

Aus der Neurologischen Klinik  
der Medizinischen Fakultät Mannheim  
(Direktor: Prof. Dr. med. Michael Platten)

# Identifizierung und Charakterisierung antigenspezifischer T-Zell-Antworten gegen Glioblastome

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der  
Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität  
zu  
Heidelberg

vorgelegt von  
Kevin Hai-Ning Lu

aus  
Essen

2022

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd  
Referent: Prof. Dr. med. Michael Platten

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	1
1 EINLEITUNG .....	5
1.1 Klinische Aspekte von Gliomen .....	5
1.2 Das Tumormikromilieu in Glioblastomen .....	7
1.3 Immuntherapeutische Ansätze im Gliom .....	9
1.4 Tumorspezifische und Tumorassoziierte Antigene .....	13
1.5 Antigen-spezifische Immuntherapie im Gliom .....	15
1.6 Fragestellung der Doktorarbeit .....	17
2 MATERIAL UND METHODEN .....	19
2.1 Material .....	19
2.1.1 Studienpatienten .....	19
2.1.2 Patientenmaterial .....	19
2.1.3 Zelllinien .....	19
2.1.4 Kulturmedien .....	20
2.1.5 Puffer .....	21
2.1.6 Peptide .....	21
2.1.7 Primer .....	25
2.1.8 Antikörper .....	25
2.1.9 Kits .....	27
2.1.10 Vektoren .....	27
2.1.11 Reagenzien und sonstiges Material .....	28
2.2 Methoden .....	28
2.2.1 Prozessierung von frischem Gliomgewebe .....	28
2.2.2 Isolation von peripheral blood mononuclear cells (PBMC) .....	29
2.2.3 Generierung von Dendritischen Zellen .....	29
2.2.4 Isolation von T-Zellen .....	30
2.2.5 Fuse-it-Transfektion .....	30
2.2.6 Generierung eines <i>in vitro</i> Testmodell mit modifizierbaren APZ und Effektorzellen .....	31
2.2.7 Transfektion .....	32
2.2.8 IFN- $\gamma$ ELISpot .....	33
2.2.9 Durchflusszytometrie .....	33
2.2.10 Anreicherung von antigen-spezifischen T-Lymphozyten .....	34
2.2.11 HLA-Typisierung .....	34
2.2.12 Genexpressionsanalysen .....	34
2.2.13 RT-PCR .....	35
2.2.14 Selektion und Herstellung personalisierter Antigene .....	35
2.2.15 TZRb Sequenzierung .....	36
2.2.16 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS sorting) .....	36
2.2.17 Einzelzellsequenzierung (Single cell sequencing) .....	36
2.2.18 Graphische Darstellung und statistische Analyse .....	37

3	ERGEBNISSE .....	39
3.1	Etablierung von zellulären Methoden zur <i>in vitro</i> Untersuchung von HLA-abhängigen Immunantworten .....	39
3.1.1	Prozessierung von primären Dendritischen Zellen .....	39
3.1.2	Transfektion von primären Dendritischen Zellen .....	40
3.1.3	Jurkat76 und K562 Zellen als modifizierbares <i>in vitro</i> Ko-Kultur-Modell 42	
3.1.4	Generierung von TZR-transgenen T-Zellen .....	44
3.2	Spezifität und Dynamik des T-Zell-Rezeptor-Repertoires in TIL-Kulturen von Glioblastom-Patienten .....	46
3.2.1	Der Effekt von <i>in vitro</i> Expansion auf das T-Zell-Rezeptor-Repertoire von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten .....	46
3.2.2	Spontane TIL-Reaktivität von Glioblastom-Patienten gegen bekannte Tumor-assoziierte Antigene (TAA) .....	49
3.2.3	Spontane TIL-Reaktivität von Glioblastom-Patienten gegen individualisierte Glioblastom-assoziierte Antigene (GAA) .....	52
3.2.4	Transkriptionelle Signaturen bestimmen die GIL-Expansion .....	55
4	DISKUSSION .....	58
4.1	<i>In vitro</i> Kultur von humanen Zellen .....	58
4.2	Risikoprofil der transgenen-T-Zell-Therapie gegen Tumorassoziierte Antigene 59	
4.3	Die Identifikation von Tumorantigenen .....	60
4.4	Tumorreaktivität von Tumordinfiltrierenden Lymphozyten .....	62
4.5	Intratumorale Heterogenität als Hürde für die Immuntherapeutische Therapie von Patienten .....	63
4.6	Perspektiven in der Glioblastomtherapie .....	64
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	66
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	68
7	TABELLARISCHER ANHANG .....	79
8	LEBENS LAUF .....	94
9	DANKSAGUNG .....	96

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Lu, KH-N *et al.* T cell receptor dynamic and transcriptional determinants of T cell expansion in glioma-infiltrating T cells. *Neurooncol Adv.* **4**, 1–13 (2022)

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK Antikörper

ALL Akute lymphatische Leukämie

APC Allophycocyanin

APZ Antigenpräsentierende Zelle(n)

ATRX X-chromosomales Alpha-Thalassämie-Geistige Retardierung-Syndrom

AZT Adoptiver T-Zelltransfer

ATCC American Type Culture Collection

BHS Blut-Hirn-Schranke

BC buffy coat(s)

CAR chimeric antigen receptor(s)

CD cluster of differentiation

CT Computertomographie

CTA cancer/testis antigen

CTAG1B cancer testis antigen 1 B

CTLA-4 cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4

DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol 2

DKFZ Deutsches Krebsforschungszentrum

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO Dimethylsulfoxid

DZ Dendritische Zelle(n)

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

EGFR epidermal growth factor receptor

ELISpot enzyme-linked immunoadsorbent spot

FACS fluorescence-activated cell sorting

FBS fetal bovine serum

FDA Food and Drug Administration

GAA Glioblastomassoziertes Antigen

GBM Glioblastom

GFP grün fluoreszierendes Protein

gp100 Glykoprotein 100

h Stunden

HLA humanes Leukozytenantigen

HOXD13 Homeobox D13

I Ionomycin

IDH Isozitatdehydrogenase

IF Immunfluoreszenz

IFN Interferon

iGAA individualized glioma-associated antigens

IgG Immunoglobulin(e) G

IKTZ Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Zelltherapie

IL Interleukin

LPS Lipopolysaccharide

M-CSF monocyte-colony stimulating factor

MACS magnetic activated cell sorting

MAGE1 melanoma associated antigen 1

MART1 melanoma antigen recognized by T cells 1

MDSC myeloid-derived suppressor cell(s)

MFI mean fluorescence intensity

MGMT O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

MHC major histocompatibility complex

min Minuten

MOG myelin oligodendrocyte glycoprotein 4

mRNA messenger RNA

MRT Magnetresonanztomographie

Mut mutiert

NCT National Clinical Trial

NGS next generation sequencing

NIH National Institute of Health

NOA Neuroonkologische Arbeitsgemeinschaft

NY-ESO-1 New York esophageal squamous cell carcinoma 1

OP Operation

PBMC peripheral blood mononuclear cell(s)

PBS phosphate-buffered saline

PCR polymerase chain reaction

PD1 programmed cell death protein 1

PD1-L programmed cell death protein 1 ligand

PET Positronenemissionstomographie

PGE-2 Prostaglandin E2

PI Propidiumiodid

PMA Phorbol-12-myristat-13-acetat

RCh Radiochemotherapie

RF Raumforderung

RNA ribonucleic acid

RNAseq RNA-Sequenzierung

sGAA shared glioblastoma-associated antigens

TAA tumorassoziertes Antigen

TAP transporter associated with antigen processing

Teff T-Effektorzelle

TGF- $\beta$  transforming growth factor  $\beta$

TIL tumorinfiltrierende Lymphozyten

TMZ Temozolomid

TNF- $\alpha$  Tumornekrosefaktor  $\alpha$



Treg regulatorische T-Zelle

TSA tumorspezifische(s) Antigen(e)

TZR T-Zellrezeptor

WES Whole-Exome-Sequenzierung

WHO World Health Organization

wt Wildtyp

ZNS Zentrales Nervensystem

# 1 EINLEITUNG

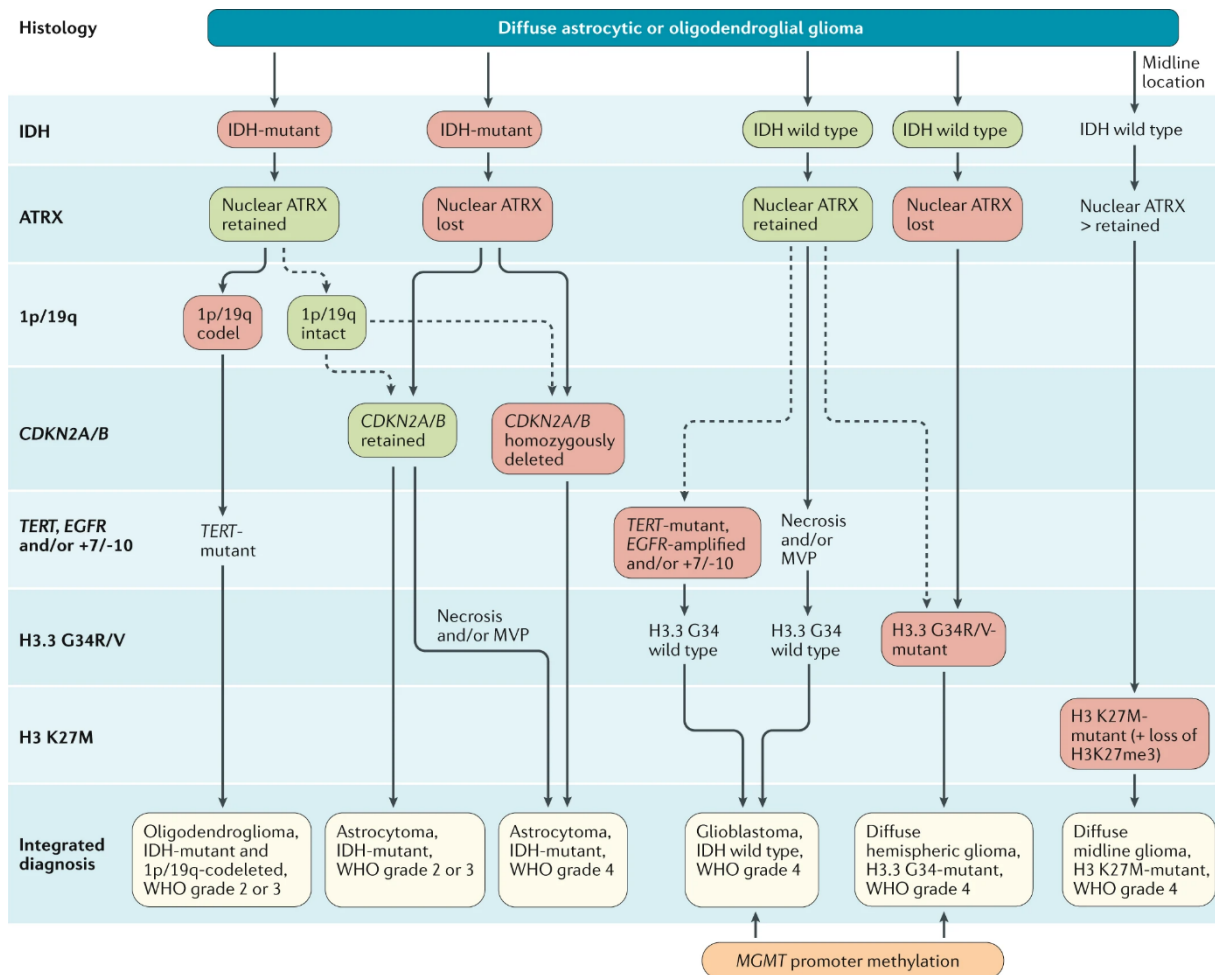
## 1.1 Klinische Aspekte von Gliomen

Gliome gehören zu den häufigsten Hirntumoren im zentralen Nervensystem (ZNS) mit einer Inzidenz von fünf Fällen pro 100.000 Einwohnern<sup>1</sup>. Mehr als die Hälfte hiervon sind WHO Grad IV Glioblastome. Sie sind definiert durch eine besonders schlechte Prognose<sup>2</sup> und machen etwa 30% aller primärer Hirntumore aus<sup>3</sup>. Symptomatisch auffällig werden Patienten mit Hirntumoren häufig durch diffuse Kopfschmerzen oder erstmalig auftretende epileptische Anfälle. Weitere klinische Symptome können Persönlichkeitsveränderungen, neurologische Herdsymptome oder Hirndruckzeichen wie Erbrechen und Vigilanzminderung sein. Diagnostisch wegweisend ist eine radiologische Untersuchung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) mit Kontrastmittelgabe in mindestens zwei Ebenen. Ein Glioblastom stellt sich meist als Raumforderung mit einer zentralen hypointensen, inhomogenen und einer randständig Kontrastmittel-anreichernden Zone dar. Die Raumforderung kann zusätzlich von einem perifokalen Ödem umgeben sein. Falls das MRT keine sichere Diagnose liefert, sind alternative bildgebende Verfahren wie die Computertomographie oder in seltenen Fällen die Angiographie möglich. Weitere Methoden wie die Positronenemissionstomographie sind derzeit Gegenstand von verschiedenen Studien<sup>4-6</sup>. Auch die Resektion von Hirntumoren kann eine diagnostische Funktion erfüllen; sie erlaubt die histopathologische und molekulare Klassifizierung des Tumors und ist damit wegweisend für die weitere Therapie.

Unterteilt werden Gliome unter anderem in Astrozytome, Oligodendrogliome, Ependymome und Glioblastome. Seit 2007 werden sie von der WHO entsprechend dem Grad der Malignität in Stufen I- IV eingeteilt, wobei Stufe I die benignesten und Stufe IV die malignesten Tumore darstellen<sup>7</sup>. Die Einteilung erfolgt auf Basis von histopathologischen Kriterien wie Nekrosen, mikrovaskulären Proliferationen, Mitosen und Kernatypien und ist ein guter Prädiktor für die Prognose von Gliom-Patienten. Zu den WHO°I-Gliomen gehört vor allem das pilozystische Astrozytom. Zu den WHO°II-Gliomen gehören unter anderem Oligodendrogliome und diffuse Astrozytome. WHO°III-Gliome sind anaplastische Astrozytome und Oligodendrogliome. Die häufigste Gliom-Entität ist das WHO°IV Glioblastom (GBM), welches die schlechteste Prognose aufweist.

Ermöglicht durch neue sequenzierungsbasierten Hochdurchsatzverfahren existiert seit 2016 eine aktualisierte Version der WHO Klassifikation<sup>8</sup>. Neu dazugekommen sind molekulare Kriterien, die eine spezifische Einteilung der Gliome anhand von Genanalysen ermöglichen. Dazu gehören Mutationen in den Genen *Isocitrate dehydrogenase 1* (IDH1) und *Isocitrate*

*dehydrogenase 2* (IDH2), die Co-Deletion von 1p/19q und der ATRX-Status (*X-chromosomales Alpha-Thalassämie-Geistige Retardierung-Syndrom*). Ebenfalls lassen sich Glioblastome auf Basis der IDH-Mutation in IDH-wildtyp (IDH-wt) und IDH-mutierte (IDH-mut) Glioblastome aufteilen, wobei erstere mehr als 90% aller Glioblastome ausmachen. Daneben spielen molekulare Marker eine wichtige Rolle für die Prognose oder lassen sich wie im Fall von IDH1-Mutationen als Zielstruktur für neue Therapien nutzen<sup>9</sup>.



**Abbildung 1: Klassifikation von Gliomen.** In der neuen WHO-Klassifikation von 2016 wurden zusätzlich zu histopathologischen Kriterien auch genetische Marker integriert. Übernommen von Weller *et al.* 2020<sup>10</sup>.

Goldstandard bei der Therapie von Glioblastomen ist die Resektion des Tumors. Studien zeigten einen deutlichen Überlebensvorteil der Operation, sogar bei Patienten über 65 Jahren<sup>11</sup>. Die Resektion des Tumors ist jedoch nicht kurativ, da Glioblastome über den makroskopisch erkennbaren Tumorrand hinaus infiltrierend wachsen. Man geht also davon aus, dass auch benachbartes Hirngewebe Tumorzellen enthält. Insofern hat die Prävention von neurologischen Defiziten eine höhere Priorität als die komplette Resektion von Tumorgewebe. Patienten mit Glioblastomen werden adjuvant mit Strahlentherapie und Chemotherapie behandelt. Das Chemotherapeutikum der Wahl ist bei Glioblastomen

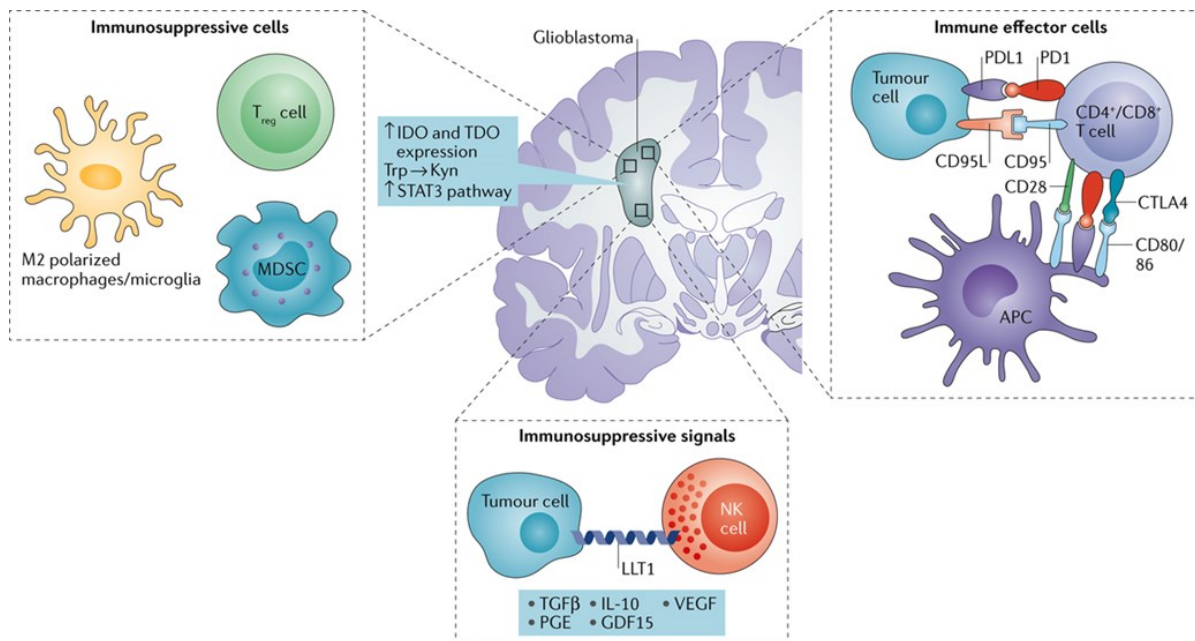
*Temozolomid*. Die Radiochemotherapie (RCh) erhöht die Überlebensrate nach 2 Jahren von 10 % auf 26 %<sup>12</sup>. Entscheidend für den Therapieerfolg ist die Methylierung des Promotors des *06-Methylguanin-DNA-Methyltransferase* (MGMT)-Gens, die mit einem besseren Ansprechen auf die Therapie mit *Temozolomid* einhergeht<sup>13</sup>. Eine besondere Hürde bei der Therapie stellt die isolierte Lage des Glioblastoms im ZNS dar. Aktuelle Studien verfolgen daher das Ziel, mit Hilfe von Nanopartikeln<sup>14</sup> oder der direkten intrathekalen Applikation der Therapeutika<sup>15</sup> die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu überwinden, die das ZNS vom restlichen Körper abschirmt. Da Patienten trotz Standardtherapie eine schlechte Prognose zeigen, stellt die Etablierung von neuen therapeutischen Modalitäten einen zentralen Forschungsschwerpunkt in der Glioblastomforschung dar. Dazu gehört auch die Immuntherapie, die in einigen Tumorentitäten bereits Erfolge gezeigt hat<sup>16</sup>.

## 1.2 Das Tumormikromilieu in Glioblastomen

Die Immuntherapie für Glioblastom-Patienten folgt ähnlichen Prinzipien wie die Immuntherapie in anderen Entitäten, bietet aber spezielle Herausforderungen durch die besondere immunologische Position des ZNS<sup>17</sup>. Verschiedene Mechanismen wurden postuliert, die das Hirn als immunprivilegiertes Organ vor unerwünschter Inflammation schützen sollten. Dazu zählen die Abschirmung von der Peripherie durch die BHS und eine Abwesenheit von traditionellen lymphatischen Drainagewegen. Diese Sichtweise ist heute veraltet<sup>18</sup>. So kommt es im Verlauf der Tumorerkrankung zu einer erhöhten Permeabilität der BHS und einer Immuninfiltration des Tumors mit Effektor-CD8+ T-Zellen<sup>19,20</sup>. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Lymphwege parallel der Sinus verlaufen, die das ZNS mit zervikalen Lymphknoten verbinden und dort eine relevante Antigenpräsentation stattfinden kann<sup>21</sup>.

Eine zusätzliche Herausforderung in der Glioblastom-Therapie ist das immunsuppressive Tumormikromilieu<sup>22</sup>. Dieses Mikromilieu wird gebildet von Tumorzellen sowie anderen immunsuppressiven Zellen wie regulatorischen T-Zellen (T<sub>regs</sub>), tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) und myeloiden Suppressorzellen (MDSCs engl. *Myeloid-derived suppressor cells*). Diese Zellen inhibieren eine potente antitumorale Immunantwort der T-Zellen durch direkte Zell-Zell-Interaktionen sowie durch Sekretion von immunsuppressiven Faktoren. Einer der wichtigsten Mechanismen für die direkte Zell-Zell-Interaktion zwischen Tumor und antitumoralen T-Zellen sind immunregulatorische Immun-Checkpoint Rezeptoren. Dazu gehören *Programmed cell death protein 1* (PD-1) und *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA-4) auf T-Zellen. Studien haben gezeigt, dass ihre Liganden auf Glioblastomzellen überexprimiert sind<sup>23</sup>. Bei der Zell-Zell-Interaktion zwischen Tumorzelle und T-Zelle verhindern diese Checkpoint-Rezeptoren die Aktivierung der T-Zellen und induzieren

stattdessen Apoptose<sup>24</sup>. Ein wichtiger Ansatz in der Tumormimmuntherapie ist es, diesen Mechanismus mittels Checkpoint-Inhibitoren zu blockieren. Zu den sezernierten, immunregulierenden Zytokinen gehören unter anderem IL-10, TGF- $\beta$ , Prostaglandin E und NO<sup>25-28</sup>, welche zur weiteren Rekrutierung von immunsuppressiven Zellen wie T<sub>regs</sub> und Makrophagen führen<sup>29,30</sup>. Während T<sub>regs</sub> im gesunden Körper wichtig für die Modulation der Immunantwort und die Prävention vor überschießender Inflammation sind, führen sie im Glioblastom zu Immunevasion und unterstützen das Tumorwachstum<sup>31</sup>. Sie können ebenfalls inhibitorische Checkpoint-Rezeptoren exprimieren und produzieren TGF- $\beta$  und IL-10<sup>31,32</sup>. TAMs werden vom Tumor durch die Sekretion von *Monocyte-Colony Stimulating Factor* (M-CSF) und anderen Zytokinen rekrutiert und zeigen im Glioblastom präferentiell einen immunsuppressiven M2-Phänotyp<sup>33</sup>. Im Gegensatz zu proinflammatorischen M1-Makrophagen supprimieren Makrophagen vom M2-Phänotyp die Immunantwort und zeigen eine verminderte Phagozytose und Antigenpräsentation<sup>34</sup>. Eine dritte, heterogene Population bilden MDSCs, myeloide Vorläuferzellen, die über die Rekrutierung von T<sub>regs</sub> und die Inhibition von CD4+ und CD8+ T-Zellen ebenfalls eine wichtige, immunsuppressive Rolle im Gliom spielen<sup>35</sup>. Zusammengefasst bilden Gehirntumoren im Zusammenspiel mit verschiedenen Immunzellen ein komplexes, immunsuppressives Mikromilieu. Um Gliom-Patienten erfolgreich zu behandeln, müssen diese Faktoren verstanden und Lösungsansätze gefunden werden.



Nature Reviews | Neurology

**Abbildung 2: Das immunsuppressive Tumormikromilieu im Glioblastom.** Das immunsuppressive Mikromilieu resultiert aus einem Zusammenspiel von Tumorzellen und immunsuppressiven Zellen wie Makrophagen und MDSCs. Über direkte Rezeptor-Liganden Interaktionen wie beispielsweise PD-1/PD-L1 und indirekte Regulation mittels Zytokinrektion wie Interleukin-10 (IL-10) und *Transforming Growth Factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) kommt es im Glioblastom zu einer Hemmung der antitumoralen Immunantwort. Übernommen von Weller *et al.* 2017<sup>36</sup>.

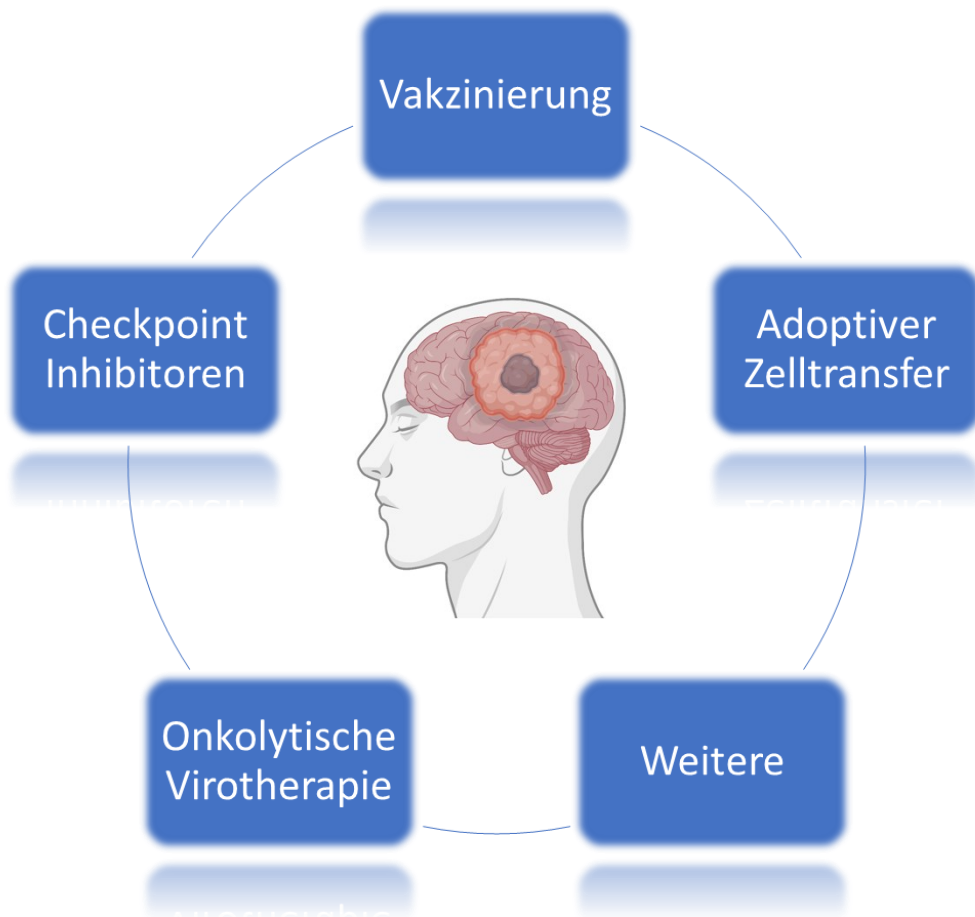
### 1.3 Immuntherapeutische Ansätze im Gliom

Genetische Mutationen und epigenetische Veränderungen im Tumor können zur Bildung von Tumorantigenen führen<sup>37,38</sup>. Diese können vom Körper als fremd erkannt werden und daraufhin zu einer antitumoralen Immunantwort führen. Von zerstörten Tumorzellen freigesetzte Antigene können wiederum durch lymphatische Wege in die Peripherie gelangen oder von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) eingefangen und präsentiert werden<sup>21</sup>. In den Lymphknoten erfolgt das „Priming“ von T-Zellen. Naive T-Zellen kommen dort mit Tumorantigenen in Kontakt und differenzieren sich zu zytotoxischen CD8+ T-Zellen oder CD4+ Helferzellen. Diese Aktivierung erfolgt über drei Signale<sup>39,40</sup>. Das prozessierte Antigen wird über das MHC-Molekül der APZ präsentiert und von einem entsprechenden T-Zellrezeptor erkannt. Eine zweite Rezeptor-Liganden-Interaktion steuert die Aktivierung oder Inhibierung des Signals. Zu den aktivierenden Signalen auf APZ gehören CD80, CD137L und CD70, die auf T-Zellen entsprechend CD28, 4-1BB und CD27 binden. Zu den inhibitorischen Signalwegen zählen PD-1 und CTLA-4, die auf T-Zellen exprimiert werden und mit CD80 und PD-L1 interagieren. Eine weitere essentielle Rolle spielen Zytokine, die von verschiedenen beteiligten Immunzellen ausgeschüttet werden und die Differenzierung der Effektorzellen kontrollieren<sup>41</sup>.

Aktiviert T-Zellen migrieren zum Tumor und überwinden unter Hilfe von Chemokinen wie CXCL9 und CXCL10 die BHS<sup>42</sup>. Wenn Tumorzellen von aktivierten CD8+ T-Zellen erkannt werden, werden diese unter Bildung einer immunologischen Synapse zwischen MHC-Epitop der Tumorzelle und dem tumorantigenspezifischen TZR der CD8+ Effektorzelle lysiert<sup>43</sup>. Unterstützt werden sie dabei von CD4+ T-Zellen, die die Immunantwort durch die Sekretion von stimulierenden Zytokinen wie Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und Tumornekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) verstärken<sup>44</sup>. T-Zellen sind die Hauptmediatoren für die antitumorale Immunantwort des Körpers. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Zahl der T-Zellen mit einem Überlebensvorteil für Krebspatienten korreliert<sup>45</sup>. Therapiestrategien in der Immuntherapie umfassen die de novo Generierung oder die Stärkung bereits bestehender antitumoraler Immunantworten, sowie die Hemmung der Immunevasion durch den Tumor.

Aktuelle Studien zur immuntherapeutischen Behandlung von Gliomen folgen meist etablierten Therapieansätzen aus anderen Tumorentitäten<sup>46</sup>, erfordern aber im Glioblastom besondere Modifikationen. Wie bereits erläutert muss bei der Applikation von Medikamenten die Isolation des ZNS durch die BHS beachtet werden. Daneben ist besonders im ZNS auf eine nebenwirkungsarme Therapie zu achten, da diese mit schwerwiegenden und oft irreversiblen

Folgen einhergehen kann. Immuntherapeutische Ansätze, die zurzeit im Glioblastom untersucht werden, umfassen unter anderem Immuncheckpoint Inhibitoren, Onkolytische Virotherapie, Vakzinierungen und Adoptiver Zelltransfer (AZT).



**Abbildung 3: Immuntherapeutische Modalitäten im Glioblastom.** Die Immuntherapie in Gliomen folgt ähnlichen Ansätzen wie die allgemeine Krebsimmuntherapie und fußt unter anderem auf Vakzinierungen, zellbasierten Therapien, Checkpoint-Inhibitoren und Onkolytischen Virotherapien. Eine große Rolle spielt in der aktuellen Forschung die Kombination der einzelnen Modalitäten. Eigene Darstellung.

Im Tumor führt die Überexpression von inhibitorischen Checkpoint-Molekülen wie PD-1 und CTLA-4 sowie ihrer Liganden zu einer insuffizienten Immunantwort<sup>4748</sup>. Die Blockade dieser inhibitorischen Moleküle und ihrer Liganden durch monoklonale Antikörper verhindert die Suppression von Immunantworten und kann die T-Zellantwort stärken. Zahlreiche solcher regulatorischer Rezeptor-Liganden-Interaktionen wurden in den letzten Jahren entdeckt und bereits in einigen Studien erfolgreich gezielt inhibiert<sup>49</sup>. Von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) ist die Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren für viele Entitäten wie Melanome, nicht-kleinzellige Lungenkarzinome, Nierenzellkarzinome, HNO-Tumore,

Urothelkarzinome, Blasenkarzinome, Hodgkin-Lymphome, Hepatozelluläre Karzinome und Tumore mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI) zugelassen<sup>50</sup>. Aufbauend auf den erfolgsversprechenden Ergebnissen in anderen Entitäten wurde der therapeutische Effekt von Checkpoint Inhibitoren auf Patienten mit rezidivierendem Glioblastom in mehreren klinischen Studien untersucht. Während erste Studien (*CheckMate143*; *CheckMate498*)<sup>51,52</sup> kein verlängertes Überleben für die behandelten Patienten zeigten, konnten in drei neueren, unabhängigen Studien positive Effekte von neoadjuvanter PD-1-Therapie auf Glioblastome gezeigt werden<sup>53–55</sup>.

Alternativ untersuchen mehrere Studien aktuell den therapeutischen Effekt von Vakzinierungen auf Tumore. Die Vakzinierungen erfolgen in Form von RNA- und Peptidvakzinierungen oder gebunden an APZ. Zusätzlich werden immunstimulatorische Adjuvantien wie *Poly-ICLC* hinzugefügt, um die Immunantwort zu „boostern“. In Melanom-Patienten konnten in mehreren klinischen Studien bereits starke antigenspezifische T-Zell-Antworten generiert werden<sup>56–58</sup>. In mehreren Phase-I-Studien konnte gezeigt werden, dass Vakzinierungen auch in Glioblastomen sicher anwendbar sind. In einer Phase-III-Studie erhielten Glioblastom-Patienten neben der Standardtherapie zusätzlich eine Behandlung mit autologen Dendritischen Zellen (DZ), welche mit Tumorlysate kultiviert wurden (DCVax-L) und zeigten dabei ein verbessertes, medianes Gesamtüberleben von 23,1 Monaten nach Operation<sup>59</sup>. Im Rahmen neuer Studien werden besonders Multipeptidvakzinierungen und personalisierte Vakzine intensiv erforscht. Ligandomanalysen und Sequenzierungsdaten erlauben die Etablierung von patientenspezifischen Vakzinen, die bereits erfolgreich in Glioblastom-Patienten getestet werden konnten<sup>60,61</sup>.

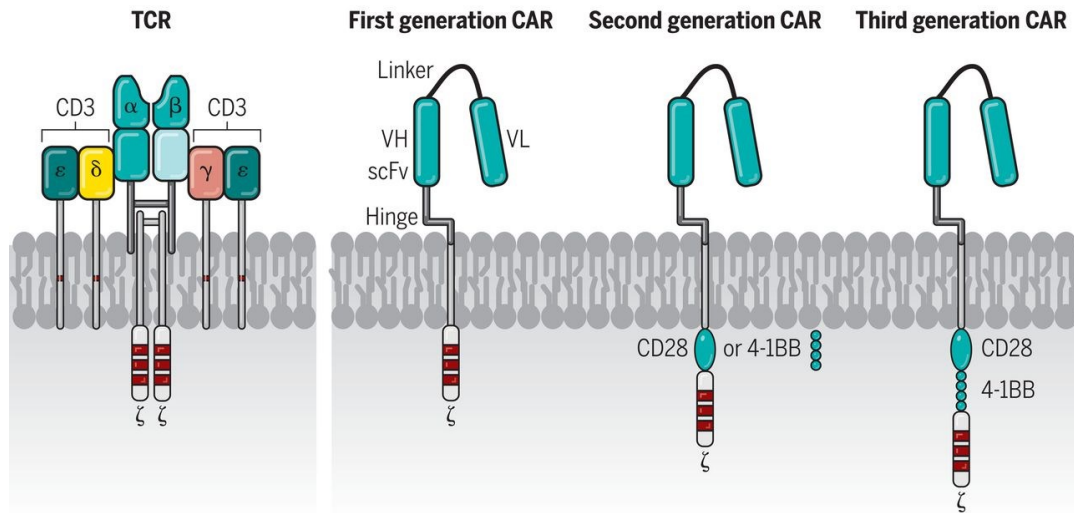
Für zelluläre Immuntherapien werden expandierte, autologe Zellen und genetisch modifizierte Zellen wie beispielsweise transgene T-Zellen und CAR-T-Zellen verwendet. Tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) werden aus Tumormaterial gewonnen und können nach *in vitro* Expansion in den Patienten zurückgeführt werden. Ziel ist zum einen, erschöpfte TIL wieder zu aktivieren und zum anderen, *ex vivo* die Tumorspezifität zu erhöhen. Durch adoptiven Transfer von TIL konnte in Studien eine Komplettremission des Tumors in Patienten mit metastasiertem Melanom erreicht werden<sup>62</sup>. In Gallengangskarzinomen<sup>63</sup> und metastasierten Mammakarzinomen<sup>64</sup> führte der adoptive Transfer von TIL in klinischen Studien zu einem stabilen Krankheitsverlauf. Auch im Glioblastom können TIL isoliert und *in vitro* expandiert werden. Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten hat sich der adoptive Transfer von TIL im Glioblastom jedoch als ineffizient erwiesen<sup>65</sup>. Sie weisen geringe Zytotoxizität und starke Erschöpfung auf. Zusätzlich haben Studien in den letzten Jahren gezeigt, dass das TIL Kompartiment sehr heterogen ist und ein Großteil der Zellen nicht tumorreaktiv ist<sup>66</sup>. Um die Effizienz der Therapie zu erhöhen, wird daher aktuell nach Markern



für tumorspezifische TIL gesucht. PD-1 und 4-1BB haben sich als gute Marker gezeigt, welche genutzt werden können, um reinere Population zu generieren<sup>67,68</sup>.

Eine alternative Strategie ist die genetische Modifikation von T-Zellen mit tumorreaktiven T-Zell-Rezeptoren (TZR) oder chimären Antigenrezeptoren (CAR). Im Gegensatz zum AZT mit TIL sind diese Therapiemodalitäten nicht durch das Vorhandensein von Tumorgewebe limitiert. Stattdessen können periphere T-Zellen aus dem Blut isoliert und genetisch modifiziert werden, um reine Effektorpopulationen zu produzieren. Die Generierung der Zellpopulationen ist für beide Therapiemethoden aufwendig und technisch anspruchsvoll. Um eine effektive transgene T-Zelle zu erzeugen, muss zunächst ein entsprechender TZR identifiziert werden. Die Identifikation ist ein aufwendiger Prozess und geschieht zum Beispiel durch *in vitro* Ko-Kulturen, in denen Tumorantigen-präsentierende Zellen mit T-Zellen kultiviert werden. Die tumorreaktiven T-Zellen können dann sequenziert werden, um den entsprechenden TZR zu isolieren. Alternativ werden auch humanisierte Mäuse verwendet, die mit Peptiden vakziniert werden. Nach Identifikation der TZR werden diese in ein Vektorsystem kloniert und anschließend mittels viraler Transduktion in T-Zellen exprimiert. In mehreren Studien konnte bereits ein klinischer Nutzen der transgenen T-Zell-Therapie festgestellt werden<sup>69,70</sup>.

Für die Generierung von CAR-T-Zellen werden synthetische Rezeptoren verwendet. Aus Antikörpern abgeleitete antigenspezifische Rezeptoren (*single chain variable fragment, scFv-Fragment*) werden mit intrazellulären T-Zell-aktivierenden Domänen fusioniert<sup>71</sup>. Dazu gehört neben der CD3 $\zeta$ -Kette auch ein kostimulatorisches Signal wie CD28 oder 4-1BB. Diese CAR-Rezeptoren sind antigenspezifisch und benötigen dabei keine Präsentation über MHC-Moleküle oder Kostimulation. Dadurch sind sie nicht auf bestimmte HLA-Typen beschränkt und können in verschiedenen Patienten mit entsprechenden Epitopen eingesetzt werden<sup>72,73</sup>. CAR-T-Zellen sind jedoch, im Gegensatz zu transgenen T-Zellen, auf Oberflächenmarker beschränkt. Große Erfolge konnten durch den Adoptiven Transfer von CD19-spezifischen CAR-T-Zellen bei Akuten lymphatischen Leukämien (ALL) der B-Zellreihe erreicht werden. In Europa zugelassen sind CAR-T-Zellen gegen CD19-Oberflächenmarker mittlerweile bei lymphoblastischen B-Zell-Leukämien, diffusem großzelligem B-Zell-Lymphom und primärem mediastinalem großzelligem B-Zell-Lymphom. In Glioblastomen wurden bisher nur wenige CAR-T-Zell-Studien durchgeführt. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass CAR-T-Zellen Gliome infiltrieren und zu Regression führen können<sup>74</sup>. Erschwert wird die Therapie durch das immunsuppressive Mikromilieu und die Heterogenität des Tumors, die unter Therapie häufig zu einem Antigenverlust führt<sup>75</sup>.



**Abbildung 4. Vergleich von transgenen T-Zellen und CAR-T-Zellen.** Die transgene T-Zelle mit einem traditionellen T-Zell-Rezeptor, während die CAR-T-Zellen einen synthetischen, aus Antikörpern abgeleiteten Rezeptor besitzen. Übernommen von June *et al.* 2018<sup>71</sup>

## Tumorspezifische und Tumorassoziierte Antigene

### 1.4 Tumorspezifische und Tumorassoziierte Antigene

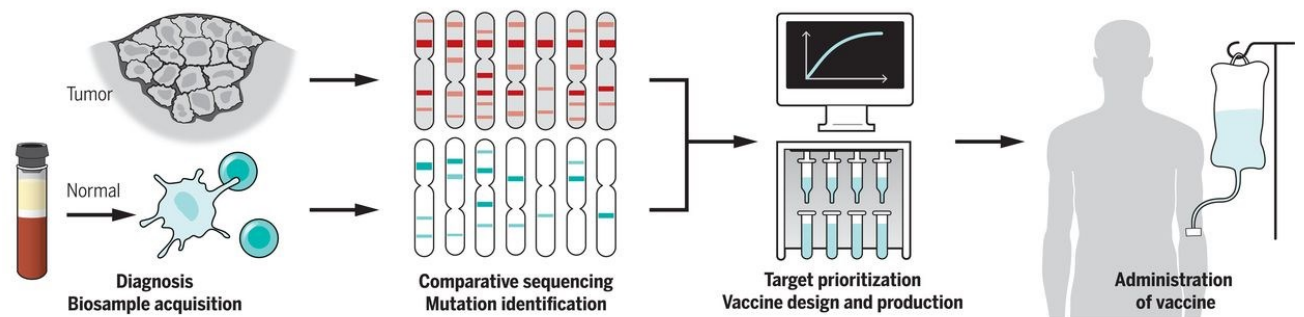
Wie auch in anderen Tumorentitäten ist die personalisierte Immuntherapie ein Gegenstand intensiver Forschung in malignen Gliomen. Individuelle Zielantigene werden mit Hilfe von Hochdurchsatzverfahren bestimmt und anschließend für personalisierte Vakzinierungen oder den Adoptiven Transfer mit antigenspezifischen Effektorzellen genutzt. Tumorantigene lassen sich dabei in verschiedene Kategorien einteilen. Durch Tumormutationen entstehen Tumorspezifische Antigene (TSAs) bzw. Neoepitope. Tumorassoziierte Antigene (TAA) dagegen sind unmutierte Antigene, die präferentiell im Tumor exprimiert sind.

Mutationen im Tumor führen zur Entstehung von neuen Peptidsequenzen, welche von T-Zellen als Fremdanigene erkannt werden können. Die Zahl an Neoantigenen zeigte in Studien eine positive Korrelation mit der Infiltration des Tumors mit TIL und einem verbesserten Ansprechen von Checkpoint-Inhibitoren<sup>76</sup>. Dies ist ein Indiz dafür, dass Neoepitope eine wichtige Zielstruktur für T-Zellen darstellen. Im Melanom konnten bereits vielversprechende Resultate mit Neoepitop-spezifischen AZT erzielt werden. Ein Beispiel im Glioblastom ist die IDH1R132H-Mutation, die häufig bei sekundären Glioblastomen auftritt<sup>77</sup> und bereits in klinischen Vakzinierungs-Studien getestet wird.

Überexpressionen von TAA in Tumoren entstehen hingegen durch Dysregulationen in Signalwegen. Aufgrund ihrer zeitlich oder örtlich begrenzten Expression im Normalgewebe können diese Autoantigene trotz fehlender Mutationen als fremd erkannt werden. Eine Untergruppe sind Differenzierungsantigene, die gewebespezifisch produziert werden. Dadurch sind sie typisch für das Ursprungsgewebe, aus dem der Tumor entsteht. Ein Beispiel ist gp100, welches auf gesunden Melanozyten und überexprimiert auf malignen Melanomzellen zu finden ist<sup>78</sup>. Tatsächlich zeigen sich häufig spontane, gp100-spezifische Immunantworten in Melanom-Patienten. Eine weitere Untergruppe sind die sogenannten *Cancer/Testis Antigene* (CTA), deren Expression im gesunden Gewebe auf den Hoden begrenzt ist<sup>38</sup>. Als erstes Tumorantigen überhaupt wurde das CTA MAGE-A1 1991 entdeckt<sup>79</sup>. Mittlerweile sind mehr als 200 solcher Gene beschrieben<sup>80</sup>. Durch die Blut-Hoden-Schranke sowie die fehlende Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen auf Keimzellen kann eine Überexpression im Tumor zu einer Immunantwort führen. Gleichzeitig sind dadurch die Keimzellen während einer CTA-spezifischen Tumorthherapie vor Nebenwirkungen geschützt.

Während die Identifikation von Tumorantigenen früher sehr zeit- und arbeitsintensiv war, ist sie mittlerweile durch die breite Verfügbarkeit von Mutations- und Genexpressionsanalysen stark vereinfacht. Im Vergleich mit gesundem Gewebe, welches ebenfalls sequenziert wird, können Mutationen sowie die Überexpression von Tumorantigenen festgestellt werden. Um eine möglichst potente Immunantwort zu generieren, müssen die gewählten Antigene eine tumorspezifische Expression bzw. Überexpression zeigen. Außerdem muss die Expression im Normalgewebe limitiert sein, um therapieassoziierte Toxizität zu vermeiden. Des Weiteren sollten die Antigene möglichst homogen exprimiert werden, damit es unter Therapie nicht zum Antigenverlust und anschließendem Rezidiv kommt. Nach der Identifikation von potenziellen Tumorantigenen folgen häufig *in silico* Prädiktionen, um auf Basis der HLA-Allele des Patienten vielversprechende Epitope vorherzusagen. Zu den neuen Algorithmen zählen unter anderem NetMHCpan<sup>81</sup>, IEDB und EpitoolKit<sup>82</sup>. Neben der Bindungsaffinität von Antigenen, können neue Prädiktionsalgorithmen auch die Wahrscheinlichkeit für die proteasomale Degradation und den Transport zur Zelloberfläche für Epitope vorhersagen. Ein alternativer Ansatzweg zur Bestimmung potenzieller Tumorantigene, sind HLA-Ligandomanalysen. Das HLA-Ligandom bezeichnet alle Peptide, die von HLA-Molekülen einer Zelle präsentiert

werden. Es kann aus Tumorgewebe isoliert und mittels Massenspektrometer analysiert werden.



**Abbildung 5: Personalisierte Vakzinierung für Tumorpatienten.** Die personalisierte Therapie beruht auf dem Vergleich des Genprofils von Tumor- und Normalgewebe. Sie erlaubt die Priorisierung und damit Auswahl der Zielantigene. Hier dargestellt ist der Arbeitsablauf mit Fokus auf Neoepitope. Übernommen von Sahin *et al.* 2018<sup>83</sup>

## 1.5 Antigen-spezifische Immuntherapie im Gliom

Im Glioblastom erfolgten erste Versuche der tumorspezifischen Therapie mittels Vakzinierung mit bestrahlten autologen Tumorlysaten<sup>84</sup>. Hochdurchsatzverfahren haben in den letzten Jahren ermöglicht, diese Therapien deutlich weiterzuentwickeln. So gibt es aktuell einige vielversprechende Ansätze, die in klinischen Studien getestet werden.

Eine IDH1-Punktmutation tritt in etwa 70-80% aller WHO°II und °III Gliome auf. Dabei tritt ein Austausch von Arginin zu Histidin an Position 132 (IDH1R132H) auf. Es konnte gezeigt werden, dass die IDH1R132H Mutation in einem immunogenen Epitop resultiert und als MHC-Klasse-II-Epitop von CD4+-T-Helferzellen erkannt wird<sup>9</sup>. Vakzinierungen in einem humanisierten Mausmodell induzierten eine Immunantwort in antigenspezifischen CD4+-Helferzellen und führten zu einem verminderten Tumorwachstum in Mäusen mit einem IDH1-mutierten Tumor im Vergleich mit Mäusen mit einem IDH1-Wildtyp Tumor. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Patienten spontane IDH1R132H-spezifische Immunantworten aufweisen können. Auf Basis dieser Ergebnisse werden zurzeit Peptidvakzinierungen gegen IDH1 R132H in drei Phase-I-Studien getestet (NOA-16 NCT02454643; RESIST NCT02193347; NOA-21/AMPLIFY-NEOVAC NCT-2016-0458).

EGFRvIII, die mutierte Form von EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), ist in 25-30% aller Glioblastome exprimiert und bildet ein immunogenes Neoepitop<sup>85</sup>. Vielversprechende Vorstudien in EGFRvIII-mutierten Glioblastom-Rezidiven führten zu einer internationalen

Phase-III-Studie, in der Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastomen eine Peptidvakzinierung gegen EGFRvIII (*Rindopepimut*) appliziert wurde<sup>86</sup>. Obwohl die Vakzinierung eine antigenspezifische Immunantwort erzeugen konnte, führte die Therapie nicht zum Überlebensvorteil für vakzinierete Patienten. Zu einem ähnlichen Ergebnis führte eine CAR-T-Zell-Studie mit EGFRvIII-spezifischen CAR-T-Zellen in 10 Glioblastom-Patienten<sup>87</sup>. Die Therapie führte ebenfalls zu keinem signifikanten Überlebensvorteil für die behandelten Patienten, obwohl in histologischen Analysen eine Migration der CAR-T-Zellen in den Tumor beobachtet werden konnte. Auch in einer dritten Studie mit anti-EGFRvIII-Car-T-Zell-Therapie in Kombination mit lymphodepletierender Chemotherapie für Patienten mit GBM-Rezidiven zeigten sich Antigenverlust und damit einhergehende Rezidive<sup>88</sup>.

IL-13R $\alpha$ 2 ist ein TAA mit häufiger Überexpression in Glioblastomen und restriktiver Expression in gesundem Gewebe. In einer Fallstudie induzierte die Therapie mit IL-13R $\alpha$ 2-spezifischen CAR-T-Zellen eine starke Immunantwort mit kompletter Remission in einem Patienten mit rezidivierendem, multifokalen GBM<sup>74</sup>. Die Therapie wurde über einen Zeitraum von über 220 Tagen intrakraniell appliziert, zunächst in die Operationshöhle, anschließend ventrikulär.

Die erste erfolgreiche Studie mit AZT verwendete genetisch modifizierte T-Zellen mit einem schwach bindenden TZR gegen das TAA MART-1 in 17 Patienten mit metastasiertem Melanom. Zwei Patienten zeigten eine partielle Regression des Tumors und transgene T-Zellen konnten auch ein Jahr später noch im peripheren Blut nachgewiesen werden<sup>89</sup>. Bereits mehrfach erfolgreich wurden TZR gegen das TAA NY-ESO-1 verwendet<sup>70,90</sup>. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass demethylierende Therapie mit *Decitabin* zu einer erhöhten Expression von NY-ESO-1 im Gliommodell führte und ein AZT zu einer effektiven Immunantwort und verlängertem Gesamtüberleben für die Mäuse führte<sup>91</sup>.

In Studien mit Glioblastom-Patienten hat sich mehrfach gezeigt, dass die Therapie gegen ein einzelnes Epitop zu Antigenverlust und anschließender Remission führt. Dies ist bedingt durch subklonale Expression von Antigenen im Glioblastom<sup>92</sup>. Um eine effektive Immunantwort zu erzeugen, fokussieren sich einige Studien daher auf die Entwicklung von Vakzinierungen mit multiplen Antigenen. In einer DZ-Vakzinierungsstudie erhielten 22 Patienten mit verschiedenen malignen Gliomen, darunter 13 Glioblastome, Multipeptidvakzine mit Tumorassoziierten Antigenen. Die Therapie wurde gut vertragen und 41% der Patienten blieben darunter für über 12 Monate progressionsfrei<sup>93</sup>. In einer weiteren DZ-Vakzinierungsstudie (ICT107) wurden Patienten mit 6 Glioblastom-assoziierten Antigenen vakziniert (gp100, MAGE1, AIM2, HER2, TRP2 und IL-13R $\alpha$ 2)<sup>94</sup>. Die Phase-II-Studie zeigte zwar einen Vorteil für das progressionsfreie Überleben, jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben. Eine nachträgliche Analyse zeigte, dass ein Vorteil durch

die Therapie vermutlich nur für HLA-A2-positive Patienten besteht. Auf dieser Basis wurde eine auf HLA-A2 beschränkte Phase-III-Studie initiiert, die jedoch zurzeit ausgesetzt ist. IMA950 ist eine weiteres Muropeptidvakzin, welches Glioblastom-assoziierte Antigene verwendet. Dafür wurden anhand von Ligandomanalysen insgesamt 11 Tumorantigene ausgewählt. Im Rahmen der Studie zeigten sich Immunantworten in 36 von 40 behandelten Patienten, allerdings ebenfalls kein Vorteil für das Gesamtüberleben<sup>95</sup>.

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass neben der intratumoralen Heterogenität auch die Heterogenität zwischen Glioblastom-Patienten enorm groß sein kann. Diese intertumorale Heterogenität hat therapeutische Konsequenzen, da es nur wenig geteilte Neoepitope zwischen Patienten gibt. Fortschritte in Hochdurchsatzverfahren erlauben es mittlerweile, stark individualisierte Studien durchzuführen. In zwei neuen Studien, *GAPVAC* und *NeoVax* (NCT02149225 und NCT03223103) wurde die Möglichkeit der individualisierten Vakzinierung auch im Glioblastom getestet. In der *NeoVax* Studie wurden 10 Patienten mit Glioblastom eingeschlossen<sup>61</sup>. Whole-Exome-Sequenzierung (WES) und RNA-Sequenzierung (RNAseq) wurde verwendet, um personalisierte Vakzinierungen gegen Neoepitope zu generieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Vakzinierung zur Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen führt und diese in den Tumor wandern. In der *GAPVAC*-Studie wurden zwei verschiedene Vakzine verwendet<sup>60</sup>: *APVAC1* bestand aus mehreren vorselektionierten TAA, *APVAC2* aus patienten-individualisierten Neoepitopen. Die Personalisierung wurde auf Basis von Sequenzierungs- und Ligandomanalysen durchgeführt. Interessanterweise konnten in den Ligandomanalysen der *GAPVAC*-Studie ausschließlich unmutierte TAA nachgewiesen werden. Beide Vakzine zeigten erfolgreiche Induktion von T-Zell-Antworten ohne Toxizität. Für unmutierte Peptide zeigte sich hauptsächlich eine CD8+ getragene Antwort, für Neoepitope eine hauptsächlich CD4+ basierte. Neoepitope zeigten dabei im Vergleich zu TAA keine verbesserte Immunogenität.

## 1.6 Fragestellung der Doktorarbeit

Die personalisierte, zelluläre Therapie wird für zahlreiche Tumorentitäten evaluiert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten grundsätzliche Schritte für die Entwicklung einer solchen Plattform für Glioblastom-Patienten etabliert werden. Zunächst sollten dafür *in vitro* Methoden etabliert werden, um in Ko-Kulturen von primären T-Zellen und APZ Tumorantigene und transgene TZR zu testen. Da die begrenzte Verfügbarkeit von primären Zellen eine wichtige Limitation darstellt, sollte zusätzlich ein personalisierbares Ko-Kultur-Modell etabliert werden, bestehend aus modifizierbaren APZ und Effektorzellen.

Das Ziel des zweiten Teils der Dissertation war, die Dynamik und Spezifität von T-Zell-Rezeptoren sowie die Determinanten der *in vitro* Expansion von TIL-Kulturen zu untersuchen, um den Einsatz von autologen TIL für die Zelltherapie zu explorieren. Glioblastome sind durch eine geringe Anzahl von TIL mit einem dysfunktionalen Phänotyp gekennzeichnet. Obwohl die Durchführbarkeit der Zelltherapie mit *in vitro* expandierten TIL gezeigt werden konnte, ist ihre Wirksamkeit und Determinanten für eine erfolgreiche Therapie bisher noch nicht abschließend geklärt. Im Detail sollte das TZR-Repertoire vor und nach der Expansion untersucht werden. Zusätzlich sollten Genexpressionsanalysen im Tumor durchgeführt werden, um überexprimierte Tumorassoziierte Antigene als potenzielle Zielstrukturen für die TIL-Therapie zu untersuchen und die Antigenreaktivität der TIL-Kulturen nach Expansion zu analysieren. Zuletzt sollten Einzelzellanalysen in Kombination mit funktionellen Analysen durchgeführt werden, um *ex vivo* verschiedenen, funktionellen TIL-Subgruppen Gensignaturen zuzuordnen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Studienpatienten

ID	Histologie	Molekularpathologie	Geschlecht	Alter
P1	Glioblastom	IDH wt, MGMT-Methylierung +	Weiblich	83
P2	Glioblastom	IDH wt, MGMT-Methylierung +	Weiblich	62
P3	Glioblastom	IDH2mut MGMT-Methylierung x	Männlich	66
P4	Glioblastom	IDH wt, MGMT-Methylierung +	Männlich	58
P5	Glioblastom	IDH wt, MGMT-Methylierung -	Weiblich	78
P6	Glioblastom	IDH wt, MGMT-Methylierung +	Weiblich	80
P7	Glioblastom	IDH wt, MGMT-Methylierung -	Männlich	62
P8	Glioblastom	IDH wt, MGMT-Methylierung -	Weiblich	63
P9	Glioblastom	IDH wt, MGMT-Methylierung -	Weiblich	53
P10	Glioblastom	IDH wt, MGMT-Methylierung -	Männlich	62
P11	Glioblastom	IDH wt, MGMT-Methylierung -	Weiblich	63
P12	Glioblastom	IDH wt, MGMT-Methylierung -	Weiblich	53

#### 2.1.2 Patientenmaterial

Gliomgewebe und Heparinblutproben wurden in der Neurochirurgischen und Neurologischen Klinik der Universitätsklinik Mannheim nach Einverständniserklärung der Patienten und der lokalen Regierungsbehörden (Ethikvoten: 2018-614N-MA, 2017-589N-MA, 2019-643N) gewonnen. Die Diagnose wurde in der Neuropathologie der Universitätsklinik Heidelberg gestellt. Buffy coats von gesunden Spendern wurden vom Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Zelltherapie (IKTZ) Heidelberg erworben.

#### 2.1.3 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden verwendet:



- Immortalisierte Nierenzelllinie HEK293T/17 Phoenix-ECO (ATCC) kultiviert in DMEM mit 10% FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alle Produkte von *Sigma-Aldrich*).
  - Leukämiezelllinie K562 (ATCC) kultiviert in IMDM (*ThermoFisher*) mit 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.
  - T-Zelllinie Jurkat (ATCC) und die daraus entwickelte
  - T-Zell-Rezeptor-defiziente T-Zelllinie Jurkat76 (freundlicherweise von *Uni.-Prof. Dr. med. Matthias Theobald, Universitäres Centrum für Tumorerkrankungen, Universität Mainz* zur Verfügung gestellt) kultiviert in RPMI-1640 (PAN Biotech) mit 10% FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.
- Gliomzelllinie LN229 (ATCC) kultiviert in DMEM mit 10% FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

#### 2.1.4 Kulturmedien

Bezeichnung	Reagenz	Firma
Humanes T-Zellmedium	RPMI-1640 2mM L-Glutamin 1,25 µg/ml Fungizone 10% Humanes AB-Serum 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	PAN Biotech, P04-16500 ThermoFisher, 25030081 Sigma-Aldrich; A9528 Sigma-Aldrich, H4522 Sigma-Aldrich, P4333 Sigma-Aldrich, P4333
Humanes DZ-Medium	RPMI-1640 2% Humanes AB-Serum 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1% Natrium Pyruvat Lösung 2mM Glutamax Solution	PAN Biotech, P04-16500 Sigma-Aldrich, H4522 Sigma-Aldrich, P4333 Sigma-Aldrich, P4333 Invitrogen, S8636 Gibco; 35050061
Suspensionszellmedium	RPMI-1640 10% FBS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	PAN Biotech, P04-16500 Sigma-Aldrich; F0804 Sigma-Aldrich, P4333 Sigma-Aldrich, P4333
K562 Zellmedium	IMDM 10% FBS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	ThermoFisher; 12440061 Sigma-Aldrich; F0804 Sigma-Aldrich; P4333 Sigma-Aldrich; P4333
Standard Zellmedium	DMEM 10% FBS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	Sigma-Aldrich; D6429 Sigma-Aldrich; F0804 F0804Sigma-Aldrich; P4333 Sigma-Aldrich; P4333
Gefriermedium für primäre humane Zellen	FBS 10% DMSO	Sigma-Aldrich; F0804 Carl Roth; A994.2
Standard Gefriermedium	RPMI-1640 10% DMSO	PAN Biotech; P04-16500 Carl Roth; A994.2

## 2.1.5 Puffer

Bezeichnung	Reagenz	Firma
MACS Buffer	PBS 3% FBS 10 mM EDTA	Sigma-Aldrich; D8537 Sigma-Aldrich; F0804 AppliChem; A3562.1000
FACS Buffer	PBS 3% FBS 2 mM EDTA	Sigma-Aldrich; D8537 Sigma-Aldrich; F0804 AppliChem; A3562.1000
Tetramer staining buffer	PBS 5% FBS 2 mM EDTA 0,05% NaN <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich; D8537 Sigma-Aldrich; F0804 AppliChem; A3562.1000 Sigma-Aldrich

## 2.1.6 Peptide

Zur Stimulation der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten im ELISpot wurden folgende Peptide verwendet. Angegeben ist die Überexpression des entsprechenden Transkripts als Änderungsfaktor im Tumor im Vergleich zum Kontrollgewebe. (TAA: Tumorassoziierte Antigene, GAA: Glioblastomassoziierte Antigene)

Patient	Epitop	Über- expression	HLA Typ	Peptidsequenz	Peptid- länge
<b>TAA</b>					
P1	CTAG1A_p1	2,33	HLA-A*02:01	SLLMWITQC	9
P1	IL13RA2_p1	1,76	HLA-A*02:01	WLPFGFILI	9
P1	IL13RA2_p2	1,76	HLA-A*24:02	WYEGLDHAL	9
P1	TTK	1,60	HLA-A*24:02	SYRNEIAYL	9
P1	SSX2_p1	1,58	HLA-A*02:01	RLQGISPKI	9
P1	SSX2_p2	1,58	HLA-A*02:01	KASEKIFYV	9
P2	MAGEA3	1,89	HLA-B*35:01	EVDPIGHLIY	9
P2	MAGEA6	1,81	HLA-B*35:01	EVDPIGHVY	9
P2	CTAG1A_p2	1,42	HLA-B*35:01	MPFATPMEA	10

P3	PRAME_p1	1,39	HLA-A*02:01	VLDGLDVLL	9
P3	PRAME_p2	1,39	HLA-A*02:01	SLYSFPEPEA	10
P3	PRAME_p3	1,39	HLA-A*02:01	ALYVDSLFFL	10
P3	PRAME_p4	1,39	HLA-A*02:01	SLLQHLIGL	9
P3	CXorf48	1,35	HLA-A*24:02	DYGMIDESI	9
P3	SSX2_p1	1,35	HLA-A*02:01	RLQGISPKI	10
P3	SSX2_p2	1,58	HLA-A*02:01	KASEKIFYV	9
P4	TMEFF1_p1	4,13	HLA-A*01:01	ATDYHFHFY	9
P4	ARX_p1	4,03	HLA-A*24:02	IYISYSHLAF	10
P4	SYCE1_p1	12,79	HLA-A*24:02	KYNFYLPFFF	10
P4	NR6A1	3,88	HLA-A*24:02	IWALSKFTF	9
P4	SYCE1_p2	12,79	HLA-A*24:02	KYNFYLPFF	9
P5	CCNA1_p1	15,67	HLA-A*02:01	FLDRFLSCM	9
P5	CCNA1_p2	15,67	HLA-A*02:01	SLIAAAAFCLA	13
P5	CCNA1_p3	15,67	HLA-A*02:01	GMAFEDVYEV	10
P5	CCNA1_p4	15,67	HLA-A*02:01	KVLAFDLTV	9
P5	CCNA1_p5	15,67	HLA-A*02:01	CLSELHKAYL	10
P5	CCNA1_p6	15,67	HLA-A*02:01	SLMEPPAVLLL	11
P5	IGSF11	3,93	HLA-A*02:01	ALSSGLYQC	9
P5	PLAC1_p1	3,19	HLA-A*02:01	VLCSIDWFM	9
P5	PLAC1_p2	3,19	HLA-A*02:01	HAYQFTYRV	9
P5	PLAC1_p3	3,19	HLA-A*02:01	FMLNNDVCV	9

P5	DKKL1	14,27	HLA-A*02:01	ALGGHPLLGV	
P6	ARX_p2	20,01	HLA-B*35:01	HPAFISPAF	9
P6	TPPP2	26,38	HLA-A*32:01	KTFHRFAAF	9
P6	TMEFF1_p2	32,92	HLA-B*35:01	LPAAPPLAF	9
P6	SPAG6	33,50	HLA-B*35:01	LPALPFLY	9
P6	CCNA1	104,72	HLA-B*35:01	FVYITDDTY	9
<b>GAA</b>					
P1	PRR11_p1	12,53	HLA-A*24:02	SWLTSSWNF	9
P1	CRNDE_p1	11,04	HLA-A*02:01	FIMELLYWL	9
P1	CALR	11,02	HLA-A*24:02	RFYALSASF	9
P1	PRR11_p2	12,53	HLA-A*24:02	RSWLTSSWNF	10
P1	CRNDE_p2	11,04	HLA-A*02:01	FIMELLYWLL	10
P2	HOXA3_p1	13,19	HLA-B*35:01	YPYQAANGF	9
P2	VCAM1	15,23	HLA-B*35:01	IPAIGMIY	9
P2	HOXA3_p2	13,19	HLA-B*35:01	SAIYGGYPY	9
P2	HOXA3_p3	13,19	HLA-B*35:01	YQAANGFAY	9
P2	C1orf61	15,66	HLA-B*35:01	FSMSNQDLY	9
P3	SELL_p1	9,04	HLA-C*03:04	FSFSSQCAF	9
P3	SELL_p2	9,04	HLA-C*03:04	FSFTSACTF	9
P3	DHRS2	59,50	HLA-C*03:04	AAYNPVVAL	9
P3	SOX4	20,25	HLA-C*03:04	AAAAAASF	9

P3	ID4	11,35	HLA-B*07:02	APPRTPLTAL	10
P4	LGI3_p1	342,98	HLA-A*24:02	HYQYIPHLF	9
P4	LGI3_p2	342,98	HLA-A*24:02	RYWYICQDF	9
P4	VSTM2B_p1	524,47	HLA-B*44:03	AETLYLAVNF	10
P4	VSTM2B_p2	524,47	A*01:01	GTDVINVTEY	10
P4	RPS4Y1	333,58	HLA-B*44:03	AEMVVEAEIF	10
P5	NPIP3	291,38	HLA-A*23:01	RWMLFWLLF	9
P5	CACNG4	333,34	HLA-A*23:01	HNYGWSFYF	10
P5	GRIK3_p1	310,42	HLA-A*23:01	AYLGVSCVLF	10
P5	GRIK3_p2	310,42	HLA-A*23:01	RYSGVNLTGF	10
P5	SHD	318,67	HLA-A*23:01	KWLRDYLSE	9
P6	GRIN1_p1	2.420,59	HLA-B*35:01	FAMIIVASY	9
P6	INA	2.934,11	HLA-B*35:01	MALDIEIAAY	10
P6	NEFL	3.733,91	HLA-B*35:01	MALDIEIAAY	10
P6	SULT4A1_p1	2.407,91	A*32:01	RTMSYRGTF	9
P6	GRIN1_p2	2.420,59	HLA-B*35:01	LARTMNFTY	9
P6	SULT4A1_p2	2.407,91	HLA-B*35:01	NPKDLVVS	9

Alle oben genannten Peptide wurden von *JPT* hergestellt. Als Positivkontrolle wurden die Kontrollpeptidpools PM-CEFX und PM-CEF-S (*JPT*) verwendet. Als Negativkontrolle wurde das murine *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG) p35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) und das HIV-Peptid p77-85 (SLYNTVATL) verwendet. Das MOG-Peptid wurde von *Genscript*, das HIV-Peptid von der *DKFZ Proteomics und Genomics Core Facility* synthetisiert. Die Peptide wurden in 100% Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 25 mg / ml rekonstituiert und bei -80 °C gelagert. Die Peptide wurden in

einer Konzentration von 10 µg /ml verwendet und nach maximal 3 Verwendungen (Auftauen und Einfrieren auf -80 °C) verworfen.

### 2.1.7 Primer

Folgende Primer wurden für die RT-PCR verwendet und bei *GenScript* bestellt.

Target	Forward 5' – 3'	Reverse 5' – 3'
GSX1	GCCGCCACTACCTACAACAT	ATG TCGCGATCTCGATTCTC
GSX2	ATGTCGCGCTCCTTCTATGTC	CAAGCGGGATGAAGAAATCCG
ZNF560	CCCAGTGTCATCTCTTGGTTG	ACCAGGTCCATTTGTATCCCATT
HOXD13	CTTCGGCAACGGCTACTACAG	TGACACGTCCATGTACTTCTCC
NY-ESO-1	AGCCGCCTGCTTGAGTTCTA	GCTGATGGAGAGCTGCAGTTG
PIWIL-2	AGGCAGAGGCCATGTATTTGG	AAGCATTTCCTCGTTTCAGAGG
Cxorf48	TGCAGGGAGTTGTCACAAGTT	CAGCACCATAAAGATGGCGAG
PRAME	CAGGACTTCTGGACTGTATGGT	CTACGAGCACCTCTACTGGAA
MAGEA10	CAATCCCAAAGTGAGACACAGG	GGGGTGCTTGGTATTAGAGGA

Folgende Primer wurden für die Klonierung von patientenspezifischen HLA-Kassetten verwendet und von *GenScript* produziert.

Target	Forward 5' – 3'	Reverse 5' – 3'
HLA-A	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTTCACCGATTCTCCCCAGAC GCCGAGG	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTTTTAACAAGGCAGCTGTCT CACA
HLA-B	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTTCACCCACCCGGACTCAGA RTCTCCT	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTTTTAATCTCAGTCCCTCACA AGA
HLA-C	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTTCACCTTCTCCCCAGACGC CGAGA	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTTTTAGTCTCAGGCTTTACAA GCCA

### 2.1.8 Antikörper

Fluorochrom	Bestellnummer
-------------	---------------

Fixable viability dye eFlour 450	eBioscience; 65-0864
Fixable viability dye eFlour 780	eBioscience; 65-0865
DAPI	Sigma-Aldrich; D8417-10MG

Humane Durchflusszytometer-Antikörper

Target	Fluorochrom	Klon	Bestellnummer
<b>Oberflächenmarker</b>			
4-1BB	FITC	4B4	eBioscience; 11-1379-42
CD3	PE	HIT3a	Biologend; 300308
CD3	FITC	SK7	eBioscience; 11-0036-42
CD4	Pacific Blue	RPA-T4	eBioscience; 11-0049-80
CD4	PE-Cy7	SK-3	eBioscience; 25-0047-42
CD8	PerCP Cy5.5	RPA-T8	eBioscience; 45-0088-42
CD14	PerCP Cy5.5	61D3	eBioscience; 45-0149-42
CD80	PerCP Cy5.5	2D10.4	eBioscience; 46-0809-41
CD83	PE	HB15e	eBioscience; 12-0839-42
CD86	Pacific Blue	IT2.2	Biologend; 305418
HLA-A2	APC	BB7.2	eBioscience; 17-9876-42
HLA-DR	PE-Cy7	L243	eBioscience; 25-9952-42
HLA-DR	PB	L243	eBioscience; 48-9952-42
OX-40	APC	ACT35	eBioscience; 17-1347-41
<b>Intrazelluläre Zytokine</b>			
IFN- $\gamma$	Pacific Blue	4S.B3	eBioscience; 48-7319-42
IL-2	APC	MQ1-17H12	Biologend; 500310
TNF $\alpha$	APC	MAb11	eBioscience; 17-7349-82
TNF $\alpha$	PE	MAb11	Biologend; 502908
<b>Tetramer</b>			
HLA-A2 Mart-1	PE		MBL; TB-0009-1

Quickschwitch HLA-A2	PE	MBL, TB-7300-K1
----------------------	----	-----------------

#### Murine Durchflusszytometer-Antikörper

Target	Fluorochrom	Klon	Bestellnummer/Innummer
mTCR	PE	H57-597	eBioscience; 12-5961-83
mTCR	APC	H57-597	eBioscience; 17-5961-82

#### 2.1.9 Kits

Bezeichnung	Hersteller
ALP Conjugate Substrate Kit	Bio-Rad, 1706432
CD14 MicroBeads	Miltenyi; 130-050-201
Fuse-It-mRNA	Ibidi, 60500
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	ThermoFisher; 4368814
Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set	eBioscience; 88-8824-00
MagniSort™ Human T Cell Enrichment Kit	ThermoFisher; 8804-6810-74
Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit hsTCRB Kit	Promega Adaptive Biotechnology
Maxwell® 16 LEV simplyRNA Tissue Kit	Promega
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen; 51104
QIAamp DNA Micro Kit	Qiagen; 56304
RNeasy Micro Kit	Qiagen; 74004
Myelin Removal Beads	Miltenyi Biotec; 130-096

#### 2.1.10 Vektoren

Bezeichnung	Hersteller
pDEST™26	ThermoFisher Scientific, 430228
pMXs-IRES-BsdR	Cell Biolebs Inc, RTV-016
pMXs-IRES-PuroR	Cell Biolebs Inc, RTV-014
Gateway™ pDONR™221 Vektor	ThermoFisher Scientific, 12536017



## 2.1.11 Reagenzien und sonstiges Material

Bezeichnung	Hersteller
Attune NxT System	ThermoFisher
Benzonase	Sigma-Aldrich, 9025-65-4
Brefeldin A	Sigma-Aldrich
Canto II System	BD Bioscience
DMEM	Sigma-Aldrich
FACS Clean BD	Bioscience
FACS Flow	Bioscience
FACS Shutdown Solution	Bioscience
FBS	Sigma-Aldrich
FuGene HD Transfektionsreagenz (TR)	Promega
HBSS	Sigma-Aldrich; 11088866001
Humanes AB Serum	Sigma-Aldrich; H4522
IL-2	Peptotech; 200-02
Leucosep Separationsröhrchen	Greiner bio-one, 227289
Liberase	Roche; 05401160001
Lympho-Paque	Genaxxon Bioscienc, C4754.0500
Penicillin	Gibco Life Technologies
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems; 4312704

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Prozessierung von frischem Gliomgewebe

Tumorgewebe wurde nach der Resektion in HBSS gesammelt und mit PBS gewaschen. Nekrotische Areale und Blutgefäße wurden entfernt und mehrere Stücke für spätere Genexpressionsanalysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der restliche Tumor wurde entweder zur direkten Isolation von TILs oder zur *in-vitro* Expansion von TILs verwendet.

Humane Hirntumorproben wurden zerkleinert und durch ein 100- $\mu$ m- und 70- $\mu$ m-Sieb gestrichen, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Das Myelin wurde mit *Myelin removal*

*beads* II (*Miltenyi Biotec*) entfernt. Humane Proben wurden in 90% FBS / 10% DMSO eingefroren und am Tag der Analyse aufgetaut.

Zur *in-vitro* Expansion von TILs wurde der Tumor in 2 mm \* 2 mm große Stücke geschnitten und je 2-3 Stücke pro Loch in einer 24-Loch-Zellkulturplatte für 2 Wochen in humanem T-Zellmedium mit 1000 U/ml IL-2 und 30 ng/ml aCD3 (OKT-3) (*eBioscience*) kultiviert. Danach wurden die Zellen direkt für Analysen, ELISpot und Ko-Kultur-Versuche verwendet oder für die spätere Verwendung eingefroren.

### 2.2.2 Isolation von peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

PBMC wurden entweder aus frischem Heparinblut oder aus Buffy coats isoliert. Die Isolation wurde mittels Dichtezentrifugation mit *Lympho-Paque* (*Genaxxon Bioscience*) durchgeführt. Die PBMCs wurde anschließend für die Isolation von T-Zellen und Dendritischen Zellen verwendet oder für spätere Versuche eingefroren.

### 2.2.3 Generierung von Dendritischen Zellen

Zur Generierung von Dendritischen Zellen wurden zunächst CD14<sup>+</sup> Monozyten aus PBMCs isoliert und diese anschließend über einen Zeitraum von 3 Tagen zu Dendritischen Zellen ausgereift. Die Isolation von CD14<sup>+</sup> Monozyten aus PBMCs erfolgte mithilfe von CD14<sup>+</sup> *MicroBeads* (*Miltenyi*) nach Angaben des Herstellers. Zunächst wurden die PBMCs gewaschen, anschließend je 10<sup>7</sup> Zellen in 80 µl MACs Puffer resuspendiert und mit 20 µl magnetischen CD14 *MicroBeads* gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4°C wurden die Zellen erneut gewaschen und in 500 µl MACS Puffer je 10<sup>8</sup> Zellen aufgenommen. Zuletzt wurde die Fraktion der magnetisch markierten Monozyten mit Hilfe von LS Rörchen (*Sigma-Aldrich*, L5293) in einem *MACS Separator* (*Miltenyi*) isoliert.

Die so gewonnenen Monozyten wurden in DZ-Kulturmedium aufgenommen und für 48 H mit 1000 U/ml GM-CSF (*Peprotech*), 500 U/ml IL-4 (*Peprotech*) kultiviert. Anschließend wurden 10 ng/ml IL-1β (*Peprotech*), 10 ng/ml IL-6 (*Peprotech*), 1000 U/ml TNFα (*Peprotech*) und 1000 ng/ml Prostaglandin-E2 (*Sigma-Aldrich*) hinzugefügt und die Zellen für weitere 24 H im Inkubator maturiert. Die so maturierten Dendritischen Zellen wurden mit gekühltem PBS abgelöst und für Transfektionen und Ko-Kulturen verwendet.

Für das Einfrieren wurden die PBMC oder DZ in auf Raumtemperatur vorgewärmtes FBS resuspendiert und gezählt. Anschließend wurde tropfenweise FBS mit 20% DMSO hinzugegeben. Bis zu 10 Millionen Zellen wurden auf ein Kryoröhrchen aufgeteilt und in Kryoboxen bei -80°C weggefroren. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die eingefrorenen Zellen in flüssigem Stickstoff bei -160°C gelagert.

Zum Auftauen wurde vorgewärmtes *X-Vivo*<sup>TM</sup> 15 Medium (*Lonza*) mit 10 µl/ml Benzonase (*Sigma-Aldrich*) verwendet. Das Kryoröhrchen mit der eingefrorenen Zellsuspension wurde in einem Wasserbad aufgewärmt. Anschließend wurde das *X-Vivo*<sup>TM</sup> 15 Medium tropfenweise hinzugefügt und die Zellsuspension in ein Falcon mit warmem, vorgelegtem Medium überführt. Um das DMSO zu entfernen, wurden die Zellen zentrifugiert und das Medium gewechselt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht im Inkubator bei 37°C gelagert und am nächsten Tag gefärbt und an einem *FACS Canto II* durchflusszytometrisch analysiert oder für weitere Versuche verwendet.

#### 2.2.4 Isolation von T-Zellen

Zur Negativselektion von CD3<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMCs wurde das *MagniSort*<sup>TM</sup> *Human T Cell Enrichment Kit* (ThermoFisher) mit dem Protokoll des Herstellers verwendet. PBMCs wurden in einer Konzentration von 1\*10<sup>8</sup> Zellen/ml in MACS Puffer aufgenommen. Je 10<sup>7</sup> Zellen wurden 20 µl *MagniSort*<sup>TM</sup> *Enrichment Antibody Cocktail* hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, im Ursprungsvolumen resuspendiert und je 10<sup>7</sup> Zellen wurden 20 µl *MagniSort*<sup>TM</sup> *Negative Selection Beads* hinzugefügt. Abschließend wurde das Röhrchen in einen *MagniSort*<sup>TM</sup> Magneten platziert, inkubiert und durch Abkippen die unmarkierte T-Zellfraktion isoliert. Die T-Zellen wurden für Transfektion und Analysen frisch aus PBMCs isoliert. Zur FACS-Analyse wurden Einzelzellsuspensionen mit Fixable viability dye, CD45 und CD3-Antikörpern gefärbt.

#### 2.2.5 Fuse-it-Transfektion

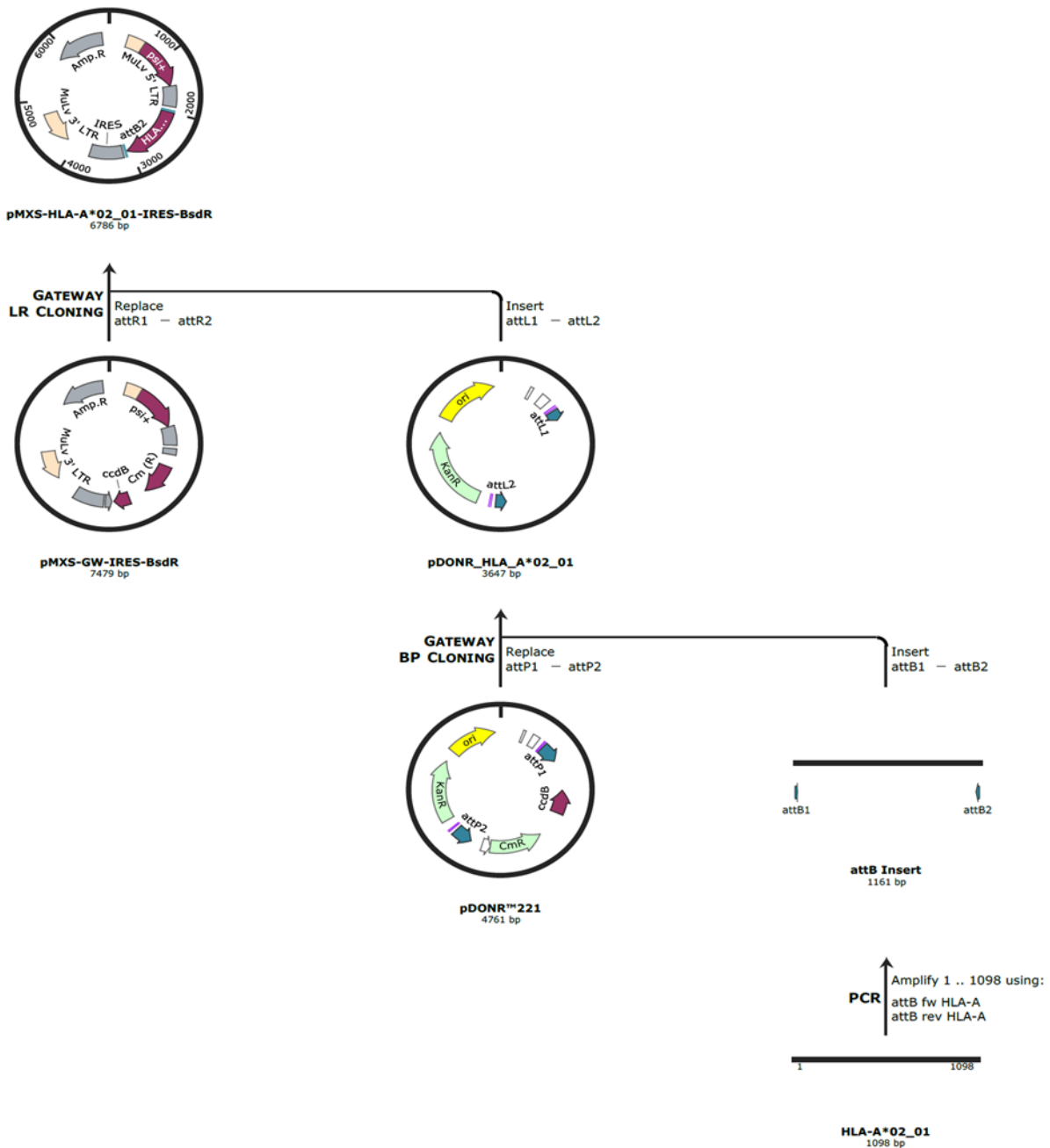
Die Transfektion von K562-Zellen und primären dendritischen Zellen mit *Fuse-it-mRNA* (*Ibidi*) verwendet ein liposomales Carriersystem und wurde mit dem Protokoll des Herstellers verwendet. Zunächst wurden verschiedene Mengen an RNA in einem Verhältnis von 1:2 mit Neutralisationspuffer gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Ladung der RNA auszugleichen. Anschließend wurde die neutralisierte RNA liposomal eingebettet, indem sie mit *Fusogenic Solution* vermischt und anschließend bei 4°C inkubiert wurde. Zur besseren Durchmischung wurde gemäß Anleitung ein Ultraschallbad verwendet. 1,75 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden daraufhin mit der RNA vermischt und für 15-25 min bei 37°C inkubiert. Die Transfektionseffizienz wurde nach 1-2 Tagen am *FACS Canto II* analysiert.

### 2.2.6 Generierung eines personalisierbaren, *in vitro* Ko-Kultur-Modells

Für die Generierung von antigenpräsentierenden Zellen für das *in vitro* Testmodell wurden Vektoren mit patientenindividuellen HLA-Molekülen kloniert und HLA-Molekül-defiziente K562-Zellen als antigenpräsentierende Zellen verwendet. RNA aus schockgefrorenem Tumorgewebe von Gliompatienten wurde mit dem *RNeasy® Mini Kit (Qiagen)* oder alternativ in Kooperation mit der Neuropathologischen Klinik der Universitätsklinik Heidelberg mit dem *Maxwell® 16 LEV simplyRNA Tissue Kit (Promega)* isoliert. Die gewonnene RNA wurde mit dem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)* zu cDNA umgeschrieben. Primer für HLA-A, -B, -C aus der Literatur<sup>96</sup> mit zusätzlichen *attB*-Rekombinationsstellen für das *Gateway Cloning System (ThermoFisher)* wurden verwendet, um die HLA-Sequenzen mittels PCR aus der cDNA zu klonieren. Anschließend wurde die HLA-Sequenz durch eine *BP Rekombination (ThermoFisher)* in einen *pDONR™ (ThermoFisher)* Eingangsvektor kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Mithilfe einer *LR Rekombinationsreaktion* wurde die HLA Sequenz in die Expressionsvektoren *pMXs-IRES-Bsd* oder *pMXs-IRES-Puro (Cell Biolebs Inc.)* transferiert (Abb. 6).

Zur Generierung von antigenspezifischen Effektorzellen wurde antigenspezifische T-Zell-Rezeptoren bei *Twist Bioscience* erworben und ebenfalls mithilfe des *Gateway Cloning Systems* in Expressionsvektoren kloniert. Als Effektorzellen wurden T-Zell-Rezeptor-defiziente Jurkat 76-Zellen verwendet.

Die Produktion von murinen, ecotropen Viren wurde in *HEK293T Phoenix Eco* Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mittels *FuGENE® HD (Promega)* nach Protokoll des Herstellers transfiziert. Der Virusüberstand wurde für 3 Tage gesammelt und durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Die Expression des Virusrezeptors mCAT-1 auf Jurkat 76-Zellen und K562-Zellen wurde mit *Ecotropic Receptor Booster (Takara Bio)* stimuliert und die Zellen mit *Protransduzin®-A (Immundiagnostik)* nach Angaben des Herstellers retroviral transduziert. Nach 72 h wurde die Selektion der transduzierten Zellen mit 9 µg/ml Blasticidin bzw. 1 µg/ml Puromycin begonnen.



**Abbildung 6: Klonierungsstrategie für HLA-Kassetten.** HLA-Gene wurden mittels PCR aus cDNA von HLA-typisierten Patienten isoliert. Dabei wurden zusätzliche attB-Rekombinationsstellen für das Gateway Cloning System angefügt. Mittels BP und LR-Rekombination wurden die Gene erst in pDONR™-Eingangsvektoren und anschließend in die Expressionsvektoren pMXs-IRES-Bsd oder pMXs-IRES-Puro kloniert. Hier beispielhaft für HLA-A\*02:01 gezeigt.

### 2.2.7 Transfektion

Für die Transfektion von K562, Jurkat 76 und primären humanen T-Zellen wurde das *Neon Transfection System (ThermoFisher)* nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden gewaschen und in einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml in *Resuspension Buffer*

T aufgenommen. Je Reaktion wurde 4 - 15 µg des Konstrukts zu den Zellen gegeben und die Zellen je nach Zelltyp nach Protokoll des Herstellers elektroporiert. Jurkat 76 und primäre humane Zellen wurden mit einem transgenen Mart1-TCR elektroporiert. Die Zelllinie K562 wurde mit einem MHC-Klasse-I-Molekül transfiziert. Beide Konstrukte wurden in einen *S/MAR-DNA*-Vektor kloniert. Dieser wurde freundlicherweise von R. Harbottle (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Zur Kontrolle wurde ein *S/MAR-GFP*-Vektor und GFP-RNA verwendet. Die Expression von GFP wurde im Fluoreszenzmikroskop und mittels Durchflusszytometrie verifiziert.

### 2.2.8 IFN-γ ELISpot

ELISpot-Platten wurden unter sterilen Bedingungen mit IFN-γ Antikörper (1D1K) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten für drei H mit Suspensionszellmedium geblockt. Pro Well wurden jeweils  $2 \cdot 10^4$  antigenpräsentierende Zellen ausgesät. Dies waren entweder transduzierte K562-Zellen mit entsprechendem HLA-Typ oder autologe Dendritische Zellen. T-Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^5$  pro Well ausgesät und mit Peptid in einer Konzentration von 10 µg/ml stimuliert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in einer Konzentration von 20 ng/ml und Ionomycin in einer Konzentration von 1 µg/ml stimuliert. Als zweite Positivkontrolle diente ein MHC-I-Peptidpool (*JPT*). Als Negativkontrollen wurden HIV-Peptid und MOG-Peptid verwendet (s.o.). Der ELISpot wurde für 36 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und das an die ELISpot-Platte gebundene IFN-γ durch einen biotinylierten IFN-γ-Antikörper für 2 h (7-B6-1) markiert. Nach Bindung von Streptavidin-ALP an das Biotin wurde eine Farbreaktion mit dem *ALP conjugate substrate kit* eingeleitet und die gebildeten Farbpunkte am *ImmunoSpot Analyzer* analysiert.

### 2.2.9 Durchflusszytometrie

Für extrazelluläre Färbungen wurden humane Zellen mit Serum und murine Zellen mit anti-Maus CD16/CD32 (*eBioscience*) geblockt und anschließend für 30 min bei 4°C in FACS Puffer oder PBS gefärbt. Für intrazelluläre Färbungen wurden die Zellen mit dem *Intracellular fixation Kit* (*eBioscience*) nach Herstellerangaben fixiert und anschließend permeabilisiert. Die Färbungen wurden für 40 min bei 4°C in *Permeabilization Buffer* (*eBioscience*) durchgeführt. Die Zytokinsekretion wurde gemessen, indem die Zellen zunächst für 6 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> mit 10 µg/ml Brefeldin A (*Sigma-Aldrich*) inkubiert wurden. Dabei wurden die Zellen mit Peptid in einer Konzentration von 10 µg/ml stimuliert. Für Tetramer Färbungen wurden die Zellen für 30 min mit 7,5 µl/100 µl HLA-A\*02:01 Mart-1-Tetramer ELAGIGILTV gefärbt. Alternativ wurde das *QuickSwitch™ Quant HLA-A\*02:01 Tetramer Kit* (MBL International) verwendet. Dafür wurde das Tetramer nach Protokoll des Herstellers für 4 h mit Mart-1 Peptid (p26 – 35) und

*Peptide Exchange Factor* inkubiert, um das Peptid an das Tetramer zu koppeln und anschließend zur Färbung der Zellen verwendet.

Die Zellen wurden am FACS *Canto II* (BD Bioscience) oder *Attune Nxt System* (ThermoFisher) akquiriert und anschließend mit der *FlowJo*-Software Version 9 oder 10 analysiert.

#### 2.2.10 Anreicherung von antigen-spezifischen T-Lymphozyten

Zur Positivselektion von antigen-spezifischen T-Lymphozyten wurde das *z-Movi™* System (*Lumicks*) verwendet. Primäre humane T-Zellen wurden wie oben beschrieben aus HLA-typisierten Buffy coats isoliert und mit dem *Neon Transfection System* (ThermoFisher) mit einem HLA-A\*02:01 Mart-TCR transfiziert. Die Tumorzelllinie LN229 wurde auf eine Glasplatte geladen und über Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Adhärenz der Tumorzellen wurde im Mikroskop kontrolliert. Tote, abgelöste Zellen wurden weggespült. Anschließend wurde Mart-1-Peptid (p26-35) auf die Zellen geladen und für 4h inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die transfizierten T-Zellen auf die Glasplatte geladen und für 4h mit den MART1-beladenen LN229-Zellen ko-kultiviert. Mithilfe von Ultraschallwellen wurden Zellen mit schwachem Zell-Zell-Kontakt abgelöst. Die Stärke der Ultraschallwellen wurde sukzessiv gesteigert und als Cut-off Wert zwischen stark und schwach bindenden Zellen ein Wert von 80% der Maximalkraft gewählt. Die gelösten Zellen wurden gesammelt und die beiden Populationen mithilfe von Durchflusszytometrie am FACS *Canto II* analysiert.

#### 2.2.11 HLA-Typisierung

Genomische DNA wurde aus Patientenblut oder Gliomgewebe isoliert. Dafür wurde das *NucleoSpin Tissue Kit* (*Macherey-Nagel*) oder in Kooperation mit der Neuropathologie Heidelberg das *Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit* (*Promega*) verwendet. Die gewonnene DNA wurde an die *DKMS Dresden* gesendet, die die HLA-Typisierungen durchführten.

#### 2.2.12 Genexpressionsanalysen

Für Microarray- und RNAseq-Analysen wurde aus den Tumorproben der Studienpatienten RNA mit dem *RNeasy® Mini Kit* (*Qiagen*) oder dem *Maxwell® 16 LEV simplyRNA Tissue Kit* (*Promega*) isoliert. Zum Vergleich wurde gepoolte DNA aus gesundem Hirngewebe von fünf Spendern (*Biocat*) verwendet. Die Qualität der RNA wurde mittels *Nanodrop ND-1000* (*ThermoFisher*) und mittels *2100 Bioanalyzer* (*Agilent*) kontrolliert.

Die Microarray-Analyse wurde mit dem *GeneChip™ Human Genome U133 Plus 2.0 Array* (*Applied Biosystems™*) durchgeführt. Das Scannen erfolgte mit einem *iScan-Array-Scanner*. Die Datenextraktion erfolgte für alle Beads einzeln. Ausreißer wurden entfernt, wenn die absolute Differenz zum Median mehr als das 2,5-fache des MAD-Wertes betrug (*2,5-Hampel's method*). Alle verbleibenden Datenpunkte wurden quantilnormalisiert. Zur Signifikanztestung

wurde der t-Test in Kombination mit der *Benjamini-Hochberg*-Korrektur auf die Expressionswerte angewendet. Der durchschnittliche Expressionswert wurde als Mittelwert der gemessenen Expressionen der Beads zusammen mit der Standardabweichung der Beads berechnet.

Die RNA-Sequenzierung wurde mit einem *Illumina HiSeq4000* durchgeführt. Die *FastQ*-Rohdateien wurden mit dem *STAR Aligner Version 2.7.5b*, gefolgt von *featureCounts Version 1.6.4*, auf das *hg19*-Referenzgenom abgebildet. Zur Veranschaulichung wurden die Werte für Transkripte pro Million (TPM) verglichen.

### 2.2.13 RT-PCR

RNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit (*Qiagen*) aus Gliomgewebe isoliert. Für die von der Neuropathologie Heidelberg durchgeführte Isolation von RNA wurde das *Maxwell® 16 LEV simplyRNA Tissue Kit (Promega)* benutzt. Die RNA-Qualität und Quantität wurde mittels *NanoDrop™1000 spectrophotometer (PEQLAB)* gemessen. Anschließend wurde die extrahierte RNA mit dem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™)* nach Angaben des Herstellers zu cDNA umgeschrieben. Die RT-qPCR wurde mit dem *QuantStudio 3® Real-Time PCR System (ThermoFisher)* durchgeführt. Zur Markierung wurde der *SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems™)* verwendet. Zur Qualitätskontrolle wurden technische Duplikate der DNA in zwei verschiedenen Verdünnungen und jeweils als Triplikate gemessen. Außerdem wurden nach RT-PCR die Schmelzkurven analysiert. Als Referenzgen wurde GAPDH benutzt und die Werte als  $2^{-[Ct(\text{Zielgen})-Ct(\text{GAPDH})]}$ .

### 2.2.14 Selektion und Herstellung personalisierter Antigene

Anhand von Microarray- (n=3) oder RNA-seq-Daten (n=3) der Glioblastom-Patienten (n=6) im Vergleich zu gepoolter DNA aus gesundem Hirngewebe von fünf Spendern wurde für jeden Patienten ein Panel von überexprimierten TAA und GAA definiert. Jeder Patient wurde HLA typisiert, um die Epitope entsprechend zu matchen. Zwei verschiedene Ansätze wurden verwendet.

I. Eine Liste publizierter tumorassoziierter Antigene (TAA) wurde aus der *CTdatabase* übernommen (n=276). Die 30 am stärksten überexprimierten TAA für jeden Patienten wurden auf der Grundlage der Genexpressionsergebnisse bestimmt. Die vorhandene Literatur wurde entsprechend dem HLA-Typ des Patienten nach bekannten Epitopen dieser n=30 TAA durchsucht. Für die Patienten, in denen keine übereinstimmenden Epitope gefunden werden konnten (n=2), wurden stattdessen die Top10 der überexprimierten TAA für die *in silico* Berechnung von HLA-konformen Epitopen mittels *IEDB Processing Tool* ausgewählt<sup>97</sup>. Dabei wurden für potenzielle 9- und 10-mer-Peptide Wahrscheinlichkeiten für intrazelluläre Prozessierung und HLA-Präsentation prädictiert und eine Gesamtbewertung kalkuliert.



Schließlich wurden für jeden Patienten die fünf Epitope mit dem höchsten berechneten Gesamtscore ausgewählt.

II. Individuelle Glioblastomassoziierte Antigene (GAA) wurden anhand der Überexpression einzelner Gene ohne vorherige Vorauswahl sortiert. Gene, die eine Expression oberhalb der Grenzwerte im gesunden Kontrollgewebe aufwiesen (Microarray: >200 relative Genexpression; RNA-seq: > 0,5 TPM), wurden ausgeschlossen. Die zehn am stärksten überexprimierten GAA wurden für die *in silico* Epitoprädiktion mittels *IEDB Processing Tool* verwendet, und die fünf Epitope mit der höchsten Bewertung wurden für jeden Patienten ausgewählt.

Alle getesteten Epitope wurden als Peptide bei GenScript bestellt.

### 2.2.15 TZRb Sequenzierung

Zur Analyse des T-Zell-Rezeptor-Repertoires wurde DNA mittels *NucleoSpin Tissue Kit* (*Macherey-Nagel*) aus dem Tumorgewebe und aus expandierten TIL isoliert. Mit Hilfe des *Adaptive Biotechnologies® immunoSEQ® human T-cell receptor beta (hsTCRB) Kit* wurde anschließend anhand der Herstellerangaben die DNA amplifiziert und modifiziert. Die Sequenzierung wurde ebenfalls von *Adaptive Biotechnologies®* durchgeführt. Die Daten wurden mittels VDJtools Version 1.2.1 konvertiert und analysiert. Baumdiagramme wurden mit dem R-Package Treemap (R Version 4.0.3) erstellt.

### 2.2.16 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS sorting)

Humane Hirntumorproben wurden zerkleinert und durch 100-µm- und 70-µm-Siebe gefiltert, um Einzelzellsuspensionen zu erhalten. Das Myelin wurde mit *Myelin removal beads II* (*Miltenyi Biotec*) entfernt. Humane Proben wurden in 90% FBS / 10% DMSO eingefroren und am Tag der Analyse aufgetaut.

Für die Zellsortierung wurde ein *Aria Fusion* (*BD Biosciences*) mit den folgenden Lasern verwendet: 355, 405 nm; 488 nm; 561 nm; 640 nm. Dissoziierte Hirntumorproben wurden mit folgenden Antikörpern angefärbt: *Anti-CD3-BV510* (Klon *HIT3A*), *Anti-CD45 APC-H7* (Klon *2D1*), *Anti-CD8-FITC* (Klon *SK1*), *Anti-CD11b-PE/Dazzle* (Klon *ICRF44*). Der Fixationsfarbstoff *eFluor780* (*Thermo Fisher*) wurde zum Ausschluss toter Zellen verwendet. Anschließend wurde mit dem *Chromium Single Cell 5' TCR/RNA Sequencing Kit (10x Genomics)* ein mRNA-Profilung in Verbindung mit der Feature Barcoding Technologie für Zelloberflächenproteine (*TotalSeq-C*) der sortierten Zellen durchgeführt.

### 2.2.17 Einzelzellsequenzierung (Single cell sequencing)

Einzelzell-RNA-Daten wurden mit der *CellRanger-Pipeline* Version 6.0 mit allen Standardeinstellungen auf das *GRCh38*-Referenzgenom abgebildet. Wir schlossen Zellen

mit eindeutigen Merkmalen von mehr als 2.500 oder weniger als 200 sowie Zellen mit mehr als 10 % mitochondrialen Merkmalen für die nachgeschaltete Analyse aus. Die Genexpression wurde mit der Funktion *LogNormalisation()* von Seurat normalisiert, und mit *FindVariableFeatures()* wurden 2000 variable Merkmale erzeugt. Anschließend wurden VDJ-Daten mit Hilfe von *combineExpression()* aus dem *scRepertoireV.1.3.1* hinzugefügt, indem die Aminosäuresequenz (CTaa) für die Klonotypbestimmung verwendet wurde. Jeder Zell-Barcode, der keinen Wert für die TCR-Beta-Kette enthielt, wurde für die weitere Analyse entfernt. Für das anschließende Clustering wurden die variablen TCR-Gene sowie die mit dem Chargeneffekt verbundenen Merkmale (JUN|FOS|RP|ZFP36|EGR|HSP|MALAT1|XIST|MT|HIST|TRAV|TRAD|TRAJ|TRBV|TRBD|TRBJ|TRGV|TRGD|TRGJ|TRDV|TRDD|TRDJ) aus der *ScaleData*-Funktion herausgefiltert. Die drei Patientendatensätze wurden mit *RunHarmony()* des *Harmony-Pakets* Version V.0.1.0 mit folgenden Parametern integriert: *max.iter.harmony* =8, *max.iter.cluster*=30, *dims.use*= 1:30, *epsilon.cluster* = -Inf, *epsilon.harmony* = -Inf. Das Clustering wurde mit den Seurat-Funktionen *RunUMAP()*, *FindNeighbours()* und *FindClusters()* unter Verwendung von 20 *Harmony* Dimensionen und einer Auflösung von 0,5 durchgeführt. Zur Bestimmung der Clusteridentität wurde eine differenzielle Genexpressionsanalyse mit *MAST* durchgeführt. Um die expandierten TILs zu bestimmen, wurden die TCR-Beta-Kettenfrequenzen für jeden Patienten mit der passenden TCR-Beta-Tiefensequenzierung nach dem Expansionsprotokoll verglichen. Die Top33 Prozent der expandierten TILs wurden für die Visualisierung verwendet. *Volcanoplots* und *Violinplots* wurden mit *FindMarkers()* von Seurat erstellt, indem erneut TCR-variable Gene sowie mit dem Chargeneffekt verbundene Merkmale (JUN|FOS|RP|ZFP36|EGR|HSP|MALAT1|XIST|MT|HIST|TRAV|TRAD|TRAJ|TRBV|TRBD|TRBJ|TRGV|TRGD|TRGJ|TRDV|TRDD|TRDJ) herausgefiltert und anschließend die *EnhancedVolcano*-Funktion mit Cutoffs für  $\log_2$  fold change = 1 und p- Wert =  $10e-50$  verwendet wurden.

Die Gene-Ontology-Anreicherungsanalyse für überexprimierte Gene wurde mit *Metascape* durchgeführt<sup>98</sup>.

### 2.2.18 Graphische Darstellung und statistische Analyse

Alle Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SD oder individuelle Datenpunkte angegeben (siehe Legende). Die graphische Repräsentation der Daten und die statistische Auswertung wurde mittels *GraphPad Prism 9.0* durchgeführt. Verwendet wurden der gepaarte und ungepaarte T-test für den Vergleich von zwei Gruppen. Bei mehr als zwei Gruppen wurde *analysis of variance* (ANOVA) mit Tukey-Test zur Korrektur für Mehrfachvergleiche verwendet. p-

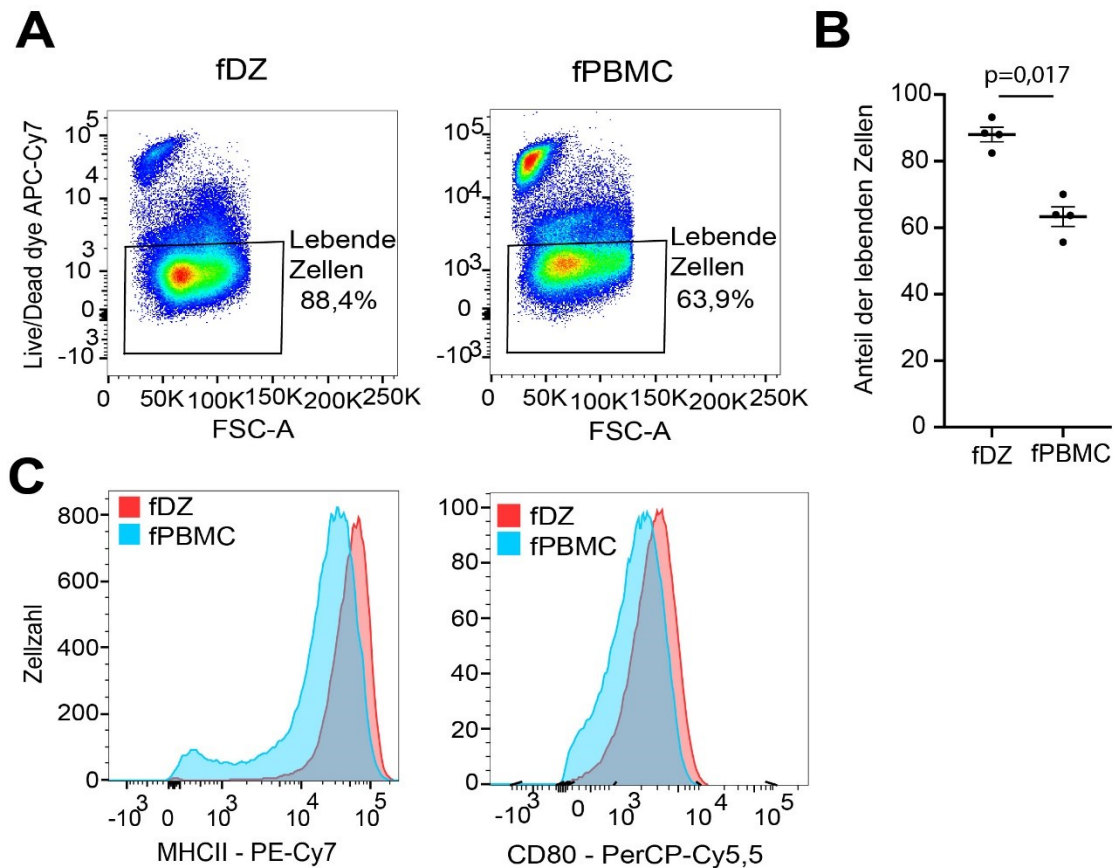
Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant gewertet ( $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Experimentalübersichten wurden mit *Biorender* erstellt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Etablierung von zellulären Methoden zur *in vitro* Untersuchung von HLA-abhängigen Immunantworten

##### 3.1.1 Prozessierung von primären Dendritischen Zellen

Ein wichtiger limitierender Faktor bei humanen Proben ist die begrenzte Verfügbarkeit von Patientenmaterial, insbesondere von Tumorgewebe und autologen Zellen. Aus peripherem Blut können unter anderem *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) gewonnen und zu DZ maturiert werden, welche anschließend als APZ in Ko-Kultur-Versuchen verwendet werden können. Im Gegensatz zu TIL lassen sich DZ nur begrenzt *in vitro* expandieren und sind damit nur in limitierter Zahl verfügbar. Es ist daher wichtig, aus dem verfügbaren Blut möglichst viele funktionelle Zellen zu isolieren. Das Standardprotokoll sieht vor, aus Blut gewonnene PBMC einzufrieren und bei Bedarf nach dem Auftauen zu DZ zu maturieren. Der Vorteil ist dabei, dass PBMC für verschiedenste Experimente genutzt werden können. Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass ein Maturieren der PBMC zu DZ vor dem Einfrieren zu einem höheren Anteil an lebenden Zellen führt (Abbildung 7A,B). Aus Buffy coats wurden dafür PBMC isoliert und die Hälfte als PBMC eingefroren, während die andere Hälfte zunächst zu DZ entwickelt und anschließend eingefroren wurde. Nach dem Auftauen wurden die PBMC zu DZ entwickelt und anschließend beide DZ-Populationen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei konnte neben der höheren Frequenz an lebenden Zellen auch eine erhöhte Expression von MHC II (Abbildung 7C) und CD80 (Abbildung 7D) als Zeichen einer verbesserten Antigenpräsentation nachgewiesen werden.

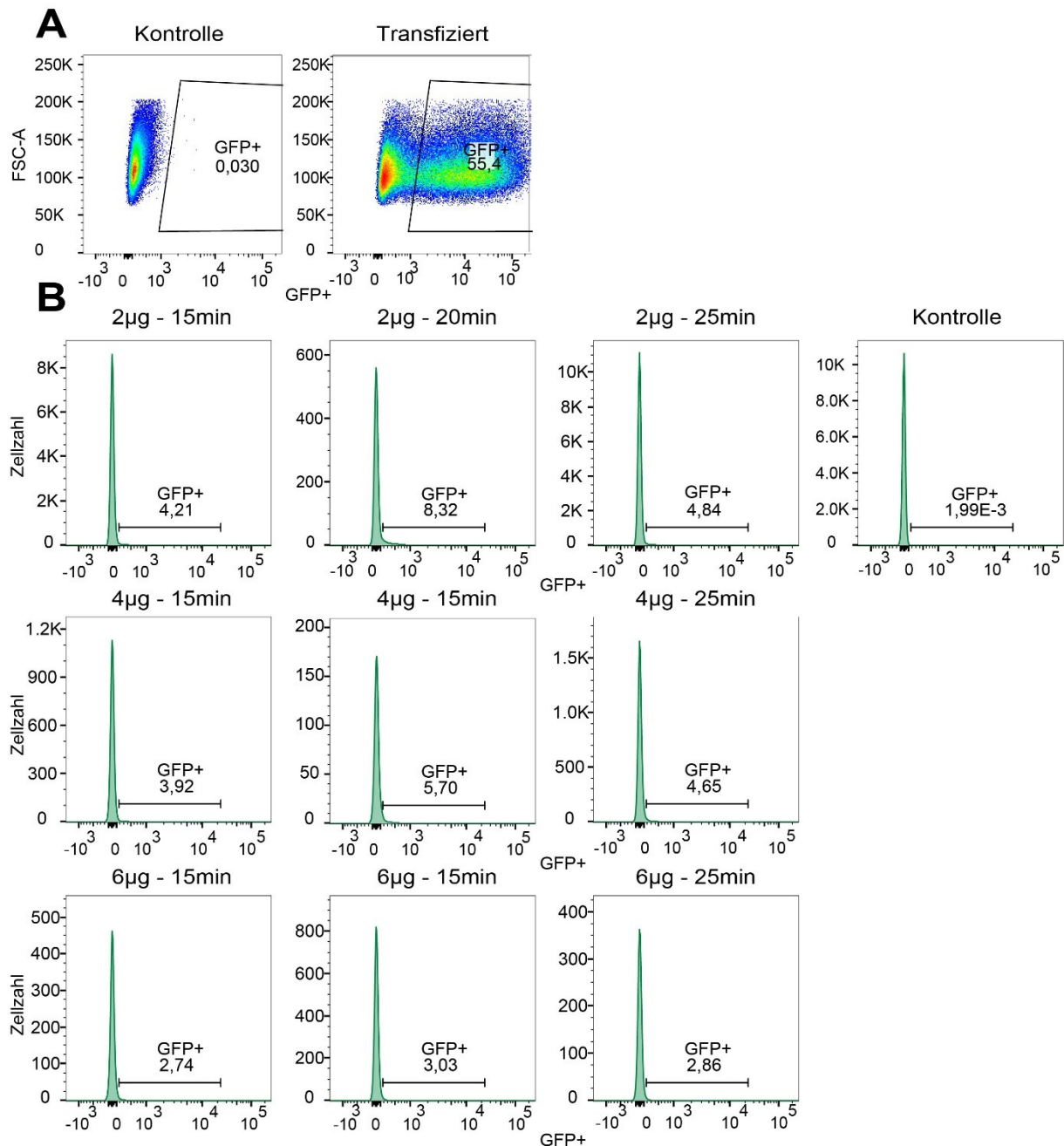


**Abbildung 7: Optimierung des Protokolls zur Herstellung von Dendritischen Zellen.** PBMC wurden aus Buffy coats von gesunden Spendern isoliert. Ein Teil wurde als PBMC eingefroren (fPBMC) und erst nach dem Auftauen zu Dendritischen Zellen (DZ) maturiert. Die andere Hälfte wurde zunächst zu DZ maturiert und dann eingefroren (fDZ). Beide Zellpopulationen wurden angefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. **A, B.** Vergleich von aufgetauten DZ die entweder als PBMC (fPBMC) oder alternativ als DZ eingefroren wurden (fDZ). Tote Zellen wurden mit *fixable live/dead dye* angefärbt. **C** Vergleich der MHC II-Expression. **D** Vergleich der CD80-Expression. **A.** Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM. Statistische Signifikanz wurde mit gepaartem t-Test evaluiert. \* $p < 0.05$ .

### 3.1.2 Transfektion von primären Dendritischen Zellen

Primäre DZ können als APZ für in vitro Ko-Kulturen verwendet werden<sup>100</sup>. Um potenzielle Neopeptide und TAA auf Immunogenität zu testen, können DZ mit der entsprechenden Antigen-RNA transfiziert werden und die entsprechende Sequenz präsentieren. Zur Transfektion wurde in diesem Versuch das *Fuse-it* System verwendet, welches die RNA mittels Liposomen in die Zelle transportiert. Zur Etablierung der Transfektion wurden zunächst gut transfizierbare K562 Zellen mit GFP-RNA transfiziert. Dabei zeigte sich eine hohe Transfektionseffizienz von über 50% (Abbildung 8A). Für die anschließende Transfektion von primären, humanen Zellen wurden DZ aus Buffy coats von gesunden Spendern nach oben etablierter Methodik generiert. Verschiedene RNA-Mengen und Inkubationszeiten wurden

getestet, um die Transfektionseffizienz zu maximieren. Dabei zeigte sich mit einem Maximalwert von 8,32% bei Verwendung von 2  $\mu\text{g}$  RNA und 20-minütiger Inkubation (Abbildung 8B) eine insgesamt niedrige Effizienz.



**Abbildung 8: Transfektion von Dendritischen Zellen.** Das *Fuse-it*-Transfektionssystem wurde verwendet, um DZ und K562-Zellen nach Herstellerprotokoll mit GFP-RNA zu transfizieren. Die transfizierten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. **A.** Anteil der GFP-positiven K562-Zellen. **B.** Anteil der GFP-positiven DZ. Angegeben ist die Menge an RNA und die Inkubationszeit.

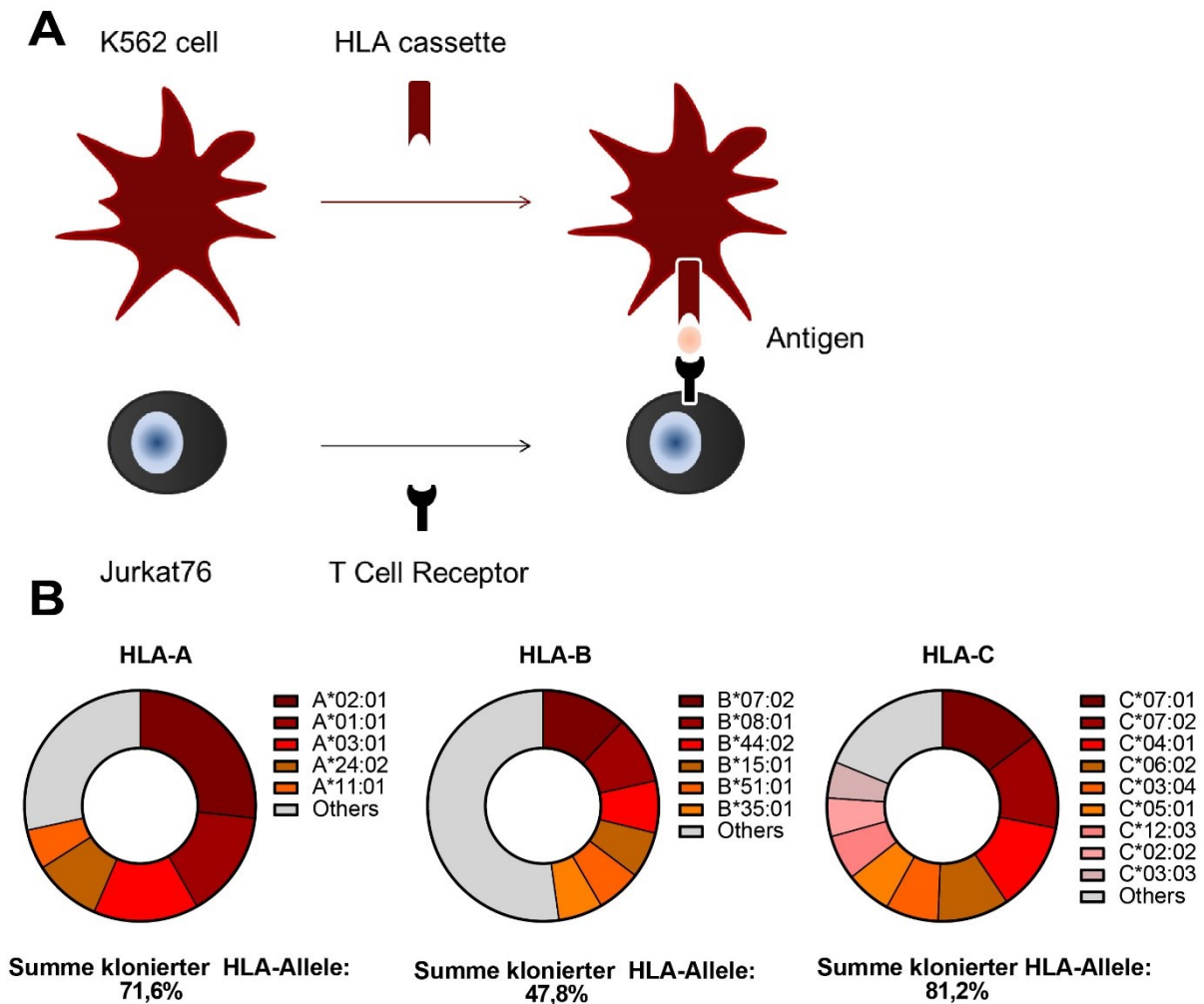
### 3.1.3 Jurkat76 und K562 Zellen als modifizierbares *in vitro* Ko-Kultur-Modell

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von primären Zellen wurde ein alternatives *in vitro* Ko-Kultur-Modell, bestehend aus modifizierbaren APZ und Effektorzellen, etabliert. Ziel war es, ein Modell zu entwickeln, bei dem die APZ patientenspezifisch mit entsprechenden HLA-Allelen ausgestattet werden können. Als Gegenstück wurden Jurkat76-Zellen als Effektorzellen zur Testung der Antigenreaktivität von T-Zell-Rezeptoren untersucht (Abbildung 9A).

Folgende Zielkriterien wurden für die APZ festgelegt:

1. Leichtes Handling und Robustheit der Zelllinie
2. Fehlen von eigenen HLA-Molekülen und die Möglichkeit, die Zellen je nach HLA-Typ des Patienten individuell auszustatten
3. Zuverlässige Antigenpräsentation

K562 ist eine CML-entstammende erythroleukämische Zelllinie, die aufgrund fehlender Expression eigener HLA-Moleküle eine passende Zelllinie darstellt<sup>101,102</sup>. Eine Untersuchung der HLA-Frequenzen bei Kaukasiern in der deutschen Bevölkerung zeigte, dass sich mit der Klonierung von einigen HLA-Allelen ein Großteil der Bevölkerung abdecken ließ (Abbildung 9B). Kloniert wurden alle HLA-Allele, die häufiger als 5% waren. Im Fall von HLA-A ließen sich somit 71,6% aller Allele mit fünf verschiedenen HLA-Typen abdecken, wobei HLA-A\*02:01 das häufigste Allel darstellte. Für HLA-B ließ sich etwa die Hälfte (47,8%) aller vorkommenden HLA-Typen mit sechs klonierten HLA-Allelen abdecken. Für HLA-C wurden neun Allele kloniert (81,2%).



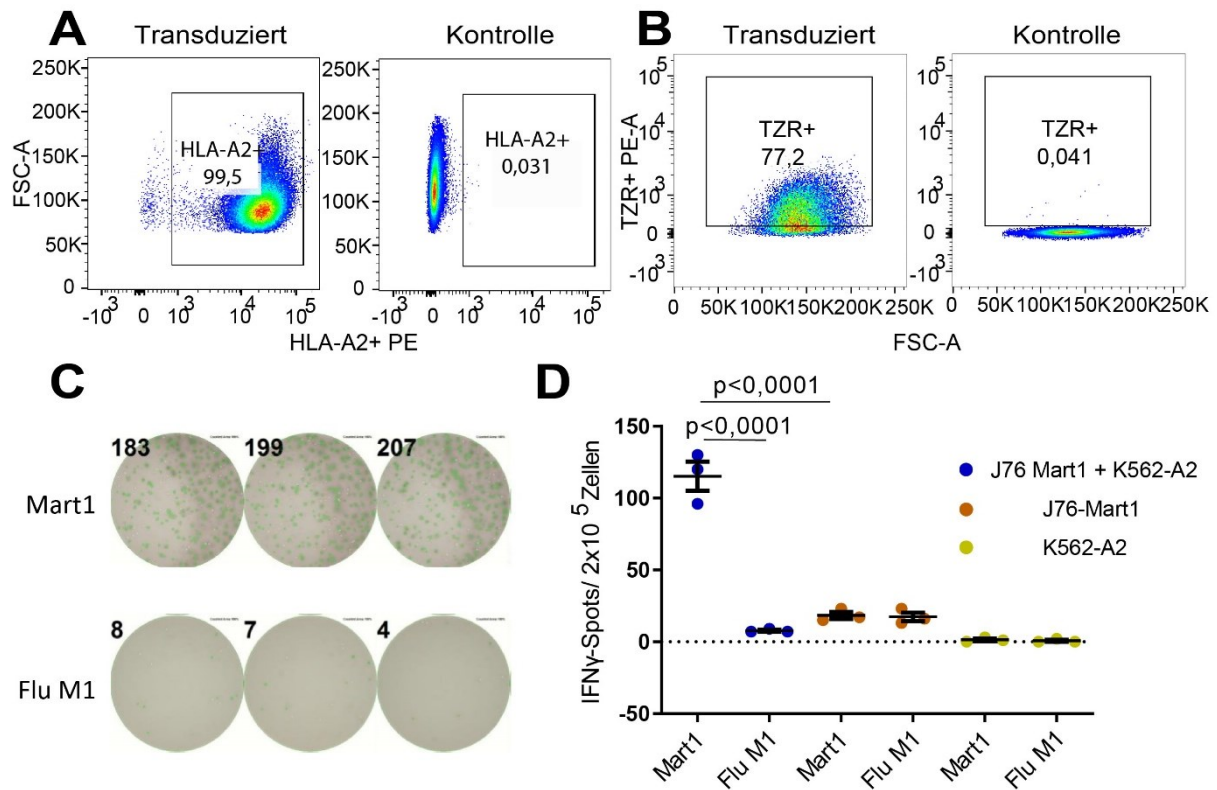
**Abbildung 9: 3.1.3 Jurkat76 und K562 Zellen als modifizierbares *in vitro* Ko-Kultur-Modell.** **A.** Konzept zur Generierung eines personalisierbaren *in vitro* Zellmodells. K562 als Antigenpräsentierende Zellen, die je nach HLA-Typ des Patienten mit entsprechenden HLA-Kassetten ausgestattet werden können. T-Zell-defiziente Jurkat76-Zellen, die mit verschiedenen T-Zell-Rezeptoren ausgestattet werden können. **B.** Verteilung der HLA-Allele unter Kaukasier in Deutschland. Dargestellt sind alle HLA-Typen mit einer Frequenz >5%.

Für die Generierung der HLA-Kassetten wurden die HLA-Allele einzeln aus cDNA von HLA-typisierten Spendern kloniert und in Expressionsvektoren mit Blasticidin- oder Puromycin-Resistenz transferiert (Klonierungsstrategie siehe Methoden). K562-Zellen konnten erfolgreich mit den synthetisierten HLA-Molekülen transduziert werden und zeigten in Kultur mit Blasticidin oder Puromycin auch nach mehreren Monaten stabile Expression (Abbildung 10A).

Als Gegenstück zu den aAPZ wurden Jurkat76-Zellen (J76-Zellen), eine TZR-defiziente, immortalisierte T-Zell-Linie, als Effektorzellen genutzt<sup>103</sup>. Der Knockout des endogenen TZR ermöglicht es, diese Zelllinie zur Testung von transgenen T-Zell-Rezeptoren zu verwenden. Die Transduktion wurde analog zur Transduktion der K562-Zellen durchgeführt. Transgene TZR wurden bei *Twist Bioscience Corporation* oder *GENEART* erworben oder selbst kloniert. Es konnte gezeigt werden, dass J76-Zellen einen transgenen TZR stabil exprimieren können



(Abbildung 10B). In Ko-Kultur mit transduzierten K562- und Jurkat76-Zellen konnte die erfolgreiche Peptid-Antigenpräsentation von K562-Zellen nachgewiesen werden. Im ELISpot zeigten mit einem MART1-spezifischen TZR ausgestattete J76-Zellen antigenspezifische Produktion von IFN $\gamma$  (Abbildung 10C, D).

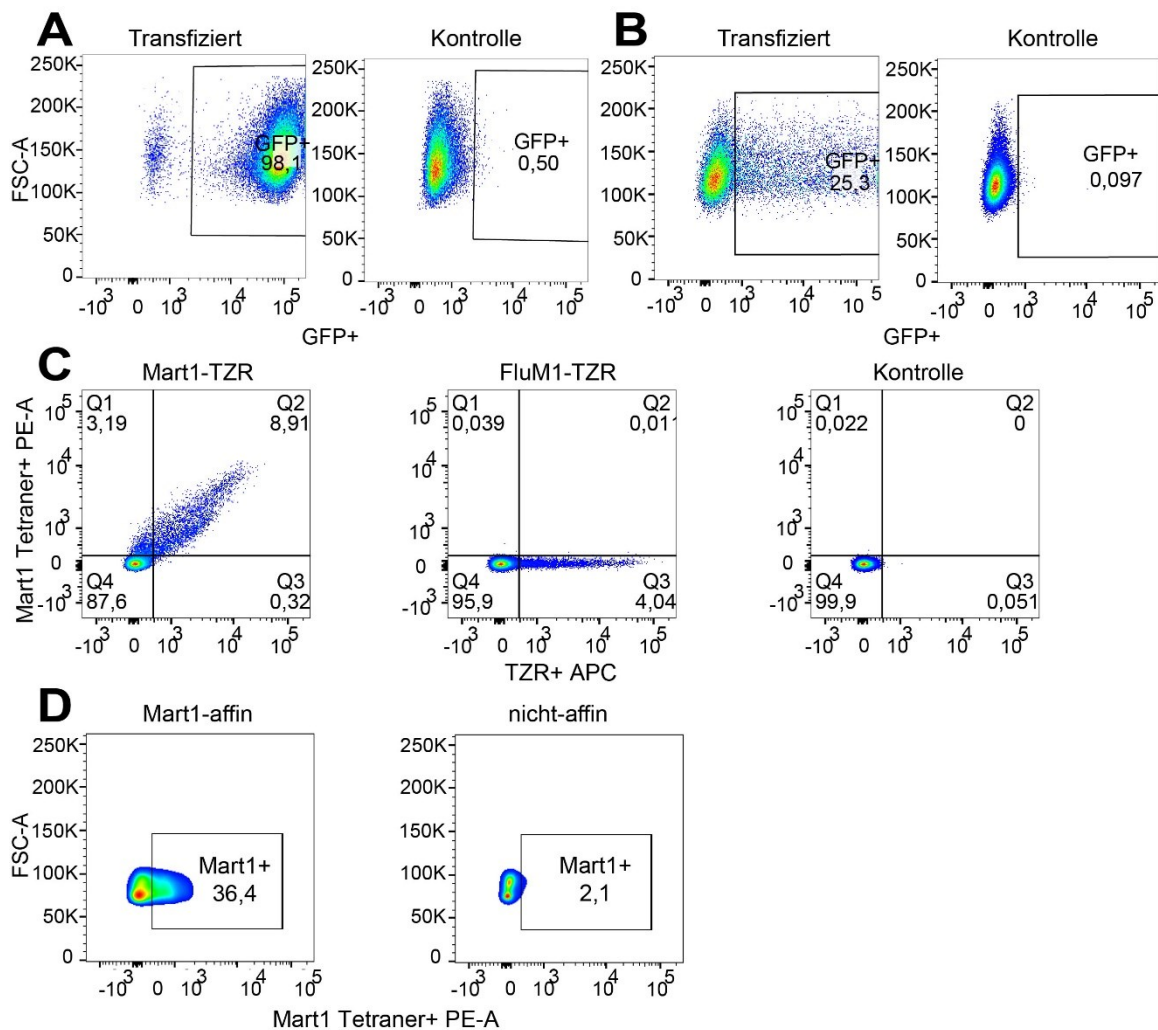


**Abbildung 10: K562-Zellen und Jurkat76-Zellen können für *in vitro* Ko-Kultur-Testungen verwendet werden.** **A.** Durchflusszytometrie mit transduzierten und untransduzierten K562-Zellen. Beispielhaft wurde hier HLA-A\*02:01 verwendet. **B.** Durchflusszytometrie mit transduzierten und untransduzierten Jurkat76-Zellen. Beispielhaft wurde hier ein MART1-spezifischer TZR verwendet. **C.** ELISpot mit transduzierten K562 (K562-A2) und Jurkat76-Zellen (J76-Mart1) aus A und B. Zur Testung wurden als Peptide MART1 und Influenza M-Protein (Flu M1) verwendet. Zur Kontrolle wurden J76-Mart1 und K562-A2 auch alleine getestet. **D.** Auswertung der ELISpots aus C. Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM. **D.** Statistische Signifikanz wurde durch ANOVA evaluiert und für multiples Testen nach Holm-Sidak korrigiert. \*\*\*\*p<0.0001

### 3.1.4 Generierung von TZR-transgenen T-Zellen

Zelluläre Immuntherapie mit transgenen T-Zellen ist eine vielversprechende Therapiemodalität<sup>104</sup>. Um die Transfektion mittels *Neon Transfection System (ThermoFisher)* zu etablieren, wurden aufgrund ihrer Robustheit zunächst K562-Zellen mit GFP-RNA transfiziert. Damit ließ sich eine Transfektionseffizienz von über 90% erreichen ließ (Abbildung 11A). Mit dem gleichen Transfektionssystem konnte in primären T-Zellen lediglich eine

maximale Transfektionseffizienz von 25,3% bei Transfektion mit einem GFP-Vektor erreicht werden (Abbildung 11B). Es konnte aber weiter gezeigt werden, dass die Zellen erfolgreich mit einem antigenspezifischen TZR transfiziert werden können (Abb. 11C). Die Detektion des TZR erfolgte über das Anfärben der murinen konstanten TZR-Domäne bzw. mittels Tetramer-Färbung. Dabei konnte eine maximale Transfektionseffizienz von 8,9% erreicht werden (Abb. 11C). Um den antigenspezifischen Anteil der transfizierten T-Zellen zu erhöhen, wurde zusätzlich die *z-Movi* Technologie zur Anreicherung von antigenspezifischen T-Zellen verwendet. Dafür wurden HLA-A2+ LN229-Zellen als APZ auf dem *z-Movi* Chip kultiviert und mit Mart1-Peptid beladen, anschließend erfolgte eine Inkubation mit primären T-Zellen, die mit einem MART1-TZR transfiziert wurden. MART1-spezifische T-Zellen konnten durch Affinität zum MART1-Antigen am Chip haften, während die restlichen Zellen abgelöst wurden. Die MART1-spezifische T-Zellpopulation konnte damit auf 36,4% erhöht werden (Abb. 11D).



**Abbildung 11: Etablierung von primären TZR-transgenen T-Zellen.** **A.** Durchflusszytometrie von K562-Zellen transfiziert mit GFP RNA und Kontrolle. **B.** Durchflusszytometrie von primären, humanen T-Zellen transfiziert mit einem GFP- Vektor und Kontrolle **C.** Durchflusszytometrie von primären, humanen T-Zellen transfiziert mit MART1-TZR oder einem Kontroll-TZR sowie untransfizierte Kontroll-T-Zellen. **D.** Durchflusszytometrie von transfizierten T-Zellen nach Auftrennung mittels *z-Movi-Technologie*.

## 3.2 Spezifität und Dynamik des T-Zell-Rezeptor-Repertoires in TIL-Kulturen von Glioblastom-Patienten

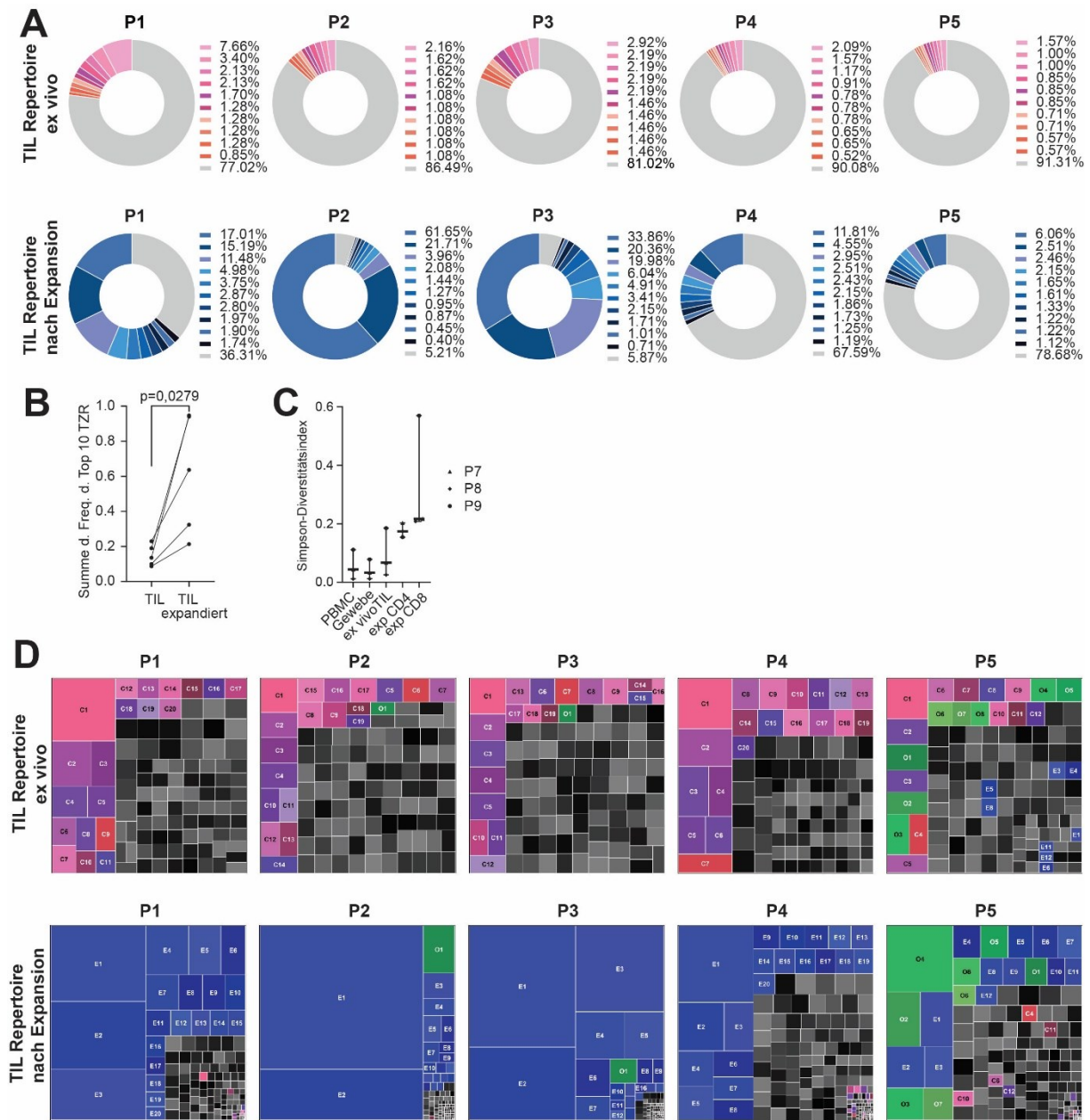
### 3.2.1 Der Effekt von *in vitro* Expansion auf das T-Zell-Rezeptor-Repertoire von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten

Neben transgenen T-Zellen und CAR-T-Zellen werden auch autologe Tumor-infiltrierende Lymphozyten für die Immuntherapie von Glioblastom-Patienten evaluiert<sup>105–108</sup>. Die Verwendung von expandierten TIL Kulturen umgeht zeitaufwändige und technologisch

anspruchsvolle Methoden wie die Antigen-Identifikation und Zell-Modifikation. Ihre Durchführbarkeit konnte bereits in primären und sekundären Hirntumoren gezeigt werden.

Zur Expansion der TIL-Kulturen von Glioblastom-Patienten wurden Tumorstücke für 2 Wochen mit OKT3 und Interleukin-2 stimuliert. Zur Untersuchung des TZR-Repertoires wurden TZR $\beta$ -Sequenzierungen (TZR $\beta$ -seq) *ex vivo* (Tag 0) und nach Expansion (Tag 14) durchgeführt (Abbildung 3.2.5). Dafür wurden insgesamt fünf Patienten untersucht. Die Analyse ergab, dass die Klonalität während der Expansion stark anstieg, was auf unterschiedliche Expansionskapazitäten der TZR-Klonotypen hinweist (Abb. 12A-C). So dominierten die zehn häufigsten TZR-Klonotypen, die *ex vivo* gerade 14,8 % des TIL-Repertoires ausmachten, das Repertoire nach der Expansion und stiegen auf 61,3 % aller TZR-Klonotypen an (Abb. 12A,B). Der Simpson-Diversitätsindex zeigte einen steigenden, wenn auch nicht signifikanten Trend für expandierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 12C).

Wie in der farbkodierten Visualisierung des Kacheldiagramms dargestellt, zeigten die 20 häufigsten TZR-Klonotypen vor und nach der Expansion keine relevanten Überschneidungen (Abbildung 12D). Die meisten der prominenten *ex vivo* TZR-Klonotypen expandierten entweder schlecht oder lagen nach der *in vitro*-Expansion sogar unter der TZR $\beta$ -seq-Nachweisgrenze. Umgekehrt wurden die häufigsten TZR-Klonotypen nach der *in vitro* Expansion, wenn überhaupt, nur mit sehr geringer Häufigkeit im *ex vivo* TZR-Repertoire nachgewiesen, was auf eine starke Expansion von zuvor nicht-dominanten T-Zell-Klonotypen hindeutet.



**Abbildung 12: Die Dynamik von T-Zell-Rezeptoren in TIL-Kulturen.** A-D. Aus GBM-Patienten isolierte TIL-Kulturen (n=5) wurden zwei Wochen lang kultiviert und mittels *TCR-Beta Deep Sequencing* (TZR $\beta$ -seq) zur Beginn (Tag 0) und nach (Tag 14) der Expansion analysiert. **A.** Prozentualer Anteil der zehn häufigsten TZR-Klonotypen vor und nach der Expansion als Tortendiagramm. Die zehn dominierenden TZR-Klonotypen vor der Expansion sind in pink/lila Farbtönen, die zehn dominierenden nach der Expansion sind in blauen Farbtönen dargestellt. Die verbleibenden TZR-Klonotypen sind in grau dargestellt. **B.** Quantifizierung von A. Summe der Frequenz der Top10 TZR-Klonotypen vor und nach Expansion. **C.** Quantifizierung der Diversität von PBMC aus peripherem Blut, T-Zellen im Tumorgewebe, TIL Kulturen vor Expansion sowie CD4 und CD8 TIL nach Expansion mittels Simpson-Diversitätsindex. **D.** Top 100 TZR-Klonotypen vor und nach Expansion als Kacheldiagramm. Die Top20 TZR-Klonotypen vor Expansion sind in pink/lila dargestellt. Die Top20 TZR-Klonotypen nach Expansion sind in blauen Farbtönen dargestellt. TZR-Klonotypen, die in beiden Top20-Listen enthalten sind, sind in grünen Farben dargestellt. **B,C.** Die statistische Signifikanz wurde durch gepaarte, zweiseitige t-Tests ermittelt. Modifiziert nach Lu et al. 2022<sup>109</sup>.

### 3.2.2 Spontane TIL-Reaktivität von Glioblastom-Patienten gegen bekannte Tumor-assoziierte Antigene (TAA)

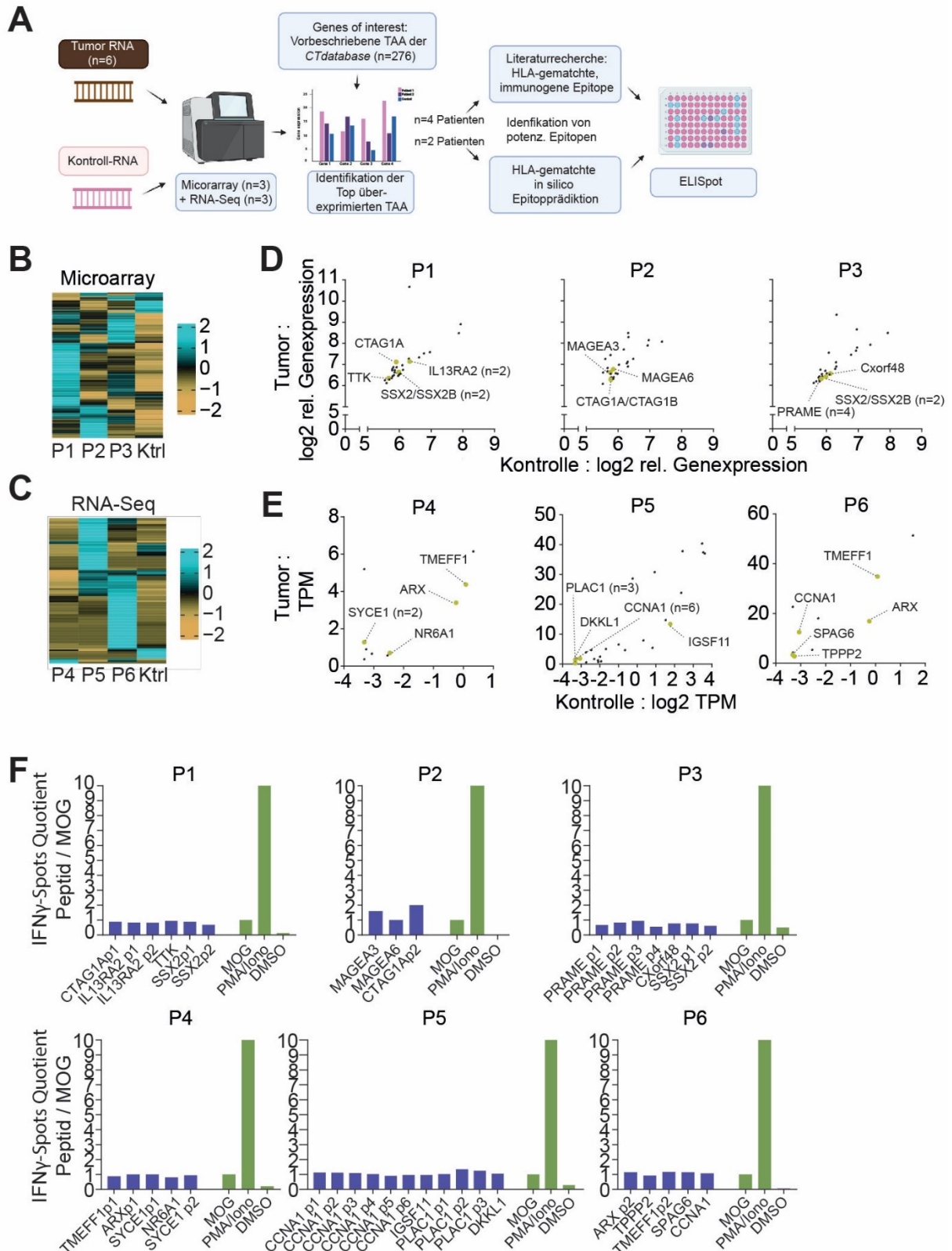
Neopeptide sind in Glioblastomen selten und meist patientenspezifisch und subklonal<sup>60,61,111</sup>. Daher können Neopeptid-spezifische T Zellen nur selten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu sind TAA häufig und patientenübergreifend überexprimiert. In Ligandomstudien konnte bereits gezeigt werden, dass überexprimierte TAA im Glioblastom und anderen Krebsarten prozessiert und präsentiert werden<sup>60,112,113</sup>. Trotz ihrer Abundanz im Tumor fehlen jedoch ausführliche Daten zu TAA-Epitopen als Zielantigene. Im Rahmen dieses Projekts wurde untersucht, ob in TIL-Kulturen spontane Reaktivität gegen beschriebene TAA oder neue, patientenindividuelle GBM-assoziierte Antigene (GAA) nachgewiesen werden kann.

In diese Studie wurden sechs Patienten mit diagnostizierten Glioblastomen eingeschlossen und am Operationstag Tumormaterial und peripheres Blut gewonnen. Mittels Microarray (n=3) oder RNA-seq (n=3) wurden vergleichende Expressionsanalysen der GBM-Proben und gepoolter gesunder Gehirn-RNA durchgeführt, um überexprimierte Gene im Tumor zu identifizieren (Abb. 13A). Zudem wurden für alle Studienpatienten eine HLA-Typisierung durchgeführt. (Tabelle 1). Zunächst wurde die spontane Reaktivität von TIL Kulturen auf vorbekannte TAA-Epitope untersucht. Dafür wurde eine Liste von n=276 beschriebenen TAA aus der *CTdatabase* extrahiert (Tabelle 2, siehe Anhang).

Microarrays sind für die semiquantitative Bewertung seltener Transkripte geeignet. Daher wurden Microarray-Analysen für drei GBM-Patientenproben (P1-3) durchgeführt, um das Expressionsniveau von vorbekannten TAA zu bestimmen (Abbildung 13B, C; Tabelle 3, siehe Anhang). Interessanterweise war die TAA-Expression mit Ausnahme einiger weniger Transkripte wie SSX-Peptid 2 zwischen P1 und P3 und CTAG1A zwischen P1 und P2 sehr heterogen. Einige TAA-Transkripte waren sogar in der Kontroll-RNA stärker exprimiert. Die 30 im Vergleich zur Kontrolle am stärksten überexprimierten TAA pro Patient (P1-3) wurden jeweils für eine Literaturrecherche auf bereits experimentell validierte, immunogene, HLA-konforme Epitope verwendet (Abbildung 13A). Unter Anwendung dieses Algorithmus wurden drei bis sieben auf HLA-Klasse-I begrenzte Epitope pro Patient ausgewählt (Tabelle 4, siehe Anhang). Die entsprechenden Epitope wurde jeweils als Peptid bestellt. Für jeden Patienten wurden anschließend ELISpots mit autologen TIL-Kulturen und den Epitop-basierten Peptiden durchgeführt. Jedoch löste keines der ausgewählten TAA-Peptide eine robuste IFN- $\gamma$ -Antwort in der entsprechenden TIL-Kultur aus (Abbildung 13F).

Als Nächstes wurde RNA-Seq anstelle Microarray zur Evaluation der TAA-Expression in drei weiteren GBM-Patientenproben verwendet (P4-P6) (Abbildung 13A). Im Vergleich mit den

Microarray-Ergebnissen zeigte sich ein größeres intraindividuelles Expressionsspektrum (Abbildung 13D, E; Tabelle 5, siehe Anhang). Entsprechend unserem Algorithmus zur Priorisierung von überexprimierten TAA und anschließender Literaturrecherche zu HLA-konformen TAA-Kandidaten wurden elf HLA-Klasse-I-präsentierte Epitope für die Testung auf spontane intratumorale T-Zell-Reaktionen bei Patient P5 ausgewählt. Für die Patienten P4 und P6 wurden aufgrund ihrer seltenen HLA-Merkmale keine HLA-übereinstimmenden TAA-Kandidaten gefunden. Für letztere wurden stattdessen die zehn am stärksten überexprimierten TAA ausgewählt. Diese wurden wiederum für *in silico* Kalkulationen von HLA-übereinstimmenden Epitopen mit dem *IEDB prediction tool* verwendet<sup>97</sup>. Dabei wurde für aus den TAA abgeleitete 9- und 10-Aminosäure-lange-Peptide eine Gesamtbewertung erstellt, die die Wahrscheinlichkeit für eine intrazelluläre Prozessierung und die Präsentation auf der Zelloberfläche berechnet. Schließlich wurden für die beiden Patienten die fünf Epitope mit der besten Gesamtbewertung ausgewählt (Tabelle 4, siehe Anhang). Überschneidungen der vorhergesagten TAA wurden für ARX zwischen P4 und P6 und für CCNA1 zwischen P5 und P6 festgestellt. Ähnlich wie beim Microarray-basierten Ansatz wurde keine IFN- $\gamma$ -Produktion für die Epitop-abgeleiteten Peptide beobachtet, wenn sie mit der entsprechenden TIL-Kultur inkubiert wurden (Abbildung 13F).



**Abbildung 13: Spontane TIL-Reaktivität von Glioblastom-Patienten gegen bekannte Tumor-assoziierte Antigene (TAA).** A. Experimentalübersicht. RNA aus GBM-Proben (n=6) und gepoolten gesunden Kontrollen wurde mittels Microarray (n=3) oder RNA-seq (n=3) sequenziert, um patientenspezifische Gen-Überexpression im Tumor zu ermitteln. Eine Liste von vorbeschriebenen, tumorassoziierten Antigenen (TAA) aus der CTdatabase (n=276) wurde nach patientenindividueller Überexpression sortiert. Für die 30 am stärksten überexprimierten TAA pro Patient wurden jeweils Literaturrecherchen durchgeführt, um patientenspezifische, HLA-konforme Epitope zu



finden, für die Immunogenität bereits beschrieben ist (Pro Patient n=3-11). Für Patienten mit seltenen HLA-Typen (P4, P6), für die keine vorbeschriebenen Epitope gefunden werden konnten, wurden Epitope HLA-konform mit dem *IEDB Processing Tool in silico* prädiziert. **B – E.** Auswahl der überexprimierten TAA. **B.** Heatmap der TAA-Genexpression in Microarray-Daten (P1-P3). **C.** Heatmap der TAA-Genexpression in RNA-seq-Daten (P4-P6). **D.** Microarray-Genexpression von n=3 GBM-Geweben (P1-P3) im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind die 30 am stärksten überexprimierten TAA-Gene. Gene mit vorbeschriebenen, HLA-konformen Epitopen, die für ELISpot-Assays verwendet wurden, sind gelb dargestellt. **E.** RNA-seq-Genexpression von n=3 GBM-Geweben (P4-P6) im Vergleich zur Kontrolle. **P5:** Darstellung der 30 am stärksten überexprimierten TAA-Gene. Gene mit vorbeschriebenen, HLA-konformen Epitopen sind gelb dargestellt. **P4, P6:** Dargestellt sind die zehn am stärksten überexprimierten TAA, die für die Epitopvorhersage mittels *IEDB Processing Tool* verwendet wurden. Die Gene, für deren Epitope die beste Gesamtbewertung für intrazelluläre Prozessierung und MHC-I-Präsentation kalkuliert wurde und für ELISpot-Tests verwendet wurden, sind gelb dargestellt. **F.** ELISpot-Assays mit autologen, expandierten TIL und ausgewählten Peptiden (aus B-E). Es wurden  $1 \times 10^5$  TIL pro Well verwendet. Das *Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein* (MOG)-Peptid wurde als Negativkontrolle verwendet. Modifiziert nach Lu *et al.* 2022<sup>109</sup>.

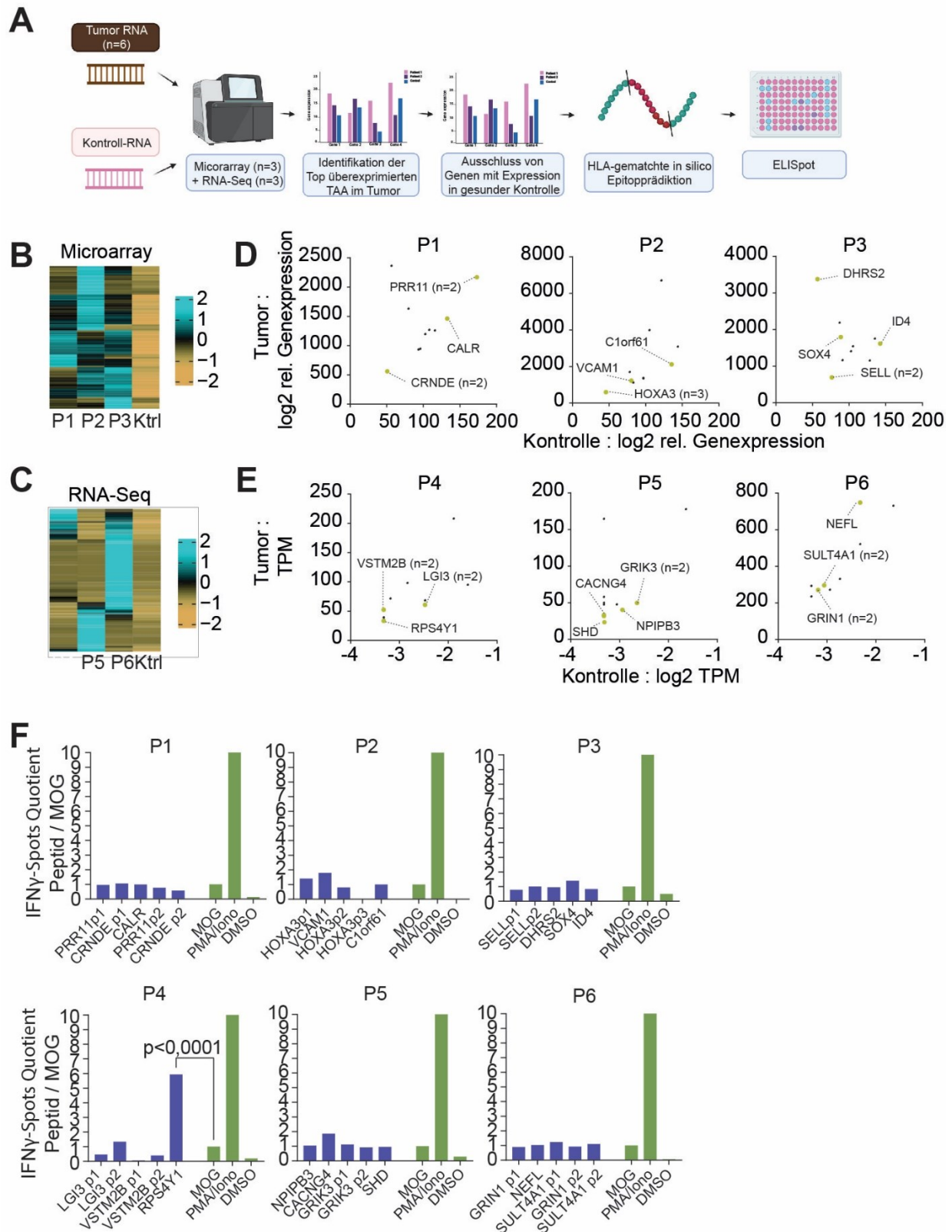
**Tabelle 1: HLA-Typisierungen in Glioblastom-Patienten (n=6).** Modifiziert nach Lu et al. 2022<sup>109</sup>.

Patient	P1	P2	P3	P4	P5	P6
HLA_A I	24:02:01G	30:04:01G	24:02:01G	01:01:01G	02:01:01G	32:01:01G
HLA_A II	02:01:01G	03:01:01G	02:01:01G	24:02:01G	23:01:01G	68:01:01G
HLA-B I	13:02:01G	49:01:01G	07:02:01G	08:01:01G	40:01:01G	18:01:01G
HLA-B II	44:02:01G	35:01:01G	40:01:01G	44:03:01G	44:02:01G	35:01:01G
HLA-C I	06:02:01G	07:01:01G	03:04:01G	04:01:01G	03:CEJXD	04:01:01G
HLA C II	07:04:01G	04:01:01G	07:02:01G	07:01:01G	05:01:01G	07:01:01G
HLA-DRB1	08:01:01G	04:02:01	13:02:01	03:RPXT	01:JZDV	01:JZDV
HLA-DRB1 II	07:DFRJ	03:01:01	01:01:01	07:BMSUC	04:BZVGC	03:RPXT
HLA-DQB1 I	04:02:00	03:02:01	06:04:00	02:CGRKB	03:CEMZB	02:CGRKD
HLA-DQB1 II	02:GKDU	02:01:01	05:01	02:CGRKD	05:CAVTD	05:CAVTD
HLA-DPB1 I	04:01	01:AETTG	03:FYKD	04:BYVXE	03:CEXRE	02:CEMZH
HLA-DPB II	04:01	04:ADCGE	04:ADCGE	13:AJYCN	03:CEXRE	04:BYMSJ

### 3.2.3 Spontane TIL-Reaktivität von Glioblastom-Patienten gegen individualisierte Glioblastom-assoziierte Antigene (GAA)

In einem zweiten Ansatz wurde die TIL-Reaktivität in den Patientenproben (P1-P6) auf patientenindividuelle Glioblastom-assoziierte Antigene (GAA) getestet (Abbildung 14A-F). Im Gegensatz zum ersten Ansatz, bei dem vorbeschriebene TAA untersucht wurden, wurden für die GAA keine Vorauswahl getroffen und stattdessen die Gene mit der höchsten Überexpression für jeden Patienten individuell ausgewählt. Mittels der durchgeführten Microarray- (Abb. 14 B,D) und RNA-seq-Untersuchungen (Abb. 14 C,E) wurden die Gene in eine Rangfolge gebracht. Potenzielle GAA, die im gesunden Kontrollgewebe eine Expression

über einem Cut-off-Wert (Microarray: > 200 relative Genexpression; RNA-seq: > 0,5 TPM) aufwiesen, wurden ausgeschlossen (Tabelle 6, siehe Anhang). Für die zehn Gene mit der höchsten Überexpression wurden wie vorbeschrieben jeweils patientenspezifische Epitope mittels *IEDB prediction tools* prädiziert (Abbildung 14D, E). Fünf HLA-konforme, HLA-Klasse-I-restringierte Peptide wurden pro Patient für die Testung ausgewählt (Tabelle 4). Es gab keine Überschneidung zwischen den ausgewählten GAA der einzelnen Patienten (Abbildung 14F). Interessanterweise ließ sich ebenfalls keine Übereinstimmung zwischen den patientenindividuellen GAA und den ausgewählten TAA (siehe Abbildung 13) feststellen. Von den ausgewählten GAA zeigte die Testung mit einem *RPS4Y1*-abgeleiteten 10-mer Peptid eine robuste IFN- $\gamma$ -Antwort bei Patient P4, definiert als >5-fache IFN $\gamma$ -Produktion im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 14F). Die Überexpression von *RPS4Y1* betrug in der Patientenprobe P4 das 333,6-fache im Vergleich zur Kontrolle und war HLA-B\*44:03-restringiert. Für die anderen Peptide konnte keine Reaktivität festgestellt werden. Insgesamt wurden für die Studie auf Grundlage verschiedener Priorisierungsalgorithmen n=68 HLA-angepasste Peptide synthetisiert und ausgewählt. Nur eine von sechs TIL-Kulturen zeigte antigenspezifische Reaktivität gegen einen GAA-Kandidaten.

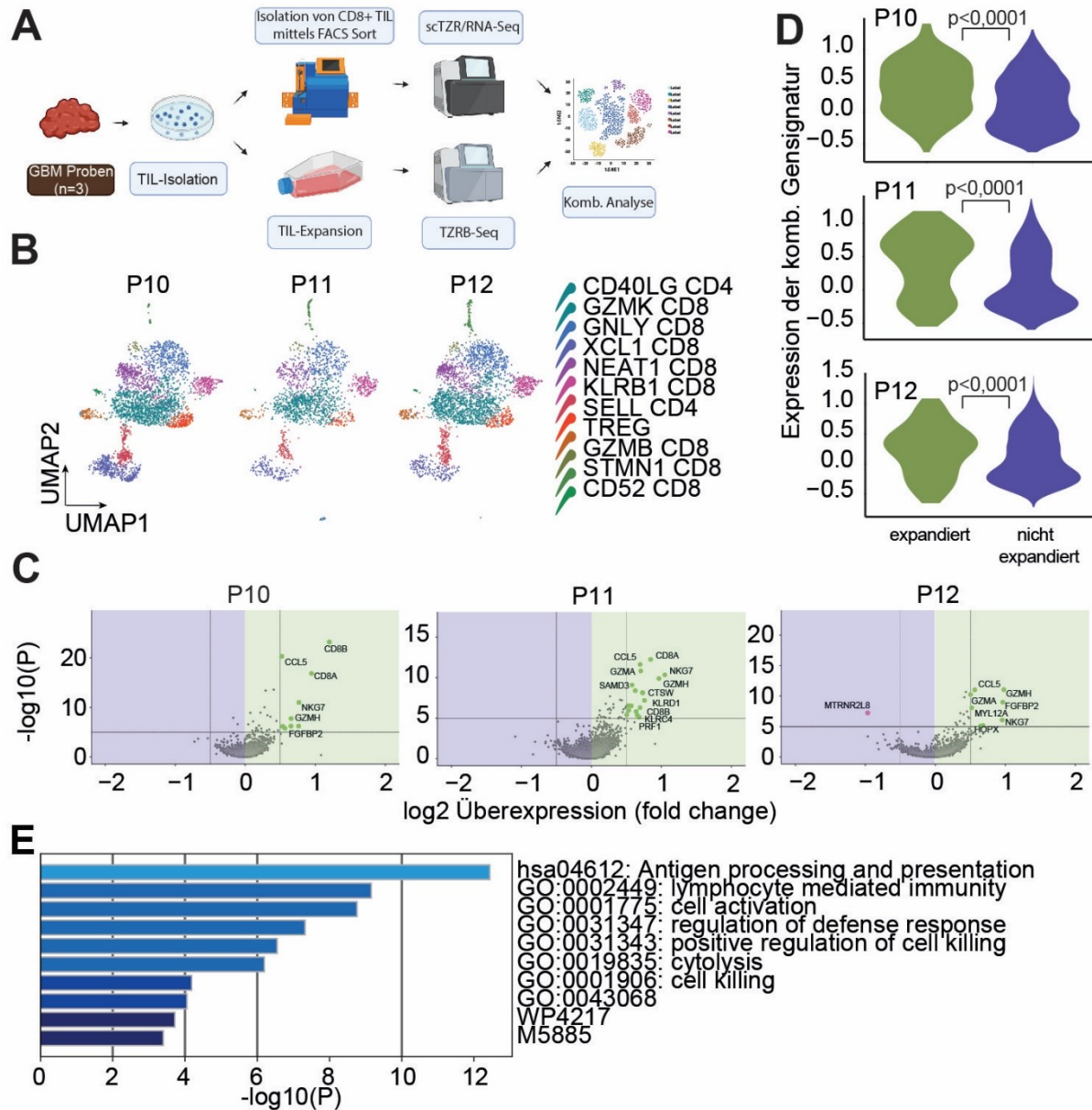


**Abbildung 14: Spontane TIL-Reaktivität von Glioblastom-Patienten gegen individualisierte Glioblastom-assoziierte Antigene (GAA)** **A**. Experimentalübersicht: Sequenzierungsdaten aus Abbildung 3. Gene wurden nach Überexpression in GBM-Patienten (n=6) im Vergleich zu gesunder Kontroll-RNA für jeden Patienten ohne Vorselektion sortiert. Anschließend wurden Gene, deren Expression im Kontrollgewebe über dem Cut-off lag (Microarray: >200 relative Genexpression; RNA-seq: > 0,5 TPM), ausgeschlossen. Für Top10 überexprimierte Gene wurden HLA-konforme Epitope mittels *IEDB Processing Tool* prädictiert. **B – E**. Auswahl der GAA-Kandidaten.

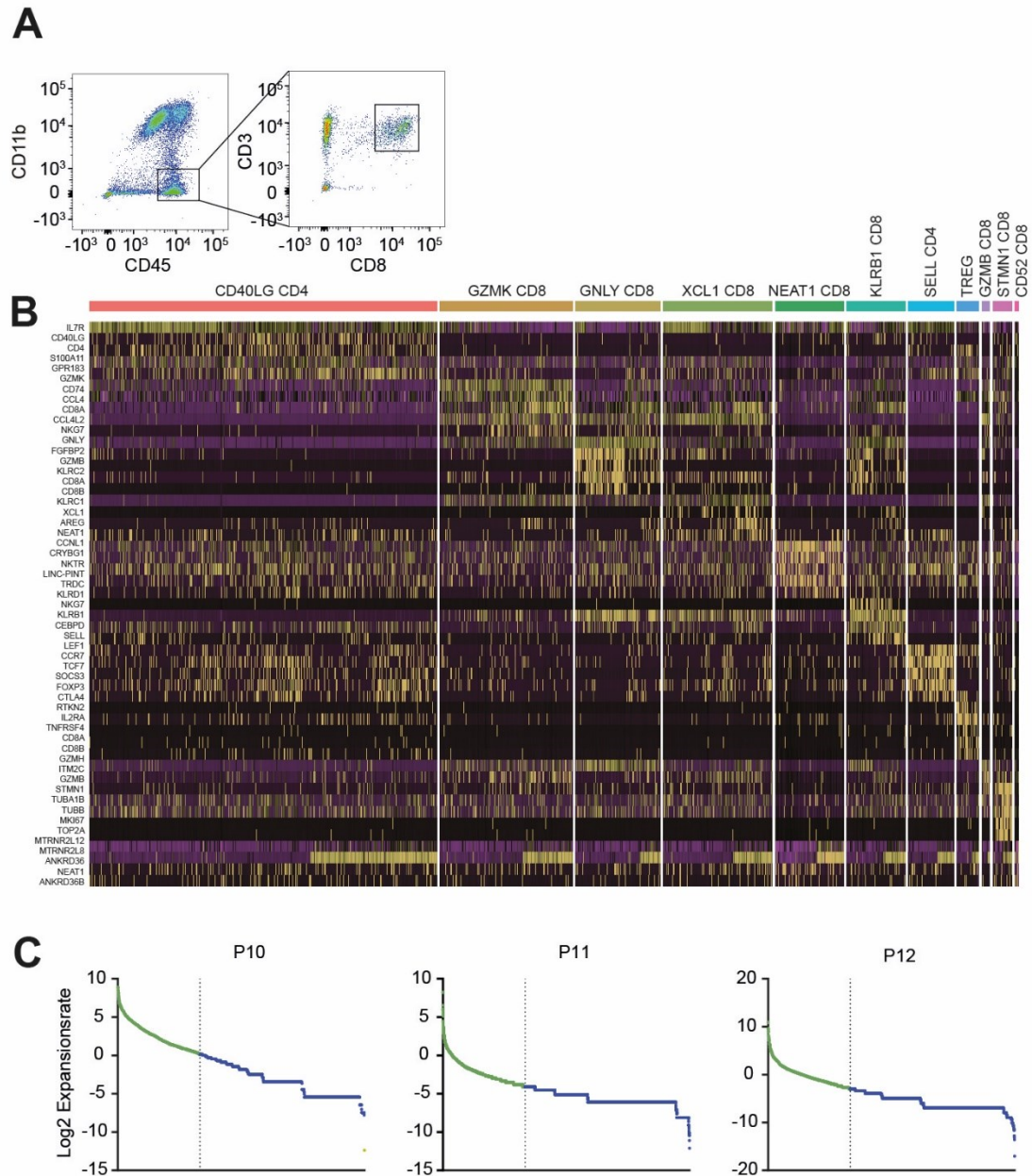
**B.** Heatmap der Genexpression in Microarray-Daten (P1-P3). **C.** Heatmap der Genexpression in RNA-seq-Daten (P4-P6) **D.** Genexpression von n=3 GBM-Geweben (P1-P3) im Vergleich zu gepoolter gesunder Gehirn-RNA in Microarray Daten. Dargestellt sind die zehn am stärksten überexprimierten Gene, die für die Epitopvorhersage verwendet wurden. Gene, deren Epitope die besten Gesamtbewertungen hatten und für ELISpot-Tests verwendet wurden, sind gelb dargestellt. **E.** Genexpression von n=3 GBM-Geweben (P4-P6) im Vergleich zu gepoolter gesunder Hirn-RNA in RNA-seq-Daten. Dargestellt sind die zehn am stärksten überexprimierten Gene, die für die Epitopvorhersage verwendet wurden. Gene, deren Epitope die besten Gesamtbewertungen hatten und für ELISpot-Tests verwendet wurden, sind gelb dargestellt. **F.** ELISpot-Assays mit autologen, expandierten TIL und ausgewählten Peptiden (aus B-E). Pro Well wurden  $1 \times 10^5$  TIL verwendet. Das *Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein* (MOG)-Peptid wurde als Negativkontrolle verwendet. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA mit Tukey-Test ermittelt. Modifiziert nach Lu *et al.* 2022<sup>109</sup>.

### 3.2.4 Transkriptionelle Signaturen bestimmen die TIL-Expansion

Im nächsten Schritt des Projekts wurde die Relevanz von transkriptionellen Signaturen zum Zeitpunkt der Tumorresektion auf die TIL-Expansion untersucht. 8.136 CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden vor Beginn der TIL-Expansion (Tag 0) aus *ex vivo* dissoziiertem GBM-Gewebe mittels Durchflusszytometrie isoliert (Abbildung 15A, Abbildung 3.2.5A) und kombinierte scTZR/RNA-seq durchgeführt (Abbildung 15B, Abbildung 16A, B). Um die expandierenden T-Zell-Klonotypen zu identifizieren, wurde nach *der in vitro* Expansion (Tag 14) eine TZR $\beta$ -seq der entsprechenden TIL-Kulturen durchgeführt (Abbildung 15A). Expandierte T-Zell-Subgruppen wurden durch Vergleich der relativen Häufigkeit von T-Zell-Klonotypen *ex vivo* und nach der Expansion bestimmt (Abbildung 16C). Auf Grundlage ihrer Expansionskapazität wurden die T-Zell-Klonotypen in expandierende (obere 33%) und nicht-expandierende (untere 67%) TIL-T-Zellen gruppiert. In der expandierten TIL-T-Zell-Population zeigten differenzielle Genanalysen eine erhöhte Expression mehrerer Gene, die mit der T-Zellaktivierung in Verbindung gebracht werden (Abbildung 15C). Von diesen Genen wurden *Granzyme A* (GZMA), *Granzyme H* (GZMH), *Chemokine (C-C motif) ligand 5* (CCL5), *Natural killer cell granule protein 7* (NKG7) und *Granulysin* (GNLY) in mindestens zwei GBM-Patientenproben auf expandierten T-Zellen stark exprimiert. Diese aktivierungsassoziierte Gensignatur war in der expandierten T-Zell-Population aller drei Patienten stark hochreguliert (Abbildung 15D). Die Gen-Ontologie-Analyse zeigte eine aktivierte, proinflammatorische Gensignatur und eine Assoziation mit Antigenverarbeitung und -präsentation sowie Zellaktivierung und Zytolyse (Abbildung 15E). Zusammengefasst wurde mittels multimodaler, longitudinaler T-Zell-Rezeptor- und Transkriptom-sc-RNA-seq eine T-Zell-Transkriptionssignatur identifiziert, die mit der *ex vivo* TIL-Expansion in Glioblastom-Patienten korreliert.



**Abbildung 15: Transkriptionelle Signaturen bestimmen die TIL-Expansion.** **A.** Experimentalübersicht: TIL-Kulturen, isoliert aus n=3 Glioblastom-Patienten (P10-P12). Geparate Single cell-TZR/RNA-Sequenzierung von *ex vivo* TIL-Kulturen (Tag 0) und TZRβ-Sequenzierung von expandierten TIL-Kulturen (Tag 14) wurden durchgeführt. **B.** *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP) Karte mit 8.136 CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus humanen Glioblastomen (n=3). Die Zellpopulationen sind gemäß definierendem Gen in der farbkodierten Legende angegeben. **C.** Vulkandiagramm mit Darstellung der unterschiedlich exprimierten Gene in expandierten und nicht-expandierten TIL-Subpopulationen. Die hervorgehobenen Gene sind die am stärksten überexprimierten Gene mit einem P-Wert < 0,05 und einer durchschnittlichen log-transformierten Fold change > 0,5. **D.** Violinplots, die die kumulative Expression der expansionsassoziierten Gensignatur in expandierten und nicht-expandierten TIL-Subgruppen darstellen. **E.** Gen-Ontologie-Analyse der expansionsassoziierten Gensignatur mittels *Metascape*. Modifiziert nach Lu *et al.* 2022<sup>109</sup>.



**Abbildung 16: Ergänzung zu Abb. 15 Transkriptionelle Signaturen bestimmen die TIL-Expansion. A.** Repräsentative Darstellung der *ex vivo* Durchflusszytometrie-Isolierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem TIL-Kompartiment, die für die Single cell (sc) TZR/RNA-Sequenzierung verwendet wurden. **B.** Heatmap der Expression der Top5 Marker pro Cluster im Glioblastom-Einzelzell Datensatz. **C.** Verhältnis der relativen Häufigkeit der T-Zell-Klonotypen nach Expansion und *ex vivo* dargestellt als log-transformierte Expansionsrate. Expandierte TIL-Untergruppe (Top 33%) in grün dargestellt. Nicht expandierte TIL-Untergruppe (Untere 67%) in blau dargestellt. Modifiziert nach Lu *et al.* 2022<sup>109</sup>.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 *In vitro* Kultur von humanen Zellen

Die personalisierte, zelluläre Therapie ist ein vielversprechender Ansatz, der jedoch eine aufwendige Infrastruktur benötigt. Ein limitierender Faktor bleibt dabei die begrenzte Verfügbarkeit von Patientenmaterial, vor allem von primären Zellen. Je nach Zelltyp und Anwendung werden verschiedene Ansätze verwendet, um diese Limitationen zu überwinden. TIL spielen eine essenzielle Rolle in der Tumorabwehr und haben als solche einen prognostischen Wert für das Patientenüberleben<sup>45,114–117</sup>. Sie werden in dieser Rolle auch für die zelluläre Therapie von Hirntumor-Patienten evaluiert<sup>105–108</sup>. Verschiedene TIL-Kulturmethode sind etabliert, in diesem Projekt wurde die *in vitro* Expansion aus Tumorstücken mit IL-2 und OKT-3 durchgeführt. Dabei zeigte sich in TZR $\beta$ -Sequenzierungen eine starke Verschiebung in den TZR-Klonotypen vor und nach Expansion (Abb. 12). Auffällig war vor allem die geringe Überlappung in den dominanten Klonen. Ein ähnliches Phänomen konnte auch in Melanom-TIL-Kulturen beobachtet werden<sup>118</sup>.

Die weitere Untersuchung der TIL-Kulturen ergab mangelnde Reaktivität der TIL auf TAA und GAA (Abb. 13, 14). Obwohl die gewählte Testungsstrategie Einschränkungen bezüglich der Sensitivität aufweist, ist die fehlende Antigenreaktivität zumindest ein Hinweis auf antigenunabhängige Faktoren für die T-Zell-Expansion, der mit einem Verlust von tumorreaktiven TIL einhergeht. Ähnliche Protokolle, wie bei diesem Projekt, werden auch zur TIL-Expansion in anderen Studien genutzt, unter anderem werden zusätzliche Zytokine wie IL-7 und IL-15 verwendet<sup>119,120</sup>. Insgesamt zeigen die mangelnde Antigenreaktivität der TIL Kultur sowie die starke Dynamik im TZR-Repertoire, dass bei zukünftigen Expansionsprotokollen neben der Expansionskapazität der TIL auch der Verlust von TZR-Klonotypen beachtet werden muss.

Antigenpräsentierende Zellen wie Dendritische Zellen können therapeutisch zur Vakzinierung von Krebspatienten genutzt werden<sup>121</sup>. In T-Zell-basierten Therapien können sie für *in vitro* Ko-Kulturen verwendet werden und als Feeder-Zellen die antigenspezifische Expansion von T-Zellen stimulieren<sup>122</sup>. Im Rahmen dieses Projekts wurde das Handling von primären Dendritischen Zellen verbessert (Abb. 7). Zusätzlich wurde ein personalisierbares *in vitro* Ko-Kultur-Modell etabliert (Abb. 3.1.3). K562-Zellen ermöglichen es, auch ohne verfügbares Patientenmaterial HLA-spezifisch Antigene zu präsentieren. Aufgrund ihrer guten Modifizierbarkeit ist es zusätzlich möglich, die Antigenpräsentation und T-Zell Aktivierung durch die Transduktion mit weiteren Co-Molekülen zu verbessern<sup>123</sup>. Als Effektorzellen wurden zusätzlich TZR-defiziente Jurkat76-Zellen etabliert, die mit variablen TZR ausgestattet werden

können (Abb. 3.1.3). Ist das Antigen bekannt, zum Beispiel im Rahmen einer Vakzinierungsstudie, so können verschiedene potenzielle TZR getestet werden.

#### **4.2 Risikoprofil der transgenen-T-Zell-Therapie gegen Tumorassoziierte Antigene**

In klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass bei Auswahl der richtigen Zielantigene eine zelluläre Therapie mit TAA-spezifischen, transgenen T-Zellen zu klinischem Erfolg führen kann<sup>70,89,90</sup>. Ein TZR gegen das TAA MART-1 wurde erfolgreich in einer klinischen Studie mit Melanom-Patienten genutzt<sup>89</sup>, NY-ESO-1 wurde in mehreren Tumorentitäten als Zielantigen verwendet<sup>70,90</sup>. Therapie mit IL-13R $\alpha$ 2-spezifischen CAR-T-Zellen führte sogar zu kompletter Remission in einem Patienten mit rezidivierendem, multifokalen GBM<sup>74</sup>. Gleichzeitig zeigen Studien mit TAA als Zielstruktur auch Risiken für Nebenwirkungen im Normalgewebe, so dass die Evaluation möglicher Toxizität und die Entwicklung entsprechender Lösungsansätze essenziell ist. Zu typischen Nebenwirkungen von Immuntherapien im Allgemeinen gehören Fieber, Müdigkeit, Ausschlag, in extremeren Fällen auch Zytokinfreisetzungssyndrome und Exazerbationen von Autoimmunerkrankungen<sup>124</sup>. Bei der gegen TAA gerichteten transgenen-T-Zell-Therapie kommen zusätzliche Risiken hinzu<sup>125</sup>:

1. Toxizität gegenüber TAA-exprimierendem Normalgewebe
2. Kreuzreaktivität von transgenen T-Zell-Rezeptoren

In Fallstudien entwickelten die Patienten schwere pulmonale und kardiale Toxizität nach AZT mit HER2-spezifischen CAR-T-Zellen<sup>126,127</sup>. Auch in Studien mit CAIX- (*carbonic anhydrase IX*)<sup>128</sup> und CEACAM5<sup>129</sup>-spezifischen CAR-Rezeptoren kam es zu schweren Nebenwirkungen in Form von Leber- und Lungentoxizität. In weiteren Studien wurden Melanom-Patienten mit hochaffin bindenden TZR gegen MART-1 oder gp100 behandelt. In 30% bzw. 19% der Patienten zeigte sich eine Regression des Tumors, allerdings kam es dabei auch zu starken toxischen Nebenwirkungen der Haut, Augen und Ohren aufgrund der unspezifischen Antigenexpression<sup>130</sup>. Viele ursprünglich als TAA mit restriktiver Expression beschriebene Antigene zeigen in neueren Analysen auch in somatischem Gewebe Expression<sup>131</sup>. Ein wichtiger Grund dafür ist die verbesserte Sensitivität der Analysemethoden. Es ist daher essenziell, die Genexpression von verwendeten Antigenen im Normalgewebe vor Studienbeginn streng zu evaluieren. In diesem Projekt wurden alle potenziellen GAA ausgeschlossen, die eine gewisse Expression im Normalgewebe überschritten. Wie hoch



genau die Expression im Normalgewebe sein darf, ist bislang ungeklärt, ist aber unter anderem von Faktoren wie dem betroffenen Gewebe, der Therapiemodalität und -intensität abhängig.

Kreuzreaktivität als Ursache für Toxizität ist bei der Therapie mit transgenen T-Zellen ein zusätzlicher Risikofaktor. So führte in einer Studie von Morgan *et al.* die Therapie mit MAGE-A3-spezifischen T-Zellen bei unerwarteter Kreuzreaktion auf MAGE-A12 zu schwerer Neurotoxizität<sup>98</sup>. Verwendet wurde ein TZR, der durch Vakzinierung einer humanisierten Maus gewonnen wurde. In einer weiteren Studie von Linette *et al.* mit MAGE-A3 spezifischen T-Zellen kam es zu Kardiotoxizität durch Kreuzreaktion auf Titin, ein Protein im gesunden Herzmuskel<sup>134</sup>. Dieser TZR wurde nach Vakzinierung aus einem Melanom-Patienten isoliert. In beiden Fällen wurden die TZR *in vitro* modifiziert, um höhere Affinitäten zu erreichen. Therapie mit niedrig-affinen T-Zellen schien in klinischen Versuchen bisher mit weniger Gefahr für Nebenwirkungen verbunden zu sein<sup>89</sup>. Ein weiterer Grund für off-target Toxizität kann nach Transduktion der T-Zellen die falsche Paarung der neuen, transgenen TZR-Ketten mit endogenen TZR-Ketten sein, die zu ungewollten Immunreaktionen führen können. Gleichzeitig führt die kompetitive Expression beider TZR zu einer verminderten Antigen-spezifität der T-Zelle. Vielversprechende Studien mit CRISPR/Cas9 Technologie können dies umgehen, indem der endogene TZR ausgeschaltet wird<sup>135</sup>.

### 4.3 Die Identifikation von Tumorantigenen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden n=68 Epitope getestet, dabei wurde lediglich eine spontane Immunantwort gegen ein Epitop von *RPS4Y1*, ein HLA-B\*44:03-restringiertes 10-mer, gefunden. Immunantworten gegen autologe Antigene sind im Vergleich zu Immunantworten gegen Neoepitope erwartungsgemäß geringer, da sie der Immuntoleranz unterliegen<sup>136</sup>. Potentiell hochaffine TAA-spezifische TZR werden durch physiologische Negativselektion im Thymus ausselektiert<sup>137</sup>. Anzumerken ist hier, dass es aufgrund von Immunoediting auch zum Verlust von Neoepitopen mit hoher Immunogenität kommt<sup>138</sup>. Zusammengenommen führen diese Faktoren zu einer erschwerten Auswahl der Zielantigene. Ein Vorteil von Neoepitopen sind die Tumorspezifität und die damit verbundenen geringeren Risiken für off-target Toxizität. Unter anderem wird in unserem Labor zurzeit die immunogene Treibermutation IDH1R132H in einer klinischen Vakzinierungsstudie getestet (NCT02454634). Eine Hürde ist, dass GBM nur wenige Mutationen besitzen, so dass die Zahl der potenziellen Zielantigene gering ist<sup>139</sup>. Tatsächlich konnten in Ligandomanalysen von GBM-Patienten keine Neoepitope, wohl aber TAA-Epitope gefunden werden<sup>60</sup>. Über mehrere Studien in verschiedenen Tumorentitäten hinweg hat sich gezeigt, dass mit 1,2% aller getesteten Epitope

lediglich ein geringer Anteil der Neoepitope eine spontane Immunantwort auslöst<sup>140</sup>. Diese Zahl entspricht ungefähr unserem Ergebnis mit getesteten TAA-Epitopen (1/68).

In diesem Projekt wurde die Antigenauswahl auf Basis von Überexpression im Tumor und restriktiver Expression im Normalgewebe getroffen (Abbildung 13, 14). Restriktive Expression im Normalgewebe hat bei der Auswahl höchste Priorität zur Minimierung der Therapie-assoziierten Toxizität. Wie oben bereits erläutert, kann bereits eine minimale Expression im Normalgewebe mit schwersten Nebenwirkungen einhergehen. Weiter erforscht werden muss, wie stark die Überexpression von Antigenen im Vergleich zu anderen Faktoren bei der Auswahl von Zielantigenen priorisiert werden muss.

Für die *in silico* Epitopprädiktionen wurde in diesem Projekt das *IEDB prediction tool* verwendet<sup>141</sup>. Dieses Programm nutzt zur Kalkulation unter anderem eine Datenbank aus bekannten Peptid-MHC Bindungsaffinitäten. Diese Berechnungen sind für häufige HLA-Klasse-I-Allele wie HLA-A2 zuverlässiger. Die Epitopprädiktion für seltene HLA-Typen basieren entsprechend auf kleineren Datenbanken, die Prädiktionen sind daher ungenauer. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass HLA-Klasse-II-restringierte Antigene eine große Rolle spielen<sup>142</sup>. Unter anderem wird auch das IDH1R132H-Epitop von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt<sup>143</sup>. Die Identifikation von CD4<sup>+</sup> Epitopen ist eine Herausforderung, da die Epitope sehr polymorph sind und ihre Länge der Epitope stärker variiert<sup>144</sup>. Prädiktionen für HLA-Klasse-II-Epitope wurden daher für diese Studie nicht verwendet.

Eine alternative Antigenselektion kann auch mittels Ligandomanalyse durchgeführt werden<sup>60,145</sup>. Diese erlaubt die Identifikation von präsentierten Epitopen im Tumor und wird erfolgreich in klinischen Studien verwendet, teilweise auch in Kombination mit Expressionsanalysen und *in silico* Berechnungen<sup>60,95,145</sup>. Trotz Weiterentwicklungen in den letzten Jahren birgt die Massenspektrometrie aber auch Herausforderungen, da die Analyse eine große Menge an Patientenmaterial erfordert und zeit- sowie kostenintensiv ist<sup>146</sup>. Sie kann zudem nur einen kleinen Teil aller präsentierter Epitope detektieren<sup>147</sup>, wodurch Antigene verloren gehen können. Davon betroffen sind besonders diejenigen, die nur in geringem Ausmaß präsentiert werden.

#### 4.4 Tumorreaktivität von Tumordinfiltrierenden Lymphozyten

TIL spielen eine essenzielle Rolle in der Tumorabwehr<sup>20</sup>. In einer Studie von Rosenberg *et al.* konnte durch adoptiven Transfer von unselektierten TIL in 20% der behandelten Melanom-Patienten Tumorregression erreicht werden<sup>148</sup>. Ziel unserer Studie war die Identifizierung von tumorreaktiven TZR im TIL Kompartiment. Auf Basis dieser Rationale wurden TIL mithilfe von ELISpots auf Antigen-spezifität getestet. Bei dieser Methode lassen sich bis zu einer Untergrenze von vier Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) produzierende Zellen aus 100.000 Zellen detektieren<sup>149</sup>. Dabei konnte in dieser Arbeit nur bei einem von 68 getesteten TAA eine spezifische Immunantwort gefunden werden. Neben bereits diskutierten Ursachen ist eine weitere zu diskutierende Faktor für dieses Ergebnis die unzureichende Tumorreaktivität des TIL Kompartiments<sup>150</sup>. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass ein großer Anteil der tumordinfiltrierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen *Bystander-T-Zellen* ohne Tumorreaktivität sind<sup>66</sup>. Während die genaue Funktion der T-Zellen unklar ist, so scheinen manche virale Epitope zu erkennen, während andere möglicherweise spezifisch für Tumorantigene sind, die durch Immunoediting verloren wurden<sup>138</sup>. Hinzu kommt, dass tumorreaktive T-Zellen häufig einen erschöpften Phänotyp mit Hochregulation von Checkpoint Molekülen wie PD-1 und CTLA-4 aufweisen<sup>151</sup>. In Kombination mit dem immunsupprimierenden Tumormikromilieu führt dies zu einer gestörten Effektorfunktion und kann ein Grund für die fehlende *in vitro* IFN $\gamma$ -Produktion sein<sup>152</sup>. Zusätzlich geht die Dysfunktion auch mit einer gestörten Proliferationskapazität einher<sup>153</sup>, die eine Rolle bei der Expansion der TIL Kulturen spielen kann und noch weiter untersucht werden muss. Ein Ansatz zur antigenspezifischen Expansion von TIL sieht vor, die TIL mit mittels *in silico* Prädiktion oder Massenspektrometrie identifizierten Peptiden zu kultivieren<sup>150</sup>. Expandierte TZR-Klonotypen können anschließend durch TZR-seq identifiziert werden. Dieser Ansatz ermöglicht insbesondere eine höhere Sensitivität bei der Suche nach niedrigfrequenten TZR.

Eine alternative Methode zur Detektion von tumorreaktiven TIL *ex vivo* sind Einzelzellanalysen, um mittels ihrer transkriptionellen Signatur die entsprechenden TIL-Subpopulationen zu finden<sup>67</sup>. Studien haben als Marker für Tumorreaktivität unter anderem CXCL13, PD-1 und TIGIT identifiziert<sup>67,100,154,155</sup>. Im Rahmen dieses Projekts wurde die Signatur für expandierende TIL untersucht und geht mit einem proinflammatorischen, aktivierungsassoziierten Phänotyp einher (Abbildung 15). Zu den in mindestens zwei GBM-Patienten hochregulierten Genen gehören *Granzyme A* (GZMA), *Granzyme H* (GZMH), *Chemokine (C-C motif) ligand 5* (CCL5), *Natural killer cell granule protein 7* (NKG7) und *Granulysin* (GNLY). Vergleiche mit bereits publizierten Gensignaturen für tumorreaktive TIL zeigen Überlappungen, unter anderem GZMA, GZMH und NKG7<sup>155,156</sup>. Weitere Analysen sind

nötig, um den prädiktiven Wert von Gensignaturen festzustellen. Für die in diesem Projekt festgestellte Gensignatur bleibt weiterhin unklar, ob sie T-Zell-Untergruppen mit insgesamt erhöhter Proliferationsfähigkeit definiert, oder ob sich dieser Zustand lediglich auf die *in vitro* Expansion beschränkt.

#### **4.5 Intratumorale Heterogenität als Hürde für die Immuntherapeutische Therapie von Patienten**

Heterogene Tumore wie das Glioblastom können aus zahlreichen Subklonen bestehen, die sich im Verlauf der Tumorentwicklung aus einer Tumorstammzelle entwickeln<sup>157</sup>. Ein wichtiger Faktor ist dabei das im Zusammenspiel mit dem Immunsystem stattfindende Immunoediting, das durch Selektionsdruck die Entwicklung von Subklonen des Tumors fördert<sup>135</sup>. Klinische Studien zeigen, dass intratumorale Heterogenität eine große Herausforderung in der Krebstherapie darstellt<sup>158</sup>. Sie erschwert sowohl die Identifizierung von Zielstrukturen wie auch die Therapie. Für unsere Studie wurden Bulk-Sequenzierungen verwendet. Diese ermöglichen es, überexprimierte Antigene zu identifizieren, bilden jedoch die Heterogenität des Tumors nur unvollständig ab. Unklar bleibt, ob die Überexpression eines möglichen Zielantigens im kompletten Tumor zu finden ist oder sich lediglich auf eine Subpopulation beschränkt. Zielstrukturen, die nur in einzelnen Subpopulationen exprimiert werden, können wiederum übersehen werden<sup>159</sup>.

Therapeutisch stellt die Heterogenität im Tumor ebenfalls eine Herausforderung dar<sup>160</sup>, da resistente Subpopulationen der Therapie entkommen und zu einem Rezidiv führen können<sup>161</sup>. Im Kontext der individualisierten Therapie ist der Antigenverlust ein beschriebener Mechanismus, der auch in klinischen Studien mit Glioblastomen zu Rezidivbildung führt<sup>162</sup>. Eine mögliche Lösung ist die Therapie mit multiplen Zielantigenen, zum Beispiel in Form von Multipeptidvakzinen<sup>60,83</sup>. Interessanterweise zeigte sich in einer präklinischen Studie, dass größere Heterogenität unabhängig von der Mutationslast zu verstärktem Tumorwachstum und verminderter Immunantwort im murinen Melanommodell führte<sup>163</sup>. Eine longitudinale Analyse der Tumore im Mausmodell zeigte, dass es nicht wie erwartet zum Auswachsen einzelner Subklone kam. Stattdessen postulieren Wolf *et al.* eine verminderte Immunantwort durch Dilution der Antigene als Grund für die verminderte Immunantwort und das schlechtere Überleben. Auch in klinischen Daten zeigte sich, dass Patienten unter Checkpoint-Therapie mit genetisch diverserem Tumor ein schlechteres Überleben zeigen. Um die dahinter liegenden Mechanismen besser zu erforschen, werden unter anderem PDX-Modelle, Organoide und Einzelzellanalysen verwendet, um Tumorerheterogenität besser abzubilden<sup>164</sup>.

#### 4.6 Perspektiven in der Glioblastomtherapie

Ein wichtiges Thema in der Glioblastomforschung ist aktuell die Kombination verschiedener immuntherapeutischer und konventioneller Behandlungsstrategien<sup>165,166</sup>, um Synergien zu verstärken und antagonistische Effekte zu minimieren. Zur Standardtherapie von Glioblastom-Patienten gehören chirurgische Resektion, Radiotherapie, Chemotherapie mit Temozolomid<sup>12</sup> und symptomatische Therapie mit Glukokortikoiden, Antikonvulsiva und Antiemetika<sup>167</sup>. Zu den vielversprechendsten, experimentellen Therapien gehört die patienten-individualisierte Immuntherapie, zu deren Etablierung und Weiterentwicklung diese Dissertation konzipiert wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass einige der Standard-Therapiemodalitäten eine Hemmung der antitumoralen Immunantwort bewirken. So führen Glukokortikoide über eine Inaktivierung von T-Gedächtniszellen und Expansion von immunsuppressiven Immunzellpopulationen wie T<sub>reg</sub> und MDSC zu einem immunsuppressiven Tumormikromilieu. Passend dazu zeigten sich in der *NeoVax*-Studie nach Vakzinierung nur induzierte T-Zell Antworten in Patienten, die kein Dexamethason während der Vakzinierung erhalten hatten<sup>61</sup>. Studien konnten zudem zeigen, dass die Gabe von Glukokortikoiden mit einer schlechteren Prognose in Glioblastom-Patienten einhergeht<sup>168</sup>. In Mäusen führte systemische Gabe von Chemotherapie zu intratumoraler Depletion von Lymphozyten und schlechterem Ansprechen auf Checkpoint Inhibition<sup>169</sup>. Auch der Einfluss der Radiotherapie auf das Immunsystem muss weiter untersucht werden. So zeigte sich eine Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Patienten nach hyperfraktionierter Bestrahlung, die mit einer negativen Prognose einherging<sup>170</sup>.

Vielversprechend zeigten sich neue Studien mit neoadjuvanter Checkpoint-Inhibition und machen sie damit zu einem wertvollen Baustein in einem kombinierten Therapieschema<sup>53–55</sup>. Ein Projekt unserer Arbeitsgruppe untersucht zurzeit in einer multizentrischen Phase-I-Studie den synergistischen Effekt einer IDH1R132H-Vakzinierung in Kombination mit der Gabe des Checkpoint-Inhibitors *Avelumab* (NOA-21/ AMPLIFY-NEOVAC NCT20160458) in Patienten mit einem rezidivierenden, IDH1-mutierten Gliom. Während die Durchführbarkeit und Sicherheit einer monotherapeutischen IDH1R132H-Vakzinierung bereits gezeigt werden konnte (NOA-16 NCT02454643; RESIST NCT02193347)<sup>110</sup>, sollen damit die potenziellen Synergieeffekte einer Kombinationstherapie untersucht werden. Zusätzlich laufen zurzeit Studien zur Kombination von Checkpoint-Inhibitoren mit DZ-Vakzinierungen (NCT02529072, NCT03014804). Weitere Phase-I-Studien kombinieren Checkpoint-Inhibition mit CAR-T-Zellen. So untersucht eine Studie den Effekt von CAR-T-Zellen gegen EGFRvIII in Kombination mit *Pembrolizumab* (PD-1-Inhibitor) in neu diagnostizierten GBM (NCT03726515), eine andere anti-IL-13R $\alpha$ 2-CAR-T-Zellen mit kombinierter Checkpoint

Inhibition (*Nivolumab* + *Ipilimumab*) in GBM-Rezidiven (NCT04003649). Weitere Studien verfolgen die Kombination von Immuntherapie mit anderen therapeutischen Modalitäten. Stereotaktische Radiochirurgie (SRS) ist ein intensiv erforschter Therapieansatz, aber auch lokale Chemotherapie, Onkolytische Virustherapie, Laserablation und Nanopartikel werden untersucht (NCT02311582, NCT01811992, NCT01205334, NCT02197169, NCT02798406, NCT02576665, NCT03020017, NCT00734682, NCT02340156 und NCT02766699). So zeigt zum Beispiel die Kombination von SRS mit PD-1 Inhibitoren einen Überlebensvorteil für behandelte Mäuse und SRS scheint im Vergleich zur normalen Radiotherapie weniger immunsuppressiv zu wirken<sup>171</sup>.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Dissertation die zelluläre Therapie für Glioblastom-Patienten exploriert. Während technische Fortschritte immer neue Möglichkeiten zur Analyse und *in vitro* Manipulation von Zellen eröffnen, bleibt die Identifikation von Tumorepitopen und tumorspezifischen Lymphozyten insbesondere in mutationsarmen Tumoren wie dem Glioblastom eine große Herausforderung. Ergebnisse der vielen, aktuell laufenden klinischen Studien bleiben abzuwarten.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Glioblastome sind die häufigsten primären Hirntumore. Trotz maximaler Therapie mit Operation und Radiochemotherapie ist die Prognose nach wie vor auf ein Gesamtüberleben von unter 16 Monaten im Median begrenzt. Ein großer Hoffnungsträger ist die Immuntherapie, insbesondere Immuncheckpoint-Inhibitoren und zelluläre Therapien. Für zelluläre Therapien können *in vitro* expandierte autologe Tumorerfiltrierende Lymphozyten (TIL) oder genetisch modifizierte Zellen verwendet werden.

Ein essenzieller Schritt für die erfolgreiche, personalisierte Immuntherapie ist die Detektion von Tumorantigenen und entsprechenden T-Zell-Rezeptoren (TZR). Im ersten Teil dieser Dissertation konnte ein personalisierbares Zellmodell etabliert werden, um *in vitro* Ko-Kulturen zur Antigen- und TZR-Testung durchzuführen. Es konnte gezeigt werden, dass K562-Zellen als antigenpräsentierende Zellen (APZ) mit personalisierten humanen Leukozytenantigenen (HLA) transfiziert werden und erfolgreich HLA-konforme Antigene präsentieren können, die wiederum von TZR-transduzierten Jurkat76-Zellen erkannt werden. Als weiterer, wichtiger Schritt wurde die Transfektion von primären humanen T-Zellen mit transgenen TZR etabliert. Die Spezifität dieser transgenen T-Zellen konnte durch Tetramer-Färbung gezeigt werden. Insgesamt konnten so wichtige Grundsteine für die personalisierte Immuntherapie in Glioblastomen vorangetrieben werden.

Die zelluläre Therapie mit expandierten, autologen TIL umgeht im Vergleich zu personalisierten Plattformen zeitaufwändige und technologisch anspruchsvolle Methoden, insbesondere die Antigen-Identifikation und Zell-Modifikation. Ihre Durchführbarkeit wurde bereits in primären und sekundären Hirntumoren gezeigt. Im zweiten Teil der Dissertation wurde die Dynamik und die Spezifität des T-Zell-Rezeptor-Repertoires in TIL-Kulturen von Glioblastom-Patienten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* TIL-Expansion zu einem starken Anstieg in der Klonalität des TZR-Repertoires führt. Gleichzeitig gibt es nur wenig Überschneidung zwischen den dominierenden TZR-Klonotypen vor und nach Expansion, was auf starke Unterschiede in den Expansionskapazitäten der einzelnen TZR-Klonotypen hindeutet. Neoepitope sind in Glioblastomen selten und meist subklonal, dagegen sind unmutierte Tumorassoziierte Antigene (TAA) häufig überexprimiert. Zur Exploration der Tumorreaktivität nach TIL-Expansion wurden überexprimierte TAA auf Basis von Microarray und RNA-Sequenzierung (-seq) individuell für jeden Patienten identifiziert. Epitope wurden auf Basis von experimentell validierter Immunogenität und *in silico* prädizierter Wahrscheinlichkeit für intrazelluläre Prozessierung sowie HLA-Präsentation ausgewählt. In ELISpot-Assays mit autologen, expandierten TIL-Kulturen zeigte sich bei 68 getesteten Peptiden lediglich eine spontane Immunantwort in einer TIL-Kultur gegen *RPS4Y1*. In Zusammenschau mit den

vorherigen Beobachtungen deutet dies darauf hin, dass Faktoren unabhängig von der Tumorreaktivität die Expansion *in vitro* antreiben. Im letzten Schritt wurde mittels kombinierter Einzelzell (sc)-TZR/RNA-seq und TZRb-seq vor und nach Expansion die Gensignatur von expandierenden TIL-T-Zellen untersucht. Dabei konnte eine proinflammatorische, aktivierungsassoziierte Gensignatur in expandierenden TIL-Subpopulationen identifiziert werden. Diese Gensignatur beinhaltet *Granzyme A*, *Granzyme H*, *Chemokine ligand 5*, *Natural killer cell granule protein 7* und *Granulysin*.

Zusammenfassend hat diese Dissertation wichtige Methoden zur Identifikation und Charakterisierung antigenspezifischer T-Zell-Antworten gegen Glioblastome etabliert. Zudem wurde die Dynamik und Spezifität von *in vitro* TIL-Kulturen als möglicher Therapieansatz für autologe Zelltherapien exploriert. Die Ergebnisse dieser Dissertation bieten somit wichtige Ansatzpunkte für die weitere Entwicklung der zellulären Immuntherapie in Glioblastom-Patienten.



## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, et al.: CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro Oncol* 19: v1–v88, 2017
2. Stupp R, Brada M, Bent M Van Den, ... JT-A of, 2014 undefined: High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *academic.oup.com*
3. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E: Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 46: 765–781, 2010
4. Rapp M, Heinzl A, Galldiks N, Stoffels G, Felsberg J, Ewelt C, et al.: Diagnostic performance of 18F-FET PET in newly diagnosed cerebral lesions suggestive of glioma. *Journal of Nuclear Medicine* 54: 229–235, 2013
5. Pichler R, Dunzinger A, Wurm G, Pichler J, Weis S, Nubaumer K, et al.: Is there a place for FET PET in the initial evaluation of brain lesions with unknown significance? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37: 1521–1528, 2010
6. Dunet V, Rossier C, Buck A, Stupp R, Prior JO: Performance of 18F-fluoro-ethyl-tyrosine ( 18F-FET) PET for the differential diagnosis of primary brain tumor: A systematic review and metaanalysis. *Journal of Nuclear Medicine* 53: 207–214, 2012
7. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al.: The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114: 97–109, 2007
8. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al.: The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 131: 803–820, 2016
9. Schumacher T, Bunse L, Pusch S, Sahm F, Wiestler B, Quandt J, et al.: A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature* 512: 324–327, 2014
10. Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, et al.: EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* 17: 30, 2020
11. Vuorinen V, Hinkka S, Färkkilä M, Jääskeläinen J: Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people - a randomised study. *Acta Neurochir (Wien)* 145: 5–10, 2003
12. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al.: Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 352: 987–996, 2005
13. Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, et al.: NOA-04 Randomized Phase III Trial of Sequential Radiochemotherapy of Anaplastic Glioma With Procarbazine, Lomustine, and Vincristine or Temozolomide. *Journal of Clinical Oncology* 27: 5874–5880, 2009
14. Ung N, Yang I: Nanotechnology to augment immunotherapy for the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 123: 473–481, 2015
15. Vogelbaum MA, Aghi MK: Convection-enhanced delivery for the treatment of glioblastoma. *Neuro Oncol.* 17: ii3–ii8, 2015
16. Platten M, Offringa R: Cancer immunotherapy: Exploiting neoepitopes. *Cell Res* 2015

17. Platten M, Bunse L, Wick W, Bunse T: Concepts in glioma immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 65: 1269–1275, 2016
18. Hu X, Deng Q, Ma L, Li Q, Chen Y, Liao Y, et al.: Meningeal lymphatic vessels regulate brain tumor drainage and immunity. *Cell Res* 2020
19. Lohr J, Ratliff T, Huppertz A, Ge Y, Dictus C, Ahmadi R, et al.: Effector T-Cell Infiltration Positively Impacts Survival of Glioblastoma Patients and Is Impaired by Tumor-Derived TGF-. *Clinical Cancer Research* 17: 4296–4308, 2011
20. Han S, Zhang C, Li Q, Dong J, Liu Y, Huang Y, et al.: Tumour-infiltrating CD4(+) and CD8(+) lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br J Cancer* 110: 2560–8, 2014
21. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al.: Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523: 337–341, 2015
22. Nduom EK, Weller M, Heimberger AB: Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma: Fig. 1. *Neuro Oncol* 17: vii9–vii14, 2015
23. Doucette T, Rao G, Rao A, Shen L, Aldape K, Wei J, et al.: Immune Heterogeneity of Glioblastoma Subtypes: Extrapolation from the Cancer Genome Atlas. *Cancer Immunol Res* 1: 112–122, 2013
24. Butte M, Keir M, Phamduy T, Immunity AS-, 2007 undefined: Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Elsevier*
25. Frei K, Gramatzki D, Tritchler I, Oncotarget JS-, 2015 undefined: Transforming growth factor- $\beta$  pathway activity in glioblastoma. *ncbi.nlm.nih.gov*
26. Hegardt P, Widegren B, immunology HS-C, 2000 undefined: Nitric-oxide-dependent systemic immunosuppression in animals with progressively growing malignant gliomas. *Elsevier*
27. Kuppner M, Sawamura Y, ... MH-J of, 1990 undefined: Influence of PGE2-and cAMP-modulating agents on human glioblastoma cell killing by interleukin-2-activated lymphocytes. *thejns.org*
28. Nitta T, Hishii M, Sato K, research KO-B, 1994 undefined: Selective expression of interleukin-10 gene within glioblastoma multiforme. *Elsevier*
29. Kohanbash G, McKaveney K, Sakaki M, research RU-C, 2013 undefined: GM-CSF promotes the immunosuppressive activity of glioma-infiltrating myeloid cells through interleukin-4 receptor- $\alpha$ . *AACR*
30. Crane C, Ahn B, Han S, Neuro-oncology AP-, 2012 undefined: Soluble factors secreted by glioblastoma cell lines facilitate recruitment, survival, and expansion of regulatory T cells: implications for immunotherapy. *academic.oup.com*
31. Wainwright DA, Dey M, Chang A, Lesniak MS: Targeting Tregs in Malignant Brain Cancer: Overcoming IDO. *Front Immunol* 4: 2013
32. Grauer OM, Nierkens S, Bennink E, Toonen LWJ, Boon L, Wesseling P, et al.: CD4+FoxP3+ regulatory T cells gradually accumulate in gliomas during tumor growth and efficiently suppress antiglioma immune responses in vivo. *Int J Cancer* 121: 95–105, 2007
33. Wu A, Wei J, Kong L, Wang Y, ... WP-N, 2010 undefined: Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *academic.oup.com*
34. Wurdinger T, Deumelandt K, ... H van der V-... et BA (BBA, 2014 undefined: Mechanisms of intimate and long-distance cross-talk between glioma and myeloid cells: how to break a vicious cycle. *Elsevier*
35. Raychaudhuri B, Rayman P, Ireland J, ... JK-N, 2011 undefined: Myeloid-derived suppressor cell accumulation and function in patients with newly diagnosed glioblastoma. *academic.oup.com*

36. Weller M, Roth P, Preusser M, Wick W, Reardon DA, Platten M, et al.: Vaccine-based immunotherapeutic approaches to gliomas and beyond. *Nat Rev Neurol* 13: 363–374, 2017
37. Lu YC, Robbins PF: Cancer immunotherapy targeting neoantigens. *Semin Immunol* 28: 22–27, 2016
38. Salmaninejad A, Zamani MR, Pourvahedi M, Golchehre Z, Hosseini Bereshneh A, Rezaei N: Cancer/Testis Antigens: Expression, Regulation, Tumor Invasion, and Use in Immunotherapy of Cancers. *Immunol Invest* 45: 619–640, 2016
39. Chen D, Immunity IM-, 2013 undefined: Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Elsevier*
40. Eggermont L, Paulis L, Tel J, biotechnology CF-T in, 2014 undefined: Towards efficient cancer immunotherapy: advances in developing artificial antigen-presenting cells. *Elsevier*
41. Curtsinger J, immunology MM-C opinion in, 2010 undefined: Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Elsevier*
42. Preusser M, Lim M, Hafler D, ... DR-NR, 2015 undefined: Prospects of immune checkpoint modulators in the treatment of glioblastoma. *nature.com*
43. Dustin ML, Long EO: Cytotoxic immunological synapses. *Immunol Rev* 235: 24–34, 2010
44. Guang Gao F, Khammanivong V, Jun Liu W, Leggatt GR, Frazer IH, P Fernando GJ: Antigen-specific CD4 T-Cell Help Is Required to Activate a Memory CD8 T Cell to a Fully Functional Tumor Killer Cell 1.
45. Kmiecik J, Poli A, Brons NHC, Waha A, Eide GE, Enger PØ, et al.: Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *J Neuroimmunol* 264: 71–83, 2013
46. Boussiotis VA, Charest A: Immunotherapies for malignant glioma. *Oncogene* 37: 1121–1141, 2018
47. Pardoll DM: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12: 252–64, 2012
48. Sharpe AH, Pauken KE: The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol* 18: 153–167, 2017
49. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob J-J, Cowey CL, et al.: Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine* 377: 1345–1356, 2017
50. Ribas A, Wolchok JD: Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 359: 1350–1355, 2018
51. Reardon DA, Omuro A, Brandes AA, Rieger J, Wick A, Sepulveda J, et al.: OS10.3 Randomized Phase 3 Study Evaluating the Efficacy and Safety of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: CheckMate 143. *Neuro Oncol* 19: iii21–iii21, 2017
52. Sampson JH, Omuro AMP, Preusser M, Lim M, Butowski NA, Cloughesy TF, et al.: A randomized, phase 3, open-label study of nivolumab versus temozolomide (TMZ) in combination with radiotherapy (RT) in adult patients (pts) with newly diagnosed, O-6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT)-unmethylated glioblastoma (GBM): CheckMate-498. *Journal of Clinical Oncology* 34: TPS2079–TPS2079, 2016
53. Zhao J, Chen AX, Gartrell RD, Silverman AM, Aparicio L, Chu T, et al.: Immune and genomic correlates of response to anti-PD-1 immunotherapy in glioblastoma. *Nat Med* 25: 462–469, 2019

54. Schalper KA, Rodriguez-Ruiz ME, Diez-Valle R, López-Janeiro A, Porciuncula A, Idoate MA, et al.: Neoadjuvant nivolumab modifies the tumor immune microenvironment in resectable glioblastoma. *Nat Med* 25: 470–476, 2019
55. Cloughesy TF, Mochizuki AY, Orpilla JR, Hugo W, Lee AH, Davidson TB, et al.: Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nat Med* 25: 477–486, 2019
56. Carreno BM, Magrini V, Becker-Hapak M, Kaabinejadian S, Hundal J, Petti AA, et al.: A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science (1979)* 348: 803–808, 2015
57. Ott PA, Hu Z, Keskin DB, Shukla SA, Sun J, Bozym DJ, et al.: An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 547: 217–221, 2017
58. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, Kloke B-P, Simon P, Löwer M, et al.: Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 547: 222–226, 2017
59. Liao LM, Ashkan K, Tran DD, Campian JL, Trusheim JE, Cobbs CS, et al.: First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *J Transl Med* 16: 142, 2018
60. Hilf N, Kuttruff-Coqui S, Frenzel K, Bukur V, Stevanović S, Gouttefangeas C, et al.: Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature* [Internet] 565: 240–245, 2019 Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-018-0810-y> [cited 2019 May 7]
61. Keskin DB, Anandappa AJ, Sun J, Tirosh I, Mathewson ND, Li S, et al.: Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. *Nature* [Internet] 565: 234–239, 2019 Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-018-0792-9> [cited 2019 May 7]
62. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, et al.: Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 17: 4550–4557, 2011
63. Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu Y-C, Dudley ME, et al.: Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* 344: 641–5, 2014
64. Zacharakis N, Chinnasamy H, Black M, Xu H, Lu Y-C, Zheng Z, et al.: Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer. *Nat Med* 24: 724–730, 2018
65. Woroniecka K, Chongsathidkiet P, Rhodin K, Kemeny H, Dechant C, Harrison Farber S, et al.: T-cell exhaustion signatures vary with tumor type and are severe in glioblastoma. *Clinical Cancer Research* 24: 4175–4186, 2018
66. Simoni Y, Becht E, Fehlings M, Loh CY, Koo S-L, Teng KWW, et al.: Bystander CD8+ T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. *Nature* 557: 575–579, 2018
67. Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, et al.: PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest* 124: 2246–59, 2014
68. Ye Q, Song DG, Poussin M, Yamamoto T, Best A, Li C, et al.: CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor. *Clinical Cancer Research* 20: 44–55, 2014
69. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, et al.: Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and

- melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* 29: 917–24, 2011
70. Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, et al.: NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med* 21: 914–921, 2015
  71. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC: CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science (1979)* 359: 1361–1365, 2018
  72. Gross G, Waks T, Eshhar Z: Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 10024–10028, 1989
  73. Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, Nakanishi M, Arata Y, Itoh S, et al.: Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun* 149: 960–968, 1987
  74. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, et al.: Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy. *New England Journal of Medicine* 375: 2561–2569, 2016
  75. Bagley S, Desai A, Linette G, ... CJ-N, 2018 undefined: CAR T-cell therapy for glioblastoma: recent clinical advances and future challenges. *academic.oup.com*
  76. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al.: Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *New England Journal of Medicine* 371: 2189–2199, 2014
  77. Schumacher T, Bunse L, Wick W, Platten M: Mutant IDH1: An immunotherapeutic target in tumors. *Oncoimmunology* 3: e974392, 2014
  78. Zarour H, Smet C De, Lehmann F, ... MM-J of I, 1996 undefined: The majority of autologous cytolytic T-lymphocyte clones derived from peripheral blood lymphocytes of a melanoma patient recognize an antigenic peptide derived. *Elsevier*
  79. Bruggen P van der, Traversari C, ... PC-, 1991 undefined: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *science.sciencemag.org*
  80. Almeida L, Sakabe N, ... AD-N acids, 2008 undefined: CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. *academic.oup.com*
  81. Duan F, Duitama J, Al Seesi S, Ayres CM, Corcelli SA, Pawashe AP, et al.: Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. *Journal of Experimental Medicine* 211: 2231–2248, 2014
  82. Schubert B, Brachvogel H-P, Jürges C, Kohlbacher O: EpiToolKit--a web-based workbench for vaccine design. *Bioinformatics* 31: 2211–3, 2015
  83. Sahin U, Science ÖT-, 2018 undefined: Personalized vaccines for cancer immunotherapy. *science.sciencemag.org*
  84. Bloom HJ, Peckham MJ, Richardson AE, Alexander PA, Payne PM: Glioblastoma multiforme: a controlled trial to assess the value of specific active immunotherapy in patients treated by radical surgery and radiotherapy. *Br J Cancer* 27: 253–67, 1973
  85. Pelloski CE, Ballman K V., Furth AF, Zhang L, Lin E, Sulman EP, et al.: Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Status Defines Clinically Distinct Subtypes of Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology* 25: 2288–2294, 2007
  86. Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H, et al.: Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing

- glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18: 1373–1385, 2017
87. O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrisette JJD, et al.: A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med* 9: eaaa0984, 2017
  88. Weller M, Kaulich K, Hentschel B, Felsberg J, Gramatzki D, Pietsch T, et al.: Assessment and prognostic significance of the epidermal growth factor receptor vIII mutation in glioblastoma patients treated with concurrent and adjuvant temozolomide radiochemotherapy. *Int J Cancer* 134: 2437–2447, 2014
  89. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al.: Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science (1979)* 314: 126–129, 2006
  90. Robbins PF, Kassim SH, Tran TLN, Crystal JS, Morgan RA, Feldman SA, et al.: A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: Long-term follow-up and correlates with response. *Clinical Cancer Research* 21: 1019–1027, 2015
  91. Everson RG, Antonios JP, Lisiero DN, Soto H, Scharnweber R, Garrett MC, et al.: Efficacy of systemic adoptive transfer immunotherapy targeting NY-ESO-1 for glioblastoma. *Neuro Oncol* 18: 368–78, 2016
  92. Ellis HP, Greenslade M, Powell B, Spiteri I, Sottoriva A, Kurian KM: Current challenges in glioblastoma: Intratumour heterogeneity, residual disease, and models to predict disease recurrence. *Front Oncol.* 5: 2015
  93. Okada H, Kalinski P, Ueda R, Hoji A, Kohanbash G, Donegan TE, et al.: Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with  $\alpha$ -type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of Clinical Oncology* 29: 330–336, 2011
  94. Wen PY, Reardon DA, Armstrong TS, Phuphanich S, Aiken RD, Landolfi JC, et al.: A randomized double-blind placebo-controlled phase II trial of dendritic cell vaccine ICT-107 in newly diagnosed patients with glioblastoma. *Clinical Cancer Research* 25: 5799–5807, 2019
  95. Rampling R, Peoples S, Mulholland PJ, James A, Al-Salihi O, Twelves CJ, et al.: A cancer research UK first time in human phase I trial of IMA950 (novel multipeptide therapeutic vaccine) in patients with newly diagnosed glioblastoma. In: *Clinical Cancer Research*, pp 4776–4785, 2016
  96. Akatsuka Y, Goldberg TA, Kondo E, Martin EG, Obata Y, Morishima Y, et al.: Efficient cloning and expression of HLA class I cDNA in human B-lymphoblastoid cell lines. *Tissue Antigens* 59: 502–511, 2002
  97. Vita R, Mahajan S, Overton JA, Dhanda SK, Martini S, Cantrell JR, et al.: The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Res* [Internet] 47: D339–D343, 2019 Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D339/5144151> [cited 2022 Oct 5]
  98. Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, et al.: Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* [Internet] 10: 2019 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30944313/> [cited 2022 Oct 5]
  99. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P: Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 31: 443–73, 2013

100. Parkhurst M, Gros A, Pasetto A, Prickett T, Crystal JS, Robbins P, et al.: Isolation of T-Cell Receptors Specifically Reactive with Mutated Tumor-Associated Antigens from Tumor-Infiltrating Lymphocytes Based on CD137 Expression. *Clin Cancer Res* [Internet] 23: 2491–2505, 2017 Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-16-2680> [cited 2019 Apr 28]
101. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1975;45(3):321-334. *Blood* 128: 1995–1995, 2016
102. Britten CM, Meyer RG, Kreer T, Drexler I, Wölfel T, Herr W: The use of HLA-A\*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8+ T lymphocytes in IFN- $\gamma$  ELISPOT assays. *J Immunol Methods* 259: 95–110, 2002
103. Heemskerk MHM, Hoogeboom M, Paus RA De, Kester MGD, Hoorn MAWG Van Der, Goulmy E, et al.: Redirection of antileukemic reactivity of peripheral T lymphocytes using gene transfer of minor histocompatibility antigen HA-2 – specific T-cell receptor complexes expressing a conserved alpha joining region. *Blood* 102: 3530–3540, 2003
104. Lim M, Xia Y, Bettegowda C, Weller M: Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol* 15: 422–442, 2018
105. Dillman RO, Duma CM, Ellis RA, Cornforth AN, Schiltz PM, Sharp SL, et al.: Intralesional lymphokine-activated killer cells as adjuvant therapy for primary glioblastoma. *J Immunother* [Internet] 32: 914–919, 2009 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19816190/> [cited 2022 Oct 5]
106. Dillman RO, Duma CM, Schiltz PM, DePriest C, Ellis RA, Okamoto K, et al.: Intracavitary placement of autologous lymphokine-activated killer (LAK) cells after resection of recurrent glioblastoma. *J Immunother* [Internet] 27: 398–404, 2004 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15314549/> [cited 2022 Oct 5]
107. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, et al.: Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198812223192527> [Internet] 319: 1676–1680, 2010 Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM198812223192527> [cited 2022 Oct 5]
108. Mehta GU, Malekzadeh P, Shelton T, White DE, Butman JA, Yang JC, et al.: Outcomes of Adoptive Cell Transfer With Tumor-infiltrating Lymphocytes for Metastatic Melanoma Patients With and Without Brain Metastases. *J Immunother* [Internet] 41: 241–247, 2018 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29672342/> [cited 2022 Oct 5]
109. Lu KH-N, Michel J, Kilian M, Aslan K, Qi H, Kehl N, et al.: T cell receptor dynamic and transcriptional determinants of T cell expansion in glioma-infiltrating T cells. *Neurooncol Adv* [Internet] 4: 1–13, 2022 Available from: <https://academic.oup.com/noa/article/4/1/vdac140/6679481> [cited 2022 Oct 5]
110. Platten M, Bunse L, Wick A, Bunse T, le Cornet L, Harting I, et al.: A vaccine targeting mutant IDH1 in newly diagnosed glioma. *Nature* 2021 592:7854 [Internet] 592: 463–468, 2021 Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03363-z> [cited 2022 Oct 5]
111. Valentini D, Rao M, Meng Q, Landenberg A von, Bartek J: Identification of neoepitopes recognized by tumor-infiltrating lymphocytes ( TILs ) from patients with glioma. 9: 19469–19480, 2018

112. Dutoit V, Herold-Mende C, Hilf N, Schoor O, Beckhove P, Bucher J, et al.: Exploiting the glioblastoma peptidome to discover novel tumour-associated antigens for immunotherapy. *Brain* 135: 1042–1054, 2012
113. Shraibman B, Barnea E, Kadosh DM, Haimovich Y, Slobodin G, Rosner I, et al.: Identification of Tumor Antigens Among the HLA Peptidomes of Glioblastoma Tumors and Plasma. *Mol Cell Proteomics* [Internet] 18: 1255–1268, 2019 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31154438/> [cited 2022 Oct 5]
114. Lee HJ, Seo JY, Ahn JH, Ahn SH, Gong G: Tumor-associated lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *J Breast Cancer* 16: 32–39, 2013
115. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al.: In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 27: 5944–5951, 2009
116. Hwang WT, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G: Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecol Oncol* 124: 192–198, 2012
117. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, et al.: Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *Journal of Clinical Oncology* 26: 4410–4417, 2008
118. Poschke IC, Hassel JC, Rodriguez-Ehrenfried A, Lindner KAM, Heras-Murillo I, Appel LM, et al.: The Outcome of Ex Vivo TIL Expansion Is Highly Influenced by Spatial Heterogeneity of the Tumor T-Cell Repertoire and Differences in Intrinsic In Vitro Growth Capacity between T-Cell Clones. *Clin Cancer Res.* 26: 4289–4301, 2020
119. Lee S, Margolin K: Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 3: 3856–3893, 2011
120. Rosenberg SA, Sport??s C, Ahmadzadeh M, Fry TJ, Ngo LT, Schwarz SL, et al.: IL-7 Administration to Humans Leads to Expansion of CD8+ and CD4+ Cells but a Relative Decrease of CD4+ T-Regulatory Cells. *Journal of Immunotherapy* 29: 313–319, 2006
121. Anguille S, Smits EL, Lion E, Van Tendeloo VF, Berneman ZN: Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol.* 2014
122. Ali M, Foldvari Z, Giannakopoulou E, Bösch ML, Strønen E, Yang W, et al.: Induction of neoantigen-reactive T cells from healthy donors. *Nat Protoc* 14: 1926–1943, 2019
123. Butler MO, Hirano N: Human cell-based artificial antigen-presenting cells for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 257: 191–209, 2014
124. Gangadhar TC, Vonderheide RH: Mitigating the toxic effects of anticancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 11: 91–99, 2014
125. Rohaan MW, Wilgenhof S, Haanen JBAG: Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Archiv.* 2019
126. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA: Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced With a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2. *Molecular Therapy* 18: 843–851, 2010
127. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA: Case report of a serious adverse event following the administration of t cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular Therapy* 18: 843–851, 2010
128. Lamers CH, Sleijfer S, van Steenbergen S, van Elzakker P, van Krimpen B, Groot C, et al.: Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With CAIX CAR-



- engineered T cells: Clinical Evaluation and Management of On-target Toxicity. *Molecular Therapy* 21: 904–912, 2013
129. Thistlethwaite FC, Gilham DE, Guest RD, Rothwell DG, Pillai M, Burt DJ, et al.: The clinical efficacy of first-generation carcinoembryonic antigen (CEACAM5)-specific CAR T cells is limited by poor persistence and transient pre-conditioning-dependent respiratory toxicity. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 66: 1425–1436, 2017
  130. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, et al.: Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114: 535–46, 2009
  131. Hofmann O, Caballero OL, Stevenson BJ, Chen Y-T, Cohen T, Chua R, et al.: Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 20422–20427, 2008
  132. Parkhurst MR, Yang JC, Langan RC, Dudley ME, Nathan D-AN, Feldman SA, et al.: T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther* 19: 620–6, 2011
  133. Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D, Gros A, Robbins PF, Zheng Z, et al.: Cancer Regression and Neurological Toxicity Following Anti-MAGE-A3 TCR Gene Therapy. *Journal of Immunotherapy* 36: 133–151, 2013
  134. Linette GP, Stadtmauer EA, Maus M V., Rapoport AP, Levine BL, Emery L, et al.: Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* 122: 863–871, 2013
  135. Legut M, Dolton G, Mian AA, Ottmann OG, Sewell AK: CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic t cells. *Blood* 131: 311–322, 2018
  136. Mohme M, Neidert MC, Regli L, Weller M, Martin R: Immunological challenges for peptide-based immunotherapy in glioblastoma. *Cancer Treat Rev.* 40: 248–258, 2014
  137. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA: Positive and negative selection of the T cell repertoire: What thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol.* 14: 377–391, 2014
  138. Scheper W, Kelderman S, Fanchi LF, Linnemann C, Bendle G, de Rooij MAJ, et al.: Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers. *Nat Med.* 25: 89–94, 2019
  139. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin A V., et al.: Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500: 415–421, 2013
  140. Karpanen T, Olweus J: The potential of donor T-cell repertoires in neoantigen-targeted cancer immunotherapy. *Front Immunol.* 8: 1718, 2017
  141. Vita R, Overton JA, Greenbaum JA, Ponomarenko J, Clark JD, Cantrell JR, et al.: The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res* 43: D405-12, 2015
  142. Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, Diken M, Löwer M, Diekmann J, et al.: Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 520: 692–696, 2015
  143. Schumacher T, Bunse L, Pusch S, Sahm F, Wiestler B, Quandt J, et al.: A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature* 512: 324–327, 2014

144. Andreatta M, Trolle T, Yan Z, ... JG-, 2018 undefined: An automated benchmarking platform for MHC class II binding prediction methods. *academic.oup.com*
145. Dutoit V, Herold-Mende C, Hilf N, Schoor O, Beckhove P, Bucher J, et al.: Exploiting the glioblastoma peptidome to discover novel tumour-associated antigens for immunotherapy. *Brain* 135: 1042–1054, 2012
146. Wang QJ, Yu Z, Griffith K, Hanada KI, Restifo NP, Yang JC: Identification of T-cell receptors targeting KRAS-mutated human tumors. *Cancer Immunol Res* 4: 204–214, 2016
147. Hassan C, Kester MGD, Oudgenoeg G, de Ru AH, Janssen GMC, Drijfhout JW, et al.: Accurate quantitation of MHC-bound peptides by application of isotopically labeled peptide MHC complexes. *J Proteomics* 109: 240–244, 2014
148. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, et al.: Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 17: 4550–4557, 2011
149. Moodie Z, Price L, Gouttefangeas C, Mander A, Janetzki S, Löwer M, et al.: Response definition criteria for ELISPOT assays revisited. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 59: 1489–1501, 2010
150. Danilova L, Anagnostou V, Caushi JX, Sidhom J-W, Guo H, Chan HY, et al.: The Mutation-Associated Neoantigen Functional Expansion of Specific T Cells (MANAFEST) Assay: A Sensitive Platform for Monitoring Antitumor Immunity. *Cancer Immunol Res* 6: 888–899, 2018
151. Sharpe A, Immunology KP-NR, 2018 undefined: The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *nature.com*
152. Woroniecka KI, Rhodin KE, Chongsathidkiet P, Keith KA, Fecci PE: T-Cell dysfunction in glioblastoma: Applying a new framework. *Clinical Cancer Research*. 2018
153. Schietinger A, Philip M, Krisnawan VE, Chiu EY, Delrow JJ, Basom RS, et al.: Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity* 2016
154. Simon S, Labarriere N: PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *Oncoimmunology* 7: e1364828, 2018
155. Lowery FJ, Krishna S, Yossef R, Parikh NB, Chatani PD, Zacharakis N, et al.: Molecular signatures of antitumor neoantigen-reactive T cells from metastatic human cancers. *Science (1979)* [Internet] 375: 877–884, 2022 Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abl5447> [cited 2022 Oct 5]
156. Caushi JX, Zhang J, Ji Z, Vaghasia A, Zhang B, Hsiue EHC, et al.: Transcriptional programs of neoantigen-specific TIL in anti-PD-1-treated lung cancers. *Nature* 2021 596:7870 [Internet] 596: 126–132, 2021 Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03752-4> [cited 2022 Oct 5]
157. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al.: Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821–8, 2003
158. Friedmann-Morvinski D: Glioblastoma heterogeneity and cancer cell plasticity. *Crit Rev Oncog* 19: 327–336, 2014
159. Jamal-Hanjani M, Quezada SA, Larkin J, Swanton C: Translational implications of tumor heterogeneity. *Clin Cancer Res* 21: 1258–66, 2015
160. Turner NC, Reis-Filho JS: Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol*. 13: 2012

161. Johnson BE, Mazor T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, et al.: Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science* 343: 189–193, 2014
162. O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrissette JJD, et al.: A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med* 9: eaaa0984, 2017
163. Wolf Y, Bartok O, Patkar S, Eli GB, Cohen S, Litchfield K, et al.: UVB-Induced Tumor Heterogeneity Diminishes Immune Response in Melanoma. *Cell* 179: 219–235.e21, 2019
164. Roerink SF, Sasaki N, Lee-Six H, Young MD, Alexandrov LB, Behjati S, et al.: Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level. *Nature* 2018
165. Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD: The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 13: 273–290, 2016
166. Melero I, Berman DM, Aznar MA, Korman AJ, Gracia JLP, Haanen J: Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat Rev Cancer* 15: 457–472, 2015
167. Roth P, Happold C, Weller M: Corticosteroid use in neuro-oncology: an update. *Neurooncol Pract* 2: 6–12, 2015
168. Pitter KL, Tamagno I, Alikhanyan K, Hosni-Ahmed A, Pattwell SS, Donnola S, et al.: Corticosteroids compromise survival in glioblastoma. *Brain* 139: 1458–1471, 2016
169. Mathios D, Kim JE, Mangraviti A, Phallen J, Park CK, Jackson CM, et al.: Anti-PD-1 antitumor immunity is enhanced by local and abrogated by systemic chemotherapy in GBM. *Sci Transl Med* 8: 370ra180, 2016
170. Grossman SA, Ye X, Lesser G, Sloan A, Carraway H, Desideri S, et al.: Immunosuppression in patients with high-grade gliomas treated with radiation and temozolomide. *Clinical Cancer Research* 17: 5473–5480, 2011
171. Zeng J, See AP, Phallen J, Jackson CM, Belcaid Z, Ruzevick J, et al.: Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 86: 343–349, 2013

## 7 TABELLARISCHER ANHANG

**Tabelle 2. CTdatabase Genliste.** Stand 09/2017

ACRBP	GAGE12H	PRM1
ACTL8	GAGE12I	PRM2
ADAM2	GAGE12J	PRSS54
ADAM29	GAGE13	PRSS55
AKAP3	GAGE2A	PTPN20A
AKAP4	GAGE3	RBM46
ANKRD45	GAGE4	RGS22
ARMC3	GAGE5	ROPN1
ARX	GAGE6	RQCD1
ATAD2	GAGE7	SAGE1
BAGE	GAGE8	SEMG1
BAGE2	GOLGAGL2 FA	SLCO6A1
BAGE3	GPAT2	SPA17
BAGE4	GPATCH2	SPACA3
BAGE5	HIWI, MIWI, PIWI	SPAG1
BRDT	HORMAD1	SPAG17
C15orf60	HORMAD2	SPAG4
C21orf99	HSPB9	SPAG6
CABYR	IGSF11	SPAG8
CAGE1	IL13RA2	SPAG9
CALR3	IMP-3	SPANXA1
CASC5	JARID1B	SPANXA2
CCDC110	KIAA0100	SPANXB1
CCDC33	LAGE-1b	SPANXB2
CCDC36	LDHC	SPANXC
CCDC62	LEMD1	SPANXD
CCDC83	LIPI	SPANXE
CDCA1	LOC130576	SPANXN1
CEP290	LOC196993	SPANXN2
CEP55	LOC348120	SPANXN3
COX6B2	LOC440934	SPANXN4
CPXCR1	LOC647107	SPANXN5
CRISP2	LOC728137	SPATA19
CSAG1	LUZP4	SPEF2
CSAG2	LY6K	SPINLW1
CSAG3B	MAEL	SPO11
CT16.2	MAGEA1	SSX1
CT45A1	MAGEA10	SSX2
CT45A2	MAGEA11	SSX2b
CT45A3	MAGEA12	SSX3
CT45A4	MAGEA2	SSX4
CT45A5	MAGEA2B	SSX4B
CT45A6	MAGEA3	SSX5

CT47A1	MAGEA4	SSX6
CT47A10	MAGEA5	SSX7
CT47A11	MAGEA6	SSX9
CT47A2	MAGEA8	SYCE1
CT47A3	MAGEA9	SYCP1
CT47A4	MAGEA9B/LOC728269	TAF7L
CT47A5	MAGEB1	TAG
CT47A6	MAGEB2	TDRD1
CT47A7	MAGEB3	TDRD4
CT47A8	MAGEB4	TDRD6
CT47A9	MAGEB5	TEKT5
CT47B1	MAGEB6	TEX101
CT66/AA884595	MAGEC1	TEX14
CT69/BC040308	MAGEC2	TEX15
CT70/BI818097	MAGEC3	TFDP3
CTAG1A	MCAK	THEG
CTAG1B	MMA1b	TMEFF1
CTAG2	MORC1	TMEFF2
CTAGE1	MPHOSPH1	TMEM108
CTAGE-2	NLRP4	TMPRSS12
CTAGE5	NOL4	TPPP2
CTCFL	NR6A1	TPTE
CTNNA2	NXF2	TSGA10
CXorf48	NXF2B	TSP50
Cxorf61	ODF1	TSPY1D
cyclin A1	ODF2	TSPY1E
DCAF12	ODF3	TSPY1F
DDX43	ODF4	TSPY1G
DDX53	OIP5	TSPY1H
DKKL1	OTOA	TSPY1I
DMRT1	PAGE1	TSPY2
DNAJB8	PAGE2	TSPY3
DPPA2	PAGE2B	TSSK6
DSCR8	PAGE3	TTK
EDAG, NDR	PAGE4	TULP2
ELOVL4	PAGE5	VENTXP1
FAM133A	PASD1	XAGE1
FAM46D	PBK	XAGE1B
FATE1	PEPP2	XAGE1C
FBXO39	PIWIL2	XAGE1D
FMR1NB	PLAC1	XAGE1E
FTHL17	POTEA	XAGE2
GAGE1	POTEB	XAGE2B/CTD-2267G17.3
GAGE12B	POTEC	XAGE3
GAGE12C	POTED	XAGE-3b
GAGE12D	POTEE	XAGE-4/RP11-167P23.2
GAGE12E	POTEG	XAGE5

GAGE12F	POTEH	ZNF165
GAGE12G	PRAME	ZNF645

**Tabelle 3. Microarray-Daten mit TAA Expression**

TAA	Fold change			Absolute Werte					
	P1	P2	P3	Ktrl P1	Ktrl P2	Ktrl P3	P1	P2	P3
ELOVL4	0,34	0,18	0,35	418,81	418,81	418,81	141,23	74,86	146,03
PTPN20A,B	0,38	0,40	0,39	124,11	124,11	124,11	47,72	49,37	48,96
CTNNA2	0,56	0,29	0,49	802,04	802,04	802,04	452,47	229,80	394,47
MAEL	0,61	1,00	0,62	100,27	100,27	100,27	61,43	100,67	61,98
CCNA1	0,71	0,44	0,62	133,22	133,22	133,22	94,91	58,81	82,41
TDRD6	0,75	0,57	0,64	92,42	92,42	92,42	69,75	52,78	58,76
IGSF11	0,77	0,83	0,68	224,08	224,08	224,08	172,24	186,20	152,46
MSANTD3-TMEFF1 /// TMEFF1	0,92	0,41	0,70	549,26	549,26	549,26	505,51	227,44	385,32
BAGE2 /// BAGE4	0,80	0,82	0,72	77,95	77,95	77,95	62,57	64,24	56,34
SPAG6	1,04	0,96	0,79	66,78	66,78	66,78	69,21	64,42	52,66
IL13RA2	1,76	3,90	0,80	80,18	80,18	80,18	140,86	312,89	63,84
GPAT2	1,64	0,95	0,84	98,40	98,40	98,40	161,70	93,60	83,01
BAGE2,3,5, MLL3	0,80	0,95	0,85	69,54	69,54	69,54	55,90	65,81	59,00
SPAG1	0,80	1,26	0,87	102,24	102,24	102,24	81,46	128,87	89,07
ANKRD30BP2	0,88	0,78	0,89	76,87	76,87	76,87	67,46	59,60	68,69
ANKRD45	0,94	0,87	0,90	67,96	67,96	67,96	63,60	59,18	60,86
MAGEB1	1,05	1,01	0,90	54,53	54,53	54,53	57,00	55,23	49,30
CALR3	1,12	0,91	0,91	53,82	53,82	53,82	60,52	49,14	48,72
LDHC	0,97	0,98	0,91	62,73	62,73	62,73	60,55	61,23	57,04
ZNF165	0,91	1,00	0,91	59,80	59,80	59,80	54,44	59,85	54,46
TAF7L	0,96	0,85	0,92	58,36	58,36	66,92	55,93	49,88	61,33
LOC653786 /// OTOA	0,93	0,89	0,92	62,18	62,18	62,18	58,13	55,08	57,35
MAGEB3	1,15	1,16	0,93	49,17	49,17	49,17	56,64	57,24	45,51
MAGEA3	0,98	1,89	0,93	57,64	57,64	57,64	56,68	108,87	53,36
DNAJB8	1,13	0,89	0,94	59,59	59,59	59,59	67,17	53,13	55,91
SEMG1	1,14	1,02	0,94	50,82	50,82	50,82	57,88	51,67	47,73
GAGE3	1,28	1,08	0,95	50,82	50,82	50,82	65,27	55,13	48,28
DKKL1	1,11	1,00	0,96	77,85	77,85	77,85	86,15	77,86	74,82
SPANXB1,B2,F1	1,09	1,02	0,96	53,61	53,61	53,61	58,43	54,43	51,54
TEX15	1,05	0,95	0,96	64,42	64,42	64,42	67,35	60,94	62,03

SPATA19	1,10	1,12	0,96	61,88	61,88	61,88	67,77	69,39	59,62
NLRP4	1,08	1,07	0,97	54,29	54,29	54,29	58,80	57,99	52,44
SPA17	1,11	0,88	0,97	137,49	137,49	137,49	152,93	121,65	133,22
LOC100288966 /// POTEB,C,D	1,03	1,05	0,97	46,57	46,57	46,57	47,79	48,87	45,13
MAGEA6	1,52	1,81	0,97	54,16	54,16	54,16	82,25	98,05	52,77
MAGEA4	1,18	1,13	0,98	45,80	45,80	45,80	53,96	51,53	44,95
DSCR8	0,97	0,95	0,98	58,98	58,98	58,98	57,06	55,91	58,08
GAGE1-12	1,08	0,99	0,99	54,95	54,95	54,95	59,60	54,64	54,26
CABYR	0,96	0,93	0,99	91,09	91,09	91,09	87,89	85,02	89,99
PAGE4	1,13	1,10	0,99	57,19	57,19	57,19	64,88	63,06	56,82
GAGE12F,G,I, 4-7	1,31	1,09	1,00	52,11	52,11	52,11	68,11	56,76	51,93
TSGA10	1,16	1,03	1,00	56,90	56,90	56,90	66,06	58,86	56,76
PRM2	1,02	1,00	1,00	53,17	53,17	53,17	54,20	53,38	53,15
FMR1NB	1,09	1,07	1,00	45,85	45,85	45,85	50,03	49,11	46,06
XAGE3	1,03	0,92	1,00	61,33	61,33	61,33	62,99	56,28	61,63
BRDT	0,90	0,98	1,00	55,44	55,44	55,44	49,71	54,35	55,72
CCDC83	1,08	1,15	1,01	46,38	46,38	46,38	50,02	53,21	46,74
SSX2	1,13	1,02	1,01	57,13	57,13	57,13	64,68	58,13	57,59
CT47A1-12	0,99	0,99	1,01	56,17	56,17	56,17	55,70	55,87	56,73
ZNF645	1,00	1,03	1,01	59,32	59,32	59,32	59,26	60,91	60,08
LEMD1	1,10	0,91	1,01	57,40	57,40	57,40	63,16	52,16	58,14
PAGE1	1,19	1,11	1,01	52,10	52,10	52,10	61,89	57,72	52,84
MAGEA11	1,01	1,09	1,01	50,22	50,22	50,22	50,88	54,73	50,94
MAGEB6	1,04	0,97	1,02	45,87	45,87	45,87	47,73	44,40	46,99
CCDC110	1,07	0,89	1,03	58,13	58,13	58,13	62,39	51,63	59,65
TEX14	1,01	0,99	1,03	56,03	56,03	56,03	56,76	55,23	57,57
MAGEA12	1,12	1,11	1,03	58,99	58,99	58,99	66,04	65,41	60,82
ODF2	0,95	1,73	1,03	88,90	88,90	88,90	84,45	153,63	91,73
LOC100507800 /// LOC440934	1,34	1,01	1,04	63,81	63,81	63,81	85,31	64,23	66,28
CTAGE1	1,17	1,06	1,04	52,30	52,30	52,30	61,00	55,46	54,39
TPTE	1,02	1,01	1,04	47,93	47,93	47,93	48,99	48,26	49,88
MAGEC1	1,18	1,04	1,04	53,08	53,08	53,08	62,44	55,47	55,28
PLAC1	1,19	1,02	1,04	62,58	62,58	62,58	74,73	64,13	65,23
HEMGN	1,21	1,07	1,04	51,17	46,86	46,86	62,03	50,36	48,84
TFDP3	1,08	1,07	1,04	56,16	56,16	56,16	60,63	60,04	58,62

GAGE12B-I,2A-C,4,5,6,7	1,20	1,21	1,04	52,84	52,84	52,84	63,59	63,70	55,21
COX6B2	1,43	1,08	1,04	63,09	63,09	63,09	90,47	68,34	65,93
POTEG /// POTEM	0,88	1,00	1,05	61,29	61,29	61,29	54,07	61,07	64,41
MAGEA8	1,11	1,09	1,05	52,08	52,08	52,08	57,67	56,76	54,82
MAGEA9 /// MAGEA9B	1,02	0,99	1,05	62,20	62,20	62,20	63,74	61,62	65,54
SYCP1	1,08	0,98	1,05	50,75	50,75	50,75	54,75	49,76	53,49
SPO11	1,28	1,03	1,06	48,25	48,25	48,25	61,70	49,54	51,09
ROPN1	1,31	0,99	1,06	86,87	58,79	58,79	113,61	58,23	62,51
SLCO6A1	1,07	1,05	1,06	52,86	52,86	52,86	56,36	55,39	56,21
Cxor61	1,14	1,07	1,06	49,98	49,98	49,98	56,99	53,25	53,22
PIWIL1	1,32	0,95	1,07	47,76	47,76	47,76	63,11	45,29	50,88
GAGE1,2,4,5,6,7,12	1,23	1,20	1,07	52,48	52,48	52,48	64,63	63,17	56,03
BAGE	1,33	1,02	1,07	47,60	45,41	45,41	63,08	46,39	48,50
SPAG17	1,21	1,22	1,07	56,43	56,43	56,43	68,21	68,77	60,34
LIPI	1,03	1,09	1,08	50,31	50,31	50,31	51,72	54,90	54,23
DDX53	1,16	1,02	1,08	45,37	45,37	45,37	52,46	46,32	49,08
CAGE1	1,12	1,05	1,08	45,03	45,03	45,03	50,61	47,33	48,72
MAGEA10,A5	1,28	1,14	1,08	55,02	55,02	55,02	70,51	62,48	59,54
PRSS55	1,36	1,17	1,08	51,09	51,09	51,09	69,51	59,53	55,37
SPINLW1	0,97	1,01	1,08	54,00	50,46	50,46	52,24	51,13	54,74
PLEKHA5	1,53	0,86	1,09	234,22	56,33	234,22	358,34	48,61	254,26
ARX	1,14	1,29	1,09	60,27	299,85	60,27	68,60	385,32	65,55
XAGE2 /// XAGE2B	1,21	1,11	1,09	57,87	57,87	57,87	70,13	64,32	63,21
DDX43	1,05	1,07	1,09	50,49	50,49	50,49	53,03	54,15	55,24
SPAG9	1,03	1,09	1,10	64,23	399,25	633,74	66,27	434,82	698,10
CTCFL	1,20	1,07	1,11	45,70	45,70	45,70	55,01	49,11	50,51
PAGE5	1,09	1,22	1,11	62,82	62,82	62,82	68,42	76,94	69,45
FAM46D	1,06	0,96	1,11	51,13	51,13	51,13	54,10	48,86	56,58
MAGEB2	1,17	1,07	1,11	50,58	50,58	50,58	58,96	54,14	56,03
CPXCR1	1,20	1,08	1,11	56,35	56,35	44,88	67,58	61,06	49,76
VENTXP1	1,19	1,18	1,11	47,45	57,79	47,45	56,51	68,10	52,61
SPAG4	1,55	1,19	1,11	69,24	69,24	69,24	107,41	82,57	76,78
SPANXA2-OT1	1,26	1,19	1,11	54,81	54,81	54,81	68,87	65,33	60,80
SSX4 /// SSX4B	1,12	1,17	1,11	47,98	47,98	47,98	53,51	56,16	53,31
MAGEA1	1,14	1,05	1,11	55,35	55,35	55,35	63,03	58,02	61,52



GAGE1	1,18	1,06	1,11	51,97	51,97	51,97	61,22	54,94	57,83
CSAG2 /// CSAG3	1,15	1,25	1,11	54,88	54,88	54,88	63,25	68,81	61,07
MAGEA2, MAGEA2B	1,20	2,13	1,12	50,54	46,06	50,54	60,46	98,25	56,63
GAGE1,2,4,5,6,7,8,12	1,36	1,04	1,12	50,04	50,04	50,04	68,30	52,24	56,29
FBXO39	1,01	0,86	1,13	58,04	58,04	58,04	58,78	49,97	65,34
ADAM2	1,21	1,05	1,13	49,31	49,31	49,31	59,51	51,94	55,53
SSX1	1,20	1,16	1,13	51,72	51,72	51,72	62,24	60,16	58,33
OIP5	1,25	1,73	1,13	54,38	54,38	54,38	67,92	93,88	61,35
TPPP2	1,08	1,01	1,13	60,46	60,46	60,46	65,32	61,24	68,30
SSX5	1,34	1,07	1,13	63,39	63,39	63,39	85,08	67,98	71,65
TEKT5	1,09	1,11	1,13	57,58	57,58	57,58	63,04	63,81	65,10
IGF2BP3	1,22	1,48	1,13	55,37	55,37	58,77	67,37	82,00	66,54
ACRBP	1,20	1,13	1,13	64,23	61,51	61,51	76,82	69,36	69,74
C15orf60	1,28	1,09	1,14	55,95	55,95	55,95	71,61	60,74	63,63
CEP55	1,13	1,48	1,14	45,79	45,79	45,79	51,78	67,58	52,24
SPACA3	1,09	1,19	1,14	61,18	61,18	61,18	66,40	72,75	70,04
MORC1	1,16	1,06	1,15	44,59	44,59	44,59	51,51	47,25	51,07
DMRT1	1,26	1,09	1,15	49,94	49,94	49,94	62,78	54,22	57,22
RNF17	1,22	1,13	1,15	53,24	45,21	52,30	64,74	51,12	60,00
SAGE1	1,24	1,09	1,15	47,26	47,26	47,26	58,55	51,42	54,32
CRISP2	1,08	1,05	1,15	51,03	51,03	51,03	55,27	53,74	58,76
MAGEB4	1,22	1,12	1,15	49,22	49,22	49,22	60,16	55,12	56,71
TMPRSS12	0,98	1,05	1,16	48,56	48,56	48,56	47,79	51,17	56,14
AKAP4	1,25	1,05	1,16	56,62	56,62	56,62	70,89	59,43	65,47
SSX2,2B,3	1,13	1,13	1,16	63,74	63,74	63,74	72,22	71,83	73,91
TEX101	1,19	1,21	1,16	54,31	54,31	54,31	64,63	65,64	63,03
RBM46	1,15	1,11	1,16	44,51	44,51	44,51	51,26	49,20	51,71
TDRD1	1,24	1,12	1,17	48,03	48,03	48,03	59,41	53,86	56,19
FTHL17	1,64	1,21	1,17	46,68	46,68	46,68	76,58	56,71	54,65
TULP2	1,37	1,22	1,17	56,73	56,73	56,73	77,58	69,04	66,46
THEG	1,29	0,98	1,17	56,80	56,80	56,80	73,17	55,67	66,62
LUZP4	1,32	1,06	1,17	62,88	62,88	62,88	83,12	66,47	73,87
PRM1	1,42	1,17	1,18	62,39	62,39	62,39	88,40	73,29	73,37
PRSS50	1,17	1,04	1,18	59,14	59,14	59,14	69,03	61,80	69,90
TTK	1,60	2,24	1,18	50,85	50,85	50,85	81,51	113,91	60,21
HORMAD1	1,15	1,06	1,19	46,91	46,91	46,91	53,75	49,92	55,64
NUF2	1,15	3,20	1,19	54,24	54,24	54,24	62,42	173,82	64,74

ODF4	1,25	1,26	1,20	68,21	68,21	68,21	85,32	86,00	81,58
HORMAD2	1,31	1,18	1,20	55,03	55,03	54,88	71,92	64,98	65,97
TSPY1,3,4,8,10	1,10	1,09	1,21	53,19	53,19	53,19	58,74	57,78	64,12
RGS22	1,61	1,57	1,21	60,78	60,78	60,78	98,09	95,60	73,35
MIA2	1,15	1,08	1,21	45,29	45,29	45,29	51,93	49,04	54,78
MAGEA10	1,12	0,95	1,21	61,78	61,78	61,78	69,43	58,88	74,87
CTAG2	1,59	1,13	1,22	56,75	56,75	53,80	90,34	64,33	65,59
DPPA2	1,00	1,13	1,22	52,91	52,91	52,91	52,71	59,75	64,67
SPANXA1 /// SPANXA2	1,40	1,10	1,23	68,28	68,28	68,28	95,69	75,22	83,84
MAGEC2	1,23	1,17	1,23	53,26	57,74	53,26	65,35	67,44	65,49
CCDC62	1,05	0,95	1,24	73,56	73,56	73,56	77,12	69,94	90,91
CCDC33	1,24	1,29	1,24	54,52	54,52	76,80	67,60	70,22	94,99
HSPB9	1,23	1,17	1,24	51,87	51,87	51,87	63,90	60,53	64,26
PRSS54	1,05	1,09	1,26	57,01	57,01	57,01	59,76	62,11	71,56
ODF1	1,38	1,15	1,26	59,59	59,59	59,59	81,98	68,54	74,90
CT45A1-6	1,95	0,94	1,26	60,22	51,63	60,22	117,24	48,64	75,71
CASC5	1,38	2,00	1,26	50,73	50,73	50,73	70,10	101,54	63,98
ACTL8	1,14	1,08	1,28	81,44	81,44	81,44	92,66	87,70	103,92
PASD1	1,37	1,00	1,28	61,79	61,79	61,79	84,87	62,00	78,98
MAGEC3	1,03	1,19	1,29	54,69	54,69	54,69	56,16	65,30	70,45
TSSK6	1,35	1,33	1,29	60,68	64,85	60,68	82,19	86,46	78,23
LY6K	1,13	1,20	1,29	47,40	53,74	53,74	53,77	64,49	69,43
ARMC3	1,28	0,94	1,30	53,27	53,27	53,27	67,98	50,33	69,31
CTAG1A /// CTAG1B	2,33	1,42	1,30	59,74	54,63	53,19	139,06	77,66	69,27
SSX3	1,53	1,27	1,31	51,35	51,35	51,35	78,37	64,96	67,19
ADAM29	1,26	1,18	1,32	45,36	45,36	53,46	57,17	53,71	70,53
KIF2C	1,46	1,94	1,32	65,13	65,13	65,13	94,82	126,43	86,18
XAGE1A-E	1,24	1,18	1,33	54,85	54,85	54,85	67,78	64,87	72,73
FATE1	1,83	1,37	1,33	68,37	68,37	68,37	125,17	93,90	91,26
SSX2 /// SSX2B	1,58	1,49	1,35	63,20	63,20	63,20	99,93	93,89	85,13
CXorf48	1,03	1,15	1,35	69,70	69,70	69,70	71,72	79,88	94,19
TMEM108	1,28	1,12	1,36	138,13	67,26	138,13	177,30	75,50	187,26
PRAME	1,26	1,12	1,39	57,17	57,17	57,17	72,02	63,87	79,41
PIWIL2	2,10	1,31	1,40	56,11	59,25	56,11	117,61	77,47	78,62
SPEF2	2,02	1,51	1,40	54,90	54,90	54,90	111,06	83,08	76,96

SPANXA1-2,B1- 2,C,F1	1,72	1,38	1,41	57,62	57,62	57,62	98,86	79,68	81,02
NXF2 /// NXF2B	1,40	1,25	1,42	60,31	58,22	60,31	84,34	72,97	85,80
GPATCH2	1,13	1,71	1,42	83,33	77,33	77,33	94,15	132,19	110,03
GOLGA6L2	1,04	1,08	1,43	51,19	51,19	51,19	53,39	55,07	73,28
PBK	1,44	3,16	1,43	48,35	48,35	48,35	69,77	152,91	69,31
NR6A1	1,58	1,51	1,44	55,23	55,23	55,23	87,52	83,22	79,52
CEP290	1,25	1,62	1,46	166,57	166,57	166,57	207,48	269,01	243,01
SYCE1	1,14	0,88	1,46	54,99	54,99	54,99	62,50	48,65	80,50
NOL4	1,97	0,97	1,47	243,60	243,60	243,60	478,98	237,04	357,62
AKAP3	1,45	1,31	1,48	64,42	64,42	64,42	93,19	84,18	95,09
KIAA0100	1,33	1,51	1,50	79,12	79,12	79,12	104,99	119,28	118,94
SPAG8	1,39	1,43	1,54	69,55	56,10	69,55	96,90	80,03	107,13
CCDC36	1,40	1,52	1,54	54,43	53,81	53,81	76,13	81,92	83,09
ATAD2	1,94	2,87	1,56	54,80	72,37	54,80	106,04	207,79	85,74
KDM5B	1,68	1,30	1,60	109,49	109,49	109,49	184,06	141,95	174,70
ODF3	1,83	1,45	1,60	57,83	57,83	57,83	105,86	84,06	92,74
DCAF12	1,35	1,95	1,64	121,89	121,89	121,89	164,35	237,40	199,61
SPANXC	0,95	1,26	1,66	62,38	62,38	62,38	59,19	78,34	103,61
KIF20B	1,97	1,77	1,74	78,70	78,70	78,70	154,95	139,25	136,62
RQCD1	1,54	2,27	1,78	124,63	124,63	124,63	192,15	283,11	221,25
FAM133A	1,31	0,48	3,24	123,90	123,90	123,90	161,75	59,55	402,03
TMEFF2	20,48	4,49	8,14	79,72	79,72	79,72	1.632,88	357,95	648,86

Tabelle 4. TAA und GAA Epitope

Patient	Antigen	Überexpression	Absolute Genexpression		HLA	Gensequenz	Peptidlänge
			Kontrolle	Tumor			
<b>TAA</b>							
P1	CTAG1A///CTAG1B	2,33	59,74	139,06	A*02:01	SLLMWITQC	9,00
P1	IL13RA2	1,76	80,18	140,86	A*02:01	WLPFGFILI	9,00
P1	IL13RA2	1,76	80,18	140,86	A*24:02	WYEGLDHAL	9,00
P1	TTK	1,60	50,85	81,51	A*24:02	SYRNEIAYL	9,00
P1	SSX2///SSX2B	1,58	63,20	99,93	A*02:01	RLQGISPKI	9,00
P1	SSX2///SSX2B	1,58	63,20	99,93	A*02:01	KASEKIFYV	9,00
P2	MAGEA3	1,89	57,64	108,87	B*35:01	EVDPIGHLY	9,00
P2	MAGEA6	1,81	54,16	98,05	B*35:01	EVDPIGHVY	9,00

P2	CTAG1A///CTAG1B	1,42	54,63	77,66	B*35:01	MPFATPMEA	10,00
P3	PRAME	1,39	57,17	79,41	A*02:01	VLDGLDVLL	9,00
P3	PRAME	1,39	57,17	79,41	A*02:01	SLYSFPEPEA	10,00
P3	PRAME	1,39	57,17	79,41	A*02:01	ALYVDSLFFL	10,00
P3	PRAME	1,39	57,17	79,41	A*02:01	SLLQHLIGL	9,00
P3	CXorf48	1,35	69,70	94,19	A*24:02	DYGMIDESI	9,00
P3	SSX2///SSX2B	1,35	63,20	85,13	A*02:01	RLQGISPKI	10,00
P3	SSX2///SSX2B	1,58	63,20	99,93	A*02:01	KASEKIFYV	9,00
P4	TMEFF1	4,13	1,06	4,37	A*01:01	ATDYHFHFY	9,00
P4	ARX	4,03	0,84	3,40	A*24:02	IYISYSHLAF	10,00
P4	SYCE1	12,79	0,10	1,28	A*24:02	KYNFYLPFFF	10,00
P4	NR6A1	3,88	0,18	0,70	A*24:02	IWALSKFTF	9,00
P4	SYCE1	12,79	0,10	1,28	A*24:02	KYNFYLPFF	9,00
P5	CCNA1	15,67	0,12	1,87	A*02:01	FLDRFLSCM	9,00
P5	CCNA1	15,67	0,12	1,87	A*02:01	SLIAAAAFCLA	13,00
P5	CCNA1	15,67	0,12	1,87	A*02:01	GMAFEDVYEV	10,00
P5	CCNA1	15,67	0,12	1,87	A*02:01	KVLAFDLTV	9,00
P5	CCNA1	15,67	0,12	1,87	A*02:01	CLSELHKAYL	10,00
P5	CCNA1	15,67	0,12	1,87	A*02:01	SLMEPPAVLLL	11,00
P5	IGSF11	3,93	3,41	13,43	A*02:01	ALSSGLYQC	9,00
P5	PLAC1	3,19	0,10	0,32	A*02:01	VLCSIDWFM	9,00
P5	PLAC1	3,19	0,10	0,32	A*02:01	HAYQFTYRV	9,00
P5	PLAC1	3,19	0,10	0,32	A*02:01	FMLNNDVCV	9,00
P5	DKKL1	14,27	0,10	1,43	A*02:01	ALGGHPLLGV	
P6	ARX	20,01	0,84	16,88	B*35:01	HPAFISPAF	9,00
P6	TPPP2	26,38	0,10	2,76	A*32:01	KTFHRFAAF	9,00
P6	TMEFF1	32,92	1,06	34,83	B*35:01	LPAAPPLAF	9,00
P6	SPAG6	33,50	0,10	3,35	B*35:01	LPALEPFLY	9,00
P6	CCNA1	104,72	0,12	12,50	B*35:01	FVYITDDTY	9,00
<b>GAA</b>							
P1	PRR11	12,53	173,08	2.168,13	A*24:02	SWLTSSWNF	9,00
P1	CRNDE	11,04	50,74	560,28	A*02:01	FIMELLYWL	9,00
P1	CALR	11,02	132,56	1.460,98	A*24:02	RFYALSASF	9,00

P1	PRR11	12,53	173,08	2.168,13	A*24:02	RSWLTSSWNF	10,00
P1	CRNDE	11,04	50,74	560,28	A*02:01	FIMELLYWLL	10,00
P2	HOXA3	13,19	45,77	603,51	B*35:01	YPYQAANGF	9,00
P2	VCAM1	15,23	80,49	1.225,73	B*35:01	IPAIGMIY	9,00
P2	HOXA3	13,19	45,77	603,51	B*35:01	SAIYGGYPY	9,00
P2	HOXA3	13,19	45,77	603,51	B*35:01	YQAANGFAY	9,00
P2	C1orf61	15,66	135,49	2.121,29	B*35:01	FSMSNQDLY	9,00
P3	SELL	9,04	76,37	690,30	C*03:04	FSFSSQCAF	9,00
P3	SELL	9,04	76,37	690,30	C*03:04	FSFTSACTF	9,00
P3	DHRS2	59,50	56,75	3.376,53	C*03:04	AAYNPVVAL	9,00
P3	SOX4	20,25	88,65	1.795,01	C*03:04	AAAAAASF	9,00
P3	ID4	11,35	142,30	1.615,50	B*07:02	APPRTPLTAL	10,00
P4	LGI3	342,98	0,18	60,84	A*24:02	HYQYIPHLF	9,00
P4	LGI3	342,98	0,18	60,84	A*24:02	RYWYICQDF	9,00
P4	VSTM2B	524,47	0,10	52,45	B*44:03	AETLYLAVNF	10,00
P4	VSTM2B	524,47	0,10	52,45	A*01:01	GTDVINTEY	10,00
P4	RPS4Y1	333,58	0,10	33,36	B*44:03	AEMVVEAEIF	10,00
P5	NPIP3	291,38	0,12	34,26	A*23:01	RWMLFWLLF	9,00
P5	CACNG4	333,34	0,10	33,33	A*23:01	HYNYGWSFYF	10,00
P5	GRIK3	310,42	0,13	40,36	A*23:01	AYLGVSCVLF	10,00
P5	GRIK3	310,42	0,13	40,36	A*23:01	RYSGVNLTGF	10,00
P5	SHD	318,67	0,10	31,87	A*23:01	KWLRDYLSF	9,00
P6	GRIN1	2.420,59	0,11	271,13	B*35:01	FAMIIVASY	9,00
P6	INA	2.934,11	0,10	293,41	B*35:01	MALDIEIAAY	10,00
P6	NEFL	3.733,91	0,20	748,68	B*35:01	MALDIEIAAY	10,00
P6	SULT4A1	2.407,91	0,12	296,42	A*32:01	RTMSYRGTF	9,00
P6	GRIN1	2.420,59	0,11	271,13	B*35:01	LARTMNFTY	9,00
P6	SULT4A1	2.407,91	0,12	296,42	B*35:01	NPKDLVVSY	9,00

**Tabelle 5. RNA-Sequenzierungsdaten mit TAA Expression**

RNAseq	Überexpression			Absolute Werte			
	P4	P5	P6	Kontrolle	P4	P5	P6
TMEFF2	51,99	2,66	227,09	0,10	5,20	0,27	22,71

CCNA1	5,59	15,67	104,72	0,12	0,67	1,87	12,50
NOL4	2,33	8,39	89,25	0,20	0,47	1,70	18,10
SYCE1	12,79	1,44	42,86	0,10	1,28	0,14	4,29
SPAG6	3,73	2,15	33,50	0,10	0,37	0,21	3,35
TMEFF1	4,13	1,57	32,92	1,06	4,37	1,66	34,83
FAM133A	3,34	0,30	31,41	0,17	0,57	0,05	5,38
TPPP2	8,60	17,74	26,38	0,10	0,90	1,86	2,76
ARX	4,03	33,98	20,01	0,84	3,40	28,66	16,88
ELOVL4	0,44	0,76	18,08	2,84	1,24	2,15	51,34
TMEM108	1,13	13,07	17,30	0,50	0,57	6,54	8,66
CABYR	3,08	2,96	16,15	0,47	1,44	1,38	7,55
PRSS54	1,02	2,69	15,36	0,29	0,29	0,78	4,43
SPEF2	1,59	3,58	13,94	0,26	0,42	0,94	3,65
NR6A1	3,88	26,02	10,61	0,18	0,70	4,71	1,92
MAEL	0,62	2,43	10,16	0,40	0,25	0,97	4,07
ANKRD45	0,89	1,66	9,03	0,44	0,40	0,74	4,01
CTNNA2	1,36	1,26	8,78	8,10	11,03	10,22	71,06
TEX15	0,46	0,98	7,91	0,10	0,05	0,10	0,79
ARMC3	2,83	-	7,77	0,10	0,28	-	0,78
CCDC62	1,36	2,02	7,23	0,13	0,18	0,27	0,96
PLEKHA5	0,43	0,59	6,93	1,30	0,56	0,77	9,01
IGSF11	1,90	3,93	6,53	3,41	6,49	13,43	22,30
LIPI	0,10	2,06	6,53	0,10	0,01	0,21	0,65
CTAGE1	0,47	1,73	6,18	0,10	0,05	0,17	0,62
TAF7L	0,41	5,55	5,67	0,23	0,10	1,29	1,32
TULP2	0,73	0,09	5,36	0,15	0,11	0,01	0,80
SPAG9	0,90	3,01	4,98	12,31	11,12	37,03	61,32
RGS22	1,69	5,64	4,58	0,10	0,17	0,56	0,46
TDRD6	0,67	0,80	4,29	0,64	0,43	0,51	2,76
CCDC110	0,20	0,56	4,11	0,45	0,09	0,25	1,85
LY6K	0,62	0,65	4,02	0,58	0,36	0,38	2,35
AKAP3	2,15	1,64	3,92	0,43	0,93	0,71	1,70
CEP290	0,83	2,90	3,87	2,24	1,87	6,50	8,66
KIAA0100	0,62	3,23	3,76	11,58	7,20	37,42	43,56
SPAG8	2,06	16,14	2,94	1,91	3,93	30,81	5,62
TDRD1	0,23	0,83	2,94	0,10	0,02	0,08	0,29
TSGA10	1,03	2,75	2,90	0,77	0,79	2,10	2,22

SPAG1	0,49	3,09	2,81	1,76	0,87	5,46	4,96
PIWIL2	2,12	17,94	2,66	0,10	0,21	1,79	0,27
GPAT2	4,89	6,32	2,60	1,26	6,15	7,94	3,27
GPATCH2	0,34	1,74	2,52	1,81	0,61	3,14	4,56
KDM5B	0,35	1,61	2,50	5,43	1,88	8,76	13,60
SPAG17	0,47	3,85	2,42	0,15	0,07	0,58	0,36
TEKT5	1,72	6,82	2,22	0,10	0,17	0,68	0,22
POTEE	0,51	0,53	2,22	0,38	0,20	0,20	0,85
PRSS50	3,03	26,37	2,02	0,15	0,45	3,94	0,30
FATE1	3,20	0,23	1,98	0,23	0,75	0,05	0,46
ZNF165	0,40	1,58	1,90	0,92	0,37	1,46	1,75
ODF2	0,63	7,02	1,67	5,39	3,42	37,81	8,99
ROPN1	0,24	0,60	1,58	0,10	0,02	0,06	0,16
ATAD2	0,24	5,13	1,55	2,88	0,69	14,76	4,47
RQCD1	0,65	3,63	1,54	11,13	7,24	40,39	17,19
CCDC33	0,12	1,38	1,41	0,10	0,01	0,14	0,14
MORC1	0,46	0,54	1,36	0,10	0,05	0,05	0,14
HORMAD1	0,13	-	1,36	0,11	0,01	-	0,15
HSPB9	0,45	9,94	1,31	0,25	0,11	2,51	0,33
TEX14	0,86	1,48	1,22	0,26	0,23	0,39	0,32
SPA17	0,22	1,31	1,21	2,35	0,51	3,07	2,84
CCDC36	0,54	2,38	1,11	0,10	0,05	0,24	0,11
TSSK6	0,54	1,90	1,01	1,57	0,85	2,99	1,59
C15orf60	0,12	0,99	0,99	0,24	0,03	0,24	0,24
HORMAD2	0,62	0,56	0,97	0,16	0,10	0,09	0,15
CT45A5	0,50	0,52	0,94	0,10	0,05	0,05	0,09
CSAG1	1,79	7,38	0,84	0,63	1,13	4,68	0,53
DCAF12	0,21	0,80	0,82	17,05	3,58	13,56	14,04
KIF20B	0,16	1,47	0,78	1,43	0,23	2,11	1,12
TEX101	0,27	0,36	0,72	0,10	0,03	0,04	0,07
BRDT	0,18	0,13	0,68	0,10	0,02	0,01	0,07
SPAG4	0,17	0,98	0,67	4,42	0,77	4,34	2,98
PAGE2	1,06	0,66	0,66	0,10	0,11	0,07	0,07
HEMGN	1,08	-	0,60	0,10	0,11	-	0,06
COX6B2	0,35	3,61	0,59	0,10	0,04	0,36	0,06
DDX43	0,54	0,04	0,57	0,63	0,35	0,03	0,36
MAGEA12	0,22	2,03	0,56	0,34	0,08	0,70	0,19

LDHC	0,17	0,56	0,42	0,10	0,02	0,06	0,04
DKKL1	0,36	14,27	0,40	0,10	0,04	1,43	0,04
RBM46	0,26	0,69	0,40	0,10	0,03	0,07	0,04
FBXO39	0,20	1,92	0,38	0,42	0,08	0,81	0,16
TPTE	0,14	0,21	0,37	0,10	0,01	0,02	0,04
SPACA3	0,27	-	0,33	0,11	0,03	-	0,04
IGF2BP3	0,08	16,17	0,33	0,31	0,02	5,06	0,10
CAGE1	0,04	0,23	0,31	0,10	0,00	0,02	0,03
ACRBP	0,28	1,42	0,29	2,26	0,63	3,21	0,66
PIWIL1	-	-	0,25	0,10	-	-	0,02
PLAC1	0,73	3,19	0,23	0,10	0,07	0,32	0,02
OIP5	0,06	2,70	0,23	2,36	0,14	6,38	0,53
SPANXN3	-	-	0,20	0,12	-	-	0,02
DMRT1	-	0,27	0,18	0,10	-	0,03	0,02
IL13RA2	0,00	0,01	0,17	16,13	0,08	0,12	2,80
OTOA	0,09	0,08	0,15	2,03	0,19	0,16	0,30
POTEG	0,02	0,35	0,15	0,10	0,00	0,04	0,01
CCDC83	-	0,25	0,12	0,10	-	0,02	0,01
PAGE2B	1,02	3,17	0,12	0,24	0,24	0,75	0,03
NUF2	0,05	2,74	0,12	4,80	0,23	13,14	0,57
CALR3	0,06	0,75	0,10	0,10	0,01	0,07	0,01
TTK	0,01	1,65	0,09	2,16	0,02	3,55	0,19
CASC5	0,01	1,29	0,07	1,01	0,01	1,31	0,07
KIF2C	0,04	4,66	0,07	5,13	0,22	23,89	0,35
ADAM2	-	-	0,05	0,10	-	-	0,01
CTCFL	-	-	0,02	0,10	-	-	0,00
CEP55	0,00	1,01	0,01	5,24	0,02	5,28	0,06
PBK	0,00	1,44	0,01	11,55	0,01	16,68	0,07
SAGE1	1,57	2,37	-	0,21	0,33	0,50	-
FMR1NB	0,07	0,61	-	0,10	0,01	0,06	-
AKAP4	-	0,29	-	0,10	-	0,03	-
PRAME	0,62	0,04	-	0,10	0,06	0,00	-
SSX5	-	-	-	0,10	-	-	-
SEMG1	-	-	-	0,10	-	-	-
MAGEA10	-	-	-	0,10	-	-	-



**Tabelle 6. Microarray und RNA-Sequenzierung der Studenpatienten (n=6).** Angegeben sind die zehn ausgewählten Gene mit der höchsten Überexpression.

P1		Absolute Expressionswerte	
GAA	Fold change	Kontrolle	P1
TMEFF2	20,4835651	79,7163746	1632,87555
PRR11	12,5270151	173,076571	2168,13281
RGS1	11,7715643	107,956835	1270,82083
NKAIN4	11,6833187	102,559526	1198,23562
CRNDE	11,042593	50,7380378	560,279501
CALR	11,0213046	132,560055	1460,98473
UCP2	10,8935804	115,707211	1260,46581
CRIM1	9,89558385	95,758839	947,58962
AQP1	9,53050465	143,925344	1371,68116
CTBP1	9,49222646	118,815423	1127,8229
P2		Absolute Expressionswerte	
GAA	Fold change	Kontrolle	P2
CHI3L1	55,2525816	121,46475	6711,24101
NES	38,0061256	105,155808	3996,56486
FCGBP	21,7754211	78,2562662	1704,06315
AQP1	21,5089172	143,925344	3095,6783
C1orf61	15,6569811	135,48516	2121,28859
VCAM1	15,2287515	80,4876937	1225,72709
RGMA	14,2858132	96,7072657	1381,54193
CDCA7L	13,9364442	96,9554757	1351,21457
LFNG	13,5367278	83,1552508	1125,65
HOXA3	13,1864542	45,7677048	603,513745
P3		Absolute Expressionswerte	
GAA	Fold change	Kontrolle	P3
DHRS2	59,4987077	56,7496936	3376,53343
ARHGAP36	25,1876408	86,9351171	2189,69051
SOX4	20,2492955	88,6456824	1795,01262
NES	14,6984364	105,155808	1545,62596
NKAIN4	13,7539732	102,559526	1410,60097
APLNR	12,9779725	135,108857	1753,43904
SOX11	12,8227753	90,9073775	1165,68487
ID4	11,35257	142,302935	1615,50403
SELL	9,03920134	76,3675818	690,301948
RND2	9,00587848	128,204669	1154,59567
P4		Absolute Expressionswerte	
GAA	Fold change	Kontrolle	P4
CARNS1	773,059403	0,26944546	208,297344
HHATL	721,502066	0,13642281	98,4293378
OPALIN	647,71315	0,11089641	71,8290643
VSTM2B	524,469546	0,1	52,4469546

CHGA	394,798172	0,1	39,4798172
MYRF	386,559029	0,17739851	68,5749958
TMEM235	360,053572	0,1	36,0053572
LGI3	342,97726	0,17739214	60,8414716
RPS4Y1	333,580773	0,1	33,3580773
KLK6	289,053982	0,32963301	95,2817343
P5		Absolute Expressionswerte	
GAA	Fold change	Kontrolle	P5
ASIC4	1649,07087	0,1	164,907087
LHFPL3	580,762731	0,1	58,0762731
BAI1	550,736312	0,32331994	178,064032
COL20A1	501,50558	0,1	50,150558
RPH3A	477,636164	0,1	47,7636164
SST	412,383376	0,11603364	47,8503433
CACNG4	333,343447	0,1	33,3343447
SHD	318,66562	0,1	31,866562
GRIK3	310,421083	0,13002286	40,3618366
NPIP3	291,375212	0,11756941	34,2568112
P6		Absolute Expressionswerte	
GAA	Fold change	Kontrolle	P6
NEFL	3733,90631	0,20050829	748,679158
INA	2934,10647	0,1	293,410647
CPLX2	2662,25651	0,19613265	522,155411
SST	2581,60135	0,11603364	299,552596
GRIN1	2420,59411	0,11201165	271,134728
SULT4A1	2407,90723	0,12310343	296,421627
CHGA	2359,31526	0,1	235,931526
CAMK2A	2287,60368	0,31967739	731,295177
DDN	2191,41099	0,1514256	331,835725
CCK	2164,4746	0,12610658	272,954496

## 8 LEBENSLAUF

Kevin Hai-Ning Lu  
Sternstraße 1A  
40479 Düsseldorf  
Mobil: +4915751512331  
E-Mail: kevin.lu@uk-essen.de  
Geburtsdatum: 16.09.1993

### Beruflicher Werdegang

---

Seit 03/2021                      Assistenzarzt, Universitätsmedizin Essen  
   *Klinik für Kinderheilkunde*

### Ausbildung

---

10/2012 – 01/2021                      Studium, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg  
   *Humanmedizin, Staatsexamen, Note: 1,83*

09/2015 – 07/2016                      Studium, Fudan Universität, Shanghai, China  
   *Humanmedizin, TCM, chinesische Literatur*

08/2003 – 06/2012                      Gymnasium, Goethe- und Helmholtz-Gymnasium, Essen  
   *Abitur, Note: 1,0*

### Wissenschaftliche Erfahrung

---

Seit 08/17                                  Promotion, Prof. Michael Platten, KKE Neuroimmunologie und  
   Hirntumorimmunologie, DKFZ Heidelberg  
   *Spontaneous intratumoral T cell responses against glioblastoma-  
   associated antigens*

12/2013 – 06/2015                      Wissenschaftliche Hilfskraft, Prof. Ralf Bartenschlager,  
   Molekulare Virologie, Universität Heidelberg  
   *Phänotypische Charakterisierung von Resistenzmutationen des  
   Hepatitis C Virus*

### Praktische Tätigkeiten

---

06/2019 – 10/2019                      PJ, Universitätsklinikum Köln, *Hämatonkologie, Kardio-IMC*

05/2019 – 06/2019                      PJ, Diakonie-Klinikum Schwäbisch Hall, *Viszeralchirurgie*

03/2019 – 05/2019                      PJ, Royal Infirmary Edinburgh, UK, *Orthopädie*

11/2019 – 03/2019                      PJ, Universitätsklinikum Heidelberg, *Pädiatrie*

### Stipendien und Förderung

---

2022	Forschungsförderung durch die Essener Elterninitiative zur Unterstützung krebskranker Kinder e.V.
2020	Erasmus-Stipendium für PJ-Aufenthalt in Edinburgh
2015	DAAD-Stipendium für Studienaufenthalt in Shanghai
2012	e-fellows-Stipendium

### Interessen

---

Engagement	AMLS (Advanced Medical Life Support) Team Instruktor Organisation „Heidelberger Symposium“ 2015
Sprachkenntnisse	Deutsch, <i>Muttersprache</i> Chinesisch, <i>Muttersprache</i> Englisch, <i>verhandlungssicher in Wort und Schrift (C2)</i> Französisch, <i>gute Kenntnisse (B2/C1)</i>

### Publikationen

---

- I. **Kevin Hai-Ning Lu**, Julius Michel, Michael Kilian, Katrin Aslan, Hao Qi, Niklas Kehl, Stefanie Jung, Khwab Sanghvi, Katharina Lindner, Xin-Wen Zhang, Edward W Green, Isabel Poschke, Miriam Ratliff, Theresa Bunse, Felix Sahm, Andreas von Deimling, Wolfgang Wick, Michael Platten, and Lukas Bunse. **T cell receptor dynamic and transcriptional determinants of T cell expansion in glioma-infiltrating T cells.** *Neuro-Oncology Advances*, 2022
- II. Pascal D Johann, Patrick Wuchter, Lenka Trojanova, Dominik Sturm, **Kevin Hai-Ning Lu**, Andreas E Kulozik, Joachim B Kunz. **Cui Bono? Identifying Patient Groups That May Benefit From Granulocyte Transfusions in Pediatric Hematology and Oncology.** *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 2022
- III. Xin-Wen Zhang, Katrin Huck, Kristine Jähne, Frederik Cichon, Jana K Sonner, Friederike Ufer, Simone Bauer, Marcel Seungsu Woo, Ed Green, **Kevin Lu**, Michael Kilian, Manuel A Friese, Michael Platten, Katharina Sahm. **Activity-regulated cytoskeleton-associated protein/activity-regulated gene 3.1 (Arc/Arg3.1) enhances dendritic cell vaccination in experimental melanoma.** *Oncoimmunology*, 2021

## 9 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Platten danken für sein Vertrauen, seine kontinuierliche Anleitung und für die Schaffung eines unglaublich inspirierenden und anspornenden Umfelds.

Bei meinem Betreuer Dr. Lukas Bunse möchte ich mich für seinen großartigen Input bedanken. Ohne seine Ideen und seinen Optimismus wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Danken möchte ich allen aktuellen und ehemaligen Labormitgliedern der Klinischen Kooperationsseinheit „Neuroimmunologie und Hirntumorimmunologie“ für die tolle Zusammenarbeit, Unterstützung und wunderbare, gemeinsame Zeit. Insbesondere möchte ich Dr. Michael Kilian, Xin-Wen Zhang, Khwab Sanghvi, Dr. Frederik Cichon, Dr. Mirco Friedrich, Dr. Jana Sonner und Dr. Katrin Aslan danken.

Ganz besonders dankbar bin ich Dr. Michael Kilian, Manuel Piechutta, Dr. Selina Jansky und Vera Thiel für ihre wunderbare Freundschaft und die großartige Zeit innerhalb und außerhalb des Labors. Ohne Euch wäre die Zeit nur halb so schön gewesen.

Außerdem möchte ich meiner Familie meinen besonderen Dank für die liebevolle Unterstützung und geduldigen Ermutigungen aussprechen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Verlobten Dr. Anne Christine Bischops für ihre unerschöpfliche Unterstützung, Verständnis und Liebe danken. Du findest immer die richtigen Worte.