

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR ALLGEMEIN-, VISZERAL-, THORAX-, GEFÄß- UND
TRANSPLANTATIONSCHIRURGIE

DIREKTOR: PROF. DR. CLEMENS SCHAFMAYER

Die Interaktion von T-Zellen und autologen
kolorektalen Tumorzellen:
Charakterisierung immunsuppressiver
Mechanismen und Verbesserung der
Tumorantigenerkennung durch Immunmodulation

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZINWISSENSCHAFTEN

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

SANDRA SCHWARZ | GEB. AM 26.10.1993 IN HALLE (SAALE)

AUS ROSTOCK

ROSTOCK | 28.09.2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004276

ERSTGUTACHTER: PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher

Universitätsmedizin Rostock

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und
Transplantationschirurgie

Molekulare Onkologie und Immuntherapie

ZWEITGUTACHTER: Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke

Universitätsmedizin Rostock

Institut für Immunologie

DRITTGUTACHTER: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Schlosser

Universität Würzburg

Rudolf-Virchow-Zentrum - Center for Integrative and Translational Bioimaging

DATUM DER VERTEIDIGUNG: 12.04.2023

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
1.1	DAS KOLOREKTALE KARZINOM	1
1.1.1	<i>Therapie</i>	2
1.2	IMMUNÜBERWACHUNG UND DIE UMGEHUNG DIESER	3
1.3	IMMUNCHECKPOINTS	7
1.4	TUMORVAKZINIERUNG	11
1.4.1	<i>Tumorassoziierte Antigene</i>	11
1.4.2	<i>Tumorspezifische Antigene</i>	12
II.	Zielstellung der Arbeit	15
III.	Material und Methoden	16
3.1	MATERIAL	16
3.2	METHODEN	22
3.2.1	<i>Zelllinienetablierung</i>	22
3.2.2	<i>Zellkultur</i>	22
3.2.3	<i>Isolation von peripheren Blutlymphozyten</i>	23
3.2.4	<i>Etablierung von B-lymphoiden Zelllinien</i>	23
3.2.5	<i>Expansion von T-Zellen</i>	23
3.2.6	<i>Probenvorbereitung für die Durchflusszytometrie</i>	24
3.2.7	<i>Messung am Durchflusszytometer</i>	25
3.2.8	<i>Identifizierung von T-Zell-Subpopulationen</i>	25
3.2.9	<i>Stimulation von T-Zellen</i>	26
3.2.10	<i>IFNγ-ELISpot</i>	26
3.2.11	<i>Kokultur</i>	26
3.2.12	<i>Degranulierungstest</i>	27
3.2.13	<i>Zytokinbestimmung</i>	27
3.2.14	<i>GranToxiLux Färbung</i>	28
3.2.15	<i>Statistik</i>	28
IV.	Ergebnisse	29
4.1	FALLAUSWAHL	29
4.2	CHARAKTERISIERUNG DER TUMORZELLEN	29
4.2.1	<i>IFNγ-Stimulation</i>	29
4.2.2	<i>Expression potenziell immunregulatorischer Proteine durch Tumorzellen</i>	31
4.3	CHARAKTERISIERUNG DER T-ZELLEN	33

4.3.1	<i>Expansionsergebnis</i>	33
4.3.2	<i>Subpopulationen</i>	34
4.3.3	<i>Imm checkpoints</i>	36
4.3.4	<i>Regulatorische T-Zellen</i>	37
4.4	KOKULTUR VON T-ZELLEN MIT AUTOLOGEN TUMORZELLEN	38
4.4.1	<i>Kokultur von T-Zellen mit autologen Tumorzellen und Imm checkpoints-inhibitoren</i>	40
4.4.2	<i>Zytokinbestimmung</i>	42
4.4.3	<i>Kokultur von T-Zellen mit autologen Tumorzellen und HLA-Inhibitoren</i>	46
4.5	CHARAKTERISIERUNG DER B-LCL	47
4.6	PEPTIDSTIMULATION DER T-ZELLEN	48
4.6.1	<i>Identifizierung von tumorspezifischen Antigenen</i>	48
4.6.2	<i>IFNγ-Sekretion nach Peptidstimulation</i>	49
4.6.3	<i>Tetramerfärbung</i>	53
4.6.4	<i>Tumorerkennung nach Peptidstimulation</i>	56
4.7	ZYTOTOXIZITÄT PEPTIDSTIMULIERTER T-ZELLEN	58
4.8	IMMUNEVASION DURCH PI-9-EXPRESSION	59
4.9	BESTIMMUNG DER PI-9-EXPRESSION IN WEITEREN ZELLINIEN	59
V.	Diskussion	61
5.1	CHARAKTERISIERUNG DER TUMORZELLEN	61
5.2	CHARAKTERISIERUNG DER T-ZELLEN	63
5.3	DIE INTERAKTION VON T-ZELLEN UND TUMORZELLEN	66
5.4	PEPTIDENTIFIZIERUNG UND –STIMULIERUNG	71
5.5	IMMUNEVASION DURCH PI-9	73
5.6	FAZIT	74
VI.	Zusammenfassung	77
VII.	Literaturverzeichnis	79
VIII.	Anhang	105
IX.	Danksagung	118
X.	Eidesstattliche Versicherung	119

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Immunüberwachung	4
Abbildung 2: Das Umgehen der Immunüberwachung.....	6
Abbildung 3: Immuncheckpoints.....	8
Abbildung 4: Die Präsentation tumorassoziierter und tumorspezifischer Antigene.....	14
Abbildung 5: Vorversuche zur HLA-Detektion.....	30
Abbildung 6: HLA-Expression auf Tumorzellen.....	31
Abbildung 7: Expression immunregulatorischer Proteine.....	32
Abbildung 8: Wachstumsverhalten von T-Zellen während der Expansion.....	33
Abbildung 9: T-Zellsuppopulationen.	34
Abbildung 10: Expression von Immuncheckpoints.....	36
Abbildung 11: Regulatorische T-Zellen innerhalb der T-Zellpopulationen.	37
Abbildung 12: Erkennung von Tumorzellen nach der Kokultur.....	39
Abbildung 13: Erkennung von Tumorzellen nach der Kokultur mit Immuncheckpointinhibitoren.	41
Abbildung 14: Zytokinsezernierung aus Kokulturen von HROC113 und Tc HROC113.	43
Abbildung 15: Zytokinsezernierung aus Kokulturen von HROC285 T0 M2 und Tc HROC285	44
Abbildung 16: Erkennung von Tumorzellen nach der Kokultur mit HLA-Inhibitoren.	46
Abbildung 17: Charakterisierung der B-LCL.	47
Abbildung 18: Untersuchung der IFN γ -Sekretion durch HROC113 T-Zellen nach der Stimulation mit tumorspezifischen kryptischen Peptiden und Neoantigenen.....	51
Abbildung 19: Untersuchung der IFN γ -Sekretion durch HROC285 T-Zellen nach der Stimulation mit tumorspezifischen kryptischen Peptiden und Neoantigenen.....	52
Abbildung 20: Validierung der Tetramerherstellung.....	54
Abbildung 21: Tetramerfärbung.	55
Abbildung 22: Degranulierungstest nach Stimulation mit ausgewählten Peptiden.	57
Abbildung 23: Bestimmung der Granzym-B-Aktivität in T-Zellen und Tumorzellen.	58
Abbildung 24: Bestimmung der PI-9-Expression in T-Zellen und Tumorzellen.....	59
Abbildung 25: PI-9-Expression in MSI- und MSS-Zelllinien	60

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Immuncheckpointinhibitoren (Zulassung in der EU)	10
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 3: Reagenzien.....	17
Tabelle 4: Zellkulturmedien	18
Tabelle 5: Puffer.....	19
Tabelle 6: Kits	19
Tabelle 7: Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	19
Tabelle 8: Antikörper für funktionelle Testungen.....	20
Tabelle 9: Geräte.....	20
Tabelle 10: Software	21
Tabelle 11: Definition der T-Zell-Subpopulationen	26
Tabelle 12: Immunogene kryptische Peptide	53

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CD	<i>cluster of differentiation</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CIN	chromosomale Instabilität
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte associated protein 4</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	<i>european medicines agency</i>
FDA	<i>food and drug administration</i>
FGL1	<i>fibrinogen-like protein 1</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage-colony stimulating factor</i>
HER2/neu	<i>human epidermal growth receptor 2</i>
HLA	humanes Leukozytenantigen
ICI	Immuncheckpointinhibitoren
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
KRK	kolorektales Karzinom
LAG-3	<i>lymphocyte-activation gene 3</i>
MAGE	Melanomantigen
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i>
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cell</i>
MFI	Median der Fluoreszenzintensität
MSI	Mikosatelliteninstabilität
MSS	Mikosatellitenstabilität
NKT-Zelle	natürliche Killer-T-Zelle
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i>
PI-9	Proteinaseinhibitor 9
TAA	tumorassoziiertes Antigen
TAM	tumorassoziierte Makrophagen
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TGF β RII	<i>transforming growth factor β receptor II</i>

TNF	Tumornekrosefaktor
TSA	tumorspezifisches Antigen

I. Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen der Welt mit 1,9 Millionen Neuerkrankung jährlich (Stand 2020)¹. In Deutschland beträgt der Anteil des kolorektalen Karzinoms an allen Krebsneuerkrankungen bei Frauen 11,5 % und bei Männern 12,8 % (Stand 2017/2018)². Das Risiko an einem KRK zu erkranken erhöht sich mit steigendem Alter. So lag das mittlere Erkrankungsalter 2017/2018 in der weiblichen Bevölkerung bei 75 und in der männlichen bei 72 Jahren². Nur zehn Prozent traten vor dem 55. Lebensjahr auf².

Ursächlich für das KRK sind meist gutartige Adenome, die aufgrund genetischer Veränderungen entarten und in ein malignes Wachstum übergehen. Dieser als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnete Prozess wurde bereits 1990 von Fearson und Vogelstein beschrieben und mit der Inaktivierung der Gene APC, KRAS, DCC und TP53 assoziiert³. Diese Geninaktivierung resultierte aus Genmutationen und chromosomaler Instabilität (CIN), die vom Verlust ganzer Chromosomen oder Teilen von Chromosomen geprägt ist⁴. Dadurch kommt es zu einem Ungleichgewicht der Chromosomenanzahl (Aneuploidie) und häufigem Verlust der Heterozygotie, wovon vor allem Tumorsuppressorgene betroffen sind⁵.

Doch die Geninaktivierung kann nicht nur durch Veränderungen in der Basensequenz hervorgerufen werden, sondern auch durch epigenetische Modifikationen. So hat die Methylierung der CpG-Inseln im Promotorbereich eines Gens ebenso die Inaktivierung dessen zur Folge. Demnach werden neben CIN auch CIMP (*CpG island methylator phenotype*) KRK unterschieden⁶.

Die Tumorentstehung kann jedoch auch durch einen Defekt im Mismatch-Reparatursystem begünstigt werden. Folge dieses defekten Reparatursystems sind Längenvariationen im Bereich meist nichtkodierender Genabschnitte, die Mikrosatelliten genannt werden. Diese bestehen aus repetitiven Sequenzen von ein bis sechs Basenpaaren, die häufig zur fehlerhaften Transkription durch Polymerasen führen. Werden diese Basenpaarungsfehler nicht durch das Mismatch-Reparatursystem korrigiert, liegt eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) vor. Diese wird durch den Funktionsverlust der Gene MLH1, MSH2, MSH6 oder PMS2, die für Proteine des Mismatch-Reparatursystems kodieren, verursacht⁷. Des Weiteren kann auch eine Mutation im Gen der Polymerase Epsilon (POLE) eine MSI induzieren⁸. Keimbahnmutationen (Lynch-Syndrom) sowie sporadisch auftretende Mutationen während der Tumorigenese sind für diese Gendefekte verantwortlich. Ebenso kann eine Hypermethylierung von CpG-Inseln der Mismatch-Reparaturgene zur Inaktivierung führen. Durch die fehlende Korrekturfunktion während der Transkription, führen Defekte im Mismatch-Reparatursystem zu einer Vielzahl an Mutationen innerhalb des Tumors, die nicht nur auf

Mikrosatelliten beschränkt sind. Den molekularen Subtyp des MSI KRK weisen circa 15 % der Tumoren auf⁹.

1.1.1 Therapie

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate von KRK-Patienten betrug 2017/2018 in Deutschland für Frauen und Männer 65 % beziehungsweise 63 %². Diese ist aber stark abhängig vom Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose. Patientinnen und Patienten mit metastasiertem Karzinom erreichen nur ein 5-Jahres-Überlebensrate von 14 %, wohingegen lokalbegrenzte Erkrankungen 90 % erreichen¹⁰.

Die Therapie des KRK ist abhängig vom Allgemeinzustand der Patientinnen und Patienten, der Lokalisation und Ausdehnung sowie der Biologie des Tumors. Dabei steht zunächst die endoskopische oder radikalchirurgische Resektion des Tumors im Mittelpunkt, die in frühen Tumorstadien ohne Infiltration benachbarter Organe kurativ sein kann. Dies betrifft lediglich ca. 22 % der Tumoren², sodass der Großteil der KRK-Erkrankten einer adjuvanten medikamentösen Therapie bedarf. Das Leitlinienprogramm Onkologie sieht dafür als Erstlinienchemotherapie Fluoropyrimidin-basierte Kombinationsregime vor, die auf den Chemotherapeutika 5-Fluoruracil (5-FU), Irinotecan und Oxaliplatin basieren¹¹. Diese sind FOLFIRI (Folinsäure + 5-FU + Irinotecan), FOLFOX (Folinsäure + 5-FU + Oxaliplatin) und FOLFOXIRI (Folinsäure + 5-FU + Oxaliplatin + Irinotecan). Aber auch eine Kombinationstherapie mit dem Fluoropyrimidin Capecitabin und Oxaliplatin (CAPOX) ist möglich¹¹. Zudem kann die Chemotherapie um monoklonale Antikörper ergänzt werden. Liegt keine RAS-Mutation im Tumor vor, kann Cetuximab oder Panitumumab eingesetzt werden¹¹, um eine Blockade des Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors zu erzielen und damit das Tumorwachstum zu verlangsamen. Auch der zusätzliche Einsatz von Bevacizumab, einem neutralisierenden Antikörper des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors, kann die Effektivität eines Chemotherapieprotokolls steigern.

Spätere Therapielinien können um Trastuzumab und Lapatinib ergänzt werden, wenn eine Amplifikation des humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER2/neu) vorliegt.

Trotz dieser vielfältigen medikamentösen Behandlungsmethoden profitieren nicht alle Patientinnen und Patienten, was durch intrinsische oder erworbene Resistenzen begründet ist. Besonders dramatisch ist die Situation bei metastasiertem KRK, die zu 90 % Behandlungsresistenzen aufweisen¹². Diese Zahl beweist, dass neue Mechanismen der Tumorbehandlung benötigt werden, die über die klassische Chemotherapie hinausgehen. Eine solche hoffnungsvolle Option ist die Immuntherapie, die die körpereigene Abwehr entarteter Zellen unterstützt.

1.2 Immunüberwachung und die Umgehung dieser

Das Immunsystem nutzt drei verschiedene Mechanismen, um der Etablierung von Tumoren vorzubeugen¹³. Einerseits werden virusinduzierte Tumoren durch die Abwehr viraler Infektionen abgewendet. Andererseits verhindert die zeitnahe Eliminierung von Pathogenen und die schnelle Aufhebung der Entzündungsreaktion die Etablierung einer entzündlichen Umgebung, die förderlich für die Tumorigenese ist. Außerdem kann das Immunsystem basierend auf der Erkennung von tumorspezifischen Antigenen Tumorzellen identifizieren und gezielt eliminieren.

Der letztgenannte Prozess wird als Immunüberwachung bezeichnet und gliedert sich in die drei Phasen der Eliminierungs-, Gleichgewichts- und Entkommensphase¹⁴ (**Abbildung 1**). Die Eliminierungsphase wird initiiert vom beginnenden Wachstum der Tumorzellen, das eine Gewebsschädigung der umgebenden gesunden Zellen zur Folge hat. Dadurch werden inflammatorische Signale freigesetzt, die zum Einwandern von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), dendritischen Zellen und Makrophagen führen^{15,16}. Die Bindung verschiedener tumoraler Liganden an den NKG2D-Rezeptor auf NK- und NKT-Zellen induziert die Expression und Sekretion von Interferon gamma (IFN γ)¹⁷⁻¹⁹. Während die IFN γ -induzierten antiproliferativen²⁰ und apoptotischen²¹ Prozesse nur begrenzt zum Zelltod von Tumorzellen führen, wird dadurch auch die Produktion der Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 von Tumorzellen und gesunden Zellen der Tumorumgebung ausgelöst¹⁶. Diese wirken chemotaktisch²² und teilweise auch antiangiogenetisch²³⁻²⁵, sodass der Tumor verstärkt von Immunzellen infiltriert und durch eine verminderte Blutversorgung im Wachstum gehemmt wird. Dadurch steigt der Anteil apoptotischer Tumorzellen weiter.

Fragmente abgetöteter Tumorzellen werden von dendritischen Zellen aufgenommen bevor diese in die sekundären lymphatischen Organe einwandern und die Tumorpeptide T-Zellen präsentieren¹⁴. Dabei werden zunächst tumorspezifische CD4⁺ T-Helferzellen aktiviert, die wiederum die Aktivierung tumorspezifischer CD8⁺ T-Zellen induzieren¹⁴. Diese zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen gelangen anschließend zum Tumor und eliminieren verbliebene Tumorzellen, die durch die Präsentation tumorspezifischer Antigene identifiziert werden. Dabei führt das initial sezernierte IFN γ in den Tumorzellen zu einer erhöhten Expression der HLA-Moleküle (*human leukocyte antigen*), sodass die Antigenpräsentation und -erkennung gesteigert wird²⁶. Die verbliebenen Tumorzellen und die Immunzellen befinden sich nun in der Gleichgewichtsphase, die von der fortgesetzten Elimination und dem Aufkeimen neuer Tumorzellvarianten geprägt ist. Der vom Immunsystem ausgeübte Selektionsdruck führt zur Entstehung genetisch instabiler und schnell mutierender Tumorzellen, deren Immunogenität geringer ist als die der initialen Tumorzellen. Dominieren die wenig immunogenen Tumorzellen, die nicht mehr vom Immunsystem identifiziert und eliminiert werden können,

beginnt die Entkommensphase, die durch ungehindertes Wachstum des Tumors und klinischen Manifestationen gekennzeichnet ist.

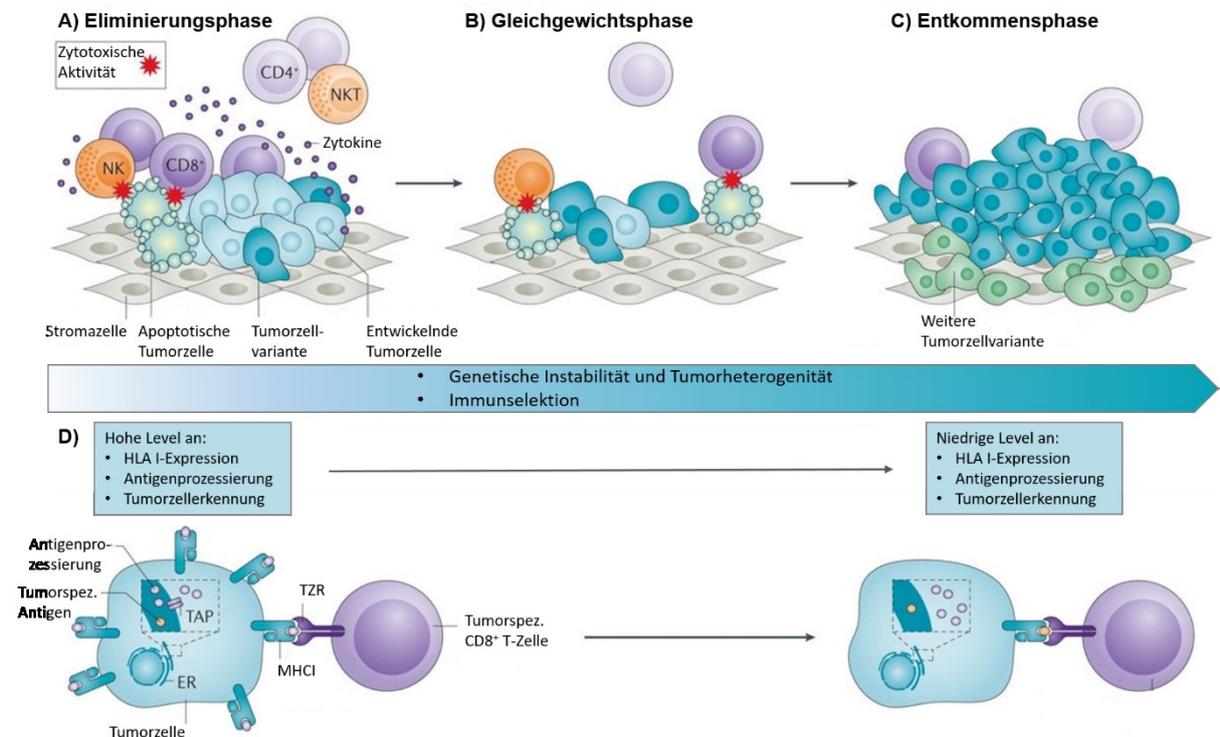


Abbildung 1: Immunüberwachung

Der Prozess der Immunüberwachung beschreibt die Beziehung zwischen Tumor und infiltrierenden Zellen des Immunsystems. In der ersten Phase (A) kann das Immunsystem das Tumorwachstum kontrollieren und es kommt zur Eliminierung der Tumorzellen. Während der Gleichgewichtsphase (B) entwickeln sich Tumorzellvarianten mit der Fähigkeit der Immunüberwachung zu entgehen, die in der Entkommensphase (C) resultiert. Dabei verliert das Immunsystem die Kontrolle über den Tumor und es kommt zum ungebremsten Wachstum mit weiteren Tumorzellvarianten. Dieser Prozess ist geprägt von der Zunahme der genetischen Instabilität und Heterogenität des Tumors durch die Immunselektion. Während der ersten Phase exprimieren Tumorzellen üblicherweise hohe Level an HLA I, die Antigenprozessierung ist intakt und sie können leicht von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden (D). Die Modifikationen, die Tumorzellen während des Immun-Editing erfahren, führen in späteren Phasen zur verminderten Expression von HLA I und defekter Antigenprozessierung, die mit einer reduzierten Erkennung und Eliminierung durch CD8⁺ T-Zellen einhergehen. Abbildung adaptiert von van der Burg et al.²⁷.

Immun-Editing bezeichnet die Veränderungen, die Tumorzellen an verschiedenen Mechanismen der Tumorzellerkennung vornehmen, um der Aufmerksamkeit des Immunsystems zu entgehen (**Abbildung 2**). Da die Unterscheidung zwischen gesunden und malignen Zellen fundamental für die Tumorabwehr ist und diese geprägt ist von der Präsentation tumorspezifischer Antigene, unterliegt der Tumorantigen-HLA-Komplexe häufig Modifikationen durch Immun-Editing. Dabei kann die Selektion während der Gleichgewichtsphase Tumorzellvarianten bevorzugen, die keine tumorspezifischen Antigene aufweisen oder durch Defekte in der Antigenpräsentation nicht präsentieren können²⁸. Dies kann durch den Verlust der Expression von HLA Klasse I (HLA I) geschehen, die durch genetische oder auch epigenetische Modifikationen herunterreguliert ist. Zudem können auch weitere Faktoren der Antigenprozessierung in Tumorzellen verändert sein, sodass kein stabiler

HLA-Peptid-Komplex an die Zelloberfläche gelangt^{29,30}. Bis zu 80 % der Tumoren verschiedenster Entitäten exprimieren kein HLA I³¹. Das wurde vor allem bei Blasen-, Brust- und Prostatakarzinomen beobachtet, wohingegen Nierenzellkarzinomzellen am seltensten ihre HLA I-Expression verlieren³¹. Bei Untersuchungen des KRK exprimierten ca. 30 % der untersuchten Tumoren HLA I³¹. Im Gegensatz zum Verlust der Expression klassischer HLA I-Moleküle (HLA-A, -B, -C), liegt in Tumorzellen häufig ein Überexpression nichtklassischer HLA I-Moleküle wie beispielsweise HLA-G vor³². HLA-G wirkt immunsuppressiv, indem es zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen in ihrer zytolytischen Funktion inhibiert und Apoptose induziert³³, regulatorische T-Zellen und myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) induziert³⁴ und auch die Reifung dendritischer Zellen sowie deren Antigenpräsentation negativ beeinflusst^{35,36}. Die Expression von HLA-G konnte in einer Vielzahl von Tumorentitäten nachgewiesen werden, doch die Frequenz variierte zwischen 10-90 % der untersuchten Tumoren der jeweiligen Entität^{32,36}. Studien, die die HLA-G-Expression in KRK untersuchten, zeigten, dass ein Großteil der untersuchten KRK-Proben (55 %³¹ beziehungsweise 77 %³²) HLA-G exprimierte.

Während die Expression von HLA I während der Tumorigenese absinkt, steigt bei einigen Tumorentitäten die Expression von HLA Klasse II (HLA II)³⁷. Dies konnte vor allem bei Melanomen³⁸, Brust-³⁹, Ovarial-⁴⁰ und Prostatakarzinomen⁴¹ nachgewiesen werden. Auch im KRK ist häufig eine HLA II-Expression zu beobachten⁴²⁻⁴⁴.

Präsentieren Tumorzellen keine oder fehlerhafte HLA-Komplexe auf ihrer Oberfläche, können diese nicht mehr durch T-Zellen erkannt werden und entgehen so den Zellen des erworbenen Immunsystems. Andererseits werden Zellen ohne HLA I-Expression von NK-Zellen als körperfremd erkannt. Um dem entgegenzuwirken exprimieren Tumorzellen vermehrt Liganden des NKG2D-Rezeptors von NK-Zellen. Dies können einerseits inhibierende, andererseits jedoch auch aktivierende Liganden sein, die durch eine Überaktivierung der NK-Zellen letztendlich zu einer verringerten Zytotoxizität führen⁴⁵.

Doch Tumorzellen können auch mit funktionierender Antigenpräsentation unsichtbar für die Immunüberwachung werden. Dies kann einerseits durch die Präsentation von Antigenen geschehen, die nicht ausreichend tumorspezifisch sind, als Selbstantigene erkannt werden und dadurch immunologische Toleranz erreichen. Außerdem können präsentierte immunogene Antigene während des selektiven Drucks in der Gleichgewichtsphase Veränderungen unterliegen, die ihre Immunogenität herabsetzen.

Ein weiterer Mechanismus der Immunsuppression ist die Deaktivierung von tumorspezifischen T-Zellen. Dafür nutzen Tumorzellen die wirtseigenen Regulationsmechanismen, die einer überschießenden Immunreaktion vorbeugen sollen (1.3). Dies geschieht über die Expression membrangebundener Rezeptorliganden, die bei Bindung an den entsprechenden Rezeptor

der T-Zelle diese in ihrer Aktivität hemmt. Doch auch sezernierte Faktoren wie beispielsweise *transforming growth factor beta* (TGF β) können die T-Zell-Funktion direkt inhibieren⁴⁶.

Tumorzellen wirken auch indirekt immunsuppressiv auf infiltrierende Immunzellen, in dem sie die extrazelluläre Matrix zu ihren Gunsten umformen. Dabei kann die vermehrte Expression von Kollagen zur Versteifung der Matrix führen und so einen Kontakt zwischen Immunzellen und Tumorzellen unterbinden⁴⁷. Andererseits begünstigt die vermehrte Bildung von Kollagen die Metastasierung⁴⁸.

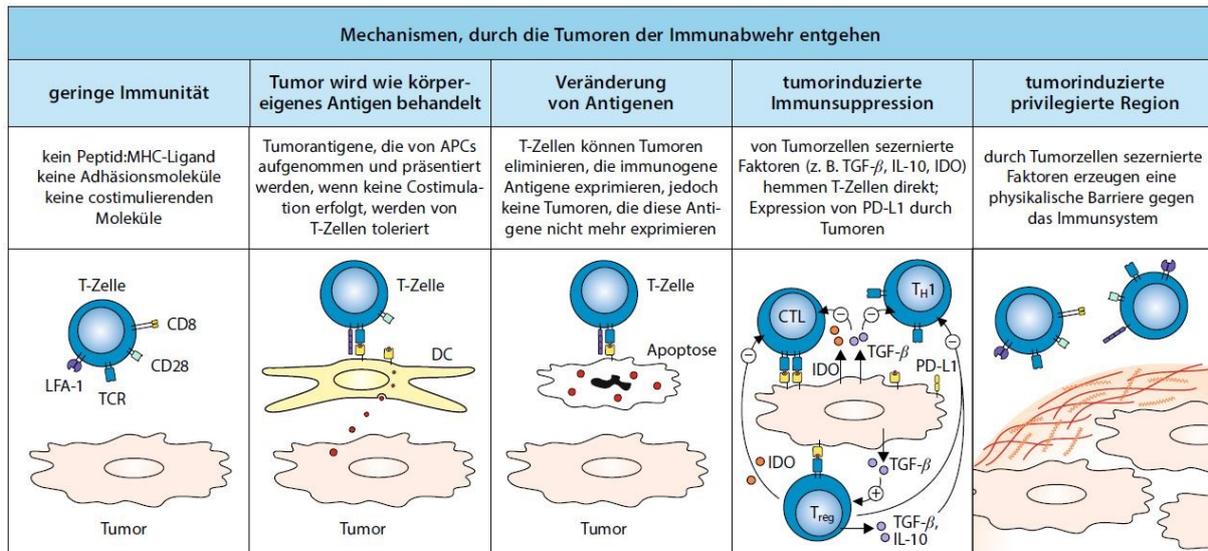


Abbildung 2: Das Umgehen der Immunüberwachung

Die Mechanismen, mit denen Tumorzellen der Immunüberwachung entgehen, sind vielfältig. (Erstes Bild) Tumorzellen können durch den Verlust der HLA-Expression keine Antigene präsentieren oder sind durch fehlende Kostimulatoren wenig immunogen. (Zweites Bild) Ebenso können Antigene präsentiert werden, die aufgrund der Selbsttoleranz nicht zu einer Immunantwort führen. (Drittes Bild) Im Prozess des Immun-Editing werden Tumorzellen selektioniert, die durch genetische Instabilität die Expression und Präsentation tumorspezifischer immunogener Antigene verlieren. (Viertes Bild) Die Expression immunsuppressiver Faktoren wie TGF- β , IL-10, IDO oder PD-L1 führt zur Immunsuppression von T-Zellen und zur Infiltration regulatorischer T-Zellen, die wiederum weitere immunsuppressive Zytokine freisetzen. (Fünftes Bild) Eine Umformung der extrazellulären Matrix durch Tumorzellfaktoren führt zur Etablierung einer physikalischen Barriere aus Kollagen, die die Interaktion von Immun- und Tumorzellen verhindert. Abbildung aus Janeway Immunologie¹⁴.

Zudem sind Tumorzellen auch in der Lage Faktoren zu exprimieren, die die Immunzellaktivität der Tumorumgebung beeinflussen. Dies sind einerseits sezernierte Faktoren wie Cytokine, andererseits aber auch membrangebundene Rezeptorliganden und Enzyme. Die Sekretion des Granulozyten-, Makrophagen- und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (G-CSF, M-CSF und GM-CSF) führt zur Infiltration von MDSC in die Tumorumgebung⁴⁹. Diese sind verantwortlich für eine erhöhte Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies, die Apoptose in T-Zellen induzieren können⁵⁰. Zudem verbrauchen MDSC vermehrt die Aminosäuren Arginin und Tryptophan, die kritisch für T-Zell-Funktionen sind⁵⁰. Tryptophan wird außerdem durch die in Tumorzellen häufig exprimierte Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in immunsuppressives Kynurenin metabolisiert, das ebenso T-Zellen

hemmt⁵¹. Darüber hinaus wirken MDSC auch immunsuppressiv auf NK-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen und führen zur Expansion regulatorischer T-Zellen^{49,52}. Die Sezernierung von Interleukin (IL) 10 durch MDSC führt ebenso zur Aktivitätsminderung in dendritischen und T-Zellen¹⁴.

Die immunsuppressive Tumorumgebung wird neben MDSC auch von tumorassoziierten Makrophagen (TAM), tumorassoziierten Fibroblasten und regulatorischen T-Zellen geprägt. Die Funktion der TAM besteht vor allem darin die Tumorumgebung mit wachstumsfördernden Signalen für den Tumor (epidermaler Wachstumsfaktor, IL-6, Tumornekrosefaktor (TNF)), angiogenen Faktoren (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) und Enzymen für den Abbau der extrazellulären Matrix (Matrixmetalloproteinasen) protumorigen zu formen und die Metastasierung zu fördern⁵³. Eine ähnliche Funktion erfüllen auch die tumorassoziierten Fibroblasten, die durch die Sezernierung von TGF β , IL-1 und -6 durch Tumorzellen induziert werden⁵⁴.

Regulatorische T-Zellen erfüllen ihre immunsuppressive Funktion durch verschiedene Mechanismen. Der hochaffine IL-2-Rezeptor CD25 führt zum verstärkten IL-2-Konsum und limitiert die Verfügbarkeit dieses aktivierenden Faktors für T-Effektorzellen⁵⁵. Über die Expression von Immuncheckpoints⁵⁶ und immunsuppressiven Zytokinen wie TGF β und IL-10 inhibieren regulatorische T-Zellen auch direkt T-Effektorzellen^{57,58}.

1.3 Immuncheckpoints

Für eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung durch Antigenerkennung ist neben der Bindung von T-Zell-Rezeptor und HLA-Peptid-Komplex auch die Induktion kostimulatorischer Signale von Bedeutung. Erst die Bindung von CD28 der T-Zelle an CD80/86 der antigenpräsentierenden Zelle führt zu einer starken Aktivierung der T-Zelle¹⁴. Neben diesem positiven Checkpoint gibt es auch negative Kontrollstellen, die von inhibitorischen Rezeptoren gebildet werden (Abbildung 3). Dazu gehören das zytotoxische-T-Zellen-assoziierte Protein 4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*; CTLA-4) und das Protein des programmierten Zelltodes (*programmed cell death protein 1*; PD-1). Bindet CTLA-4 an CD80/86 führt dies zur Inhibition von T-Zell-Proliferation, Zellzyklus und IL-2-Produktion⁵⁹. Da CTLA-4 zudem eine deutlich höhere Affinität zu CD80/86 aufweist als CD28 ist die Expression und Oberflächenbindung beider Moleküle entscheidend für eine positives Kostimulationssignal. Während CD28 konstitutiv auf 90 % der CD4⁺ und 50 % der CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird⁶⁰, ist CTLA-4 kaum auf nicht aktivierten T-Zellen nachweisbar⁶¹. Doch die Expression überschreitet ungefähr eine Stunde nach T-Zell-Aktivierung die Nachweisgrenze und erreicht ihren Höhepunkt nach ca. 24-36 h⁶⁰. Diese Kinetik weist darauf hin, dass die Bindung von CTLA-4 der aktivierten T-Zellen an CD80/86 der antigenpräsentierenden Zellen, eine Abschwächung der T-Zell-Antwort induziert, um die Immunreaktion zeitlich zu begrenzen.

Auch das Oberflächenprotein PD-1 wird erst durch Antigenstimulation und Zytokineinfluss auf T-Zellen exprimiert. Die Liganden von PD-1, PD-L1 und PD-L2, werden vor allem auf Leukozyten aber auch weiteren Zelltypen des angeborenen und erworbenen Immunsystems exprimiert⁶². Die Bindung von PD-1 und seinen Liganden limitiert die T-Zell-Aktivität durch verminderte IFN γ -Produktion und Proliferation sowie verstärkte Apoptoseinduktion⁶³. Auch dieser Signalweg verhindert unbegrenzte T-Zell-Antworten und schützt vor Autoimmunität. Da PD-L1 auch vermehrt auf Tumorzellen exprimiert wird und dies durch die IFN γ -Sekretion aktivierter T-Zellen stark induziert wird⁶⁴, stellt die PD-1 – PD-L1 – Achse ein gutes Ziel für immuntherapeutische Eingriffe dar.

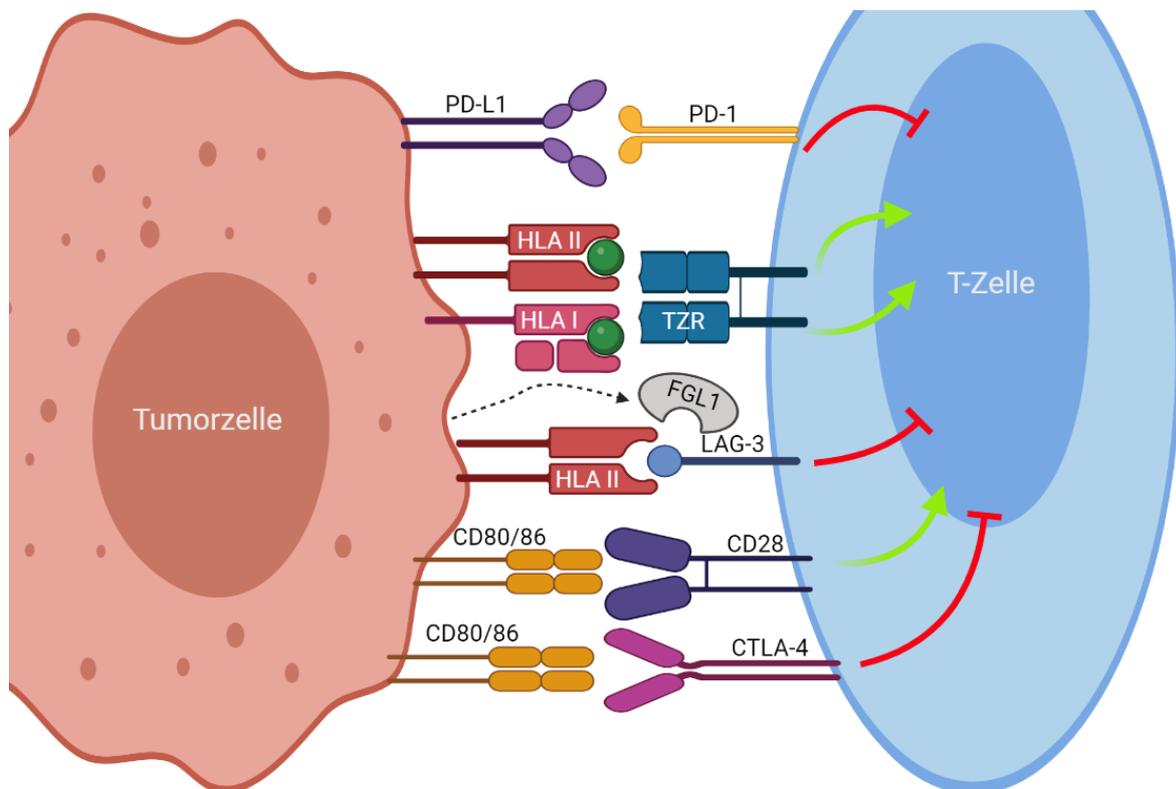


Abbildung 3: Immuncheckpoints

Tumorzelle und T-Zelle interagieren über verschiedene Rezeptoren und Liganden, deren Bindung in der T-Zelle aktivierende (grüne Pfeile) oder inhibierende Signalkaskaden (rote Pfeile) auslöst. CD: *cluster of differentiation*; FGL1: *Fibrinogen-like protein 1*; LAG-3: *lymphocyte activating gene 3*; HLA: *human leukocyte antigen*; PD-1: *programmed cell death 1*; PD-L1: *PD-1 ligand 1*. TZR: T-Zell-Rezeptor. Abbildung erstellt mit Biorender.

Das Protein des Lymphozytenaktivierungsgen 3 (*lymphocyte activation gene 3*; LAG-3) ist ein weiterer Immuncheckpoint auf der T-Zell-Oberfläche, der ähnlich wie CD4 HLA II-Komplexe dendritischer Zellen bindet⁶⁵. Da LAG-3 aber eine höhere Affinität zum Rezeptor ausweist, verhindert es direkt die aktivierende CD4-HLA II-Bindung⁶⁵. LAG-3 ist auf erschöpften CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen nach Antigenaktivierung und häufig auch tumorinfiltrierenden T-Zellen exprimiert und ist mit einer Aktivitätsminderung assoziiert⁶⁶. Da Tumorzellen häufig HLA II überexprimieren³⁷, wirken diese durch die Bindung an LAG-3 immunsuppressiv. Zudem kann

auch das durch Tumorzellen sezernierte fibrinogenähnliche Protein 1 (*fibrinogen-like protein 1*, FGL1) an LAG-3 binden und die T-Zell-Funktion herabsetzen⁶⁷.

Die Entwicklung immuntherapeutischer Wirkstoffe, die auf die Blockade der Immuncheckpointinteraktion abzielen, fokussierte sich zunächst auf CTLA-4. Bereits 1996 konnten Leach et al. im Mausmodell die Hypothese beweisen, dass die Gabe blockierende Antikörper gegen CTLA-4 die antitumorale Immunantwort stärkt und das Tumorstadium reduziert⁶⁸. 2011 wurde Ipilimumab schließlich von der amerikanischen und europäischen Zulassungsbehörde (FDA und EMA) zur Behandlung des Melanoms zugelassen. Mit Pembrolizumab und Nivolumab folgten im Jahr 2014 zwei anti-PD-1-Antikörper, die zunächst ebenfalls auf die Behandlung des malignen Melanoms beschränkt waren (Tabelle 1). Es folgten jedoch zeitnah die Zulassungen für die Behandlung weiterer Tumorentitäten, darunter Lungen-, Nieren-, Kopf-Hals- und Merkelzellkarzinome sowie das Hodgkin-Lymphom. Außerdem zeigte sich in weiteren Studien, dass die Kombination von anti-CTLA-4 und anti-PD-1-Therapie den Therapieerfolg erhöhte, sodass nun vermehrt Ipilimumab zusammen mit Nivolumab eingesetzt wird. Atezolizumab war der erste Checkpointinhibitor gegen PD-L1, der 2016 von den Zulassungsbehörden für die Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms und des Blasenkarzinoms freigegeben wurde.

Immuncheckpointinhibitoren (ICI) haben in der Behandlung vieler Tumorentitäten Einzug in Therapieleitlinien erhalten (Tabelle 1) und das Spektrum erweitert sich stets. Doch auch weitere Immuncheckpoints stehen im Fokus medizinischer Forschung und werden in klinischen Studien getestet. Derzeit befinden sich eine Vielzahl an Kandidaten für immuntherapeutische Ansätze gegen LAG-3 in klinischen Testungen, darunter drei klassische monoklonale Antikörper⁶⁹⁻⁷¹, ein bispezifischer Antikörper gegen PD-1 und LAG-3⁷², ein bispezifischer Antikörper gegen PD-L1 und LAG-3⁷³ und eine lösliche Form von LAG-3, die über die verstärkte Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen und die Zugabe von anti-PD-1-Antikörper die Immunantwort verstärkt⁷⁴. Weiterhin werden Antikörper getestet, welche die T-Zell-Rezeptoren TIM-3, TIGIT, NKG2D, VISTA, B7-H3 und A2aR inhibieren und so die Immunantwort wiederherstellen^{75,76}.

ICI haben auch Einzug in die KRK-Therapie erhalten (Tabelle 1). Doch werden dabei nur KRK in Betracht gezogen, die einen Defekt im Mismatch-Reparatursystem und/oder MSI und dadurch eine sehr hohe Mutationslast aufweisen. Denn es wurde bereits gezeigt, dass eine hohe Mutationslast mit einer Sensitivität gegenüber ICI assoziiert ist⁷⁷⁻⁷⁹. In klinischen Studien wurde bestätigt, dass fast 40 % der KRK Patienten mit MSI von einer anti-PD-1-Therapie profitierten, wohingegen dies bei MSS KRK nur selten eintrat^{80,81}. Weitere Studien konnten zeigen, dass der MSI-Status häufig mit einer erhöhten Immuninfiltration in der Tumorumgebung einhergeht, doch diese antitumoralen Immunzellen auch die Immuncheckpoints PD-1, PD-L1, CTLA-4 und LAG-3 überexprimierten⁸². Deshalb sind MSI

Tumoren besonders für eine Immuncheckpointtherapie geeignet, da die vorhandene geschwächte Immunreaktion gegen die Tumorzellen wieder gestärkt werden kann.

Tabelle 1: Immuncheckpointinhibitoren (Zulassung in der EU)

Immuncheckpoint	Wirkstoff	Indikationen
CTLA-4	Ipilimumab	<ul style="list-style-type: none"> • Melanom
PD-1	Nivolumab	<ul style="list-style-type: none"> • Melanom • nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom • Nierenzellkarzinom • Hodgkin-Lymphom • Kopf-Hals-Tumoren • Urothelkarzinom • Pleuramesotheliom • MSI KRK/KRK mit Defekt im Mismatch-Reparatursystem • Ösophaguskarzinom • Magenkarzinom
	Pembrolizumab	<ul style="list-style-type: none"> • Melanom • nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom • Hodgkin-Lymphom • Kopf-Hals-Tumoren • Urothelkarzinom • Nierenzellkarzinom • MSI-Karzinome: <ul style="list-style-type: none"> ○ KRK ○ Endometriumkarzinom ○ Magenkarzinom
	Dostarlimab	<ul style="list-style-type: none"> • Endometriumkarzinom mit MSI oder Defekt im Mismatch-Reparatursystem
PD-L1	Cemiplimab	<ul style="list-style-type: none"> • Plattenepithelkarzinom der Haut
	Atezolizumab	<ul style="list-style-type: none"> • Urothelkarzinom • nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom • kleinzelliges Lungenkarzinom • Brustkarzinom (dreifach negativ) • Hepatozelluläres Karzinom
	Avelumab	<ul style="list-style-type: none"> • Merkelzellkarzinom • Nierenzellkarzinom • Urothelkarzinom
	Durvalumab	<ul style="list-style-type: none"> • nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom

1.4 Tumorvakzinierung

Eine weitere Form der Immuntherapie ist die Tumorvakzinierung, die durch tumorspezifische Stimulation des Immunsystems die Etablierung einer antitumoralen Immunantwort induziert, die allein durch die Therapie mit ICI nicht ausreichend stark vorhanden wäre. Dazu werden Tumorantigene benötigt, die spezifisch und immunogen sind. Diesen können direkt als Peptide, peptidbeladene Viren, peptidbeladene antigenpräsentierende Zellen oder peptidspezifische T-Zellen eingesetzt werden.

Grundsätzlich werden zwei Kategorien an Tumorantigenen unterschieden: tumorassoziierte und tumorspezifische Antigene.

1.4.1 Tumorassoziierte Antigene

Tumorassoziierte Antigene (TAA) sind Proteine, die in Tumorzellen überexprimiert und auch über HLA-Komplexe präsentiert werden. Dadurch können Tumorzellen von gesunden Zellen unterschieden werden.

Eines der ersten identifizierten TAA ist das karzinoembryonale Antigen (*carcinoembryonic antigen*, CEA), das auch in KRK überexprimiert ist⁸³. Initiale *in vitro* Ergebnisse bestätigten, dass CEA-beladene dendritische Zellen T-Zellen spezifisch aktivieren können, doch die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen war gering^{84,85}. Um die Immunantwort weiter zu verstärken wurden unter anderem Studien *in vitro* durchgeführt, die eine veränderte CEA-Peptidsequenz aufwiesen und dadurch vermehrt T-Zellen aktivieren konnten⁸⁶. Auch Versuche mit einer DNA-Impfung, die sowohl ein CEA-Peptid als auch stimulierende Zytokine, Adjuvantien und T-Helferzell-Peptide kodierte, konnten einen Anstieg aktivierter zytotoxischer T-Zellen im Mausmodell induzieren^{87,88}. Doch klinische Studien mit CEA-Peptiden erzielten in KRK-Patienten nur geringe Ansprechraten von maximal 17 %⁸⁹⁻⁹².

Neben CEA ist teilweise auch das melanomassoziierte Antigen (*melanoma associated antigen*, MAGE) in KRK-Zellen überexprimiert⁹³⁻⁹⁵. Klinische Studien konnten auch belegen, dass Vakzinierungen mit MAGE-Peptiden eine T-Zell-Antwort induzieren können, doch das Tumorwachstum wurde nur geringfügig verringert^{96,97}. Weitere TAA wie beispielsweise Mucin-1⁹⁸⁻¹⁰⁰ und Survivin^{101,102} erzielten ebenso positive präklinische Ergebnisse, die aber nicht mit klinischen Resultaten validiert werden konnten.

Um die Immunantwort, die durch die Vakzinierung mit TAA induziert wurde, zu verstärken, wurden auch klinische Studien mit Kombinationen von bis zu sieben TAA durchgeführt. Dabei zeigte sich erneut, dass ein Anstieg tumorreaktiver zytotoxischer T-Zellen gemessen werden konnte und sich die Erkrankung nicht weiter verschlechterte^{103,104}. Zudem wurde festgestellt, dass die KRK-Patienten, die eine Immunantwort gegen alle eingesetzten Peptide etablierten, eine längere Gesamtüberlebenszeit aufwiesen^{103,104}. Doch eine Reduktion des

Tumorvolumens blieb auch bei der Vakzinierung mit mehreren TAA in den meisten Fällen aus^{103–105}.

In späteren klinischer Studien wurden TAA personalisiert angewendet. Dabei wurde das vorhandene T-Zell-Repertoire der Patienten untersucht und TAA-spezifische T-Zellen beziehungsweise Antikörper detektiert. Die Vakzinierung erfolgte dann entsprechend der identifizierten T-Zell-Spezifität und auch hier zeigte sich ein Anstieg TAA-reaktiver T-Zellen¹⁰⁶. Doch sogar in der Kombination mit Chemotherapeutika profitierte nur ein geringer Anteil an Patienten von dieser personalisierten Tumorstoffimpfung^{107,108}.

1.4.2 Tumorspezifische Antigene

Wie bereits unter 1.1 dargestellt, ist die Tumorigenese des KRC sowie der meisten anderen Tumorerkrankungen geprägt von der Akkumulation verschiedener Mutationen. Davon sind nicht nur Onkogene und Tumorsuppressorgene betroffen, die zur Tumorentwicklung beitragen, sondern jeder Abschnitt des Genoms kann Mutationen aufweisen. Nichtsynonyme Punktmutationen, Deletionen und Insertionen können dann zur Translation von Peptiden mit veränderter Aminosäuresequenz führen, die Neoantigene genannt werden. Demnach steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Tumorzellen Neoantigene aufweisen schlichtweg mit der Anzahl der Mutationen, die jedoch zwischen den Tumorentitäten stark verschieden ist. So weisen Melanom, Lungenkarzinom und KRC mit ca. 10 Mutationen pro 1×10^6 Basenpaaren häufig veränderte Genomsequenzen auf während es bei Schilddrüsenkarzinom und akuter myeloischer Leukämie nur 0,1-1 Mutationen pro 1×10^6 Basenpaaren sind¹⁰⁹. Hypermutation, die durch MSI oder POLE-Mutationen ausgelöst werden, erreichen weitaus höhere Mutationsraten.

Da Neoantigene ausschließlich von Tumorzellen exprimiert werden, stellen sie ideale Zielstrukturen für Tumorstoffimpfungen dar. Außerdem wurde bereits eine Korrelation zwischen der Anzahl der Neoantigene und der Gesamtüberlebenszeit von KRC-Patienten nachgewiesen^{110,111}.

Da KRAS in mehr als 40 % der KRC mutiert vorliegt und häufig auch über den HLA-Komplex präsentiert wird, wurden schon früh Vakzinierungsstudien mit KRAS-Peptiden durchgeführt. Bei den Mutationen handelt es sich häufig um Punktmutationen in Codon 12 und 13, die eine veränderte Aminosäuresequenz zur Folge haben (G12D-, G12V und G13D-Mutation)^{112,113}. Eine *in vitro* Studie zeigte bereits, dass mutierte KRAS-Peptide zytotoxische T-Zellen induzieren, die fähig sind Zielzellen, die das mutierte KRAS-Peptid tragen, zu lysieren¹¹⁴. Im Xenograftmodell wurde zudem nachgewiesen, dass die Vakzinierung mit einem KRAS-Mutationspeptid das Wachstum des Tumors verlangsamen kann¹¹⁵. Auch klinische Studien konnten teilweise einen positiven Effekt der Tumorstoffimpfung mit KRAS-Mutationen als Zielstruktur bestätigen^{116,117}. In einer Studie, die die Tumorstoffimpfung mit der Gabe von IL-2

und/oder GM-CSF kombinierte, wurde beobachtet, dass KRAS-spezifische aktivierte T-Zellen zunahmen, doch das klinische Ansprechen ausblieb und das Tumorwachstum fortschritt¹¹⁸.

Neben Punktmutationen können im Tumorgenom auch Insertionen und Deletionen vorliegen, die zum Verschieben des Leserasters und der Entstehung von sogenannten Frameshift-Peptiden führen. Ein Beispiel dafür ist der *transforming growth factor beta receptor 2* (TGFβRII), der durch die Verschiebung des Leserasters zu einem vorzeitigen Stopcodon in KRK häufig in gekürzter Form vorliegt. *In vitro* Versuche mit verschiedenen Peptiden dieses Neoantigens zeigten auf, dass eine Induktion der CD4⁺- sowie CD8⁺-T-Zell-Proliferation stattfindet und auch neoantigenpräsentierende Zielzellen lysiert werden konnten^{119,120}. Auch im Mausmodell wurde eine positive Wirkung der TGFβRII-Vakzinierung durch Tumorreduktion und Überlebensverlängerung bestätigt¹²¹. Zytotoxische T-Zell-Aktivität gegen KRK-Zellen konnte auch durch die Vakzinierung mit Frameshift-Peptiden von Caspase 5, mut-S-Homolog 3 und O-linked N-Acetylglucosamintransferase erzielt werden^{122–124}. In einer ersten klinischen Studie, bei der 22 MSI-KRK-Patienten eine Peptidvakzinierung der Frameshift-Peptide AIM2, HT001 und TAF1B erhielten, wurden ebenso positive Effekte beobachtet: Es wurden keine schwerwiegenden Nebenwirkungen der Vakzinierung festgestellt und alle Patienten reagierten mit einer Immunantwort gegen mindestens eines der Frameshift-Peptide¹²⁵.

Doch auch nichtmutierte Antigene eignen sich hervorragend als Zielstrukturen für Tumorstimmungen. Kryptische Peptide, die einer nichtkanonischen Translation entstammen, können ebenso tumorspezifisch sein wie mutierte Neoantigene. Sie werden von physiologisch nichtkodierender RNA, Introns und Zwischengenbereichen, physiologisch nichttranslatierten Bereichen (3'- und 5'-Ende der RNA) sowie verschobenen Leserastern der RNA translatiert. Diese abnormalen Translationsprozesse produzieren kurze intrazelluläre Peptide, die fast ausschließlich über HLA I-Komplexe präsentiert werden¹²⁶. Dabei repräsentieren kryptische Peptide circa 15 % der Tumorzellgenoms^{127–130}. Außerdem konnte bereits nachgewiesen werden, dass tumorspezifische kryptische Peptide T-Zellen aktivieren und eine IFNγ-Sekretion induzieren können^{126,131–133}. Im Mausmodell wurde zudem nach der Vakzinierung mit einem Pool kryptischer Peptiden ein verringertes Tumorwachstum beobachtet¹³³.

Insgesamt weisen tumorspezifische Antigene (TSA) mehrere Vorteile gegenüber TAA auf (**Abbildung 4**)¹³⁴. Da TAA zwar in Tumorzellen überexprimiert werden, grundsätzlich aber körpereigene Proteine darstellen, ist die Aktivierbarkeit der T-Zellen durch die Selbsttoleranz des Immunsystems limitiert. Wird diese Toleranz aber durch äußere Eingriffe überwunden, können neben den Tumorzellen auch andere TAA-exprimierende gesunde Körperzellen geschädigt werden und das Risiko schwerwiegender Nebenwirkungen steigt. Die Expression und Präsentation von TSA ist hingegen auf Tumorzellen begrenzt, sodass die Gefahr von Nebenwirkungen deutlich reduziert ist. Zudem ist hier auch die Immunogenität der Antigene

höher, sodass eine vollständige Aktivierung der T-Zellen möglich ist. Zwar weisen neoantigenexprimierende Tumorzellen auch vermehrt immunregulatorische Proteine wie Immuncheckpoints auf, doch können diese durch die Therapie mit ICI gehemmt werden. Da TSA jedoch häufig patientenindividuell sind, ist die Therapie mit höheren Kosten verbunden.

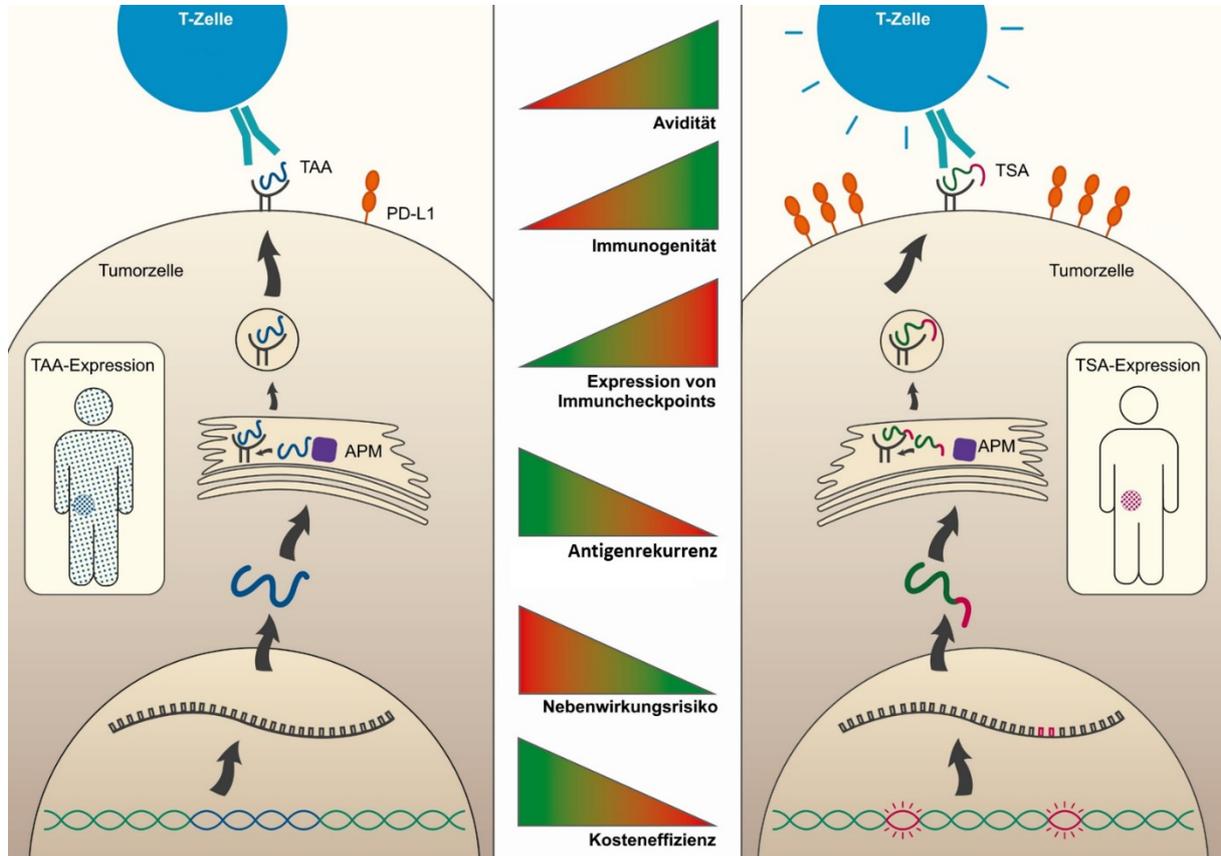


Abbildung 4: Die Präsentation tumorassoziierter und tumorspezifischer Antigene

Diese Abbildung stellt die Antigenpräsentation von TAA (links) und TSA (rechts) dar. Zunächst wird der kodierende Bereich (TAA: blaue Helix) bzw. der kodierende Bereich mit Mutationen (TSA: grün und pink) in RNA transkribiert, translatiert, durch Proteasomen degradiert und während der Antigenprozessierung auf ein HLA I-Molekül geladen. Dieser HLA I-Peptid-Komplex gelangt zur Zellmembran und kann präsentiert werden. Die Erkennung erfolgt durch T-Zell-Rezeptoren. Dabei ist die Immunogenität von TSA höher als von TAA, was in einer stärkeren Aktivierung der T-Zellen resultiert (rechts: aktivierte T-Zelle). TAA sind im Tumor überexprimiert, können jedoch auch in anderen Organen des Patienten exprimiert werden (blaugepunkteter Patient). TSA werden ausschließlich im Tumor exprimiert (pinkgepunkteter Tumor). Häufig weisen TSA-exprimierende Tumoren vermehrt immunregulatorische Proteine wie PD-L1 auf (orangefarbener Ligand). Das mittlere Panel verdeutlicht die Vor- (grün) und Nachteile (rot) von TAA und TSA hinsichtlich Avidität, Immunogenität, Checkpointexpression, Antigenrekurrenz, Nebenwirkungsrisiko und Kosteneffizienz. Abbildung adaptiert von Wagner et al¹³⁴.

II. Zielstellung der Arbeit

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war es, die Interaktion zwischen T-Zellen und autologen Tumorzellen detailliert zu analysieren und durch Peptidstimulation eine Steigerung der T-Zell-Aktivität und Tumorzellerkennung zu induzieren. Dafür wurden zwei Tumorpatienten aus der HROC-Kollektion ausgewählt, die mit einer hohen Mutationslast und der Fähigkeit zur Antigenpräsentation die Kriterien für eine erfolgversprechende Immuntherapie erfüllten.

Zunächst sollte die Expression und Induzierbarkeit der HLA-Moleküle auf Tumorzelllinien untersucht werden. Außerdem sollte eine Charakterisierung hinsichtlich potenziell immunregulatorischer Moleküle erfolgen.

Die Patienten-T-Zellen aus dem peripheren Blut sowie dem Tumor sollten nach der Isolation expandiert und näher charakterisiert werden. Dafür sollte eine Kategorisierung in T-Zell-Subpopulationen erfolgen und die Expression von Immuncheckpoints gemessen werden. Außerdem sollte der Anteil regulatorischer T-Zellen bestimmt werden.

Für nachfolgende Peptidstimulationen sollten auch B-lymphoide Zelllinien etabliert werden und die Expression kostimulatorischer Proteine überprüft werden.

Die Untersuchung der T-Zell – Tumorzell – Interaktion sollte anhand von Kokulturen erfolgen. Diese sollten aufzeigen, inwieweit die Patienten-T-Zellen autologe Tumorzellen erkennen und gegebenenfalls abtöten können. Zudem sollte geklärt werden, welche sezernierten Faktoren in dieser Interaktion eine Rolle spielen. Diese Kokulturversuche sollten auch demonstrieren, welche HLA-Komplexe an einer erfolgreichen Antigenpräsentation beteiligt sind und ob der Einsatz von ICI die Tumorzellerkennung verbessern kann.

Außerdem sollten mithilfe bioinformatischer Analysen tumorspezifische Peptide identifiziert werden, die dann für eine Peptidstimulation verwendet werden sollten. T-Zellen, die mit immunogenen Peptiden stimuliert wurden, sollten dann erneut auf ihre Fähigkeit zur Tumorzellerkennung getestet werden. In abschließenden Experimenten zur Apoptoseinduktion in Tumorzellen sollte gezeigt werden, ob peptidstimulierte T-Zellen Tumorzellen erfolgreich lysieren können.

III. Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US
Flaschenaufsatzfilter	Starlab, Hamburg, DE
LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Membraneinsatz für 24-well-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Pasteurpipetten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Probenröhre 75x12 mm	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße: 0,5 ml 1,5 ml 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Röhrchen für Langzeitlagerung CryoPure	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Spritzen, 60 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, US
Spritzenvorsatzfilter, 0,2 µm	Corning, Corning, NY, US
Zellkulturflaschen: T25 T75 T175	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkulturplatten: 6-well 24-well 96-well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zellsieb, 100 µm	PluriSelect, Leipzig, DE
Zentrifugenröhrchen: 15 ml 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE

Tabelle 3: Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
AB-Serum, human	Transfusionsmedizin Universitätsmedizin Rostock, DE
Amphotericin	Dermapharm, Grünwald, DE
Bacillol	BODE Chemie, Hamburg, DE
Bovines Serumalbumin	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Brefeldin A	MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, US
Cyclosporin A (Sandimmun)	Novartis, Basel, CH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, DE
DMEM/Hams F12 Medium	PAN Biotech, Aidenbach, DE
EDTA	AppliChem, Darmstadt, DE
Flex-T™ HLA-B*08:01 Monomer UVX	Biologend, San Diego, CA, US
Fetales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Ficoll	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Formafix, 4 %	Grimm med. Logistik, Torgelow, DE
HEPES	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Imukin Interferon gamma (IFN γ)	Böhringer-Ingelheim, Ingelheim am Rhein, DE
Interleukin-2 (Proleukin)	Novartis, Basel, CH
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
L-Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach, DE
PBS	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Penicillin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Saponin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Streptomycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Tween20	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Tabelle 4: **Zellkulturmedien**

Medium	Komponenten
B-Zell-Medium	DMEM/Hams F12 Medium 10 % FKS 2 mM L-Glutamin 10 IE/ml Penicillin 130 µg/ml Streptomycin 6 µg/ml Amphotericin
Einfriermedium	FKS 10 % Dimethylsulfoxid
Transformationsmedium	42 % DMEM/Hams F12 Medium 42 % B95/8 Überstand (steril-filtriert) 16 % FKS 550 nM Cyclosporin A 10 IE/ml Penicillin 130 µg/ml Streptomycin 6 µg/ml Amphotericin
Tumorzellmedium	DMEM/Hams F12 Medium 10 % FKS 2 mM L-Glutamin
T-Zell-Expansionsmedium	TexMACS Medium 3 % humanes AB-Serum 3.000 IE/ml IL-2 10 IE/ml Penicillin 130 µg/ml Streptomycin 6 µg/ml Amphotericin
T-Zell-Medium	DMEM/Hams F12 Medium 10 % humanes AB-Serum 300 IE/ml IL-2 10 IE/ml Penicillin 130 µg/ml Streptomycin 6 µg/ml Amphotericin

Tabelle 5: **Puffer**

Bezeichnung	Komponenten
Färbepuffer	PBS 0,5 % Bovines Serumalbumin 2 mM EDTA
P-Puffer (100x)	PBS 1 % FKS 0,1 % Saponin 0,01 M HEPES

Tabelle 6: **Kits**

Bezeichnung	Hersteller
GranToxiLux	Oncoimmunin, Gaithersburg, MD, US
IFN γ -ELISpot ^{BASIC}	Mabtech, Nacka Strand, SE
Inside Stain Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
LEGEND MAX Flex-T Human Class I Peptide Exchange ELISA	Biologend, San Diego, CA, US
MACSPlex Cytokine 12 Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Pan T cell isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
REAl ease CD4 MicroBead Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE

Tabelle 7: **Antikörper für die Durchflusszytometrie**

Epitop	Klon	Fluorophor	Hersteller
CD3	HIT3a	PerCP-Cy5.5	Biologend, San Diego, CA, US
CD4	IT4	APC	Immunotools, Friesoythe, DE
CD8	SK1	APC-Cy7	Biologend, San Diego, CA, US
CD28	CD28.2	-	Immunotools, Friesoythe, DE
CD40	HI40a	APC	Immunotools, Friesoythe, DE
CD45RO	UCHL1	FITC	Immunotools, Friesoythe, DE
CD50	MEM-171	FITC	Immunotools, Friesoythe, DE
CD54	1H4	APC	Immunotools, Friesoythe, DE
CD58	MEM-63	PE	Immunotools, Friesoythe, DE
CD62L	HI62L	PE	Immunotools, Friesoythe, DE
CD86	BU63	PE-Cy7	Biologend, San Diego, CA, US
CD95	DX2	PE-Cy7	Biologend, San Diego, CA, US
CD102	CBR-IC2/2	FITC	Acris Antibodies, Herford, DE

CD107a	H4A3	FITC	Biologend, San Diego, CA, US
CD152 (CTLA-4)	L3D10	PE	Biologend, San Diego, CA, US
CD227 (LAG-3)	7H2C65	APC	Biologend, San Diego, CA, US
CD274 (PD-L1)	MIH3	FITC	Biologend, San Diego, CA, US
CD279 (PD-1)	EH12.2H7	FITC	Biologend, San Diego, CA, US
FoxP3	3G3	PE	Immunotools, Friesoythe, DE
HLA-A/B/C	W6/32	APC	Immunotools, Friesoythe, DE
HLA-DR/DP	HL-38	FITC	Immunotools, Friesoythe, DE
IDO	2E2/IDO1	AlexaFluor647	Biologend, San Diego, CA, US
IFN γ	4S.B3	PE	Biologend, San Diego, CA, US
Proteinaseinhibitor 9 (PI-9)	C-10	FITC	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, US

Tabelle 8: **Antikörper für funktionelle Testungen**

Name	Zielstruktur	Hersteller
Anti-HLA-A/-B/-C (W6/32)	Anti-HLA-A/-B/-C	Hybridomzelllinie verfügbar
Anti-HLA-DR/-DP-DQ (Tü39)	Anti-HLA-DR/-DP-DQ	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, US
Anti-LAG-3 (17B4)	Anti-LAG-3	AdipoGen Life Sciences, San Diego, CA, US
Durvalumab	Anti-PD-L1	AstraZeneca, Cambridge, UK
Ipilimumab	Anti-CTLA-4	Bristol-Myers Squibb, New York City, NY, US
Pembrolizumab	Anti-PD-1	Merck, Darmstadt, DE

Tabelle 9: **Geräte**

Bezeichnung	Hersteller
CO ₂ -Brutschrank Inco	Memmert, Schwabach, DE
Einfriercontainer CoolCell	Corning, Corning, NY, US
FACSCalibur	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, US
FACSVerse	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, US
Heizplatte Präzitherm	Harry Gestigkeit, Düsseldorf, DE
IBL637 Bestrahlungsanlage	CIS BioInternational, Saclay, FR

ImmunoSpot Reader S5 UV	Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH, US
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, CH
Mikroplatten-Reader Infinite 200	Tecan, Männedorf, CH
Mikroskop CKX53	Olympus, Shinjuku, JP
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda Königshofen, DE
Pipetten Pipetman 1-10 µl 2-20 µl 20-100 µl 50-200 µl 200-1000 l	Gilson, Middleton, WI, US
Pipettierhilfe Pipetboy acu 2	Integra Biosciences, Biebertal, DE
Schüttler VortexGenie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, US
Separator Quadro MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Sterilwerkbank Safemate 1.8 Vision	BioAir, Pero, IT
Tiefkühltruhe -30°C	Kryotec, Hamburg, DE
Tiefkühltruhe -80°C	Kryotec, Hamburg, DE
Vakuumpumpe VacuSafe	Integra Biosciences, Biebertal, DE
Wasserbad WB6	Witeg Labortechnik, Wertheim, DE
Zentrifugen: Rotina 38 Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, DE Hettich, Tuttlingen, DE

Tabelle 10: **Software**

Bezeichnung	Hersteller
BD CELLQuest	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, US
BD FACSuite	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, US
Citavi 6	Swiss Academic Software, Wädenswil, CH
FACSAlyzer 0.9.21-alpha	Sven Mostböck, Wien, AT
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, US
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, WA, US

3.2 Methoden

3.2.1 Zelllinienetablierung

Tumorzelllinien der HROC-Kollektion¹³⁵ wurden aus Resektaten kolorektaler Karzinome etabliert. Die Gewebstücke wurden mithilfe von Skalpellern zerkleinert, in phosphatgepufferter Saline (*phosphate-buffered saline*; PBS) aufgenommen und durch ein Zellsieb mit 100 µm Porengröße filtriert. Nach der Zentrifugation bei 300 g für 7 min wurden die Zellen in Medium aufgenommen und in einer kollagenbeschichteten 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Kultur erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte. Wachsende Kulturen wurden regelmäßig passagiert und kryokonserviert. Dieser Aufarbeitungsprozess wurde bei Patientenproben sowie bei Proben aus Xenotransplantaten der Maus angewendet. Alle Patienten erteilten ihre schriftliche Einwilligung zur Verwendung ihres Biomaterials und die Verarbeitung wurde durch die Ethikkommission der Universitätsmedizin Rostock genehmigt (Referenznummer II HV 43/2004 und A 45/2007).

3.2.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Verwendet wurden ausschließlich steril gelieferte oder durch Autoklavieren sterilisierte Materialien. Die Zellkultur erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte.

Die Tumorzelllinien wurden entsprechend ihrer Konfluenz ein- bis zweimal wöchentlich passagiert. Adhärenz Zellen wurden durch eine 5-10-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA bei 37°C vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und anschließend gezählt. Suspensionszellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren durchmischt bevor die Zellzahl bestimmt wurde. Die Zählung erfolgte mithilfe einer Lebend-Tot-Färbung der Zellsuspension mit Trypanblau und unter Zuhilfenahme einer Neubauerzählkammer. Die benötigte Anzahl an Zellen wurde bei 300 g für 7 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen. Die Aussaat der Zellen erfolgte in entsprechenden Zellkulturgefäßen.

Für die Kryokonservierung wurden 3×10^6 Tumorzellen, 5×10^6 Zellen B-lymphoider Zelllinien (*b-lymphoid cell lines*; B-LCL) oder 15×10^6 T-Zellen in je 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen, in beschriftete Röhrchen für die Langzeitlagerung überführt und mithilfe eines Einfriercontainers auf -80°C heruntergekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in der Gasphase flüssigen Stickstoffs (-150°C).

3.2.3 Isolation von peripheren Blutlymphozyten

Die Isolation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) erfolgte durch eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficolllösung¹³⁶. Dafür wurden 20 ml heparinisiertes Blut von gesunden Spendern oder Tumorpatienten mit 15 ml PBS verdünnt bevor 15 ml Ficolllösung unterschichtet wurden. Nach der Zentrifugation bei 1400 g für 15 min ohne Bremse konnte die zwischen Ficolllösung und Plasma befindliche weißliche Lymphozytenschicht entnommen werden. Die Zellen wurden nach Zugabe von 15 ml PBS bei 700 g für 15 min zentrifugiert und abschließend in frischem Medium aufgenommen. Die isolierten Lymphozyten wurden kryokonserviert (3.2.2) oder sofort für weitere Versuche eingesetzt (3.2.4; 3.2.5).

3.2.4 Etablierung von B-lymphoiden Zelllinien

Für die Etablierung von immortalisierten B-LCL ist die Herstellung von Transformationsmedium nötig¹³⁷ (Tabelle 4). Dieses enthält Epstein-Barr-Virus-haltigen Zellkulturüberstand, der aus der Kultur von B95/8-Zellen gewonnen wird. Zweimal im Abstand weniger Tage wird der Überstand proliferierender B95/8-Zellen entnommen, steril filtriert und zunächst bei 4°C gelagert.

Die Epstein-Barr-Virus-induzierte Transformation der B-Zellen erfolgte durch die Kultivierung von 5-10x10⁶ PBL mit 5 ml Transformationsmedium. Nach vier bis sechs Wochen wurden sphärische Zellansammlungen sichtbar und die B-LCL wurden weiter passagiert oder kryokonserviert (3.2.2).

3.2.5 Expansion von T-Zellen

T-Zellen wurden mithilfe des „Pan T cell isolation Kit“ aus PBL (3.2.3) isoliert und anschließend mittels eines adaptierten Schnellexpansionsprotokolls (*rapid expansion protocol*)¹³⁸ expandiert. Dafür wurden 1x10⁶ T-Zellen mit bestrahlten (40 Gy) PBL gesunder Spender im Verhältnis 1:200 in T-Zell-Expansionsmedium (Tabelle 4) mit 0,1 % OKT3-Zellkulturüberstand in einer stehenden T75-Zellkulturflasche kultiviert. Nach fünf Tagen wurden $\frac{3}{4}$ des Mediums mit frischem T-Zell-Expansionsmedium ersetzt. Beginnend mit Tag sieben wurden die Zellen täglich gezählt und auf eine Konzentration von 0,8-1,0x10⁶ Zellen/ml eingestellt. Der kumulative Wachstumsfaktor wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}(\text{Tag } X+1)}{\text{Zellzahl}(\text{Tag } X)} * \frac{\text{Zellzahl}(\text{Tag } X)}{\text{Zellzahl}(\text{Tag } X-1)}$$

Die Expansion wurde an Tag 14 beendet und die T-Zellen wurden kryokonserviert (3.2.2) oder sofort für weitere Versuche eingesetzt (3.2.9; 3.2.11; 3.2.12; 3.2.10). Die Expansion tumorinfiltrierender T-Zellen erfolgte aus vital kryokonservierten Tumorgewebsstücken. Für jeden Patienten wurden vier dieser Stücke von je 3x3x3 mm Größe mit gekreuzten Skalpellens

zerkleinert und für die Expansion verwendet. Diese folgte einem ähnlichen Protokoll wie die Expansion peripherer T-Zellen, gliederte sich jedoch in zwei Phasen. Zunächst wurde die Zellsuspension in T-Zell-Expansionsmedium aufgenommen, das jedoch 6000 IE/ml IL-2 und OKT3-Zellkulturüberstand enthielt. Zudem wurden die tumorinfiltrierenden T-Zellen mit bestrahlten (40 Gy) PBL gesunder Spender im Verhältnis 1:200 versetzt, wobei eine Konzentration von $2-4 \times 10^6$ T-Zellen pro cm^3 Gewebe angenommen wurde, und sieben Tage kultiviert. Im Anschluss folgte die zweite Expansionsphase, die mithilfe des Expansionsprotokolls periphere T-Zellen durchgeführt wurde.

3.2.6 Probenvorbereitung für die Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Messungen wurden für adhärente Tumorzellen sowie Lymphozyten in Suspensionskultur durchgeführt. Die Ernte und Zählung der Zellen folgte dabei dem unter 3.2.2 geschilderten Ablauf. Zur Entfernung des Mediums wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Alle Zentrifugationsschritte der Probenvorbereitung für die Durchflusszytometrie wurden bei 400 g für 5 min durchgeführt. Pro Färbung wurden 5×10^5 Zellen eingesetzt.

3.2.6.1 Extrazelluläre Färbung

Zunächst wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Für die Färbung extrazellulärer Oberflächenproteine mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 100 μl aufgenommen, bestehend aus Färbepuffer (Tabelle 5) und der entsprechenden Menge Antikörper. Anschließend wurden die Zellen lichtgeschützt für 20-30 min bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand entfernt. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 200 μl Färbepuffer aufgenommen.

3.2.6.2 Intrazelluläre Färbung

Für die Färbung intrazellulärer Proteine wurde das „InsideStain Kit“ nach Herstellerangaben oder das folgende Protokoll verwendet. Die geernteten Zellen wurden zunächst mit P-Puffer (Tabelle 5) gewaschen und anschließend mit 2 % Formafix für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Entfernung der Fixierlösung erfolgte nach einer Zentrifugation. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen für 10 min mit P-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an eine Zentrifugation zur Entfernung des P-Puffers wurden die Zellen in 100 μl P-Puffer inklusive der entsprechenden Menge Antikörper aufgenommen und lichtgeschützt 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 200 μl 2 % Formafix aufgenommen.

3.2.6.3 Tetramer-Färbung

Zum Nachweis und der Quantifizierung von neoantigenspezifischen T-Zellen wurde eine Tetramer-Färbung durchgeführt. Das PE-IQGAP1neo-Tetramer wurde von Miltenyi Biotec zur Verfügung gestellt; die Tetramere PE-TRIT1neo und APC-TRIT1neo wurden mithilfe des „Flex-T™ HLA-B*08:01 Monomer UVX“ nach Herstellerangaben angefertigt. Dabei wurde durch die Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm Wellenlänge) ein stabilisierendes Monomer aus dem Monomer-HLA I-Komplex gelöst, sodass im Nachgang das TRIT1-Peptid gebunden werden konnte. Mithilfe des „LEGEND MAX™ Flex-T™ Human Class I Peptide Exchange ELISA“ wurde im Anschluss die Bindung der Neoantigen-Monomere an die HLA I-Moleküle überprüft. Monomerbeladene Proteinkomplexe werden durch die spezifische Bindung der α -Kette und des β 2-Mikroglobulins des HLA I-Komplexes detektiert.

T-Zellen wurden zunächst mit Färbepuffer (Tabelle 5) gewaschen und anschließend für 30 min mit dem entsprechenden Tetramer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Färbepuffer wurden die T-Zellen in 200 μ l Färbepuffer aufgenommen.

3.2.7 Messung am Durchflusszytometer

Die Messung der Zellen, die mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern oder Tetrameren gefärbt wurden, erfolgte zeitnah nach der Färbung am FACSCalibur oder FACSVerse. Die Zellpopulation wurde durch Ausschluss von Zelldebris im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht definiert. Es wurden stets ungefärbte Zellen der zu untersuchenden Zellpopulationen zur deutlichen Abgrenzung und Identifizierung der antikörpermarkierten Zellen mitgeführt. Bei Färbungen mit mehreren Antikörpern mit unterschiedlichen Fluorophoren wurden zunächst Vorversuche durchgeführt, um durch Kompensationseinstellungen eine Fehldetektion durch überlagerte Fluoreszenzsignale zu vermeiden. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte mit FCSalyzer 0.9.21-alpha.

3.2.8 Identifizierung von T-Zell-Subpopulationen

Die unterschiedlichen Subpopulationen innerhalb der T-Zellen wurden durch eine durchflusszytometrische Messung identifiziert. Dafür wurde eine extrazelluläre Färbung (3.2.6.1) der Oberflächenproteine CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD62L und CD95 durchgeführt. Die Subpopulationen innerhalb der CD3⁺/CD4⁺- beziehungsweise CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen wurden anhand der Präsenz von CD62L, CD45RO und CD95 unterschieden (Tabelle 11).

Tabelle 11: **Definition der T-Zell-Subpopulationen**

Oberflächenproteine	T-Zell-Subpopulation
CD3 ⁺ /CD62L ⁺ /CD45RO ⁻ /CD95 ⁻	naïve T-Zellen
CD3 ⁺ /CD62L ⁺ /CD45RO ⁻ /CD95 ⁺	Stammzellähnliche T-Gedächtniszellen
CD3 ⁺ /CD62L ⁺ /CD45RO ⁺ /CD95 ⁺	Zentrale T-Gedächtniszellen
CD3 ⁺ /CD62L ⁻ /CD45RO ⁺ /CD95 ⁺	T-Effektorgedächtniszellen
CD3 ⁺ /CD62L ⁻ /CD45RO ⁻ /CD95 ⁺	T-Effektorzellen

3.2.9 Stimulation von T-Zellen

Für die Stimulation von T-Zellen wurden autologe B-LCL als antigen-präsentierende Zellen verwendet. Die Beladung von 3×10^6 B-LCL mit 10 µg Peptid erfolgte in 1 ml serumfreiem Medium bei 37°C. Im Anschluss wurden die peptidbeladenen B-LCL mit 30 Gy bestrahlt. B-LCL und expandierte T-Zellen wurden im Verhältnis 1:4 in T-Zell-Stimulationsmedium (Tabelle 4) gemischt und je 1×10^6 T-Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Die T-Zellen wurden nach sieben Tagen gezählt und mit neuen peptidbeladenen B-LCLs im Verhältnis 1:4 kultiviert.

3.2.10 IFN γ -ELISpot

Die Detektion der IFN γ -Sekretion von aktivierten T-Zellen erfolgte mithilfe des humanen „IFN γ -ELISpot^{BASIC}“. Dafür wurden 20.000 T-Zellen mit 10.000 B-Zellen in 200 µl/Well T-Zellmedium (Tabelle 4) in eine anti-IFN γ -beschichtete 96-well Platte gesät. Zudem wurde den Proben 4 µg Peptid zugesetzt, wohingegen T-Zellen, die mit B-Zellen aber ohne Peptid inkubierten, als Negativkontrolle dienten. Die Positivkontrollen wurden mit 50 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 1 µg/ml Ionomycin versetzt. Nach 16-20 h Inkubationszeit bei 37°C und 5 % CO₂ wurde das Medium entfernt und die Detektion der IFN γ -Spots erfolgte nach Herstellerangaben. Die abschließende Zählung der Spots wurde mithilfe eines ELISpot-Lesegerätes durchgeführt.

3.2.11 Kokultur

Die Stimulation von T-Zellen mit autologen Tumorzellen erfolgte durch eine Kokultur beider Zelltypen¹³⁹. Zunächst wurden Tumorzellen für 48 h mit 200 IE/ml IFN γ stimuliert, um eine gesteigerte HLA-Expression zu induzieren. Die Kokultur erfolgte in einer 24-Well-Platte, die mit humanem anti-CD28-Antikörper beschichtet wurde. Pro Well wurden 200.000 T-Zellen und 20.000 autologe IFN γ -stimulierte Tumorzellen in 1 ml T-Zell-Medium (Tabelle 4) ausgesät. Ein Austausch von 50 % des Mediums wurde nach je zwei bis drei Tagen durchgeführt. Nach sieben Tagen wurden die Zellen geerntet und ihrer Zellzahl entsprechend mit neuen IFN γ -stimulierten Tumorzellen im Verhältnis 10:1 ausgesät. Die Kokultur wurde an Tag 14 beendet und die Zellen wurden analysiert (3.2.6; 3.2.12). Teilweise wurden Kokulturen mit weiteren

Zusätzen angesetzt: 20 µg/ml Pembrolizumab, 10 µg/ml Ipilimumab, 20 µg/ml Durvalumab, 1 µg/ml anti-LAG3, 10 µg/ml anti-HLA- DR, DP, DQ, 10 % W6/32-Zellkulturüberstand.

Des Weiteren wurden auch Kokulturversuche mit Membraneinsätzen durchgeführt, um eine räumliche Trennung von Tumorzellen und T-Zellen zu ermöglichen. Dabei wurden die T-Zellen auf den Boden der anti-CD28-Antikörper beschichteten 24-Well-Platte gegeben, während die Tumorzellen in den Membraneinsatz gesät wurden. Da diese Versuche nur für die Gewinnung von Zellkulturüberstand durchgeführt wurden, erfolgte kein Mediumwechsel.

3.2.12 Degranulierungstest

Der Degranulierungstest¹⁴⁰ wurde durchgeführt, um die Freisetzung zytotoxischer Granula aus CD8⁺ T-Zellen zu messen. Dabei steht die Detektion von CD107a im Fokus, das auch lysosomassoziiertes Glykomembranprotein genannt wird. Dieses Protein ist Teil der Lysosomenmembran, die bei der zytotoxischen T-Zell-Antwort mit der Zellmembran fusioniert, um die enthaltenen Granzyme und das porenbildende Perforin freizusetzen. Nach der Fusion der Membranen kann CD107a durch eine extrazelluläre Antikörperfärbung angefärbt werden. Ebenso wichtig ist jedoch auch der Nachweis von IFN γ , das nur von aktivierten T-Zellen exprimiert wird.

In Vorbereitung des Degranulierungstests wurden die Tumorzellen für 48 h mit 200 IE/ml IFN γ behandelt. Für die Inkubation wurden 200.000 T-Zellen und 100.000 autologe Tumorzellen in 100 µl T-Zellmedium (Tabelle 4) in einer 96-well-Platte ausgesät, die zuvor mit humanem anti-CD28-Antikörper beschichtet wurde. Dem Medium wurde zudem der humane anti-CD107a-Antikörper zugesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation wurde jedes Well mit 1 µg/ml Brefeldin A versetzt und nach weiteren vier Stunden wurden die Zellen geerntet. Die Färbung für die durchflusszytometrische Messung erfolgte mithilfe des „Inside Stain Kit“ sowie humanem anti-CD8-APC-Antikörper und humanem anti-IFN γ -PE-Antikörper. Die Messung von CD8/CD107a/IFN γ dreifach positiven Zellen erfolgte am BD FACSCalibur™. Zur Berechnung der relativen Degranulierung wurde der Anteil an dreifach-positiven T-Zellen der Proben in Relation gesetzt zu dreifach-positiven T-Zellen, die während des Degranulierungstests nicht mit Tumorzellen inkubiert wurden.

3.2.13 Zytokinbestimmung

Für die Detektion von Zytokinen, die während der Kokultur von Tumorzellen und T-Zellen sezerniert werden, wurden Zellkulturüberstände gesammelt und mit dem „MACSplex Cytokine 12 Kit“ analysiert. Dabei kann die Konzentration der Zytokine GM-CSF, IFN α , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-17A, und TNF α bestimmt werden. Die Zytokinbestimmung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und am FACSVerse gemessen.

3.2.14 GranToxiLux Färbung

Die GranToxiLux Färbung zur Bestimmung der Granzym B-Freisetzung durch zytotoxische T-Zellen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden Tumorzellen für 15 min mit dem Fluorophor TFL4 bei 37°C inkubiert, gewaschen, mit Granzym B-Substrat versetzt und im Verhältnis 1:5 mit T-Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Detektion von Zellen, die positiv für TFL4 und das Granzym B-Substrat waren, erfolgte am FACSCalibur.

Diese Färbung wurde auch in reduzierter Form durchgeführt. Dabei wurde lediglich das Granzym B-Substrat zur Detektion von tumoreigenem Granzym B genutzt.

3.2.15 Statistik

Die Bestimmung der statistischen Kenngrößen Mittelwert, Median, Standardabweichung vom Mittelwert sowie p-Wert im t-Test erfolgte mithilfe von GraphPad Prism 5. Dabei wurden im t-Test stets Proben und Kontrollen eingeschlossen, die in den einzelnen Experimenten näher definiert sind.

IV. Ergebnisse

4.1 Fallauswahl

Für die Analyse der Interaktion von Tumorzellen und T-Zellen wurden die beiden KRK-Patientinnen HROC113 und HROC285 ausgewählt. HROC113 identifiziert einen Kolontumor einer Patientin (41 Jahre), die zum Zeitpunkt der Operation zwei Tumoren aufwies, die alle Schichten des Darmepithels durchdrangen und ebenso invasiv in das angrenzende Fettgewebe eingewachsen waren (T4b N2 M0). Immuninfiltrate konnten in der immunhistochemischen Färbung bestätigt werden. Bei HROC285 (weiblich, 30 Jahre) wurde ebenso ein invasiv wachsender Tumor (T4b N2 M1) mit mäßiger Immuninfiltration diagnostiziert, der außerdem auch Lebermetasten gebildet hatte. Beide Patientinnen erhielten erst nach der Operation medikamentöse Therapien, sodass die Tumoren als unbehandelt angesehen werden können.

Da beide Patientinnen ein Lynch-Syndrom aufwiesen, das durch eine Mutation der Mismatch-Reparaturgene MLH1 (HROC113) und MSH2 (HROC285) bedingt ist, sind beide Tumoren von MSI und hoher Mutationslast gekennzeichnet. In HROC113 wurden 5.288 und in HROC285 6.373 nichtsynonyme Mutationen detektiert. Ausgehend von diesen beiden Tumoren konnten die Tumorzelllinien HROC113 und HROC285 T0 M2 etabliert werden. Zudem waren PBL kryokonserviert und standen für die T-Zell-Isolation zur Verfügung. Die Vielzahl an Mutationen sowie die konstitutive Expression von HLA I auf den Tumorzelllinien waren entscheidende Charakteristika zur Auswahl dieser Fälle für die Zielsetzung dieser Arbeit.

4.2 Charakterisierung der Tumorzellen

4.2.1 IFN γ -Stimulation

Die Tumorzellen wurden mit IFN γ behandelt, um eine verstärkte HLA-Expression zu induzieren. Dazu wurden Vorversuche durchgeführt, um die optimale Konzentration und Behandlungsdauer zu ermitteln. Dabei zeigte sich, dass längere Inkubationszeiten zwar einerseits eine stärkere Expression von HLA II-Molekülen induzierten, andererseits aber die Vitalität der Zellen beeinträchtigten (**Abbildung 5A** und **B**). Dieser Effekt war besonders deutlich bei HROC113 zu beobachten, deren Anteil lebender Zellen nach 72 h IFN γ -Behandlung auf bis zu 41 % absank. Der Anteil toter Zellen stieg bei den HROC285 T0 M2 auf maximal 33 %. Auch der Einsatz unterschiedlich hoher IFN γ -Konzentrationen wurde zuvor für 48 h getestet. Hierbei wurde beobachtet, dass eine erhöhte IFN γ -Konzentration keinen weiteren Vorteil hinsichtlich der HLA II-Expression erbrachte (**Abbildung 5C** und **D**). Zudem ging die Konzentrationserhöhung bei HROC113 erneut mit dem Absinken der Vitalität einher, wohingegen die Konzentrationsänderung bei HROC285 T0 M2 keine Veränderung der Anteile lebender und toter Tumorzellen induzierte.

Dementsprechend wurde die IFN γ -Behandlung in allen nachfolgenden Experimenten für 48 h mit 200 IE/ml IFN γ durchgeführt.

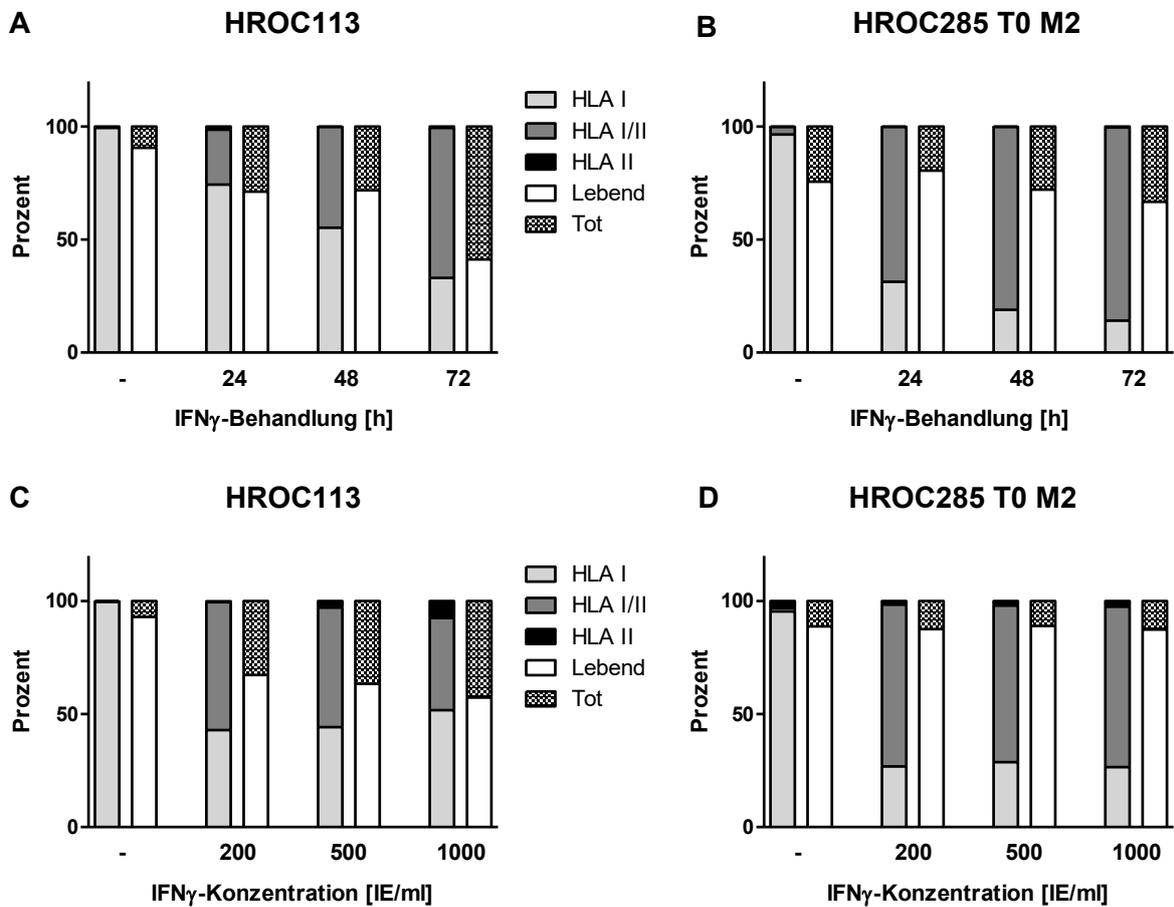


Abbildung 5: Vorversuche zur HLA-Detektion

Die Detektion der HLA I- und HLA II-Expression erfolgte durch durchflusszytometrische Messungen. (A und B) Die IFN γ -Behandlung erfolgte mit 200 IE/ml für 24, 48 oder 72 h. (C und D) Tumorzellen wurden für 48 h mit 200, 500 oder 1000 IE/ml IFN γ stimuliert. Unbehandelte Tumorzellen dienen in beiden Versuchsansätzen als Kontrolle.

Die 48-stündige IFN γ -Behandlung führte in HROC113 zu einer deutlichen Induktion von HLA II (**Abbildung 6A**). Unbehandelte HROC113 wiesen auf mehr als 97 % der Zellen ausschließlich HLA I auf, wohingegen dieser Anteil in IFN γ -stimulierten HROC113 zugunsten der HLA I/HLA II doppelt positiven Zellen auf 55 % sank ($p < 0,001$). HLA I⁺/HLA II⁺ Zellen erreichten durch die 48-stündige IFN γ -Behandlung einen Anteil von 45 % ($p < 0,001$). Zudem führte die Stimulation mit IFN γ zu einer Erhöhung des Medians der Fluoreszenzintensität (MFI). HLA II wurde in IFN γ -behandelten HROC113 mit einem dreifach höheren MFI detektiert als in den unbehandelten Tumorzellen. Dieser Effekt war in den HROC285 T0 M2 noch deutlicher zu beobachten. Hier induzierte die Interferonbehandlung eine mehr als 21-fache Steigerung des MFI von HLA II ($p = 0,002$). Auch der Anteil an HLA I/HLA II doppelt positiven HROC285 T0 M2 stieg von 2 % auf 72 % ($p < 0,001$).

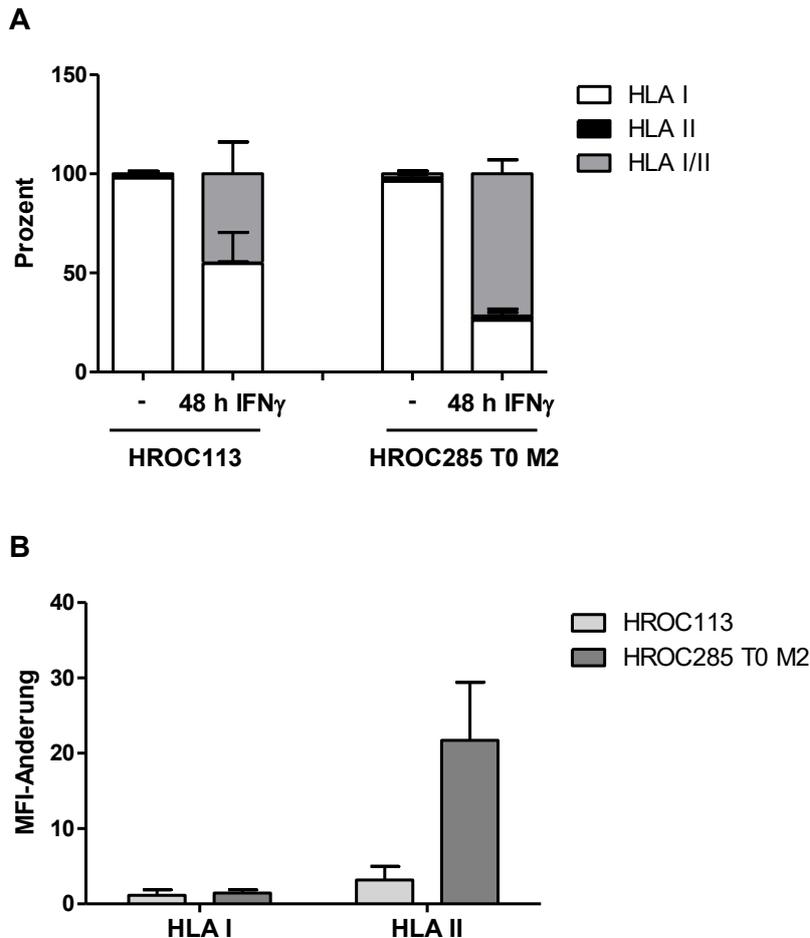


Abbildung 6: HLA-Expression auf Tumorzellen.

Die Tumorzellen wurden unbehandelt oder nach 48-stündiger Stimulation mit 200 U/ml IFN γ am Durchflusszytometer analysiert. Der Anteil HLA I- und HLA II-exprimierender Zellen wurde bestimmt (A). Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) der IFN γ -behandelten Zellen wurde in Relation gesetzt zum MFI unbehandelter Tumorzellen (B). N=3

4.2.2 Expression potenziell immunregulatorischer Proteine durch Tumorzellen

Zur näheren Charakterisierung der Tumorzellen hinsichtlich ihres Potenzials zur Immunregulation wurden verschiedene Liganden von Immuncheckpoints analysiert. Die durchflusszytometrische Analyse der Tumorzelllinien ergab, dass die Mehrheit der HROC113 und HROC285 T0 M2 PD-L1 exprimiert (**Abbildung 7A**). Die IFN γ -Behandlung der Zellen induzierte zudem eine vierfache Verstärkung der Expression, was durch die erhöhte Fluoreszenzintensität nachgewiesen wurde (**Abbildung 7B**).

Die Detektion der Oberflächenmoleküle CD80/86 ergab, dass mehr als 30 % der HROC113 den CTLA-4-Liganden präsentierten (**Abbildung 7C**). Die IFN γ -Behandlung führte zu einem leichten Anstieg der CD80/86-Expression (42 %). Dieses Protein konnte auch in HROC285 T0 M2 nachgewiesen werden, auch wenn der Anteil der CD80/86-exprimierenden Zellen hier deutlich geringer war. Im Mittel konnte das Protein auf 17 % der Tumorzellen detektiert werden. Zudem führte die IFN γ -Behandlung zu einer leichten Abnahme der Expression (13 %).

Die Bestimmung des FGL1 in Zellkulturüberständen mithilfe eines ELISA bewies, dass weder HROC113 noch HROC285 T0 M2 FGL1 sezernierten (Abbildung 7D). Dies war zudem unabhängig von der Stimulation mit IFN γ .

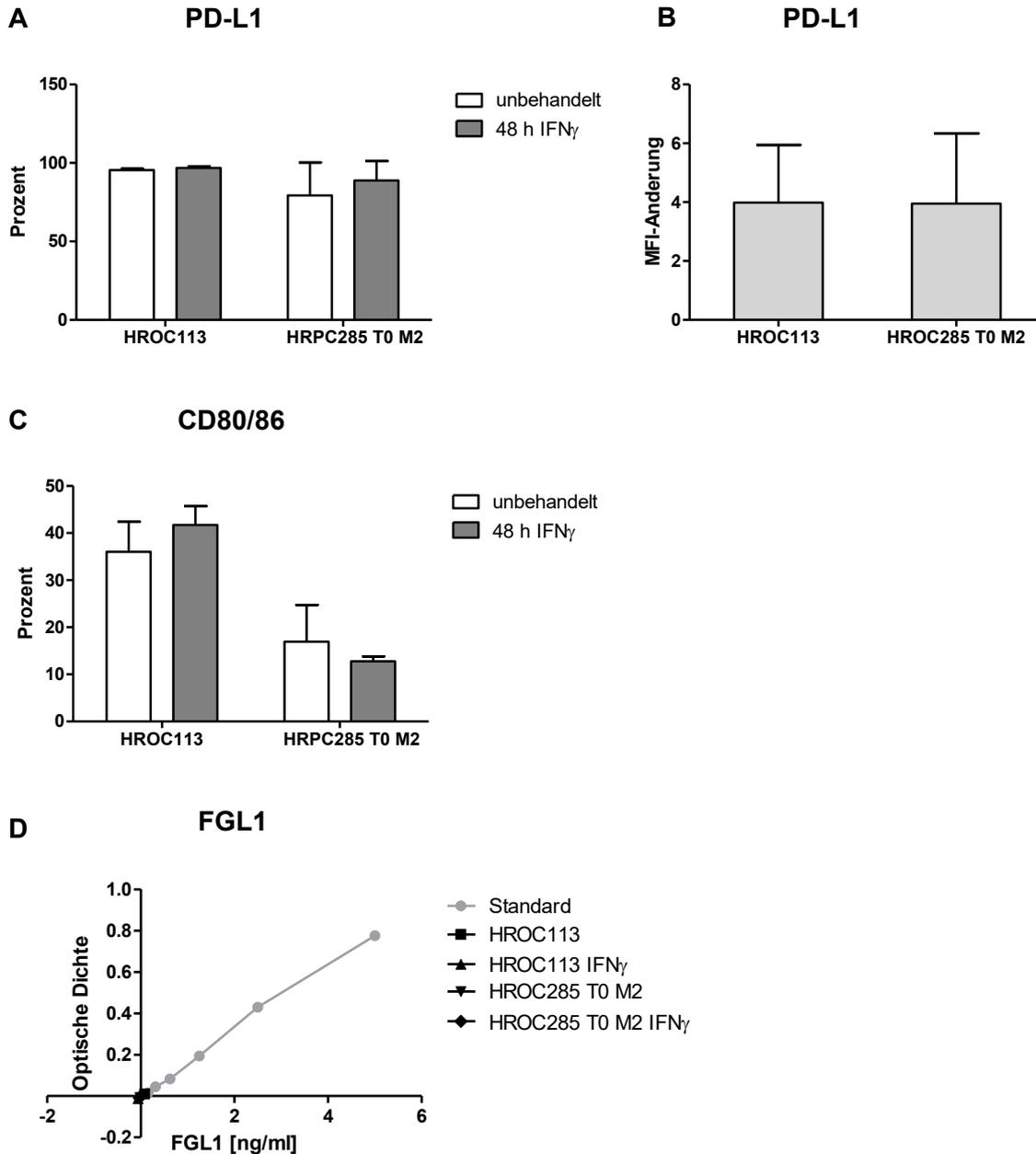


Abbildung 7: Expression immunregulatorischer Proteine

Die Tumorzellen wurden unbehandelt oder nach 48-stündiger Stimulation mit 200 U/ml IFN γ am Durchflusszytometer analysiert. Der Anteil PD-L1-exprimierender Zellen wurde bestimmt (A). Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) der IFN γ -behandelten Zellen wurde in Relation gesetzt zum MFI unbehandelter Tumorzellen (B). Außerdem wurde der Anteil an CD80/86-exprimierenden Zellen bestimmt (C) und die Konzentration an FGL1 im Zellkulturüberstand mithilfe eines ELISA gemessen. (A-C) N=3; (D) N=1.

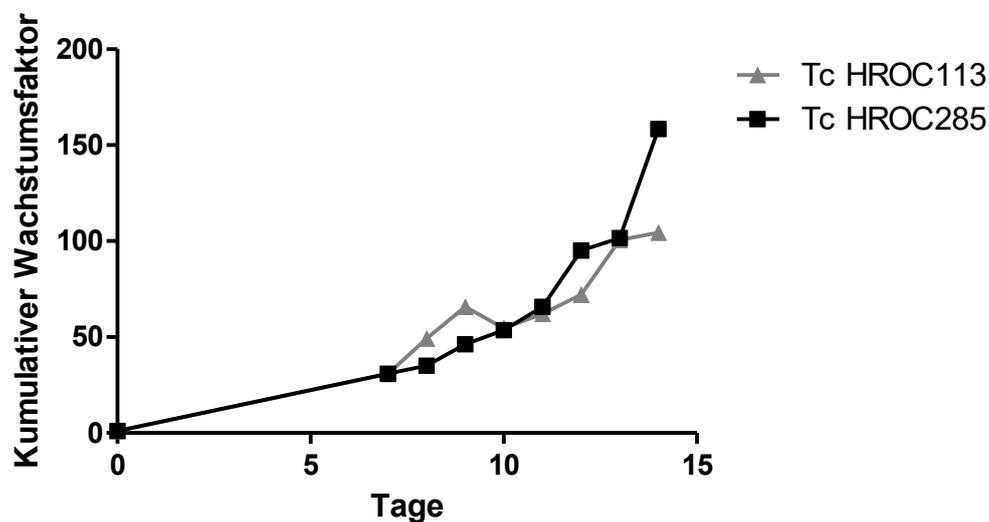
4.3 Charakterisierung der T-Zellen

4.3.1 Expansionsergebnis

Nach der Isolation von T-Zellen aus kryokonservierten PBL wurden diese mit dem „*rapid expansion protocol*“ expandiert (3.2.4). Dabei konnten aus den PBL des Patienten HROC113 $5,0 \times 10^6$ T-Zellen isoliert werden; bei HROC285 waren es $3,3 \times 10^6$ T-Zellen. Nach zweiwöchiger Expansion erreichten Tc HROC113 und Tc HROC285 kumulative Wachstumsfaktoren von 104 beziehungsweise 158 (**Abbildung 8A**).

Ausgehend von der angenommenen T-Zell-Konzentration von $2-4 \times 10^6/\text{cm}^3$ Tumorgewebe wurden für die TiTc HROC113 und TiTc HROC285 kumulative Wachstumsfaktoren von 210 und 496 erzielt (**Abbildung 8B**).

A



B

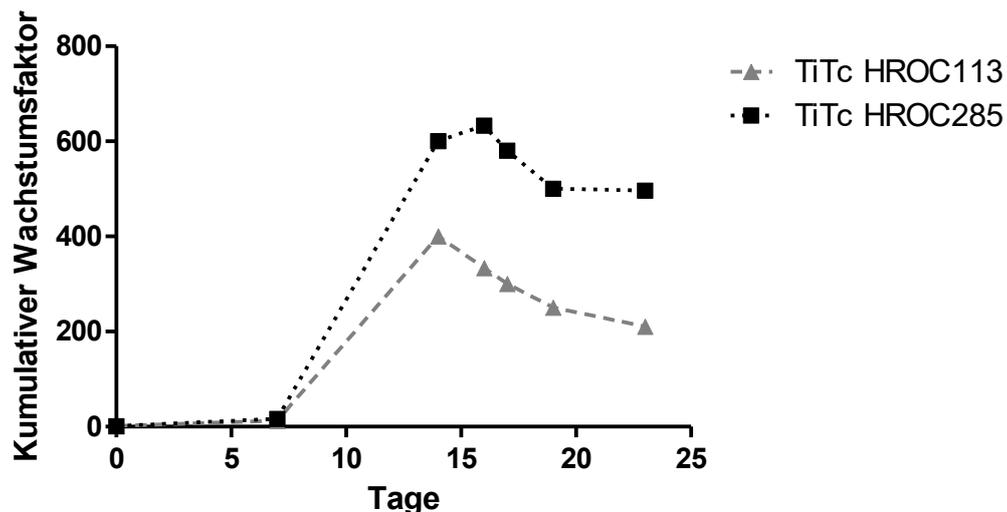


Abbildung 8: Wachstumsverhalten von T-Zellen während der Expansion.

Die Zählung der T-Zellen des peripheren Blutes (A) und tumorinfiltrierenden T-Zellen (B) erfolgte dem Protokoll entsprechend ab Tag 7 und es folgte die Berechnung des kumulativen Wachstumsfaktors (3.2.5).

4.3.2 Subpopulationen

Im Anschluss an die Expansion wurden die T-Zellen hinsichtlich ihrer Subpopulationen analysiert. Die durchflusszytometrische Analyse (**Abbildung A 1**) zeigte auf, dass sich die Verteilung der T-Zellen in den CD4⁺ und CD8⁺ Kompartimenten während der Expansion zugunsten der CD8⁺ T-Zellen verschob.

Zu Beginn der Expansion herrschten bei den Tc HROC113 CD4/CD8 doppelt positive T-Zellen (49,4 %) und CD4⁺ vor, die in naive T-Zellen (20,0 %) und stammzellähnliche T-Gedächtniszellen (28,5 %) unterschieden werden konnten (**Abbildung 9A**). Nach der 14-tägigen Expansion wurde der größte Teil der Tc HROC113 als CD8⁺ T-Gedächtniszellen identifiziert, die sich wiederum in zentrale CD8⁺ T-Gedächtniszellen (49,6 %) und stammzellähnliche CD8⁺ T-Gedächtniszellen (25,8 %) gliederten. Des Weiteren wurden auch CD4⁺ T-Gedächtniszellen detektiert, welche ebenso den zentralen CD4⁺ T-Gedächtniszellen (13,5 %) und den stammzellähnliche CD4⁺ T-Gedächtniszellen (4,5 %) zugeordnet werden konnten. Lediglich eine Minderheit der Tc HROC113 konnte als T-Effektorgedächtniszelle (CD8⁺: 2,5%; CD4⁺: 1,9%) oder T-Effektorzelle (CD8⁺: 0,5%; CD4⁺: 0,1%) identifiziert werden. Der Anteil an CD4/CD8 doppelt positiven T-Zellen sank auf 1,5 % und naive T-Zellen konnten am Ende der Expansion nicht mehr detektiert werden.

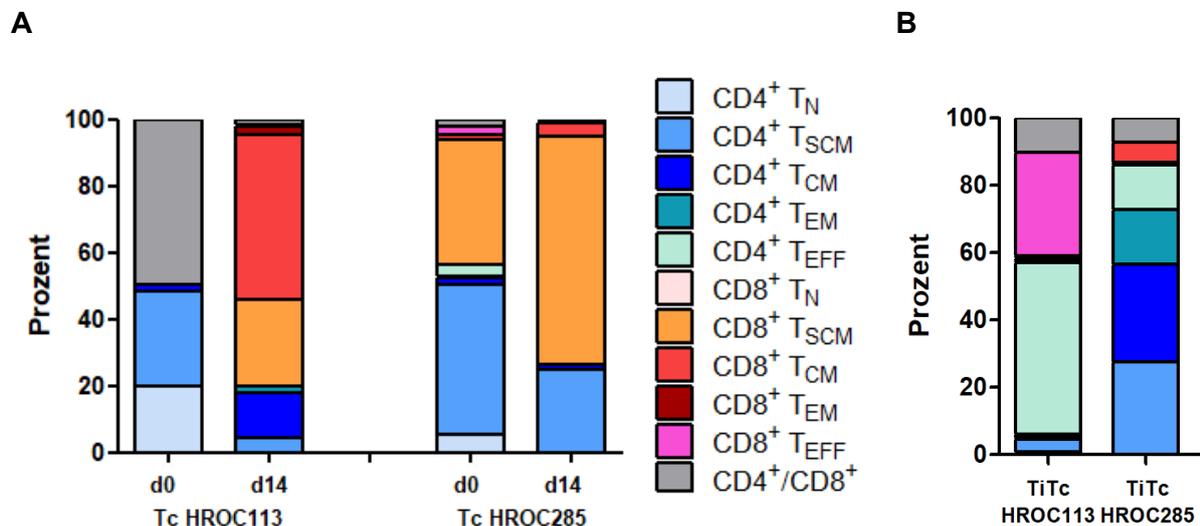


Abbildung 9: T-Zellsubpopulationen.

Die T-Zellen wurden anhand der Detektion der Oberflächenproteine CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD62L und CD95 in der Durchflusszytometrie kategorisiert: TCM: zentrale T-Gedächtniszellen (*central memory T cells*); TEFF: T-Effektorzellen; TEM: T-Effektorgedächtniszellen (*effector memory T cells*), TN: Naive T-Zellen, TSCM: stammzellähnliche T-Gedächtniszellen (*stem cell-like memory T cells*). Die durchflusszytometrische messung erfolgte an Expansionstag 0 und 14 bei den peripheren T-Zellen (A) und an Tag 14 bei den tumor-infiltrierenden T-Zellen (B).

Die aus PBL isolierten Tc HROC285 setzten sich vor der Expansion vor allem aus stammzellähnlichen CD4⁺ (45,0 %) und CD8⁺ (37,7 %) T-Gedächtniszellen zusammen (**Abbildung 9A**). Hier betrug der Anteil an CD4/CD8 doppelt positiven T-Zellen lediglich 2,1 %. Die Populationen an zentralen T-Gedächtniszellen (2,1 %), Effektorgedächtniszellen (0,3 %) und Effektorzellen (3,4 %) der CD4⁺ T-Zellen war gering. Eine ähnlich Verteilung wurde auch bei den CD8⁺ Tc HROC285 beobachtet. Die Populationen an zentralen T-Gedächtniszellen (1,5 %), Effektorgedächtniszellen (0,1 %) und Effektorzellen (2,4 %) waren nur gering ausgeprägt. Naive CD8⁺ T-Zellen wurden im Gegensatz zu den CD4⁺ naiven T-Zellen (5,4 %) nicht identifiziert.

Am Ende der Expansionsdauer zeigte die durchflusszytometrische Analyse, dass sich der Anteil an CD8⁺ stammzellähnlichen T-Gedächtniszellen beinahe verdoppelt hatte (68,4 %). Ein ebenso starker Anstieg wurde bei den CD8⁺ zentralen T-Gedächtniszellen (4,1 %) beobachtet, wohingegen die Anteile an CD8⁺ Effektorgedächtniszellen (0,1 %) und Effektorzellen (0,5 %) sanken. Unter den CD4⁺ T-Zellen war auch nach der Expansion die Subpopulation der stammzellähnlichen T-Gedächtniszellen (24,7 %) am größten. Die Anteile an zentralen T-Gedächtniszellen (1,6 %), Effektorgedächtniszellen (0,1 %) und Effektorzellen (0,1 %) sanken deutlich ab. Ähnlich wie bei den Tc HROC113 verringerte sich am Ende der Expansion der Anteil CD4/CD8 doppelt positiver T-Zellen (0,5 %) und es wurden ebenfalls keine naiven T-Zellen detektiert.

Die durchflusszytometrische Analyse der Subpopulationen erfolgte bei den TiTc HROC113 und TiTc HROC285 nur an Tag 14, da die Menge an T-Zellen zu Beginn der Expansion deutlich limitiert war. Im Gegensatz zu den peripheren T-Zellen zeigte sich hier bei beiden Proben eine Mehrheit von CD4⁺ T-Zellen unter denen T-Effektor- und T-Effektorgedächtniszellen dominierten (**Abbildung 9B**). Zudem wiesen die tumorinfiltrierenden T-Zellen beider Patientinnen verglichen mit den T-Zellen des peripheren Blutes auch nach der Expansion einen erhöhten Anteil an CD4/CD8 doppelt positiven T-Zellen (TiTc HROC113: 10,2 %; TiTc HROC285: 7,2 %) auf.

Die TiTc HROC113 wurden mehrheitlich als CD4⁺ (50,9 %) und CD8⁺ T-Effektorzellen (30,8 %) identifiziert. Die Populationen an naiven T-Zellen (CD4⁺: 0,7 %; CD8⁺: 0,4 %), stammzellähnlichen T-Gedächtnis- (CD4⁺: 3,7 %; CD8⁺: 0,8 %), zentralen T-Gedächtnis- (CD4⁺: 0,5 %; CD8⁺: 0,1 %) sowie T-Effektorgedächtniszellen (CD4⁺: 1,2 %; CD8⁺: 0,5 %) waren nur gering ausgeprägt.

Die TiTc HROC285 waren mehrheitlich CD4⁺. Hier herrschten gleichermaßen stammzellähnliche (27,4 %) und zentrale T-Gedächtniszellen (29,0 %) vor. Doch auch die Subpopulationen an T-Effektorzellen (13,2 %) und T-Effektorgedächtniszellen (16,3 %) waren deutlich ausgeprägt. Der insgesamt geringe Anteil an CD8⁺ T-Zellen gliederte sich in zentrale (6,0 %) und stammzellähnliche T-Gedächtniszellen (0,9 %).

4.3.3 Immuncheckpoints

Nach der Expansion wurden die T-Zellen hinsichtlich der Expression verschiedener Oberflächenproteine untersucht. Diese waren PD-1, CTLA-4 und LAG-3, die auf aktivierten und auch erschöpften T-Zellen exprimiert werden. PD-1/CTLA-4/LAG-3 dreifach positive T-Zellen wurden als T-Zellen mit Erschöpfungsmerkmalen klassifiziert.

Die T-Zellen des peripheren Blutes von HROC113 und HROC285 wiesen mit 9,9 % und 9,0 % geringe Anteile an PD-1/CTLA-4/LAG-3 dreifach positiven T-Zellen auf (**Abbildung 10A** und **B**). Jedoch zeigten die Mehrheit beider T-Zell-Populationen eine Expression an LAG-3 (Tc HROC113: 81,6 %; Tc HROC285: 67,0 %) und CTLA-4 (Tc HROC113: 68 %; Tc HROC285: 50,9 %), wohingegen PD-1 auf unter 20 % der Zellen nachgewiesen werden konnte.

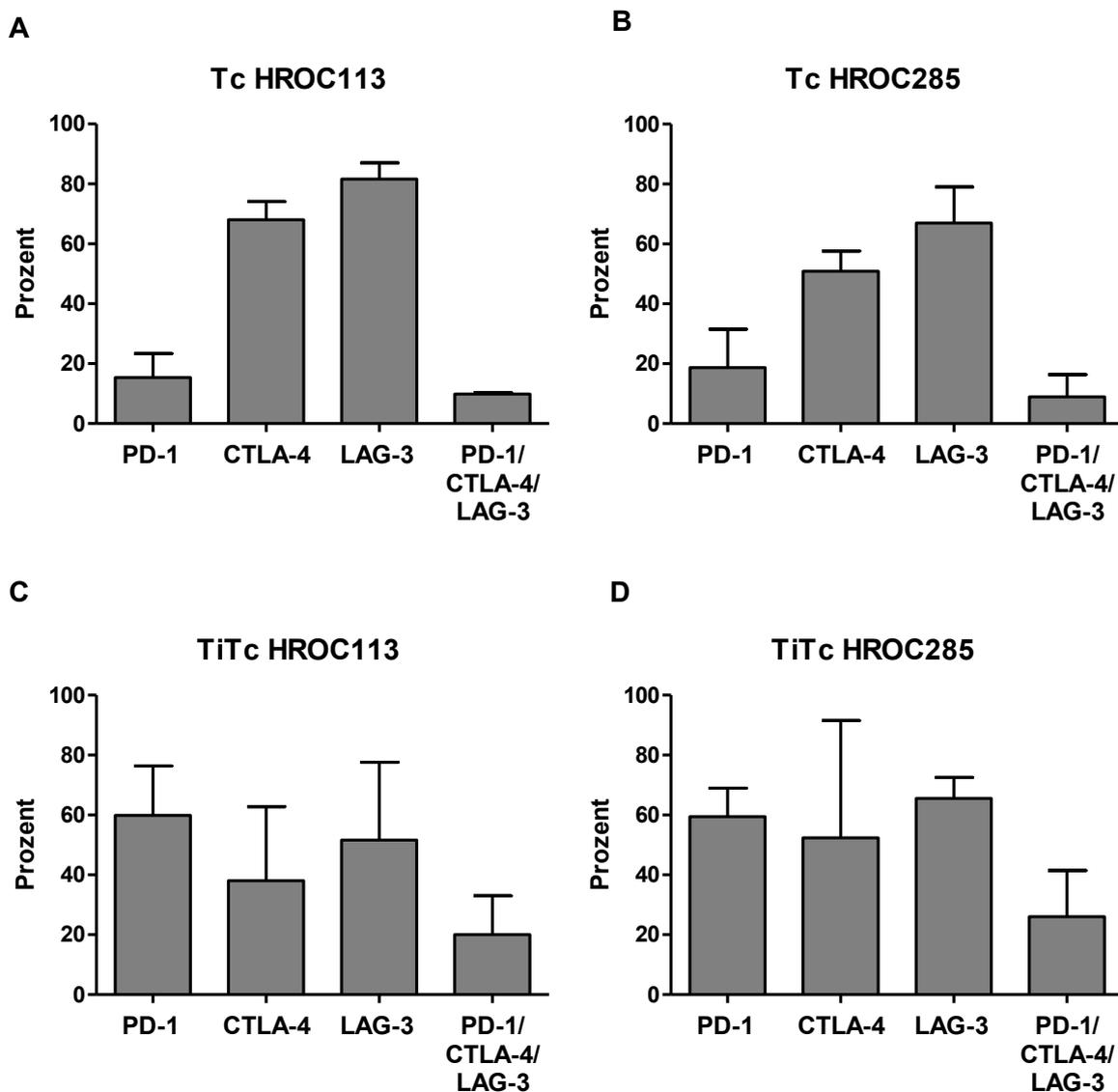


Abbildung 10: Expression von Immuncheckpoints.

Durchflusszytometrische Messungen von expandierten peripheren (A und B) und tumorinfiltrierenden T-Zellen (C und D) detektierten die Expression der Immuncheckpoints PD-1, CTLA-4 und LAG-3. (A) und (B): N=3; (C) und (D): N=2.

Auffallend ist bei der Analyse der tumorinfiltrierenden T-Zellen beider Patientinnen der deutlich erhöhte Anteil PD-1⁺ T-Zellen. So waren im Mittel 59,8 % der TiTc HROC113 und 59,5 % der TiTc HROC285 PD-1⁺. Der Anteil an CTLA-4⁺ und LAG-3⁺ war mit 38,1 % und 51,6 % bei den TiTc HROC113 geringer als in den entsprechenden expandierten peripheren T-Zellen (**Abbildung 10A** und C). Jedoch führte der hohe Anteil PD-1-exprimierender T-Zellen zu einem höheren Anteil an PD-1/CTLA-4/LAG-3 dreifach positiven T-Zellen unter den TiTc HROC113. Zwischen Tc und TiTc HROC285 zeigten sich mehr Ähnlichkeiten, doch ebenso resultierte der größere Anteil PD-1⁺ Zellen in einer erhöhten Anzahl erschöpfter T-Zellen (**Abbildung 10D**).

4.3.4 Regulatorische T-Zellen

Zur näheren Charakterisierung der T-Zell-Populationen wurde die Population an regulatorischen T-Zellen bestimmt. Dazu wurde eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt, bei der die CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ Fraktion der T-Zellen identifiziert wurde. Dabei zeigte sich, dass der Anteil an regulatorischen T-Zellen innerhalb der Tc HROC113 mit 5,2 % gering war. In den Tc HROC285, die insgesamt eine größere CD4⁺-Population aufwiesen, wurden nur 3,2 % der Zellen als regulatorische T-Zellen identifiziert.

Die Bestimmung der regulatorischen T-Zellen erfolgte auch in den tumorinfiltrierenden T-Zellen und es zeigten sich gegensätzliche Ergebnisse. Während der Anteil regulatorischer T-Zellen in den TiTc HROC113 verglichen mit den peripheren T-Zellen stark absank, wurden bei den Tc und TiTc HROC285 der gegenteilige Effekt beobachtet.

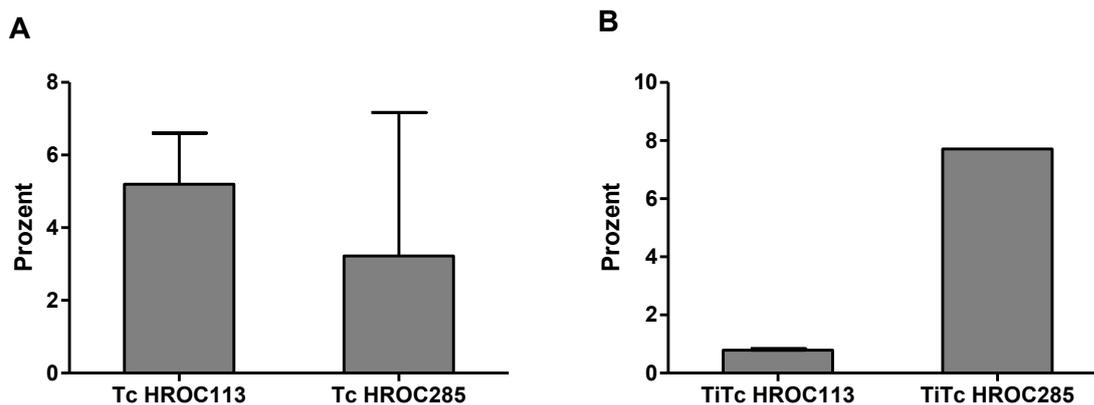


Abbildung 11: Regulatorische T-Zellen innerhalb der T-Zellpopulationen.

Durchflusszytometrische Messung des Anteils an regulatorischen T-Zellen in peripheren (A) und tumorinfiltrierenden (B) T-Zellen, die als CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ definiert wurden. (A) N=3; (B) N=1-2.

4.4 Kokultur von T-Zellen mit autologen Tumorzellen

Um zu testen, inwieweit T-Zellen durch autologe Tumorzellen aktiviert werden, wurden beide Zellpopulationen für zwei Wochen kokultiviert und anschließend ein Degranulierungstest durchgeführt. Dieser beziffert den Anteil an T-Zellen, die nach erfolgreicher Antigenerkennung die Freisetzung ihrer zytotoxischen Granula initiiert haben. Verglichen wurden dabei expandierte T-Zellen, T-Zellen, die zwei Wochen mit Tumorzellen kokultiviert wurden und T-Zellen, die unter denselben Bedingungen (Temperatur, Medium, Mediumwechsel etc.) aber ohne Kontakt zu Tumorzellen kultiviert wurden („Kontrollkultur“). Eine repräsentative Auswertung des Degranulierungstests ist in **Abbildung A 2** dargestellt.

Bei den peripheren und auch tumorinfiltrierenden T-Zellen von HROC113 zeigte sich ein Anstieg der Degranulierung durch die Kokultur verglichen mit expandierten T-Zellen (**Abbildung 12A** und **B**). Dabei war bei Tc HROC113 eine sehr große Varianz zu verzeichnen, während die verbesserte Tumorzellerkennung bei TiTc HROC113 deutlicher zu beobachten war. Jedoch war ein deutlicher Aktivitätsanstieg ebenso bei den Tc und TiTc HROC113 zu beobachten, die ohne Tumorzellen kultiviert wurden.

Die Kokultur von Tc HROC285 mit autologen Tumorzellen HROC285 T0 M2 führte hingegen zu einem gegensätzlichen Ergebnis (**Abbildung 12C**). Nach der Kokultur sowie der Kontrollkultur war die Tumorzellerkennung und Aktivität der T-Zellen vermindert. Dieser Versuch wurde ebenfalls mit den tumorinfiltrierenden T-Zellen dieser Patientin durchgeführt, doch der ohnehin sehr geringe Anteil an CD8⁺ Zellen sank im Verlauf der Kokultur weiter ab, sodass nach zwei Wochen fast keine zytotoxischen T-Zellen mehr nachgewiesen werden konnten. Durch diese äußerst geringe Anzahl an messbaren Events im Durchflusszytometer, konnte der Anteil der CD8⁺/CD107a⁺/IFN γ ⁺ T-Zellen nicht verlässlich bestimmt werden.

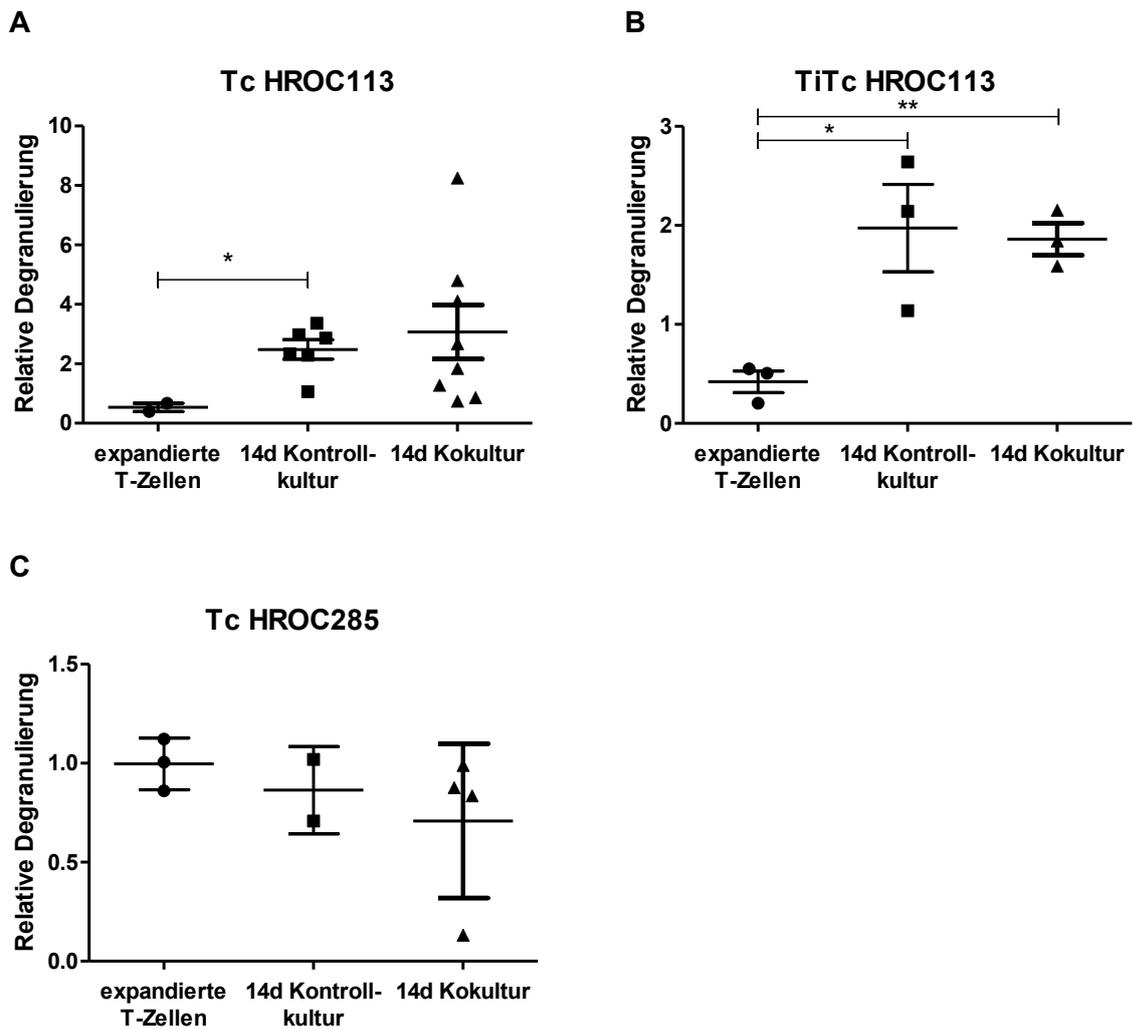


Abbildung 12: Erkennung von Tumorzellen nach der Kokultur.

Nach 14-tägiger Kokultur von T-Zellen mit autologen Tumorzellen wurde ein Degranulierungstest zur Bestimmung der Tumorzellerkennung gemessen an $CD8^+/CD107a^+/IFN\gamma^+$ T-Zellen durchgeführt. Tc HROC113 (A), TiTc HROC113 (B) und Tc HROC285 (C) wurden dafür 5 h mit den entsprechenden autologen $IFN\gamma$ -behandelten Tumorzelllinien inkubiert und anschließend am Durchflusszytometer analysiert. Die statistische Auswertung beruht auf dem t-Test: $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**). $N = 2-6$.

4.4.1 Kokultur von T-Zellen mit autologen Tumorzellen und Immuncheckpoint-inhibitoren

Um eine stärkere Aktivität der T-Zellen zu induzieren, wurden Kokulturversuche mit verschiedenen ICI durchgeführt. Durch die hohe Expression von PD-L1 auf den untersuchten Tumorzellen wurden die klinischen ICI Pembrolizumab (anti-PD-1; 20 µg/ml) und Durvalumab (anti-PD-L1; 10 µg/ml) eingesetzt. Da die Expression von CTLA-4 und LAG-3 in mindestens 50 % der Tc HROC113 sowie der Tc HROC285 nachgewiesen wurde, wurden ebenso Kokulturversuche mit Ipilimumab (anti-CTLA-4; 10 µg/ml) und einem experimentellen blockierenden Antikörper gegen LAG-3 (1 µg/ml) durchgeführt. Im Anschluss wurden ähnlich wie unter 4.4 Degranulierungsversuche durchgeführt.

Dabei war zu beobachten, dass Tc HROC113, die zuvor nicht kokultiviert wurden, den höchsten Anteil aktivierter zytotoxischer T-Zellen aufwiesen (**Abbildung 13A**). Tc HROC113 aus der Kokultur waren demnach in ihrer Aktivität gegenüber den Tumorzellen gehemmt. Auch der Einsatz der verschiedenen Immuncheckpointinhibitoren – einzeln oder in Kombination – führte nicht zu einer deutlichen Verbesserung der Tumorzellerkennung. Es konnte sogar eine signifikante Verminderung der Degranulierung detektiert werden, wenn die T-Zellen und Tumorzellen zusammen mit anti-PD-1 ($p=0,048$) oder anti-CTLA-4 ($p=0,041$) kultiviert wurden. Außerdem zeigte ein weiterer t-Test, dass die Kokultur bei HROC113 unabhängig von zugesetzten ICI zu einer verschlechterten Tumorzellerkennung führt ($p(\text{Kontrolle vs. Kokultur}\pm\text{ICI})=0,003$).

Dieser Versuch wurde ebenso mit TiTc HROC113 durchgeführt. Aufgrund der limitierten Zellzahl der tumorinfiltrierenden T-Zellen wurde hierbei nur die Kombination der ICI getestet, da diese in den peripheren T-Zellen von HROC113 die höchste Aktivität induzieren konnte. Insgesamt war die Aktivität der TiTc HROC113 hinsichtlich ihrer Degranulierung nur geringfügig verschieden zwischen kokultivierten Zellen und Kontrollen (**Abbildung 13B**). Zudem führte die Zugabe der ICI nicht zu einer verstärkten Tumorzellerkennung.

Auch der Degranulierungstest der kokultivierten Tc HROC285 zeigte auf, dass die T-Zellen der Kontrollkultur aktiviert wurden (**Abbildung 13C**). Jedoch wurde hier beobachtet, dass die Zugabe von Durvalumab, einem anti-PD-L1-Antikörper, den Anteil aktivierter zytotoxischer T-Zellen erhöhen konnte. Dabei wurde das Niveau der T-Zellen erreicht, die nicht kokultiviert wurden. Jedoch erzielte die Behandlung der Zellen mit der Kombination der ICI nicht diesen starken Effekt.

Die Versuche mit dem anti-LAG-3-Antikörper wurden aufgrund der limitierten Antikörpermenge nur einmalig durchgeführt.

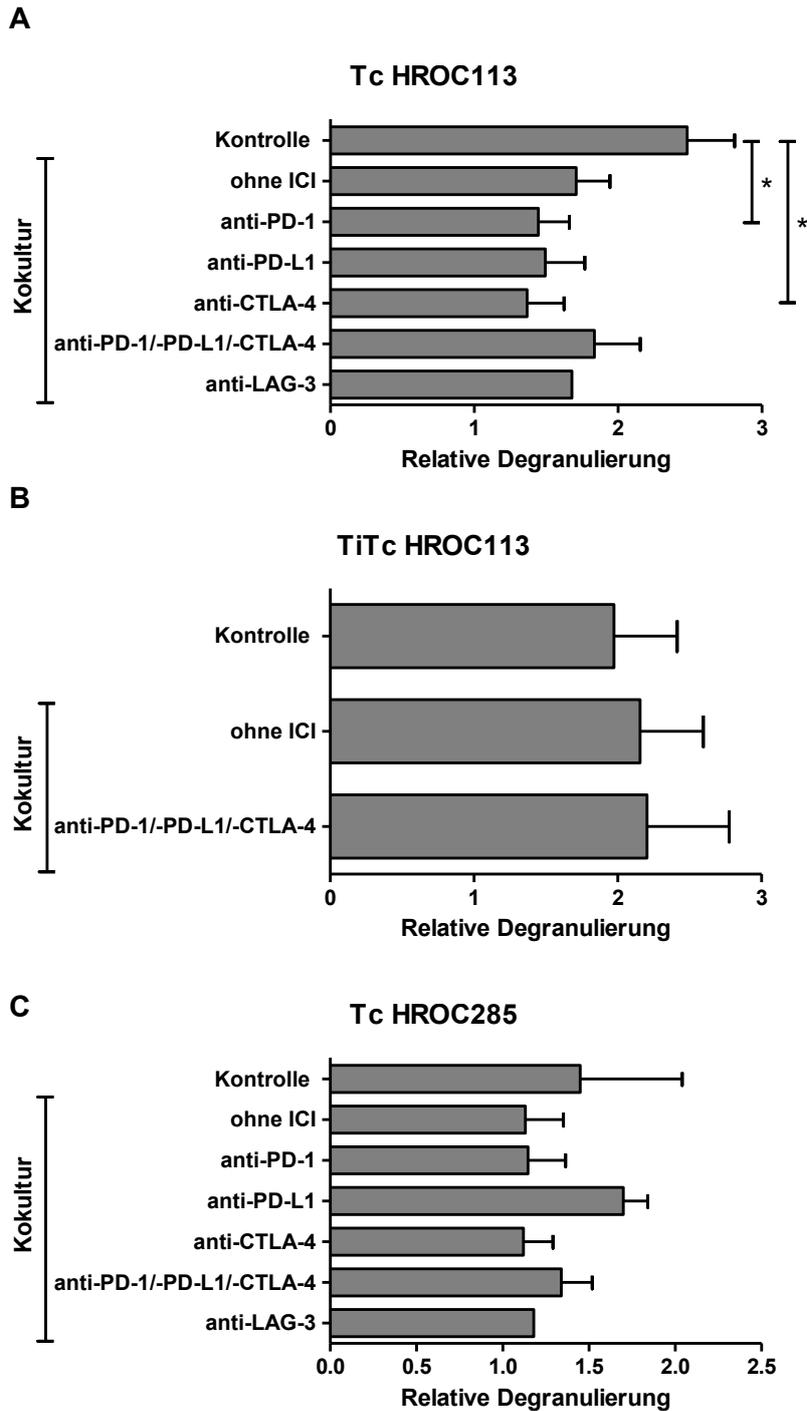


Abbildung 13: Erkennung von Tumorzellen nach der Kokultur mit Immuncheckpointinhibitoren.

Tc HROC113 (A), TiTc HROC113 (B) und Tc HROC285 (C) wurden 14 Tage mit Medium (Kontrolle), mit autologen Tumorzellen oder mit autologen Tumorzellen und den Immuncheckpointinhibitoren (ICI) anti-PD1 (20 µg/ml), anti-PD-L1 (10 µg/ml), anti-CTLA4 (10 µg/ml) oder anti-LAG3 (1 µg/ml) kultiviert. Der anschließende Degranulierungstest identifizierte CD8⁺/CD107a⁺/IFNγ⁺ T-Zellen. Die relative Degranulierung wurde durch die Normalisierung der degranulierenden T-Zellen zum Anteil CD8⁺/CD107a⁺/IFNγ⁺ in T-Zellen ohne Kontakt zu Tumorzellen bestimmt. N=1-6.

4.4.2 Zytokinbestimmung

Neben der Analyse von Proteinen, die eine Immunregulation über die Bindung an Immuncheckpoints der T-Zellen induzieren, wurden auch Zytokine aus der Tumorzell – T-Zell – Interaktion untersucht. Dafür wurden Tumorzelllinien und T-Zellen allein sowie in Kokultur für sieben Tage inkubiert und der Zellkulturüberstand wurde für die Analyse der sezernierten Zytokine verwendet. Der Kokultur wurden zudem teilweise die ICI Pembrolizumab (20 µg/ml), Ipilimumab (10 µg/ml) und Durvalumab (10 µg/ml) zugesetzt. T-Zellen wurden als Gesamtpopulation eingesetzt oder als CD4⁺- beziehungsweise CD8⁺-Teilpopulation, um subpopulationsspezifische Reaktionen identifizieren zu können. Die Kokultur erfolgte mit direktem Zellkontakt der verschiedenen Zelltypen oder in räumlicher Trennung durch einen Zellkulturmembraneinsatz (3.2.11). Mithilfe des MACSPlex Cytokine 12 Kit konnte die Konzentration der folgenden Zytokine bestimmt werden: GM-CSF, IFN α , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-17A, und TNF α (**Abbildung A 3**).

In den untersuchten Proben wurden sechs der zwölf Zytokine nachgewiesen. Diese waren GM-CSF, IL-5, IL-6, IL-17a sowie IL-2 und IFN γ . Da die beiden letztgenannten für die Stimulation der Zellen eingesetzt wurden, erfolgte ein Ausschluss dieser aus der nachfolgenden Analyse. Die Messwerte der übrigen Zytokine lagen unterhalb des Detektionslimits.

Die höchste Zytokinkonzentration wurde bei IL-5 gemessen. Hier wurden bis zu 5 ng/ml bei HROC113 und 0,9 ng/ml bei HROC285 detektiert (**Abbildung 14** und **Abbildung 15**). Dabei zeigte sich bei den Ansätzen beider Patientinnen eine ähnliche Verteilung. Die IL-5-Konzentration war jeweils am höchsten, wenn der Zellkulturüberstand von T-Zellen ohne Tumorzellen gemessen wurde. Hier war zu beobachten, dass die IL-5-Sekretion verstärkt bei CD8⁺ (HROC113: 4200 pg/ml; HROC285: 900 pg/ml) verglichen mit CD4⁺ T-Zellen (HROC113: 3200 pg/ml; HROC285: 300 pg/ml) detektiert wurde. Der Unterschied zwischen kokultivierten Zellen mit und ohne ICI war nur gering. Außerdem konnte auch in den Überständen der Kokultur mit Membraneinsätzen eine IL-5-Konzentration von 2000 pg/ml bei HROC113 sowie 500-600 pg/ml bei HROC285 gemessen werden.

Die Messungen von IL-6 und IL-17a wiesen innerhalb der Ansätze von HROC113 ein ähnliches Muster auf. Die höchste Konzentration (IL-6: 48 pg/ml; IL-17a: 29 pg/ml) wurde jeweils im Zellkulturüberstand der CD4⁺ T-Zellen gemessen. Wurden die CD4⁺ T-Zellen mit autologen Tumorzellen kokultiviert, sanken die IL-6- (Kokultur: 18 pg/ml; Kokultur mit Einsatz: 21 pg/ml) und IL-17a-Konzentrationen ab (Kokultur: 18 pg/ml; Kokultur mit Einsatz: 26 pg/ml). Innerhalb der Gesamtpopulation sowie der isolierten CD8⁺ T-Zellen lagen die gemessenen IL-6- und IL-17a-Konzentrationen insgesamt deutlich niedriger.

Die verstärkte Sekretion von IL-6 durch CD4⁺ T-Zellen wurde auch bei HROC285 beobachtet (**Abbildung 15**). Jedoch waren hier die Unterschiede weniger stark ausgeprägt.

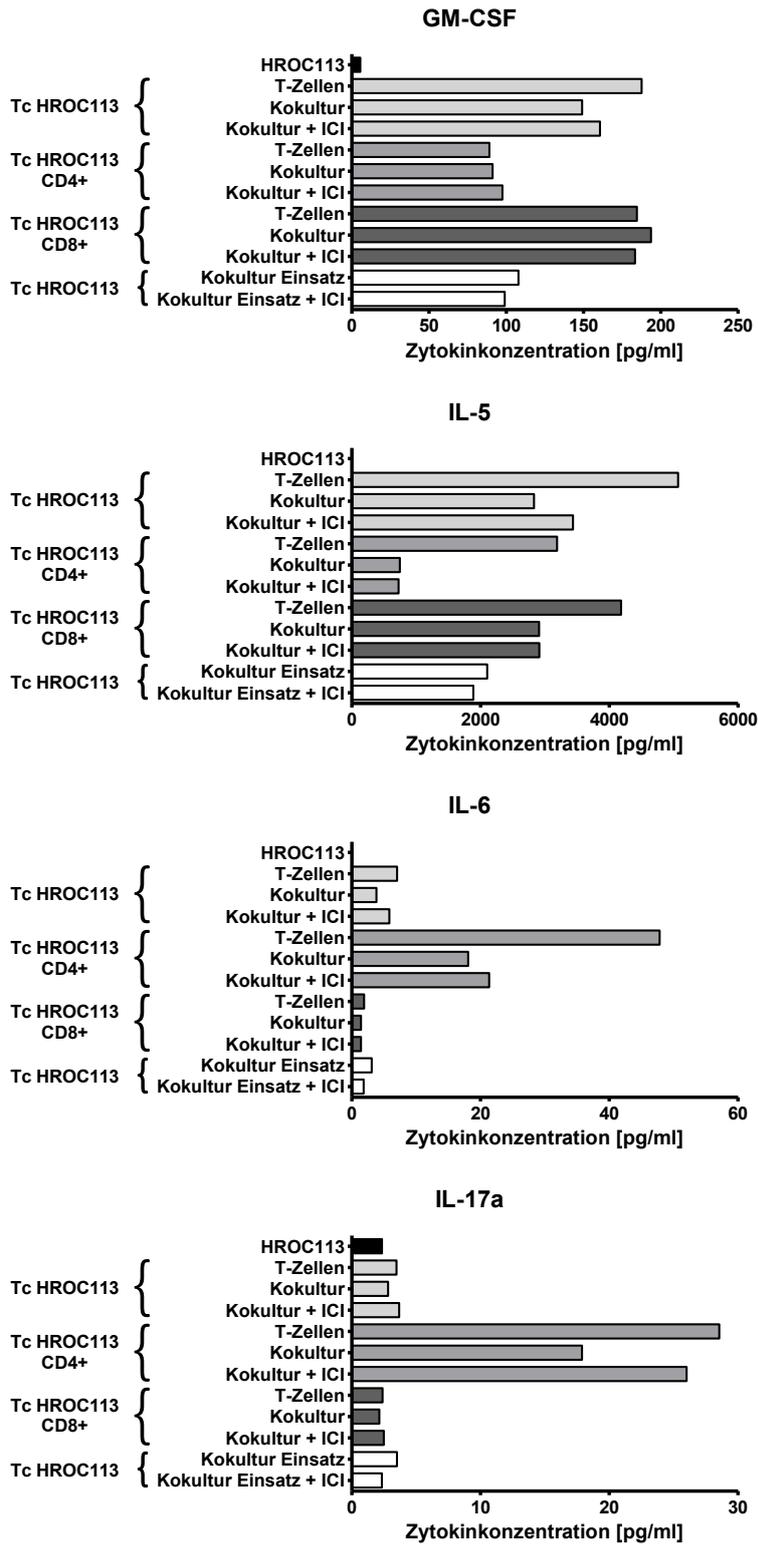


Abbildung 14: Zytokinsezernierung aus Kokulturen von HROC113 und Tc HROC113.

HROC113 und Tc HROC113 wurden allein oder in Kokultur für sieben Tage inkubiert und der Zellkulturüberstand wurde für die Analyse der sezernierten Zytokine verwendet. Dies geschah mithilfe von Membraneinsätzen für die Zellkultur oder in direktem Kontakt im Well und teilweise unter Zugabe von Immuncheckpointinhibitoren (ICI). Die Zytokindetektion erfolgte mit dem MACSPlex Cytokine 12 Kit am FACSVerse und die Berechnung der Zytokinkonzentration erfolgte anhand der Kalibrierung mit Herstellerstandards.

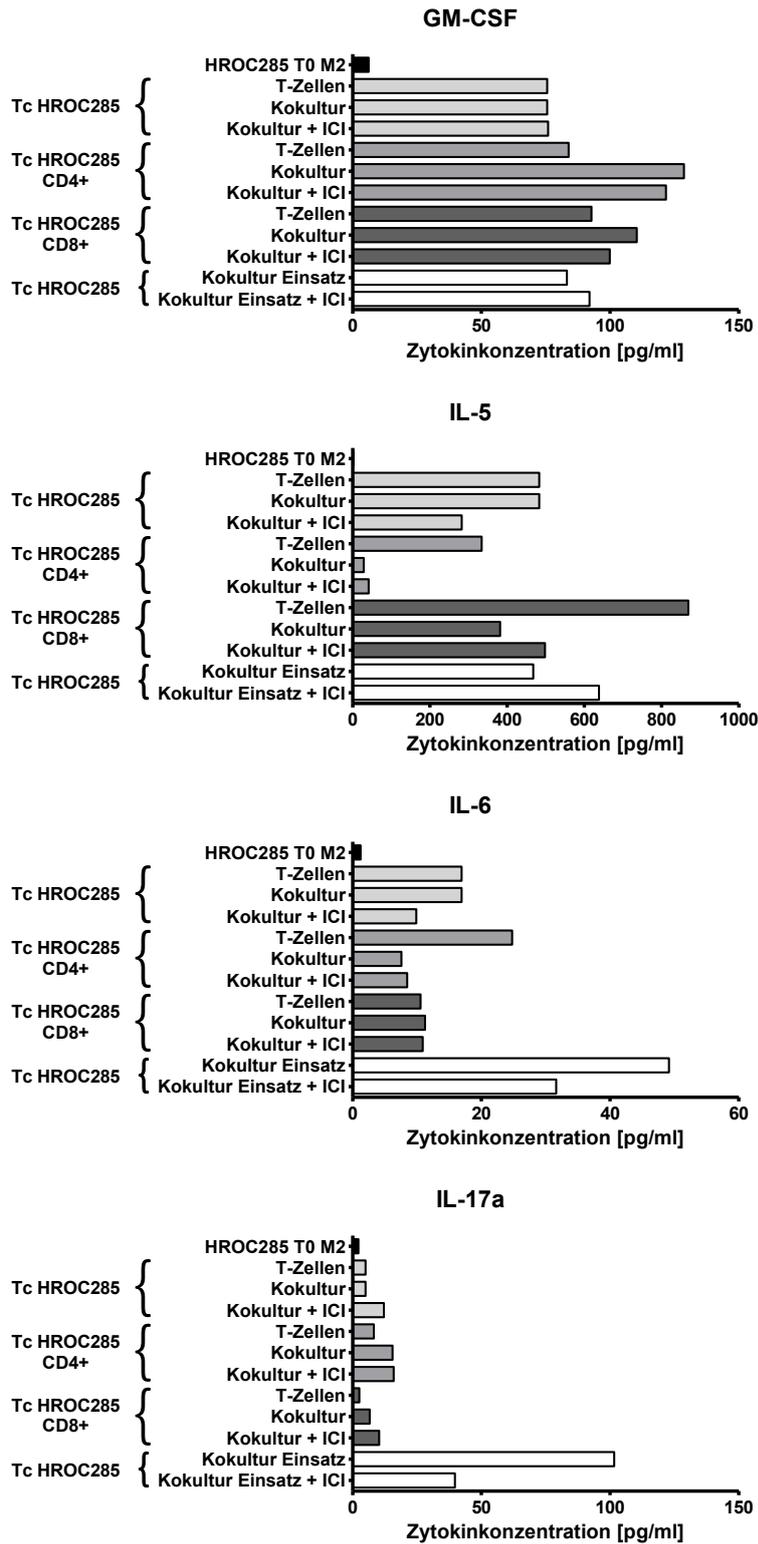


Abbildung 15: Zytokinsekretion aus Kokulturen von HROC285 T0 M2 und Tc HROC285

HROC285 T0 M2 und Tc HROC285 wurden allein oder in Kokultur für sieben Tage inkubiert und der Zellkulturüberstand wurde für die Analyse der sezernierten Zytokine verwendet. Dies geschah mithilfe von Membraneinsätzen für die Zellkultur oder in direktem Kontakt im Well und teilweise unter Zugabe von Immuncheckpointinhibitoren (ICI). Die Zytokindetektion erfolgte mit dem MACSplex Cytokine 12 Kit am FACSVerse und die Berechnung der Zytokinkonzentration erfolgte anhand der Kalibrierung mit Herstellerstandards.

Bei IL-17a waren die gemessenen Zytokinkonzentrationen zwischen den Überständen der verschiedenen T-Zell-Populationen noch geringer (3-16 pg/ml). Jedoch konnten in den Überständen der Kokultur mit Membraneinsätzen deutlich höhere Konzentrationen der beiden Interleukine gemessen werden. Zudem zeigten sich hier deutliche Unterschiede durch die Zugabe der ICI. So konnte eine IL-6-Konzentration von 49 pg/ml detektiert werden während diese in der Kokultur mit ICI nur 32 pg/ml betrug. Die Sezernierung von IL-17a unterschied sich noch deutlicher. Hier wurden 101 pg/ml in der Kokultur mit Membraneinsatz gemessen, wohingegen nur 40 pg/ml nach der Zugabe von ICI nachgewiesen werden konnten.

Die gemessenen Konzentrationen an GM-CSF wiesen innerhalb der Ansätze der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen oder der Gesamtpopulation nur geringe Unterschiede auf. In den Ansätzen von HROC285 war jedoch die GM-CSF-Konzentration in den Kokulturüberständen häufig geringfügig höher als im Überstand der T-Zell-Populationen. Außerdem unterschieden sich beide Patientenansätze im Verhältnis der GM-CSF-Konzentration der CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den anderen T-Zell-Populationen. Während die CD4⁺ Tc HROC285 ähnlich viel GM-CSF wie die Gesamtpopulation an T-Zellen oder die CD8⁺ T-Zellen sezernierten, konnte in den Überständen von CD4⁺ Tc HROC113 deutlich weniger GM-CSF nachgewiesen werden als in den anderen Zellkulturüberständen dieses Patienten.

Zusammenfassend konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass die Tumorzellen in Abwesenheit der T-Zellen kaum zur Zytokinsezernierung beitragen. Andererseits führt die Kokultur von T-Zellen mit autologen Tumorzellen häufig zu einer Abnahme der Zytokinkonzentration verglichen mit der T-Zell-Kultur. Vor allem in den Kokulturversuchen mit Membraneinsätzen von HROC285 zeigte sich, dass auch ohne direkten Kontakt zwischen Tumorzellen und T-Zellen die Zytokinsekretion stark verändert werden kann. Die Zugabe von ICI zur Kokultur veränderte die Zytokinzusammensetzung des Zellkulturüberstands nicht merklich.

Alle identifizierten Zytokine gehören zur Klasse der proinflammatorischen Zytokine und eine Sekretion antiinflammatorischer Zytokine durch die Tumorzellen konnte nicht nachgewiesen werden.

4.4.3 Kokultur von T-Zellen mit autologen Tumorzellen und HLA-Inhibitoren

Um die Aktivierung der T-Zellen durch eine HLA-gebundene Antigenpräsentation der Tumorzellen zu untersuchen, wurden Kokulturversuche mit Inhibitoren von HLA Klasse I und II durchgeführt. Die Inhibitoren verblieben die gesamte Dauer der Kultur im Medium und wurden auch dem abschließenden Degranulierungstest zugesetzt.

Die Messung der CD8⁺/CD107a⁺/IFN γ ⁺ T-Zellen ergab, dass die Tumorzellerkennung durch autologe T-Zellen unter dem Einsatz von HLA-Inhibitoren verändert wurde. Der Anteil degranulierender Tc HROC113 stieg durch Blockade der HLA-Rezeptoren an (**Abbildung 16**). Die stärkste T-Zell-Aktivierung wurde hier beobachtet, wenn eine Inhibition des HLA I-Rezeptors vorlag, doch insgesamt wiesen die Ergebnisse eine große Varianz auf. Bei Tc HROC285 kam es durch die Zugabe von anti-HLA I oder anti-HLA II zu einer Steigerung der Tumorzellerkennung, wohingegen die Kokultur mit beiden Inhibitoren den Anteil der CD8⁺/CD107a⁺/IFN γ ⁺ T-Zellen senkte.

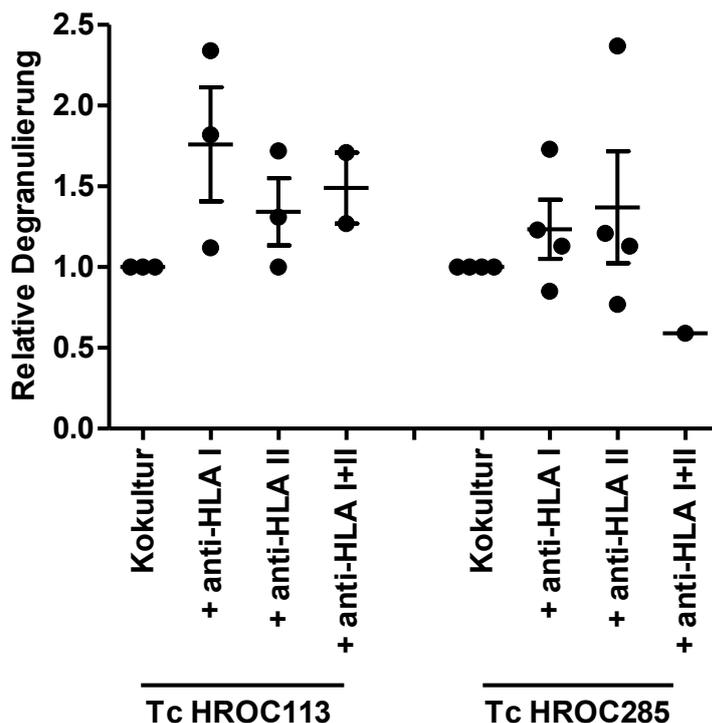


Abbildung 16: Erkennung von Tumorzellen nach der Kokultur mit HLA-Inhibitoren.

T-Zellen wurden 14 Tage mit autologen Tumorzellen und monoklonalen Antikörpern zur HLA-Blockade kultiviert. Der anschließende Degranulierungstest identifizierte CD8⁺/CD107a⁺/IFN γ ⁺ T-Zellen. Die relative Degranulierung wurde durch Normierung CD8⁺/CD107a⁺/IFN γ ⁺ der HLA-Inhibitionsversuche zu kokultivierten T-Zellen ohne blockierende Antikörper ermittelt. N=1-4.

4.5 Charakterisierung der B-LCL

Für die nachfolgende Peptidstimulation wurden B-LCL als antigenpräsentierende Zellen benötigt. Nach mehrmaligem Passagieren der transformierten B-LCL wurden diese mithilfe einer Antikörperfärbung und der nachfolgenden Messung am Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Rezeptoren und Oberflächenproteine untersucht. Dabei wurden nicht wie bei den T-Zellen subpopulationsspezifische Marker betrachtet, da deren Expression durch den Einfluss des Epstein-Barr-Virus verändert werden kann. Zudem sollten die B-LCL als antigenpräsentierende Zellen für die nachfolgenden Experimente eingesetzt werden, sodass die Funktionalität im Mittelpunkt stand. Deshalb wurde am Durchflusszytometer die Expression des antigenpräsentierenden Proteinkomplexes HLA II sowie der kostimulatorischen Oberflächenproteine CD40, CD50, CD54, CD58, CD86 und CD102 detektiert, die für eine erfolgreiche Antigenstimulation benötigt werden.

Neben HLA II wurden auch alle untersuchten kostimulatorischen Oberflächenproteine auf >95 % der B-LCL der Patienten HROC113 und HROC285 detektiert (**Abbildung 17A** und **B**). Demnach waren die etablierten B-LCL hervorragend für die *in vitro* Präsentation von Antigenen geeignet und wurden für die folgenden Versuche verwendet.

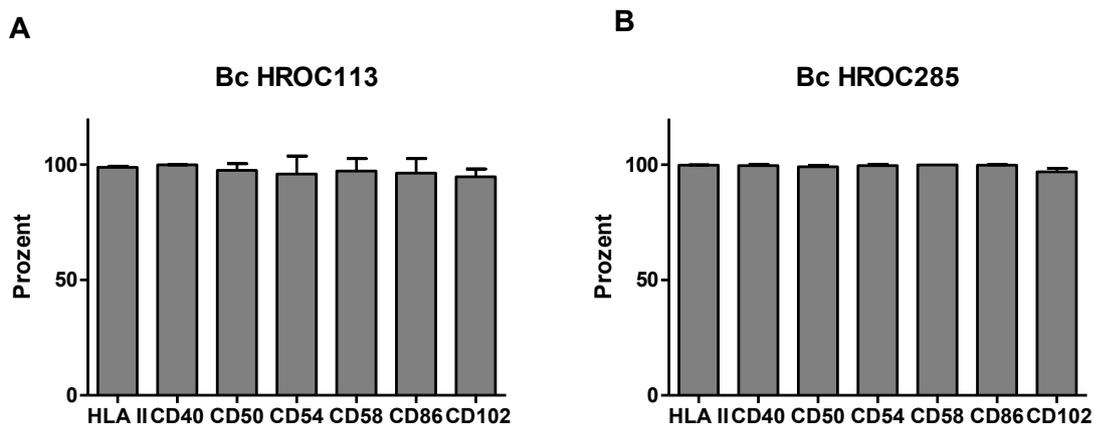


Abbildung 17: Charakterisierung der B-LCL.

Durchflusszytometrische Messung von HLA II sowie den kostimulatorischen Proteinen CD40, CD50, CD54, CD58, CD86 und CD102 auf Bc HROC113 (A) und Bc HROC285 (B). N=3-4.

4.6 Peptidstimulation der T-Zellen

4.6.1 Identifizierung von tumorspezifischen Antigenen

Um eine stärkere Aktivierung der T-Zellen zu erzielen, sollten diese mit tumorspezifischen Antigenen stimuliert werden. Basierend auf *whole exome sequencing* Daten und Ligandomanalysen wurde eine Vielzahl an Peptidkandidaten identifiziert. Diese Analysen wurden von Kooperationspartnern der Universitäten Tübingen (Dr. Markus Löffler, Dr. Michael Ghosh und Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee) und Würzburg (Dr. Andreas Schlosser) durchgeführt.

Die Sequenzierung detektierte in HROC113 5.288 Mutationen, in HROC285 sogar 6.373, wovon jeweils mehr als 1.400 durch Insertionen oder Deletionen verursacht wurden. Es konnte jedoch keins dieser Frameshift-Peptide im Ligandom nachgewiesen werden. Insgesamt wurden im Ligandom nur drei Neoantigene identifiziert, die das Resultat von Punktmutationen waren. Diese Neoantigene wurden sowohl in IFN γ -behandelten als auch in unbehandelten Zellen identifiziert.

Die p.Arg321Trp Mutation des *IQGAP1* Gens in HROC113 resultierte im Neoantigen KMWEEVITL (Wildtyp KMREEVITL). Die p.Thr41Ala-Mutation in *CTNNB1* führte zur Translation eines zweiten Neoantigens dieser Zelllinie. Dieses wies die Aminosäuresequenz YLDSGIHSGATA (Wildtyp YLDSGIHSGATT) auf. In HROC285 T0 M2 wurde nur ein Neoantigen identifiziert, das durch eine Mutation im *TRIT1*-Gen (p.Lys66Thr) verursacht und in TVIDRKVEL (Wildtyp KVIDRKVEL) translatiert wurde. Dieses Neoantigen wurde zusammen mit dem Wildtyp im Ligandom von HROC285 T0 M2 detektiert, wohingegen in HROC113 nur die Neoantigene und keines der Wildtyppeptide vorgefunden wurde.

Neben mutierten Neoantigenen wurden auch kryptische Peptide identifiziert. Mithilfe der Software Peptide-PRISM wurden 8.564 konventionelle sowie 98 kryptische Peptide in HROC113 identifiziert. In HROC285 T0 M2 wurden mit 2.374 konventionellen und 31 kryptischen deutlich weniger Peptide detektiert.

HROC113 zeigte eine typische Verteilung der Peptide über die verschiedenen HLA-Moleküle hinweg. Die meisten konventionellen und auch kryptischen Peptide wiesen eine Bindungsaffinität zu HLA-A und HLA-B auf, wohingegen nur ein kleiner Teil HLA-C präferierte. Der Algorithmus NetMHCpan klassifizierte 9 % der Peptide als Nichtbinder. Ein vollkommen anderes Bild zeigte sich bei HROC285 T0 M2. Hier wurde ein Großteil (55 %) der Peptide als HLA-C-Binder identifiziert und auch der Anteil an Nichtbindern war mit 28 % deutlich erhöht. Obwohl beide Zelllinien in drei HLA-Allelen übereinstimmen, wurde lediglich ein Peptid (Nr. 28; **Tabelle A 1**) in beiden Proben gefunden.

Die Behandlung mit IFN γ führte in den HROC113 zu einem starken Anstieg der HLA-B-gebundenen Peptide. Dieser Effekt war bei HROC285 T0 M2 nicht zu beobachten.

Die identifizierten Peptide entstammten hauptsächlich der Translation nicht-kodierender RNA, nicht-kanonischer Leseraster und physiologisch nicht-translatierter 5'-Bereiche der RNA. Insgesamt war jedoch der Anteil kryptischer Peptide in beiden Tumorzelllinien mit 1 % gering. Während mutierte Neoantigene *per se* tumorspezifisch sind, kommen kryptische Peptide ebenso in gesundem Gewebe vor. Deshalb erfolgte ein Abgleich der identifizierten kryptischen Peptide mit dem HLA Liganden Atlas, der eine Datenbank benigner kryptischer Peptide darstellt¹⁴¹. Dabei wurden 54 der ursprünglich 128 kryptischen Peptide als benigne klassifiziert und deshalb aus den Untersuchungen ausgeschlossen. Es konnten jedoch weitere 23 Peptide in die nachfolgenden funktionellen Tests inkludiert werden, obwohl diese in der Analyse von HROC113 und HROC285 die Qualitätsparameter nicht erfüllten. Aber diese Peptide konnten sicher in anderen Ligandomdatensätzen identifiziert werden, wurden nicht als benigne klassifiziert und verfügten über Bindungsprädiktionen entsprechend der HLA-Allele der Patienten.

Somit konnten final 97 kryptische Peptide und 3 Neoantigene in die funktionellen Analysen eingeschlossen werden (**Tabelle A 1**). Für HROC113 wurden 70 tumorspezifische kryptische Peptide identifiziert, wovon 54 eine starke und 16 eine schwache Bindungsprädiktion aufwiesen. Die 28 in HROC285 identifizierten kryptischen Peptide unterteilten sich in 15 mit starker und 13 mit schwacher Bindungsprädiktion. Die kryptischen Peptide wurden entsprechend der Zelllinie und ihrer Bindungsprädiktion in Pools gemischt und für die Stimulation verwendet. Die große Anzahl an Peptiden mit starker Bindungsprädiktion in HROC113 führte zur Aufteilung dieser in zwei Pools.

4.6.2 IFN γ -Sekretion nach Peptidstimulation

Periphere und tumorinfiltrierende T-Zellen wurden mit den unter 4.6.1 beschriebenen Peptidpools für 14-28 Tage stimuliert. Dabei dienten autologe B-LCL als antigenpräsentierende Zellen. Am Ende der Stimulationsdauer erfolgte ein ELISpot zum Nachweis der IFN γ -Sekretion aktivierter T-Zellen. Dabei wurde nun die Reaktivität der T-Zellen gegen einzelne Peptide der zuvor verwendeten Pools getestet. T-Zellen, die nur mit B-LCL nicht jedoch mit Peptid inkubiert wurden, dienten als Kontrolle. Die Anzahl der Spots der Proben wurde gegen die Spotanzahl dieser Kontrolle normiert, sodass die Reaktivität der T-Zellen in einer relativen Darstellung erfolgen konnte (repräsentative Ergebnisse in **Abbildung A 4**). Ein t-Test identifizierte anschließend signifikant erhöhte Reaktivität ($p < 0.05$) zwischen Proben und Kontrolle. Insgesamt war die Reaktivität der tumorinfiltrierenden T-Zellen stärker (Mittelwert: 26 Spots/Well) als die der peripheren T-Zellen (Mittelwert: 9 Spots/Well) doch war dies auch in den Kontrollen zu beobachten, sodass die relative Reaktivität in beiden T-Zell-Populationen ähnlich war.

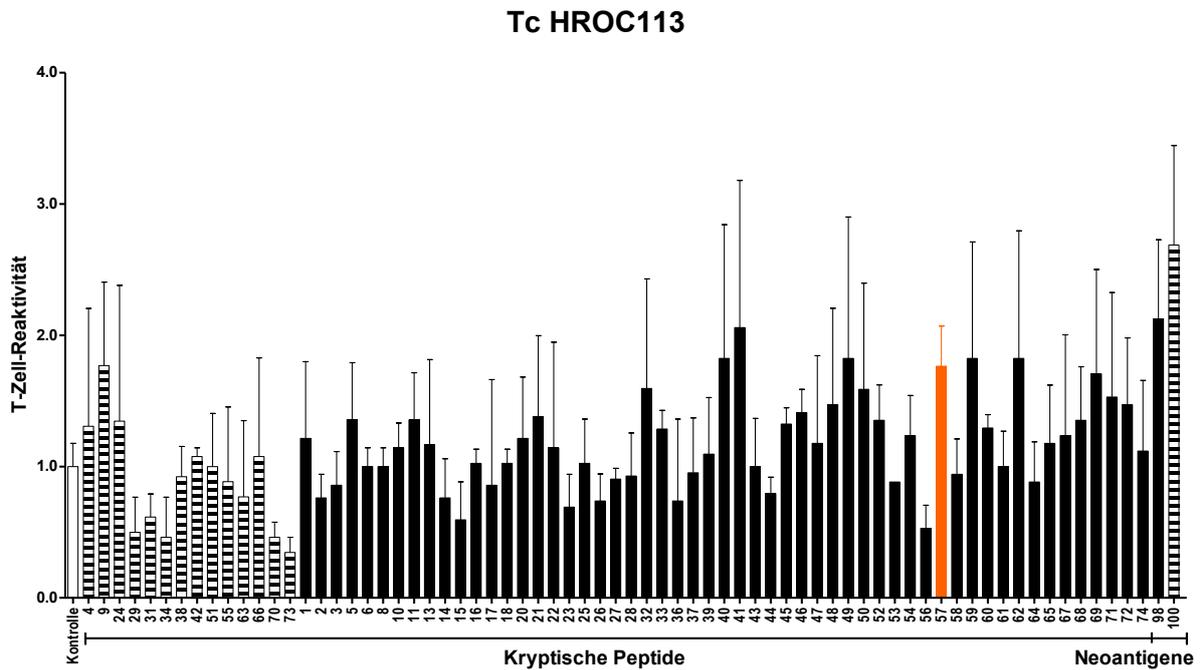
Auch wenn der Pool an kryptischen Peptiden mit schwacher Bindungsvorhersage insgesamt die schwächsten T-Zell-Antworten induzierte, konnten in den TiTc HROC113 drei Peptide identifiziert werden, die eine signifikante IFN γ -Sekretion hervorriefen (**Abbildung 18A-B**). Stimulationen mit den Peptidpools der Kategorie „starke Bindungsvorhersage“ führten ebenso zu deutlichen T-Zell-Antworten, die in den TiTc HROC113 auf 12 der 56 und in Tc HROC113 auf 1 der 56 kryptischen Peptide zurückgeführt werden konnten. Die beiden identifizierten Neoantigene induzierten ebenso eine signifikante Anzahl reaktiver peripherer T-Zellen ($p_{\text{IQGAP1neo}}=0,04$; $p_{\text{CTNNB1neo}}=0,02$) sowie tumorinfiltrierender T-Zellen ($p_{\text{IQGAP1neo}}=0,01$; $p_{\text{CTNNB1neo}}=0,04$).

In den T-Zellen des Patienten HROC285 lösten insgesamt weniger Peptide eine spezifische T-Zell-Antwort aus. Keines der Peptide aus dem Pool der kryptischen Peptide mit schwacher Bindungsvorhersage induzierte eine signifikante IFN γ -Sekretion (**Abbildung 19A-B**). Jedoch konnten zwei der 15 Peptide aus dem Pool der stark bindenden Peptide eine deutlich erhöhte T-Zell-Reaktivität induzieren. Eines dieser beiden Peptide führte sowohl in den Tc als auch in den TiTc HROC285 zu einer starken IFN γ -Freisetzung. Die Reaktivität gegen das mutierte Neoantigen war in den peripheren T-Zellen von HROC285 höher als in den TiTc HROC285 erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau.

Zusammenfassend war zu beobachten, dass die Stimulation mit Peptiden mit einer starken Bindungsvorhersage vermehrt zur Aktivierung von T-Zellen führten (21 %). Der Anteil an Peptiden mit schwacher Bindungsprädiktion, die eine signifikante T-Zell-Antwort auslösen konnten war dagegen kleiner (14 %). Eine Korrelation zwischen der Art des kryptischen Peptids (nicht-kodierende RNA, 5'-UTR, ...) und dem Erfolg der T-Zell-Stimulation war nicht zu erkennen.

Alle kryptischen Peptide, die zu einer signifikanten T-Zell-Antwort führten sind in Tabelle 12 aufgeführt. Sie wurden für jede Tumorzelllinie in einem Pool („immunogene Peptide“) zusammengeführt und in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt.

A



B

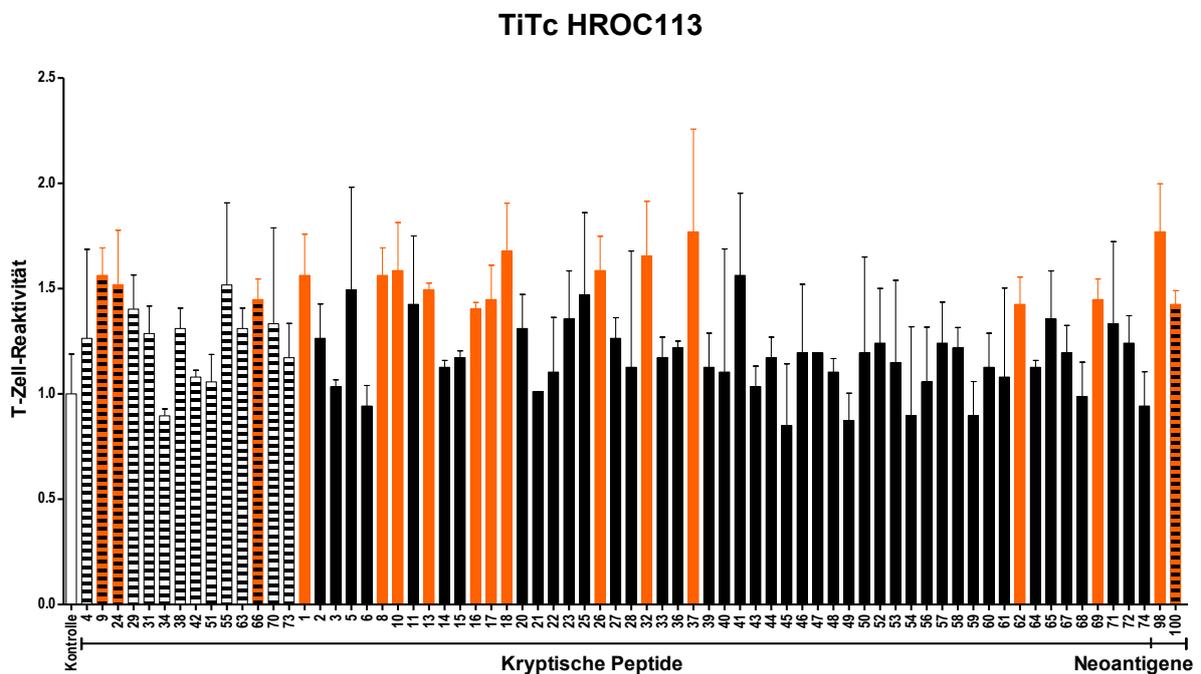
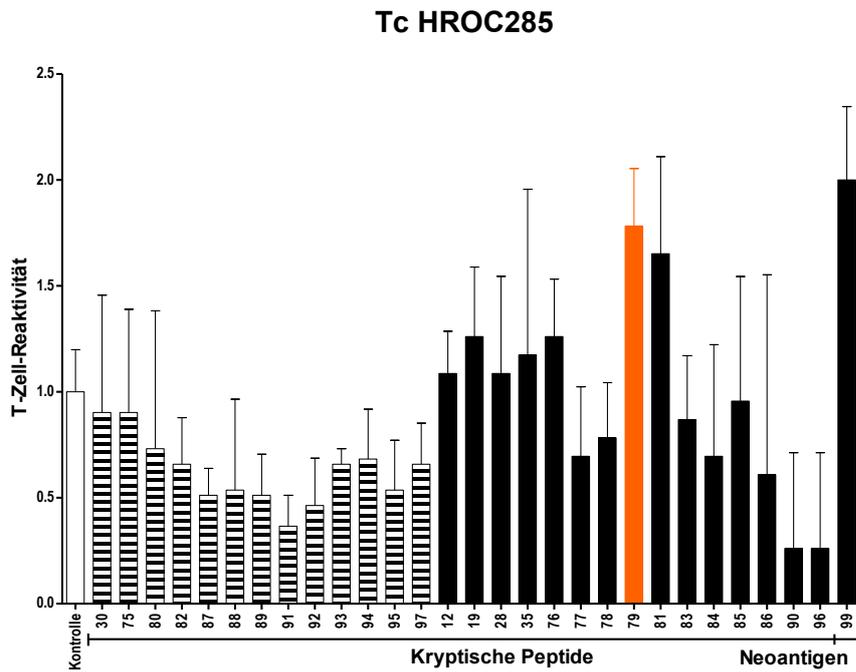


Abbildung 18: Untersuchung der IFN γ -Sekretion durch HROC113 T-Zellen nach der Stimulation mit tumorspezifischen kryptischen Peptiden und Neoantigenen.

Tc HROC113 (A) und TiTc HROC113 (B) wurden 28 beziehungsweise 14 Tage mit den entsprechenden Peptidpools stimuliert. Die Anzahl der IFN γ -Spots in den Proben wurde zur Anzahl der IFN γ -Spots der unstimulierten Kontrolle normiert. N=2-3. Die Signifikanztestung wurde mit einem T-Test durchgeführt ($p < 0,05$). Weiße Säule: Kontrolle; farbgefüllte Säulen: Peptide mit starker Bindungsvorhersage; gestreifte Säulen: Peptide mit schwacher Bindungsvorhersage; orangefarbene Säulen: signifikant erhöhte IFN γ -Sekretion.

A



B

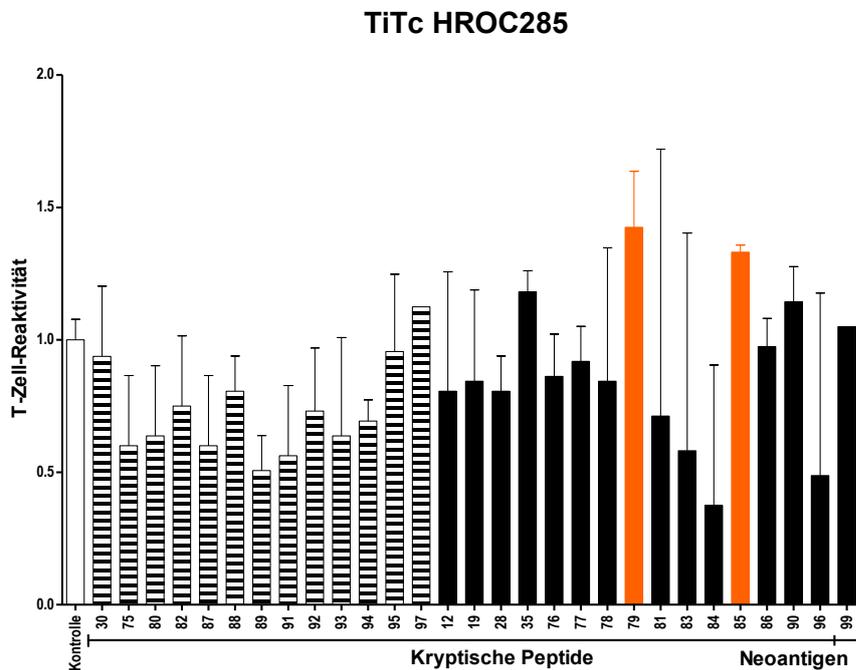


Abbildung 19: Untersuchung der IFN γ -Sekretion durch HROC285 T-Zellen nach der Stimulation mit tumorspezifischen kryptischen Peptiden und Neoantigenen.

Tc HROC285 (A) und TiTc HROC285 (B) wurden 28 beziehungsweise 14 Tage mit den entsprechenden Peptidpools stimuliert. Die Anzahl der IFN γ -Spots in den Proben wurde zur Anzahl der IFN γ -Spots der unstimulierten Kontrolle normiert. N=2-3. Die Signifikanztestung wurde mit einem T-Test durchgeführt ($p < 0,05$). Weiße Säule: Kontrolle; farbgefüllte Säulen: Peptide mit starker Bindungsvorhersage; gestreifte Säulen: Peptide mit schwacher Bindungsvorhersage; orangefarbene Säulen: signifikant erhöhte IFN γ -Sekretion.

Tabelle 12: Immunogene kryptische Peptide

Peptid	Zelllinie	Peptidsequenz	Gensymbol	Ursprung	Bindungs- prädiktion	HLA-Allel
1	HROC113	ALPEVQKQV	ATRAID	UTR5	stark	HLA-A*02:01
8	HROC113	MAALRALL	ZFYVE26	UTR5	stark	HLA-B*08:01
9	HROC113	QTELSQLLK	BTF3	UTR3	schwach	HLA-A*01:01
10	HROC113	TLKDRNFQI	CTNND1	UTR5	stark	HLA-B*08:01
13	HROC113	ETDIOMETRY	GS1-25119.4	ncRNA	stark	HLA-A*01:01
16	HROC113	NSKKRLNTL	SET	OffFrame	stark	HLA-B*08:01
17	HROC113	YSSEIWDLY	ARHGAP5	UTR5	stark	HLA-A*01:01
18	HROC113	NMKQRTERL	ARHGAP12	OffFrame	stark	HLA-B*08:01
24	HROC113	WAAPFPKLL	PRDM4	UTR5	stark	HLA-C*12:03
26	HROC113	YHSSTDSLI	CTNNB1	UTR5	stark	HLA-B*38:01
32	HROC113	MARARAVAA	METTL9	UTR5	stark	HLA-B*08:01
37	HROC113	VPLTRILTL	WARS	OffFrame	stark	HLA-B*08:01
57	HROC113	HHSDWGNIM	TRIM31	OffFrame	stark	HLA-B*38:01
62	HROC113	HHSDWGNIMW	TRIM31	OffFrame	stark	HLA-B*38:01
66	HROC113	RLATLKSTV	PLS1	UTR5	schwach	HLA-A*02:01
69	HROC113	LLDIDLDKY	RP11-624L4.1	ncRNA	stark	HLA-A*01:01
79	HROC285 T0 M2	SLNIRTPIL	ZNF146	OffFrame	stark	HLA-B*08:01
85	HROC285 T0 M2	LFDYEVRL	UHRF1	ncRNA	stark	HLA-C*04:01

OffFrame: Frameshift-Peptid resultierend aus verschobenem Leseraster während der Translation; ncRNA: nichtkodierende RNA; UTR5: nicht-translatierter Bereich am 5'-Ende der RNA;

4.6.3 Tetramerfärbung

4.6.3.1 Herstellung und Validierung des Tetramers

Die Tetramere für das TRIT1-Neoantigen wurden mit dem „Flex-T™ HLA-B*08:01 Monomer UVX“ hergestellt und im Anschluss mit dem „LEGEND MAX™ Flex-T™ Human Class I Peptide Exchange ELISA“ überprüft. In diesem Sandwich-ELISA binden Antikörper an die α -Kette und das β 2-Mikroglobulins des HLA I-Komplexes, sodass nur stabile Proteinkomplexe mit gebundenem Monomer detektiert werden. Die erfolgreiche Antikörperbindung wurde durch einen Farbumschlag messbar.

Die Validierung der Monomerbindung an das HLA I-Molekül mit dem „LEGEND MAX™ Flex-T™ Human Class I Peptide Exchange ELISA“ zeigte auf, dass eine erfolgreiche Bindung des TRIT1-Neoantigens an das HLA-B.08.01-Molekül stattgefunden hat (**Abbildung 20**). Der Mittelwert der optischen Dichte lag zwischen dem des mittleren und hohen Standard des Kits, wodurch eine mittlere Bindungsaffinität des Neoantigens an das entsprechende HLA I-Molekül nachgewiesen wurde.

Aus den validierten Monomeren wurden anschließend Tetramere generiert und diese mit den Fluorophoren PE oder APC für die nachfolgende durchflusszytometrische Messung gekoppelt.

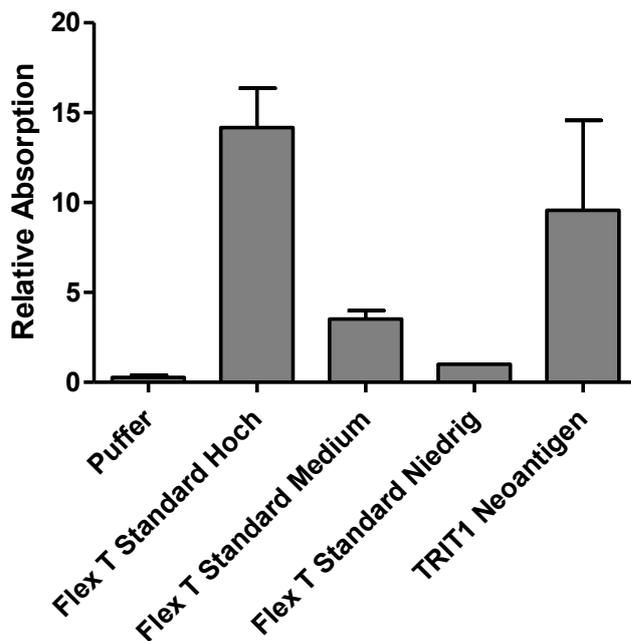


Abbildung 20: Validierung der Tetramerherstellung.

Zur Überprüfung der Bindung des Neoantigens an das HLA-B.08.01 zur Herstellung des Tetramers wurde der LEGEND MAX™ Flex-T™ Human Class I Peptide Exchange ELISA durchgeführt. Die mitgeführten Standards Hoch, Medium und Niedrig geben Aufschluss über die Bindungsaffinität des Monomers. N=2-3.

4.6.3.2 Bestimmung der neoantigenspezifischen T-Zellen

Um zu bestätigen, dass durch die Inkubation mit neoantigenbeladenen B-LCL neoantigenspezifische T-Zellen proliferierten, wurde eine Tetramerfärbung durchgeführt. Dabei wurden Tetramere eingesetzt, die die Neoantigene mit starker Bindungsprädiktion IQGAP1neo und TRIT1neo beinhalten. Der Anteil an tetramergefärbten Zellen wurde vor und nach der zweiwöchigen Stimulation mit den Neoantigenen am Durchflusszytometer bestimmt (**Abbildung A 5**).

Ein deutlicher Anstieg an IQGAP1neo-bindenden T-Zellen wurde innerhalb der Tc und TiTc HROC113 nach der Stimulation beobachtet (**Abbildung 21A-B**). Der gemittelte Anteil neoantigenspezifischer T-Zellen stieg in den Tc HROC113 von 0,23 % auf 0,83% und innerhalb der TiTc HROC113 von 0,06 % auf 0,42 %.

Deutlich geringer war die Proliferation der TRIT1-spezifischen Tc HROC285 (**Abbildung 21C**). Hier stieg der Anteil an Tc HROC285 mit dem Rezeptor für TRIT1neo nur von 0,55 % auf 0,7 %.

Dabei ist insgesamt zu erkennen, dass die T-Zellen der Replikate unterschiedlich gut auf die Neoantigenstimulation ansprechen. Besonders deutlich zeigte sich dies bei der Bestimmung der neoantigen-spezifischen TiTc HROC285 (**Abbildung 21D**). In einem Versuchsansatz wurden mehr als 5 % der T-Zellen als TRIT1-spezifisch identifiziert, während in einem weiteren Replikat keine neoantigen-spezifische Proliferation induziert werden konnte.

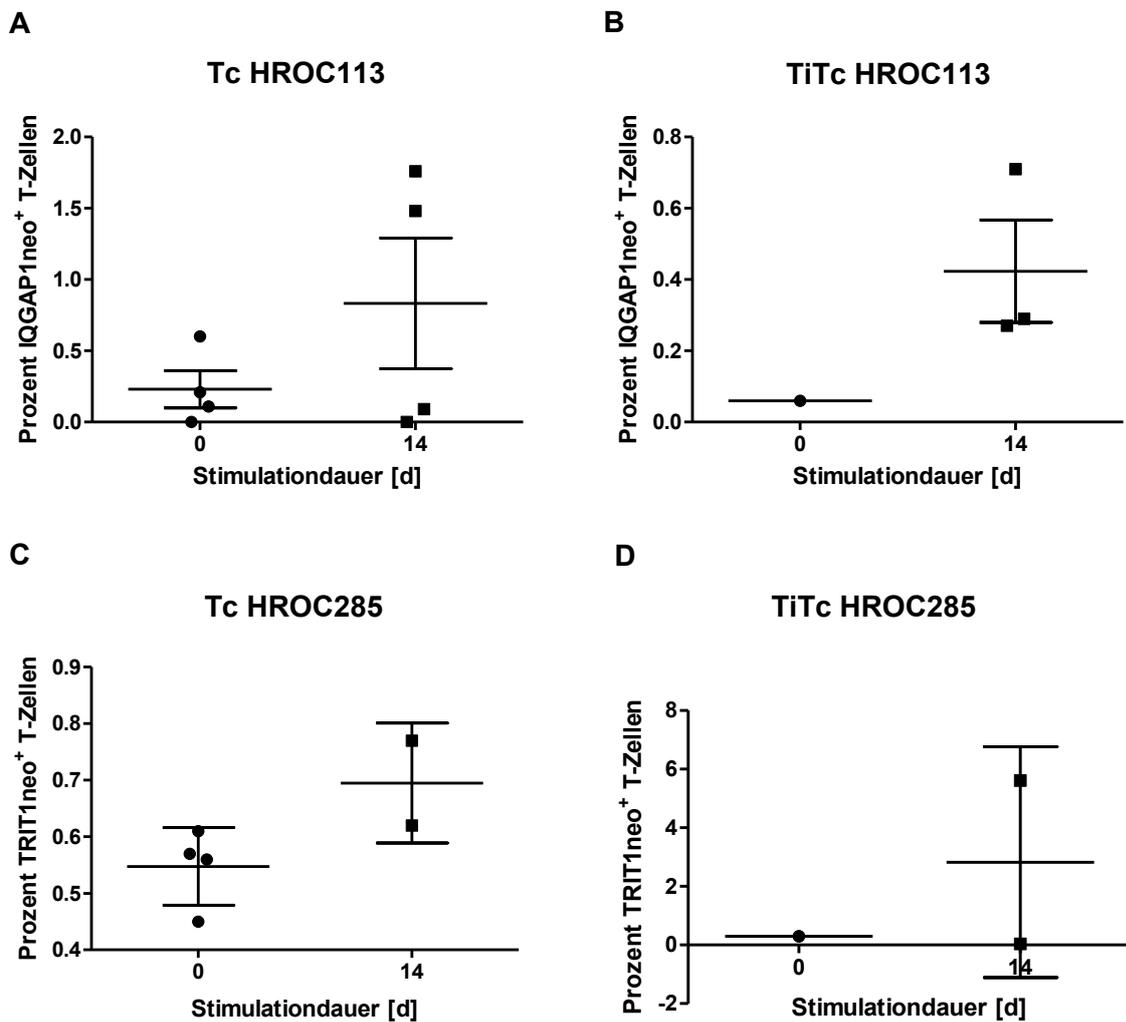


Abbildung 21: Tetramerfärbung.

Die Tc und TiTc HROC113 (A-B) sowie die Tc und TiTc HROC285 (C-D) wurden vor und nach der 14-tägigen Neoantigenstimulation anhand einer Tetramerfärbung auf ihre Neoantigen-Rezeptorspezifität geprüft. N=1-4.

4.6.4 Tumorerkennung nach Peptidstimulation

Nach 14-tägiger Stimulation der peripheren und tumorinfiltrierenden T-Zellen mit den immunogenen kryptischen Peptiden sowie den Neoantigenen wurde ein Degranulationstest zum Nachweis des Erkennens autologer Tumorzellen durchgeführt. Dabei zeigten die peptidstimulierten Tc HROC113 im Vergleich zu nicht-stimulierten T-Zellen eine verstärkte Degranulierung, die durch einen signifikant erhöhten ($p=0,0008$) Anteil an $CD8^+/CD107a^+/IFN\gamma^+$ T-Zellen bestimmt wurde (**Abbildung 22A**). Ein im Mittel ebenso starker Effekt war auch nach der Stimulation mit den Neoantigenen zu beobachten, doch führte eine große Streuung dazu, dass das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. Deutlichere Effekte konnten aber im Degranulationstest der stimulierten TiTc HROC113 und der entsprechenden Tumorzelllinie beobachtet werden (**Abbildung 22B**). Hier verdoppelte sich der Anteil der $CD8^+/CD107a^+/IFN\gamma^+$ T-Zellen nach der Stimulation mit den immunogenen kryptischen Peptiden ($p=0,0025$). Nach zweiwöchiger Stimulation mit den zwei Neoantigenen zeigte der Degranulationstest der TiTc HROC113 sogar einen noch höheren Anteil an degranulierenden zytotoxischen T-Zellen ($p=0.0051$).

Die Stimulation mit immunogenen kryptischen Peptiden führte auch bei Tc HROC285 zu einer verstärkten Tumorzellerkennung (**Abbildung 22C**). Dabei zeigten peptidstimulierte Tc HROC285 einen fünffach höheren Anteil an $CD8^+/CD107a^+/IFN\gamma^+$ T-Zellen im Vergleich zu unstimulierten Tc HROC285 ($p=0.0226$). Im Gegensatz dazu führte die Stimulation mit dem Neoantigen dieses Tumors nicht zu einer verbesserten T-Zell-Antwort. Der ohnehin geringe Anteil an $CD8^+$ T-Zellen innerhalb der TiTc HROC285 reduzierte sich während der Stimulation noch weiter, sodass im Degranulationstest keine verlässliche Aussage über $CD8^+/CD107a^+/IFN\gamma^+$ T-Zellen getroffen werden konnte. Hier wurde die Analyse auch auf $CD8^+$ T-Zellen ausgedehnt, doch auch in dieser Population wurden keine degranulierenden T-Zellen identifiziert.

Der Degranulationstest wurde auch unter Einsatz von ICI durchgeführt. Dazu wurden die peptidstimulierten T-Zellen für den Degranulationstest zusammen mit Pembrolizumab (anti-PD1; 20 $\mu\text{g/ml}$) und Ipilimumab (anti-CTLA4; 10 $\mu\text{g/ml}$) ausgesät und 5 h inkubiert. Es wurde jedoch keine weitere Steigerung der T-Zell-Aktivität im Vergleich zu den Proben ohne ICI gemessen.

Insgesamt konnte hier gezeigt werden, dass die Stimulation von T-Zellen mit tumorspezifischen Peptiden zu einer deutlich gesteigerten Erkennung der autologen Tumorzellen führt. Dabei konnten sowohl kryptische Peptide als auch mutierte Neoantigene eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung induzieren. Doch der Anteil tumorreaktiver T-Zellen lag im Mittel bei lediglich 2 %.

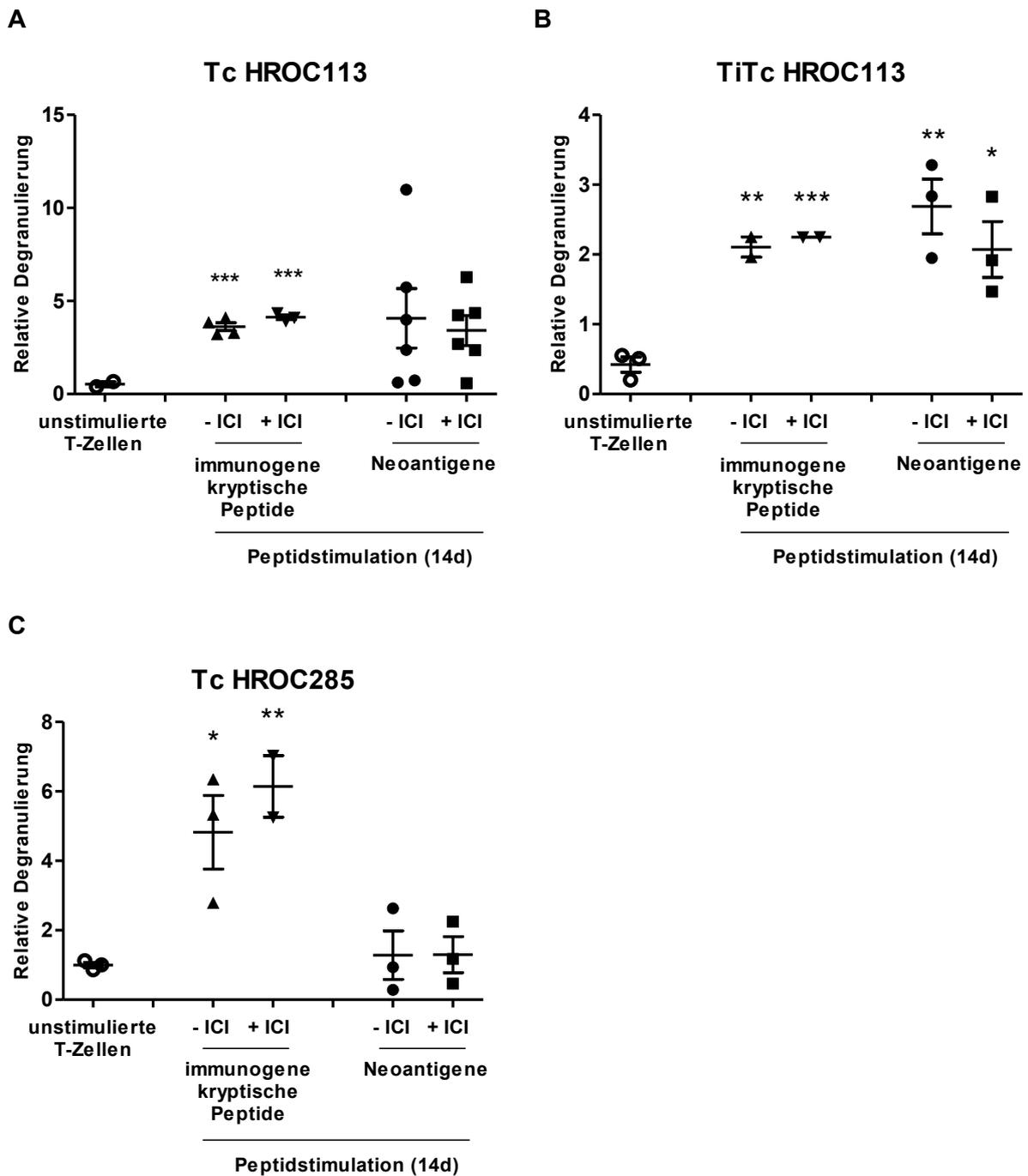


Abbildung 22: Degranulationstest nach Stimulation mit ausgewählten Peptiden.

Die Tc HROC113 (A), TiTc HROC113 (B) und Tc HROC285 (C) wurden zwei Wochen entweder mit einem Pool immunogener kryptischer Peptide oder ihren entsprechenden Neoantigenen stimuliert. Im Anschluss erfolgte der Degranulationstest mit IFN γ -behandelten autologen Tumorzellen teilweise unter Zugabe von Immuncheckpointinhibitoren (ICI) und der Anteil an CD8+/CD107a+/IFN γ + T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die relative Degranulation ergab sich aus der Normierung des Anteils an dreifach-positiven T-Zellen der Proben zum Anteil dreifach-positiver T-Zellen, die nicht mit Tumorzellen inkubiert wurden. Die statistische Auswertung beruht auf dem t-Test: p<0,05 (*); p<0,01 (**); p<0,001 (***) N=3-6.

4.7 Zytotoxizität peptidstimulierter T-Zellen

Da in vorausgegangenen Zytotoxizitätstests, die auf der Färbung von Tumorzellen mit Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) und Propidiumiodid oder der Messung der transepithelialen elektrischen Impedanz beruhten, kein Effekt der T-Zellen auf die Tumorzellen beobachtet wurde, wurde der GranToxiLux-Test durchgeführt. Dieser dient der Überprüfung der Granzym-B-abhängigen Zytotoxizität stimulierter T-Zellen. Mithilfe eines Granzym-B-spezifischen Substrats kann die intrazelluläre Aktivität des Enzyms bestimmt werden, welches durch die Freisetzung zytotoxischer Granula aus aktivierten T-Zellen in die Zielzellen gelangte. Die Inkubation von stimulierten T-Zellen mit autologen Tumorzellen unter Zugabe des Granzym-B-spezifischen Substrats resultierte in einer sehr hohen Granzym-B-Aktivität in den Tumorzellen. Dabei gab es nur sehr geringe Unterschiede zwischen Tumorzellen, die mit unstimulierten T-Zellen, und denen, die mit peptidstimulierten T-Zellen inkubiert wurden (**Abbildung A 6**).

Eine anschließende Analyse der Tumorzellen offenbarte, dass diese eine ebenso hohe Granzym-B-Aktivität aufwiesen, auch wenn sie keinen Kontakt zu T-Zellen hatten. Dabei zeigte sich, dass die Mehrheit der Tumorzellen (>90 %) auch unabhängig von einer IFN γ -Stimulation, das Granzym-B-spezifische Substrat spalten konnten (**Abbildung 23**). T-Zellen, die als Positivkontrollen mitgeführt wurden, wiesen geringfügig niedrigere Werte auf. Ein Vergleich des MFI ergab, dass IFN γ -stimulierte sowie auch unbehandelte HROC113 und HROC285 T0 M2 mindestens den MFI der Positivkontrollen erreichten, diesen meist sogar deutlich überschritten.

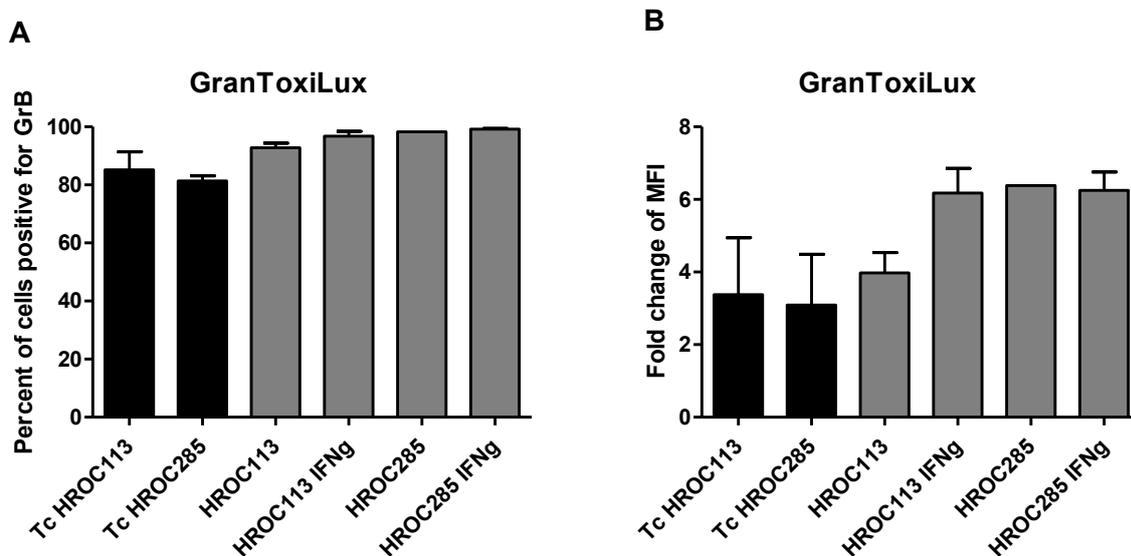


Abbildung 23: Bestimmung der Granzym-B-Aktivität in T-Zellen und Tumorzellen.

Mithilfe des Granzym-B-spezifischen Substrats des GranToxiLux-Tests wurde die Granzym-B-Aktivität in T-Zellen und Tumorzellen nachgewiesen. Die Tumorzellen wurden dazu teilweise 48 h mit 200 IE/ml IL-2 behandelt. Die Aktivität wurde einerseits als Anteil positiver Zellen (A) sowie mittels des MFI (B) dargestellt. N=1-3.

4.8 Immunevasion durch PI-9-Expression

Um die Ergebnisse des GranToxiLux-Tests der Tumorzelllinien zu validieren, wurde eine durchflusszytometrische Messung des Proteinaseinhibitors-9 (PI-9) durchgeführt. PI-9 liegt physiologisch in Granzym-B-exprimierenden Zellen vor, zum Beispiel T-Zellen, um eine intrazelluläre Enzymaktivität von Granzym B zu inhibieren. Deshalb wurden die Tc HROC113 und Tc HROC285 als Positivkontrollen mitgeführt.

Die Messung zeigte eine deutliche Expression von PI-9 in den Tumorzelllinien. In mindestens 40 % der Zellen konnte PI-9 gemessen werden (**Abbildung 24**). HROC113 und HROC285 T0 M2 wiesen eine ähnlich große Population auf, in denen PI-9 nachgewiesen werden konnte. Auch eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu ungefärbten Zellen konnte gemessen werden. Die IFN γ -Behandlung hatte keinen Einfluss auf die PI-9-Detektion.

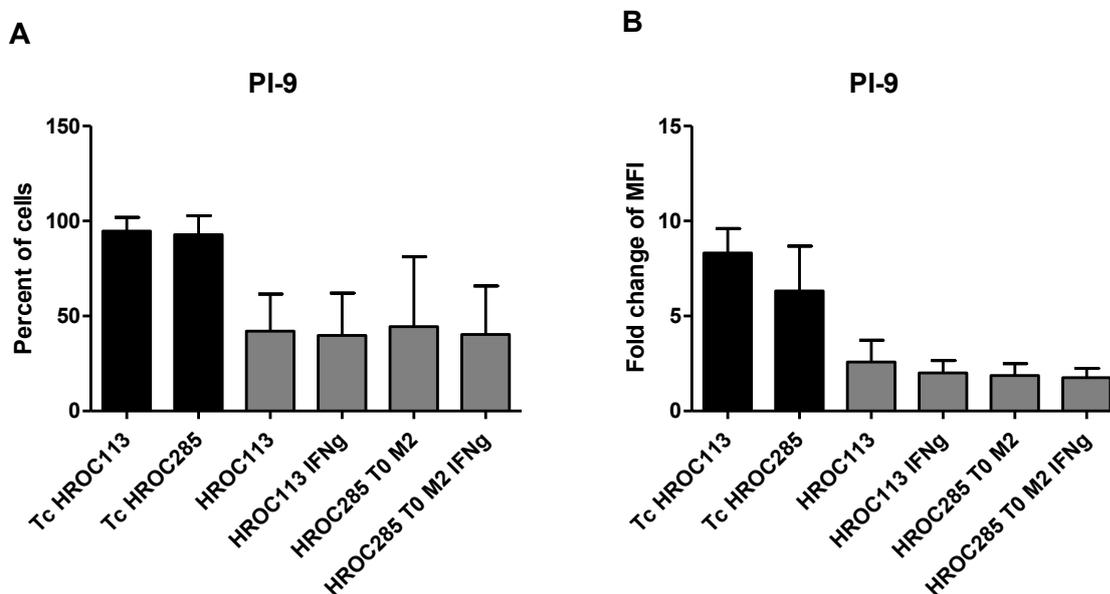


Abbildung 24: Bestimmung der PI-9-Expression in T-Zellen und Tumorzellen.

Der Nachweis von PI-9 erfolgte durch eine durchflusszytometrische Messung. Die Tumorzellen wurden dazu teilweise 48 h mit 200 IE/ml IL-2 behandelt. Die Aktivität wurde einerseits als Anteil positiver Zellen (A) sowie mittels des MFI (B) dargestellt. N=3.

4.9 Bestimmung der PI-9-Expression in weiteren Zelllinien

Um zu überprüfen, ob diese unerwartet starke PI-9-Expression auf die beiden untersuchten Tumorzelllinien beschränkt ist, folgte eine Untersuchung von weiteren KRK-Zelllinien. Diese wurden entsprechend ihres Mikrosatellitenstatus ausgewählt, sodass MSI Zelllinien und Zelllinien mit stabilen Mikrosatelliten (MSS) gegenübergestellt werden konnten. Die Tumorzelllinien HROC87 T0 M2, HROC131 T0 M3 und HROC159 T2 M4 wurden ebenso wie HROC113 und HROC285 T0 M2 aus KRK mit MSI etabliert. Als MSS-Zelllinien wurden HROC60, HROC183, HROC239 T0 M1 und HROC447 hinsichtlich ihrer PI-9-Expression untersucht.

Dabei zeigte der Vergleich aller MSI- und MSS-Zelllinien auf, dass der Anteil an Tumorzellen mit PI-9-Expression in den MSI-Zelllinien signifikant ($p=0,028$) höher war als in den MSS-Zelllinien (**Abbildung 25A-C**). Dies war ebenso in den IFN γ -behandelten Tumorzellen zu beobachten ($p=0,015$). Die 48-stündige Inkubation mit IFN γ beeinflusste den Anteil PI-9-positiver Zellen nur in vereinzelt Zelllinien.

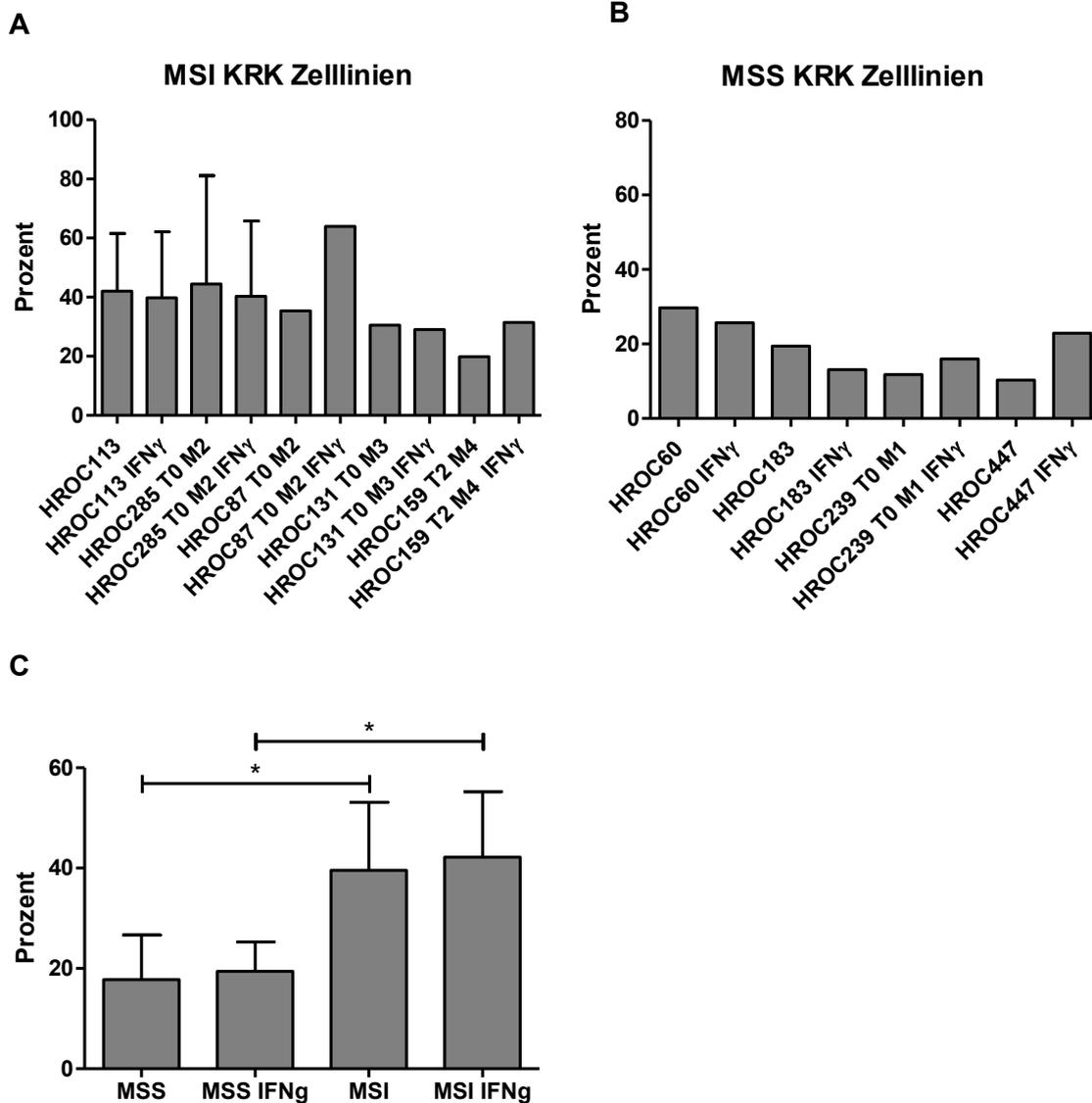


Abbildung 25: PI-9-Expression in MSI- und MSS-Zelllinien

Der Nachweis von PI-9 erfolgte durch eine durchflusszytometrische Messung. Die Tumorzellen wurden dazu teilweise 48 h mit 200 IE/ml IL-2 behandelt. Die Tumorzellen wurden entsprechend ihres Mikrosatellitenstatus ausgewählt (A: MSI-Zelllinien; B: MSS-Zelllinien). In (C) sind die Ergebnisse aus (A) und (B) zusammengefasst. Die statistische Auswertung beruht auf dem t-Test: $p<0,05$ (*).

V. Diskussion

Bereits 1909 postulierte Paul Ehrlich, dass der Organismus mit Schutzvorrichtungen ausgestattet sein muss, die das Wachstum entarteter Zellen („aberrierender Keime“) eindämmen, die im Verlauf der komplexen fetalen und postfetalen Entwicklung vielfach entstehen¹⁴². Stünden diese dem Organismus nicht zur Verfügung, würden Karzinome in einer „geradezu ungeheuerlichen Frequenz“ auftreten¹⁴². Darüber hinaus begründete Paul Ehrlich die Vision der „Zauberkugel“, einem Medikament, das gezielt Krankheitserreger oder erkrankte Zellen beseitigt, ohne gesundes Gewebe zu schädigen. Doch noch heute werden in der Erstlinientherapie neoplastischer Erkrankungen zumeist Chemotherapeutika angewendet, die ein immenses Nebenwirkungsprofil aufweisen und damit ganz und gar nicht dem Ideal der „Zauberkugel“ entsprechen. Eine Stärkung der körpereigenen Immunüberwachung hingegen, mit optimaler Unterscheidung zwischen Tumorzellen und gesunden Körperzellen, könnte diese Vision erfüllen. Das Konzept der Immuntherapie und besonders der Tumorzellvaksinierung fokussiert genau diesen Anspruch und ist einer der Hoffnungsträger in aktuellen Tumortheraeutikentwicklungen.

In diesem hochaktuellen und herausfordernden Themengebiet ist auch die vorgelegte Arbeit angesiedelt. Ziel dieser war es, die Interaktion von T-Zellen und autologen Tumorzellen näher zu charakterisieren und diese antitumoral zu modifizieren.

5.1 Charakterisierung der Tumorzellen

Die Basis dieser Arbeit bildeten die ausgewählten Tumorzelllinien, die aus Tumorproben der KRK-Patientinnen HROC113 und HROC285 etabliert wurden. Mit einer Vielzahl an Mutationen aufgrund der MSI und der konstitutiven Expression von HLA I verfügten sie über ideale Voraussetzungen einer erfolgreichen Immuntherapie. Obwohl bereits eine Korrelation zwischen MSI und HLA II-Expression nachgewiesen werden konnte¹⁴³, wiesen die ausgewählten Tumorzelllinien diese erst nach IFN γ -Behandlung auf. IFN γ führt durch die Rezeptorbindung zur Aktivierung der Januskinase 1 und 2 und diese zur Phosphorylierung von STAT1, das dann in den Nukleus gelangt und an Promotorbereiche IFN γ -responsiver Gene bindet³⁷. Darunter ist auch CIITA, das mithilfe des HLA II regulatorischen Faktors (RFX1) die Expression von HLA II reguliert³⁷. MSI KRK, in denen die HLA II-Expression nicht durch IFN γ induziert werden kann, weisen zumeist Inaktivierungen in CIITA oder RFX1 auf^{42,144}. Die Expression von HLA II wurde bereits mit einer verbesserten Prognose und gutem Ansprechen auf ICI korreliert¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ und Mutationen in den Januskinasen wurden mit einer primären Resistenz gegen anti-PD-1 assoziiert¹⁴⁸. Demnach wurde die IFN γ -Behandlung in den experimentellen Ansätzen dieser Arbeit einerseits dazu genutzt, um die Immunantwort der autologen T-Zellen zu verbessern. Andererseits wurde dadurch auch die Tumorumgebung während der Eliminierungsphase nachgebildet, die von sezerniertem IFN γ geprägt ist (1.2).

Da bereits eine Korrelation zwischen MSI und PD-L1-Expression nachgewiesen wurde^{149,150}, erfolgte eine durchflusszytometrische PD-L1-Detektion auf den ausgewählten Tumorzelllinien. Dabei zeigte sich, dass der Immuncheckpointligand auf allen untersuchten Tumorzellen gemessen werden konnte. Außerdem induzierte die 48-stündige Behandlung mit IFN γ eine weitere Expressionssteigerung, die durch die Erhöhung des MFI belegt wurde. Dieser Effekt der IFN γ -abhängigen PD-L1-Expression wurde bereits in verschiedenen soliden Tumoren nachgewiesen^{151,152}. Dies verschlechtert zwar einerseits die antitumorale Immunantwort durch die Aktivitätshemmung zytotoxischer T-Zellen, bietet andererseits jedoch die Chance zur Intervention mit anti-PD-1/anti-PD-L1 ICI.

Die Expression von CD80/86 kann in pro- und auch antitumorigenen Effekten resultieren. Die Bindung des Komplexes an CD28 wirkt als kostimulatorisches Signal in T-Zellen, während die Bindung an CTLA-4 die Aktivierung von T-Zellen hemmt⁵⁹. Dabei scheint das Expressionslevel entscheidend für die Induktion dieser Effekte zu sein. Während eine Überexpression von CD80 mit einer verbesserten Immunantwort und verstärkten Tumoreliminierung einhergeht¹⁵³, wurde eine geringe Expression als protumorigener Faktor identifiziert^{154,155}. In einer weiteren Studie konnte zudem belegt werden, dass eine niedrigere CD80-Expression im Tumorgewebe von Magenkarzinomen verglichen mit der des Normalgewebes, mit einer verschlechterten Prognose assoziiert ist¹⁵⁶. Interessanterweise führt jedoch der Verlust der CD80-Expression zu einem verringerten Tumorwachstum und einer Abwehr des Kolontumors in immunkompetenten Mäusen¹⁵⁵. Die Analyse der Zelllinien HROC113 und HROC285 T0 M2 ergab, dass eine Minderheit der Tumorzellen CD80/86 exprimiert. Dabei war der Anteil der positiv-detektierten Zellen bei HROC285 T0 M2 deutlich geringer als in HROC113. Eine Induktion der Expression durch IFN γ wie sie bereits beschrieben wurde¹⁵⁷, konnte nicht festgestellt werden.

Als weiterer potenziell immunregulatorischer Faktor wurde FGL1 untersucht. Dieses sezernierte Protein kann an LAG-3 auf T-Zellen binden und diese in ihrer Aktivität hemmen⁶⁷. Eine Untersuchung der FGL1-mRNA ergab, dass diese teilweise auch in KRK verglichen mit dem Normalgewebe erhöht ist. Daher wurden auch die ausgewählten Tumorzelllinien auf eine FGL1-Sekretion geprüft. Mithilfe eines FGL1-ELISA wurde jedoch festgestellt, dass die Zellkulturüberstände frei von FGL1 waren.

Insgesamt boten die KRK-Zelllinien HROC113 und HROC285 T0 M2 also mit der starken HLA-Expression hervorragende Voraussetzungen für die Induktion einer Immunantwort. Da auch immunsuppressive Moleküle nachgewiesen wurden, sollten ICI in späteren Versuchen eingesetzt werden und zur Stärkung der Immunantwort führen.

5.2 Charakterisierung der T-Zellen

Um eine ausreichende Anzahl an Patienten-T-Zellen in Versuchen einsetzen zu können, wurden die peripheren und tumorinfiltrierenden T-Zellen mit einem Expansionsprotokoll expandiert. Dafür wurden verschiedene Protokolle getestet: T Cell TransAct, T Cell Activation/Expansion Kit und das „*rapid expansion protocol*“. Allen drei Protokollen ist die Nutzung von IL-2 und anti-CD3-Antikörpern gemein, die im T Cell TransAct um anti-CD28-Antikörper ergänzt werden und im T Cell Activation/Expansion Kit um anti-CD2- und anti-CD28-Antikörper. Das „*rapid expansion protocol*“ hingegen nutzt neben den aktivierenden Antikörpern bestrahlte PBL gesunder Spender. Dieses Protokoll hat sich in Vorversuchen durch die höchsten Expansionsergebnisse ausgezeichnet und wurde daher für die T-Zell-Expansionen dieser Arbeit verwendet. So konnten mehrere hundert Millionen T-Zellen generiert werden, sodass diese einer Expansion entstammenden T-Zellen für alle Experimente eingesetzt werden konnten. Damit wurden eventuell auftretende Unterschiede verschiedener Expansionen eliminiert.

Da die Zählung der T-Zellen manuell erfolgte, können besonders in den ersten Tagen der Zählungen Unsicherheiten aufgrund der PBL aufgetreten sein. Diese bestrahlten Zellen proliferieren zwar während der Expansionsdauer aufgrund ihrer geschädigten DNA nicht, sind in ihrer Form aber kaum von den expandierenden T-Zellen zu unterscheiden. Im weiteren Verlauf jedoch verkleinert sich die Zellgröße der PBL und sie sterben ab. Zudem sind aktivierte T-Zellen durch ihre zunehmende Größe besser zu identifizieren, sodass die Ergebnisse der Zählung mit zunehmender Expansionsdauer spezifischer werden. Demnach deuten die abfallenden Wachstumskurven der tumorinfiltrierenden T-Zellen wahrscheinlich eher auf fehlerhafte Zählungen hin als auf absterbende T-Zellen, da hier durch das zweiphasige Expansionsprotokoll besonders viele bestrahlte PBL eingesetzt wurden.

Eine Subpopulationsanalyse vor und nach der Expansion wies auf, wie sich die Zusammensetzung der T-Zellen veränderte. Dabei zeigte sich, dass sich das Verhältnis der CD4⁺ und CD8⁺ zugunsten der CD8⁺ T-Zellen verschob. Dieser Effekt kann auf das „*rapid expansion protocol*“ zurückgeführt werden, da dies auch bei zwanzig weiteren Patienten mit KRK oder Pankreaskarzinom und darüber hinaus auch bei gesunden Spendern beobachtet wurde (Daten der Arbeitsgruppe). In diesen Proben wurden zudem ähnlich wie in Tc HROC113 direkt nach der Isolation aus PBL bis zu 50 % der Zellen als CD4/CD8 doppelt positiv detektiert. Dieser Anteil reduzierte sich jedoch im Verlauf der Expansion massiv und wurde am Expansionsende nicht mehr nachgewiesen. Die Rolle von reifen CD4/CD8 doppelt positiven T-Zellen ist noch nicht vollends geklärt und es konnten bisher sowohl zytotoxische als auch immunsuppressive Eigenschaften dieser Zellpopulation nachgewiesen werden¹⁵⁸. Dabei wurden sie jedoch bereits hauptsächlich in tumorinfiltrierenden Lymphozyten nachgewiesen^{159,160}. Zudem wurde im KRK ein Zusammenhang zwischen CD4/CD8 doppelt

positiven T-Zellen im Lymphozyteninfiltrat und dem Metastasierungsgrad festgestellt¹⁶⁰. Doch auch im peripheren Blut von Tumorpatienten wurden CD4/CD8 doppelt positive T-Zellen detektiert und wiesen teilweise sogar Neoantigenspezifität auf¹⁶¹.

Der hohe Anteil an CD4/CD8 doppelt positiven T-Zellen in Tc HROC113, der zu Beginn der Expansion detektiert wurde, ist am Ende der Expansion nicht mehr messbar. Dafür zeigte sich aber eine große Mehrheit der Tc HROC113 CD8⁺. Da reife CD4/CD8 doppelt positive T-Zellen vor allem aus einfach positiven Zellen entstehen, ist anzunehmen, dass das verwendete Expansionsprotokoll die Regulation der Expression zugunsten einfachpositiver Zellen verändert hat. Ebenso könnte die Präparation der Zellen (T-Zell-Isolation und Antikörperfärbung) zu Expressionsänderung hinsichtlich CD4 und CD8 geführt haben.

Im Expansionsverlauf der peripheren T-Zellen zeigte sich, dass T-Gedächtniszellen dominierten. Ein großer Anteil stammzellähnlicher, zentraler und T-Effektorgedächtniszellen ist Voraussetzung für einen erfolgreichen immuntherapeutischen Einsatz¹⁶². Besonders die stammzellähnlichen T-Gedächtniszellen zeichnen sich durch ein hohes Proliferationspotenzial aus und induzierten eine verstärkte antitumorale Antwort im Mausmodell verglichen mit zentralen und T-Effektorgedächtniszellen¹⁶³. Auch der Vergleich von zentralen T-Gedächtniszellen und T-Effektorzellen zeigte auf, dass erstere stärker zytotoxisch aktiv waren und etablierte Tumoren im Mausmodell besser eliminieren konnten^{164,165}. Die verbesserte antitumorale Wirkung von T-Gedächtniszellen wird durch mehrere Faktoren verursacht¹⁶². Erstens ist die Aktivierungsschwelle von T-Gedächtniszellen sehr gering und niedrigste Dosen eines Antigens können mit ausreichender Kostimulation sehr schnell eine effiziente Immunantwort auslösen. Zweitens führt die Expression von CCR7 zur verstärkten Migration zum Lymphknoten, wo sie in Kontakt mit antigenpräsentierenden dendritischen Zellen kommen können. Drittens ist die Lebensdauer von T-Gedächtniszellen sehr hoch und kann mehrere Jahre erreichen. Außerdem wurde beobachtet, dass T-Gedächtniszellen von regulatorischen T-Zellen der Tumorumgebung nur wenig in ihrer Aktivität gehemmt werden¹⁶⁶. Die Expansion der tumorinfiltrierenden T-Zellen resultierte in einer Mehrheit von CD4⁺ T-Zellen und auch der Anteil an Effektorzellen war hier deutlich höher als in den peripheren T-Zellen. Dies war besonders bei TiTc HROC113 zu beobachten; hier wurden ca. 90 % der expandierten T-Zellen als Effektorzellen identifiziert. Dieser überaus hohe Anteil an Effektorzellen weist deutlich darauf hin, dass bereits eine antitumorale Immunantwort in der Tumorumgebung des Patienten stattgefunden hat. Der hohe Anteil an CD4⁺ T-Zellen innerhalb des Tumors unterstreicht die Bedeutung von T-Helferzellen für die Induktion einer erfolgreichen Immunantwort und stärkt zugleich die Möglichkeit, dass auch zytotoxische CD4⁺ tumorinfiltrierende T-Zellen vorhanden sein können¹⁶⁷. Ein Vergleich mit T-Zellen vor der Expansion konnte bei den tumorinfiltrierenden T-Zellen aufgrund der limitierten Zellzahl nicht erfolgen.

Um die expandierten peripheren T-Zellen noch näher zu charakterisieren, erfolgte eine Messung der regulatorischen T-Zellen. Die als CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ definierten regulatorischen T-Zellen überstiegen weder in HROC113 noch in HROC285 einen Anteil von 10 %. Damit entsprachen sie Werten gesunder Probanden, in denen ebenso maximal 10 % regulatorische T-Zellen identifiziert wurden¹⁶⁸. Studienergebnisse, die mehr regulatorische T-Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten als in gesunden Probanden nachwiesen¹⁶⁹⁻¹⁷¹, konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Da regulatorische T-Zellen eine wichtige Rolle in der Tumorumgebung einnehmen und zu einem immunsuppressiven Klima beitragen, wurde auch der Anteil an regulatorischen tumorinfiltrierenden T-Zellen bestimmt. In den tumorinfiltrierenden T-Zellen beider Patientinnen wurden jedoch ebenso weniger als 10 % als regulatorische T-Zellen identifiziert. Dabei wurde in TiTc HROC113 ein besonders niedriger Anteil an regulatorischen T-Zellen gemessen, der jedoch auch in wiederholten Messungen bestätigt wurde. Saito et al. wiesen hingegen in einer Studie mit KRK-Patienten nach, dass der Anteil regulatorischer T-Zellen im Tumor im Vergleich zu dem im peripheren Blut und dem Normalgewebe deutlich erhöht ist¹⁷². Dabei wurde außerdem gezeigt, dass die Intensität der FoxP3-Expression entscheidend für die Prognose des Patienten war. Überwog der Anteil an FoxP3^{niedrig} regulatorischen T-Zellen war dies mit einer besseren Prognose assoziiert als bei FoxP3^{hoch} KRK. Diese Beobachtungen konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Weiterhin wurden die expandierten T-Zellen hinsichtlich ihrer Immuncheckpoints untersucht. Dafür erfolgte eine durchflusszytometrische Messung von PD-1, CTLA-4 und LAG-3. CTLA-4 und LAG-3 wurde mehrheitlich von Tc HROC113 und Tc HROC285 exprimiert. Hingegen erreichte die PD-1 Expression maximal 20 %. Insgesamt ergab sich auch bei den tumorinfiltrierenden T-Zellen ein ähnliches Muster, nur war hier der Anteil PD-1⁺ Zellen mindestens dreimal so hoch. Die starke Expression dieser Aktivierungsmarker wurde wahrscheinlich durch die unspezifische Expansion mit anti-CD3-Antikörpern und IL-2 verursacht. Da die Expression der Immuncheckpointproteine einer Dynamik unterliegt, die von der Anwesenheit des Antigens bestimmt wird, tritt diese zumeist nur transient nach dem Antigenkontakt auf¹⁷³. Die Aktivierung erfolgte während der Expansion durch eine unspezifische Stimulation über den T-Zell-Rezeptor, und daher könnte sich diese starke PD-1, CTLA-4 und LAG-3-Expression nach dem Ende der Expansion abschwächen.

Außerdem wurde die Messung für die Bestimmung von erschöpften T-Zellen genutzt, die als PD-1⁺/CTLA-4⁺/LAG-3⁺ definiert wurden. Der insgesamt niedrige Anteil an PD-1⁺ Zellen war verantwortlich für einen Anteil erschöpfter Zellen von unter zehn Prozent in den expandierten T-Zellen des peripheren Blutes. In den tumorinfiltrierenden T-Zellen lag der Anteil jedoch deutlich höher.

Die Expression von PD-1 auf tumorinfiltrierenden T-Zellen wurde bereits mit einer tumorantigenspezifischen Immunreaktion assoziiert^{173,174}, sodass diese Ergebnisse zur Annahme führten, dass auch in den Tumoren HROC113 und HROC285 bereits eine antitumorale Immunantwort vorlag. Außerdem sollte der Einsatz von ICI die gehemmte Immunantwort wiederherstellen.

5.3 Die Interaktion von T-Zellen und Tumorzellen

Um die Interaktion zwischen T-Zellen und Tumorzellen näher zu untersuchen wurden Kokulturversuche durchgeführt. Außerdem sollte geklärt werden, ob T-Zellen durch autologe Tumorzellen aktiviert werden können. Die Kokultur der beiden Zellpopulationen endete nach 14 Tagen und ein Degranulierungstest bestimmte den Anteil an T-Zellen, die ihre zytotoxischen Granula sezerniert hatten.

Dabei war bei der Kokultur der Tc HROC113 und HROC113 zu beobachten, dass die Tumorzellerkennung nach der Kokultur besser war als nach der unspezifischen Expansion. Überraschenderweise war ein ähnlich hoher Anstieg jedoch auch in der Kontrollgruppe zu beobachten. Durch die Stimulation mit anti-CD28-Antikörpern und IL-2 entsprechen die Kulturbedingungen der Kontrollen einer weiteren Expansion, die offenbar zu einer verbesserten Tumorerkennung führt. Zwar war der Anteil an degranulierenden T-Zellen in den kokultivierten Tc HROC113 im Mittel nicht signifikant höher als in der Kontrollgruppe, doch es gab durchaus Versuchsansätze, in denen eine deutliche Stimulation durch die Kokultur induziert werden konnte.

Ein insgesamt ähnliches Resultat zeigte die Kokultur von TiTc HROC113 und HROC113. Auch hier wurde eine deutliche Steigerung der Tumorzellerkennung nach der zweiwöchigen Kultur detektiert, die jedoch in der Kokultur ebenso wie in der Kontrollkultur zu sehen war. Doch hier war keine so große Varianz wie bei den Tc HROC113 und keine Aktivierung durch die autologen Tumorzellen zu verzeichnen. Dies könnte auf den größeren Anteil erschöpfter T-Zellen innerhalb der TiTc HROC113 zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse der Tc HROC285 wiesen gar keine Verbesserung der Tumorzellerkennung durch die Kokultur auf.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse dieser Kokulturversuche, dass die eingesetzten peripheren oder tumorinfiltrierenden T-Zellen nicht ausreichend stark durch die autologen Tumorzellen aktiviert wurden. Dies könnte durch die fehlende Präsentation tumorspezifischer Antigene oder die Expression immunsuppressiver Liganden durch die Tumorzellen zu erklären sein. Da die Tumorzelllinien aus hochgradig malignen Tumoren etabliert wurden, sind diese immunsuppressiven Eigenschaften, die für das ungehinderte Tumorwachstum nötig sind, wenig überraschend. Zudem kann auch eine geringe Aktivierbarkeit der expandierten T-Zellen Ursache der gehemmten Stimulation durch Tumorzellen sein.

Um die Interaktion von Immuncheckpointmolekülen und ihren Liganden zu unterbinden, wurden nachfolgend Kokulturversuche mit ICI durchgeführt.

Diese zeigten auf, dass die Kokultur trotz ICI nicht zu einer verstärkten Tumorzellerkennung führte. Wieder waren die T-Zellen am aktivsten, die zuvor keinen Kontakt zu autologen Tumorzellen hatten und nur in der Kontrollkultur inkubiert wurden. Die Zugabe der einzelnen ICI anti-PD-1, anti-CTLA-4, anti-PD-L1 sowie anti-LAG-3 zur Kokultur von HROC113 und Tc HROC113 führte nicht zur erhofften Stärkung der Tumorzellerkennung. Ein Vergleich mit der Kokultur ohne ICI wies sogar einen weiteren Rückgang der T-Zell-Aktivität auf. Allein der kombinierte Einsatz von anti-PD-1, anti-CTLA-4 und anti-PD-L1 erzielte die höchste Degranulierung, die aber noch immer deutlich unter der T-Zell-Aktivität nicht kokultivierter T-Zellen lag. TiTc HROC113 wiesen Degranulierungsergebnisse auf, die sich unabhängig von Kokultur und ICI nur wenig unterschieden. Jedoch resultierte der Degranulierungstest von kokultivierten Tc HROC285, denen anti-PD-L1 zugesetzt wurde, in einem Anstieg degranulierender T-Zellen. Demnach spielte PD-L1 eine bedeutende Rolle in der Immunsuppression von T-Zellen durch die HROC285 T0 M2. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Blockade der untersuchten Immuncheckpoints meist nicht ausreichte, um eine tumorspezifische Immunantwort zu induzieren. Außerdem weisen sie darauf hin, dass dem Tumor neben der Expression der analysierten Immuncheckpointliganden weitere Faktoren zur Hemmung der T-Zell-Aktivität zur Verfügung standen.

Die Effektivität von ICI zur Therapie des MSI KRK wurde bereits in mehreren klinischen Studien getestet. Dabei zeigte sich, dass die Ansprechrate von Pembrolizumab bei 40 %⁸⁰ und von Nivolumab bei 31 %¹⁷⁵ lag, sodass die Zulassung zur Behandlung des MSI KRK erteilt wurde. Dieser Erfolg konnte durch die Kombination von Nivolumab mit Ipilimumab gesteigert werden, sodass in einer weiteren Studie 55 % der Patienten von der Immuntherapie profitierten¹⁷⁶. Präklinische und klinische Studien zur Effektivität der anti-LAG-3-Therapie zeigten bereits, dass eine Kombinationstherapie mit anti-PD-1 vorteilhaft ist^{177,178}. Daten zur Wirkung von anti-LAG-3-Antikörpern in KRK-Patienten werden in klinischen Studien zurzeit erhoben (NCT05064059, NCT04895722, NCT05328908, NCT03642067) stehen aber noch nicht zur Verfügung.

Da das Vorliegen einer MSI nicht ausreichend prädiktiv für das Ansprechen auf eine ICI-Therapie zu sein scheint, wurden Biomarker gesucht, um eine Vorhersage zum Therapieerfolg treffen zu können. Da eine Korrelation von PD-L1-Expression und dem Ansprechen auf ICI-Therapie bereits für verschiedene Tumorentitäten nachgewiesen wurde¹⁷⁹, darunter nichtkleinzelliges Lungenkarzinom, Magen- und Blasenkarzinom, analysierten Le et al. diesen Zusammenhang auch im KRK. Es wurde jedoch keine Korrelation zwischen PD-L1-Expression und dem Gesamtüberleben der Patienten festgestellt⁸⁰. Weiterhin wurde der Vorhersagewert von BRAF- und KRAS-Mutationen sowie das Vorliegen eines Lynchsyndroms untersucht¹⁷⁵.

Doch auch diese Faktoren konnten nicht als Biomarker für eine erfolgreiche Immuntherapie eingesetzt werden¹⁷⁵. Jedoch wurde der bekannte Zusammenhang zwischen Mutationslast und Gesamtüberlebenszeit^{110,111} auch bezüglich der ICI-Therapie bestätigt: KRK-Patienten, die auf eine ICI-Therapie ansprachen, wiesen MSI-Tumoren mit einer signifikant erhöhten Anzahl an Mutationen auf (MSI-H), wohingegen weniger mutierte MSI-Tumoren (MSI-L) resistent gegen die Therapie waren^{180,181}. Es konnte jedoch auch das Lymphozyteninfiltrat als Biomarker für die ICI-Therapie genutzt werden, wobei die Zusammensetzung eine entscheidende Rolle spielte. In MSI-H-Tumoren wurde eine größere Population an immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen und MDSC identifiziert als in MSI-L-Tumoren^{182,183}. Jedoch wurde in anderen Tumorentitäten bereits nachgewiesen, dass eine anti-PD-1-Therapie durch eine Reduktion regulatorischer T-Zellen in der Tumorumgebung erfolgreich sein kann^{184,185}. Regulatorische T-Zellen standen auch in Studien im Mittelpunkt, die sich mit der Korrelation von Alter und ICI-Therapieprädiktion auseinandersetzten. Dabei wurde festgestellt, dass sich ein hohes Alter (60+) von Melanompatienten durch eine verringerte Aktivität regulatorischer T-Zellen positiv auf das Ansprechen auf anti-PD-1-Antikörper auswirkte^{186,187}.

Neben immunsuppressiven Zellen ist auch der Anteil tumorreaktiver zytotoxischer T-Zellen von Bedeutung, um eine Aussage über die Wirkung von ICI treffen zu können. Dabei konnte in MSI-KRK ein Trend zwischen der Intensität des CD8⁺ Lymphozyteninfiltrats und dem ICI-Therapieansprechen detektiert werden⁸⁰. Weiterhin wurde jedoch festgestellt, dass der Zustand der zytotoxischen T-Zellen ausschlaggebend ist und MSI KRK mit erschöpften CD8⁺ T-Zellen nicht von der ICI-Therapie profitieren¹⁸⁸.

Neben diesen Faktoren, die Tumorzellen oder infiltrierende Lymphozyten charakterisieren, werden zudem sezernierte Faktoren diskutiert, darunter auch Zytokine, die den Erfolg einer ICI-Therapie bestimmen. Deshalb wurde auch in dieser Arbeit der Zytokingehalt im Zellkulturüberstand von T-Zellen, Tumorzellen und Kokulturen bestimmt. Dazu wurden die expandierten T-Zellen als Gesamtpopulation oder als CD4⁺ oder CD8⁺-Teilpopulation eingesetzt, die aus der Aufreinigung mit dem REAlease CD4 MicroBead Kit resultierten. Dabei wurden CD4⁺ T-Zellen reversibel markiert und die unmarkierte Fraktion als CD8⁺ definiert. Durchflusszytometrische Analysen zeigten auf, dass die CD4⁺ nur zu einem sehr geringen Teil mit CD4/CD8 doppelpositiven oder CD8⁺ T-Zellen durchmischt war, wohingegen dieser Anteil in der CD8⁺-Fraktion bis zu 10 % erreichte.

Von den zwölf Zytokinen konnten in den untersuchten Zellkulturüberständen lediglich vier sicher nachgewiesen werden: GM-CSF, IL-5, IL-6 und IL-17a. Dabei war auffällig, dass diese nur in sehr geringen Konzentrationen in den Überständen der reinen Tumorzellkultur detektiert wurden. IL-2 und IFN γ überschritten ebenfalls die Nachweisgrenze, aber da diese dem Medium vor oder während der Kultur zugesetzt wurden, erfolgte der Ausschluss.

GM-CSF wird nicht von ruhenden, dafür jedoch von aktivierten T-Zellen sezerniert, um die Reifung von Monozyten und Granulozyten im Knochenmark anzuregen¹⁴. Demnach war der Großteil der T-Zellen in diesen Versuchen aktiviert, was jedoch auch auf die Expansionsbedingungen zurückgeführt werden kann, da auch eine Stimulation mit anti-CD3 zu einer Expression von GM-CSF in T-Zellen führt¹⁸⁹. Während die Konzentration an GM-CSF in den Tumorzellen gering war, konnte bereits belegt werden, dass inflammatorische Zytokine wie beispielsweise IL-1, IL-6 und TNF α eine erhöhte GM-CSF-Expression induzieren können¹⁸⁹. Demnach könnte auch die Interaktion der Tumorzellen mit den T-Zellen der Kokultur zur erhöhten GM-CSF-Konzentration beigetragen haben.

Die Detektion von IL-5 folgte in den Ansätzen beider Tumorzelllinien demselben Muster: Keine Detektion in Tumorzellkulturen, eine hohe Konzentration in T-Zell-Kulturen, sowie eine niedrigere Konzentration in Überständen der Kokultur. Demnach führte die Kokultur zu einer gehemmten IL-5-Sekretion aus expandierten und damit aktivierten T-Zellen. IL-5 kann von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sezerniert werden¹⁹⁰, ist jedoch eher mit Typ 2 T-Helferzellen und Mastzellen assoziiert¹⁹¹. Zwar konnte in Brustkarzinomen bereits eine Korrelation zwischen hohen IL-5 Leveln und der Prognose der Patientinnen festgestellt werden^{192,193} doch gibt es insgesamt gegensätzliche Literatur zur pro- oder antitumorigenen Rolle von IL-5 in Tumoren¹⁹⁴.

IL-6 hingegen konnten bereits protumorigene Funktionen nachgewiesen werden. Es gelangt durch autokrine und parakrine Sekretion durch Stromazellen in die Tumorumgebung und fördert Überleben und Progression des Tumors¹⁹⁵. Eine erhöhte IL-6-Konzentration wurde auch in KRK-Gewebe sowie dem Serum der Patienten nachgewiesen¹⁹⁶. Zudem konnte eine erhöhte Serumkonzentration an IL-6 mit einer verringerten Überlebenszeit der Patienten assoziiert werden¹⁹⁷. In der Analyse der Zytokinsekretion dieser Arbeit wurde auch IL-6 detektiert. Dabei wurde jedoch in den Tumorzellen HROC113 keine und in HROC285 T0 M2 nur eine sehr geringe IL-6-Sekretion gemessen. Im Überstand der CD4⁺ Tc HROC113-Kulturen hingegen wurde IL-6 sicher nachgewiesen. Dabei war die Konzentration in der T-Zell-Kultur deutlich höher als in den Kokulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei CD4⁺ Tc HROC285 beobachtet. Physiologisch wird IL-6 von Makrophagen und Monozyten während der Entzündungsreaktion produziert, darüber hinaus jedoch auch von T-Zellen während chronischer Entzündungen¹⁹⁸. Demnach ist es möglich, dass das in den Überständen detektierte IL-6 aktiven T-Zellen entstammt, die durch die Kokultur mit Tumorzellen in ihrer Aktivität und damit IL-6-Sekretion gehemmt werden. Auffällig ist weiterhin, dass die Kokultur von HROC285 T0 M2 und Tc HROC285 mit den Zellkulturmembraneinsätzen zu einer höheren IL-6-Konzentration im Überstand der Kultur führte als direkte Kokultur. Dies weist darauf hin, dass weitere sezernierte Faktoren an der Immunregulation beteiligt sind.

Das vierte Zytokin, das sicher in den Überständen gemessen werden konnte, war IL-17a. Dieses war besonders hoch in Kulturen von CD4⁺ Tc HROC113 sowie der Kokultur von HROC285 mit Membraneinsatz. IL-17a wurde auch zuerst in einer Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen, den T_H17-Zellen, nachgewiesen, kann aber auch von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und weiteren Immunzellen sezerniert werden¹⁹⁹. Nichtsdestoweniger, ist dies ein starker Hinweis auf vorhandene T_H17-Zellen in Tc HROC113 und Tc HROC285, die jedoch im KRK mit Immunsuppression und Tumorprogression assoziiert sind^{200,201}.

Um zu untersuchen, welche Klasse an HLA-Komplexen an der Interaktion zwischen Tumorzellen und T-Zellen beteiligt ist, wurden Kokulturversuche mit blockierenden Antikörpern für HLA I und HLA II durchgeführt. Da die Bindung von T-Zell-Rezeptor und HLA-Komplex fundamental für eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung ist, wurde ein Absinken der T-Zell-Degranulierung nach Inkubation mit anti-HLA-Antikörpern erwartet. Jedoch wiesen vor allem die Tc HROC113 einen Anstieg ihrer Aktivität nach dieser Kultur auf. Auch wenn der Anteil regulatorischer T-Zellen innerhalb der Tc HROC113 eher gering war, könnte diese verbesserte Tumorzellerkennung durch fehlende Interaktion von regulatorischen und zytotoxischen T-Zellen zurückgeführt werden. Die Blockade von HLA II würde eine Aktivierung regulatorischer T-Zellen unterbinden, sodass diese wiederum nicht immunsuppressiv auf zytotoxische T-Zellen wirken können. Zudem weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Antigenpräsentation der untersuchten Tumorzelllinien nicht auf HLA I und HLA II beschränkt ist, sondern ebenso nicht-klassische HLA-Komplexe – HLA-E, HLA-F, HLA-G – eine wichtige Rolle in der Aktivierung antitumoraler T-Zellen spielen. Außerdem wurde in einer klinischen Studie nachgewiesen, dass MSI-KRK-Patienten mit fehlerhaftem HLA I, das durch Mutationen in β -2-Mikroglobulin verursacht wurde, von einer ICI-Therapie profitieren können, obwohl die Antigenpräsentation über HLA I eingeschränkt war²⁰². Demnach übernahmen auch hier andere Moleküle die Antigenpräsentation

Die Untersuchungen zur Interaktion von T-Zellen und autologen Tumorzellen zeigten auf, dass durch Kokultur beider Populationen lediglich eine geringe Aktivität der T-Zellen induziert werden kann, die auf eine immunsuppressive Wirkung der Tumorzellen hinweist. Diese Effekte konnten nicht auf immunsuppressive Zytokine wie beispielsweise IL-10 zurückgeführt und auch nicht durch den Einsatz von ICI überwunden werden. Deshalb folgte nun die Identifizierung tumorspezifischer Antigene, die in einer T-Zell-Stimulation eingesetzt werden sollten, um tumorspezifische T-Zell-Reaktionen zu induzieren.

5.4 Peptididentifizierung und –stimulierung

Die Identifizierung tumorspezifischer Antigene erfolgte auf Grundlage von Sequenzierungs- und Ligandomdaten. Auch wenn beide Tumorzelllinien mehrere tausend Mutationen aufwiesen und auch im Ligandom 8.000 (HROC113) beziehungsweise 2.000 (HROC285 T0 M2) HLA-I-bindende Peptide identifiziert wurden, konnten nur drei mutierte Neoantigene detektiert werden. Ähnliche Studien konnten jedoch ebenso mit aktueller Methodik nur ca. ein bis drei Neoantigene pro Tumorpatient identifizieren^{203–205}.

Alle drei Neoantigene entstammten Punktmutationen, die in einer veränderten Aminosäuresequenz resultierten. IQGAP1 ist ein zytoplasmatisches Protein, das im Umbau des Zytoskeletts sowie in verschiedenen Signalkaskaden involviert ist²⁰⁶. Obwohl bereits eine Korrelation zwischen der Überexpression von IQGAP1 und einer geringeren Gesamtüberlebenszeit von KRK-Patienten nachgewiesen wurde, sind *IQGAP1*-Mutationen eher selten²⁰⁷. Dem zweiten Neoantigen von HROC113 liegt eine Mutation des *CTNNB1*-Gens zugrunde, das für β -Catenin kodiert. Dieses Protein ist Teil des Wnt-Signalwegs, der häufig in KRK mutiert ist. Zudem wurde beobachtet, dass *CTNNB1*-Mutationen häufiger in MSI KRK vorkommen als in MSS KRK^{208,209}. Das Neoantigen, das in HROC285 T0 M2 identifiziert wurde, ist auf eine Mutation in *TRIT1* zurückzuführen. TRIT1 ist beteiligt an der Modifikation von tRNA und Mutationen liegen nur selten vor. Ein Zusammenhang von *TRIT1* und der Tumorigenese konnte aber in Brust- und Lungenkarzinom gezeigt werden^{210,211}.

Doch neben klassischen mutierten Neoantigenen wurden auch kryptische Peptide in den Tumorzelllinien identifiziert. Durch einen Abgleich mit kryptischen Peptiden aus gesunden Geweben konnte ein Großteil als tumorspezifisch bestimmt werden. Kryptische Peptide konnten bereits in anderen Tumorentitäten nachgewiesen werden, darunter Melanom¹³¹, Glioblastom¹²⁸, Lungenkarzinom²¹², atypischer teratoider/rhabdoider Tumor¹²⁶ und KRK²¹³. Doch die technischen Voraussetzungen zur Identifizierung tumorspezifischer kryptischer Peptide bestehen erst seit kurzem, sodass hier noch zahlreiche Studien folgen werden.

Die Analyse der Ligandomdaten von HROC285 T0 M2 offenbarte außerdem, dass die Peptidpräsentation hauptsächlich über HLA-C erfolgte und nicht wie häufig beobachtet über HLA-A und HLA-B. Diese ungewöhnliche Verteilung könnte auf eine Form der Immunevasion hindeuten, die nicht die Expression des gesamten HLA-Repertoires betrifft, sondern lediglich einzelne HLA-Subtypen betrifft, die eventuell zuvor immunogene Tumorantigene präsentierten.

Für die Peptidstimulationen wurden B-LCL aus Patienten-PBL etabliert, da diese hervorragend für die Peptidpräsentation gegenüber T-Zellen geeignet sind^{214–216}. Zudem ergab die durchflusszytometrische Analyse, dass der überwiegende Teil (>95 %) HLA II sowie die Kostimulatoren CD40, CD50, CD54, CD58, CD86 und CD102 auf ihrer Oberfläche

präsentierten. Demnach sollten sie ideal für die Präsentation der identifizierten Peptide geeignet sein und T-Zellen aktivieren können.

Die Testung der 100 Peptide identifizierte 16 von 70 (23 %) kryptischen Peptiden von HROC113 als immunogen sowie 2 von 28 (7 %) von HROC285 T0 M2. Dabei überwogen die kryptischen Peptide mit starker Bindungsprädiktion, doch eine Korrelation zwischen Immunogenität und bestimmten HLA-Allelen konnte nicht nachgewiesen werden. Auch der Ursprung der kryptischen Peptide wurde nicht mit der Immunogenität assoziiert. Ein Vergleich der identifizierten 97 kryptischen Peptide dieser Arbeit mit tumorspezifischen kryptischen Peptiden aus anderen Datensätzen ergab, dass 49 in mehreren Tumoren detektiert wurden, teilweise sogar in verschiedenen Tumorentitäten (Daten Andreas Schlosser). Unter den 18 immunogenen kryptischen Peptiden wurden zudem sieben identifiziert, die auch in anderen KRK- sowie Melanomproben detektiert wurden. Dies unterstreicht die Bedeutung, die kryptischen Peptiden in der zukünftigen Bestimmung tumorspezifischer Peptide zukommen sollte. Während Neoantigene zumeist patientenindividuell sind, könnten kryptische Peptide in einer größeren Anzahl Patienten präsent sein, sodass sie auch die Entwicklung von Tumorvakzinen vereinfachen würden.

Auf die Bestimmung der IFN γ -Sekretion folgte die funktionelle Testung der Tumorzellerkennung mithilfe eines Degranulierungstests. Dabei zeigte sich bei Tc und TiTc HROC113, dass die Stimulation sowohl mit kryptischen Peptiden als auch mutierten Neoantigenen in einer erhöhten Degranulierung resultierte. Demnach führte die zweiwöchige Stimulation mit den tumorspezifischen Peptiden zur Aktivierung und auch Proliferation tumorreaktiver T-Zellen. Zudem bestätigte sich in der Tetramerfärbung, dass sich der Anteil an IQGAP1-spezifischen Tc und TiTc HROC113 erhöhte. Während die Subpopulationsanalyse in Tc HROC113 den Großteil der Zellen als CD8⁺-T-Gedächtniszellen identifizierte, dominierten in TiTc HROC113 T-Effektorzellen, darunter sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen. Dies bedeutet, dass die Neoantigenstimulation wahrscheinlich zur Proliferation neoantigen-spezifischer T-Effektorzellen geführt hat, die bereits im Tumorinfiltrat vorlagen. Außerdem wies der Degranulierungstest nach, dass die Tumorzellen sowohl kryptische Peptide als auch mutierte Neoantigene präsentierten.

Die Tc und TiTc HROC285 reagierten weniger stark auf die Stimulation mit den Neoantigenen und auch die Tumorzellerkennung wurde insgesamt nicht wesentlich durch die Neoantigenstimulation verbessert. Jedoch zeigten auch hier einzelne Stimulationen sehr gute Ergebnisse. Insgesamt war besonders in den Tetramerfärbungen zu beobachten, dass das Ansprechen der peripheren und tumorinfiltrierenden T-Zellen innerhalb der Replikate teilweise sehr stark variierte. Diese heterogene Reaktivität kann durch die Diskrepanz zwischen T-Zell-Rezeptor-Repertoire und der eingesetzten Anzahl an T-Zellen bedingt sein. Das humane T-Zell-Rezeptor-Repertoire besteht aus ungefähr 1×10^8 verschiedenen T-Zell-Klonen²¹⁷, doch

die Experimente dieser Arbeit wurden mit maximal 1×10^7 T-Zellen durchgeführt. Demnach besteht die Möglichkeit, dass in einigen Stimulationen antigenspezifische T-Zellen schlichtweg nicht enthalten waren, sodass auch keine Proliferation stattfinden konnte.

Die Zugabe von ICI führte in keinem der Degranulierungstests zu einer Verbesserung der Tumorzellerkennung. Dies deutet erneut auf weitere immunregulatorische Faktoren in der Tumorzell-T-Zell-Interaktion hin.

Die Funktionalität von tumorspezifischen kryptischen Peptiden zur Induktion zytotoxischer T-Zell-Antworten wurde bisher nur unzureichend untersucht. Häufig wurde nachgewiesen, dass T-Zellen durch die identifizierten kryptischen Peptide aktiviert werden können^{126,213}, doch der Beweis, dass stimulierte T-Zellen Tumorzellen erkennen und eliminieren können blieb aus. Eine *in vivo* Studie konnte zumindest indirekt die Wirkung einer Vakzinierung mit kryptischen Peptiden aufzeigen: Mäuse, die einen Cocktail aus drei kryptischen Peptiden und Adjuvantien enthielten, wiesen ein signifikant verringertes Wachstum der injizierten KRK-Zellen auf¹³³. Eine Einzeltestung der Peptide führte jedoch nicht zur Verlangsamung des Tumorwachstums, sodass ein synergistischer Effekt angenommen wurde.

Die Effektivität von immuntherapeutischen Ansätzen basierend auf Neoantigenen wurden vielfach *in vitro* und *in vivo* bewiesen^{218–226}. Doch auch erste klinische Studien mit neoantigenfokussierten Vakzinen zeigten in Melanom^{227,228}, Lungenkarzinom²²⁹, Pankreaskarzinom²³⁰, hepatozellulärem Karzinom²³¹ und Glioblastom²³² positive Effekte. Auch die Vakzinierung von MSI-KRK-Patienten mit drei Frameshift-Peptiden führte zur Induktion von T-Zell-Antworten in allen Patienten²³³. Weitere klinische Studien zur Testung von Tumorvakzinierungen sind noch aktiv (NCT05141721, NCT05243862, NCT05078866, NCT01885702, NCT04117087 und NCT04799431). Um das Ansprechen der Tumoren weiter zu steigern wurden ebenso Vakzinierungsstudien in Kombination mit ICI-Therapie durchgeführt, die synergistische Effekte bestätigten^{228,234,235}.

5.5 Immunevasion durch PI-9

Um die peptidstimulierten T-Zellen abschließend hinsichtlich ihrer Zytotoxizität gegenüber autologen Tumorzellen zu testen, wurde der GranToxiLux-Test durchgeführt. Dieser sollte validieren, ob die sezernierten Granzym-B-enthaltenden Granula ihre Wirkung in den Tumorzellen erzielen. Dabei wurde überraschenderweise beobachtet, dass die Tumorzellen selbst Granzym B aufwiesen und so kein Effekt durch tumorreaktive T-Zellen messbar war. Die Expression von Granzym B konnte jedoch auch schon in Brust-^{236,237}, Lungen-²³⁶ und Urothelkarzinomen²³⁸ detektiert werden.

Eine Detektion von PI-9, dem spezifischen Inhibitor von Granzym B, zeigte zudem auf, dass die untersuchten Tumorzelllinien diesen exprimierten. Die Expression von PI-9 stellt einen weiteren Mechanismus zur Umgehung der Immunüberwachung dar, da so der zytotoxische

Effekt tumorreaktiver T-Zellen inhibiert wird²³⁹. Die Expression von PI-9 wurde bereits in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen^{240–243}. Dabei konnte in Rektumkarzinomen die PI-9-Expression mit einem verringerten Ansprechen auf neoadjuvante Chemoradiotherapie assoziiert werden²⁴³.

Eine Korrelation zwischen Mikrosatellitenstatus und PI-9-Expression ist bisher noch nicht bekannt, doch die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin. Da MSI-Tumoren mehr Mutationen aufweisen, von stärkeren Immuninfiltraten gekennzeichnet sind und eine bessere Prognose hinsichtlich immuntherapeutischer Maßnahmen haben, könnte der antitumorale Druck des Immunsystems in den Tumorzellen neben der verstärkten Expression von PD-L1 auch die PI-9-Expression vermehrt induzieren. Doch ähnlich zur Blockade von anti-PD-L1, kann auch dieser Schutzmechanismus der Tumorzellen durchbrochen werden. Eine präklinische Studie wies bereits nach, dass der Einsatz eines PI-9-Inhibitors im Mausmodell zum verzögerten Tumorwachstum und zur Verlängerung der Lebenszeit beitrug²⁴⁴.

5.6 Fazit

Die vorgelegte Arbeit ist die erste detaillierte Beschreibung der Interaktion zwischen T-Zellen und autologen MSI-KRK-Zellen *in vitro*. Darin wurde gezeigt, dass die Tumorzellen immunsuppressiv wirken und die Aktivierung der T-Zellen hemmen. Diese immunregulatorischen Effekte wurden zudem nicht allein über die Expression von Immuncheckpointliganden oder die Sezernierung der untersuchten Zytokine erzielt. Ebenso ergab die Analyse blockierender Antikörpern für HLA I und HLA II, dass die Tumorzellen weitere nicht-klassische HLA-Moleküle für die Antigenpräsentation und Immunmodulation nutzten.

Weiterhin bewiesen die funktionellen Analysen dieser Arbeit, dass T-Zellen durch tumorspezifische Antigene – mutierte Neoantigene und kryptische Peptide – stimuliert und diese auch von Tumorzellen präsentiert werden. So konnte durch die Peptidstimulation eine gesteigerte Erkennung der autologen Tumorzellen durch die T-Zellen induziert werden.

Die deutlich größere Anzahl an identifizierten kryptischen Peptiden und die Tatsache, dass diese zudem auch in verschiedenen Tumoren nachgewiesen wurden, unterstreicht die Bedeutung von kryptischen Peptiden in der zukünftigen Entwicklung von Tumorstoffen. Obwohl die Expression und Präsentation von tumorspezifischen kryptischen Peptiden auf Tumoren eher gering zu sein scheint¹²⁷, wirkt sich dies jedoch vorteilhaft auf eine potentielle *ex vivo* Stimulation von T-Zellen aus. Denn dadurch ist eine vollständige Aktivierung von T-Zellen möglich, ohne dass ein Teil der T-Zellen bereits Anzeichen der Erschöpfung aufweist. Außerdem unterlag die Präsentation kryptischer Peptide seitens des Tumors noch nicht dem Immun-Editing, sodass beispielsweise ein adoptiver Zelltransfer *ex vivo* aktivierter

peptidspezifischer T-Zellen zur Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen im Patienten führen könnte.

Für die Stimulation wurden neben tumorinfiltrierenden auch periphere T-Zellen der Patientinnen eingesetzt. Die gesteigerte Sezernierung von IFN γ und erhöhte Aktivität im Degranulationstest bewiesen, dass auch T-Zellen des peripheren Blutes zur peptidspezifischen Stimulation geeignet waren. Demnach könnten auch periphere T-Zellen für *ex vivo* Stimulationen und adoptiven T-Zell-Transfer eingesetzt werden, was eine deutliche Vereinfachung gegenüber tumorinfiltrierenden T-Zellen bedeutet. Zudem ist die Anzahl tumorinfiltrierender T-Zellen und deren Aktivierbarkeit häufig stark limitiert, sodass periphere T-Zellen eine ausgezeichnete Alternative darstellen.

Außerdem zeigten die Ergebnisse der stimulierten TiTc HROC113, in denen Effektorzellen dominierten, dass bereits eine peptidspezifische Antwort im Tumor vorlag. Demnach führte eine weitere Stimulation der T-Zellen lediglich zu einer Verstärkung vorhandener Immunantworten gegenüber mutierten Neoantigenen und tumorspezifischen kryptischen Peptiden.

Die hohe Aktivität der stimulierten T-Zellen spiegelte sich leider jedoch nicht in einer gesteigerten Tumoreliminierung wieder, die auch nicht durch den Einsatz von anti-PD-1-, anti-PD-L1- und anti-CTLA-4-Antikörpern verbessert werden konnte. Dies kann teilweise auf die Expression von PI-9 in den Tumorzellen zurückgeführt werden, doch führte der immunologische Selektionsdruck in der Tumorentwicklung wahrscheinlich auch zur Ausprägung weiterer Mechanismen um die Immunantwort abzuwehren. Durch die konstitutive Expression von HLA I auf den Tumoren HROC113 und HROC285, die eigentlich mit einer vermehrten Detektion durch das Immunsystem einhergeht, ist anzunehmen, dass beide Tumoren durch weitere membrangebundene und sezernierte Faktoren der Immunüberwachung entgehen konnten.

In dieser Arbeit wurden MSI-KRK-Modelle verwendet, doch auch bei MSS KRK ist die Präsentation von kryptischen Peptiden und mutierten Neoantigenen möglich, auch wenn deren Anzahl geringer ist. Zwar wurde bisher häufig die Anzahl der Neoantigene mit einer verbesserten Immunantwort und Prognose assoziiert, doch ist auch die Qualität der Neoantigene entscheidend. So konnte Balachandran et al. im Pankreaskarzinom zeigen, dass die Qualität der Neoantigene, unter anderem definiert durch die Immunogenität, einen stärkeren Einfluss auf das Gesamtüberleben hat als die Quantität²⁴⁵. Des Weiteren kann die Immunogenität sowie die Expression von Neoantigenen von MSS-Tumoren auch positiv beeinflusst werden. So wurde anhand von Sarkomzelllinien gezeigt, dass eine Bestrahlung der Zellen Neoantigene induzierte, die dann zytotoxische T-Zell-Antworten auslösten²⁴⁶. Auch in MSS-KRK führte eine Radiotherapie in Verbindung mit Oxaliplatin zu einem veränderten RNA-Editing, das in einem Neoantigen resultierte²⁴⁷. Oxaliplatin zählt auch zu den

Chemotherapeutika, die zur Induktion des immunogenen Zelltodes beitragen. Dieser ist charakterisiert von der Präsentation sogenannter *damage-associated molecular patterns* (Calreticulin und Hitzeschockproteine), die als „Iss mich“-Signal für Immunzellen und als Kostimulatoren wirken²⁴⁸. Dadurch können Anthrazykline, DNA-alkylierende Zyklophosphamide und Platinderivate wie Oxaliplatin die antitumorale Antwort des Immunsystems stärken²⁴⁸.

Diese synergistischen Effekte verschiedener Therapieformen zeigen, dass die Kombination unterschiedlicher Wirkmechanismen den größtmöglichen Nutzen im Patienten erzielen würde. So werden T-Zellen zwar häufig durch tumorspezifische Peptide aktiviert, doch ist die Tumorerkennung und –eliminierung häufig durch immunsuppressive Mechanismen seitens der Tumorzellen gehemmt. Außerdem zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Tumorzellen nicht nur einen alleinigen Mechanismus zur Abwehr der Immunantwort, wie beispielsweise die Expression von Immuncheckpointliganden oder die verminderte Expression von HLA-Molekülen, nutzen. Wahrscheinlicher ist eine Kombination verschiedener Stellschrauben, um die T-Zell – Tumorzell – Interaktion protumorigen zu modulieren. Demnach sollte eine zukünftige Tumorstimmung mit weiteren Therapieformen ergänzt werden, um die dynamische Adaption von Tumorzellen an die Immunüberwachung zu durchbrechen.

VI. Zusammenfassung

Die Behandlung von Krebserkrankungen, darunter auch das kolorektale Karzinom (KRK), stellt noch immer eine große Herausforderung dar und nicht alle Patientinnen und Patienten profitieren von den bisher zugelassenen Therapieoptionen. Doch die Immuntherapie ist ein vielversprechender Ansatz, um durch die Stärkung der körpereigenen Tumorabwehr zur Eliminierung des Tumors zu führen.

Ziel der vorgelegten Arbeit war es die Interaktion von Tumorzellen und autologen T-Zellen zu analysieren. Die verwendeten KRK-Zelllinien HROC113 und HROC285 T0 M2 wurden aufgrund ihrer hohen Mutationslast sowie der konstitutiven und induzierbaren Expression von HLA I und HLA II ausgewählt. Eine Untersuchung der PD-L1-Expression ergab, dass dieser Immuncheckpointligand auf mindestens 80 % der Zellen beider Tumorzelllinien exprimiert wurde. Auch der CTLA-4-Ligand CD80/86 wurde auf bis zu 40 % der HROC113 und ca. 15 % der HROC285 T0 M2 nachgewiesen. Der immunregulatorische Faktor FGL1 wurde jedoch nicht im Überstand der analysierten Zelllinien detektiert.

Die peripheren und tumorinfiltrierenden T-Zellen der Patientinnen (Tc und TiTc) wurden zunächst *in vitro* expandiert und anschließend hinsichtlich ihrer Subpopulationszugehörigkeit charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die peripheren T-Zellen von CD8⁺ T-Gedächtniszellen geprägt waren, die tumorinfiltrierenden T-Zellen jedoch eine vollkommen andere Zusammensetzung der Subpopulationen aufwiesen. Innerhalb der TiTc HROC113 dominierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektorzellen, wohingegen in den TiTc HROC285 CD4⁺ T-Gedächtniszellen vorherrschten. Der Anteil regulatorischer (CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺) und erschöpfter T-Zellen (PD-1⁺/CTLA-4⁺/LAG-3⁺) war in beiden Populationen eher gering. Doch der Großteil der analysierten Zellen zeigte eine Expression von CTLA-4 und LAG-3.

Die Kokulturversuche von T-Zellen und autologen Tumorzellen zeigten auf, dass keine Aktivierung der T-Zellen durch die Tumorzellen stattfand. Auch die Zugabe der Immuncheckpointinhibitoren (ICI) anti-PD-1, anti-CTLA-4, anti-PD-L1 sowie anti-LAG-3 führte weder einzeln noch in Kombination zu einer signifikant verbesserten Tumorzellerkennung. Die nähere Untersuchung der Interaktion von T-Zellen und autologen Tumorzellen bestätigte, dass auch sezernierte Faktoren eine Rolle spielten. Im Kulturüberstand wurden die Zytokine GM-CSF, IL-5, IL-6 und IL-17a detektiert, denen teilweise bereits protumorigene Eigenschaften nachgewiesen wurden. Versuche mit blockierenden Antikörpern der Komplexe HLA I und HLA II bewiesen, dass auch weitere nicht-klassische HLA-Komplexe in die Präsentation von Tumorantigenen involviert waren.

Das komplexe Konstrukt immunregulatorischer Mechanismen, das den Tumor vor antitumoralen Immunantworten schützte, sollte durch die spezifische Stimulation von patienteneigenen T-Zellen durchbrochen werden. Dazu wurden insgesamt 100 tumorspezifische Peptide aus Ligandomdaten identifiziert, die sich aus 97 kryptischen

Peptiden und drei mutierten Neoantigenen zusammensetzten. Dabei entfielen 70 kryptische Peptide und zwei Neoantigene auf HROC113 und 28 kryptische und ein mutiertes Neoantigen auf HROC285 T0 M2. Die expandierten peripheren und tumorinfiltrierenden T-Zellen wurden mithilfe von peptidbeladenen B-LCL der Patientinnen für 14-28 Tage stimuliert. Dabei wurden Peptidpools eingesetzt, die sich entsprechend der Bindungsprädiktion der kryptischen Peptide zusammensetzten. Die Stimulationen mit den Neoantigenen erfolgte separat. Im Anschluss wurde ein IFN γ -ELISpot durchgeführt, um die Immunogenität der Peptide zu testen. Dabei führten insgesamt 18 der tumorspezifischen kryptischen Peptide (HROC113: 16; HROC285: 2) zu einer IFN γ -Sekretion. Auch die Stimulation mit den mutierten Neoantigenen induzierte eine T-Zell-Aktivierung. Eine Tetramerfärbung zeigte auf, dass der Anteil neoantigen-spezifischer T-Zellen während der Peptidstimulation teilweise deutlich zunahm.

Die anschließende funktionelle Testung erfolgte anhand eines Degranulationstests. Dieser bewies, dass die Stimulation der T-Zellen sowohl mit immunogenen kryptischen Peptiden als auch mutierten Neoantigenen in einer erhöhten Tumorzellerkennung resultierte. Dies zeigte sich besonders deutlich bei TITc HROC113, wohingegen in den Tc HROC113 und Tc HROC285 nur die Stimulation mit immunogenen kryptischen Peptiden zu einer erhöhten Degranulation führte. Der Einsatz von ICI beeinflusste diese Effekte nicht signifikant.

Abschließende Analysen offenbarten, dass beide Tumorzelllinien eine deutliche Expression von PI-9 aufwiesen. Dieser Granzym-B-Inhibitor könnte dafür verantwortlich sein, dass die Tumolyse in Zytotoxizitätstests ausblieb, auch wenn aktivierte T-Zellen mit zytotoxischen Granula auf die autologen Tumorzellen geantwortet hatten. Zudem zeigte sich, dass PI-9 stärker in MSI-KRK-Zelllinien als in MSS-KRK-Zelllinien exprimiert wurde. Demnach trägt PI-9 dazu bei, dass MSI-Tumoren, obwohl sie verglichen mit MSS-Tumoren eine stärkere antitumorale Immunantwort auslösen, der Eliminierung durch aktivierte Immunzellen entgehen können.

Insgesamt wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Tumorzellen verschiedene Mechanismen gleichzeitig nutzen, um der Immunüberwachung zu entgehen. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass Tumorzellen spezifische Peptide präsentierten, die in einer Stimulation peptidspezifische T-Zell-Antworten auslösten. Diese aktivierten T-Zellen waren anschließend für eine signifikant verbesserte Tumorzellerkennung verantwortlich. Dabei wurde gezeigt, dass neben den tumorinfiltrierenden auch die peripheren T-Zellen der Patientinnen erfolgreich stimuliert wurden und so eine antitumorale Antwort induziert werden konnte. Außerdem führten sowohl klassische mutierte Neoantigene als auch nichtmutierte kryptische Peptide zu antitumoralen Antworten. Demnach eignen sich beide Formen der tumorspezifischen Peptide für die Entwicklung zukünftiger Tumorzelllinien, die mit weiteren Immunmodulatoren ergänzt werden sollten, um die immunregulatorischen Mechanismen der Tumorzellen auszuschalten.

VII. Literaturverzeichnis

1. H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **71** (3), 209–249 (2021).
 2. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), *Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe* (Berlin, 2021).
 3. B. Vogelstein, E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits, and J. L. Bos, "Genetic alterations during colorectal-tumor development," *The New England journal of medicine* **319** (9), 525–532 (1988).
 4. B. Vogelstein, E. R. Fearon, S. E. Kern, S. R. Hamilton, A. C. Preisinger, Y. Nakamura, and R. White, "Allelotype of colorectal carcinomas," *Science (New York, N.Y.)* **244** (4901), 207–211 (1989).
 5. M. S. Pino and D. C. Chung, "The chromosomal instability pathway in colon cancer," *Gastroenterology* **138** (6), 2059–2072 (2010).
 6. E. Nazemalhosseini Mojarad, P. J. Kuppen, H. A. Aghdaei, and M. R. Zali, "The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer," *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench* **6** (3), 120–128 (2013).
 7. S. A. Cohen and A. Leininger, "The genetic basis of Lynch syndrome and its implications for clinical practice and risk management," *The Application of Clinical Genetics* **7**, 147–158 (2014).
 8. The Cancer Genome Atlas Network, "Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer," *Nature* **487** (7407), 330–337 (2012).
 9. E. Vilar and S. B. Gruber, "Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence," *Nature reviews. Clinical oncology* **7** (3), 153–162 (2010).
 10. R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Goding Sauer, S. A. Fedewa, L. F. Butterly, J. C. Anderson, A. Cercek, R. A. Smith, and A. Jemal, "Colorectal cancer statistics, 2020," *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **70** (3), 145–164 (2020).
 11. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie), *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. Kurzversion 2.1* (2019).
 12. D. B. Longley and P. G. Johnston, "Molecular mechanisms of drug resistance," *The Journal of pathology* **205** (2), 275–292 (2005).
 13. J. B. Swann and M. J. Smyth, "Immune surveillance of tumors," *The Journal of clinical investigation* **117** (5), 1137–1146 (2007).
 14. K. M. Murphy and C. Weaver, *Janeway Immunologie*, 9. Aufl. (Springer Spektrum, Berlin, 2018).
-

15. M. J. Smyth, D. I. Godfrey, and J. A. Trapani, "A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy," *Nat Immunol* **2** (4), 293–299 (2001).
 16. G. P. Dunn, A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber, "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape," *Nat Immunol* **3** (11), 991–998 (2002).
 17. A. Diefenbach, E. R. Jensen, A. M. Jamieson, and D. H. Raulet, "Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity," *Nature* **413** (6852), 165–171 (2001).
 18. E. Ullrich, J. Koch, A. Cerwenka, and A. Steinle, "New prospects on the NKG2D/NKG2DL system for oncology," *Oncoimmunology* **2** (10), e26097 (2013).
 19. W. M. Yokoyama, "Now you see it, now you don't!," *Nat Immunol* **1** (2), 95–97 (2000).
 20. J. F. Bromberg, C. M. Horvath, Z. Wen, R. D. Schreiber, and J. E. Darnell, "Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93** (15), 7673–7678 (1996).
 21. K. P. Kotredes and A. M. Gamero, "Interferons as inducers of apoptosis in malignant cells," *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **33** (4), 162–170 (2013).
 22. C. P. Tensen, J. Flier, E. M. van der Raaij-Helmer, S. Sampat-Sardjoepersad, R. C. van der Schors, R. Leurs, R. J. Scheper, D. M. Boorsma, and R. Willemze, "Human IP-9: A keratinocyte-derived high affinity CXC-chemokine ligand for the IP-10/Mig receptor (CXCR3)," *The Journal of investigative dermatology* **112** (5), 716–722 (1999).
 23. Q. Gao and Y. Zhang, "CXCL11 Signaling in the Tumor Microenvironment," *Advances in experimental medicine and biology* **1302**, 41–50 (2021).
 24. A. L. Angiolillo, C. Sgadari, D. D. Taub, F. Liao, J. M. Farber, S. Maheshwari, H. K. Kleinman, G. H. Reaman, and G. Tosato, "Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo," *The Journal of experimental medicine* **182** (1), 155–162 (1995).
 25. C. M. Coughlin, K. E. Salhany, M. S. Gee, D. C. LaTemple, S. Kotenko, X. Ma, G. Gri, M. Wysocka, J. E. Kim, L. Liu, F. Liao, J. M. Farber, S. Pestka, G. Trinchieri, and W. M. Lee, "Tumor Cell Responses to IFN γ Affect Tumorigenicity and Response to IL-12 Therapy and Antiangiogenesis," *Immunity* **9** (1), 25–34 (1998).
 26. A. S. Dighe, E. Richards, L. J. Old, and R. D. Schreiber, "Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors," *Immunity* **1** (6), 447–456 (1994).
 27. S. H. van der Burg, R. Arens, F. Ossendorp, T. van Hall, and C. J. M. Melief, "Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion," *Nat Rev Cancer* **16** (4), 219–233 (2016).
-

28. G. L. Beatty and W. L. Gladney, "Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **21** (4), 687–692 (2015).
 29. R. D. Schreiber, L. J. Old, and M. J. Smyth, "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion," *Science (New York, N.Y.)* **331** (6024), 1565–1570 (2011).
 30. K. Dhatchinamoorthy, J. D. Colbert, and K. L. Rock, "Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation," *Frontiers in immunology* **12**, 636568 (2021).
 31. M. Campoli and S. Ferrone, "HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance," *Oncogene* **27** (45), 5869–5885 (2008).
 32. J. Bukur, S. Jasinski, and B. Seliger, "The role of classical and non-classical HLA class I antigens in human tumors," *Seminars in cancer biology* **22** (4), 350–358 (2012).
 33. P. Contini, M. Ghio, A. Poggi, G. Filaci, F. Indiveri, S. Ferrone, and F. Puppo, "Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation," *European journal of immunology* **33** (1), 125–134 (2003).
 34. E. D. Carosella, S. Gregori, and J. LeMaout, "The tolerogenic interplay(s) among HLA-G, myeloid APCs, and regulatory cells," *Blood* **118** (25), 6499–6505 (2011).
 35. F. Gros, F. Cabillic, O. Toutirais, A. Le Maux, Y. Sebti, and L. Amiot, "Soluble HLA-G molecules impair natural killer/dendritic cell crosstalk via inhibition of dendritic cells," *European journal of immunology* **38** (3), 742–749 (2008).
 36. A. Horuzsko, F. Lenfant, D. H. Munn, and A. L. Mellor, "Maturation of antigen-presenting cells is compromised in HLA-G transgenic mice," *International immunology* **13** (3), 385–394 (2001).
 37. M. L. Axelrod, R. S. Cook, D. B. Johnson, and J. M. Balko, "Biological Consequences of MHC-II Expression by Tumor Cells in Cancer," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **25** (8), 2392–2402 (2019).
 38. D. B. Johnson, M. V. Estrada, R. Salgado, V. Sanchez, D. B. Doxie, S. R. Opalenik, A. E. Vilgelm, E. Feld, A. S. Johnson, A. R. Greenplate, M. E. Sanders, C. M. Lovly, D. T. Frederick, M. C. Kelley, A. Richmond, J. M. Irish, Y. Shyr, R. J. Sullivan, I. Puzanov, J. A. Sosman, and J. M. Balko, "Melanoma-specific MHC-II expression represents a tumour-autonomous phenotype and predicts response to anti-PD-1/PD-L1 therapy," *Nature communications* **7**, 10582 (2016).
 39. I. A. Park, S.-H. Hwang, I. H. Song, S.-H. Heo, Y.-A. Kim, W. S. Bang, H. S. Park, M. Lee, G. Gong, and H. J. Lee, "Expression of the MHC class II in triple-negative breast cancer is associated with tumor-infiltrating lymphocytes and interferon signaling," *PLoS ONE* **12** (8), e0182786 (2017).
-

40. T. B. Turner, S. Meza-Perez, A. Londoño, A. Katre, J. E. Peabody, H. J. Smith, A. Forero, L. A. Norian, J. M. Straughn, D. J. Buchsbaum, T. D. Randall, and R. C. Arend, "Epigenetic modifiers upregulate MHC II and impede ovarian cancer tumor growth," *Oncotarget* **8** (27), 44159–44170 (2017).
 41. A. R. Younger, S. Amria, W. A. Jeffrey, A. E. M. Mahdy, O. G. Goldstein, J. S. Norris, and A. Haque, "HLA class II antigen presentation by prostate cancer cells," *Prostate cancer and prostatic diseases* **11** (4), 334–341 (2008).
 42. S. Michel, M. Linnebacher, J. Alcaniz, M. Voss, R. Wagner, W. Dippold, C. Becker, M. von Knebel Doeberitz, S. Ferrone, and M. Kloor, "Lack of HLA class II antigen expression in microsatellite unstable colorectal carcinomas is caused by mutations in HLA class II regulatory genes," *International journal of cancer. Journal international du cancer* **127** (4), 889–898 (2010).
 43. M. Moore, A. K. Ghosh, D. Johnston, and A. J. Street, "Expression of MHC class II products on human colorectal cancer. An immunohistological and flow cytometric study," *Journal of immunogenetics* **13** (2-3), 201–209 (1986).
 44. S. A. Bustin, S. R. Li, S. Phillips, and S. Dorudi, "Expression of HLA class II in colorectal cancer: evidence for enhanced immunogenicity of microsatellite-instability-positive tumours," *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **22** (5), 294–298 (2001).
 45. A. Groth, S. Klöss, E. P. von Strandmann, U. Koehl, and J. Koch, "Mechanisms of tumor and viral immune escape from natural killer cell-mediated surveillance," *Journal of innate immunity* **3** (4), 344–354 (2011).
 46. D. A. Thomas and J. Massagué, "TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance," *Cancer cell* **8** (5), 369–380 (2005).
 47. X. Sun, B. Wu, H.-C. Chiang, H. Deng, X. Zhang, W. Xiong, J. Liu, A. M. Rozeboom, B. T. Harris, E. Blommaert, A. Gomez, R. E. Garcia, Y. Zhou, P. Mitra, M. Prevost, D. Zhang, D. Banik, C. Isaacs, D. Berry, C. Lai, K. Chaldeckas, P. S. Latham, C. A. Brantner, A. Popratiloff, V. X. Jin, N. Zhang, Y. Hu, M. A. Pujana, T. J. Curiel, Z. An, and R. Li, "Tumour DDR1 promotes collagen fibre alignment to instigate immune exclusion," *Nature* **599** (7886), 673–678 (2021).
 48. M. Egeblad, M. G. Rasch, and V. M. Weaver, "Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution," *Current opinion in cell biology* **22** (5), 697–706 (2010).
 49. Y. Tie, F. Tang, Y. Wei, and X. Wei, "Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets," *J Hematol Oncol* **15** (1), 61 (2022).
 50. Y. Mi, N. Guo, J. Luan, J. Cheng, Z. Hu, P. Jiang, W. Jin, and X. Gao, "The Emerging Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Glioma Immune Suppressive Microenvironment," *Front. Immunol.* **11**, 737 (2020).
-

51. P. Hwu, M. X. Du, R. Lapointe, M. Do, M. W. Taylor, and H. A. Young, "Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **164** (7), 3596–3599 (2000).
52. Y. Fu, S. Liu, S. Zeng, and H. Shen, "From bench to bed: the tumor immune microenvironment and current immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma," *J Exp Clin Cancer Res* **38** (1), 396 (2019).
53. K. Shimizu, T. Iyoda, M. Okada, S. Yamasaki, and S. Fujii, "Immune suppression and reversal of the suppressive tumor microenvironment," *Int Immunol* **30** (10), 445–454 (2018).
54. H. Raskov, A. Orhan, S. Gaggari, and I. Gögenur, "Cancer-Associated Fibroblasts and Tumor-Associated Macrophages in Cancer and Cancer Immunotherapy," *Front. Oncol.* **11**, 668731 (2021).
55. Y. Ohue and H. Nishikawa, "Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target?," *Cancer Science* **110** (7), 2080–2089 (2019).
56. C. Camisaschi, C. Casati, F. Rini, M. Perego, A. de Filippo, F. Triebel, G. Parmiani, F. Belli, L. Rivoltini, and C. Castelli, "LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **184** (11), 6545–6551 (2010).
57. L. W. Collison, C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg, and D. A. A. Vignali, "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function," *Nature* **450** (7169), 566–569 (2007).
58. E. A. Green, L. Gorelik, C. M. McGregor, E. H. Tran, and R. A. Flavell, "CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100** (19), 10878–10883 (2003).
59. T. L. Walunas, C. Y. Bakker, and J. A. Bluestone, "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation," *The Journal of experimental medicine* **183** (6), 2541–2550 (1996).
60. K. S. Peggs, S. A. Quezada, and J. P. Allison, "Cell intrinsic mechanisms of T-cell inhibition and application to cancer therapy," *Immunological Reviews* **224** (1), 141–165 (2008).
61. M. C. Brunner, C. A. Chambers, F. K. Chan, J. Hanke, A. Winoto, and J. P. Allison, "CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **162** (10), 5813–5820 (1999).
62. B. T. Fife and J. A. Bluestone, "Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways," *Immunological Reviews* **224** (1), 166–182 (2008).

63. S. E. Sandner, M. R. Clarkson, A. D. Salama, A. Sanchez-Fueyo, C. Domenig, A. Habicht, N. Najafian, H. Yagita, M. Azuma, L. A. Turka, and M. H. Sayegh, "Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **174** (6), 3408–3415 (2005).
 64. X. Cheng, Z. Zhao, E. Ventura, B. Gran, K. S. Shindler, and A. Rostami, "The PD-1/PD-L pathway is up-regulated during IL-12-induced suppression of EAE mediated by IFN-gamma," *Journal of neuroimmunology* **185** (1-2), 75–86 (2007).
 65. F. Triebel, S. Jitsukawa, E. Baixeras, S. Roman-Roman, C. Genevee, E. Viegas-Pequignot, and T. Hercend, "LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4," *The Journal of experimental medicine* **171** (5), 1393–1405 (1990).
 66. L. Long, X. Zhang, F. Chen, Q. Pan, P. Phiphatwatchara, Y. Zeng, and H. Chen, "The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy," *Genes & Cancer* **9** (5-6), 176–189 (2018).
 67. J. Wang, M. F. Sanmamed, I. Datar, T. T. Su, L. Ji, J. Sun, L. Chen, Y. Chen, G. Zhu, W. Yin, L. Zheng, T. Zhou, T. Badri, S. Yao, S. Zhu, A. Boto, M. Sznol, I. Melero, D. A. A. Vignali, K. Schalper, and L. Chen, "Fibrinogen-like Protein 1 Is a Major Immune Inhibitory Ligand of LAG-3," *Cell* **176** (1-2), 334-347.e12 (2019).
 68. D. R. Leach, M. F. Krummel, and J. P. Allison, "Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade," *Science (New York, N.Y.)* **271** (5256), 1734–1736 (1996).
 69. K. P. Papadopoulos, N. J. Lakhani, M. L. Johnson, H. Park, D. Wang, T. A. Yap, A. Dowlati, R. G. Maki, F. Lynce, S. V. Ulahannan, K. Kelly, T. N. Sims, A.-L. Bredlau, D. Bramble, A. Gonzalez Ortiz, M. Zhu, H. Chen, M. Karasarides, and G. Kroog, "First-in-human study of REGN3767 (R3767), a human LAG-3 monoclonal antibody (mAb), ± cemiplimab in patients (pts) with advanced malignancies," *JCO* **37** (15_suppl), 2508 (2019).
 70. M. L. Johnson, M. R. Patel, M. Cherry, Y.-K. Kang, K. Yamaguchi, D.-Y. Oh, M. A. Hussein, S. Kitano, S. Kondo, A. R. Hansen, I. J. Percent, B. George, E. Arrowsmith, M. Morimoto, C. Duffy, M. Ge, M. Rohrbacher, M. M. Elgadi, and J. C. Bendell, "Safety of BI 754111, an anti-LAG-3 monoclonal antibody (mAb), in combination with BI 754091, an anti-PD-1 mAb, in patients with advanced solid tumors," *JCO* **38** (15_suppl), 3063 (2020).
 71. P. Schöffski, D. S. W. Tan, M. Martín, M. Ochoa-de-Olza, J. Sarantopoulos, R. D. Carvajal, C. Kyi, T. Esaki, A. Prawira, W. Akerley, F. de Braud, R. Hui, T. Zhang, R. A. Soo, M. Maur, A. Weickhardt, J. Krauss, B. Deschler-Baier, A. Lau, T. S. Samant, T. Longmire, N. R. Chowdhury, C. A. Sabatos-Peyton, N. Patel, R. Ramesh, T. Hu, A. Carion, D. Gusenleitner, P. Yerramilli-Rao, V. Askoxylakis, E. L. Kwak, and D. S. Hong, "Phase I/II study of the LAG-3 inhibitor ieramilimab (LAG525) ± anti-PD-1 spartalizumab
-

- (PDR001) in patients with advanced malignancies,” *J Immunother Cancer* **10** (2), e003776 (2022).
72. M. Patel, J. Luke, E. Hamilton, B. Chmielowski, G. Blumenschein, H. Kindler, S. Bahadur, C. Santa-Maria, J. Kouček, J. Sun, S. Kaul, F. Chen, X. Zhang, J. Muth, P. Kaminker, P. Moore, B. Sumrow, and S. Ulahannan, “313 A phase 1 evaluation of tebotelimab, a bispecific PD-1 x LAG-3 DART® molecule, in combination with margetuximab in patients with advanced HER2+ neoplasms,” *J Immunother Cancer* **8** (Suppl 3), A193.1-A193 (2020).
73. T. Yap, D. Wong, S. Hu-Lieskovan, K. Papadopoulos, M. Morrow, U. Grabowska, D. Gliddon, J.-B. Holz, and P. LoRusso, “395 A first-in-human study of FS118, a tetravalent bispecific antibody targeting LAG-3 and PD-L1, in patients with advanced cancer and resistance to PD-(L)1 therapy,” *J Immunother Cancer* **8** (Suppl 3), A240-A240 (2020).
74. V. Atkinson, A. Khattak, A. Haydon, M. Eastgate, A. Roy, P. Prithviraj, C. Mueller, C. Brignone, and F. Triebel, “Eftilagimod alpha, a soluble lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) protein plus pembrolizumab in patients with metastatic melanoma,” *J Immunother Cancer* **8** (2), e001681 (2020).
75. J. A. Marin-Acevedo, E. O. Kimbrough, and Y. Lou, “Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond,” *J Hematol Oncol* **14** (1), 45 (2021).
76. Z. Qin and T. Blankenstein, “CD4 + T Cell–Mediated Tumor Rejection Involves Inhibition of Angiogenesis that Is Dependent on IFN γ Receptor Expression by Nonhematopoietic Cells,” *Immunity* **12** (6), 677–686 (2000).
77. T. A. Chan, M. Yarchoan, E. Jaffee, C. Swanton, S. A. Quezada, A. Stenzinger, and S. Peters, “Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic,” *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **30** (1), 44–56 (2019).
78. R. Cristescu, D. Aurora-Garg, A. Albright, L. Xu, X. Q. Liu, A. Loboda, L. Lang, F. Jin, E. H. Rubin, A. Snyder, and J. Lunceford, “Tumor mutational burden predicts the efficacy of pembrolizumab monotherapy: a pan-tumor retrospective analysis of participants with advanced solid tumors,” *J Immunother Cancer* **10** (1), e003091 (2022).
79. T. Huang, X. Chen, H. Zhang, Y. Liang, L. Li, H. Wei, W. Sun, and Y. Wang, “Prognostic Role of Tumor Mutational Burden in Cancer Patients Treated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis,” *Front. Oncol.* **11**, 706652 (2021).
80. D. T. Le, J. N. Uram, H. Wang, B. R. Bartlett, H. Kemberling, A. D. Eyring, A. D. Skora, B. S. Luber, N. S. Azad, D. Laheru, B. Biedrzycki, R. C. Donehower, A. Zaheer, G. A. Fisher, T. S. Crocenzi, J. J. Lee, S. M. Duffy, R. M. Goldberg, A. de La Chapelle, M. Koshiji, F. Bhajee, T. Huebner, R. H. Hruban, L. D. Wood, N. Cuka, D. M. Pardoll, N. Papadopoulos, K. W. Kinzler, S. Zhou, T. C. Cornish, J. M. Taube, R. A. Anders, J. R.
-

- Eshleman, B. Vogelstein, and L. A. Diaz, "PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency," *The New England journal of medicine* **372** (26), 2509–2520 (2015).
81. R. Gupta, S. Sinha, and R. N. Paul, "The impact of microsatellite stability status in colorectal cancer," *Current problems in cancer* **42** (6), 548–559 (2018).
82. N. J. Llosa, M. Cruise, A. Tam, E. C. Wicks, E. M. Hechenbleikner, J. M. Taube, R. L. Blosser, H. Fan, H. Wang, B. S. Lubber, M. Zhang, N. Papadopoulos, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, C. L. Sears, R. A. Anders, D. M. Pardoll, and F. Housseau, "The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints," *Cancer discovery* **5** (1), 43–51 (2015).
83. P. GOLD and S. O. FREEDMAN, "DEMONSTRATION OF TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN HUMAN COLONIC CARCINOMATA BY IMMUNOLOGICAL TOLERANCE AND ABSORPTION TECHNIQUES," *The Journal of experimental medicine* **121** (3), 439–462 (1965).
84. P. M. S. Alves, S. Viatte, T. Fagerberg, O. Michielin, G. Bricard, H. Bouzourene, H. Vuilleumier, T. Kruger, J.-C. Givel, F. Lévy, D. E. Speiser, J.-C. Cerottini, and P. Romero, "Immunogenicity of the carcinoembryonic antigen derived peptide 694 in HLA-A2 healthy donors and colorectal carcinoma patients," *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **56** (11), 1795–1805 (2007).
85. S. K. Nair, S. Hull, D. Coleman, E. Gilboa, H. K. Lyerly, and M. A. Morse, "Induction of carcinoembryonic antigen (cea)-specific cytotoxic t-lymphocyte responses *In vitro* using autologous dendritic cells loaded with cea peptide or cea rna in patients with metastatic malignancies expressing cea," *International journal of cancer. Journal international du cancer* **82** (1), 121–124 (1999).
86. S. Zaremba, E. Barzaga, M. Zhu, N. Soares, K. Y. Tsang, and J. Schlom, "Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen," *Cancer research* **57** (20), 4570–4577 (1997).
87. J.-S. Park, H.-S. Kim, H.-M. Park, C.-H. Kim, and T.-G. Kim, "Efficient induction of anti-tumor immunity by a TAT-CEA fusion protein vaccine with poly(I:C) in a murine colorectal tumor model," *Vaccine* **29** (47), 8642–8648 (2011).
88. V. Salucci, C. Mennuni, F. Calvaruso, R. Cerino, P. Neuner, G. Ciliberto, N. La Monica, and E. Scarselli, "CD8+ T-cell tolerance can be broken by an adenoviral vaccine while CD4+ T-cell tolerance is broken by additional co-administration of a Toll-like receptor ligand," *Scandinavian journal of immunology* **63** (1), 35–41 (2006).
89. L. Fong, Y. Hou, A. Rivas, C. Benike, A. Yuen, G. A. Fisher, M. M. Davis, and E. G. Engleman, "Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** (15), 8809–8814 (2001).
-

90. W. J. Lesterhuis, I. J. M. de Vries, D. H. Schuurhuis, A. C. I. Boullart, J. F. M. Jacobs, A. J. de Boer, N. M. Scharenborg, H. M. H. Brouwer, M. W. M. M. van de Rakt, C. G. Figdor, T. J. Ruers, G. J. Adema, and C. J. A. Punt, "Vaccination of colorectal cancer patients with CEA-loaded dendritic cells: antigen-specific T cell responses in DTH skin tests," *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **17** (6), 974–980 (2006).
 91. K.-J. Liu, C.-C. Wang, L.-T. Chen, A.-L. Cheng, D.-T. Lin, Y.-C. Wu, W.-L. Yu, Y.-M. Hung, H.-Y. Yang, S.-H. Juang, and J. Whang-Peng, "Generation of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell responses in HLA-A*0201 and HLA-A*2402 late-stage colorectal cancer patients after vaccination with dendritic cells loaded with CEA peptides," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10** (8), 2645–2651 (2004).
 92. K. Okuno, F. Sugiura, K. Itoh, K. Yoshida, T. Tsunoda, and Y. Nakamura, "Recent advances in active specific cancer vaccine treatment for colorectal cancer," *Current pharmaceutical biotechnology* **13** (8), 1439–1445 (2012).
 93. J. Choi and H. Chang, "The expression of MAGE and SSX, and correlation of COX2, VEGF, and survivin in colorectal cancer," *Anticancer research* **32** (2), 559–564 (2012).
 94. S. P. Kerkar, Z.-F. Wang, J. Lasota, T. Park, K. Patel, E. Groh, S. A. Rosenberg, and M. M. Miettinen, "MAGE-A is More Highly Expressed Than NY-ESO-1 in a Systematic Immunohistochemical Analysis of 3668 Cases," *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* **39** (4), 181–187 (2016).
 95. H. M. C. Shantha Kumara, M. J. Grieco, O. L. Caballero, T. Su, A. Ahmed, E. Ritter, S. Gnjatic, V. Cekic, L. J. Old, A. J. Simpson, C. Cordon-Cardo, and R. L. Whelan, "MAGE-A3 is highly expressed in a subset of colorectal cancer patients," *Cancer immunity* **12**, 16 (2012).
 96. B. Kavanagh, A. Ko, A. Venook, K. Margolin, H. Zeh, M. Lotze, B. Schillinger, W. Liu, Y. Lu, P. Mitsky, M. Schilling, N. Bercovici, M. Loudovaris, R. Guillermo, S. M. Lee, J. Bender, B. Mills, and L. Fong, "Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides," *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* **30** (7), 762–772 (2007).
 97. N. Takahashi, T. Ohkuri, S. Homma, J. Ohtake, D. Wakita, Y. Togashi, H. Kitamura, S. Todo, and T. Nishimura, "First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/ killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen," *Cancer Science* **103** (1), 150–153 (2012).
 98. V. Karanikas, G. Thynne, P. Mitchell, C.-S. Ong, D. Gunawardana, R. Blum, J. Pearson, J. Lodding, G. Pietersz, R. Broadbent, B. Tait, and I. F. C. McKenzie, "Mannan Mucin-1 Peptide Immunization: Influence of Cyclophosphamide and the Route of Injection,"
-

- Journal of immunotherapy : official journal of the Society for Biological Therapy **24** (2), 172–183 (2001).
99. T. Kimura, J. R. McKolanis, L. A. Dzubinski, K. Islam, D. M. Potter, A. M. Salazar, R. E. Schoen, and O. J. Finn, "MUC1 vaccine for individuals with advanced adenoma of the colon: a cancer immunoprevention feasibility study," *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* **6** (1), 18–26 (2013).
100. L. Zheng, B. H. Edil, K. C. Soares, K. El-Shami, J. N. Uram, C. Judkins, Z. Zhang, B. Onners, D. Laheru, D. Pardoll, E. M. Jaffee, and R. D. Schulick, "A safety and feasibility study of an allogeneic colon cancer cell vaccine administered with a granulocyte-macrophage colony stimulating factor-producing bystander cell line in patients with metastatic colorectal cancer," *Annals of surgical oncology* **21** (12), 3931–3937 (2014).
101. S. Idenoue, Y. Hirohashi, T. Torigoe, Y. Sato, Y. Tamura, H. Hariu, M. Yamamoto, T. Kurotaki, T. Tsuruma, H. Asanuma, T. Kanaseki, H. Ikeda, K. Kashiwagi, M. Okazaki, K. Sasaki, T. Sato, T. Ohmura, F. Hata, K. Yamaguchi, K. Hirata, and N. Sato, "A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11** (4), 1474–1482 (2005).
102. T. Tsuruma, F. Hata, T. Torigoe, T. Furuhashi, S. Idenoue, T. Kurotaki, M. Yamamoto, A. Yagihashi, T. Ohmura, K. Yamaguchi, T. Katsuramaki, T. Yasoshima, K. Sasaki, Y. Mizushima, H. Minamida, H. Kimura, M. Akiyama, Y. Hirohashi, H. Asanuma, Y. Tamura, K. Shimozawa, N. Sato, and K. Hirata, "Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer," *Journal of translational medicine* **2** (1), 19 (2004).
103. K. Okuno, F. Sugiura, J.-I. Hida, T. Tokoro, E. Ishimaru, Y. SUKEGAWA, and K. Ueda, "Phase I clinical trial of a novel peptide vaccine in combination with UFT/LV for metastatic colorectal cancer," *Experimental and therapeutic medicine* **2** (1), 73–79 (2011).
104. K. Okuno, F. Sugiura, K. INOUE, and Y. SUKEGAWA, "Clinical trial of a 7-peptide cocktail vaccine with oral chemotherapy for patients with metastatic colorectal cancer," *Anticancer research* **34** (6), 3045–3052 (2014).
105. S. Hazama, Y. Nakamura, H. Takenouchi, N. Suzuki, R. Tsunedomi, Y. Inoue, Y. Tokuhisa, N. Iizuka, S. Yoshino, K. Takeda, H. Shinozaki, A. Kamiya, H. Furukawa, and M. Oka, "A phase I study of combination vaccine treatment of five therapeutic epitope-peptides for metastatic colorectal cancer; safety, immunological response, and clinical outcome," *Journal of translational medicine* **12**, 63 (2014).
106. Y. Sato, Y. Maeda, H. Shomura, T. Sasatomi, M. Takahashi, Y. Une, M. Kondo, T. Shinohara, N. Hida, K. Katagiri, K. Sato, M. Sato, A. Yamada, H. Yamana, M. Harada, K.
-

- Itoh, and S. Todo, "A phase I trial of cytotoxic T-lymphocyte precursor-oriented peptide vaccines for colorectal carcinoma patients," *British journal of cancer* **90** (7), 1334–1342 (2004).
107. T. Hattori, T. Mine, N. Komatsu, A. Yamada, K. Itoh, H. Shiozaki, and K. Okuno, "Immunological evaluation of personalized peptide vaccination in combination with UFT and UZEL for metastatic colorectal carcinoma patients," *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **58** (11), 1843–1852 (2009).
108. Y. Sato, T. Fujiwara, T. Mine, H. Shomura, S. Homma, Y. Maeda, N. Tokunaga, Y. Ikeda, Y. Ishihara, A. Yamada, N. Tanaka, K. Itoh, M. Harada, and S. Todo, "Immunological evaluation of personalized peptide vaccination in combination with a 5-fluorouracil derivative (TS-1) for advanced gastric or colorectal carcinoma patients," *Cancer Science* **98** (7), 1113–1119 (2007).
109. T. N. Schumacher and R. D. Schreiber, "Neoantigens in cancer immunotherapy," *Science (New York, N.Y.)* **348** (6230), 69–74 (2015).
110. S. D. Brown, R. L. Warren, E. A. Gibb, S. D. Martin, J. J. Spinelli, B. H. Nelson, and R. A. Holt, "Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival," *Genome research* **24** (5), 743–750 (2014).
111. M. Giannakis, X. J. Mu, S. A. Shukla, Z. R. Qian, O. Cohen, R. Nishihara, S. Bahl, Y. Cao, A. Amin-Mansour, M. Yamauchi, Y. Sukawa, C. Stewart, M. Rosenberg, K. Mima, K. Inamura, K. Nosho, J. A. Nowak, M. S. Lawrence, E. L. Giovannucci, A. T. Chan, K. Ng, J. A. Meyerhardt, E. M. van Allen, G. Getz, S. B. Gabriel, E. S. Lander, C. J. Wu, C. S. Fuchs, S. Ogino, and L. A. Garraway, "Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma," *Cell reports* **17** (4), 1206 (2016).
112. H. J. Andreyev, A. R. Norman, D. Cunningham, J. R. Oates, and P. A. Clarke, "Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study," *Journal of the National Cancer Institute* **90** (9), 675–684 (1998).
113. J. L. Bos, E. R. Fearon, S. R. Hamilton, M. Verlaan-de Vries, J. H. van Boom, A. J. van der Eb, and B. Vogelstein, "Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers," *Nature* **327** (6120), 293–297 (1987).
114. S. N. Khleif, S. I. Abrams, J. M. Hamilton, E. Bergmann-Leitner, A. Chen, A. Bastian, S. Bernstein, Y. Chung, C. J. Allegra, and J. Schlom, "A phase I vaccine trial with peptides reflecting ras oncogene mutations of solid tumors," *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* **22** (2), 155–165 (1999).
115. Q. J. Wang, Z. Yu, K. Griffith, K. Hanada, N. P. Restifo, and J. C. Yang, "Identification of T-cell Receptors Targeting KRAS-Mutated Human Tumors," *Cancer immunology research* **4** (3), 204–214 (2016).
-

116. A. Toubaji, M. Achar, M. Provenzano, V. E. Herrin, R. Behrens, M. Hamilton, S. Bernstein, D. Venzon, B. Gause, F. Marincola, and S. N. Khleif, "Pilot study of mutant ras peptide-based vaccine as an adjuvant treatment in pancreatic and colorectal cancers," *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **57** (9), 1413–1420 (2008).
117. E. Tran, P. F. Robbins, Y.-C. Lu, T. D. Prickett, J. J. Gartner, L. Jia, A. Pasetto, Z. Zheng, S. Ray, E. M. Groh, I. R. Kriley, and S. A. Rosenberg, "T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer," *The New England journal of medicine* **375** (23), 2255–2262 (2016).
118. O. E. Rahma, J. M. Hamilton, M. Wojtowicz, O. Dakheel, S. Bernstein, D. J. Liewehr, S. M. Steinberg, and S. N. Khleif, "The immunological and clinical effects of mutated ras peptide vaccine in combination with IL-2, GM-CSF, or both in patients with solid tumors," *Journal of translational medicine* **12**, 55 (2014).
119. M. Linnebacher, J. Gebert, W. Rudy, S. Woerner, Y. P. Yuan, P. Bork, and M. von Knebel Doeberitz, "Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens," *International journal of cancer* **93** (1), 6–11 (2001).
120. I. Saeterdal, J. Bjørheim, K. Lislørud, M. K. Gjertsen, I. K. Bukholm, O. C. Olsen, J. M. Nesland, J. A. Eriksen, M. Møller, A. Lindblom, and G. Gaudernack, "Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** (23), 13255–13260 (2001).
121. E. M. Inderberg, S. Wälchli, M. R. Myhre, S. Trachsel, H. Almåsbak, G. Kvalheim, and G. Gaudernack, "T cell therapy targeting a public neoantigen in microsatellite instable colon cancer reduces in vivo tumor growth," *Oncoimmunology* **6** (4), e1302631 (2017).
122. Y. Garbe, C. Maletzki, and M. Linnebacher, "An MSI tumor specific frameshift mutation in a coding microsatellite of MSH3 encodes for HLA-A0201-restricted CD8+ cytotoxic T cell epitopes," *PLoS ONE* **6** (11), e26517 (2011).
123. E. Ripberger, M. Linnebacher, Y. Schwitalle, J. Gebert, and M. von Knebel Doeberitz, "Identification of an HLA-A0201-restricted CTL epitope generated by a tumor-specific frameshift mutation in a coding microsatellite of the OGT gene," *Journal of clinical immunology* **23** (5), 415–423 (2003).
124. Y. Schwitalle, M. Linnebacher, E. Ripberger, J. Gebert, and M. von Knebel Doeberitz, "Immunogenic peptides generated by frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient cancer cells," *Cancer immunity* **4**, 14 (2004).
125. M. Kloor, M. Reuschenbach, J. Karbach, M.-R. Rafiyan, S.-E. Al-Batran, C. Pauligk, E. Jaeger, and M. von Knebel Doeberitz, "Vaccination of MSI-H colorectal cancer patients with frameshift peptide antigens: A phase I/IIa clinical trial," *JCO* **32** (15_suppl), e14530-e14530 (2014).
-

126. A. Marcu, A. Schlosser, A. Keupp, N. Trautwein, P. Johann, M. Wöfl, J. Lager, C. M. Monoranu, J. S. Walz, L. M. Henkel, J. Krauß, M. Ebinger, M. Schuhmann, U. W. Thomale, T. Pietsch, E. Klinker, P. G. Schlegel, F. Oyen, Y. Reisner, H.-G. Rammensee, and M. Eyrich, "Natural and cryptic peptides dominate the immunopeptidome of atypical teratoid rhabdoid tumors," *J Immunother Cancer* **9** (10) (2021).
127. C. Chong, M. Müller, H. Pak, D. Harnett, F. Huber, D. Grun, M. Leleu, A. Auger, M. Arnaud, B. J. Stevenson, J. Michaux, I. Bilic, A. Hirsekorn, L. Calviello, L. Simó-Riudalbas, E. Planet, J. Lubiński, M. Bryśkiewicz, M. Wiznerowicz, I. Xenarios, L. Zhang, D. Trono, A. Harari, U. Ohler, G. Coukos, and M. Bassani-Sternberg, "Integrated proteogenomic deep sequencing and analytics accurately identify non-canonical peptides in tumor immunopeptidomes," *Nature communications* **11** (1), 1293 (2020).
128. F. Erhard, L. Dölken, B. Schilling, and A. Schlosser, "Identification of the Cryptic HLA-I Immunopeptidome," *Cancer immunology research* **8** (8), 1018–1026 (2020).
129. S. P. Haen, M. W. Löffler, H.-G. Rammensee, and P. Brossart, "Towards new horizons: characterization, classification and implications of the tumour antigenic repertoire," *Nature reviews. Clinical oncology* **17** (10), 595–610 (2020).
130. C. M. Laumont, T. Daouda, J.-P. Laverdure, É. Bonneil, O. Caron-Lizotte, M.-P. Hardy, D. P. Granados, C. Durette, S. Lemieux, P. Thibault, and C. Perreault, "Global proteogenomic analysis of human MHC class I-associated peptides derived from non-canonical reading frames," *Nature communications* **7**, 10238 (2016).
131. A. Bredenbeck, F. O. Losch, T. Sharav, M. Eichler-Mertens, M. Filter, A. Givehchi, W. Sterry, P. Wrede, and P. Walden, "Identification of noncanonical melanoma-associated T cell epitopes for cancer immunotherapy," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **174** (11), 6716–6724 (2005).
132. Y. Kikuchi, S. Tokita, T. Hirama, V. Kochin, M. Nakatsugawa, T. Shinkawa, Y. Hirohashi, T. Tsukahara, F. Hata, I. Takemasa, N. Sato, T. Kanaseki, and T. Torigoe, "CD8+ T-cell Immune Surveillance against a Tumor Antigen Encoded by the Oncogenic Long Noncoding RNA PVT1," *Cancer immunology research* **9** (11), 1342–1353 (2021).
133. S. Tokita, T. Kanaseki, and T. Torigoe, "Therapeutic Potential of Cancer Vaccine Based on MHC Class I Cryptic Peptides Derived from Non-Coding Regions," *Immuno* **1** (4), 424–431 (2021).
134. S. Wagner, C. S. Mullins, and M. Linnebacher, "Colorectal cancer vaccines: Tumor-associated antigens vs neoantigens," *World journal of gastroenterology* **24** (48), 5418–5432 (2018).
135. C. S. Mullins, B. Micheel, S. Matschos, M. Leuchter, F. Bürtin, M. Krohn, M. Hühns, E. Klar, F. Prall, and M. Linnebacher, "Integrated Biobanking and Tumor Model

- Establishment of Human Colorectal Carcinoma Provides Excellent Tools for Preclinical Research,” *Cancers* **11** (10) (2019).
136. W. Boyle and A. Chow, “Isolation of human lymphocytes by a Ficoll barrier method,” *Transfusion* **9** (3), 151–155 (1969).
137. G. Tosato and J. I. Cohen, “Generation of Epstein-Barr Virus (EBV)-immortalized B cell lines,” *Current protocols in immunology* **Chapter 7**, Unit 7.22 (2007).
138. M. E. Dudley, J. R. Wunderlich, T. E. Shelton, J. Even, and S. A. Rosenberg, “Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients,” *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* **26** (4), 332–342 (2003).
139. C. M. Cattaneo, K. K. Dijkstra, L. F. Fanchi, S. Kelderman, S. Kaing, N. van Rooij, S. van den Brink, T. N. Schumacher, and E. E. Voest, “Tumor organoid-T-cell coculture systems,” *Nat Protoc* **15** (1), 15–39 (2020).
140. C. M. Cattaneo, K. K. Dijkstra, L. F. Fanchi, S. Kelderman, S. Kaing, N. van Rooij, S. van den Brink, T. N. Schumacher, and E. E. Voest, “Tumor organoid-T-cell coculture systems,” *Nat Protoc* **15** (1), 15–39 (2020).
141. A. Marcu, L. Bichmann, L. Kuchenbecker, D. J. Kowalewski, L. K. Freudenmann, L. Backert, L. Mühlenbruch, A. Szolek, M. Lübke, P. Wagner, T. Engler, S. Matovina, J. Wang, M. Hauri-Hohl, R. Martin, K. Kapolou, J. S. Walz, J. Velz, H. Moch, L. Regli, M. Silginer, M. Weller, M. W. Löffler, F. Erhard, A. Schlosser, O. Kohlbacher, S. Stevanović, H.-G. Rammensee, and M. C. Neidert, “HLA Ligand Atlas: a benign reference of HLA-presented peptides to improve T-cell-based cancer immunotherapy,” *J Immunother Cancer* **9** (4), e002071 (2021).
142. Paul Ehrlich, “Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung,” *Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde* (53), 273–290 (1909).
143. T. Løvig, S. N. Andersen, L. Thorstensen, C. B. Diep, G. I. Meling, R. A. Lothe, and T. O. Rognum, “Strong HLA-DR expression in microsatellite stable carcinomas of the large bowel is associated with good prognosis,” *British journal of cancer* **87** (7), 756–762 (2002).
144. H. J. Son, E. J. Choi, N. J. Yoo, and S. H. Lee, “Inactivating mutations of class II transactivator (CIITA) gene in gastric and colorectal cancers,” *Pathology, research and practice* **216** (10), 153110 (2020).
145. A. Forero, Y. Li, D. Chen, W. E. Grizzle, K. L. Updike, N. D. Merz, E. Downs-Kelly, T. C. Burwell, C. Vaklavas, D. J. Buchsbaum, R. M. Myers, A. F. LoBuglio, and K. E. Varley, “Expression of the MHC Class II Pathway in Triple-Negative Breast Cancer Tumor Cells Is Associated with a Good Prognosis and Infiltrating Lymphocytes,” *Cancer immunology research* **4** (5), 390–399 (2016).
-

146. L. Mortara, P. Castellani, R. Meazza, G. Tosi, A. de Lerma Barbaro, F. A. Procopio, A. Comes, L. Zardi, S. Ferrini, and R. S. Accolla, "CIITA-induced MHC class II expression in mammary adenocarcinoma leads to a Th1 polarization of the tumor microenvironment, tumor rejection, and specific antitumor memory," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12** (11 Pt 1), 3435–3443 (2006).
147. S. J. Rodig, D. Gusenleitner, D. G. Jackson, E. Gjini, A. Giobbie-Hurder, C. Jin, H. Chang, S. B. Lovitch, C. Horak, J. S. Weber, J. L. Weirather, J. D. Wolchok, M. A. Postow, A. C. Pavlick, J. Chesney, and F. S. Hodi, "MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma," *Science translational medicine* **10** (450) (2018).
148. D. S. Shin, J. M. Zaretsky, H. Escuin-Ordinas, A. Garcia-Diaz, S. Hu-Lieskovan, A. Kalbasi, C. S. Grasso, W. Hugo, S. Sandoval, D. Y. Torrejon, N. Palaskas, G. A. Rodriguez, G. Parisi, A. Azhdam, B. Chmielowski, G. Cherry, E. Seja, B. Berent-Maoz, I. P. Shintaku, D. T. Le, D. M. Pardoll, L. A. Diaz, P. C. Tumeh, T. G. Graeber, R. S. Lo, B. Comin-Anduix, and A. Ribas, "Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by JAK1/2 Mutations," *Cancer discovery* **7** (2), 188–201 (2017).
149. Y. A. Cho, H. Lee, D. G. Kim, H. Kim, S. Y. Ha, Y.-L. Choi, K.-T. Jang, and K.-M. Kim, "PD-L1 Expression Is Significantly Associated with Tumor Mutation Burden and Microsatellite Instability Score," *Cancers* **13** (18) (2021).
150. J. Roberts, S. N. Salaria, J. Cates, Y. Wang, C. Vnencak-Jones, J. Berlin, and C. Shi, "PD-L1 Expression Patterns in Microsatellite Instability-High Intestinal Adenocarcinoma Subtypes," *American journal of clinical pathology* **152** (3), 384–391 (2019).
151. A. Garcia-Diaz, D. S. Shin, B. H. Moreno, J. Saco, H. Escuin-Ordinas, G. A. Rodriguez, J. M. Zaretsky, L. Sun, W. Hugo, X. Wang, G. Parisi, C. P. Saus, D. Y. Torrejon, T. G. Graeber, B. Comin-Anduix, S. Hu-Lieskovan, R. Damoiseaux, R. S. Lo, and A. Ribas, "Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression," *Cell reports* **19** (6), 1189–1201 (2017).
152. K. Mimura, J. L. Teh, H. Okayama, K. Shiraishi, L.-F. Kua, V. Koh, D. T. Smoot, H. Ashktorab, T. Oike, Y. Suzuki, Z. Fazreen, B. R. Asuncion, A. Shabbir, W.-P. Yong, J. So, R. Soong, and K. Kono, "PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer," *Cancer Science* **109** (1), 43–53 (2018).
153. P. L. Ganesan, S. I. Alexander, D. Watson, G. J. Logan, G. Y. Zhang, and I. E. Alexander, "Robust anti-tumor immunity and memory in Rag-1-deficient mice following adoptive transfer of cytokine-primed splenocytes and tumor CD80 expression," *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **56** (12), 1955–1965 (2007).
-

154. G. R. Thomas, Z. Chen, M. N. Oechsli, F. J. Hendler, and C. van Waes, "Decreased expression of CD80 is a marker for increased tumorigenicity in a new murine model of oral squamous-cell carcinoma," *International journal of cancer. Journal international du cancer* **82** (3), 377–384 (1999).
155. I. Tirapu, E. Huarte, C. Guiducci, A. Arina, M. Zaratiegui, O. Murillo, A. Gonzalez, C. Berasain, P. Berraondo, P. Fortes, J. Prieto, M. P. Colombo, L. Chen, and I. Melero, "Low surface expression of B7-1 (CD80) is an immunoescape mechanism of colon carcinoma," *Cancer research* **66** (4), 2442–2450 (2006).
156. X.-Y. Feng, L. Lu, K.-F. Wang, B.-Y. Zhu, X.-Z. Wen, R.-Q. Peng, Y. Ding, D.-D. Li, J.-J. Li, Y. Li, and X.-S. Zhang, "Low expression of CD80 predicts for poor prognosis in patients with gastric adenocarcinoma," *Future oncology (London, England)* **15** (5), 473–483 (2019).
157. J. Li, Y. Yang, H. Inoue, M. Mori, and T. Akiyoshi, "The expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 in human carcinoma cell lines: its regulation by interferon gamma and interleukin-10," *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **43** (4), 213–219 (1996).
158. N. H. Overgaard, J.-W. Jung, R. J. Steptoe, and J. W. Wells, "CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage?," *Journal of Leukocyte Biology* **97** (1), 31–38 (2015).
159. J. Desfrancois, A. Moreau-Aubry, V. Vignard, Y. Godet, A. Khammari, B. Dréno, F. Jotereau, and N. Gervois, "Double positive CD4CD8 alphabeta T cells: a new tumor-reactive population in human melanomas," *PLoS ONE* **5** (1), e8437 (2010).
160. G. Sarrabayrouse, M. Corvaisier, L.-H. Ouisse, C. Bossard, B. Le Mével, L. Potiron, G. Meurette, N. Gervois, and F. Jotereau, "Tumor-reactive CD4+ CD8 $\alpha\beta$ + CD103+ $\alpha\beta$ T cells: a prevalent tumor-reactive T-cell subset in metastatic colorectal cancers," *International journal of cancer. Journal international du cancer* **128** (12), 2923–2932 (2011).
161. J. Matsuzaki, T. Tsuji, T. Chodon, C. Ryan, R. C. Koya, and K. Odunsi, "A rare population of tumor antigen-specific CD4+CD8+ double-positive $\alpha\beta$ T lymphocytes uniquely provide CD8-independent TCR genes for engineering therapeutic T cells," *J Immunother Cancer* **7** (1), 7 (2019).
162. Q. Liu, Z. Sun, and L. Chen, "Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy," *Protein Cell* **11** (8), 549–564 (2020).
163. L. Gattinoni, E. Lugli, Y. Ji, Z. Pos, C. M. Paulos, M. F. Quigley, J. R. Almeida, E. Gostick, Z. Yu, C. Carpenito, E. Wang, D. C. Douek, D. A. Price, C. H. June, F. M. Marincola, M. Roederer, and N. P. Restifo, "A human memory T cell subset with stem cell-like properties," *Nature medicine* **17** (10), 1290–1297 (2011).
-

164. C. A. Klebanoff, L. Gattinoni, and N. P. Restifo, "CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy," *Immunological Reviews* **211**, 214–224 (2006).
165. F. Sallusto, D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia, "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions," *Nature* **401** (6754), 708–712 (1999).
166. J. Yang, M. O. Brook, M. Carvalho-Gaspar, J. Zhang, H. E. Ramon, M. H. Sayegh, K. J. Wood, L. A. Turka, and N. D. Jones, "Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** (50), 19954–19959 (2007).
167. D. Y. Oh and L. Fong, "Cytotoxic CD4+ T cells in cancer: Expanding the immune effector toolbox," *Immunity* **54** (12), 2701–2711 (2021).
168. L. S. Taams, D. B. Palmer, A. N. Akbar, D. S. Robinson, Z. Brown, and C. M. Hawrylowicz, "Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation," *Immunology* **118** (1), 1–9 (2006).
169. U. K. Liyanage, T. T. Moore, H.-G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J. A. Drebin, S. M. Strasberg, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure, and D. C. Linehan, "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **169** (5), 2756–2761 (2002).
170. L. A. Ormandy, T. Hillemann, H. Wedemeyer, M. P. Manns, T. F. Greten, and F. Korangy, "Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma," *Cancer Res* **65** (6), 2457–2464 (2005).
171. A. M. Wolf, D. Wolf, M. Steurer, G. Gastl, E. Gunsilius, and B. Grubeck-Loebenstern, "Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9** (2), 606–612 (2003).
172. T. Saito, H. Nishikawa, H. Wada, Y. Nagano, D. Sugiyama, K. Atarashi, Y. Maeda, M. Hamaguchi, N. Ohkura, E. Sato, H. Nagase, J. Nishimura, H. Yamamoto, S. Takiguchi, T. Tanoue, W. Suda, H. Morita, M. Hattori, K. Honda, M. Mori, Y. Doki, and S. Sakaguchi, "Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers," *Nat Med* **22** (6), 679–684 (2016).
173. S. Simon and N. Labarriere, "PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy?," *Oncoimmunology* **7** (1), e1364828 (2017).
174. A. Gros, P. F. Robbins, X. Yao, Y. F. Li, S. Turcotte, E. Tran, J. R. Wunderlich, A. Mixon, S. Farid, M. E. Dudley, K. Hanada, J. R. Almeida, S. Darko, D. C. Douek, J. C. Yang, and S. A. Rosenberg, "PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive

- repertoire infiltrating human tumors,” *The Journal of clinical investigation* **124** (5), 2246–2259 (2014).
175. M. J. Overman, R. McDermott, J. L. Leach, S. Lonardi, H.-J. Lenz, M. A. Morse, J. Desai, A. Hill, M. Axelson, R. A. Moss, M. V. Goldberg, Z. A. Cao, J.-M. Ledeine, G. A. Maglinte, S. Kopetz, and T. André, “Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study,” *The Lancet Oncology* **18** (9), 1182–1191 (2017).
176. M. J. Overman, S. Lonardi, K. Y. M. Wong, H.-J. Lenz, F. Gelsomino, M. Aglietta, M. A. Morse, E. van Cutsem, R. McDermott, A. Hill, M. B. Sawyer, A. Hendlisch, B. Neyns, M. Svrcek, R. A. Moss, J.-M. Ledeine, Z. A. Cao, S. Kamble, S. Kopetz, and T. André, “Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer,” *JCO* **36** (8), 773–779 (2018).
177. H. A. Tawbi, D. Schadendorf, E. J. Lipson, P. A. Ascierto, L. Matamala, E. Castillo Gutiérrez, P. Rutkowski, H. J. Gogas, C. D. Lao, J. J. de Menezes, S. Dalle, A. Arance, J.-J. Grob, S. Srivastava, M. Abaskharoun, M. Hamilton, S. Keidel, K. L. Simonsen, A. M. Sobiesk, B. Li, F. S. Hodi, and G. V. Long, “Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma,” *The New England journal of medicine* **386** (1), 24–34 (2022).
178. S.-R. Woo, M. E. Turnis, M. V. Goldberg, J. Bankoti, M. Selby, C. J. Nirschl, M. L. Bettini, D. M. Gravano, P. Vogel, C. L. Liu, S. Tansombatvisit, J. F. Grosso, G. Netto, M. P. Smeltzer, A. Chaux, P. J. Utz, C. J. Workman, D. M. Pardoll, A. J. Korman, C. G. Drake, and D. A. A. Vignali, “Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape,” *Cancer Res* **72** (4), 917–927 (2012).
179. A. A. Davis and V. G. Patel, “The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: an analysis of all US Food and Drug Administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors,” *J Immunother Cancer* **7** (1), 278 (2019).
180. A. B. Schrock, C. Ouyang, J. Sandhu, E. Sokol, D. Jin, J. S. Ross, V. A. Miller, D. Lim, I. Amanam, J. Chao, D. Catenacci, M. Cho, F. Braiteh, S. J. Klempner, S. M. Ali, and M. Fakih, “Tumor mutational burden is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in MSI-high metastatic colorectal cancer,” *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **30** (7), 1096–1103 (2019).
181. D. A. Fabrizio, T. J. George, R. F. Dunne, G. Frampton, J. Sun, K. Gowen, M. Kennedy, J. Greenbowe, A. B. Schrock, A. F. Hezel, J. S. Ross, P. J. Stephens, S. M. Ali, V. A. Miller, M. Fakih, and S. J. Klempner, “Beyond microsatellite testing: assessment of tumor mutational burden identifies subsets of colorectal cancer who may
-

- respond to immune checkpoint inhibition,” *Journal of gastrointestinal oncology* **9** (4), 610–617 (2018).
182. S. Michel, A. Benner, M. Tariverdian, N. Wentzensen, P. Hoefler, T. Pommerencke, N. Grabe, M. von Knebel Doeberitz, and M. Kloor, “High density of FOXP3-positive T cells infiltrating colorectal cancers with microsatellite instability,” *British journal of cancer* **99** (11), 1867–1873 (2008).
183. G. Cui, “Towards a precision immune checkpoint blockade immunotherapy in patients with colorectal cancer: Strategies and perspectives,” *Biomedicine & Pharmacotherapy* **149**, 112923 (2022).
184. K. Yoshida, M. Okamoto, J. Sasaki, C. Kuroda, H. Ishida, K. Ueda, H. Ideta, T. Kamanaka, A. Sobajima, T. Takizawa, M. Tanaka, K. Aoki, T. Uemura, H. Kato, H. Haniu, and N. Saito, “Anti-PD-1 antibody decreases tumour-infiltrating regulatory T cells,” *BMC Cancer* **20** (1), 25 (2020).
185. H. Zhang, Y. Li, X. Liu, Z. Liang, M. Yan, Q. Liu, A. Chen, Y. Bao, C. Zhou, S. Li, C. Yee, and Y. Li, “ImmTAC/Anti-PD-1 antibody combination to enhance killing of cancer cells by reversing regulatory T-cell-mediated immunosuppression,” *Immunology* **155** (2), 238–250 (2018).
186. C. H. Kugel, S. M. Douglass, M. R. Webster, A. Kaur, Q. Liu, X. Yin, S. A. Weiss, F. Darvishian, R. N. Al-Rohil, A. Ndoeye, R. Behera, G. M. Alicea, B. L. Ecker, M. Fane, M. J. Allegranza, N. Svoronos, V. Kumar, D. Y. Wang, R. Somasundaram, S. Hu-Lieskovan, A. Ozgun, M. Herlyn, J. R. Conejo-Garcia, D. Gabilovich, E. L. Stone, T. S. Nowicki, J. Sosman, R. Rai, M. S. Carlino, G. V. Long, R. Marais, A. Ribas, Z. Eroglu, M. A. Davies, B. Schilling, D. Schadendorf, W. Xu, R. K. Amaravadi, A. M. Menzies, J. L. McQuade, D. B. Johnson, I. Osman, and A. T. Weeraratna, “Age Correlates with Response to Anti-PD1, Reflecting Age-Related Differences in Intratumoral Effector and Regulatory T-Cell Populations,” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **24** (21), 5347–5356 (2018).
187. A. Nosrati, K. K. Tsai, S. M. Goldinger, P. Tumei, B. Grimes, K. Loo, A. P. Algazi, T. D. L. Nguyen-Kim, M. Levesque, R. Dummer, O. Hamid, and A. Daud, “Evaluation of clinicopathological factors in PD-1 response: derivation and validation of a prediction scale for response to PD-1 monotherapy,” *British journal of cancer* **116** (9), 1141–1147 (2017).
188. S. Tian, F. Wang, R. Zhang, and G. Chen, “Global Pattern of CD8+ T-Cell Infiltration and Exhaustion in Colorectal Cancer Predicts Cancer Immunotherapy Response,” *Frontiers in pharmacology* **12**, 715721 (2021).
189. Y. Shi, C. H. Liu, A. I. Roberts, J. Das, G. Xu, G. Ren, Y. Zhang, L. Zhang, Z. R. Yuan, H. S. W. Tan, G. Das, and S. Devadas, “Granulocyte-macrophage colony-

- stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know," *Cell Res* **16** (2), 126–133 (2006).
190. V. Apostolopoulos, I. F. McKenzie, C. Lees, K. I. Matthaei, and I. G. Young, "A role for IL-5 in the induction of cytotoxic T lymphocytes in vivo," *Eur. J. Immunol.* **30** (6), 1733–1739 (2000).
191. T. Kouro and K. Takatsu, "IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy," *Int Immunol* **21** (12), 1303–1309 (2009).
192. J. A. Espinoza, S. Jabeen, R. Batra, E. Papaleo, V. Haakensen, V. Timmermans Wielenga, M.-L. Møller Talman, N. Brunner, A.-L. Børresen-Dale, P. Gromov, Å. Helland, V. N. Kristensen, and I. Gromova, "Cytokine profiling of tumor interstitial fluid of the breast and its relationship with lymphocyte infiltration and clinicopathological characteristics," *Oncoimmunology* **5** (12), e1248015 (2016).
193. A. König, T. Vilsmaier, B. Rack, K. Friese, W. Janni, U. Jeschke, U. Andergassen, E. Trapp, J. Jückstock, B. Jäger, M. Alunni-Fabbroni, T. Friedl, and T. Weissenbacher, "Determination of Interleukin-4, -5, -6, -8 and -13 in Serum of Patients with Breast Cancer Before Treatment and its Correlation to Circulating Tumor Cells," *Anticancer research* **36** (6), 3123–3130 (2016).
194. R. Zaynagetdinov, T. P. Sherrill, L. A. Gleaves, A. G. McLoed, J. A. Saxon, A. C. Habermann, L. Connelly, D. Dulek, R. S. Peebles, B. Fingleton, F. E. Yull, G. T. Stathopoulos, and T. S. Blackwell, "Interleukin-5 facilitates lung metastasis by modulating the immune microenvironment," *Cancer Res* **75** (8), 1624–1634 (2015).
195. N. Kumari, B. S. Dwarakanath, A. Das, and A. N. Bhatt, "Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance," *Tumor Biol.* **37** (9), 11553–11572 (2016).
196. H. Komoda, Y. Tanaka, M. Honda, Y. Matsuo, K. Hazama, and T. Takao, "Interleukin-6 levels in colorectal cancer tissues," *World journal of surgery* **22** (8), 895–898 (1998).
197. H. Knüpfer and R. Preiss, "Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients--a summary of published results," *International journal of colorectal disease* **25** (2), 135–140 (2010).
198. W. E. Naugler and M. Karin, "The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer," *Trends in Molecular Medicine* **14** (3), 109–119 (2008).
199. Y. Ge, M. Huang, and Y. Yao, "Biology of Interleukin-17 and Its Pathophysiological Significance in Sepsis," *Front. Immunol.* **11**, 1558 (2020).
200. V. de Simone, F. Pallone, G. Monteleone, and C. Stolfi, "Role of TH17 cytokines in the control of colorectal cancer," *Oncoimmunology* **2** (12), e26617 (2013).
-

201. D. Wang, W. Yu, J. Lian, Q. Wu, S. Liu, L. Yang, F. Li, L. Huang, X. Chen, Z. Zhang, A. Li, J. Liu, Z. Sun, J. Wang, W. Yuan, and Y. Zhang, "Th17 cells inhibit CD8+ T cell migration by systematically downregulating CXCR3 expression via IL-17A/STAT3 in advanced-stage colorectal cancer patients," *J Hematol Oncol* **13** (1), 68 (2020).
202. S. Middha, R. Yaeger, J. Shia, Z. K. Stadler, S. King, S. Guercio, V. Paroder, D. D. B. Bates, S. Rana, L. A. Diaz, L. Saltz, N. Segal, M. Ladanyi, A. Zehir, and J. F. Hechtman, "Majority of B2M-Mutant and -Deficient Colorectal Carcinomas Achieve Clinical Benefit From Immune Checkpoint Inhibitor Therapy and Are Microsatellite Instability-High," *JCO precision oncology* **3** (2019).
203. S. D. Brown, R. L. Warren, E. A. Gibb, S. D. Martin, J. J. Spinelli, B. H. Nelson, and R. A. Holt, "Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival," *Genome research* **24** (5), 743–750 (2014).
204. S. Kalaora, E. Barnea, E. Merhavi-Shoham, N. Qutob, J. K. Teer, N. Shimony, J. Schachter, S. A. Rosenberg, M. J. Besser, A. Admon, and Y. Samuels, "Use of HLA peptidomics and whole exome sequencing to identify human immunogenic neo-antigens," *Oncotarget* **7** (5), 5110–5117 (2016).
205. E. Tran, M. Ahmadzadeh, Y.-C. Lu, A. Gros, S. Turcotte, P. F. Robbins, J. J. Gartner, Z. Zheng, Y. F. Li, S. Ray, J. R. Wunderlich, R. P. Somerville, and S. A. Rosenberg, "Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers," *Science (New York, N.Y.)* **350** (6266), 1387–1390 (2015).
206. S. Malarkannan, A. Awasthi, K. Rajasekaran, P. Kumar, K. M. Schuldt, A. Bartoszek, N. Manoharan, N. K. Goldner, C. M. Umhoefer, and M. S. Thakar, "IQGAP1: a regulator of intracellular spacetime relativity," *The Journal of Immunology* **188** (5), 2057–2063 (2012).
207. T. Wei and P. F. Lambert, "Role of IQGAP1 in Carcinogenesis," *Cancers* **13** (16) (2021).
208. H. Fukushima, H. Yamamoto, F. Itoh, S. Horiuchi, Y. Min, S. Iku, and K. Imai, "Frequent alterations of the beta-catenin and TCF-4 genes, but not of the APC gene, in colon cancers with high-frequency microsatellite instability," *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **20** (4), 553–559 (2001).
209. L. Mirabelli-Primdahl, R. Gryfe, H. Kim, A. Millar, C. Luceri, D. Dale, E. Holowaty, B. Bapat, S. Gallinger, and M. Redston, "Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway," *Cancer Res* **59** (14), 3346–3351 (1999).
210. M. Spinola, A. Galvan, C. Pignatiello, B. Conti, U. Pastorino, B. Nicander, R. Paroni, and T. A. Dragani, "Identification and functional characterization of the candidate tumor suppressor gene TRIT1 in human lung cancer," *Oncogene* **24** (35), 5502–5509 (2005).
-

211. Z. Yue, H.-T. Li, Y. Yang, S. Hussain, C.-H. Zheng, J. Xia, and Y. Chen, "Identification of breast cancer candidate genes using gene co-expression and protein-protein interaction information," *Oncotarget* **7** (24), 36092–36100 (2016).
212. E. Irajizad, J. F. Fahrman, J. P. Long, J. Vykoukal, M. Kobayashi, M. Capello, C.-Y. Yu, Y. Cai, F. C. Hsiao, N. Patel, S. Park, Q. Peng, J. B. Dennison, T. Kato, M. C. Tai, A. Taguchi, H. Kadara, I. I. Wistuba, H. Katayama, K.-A. Do, S. M. Hanash, and E. J. Ostrin, "A Comprehensive Search of Non-Canonical Proteins in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Impact on the Immune Response," *International journal of molecular sciences* **23** (16) (2022).
213. Y. Kikuchi, S. Tokita, T. Hiram, V. Kochin, M. Nakatsugawa, T. Shinkawa, Y. Hirohashi, T. Tsukahara, F. Hata, I. Takemasa, N. Sato, T. Kanaseki, and T. Torigoe, "CD8+ T-cell Immune Surveillance against a Tumor Antigen Encoded by the Oncogenic Long Noncoding RNA PVT1," *Cancer immunology research* **9** (11), 1342–1353 (2021).
214. T. Kanda, T. Ochi, H. Fujiwara, M. Yasukawa, S. Okamoto, J. Mineno, K. Kuzushima, and T. Tsurumi, "HLA-restricted presentation of WT1 tumor antigen in B-lymphoblastoid cell lines established using a maxi-EBV system," *Cancer Gene Ther* **19** (8), 566–571 (2012).
215. C. S. Leung, M. A. Maurer, S. Meixlsperger, A. Lippmann, C. Cheong, J. Zuo, T. A. Haigh, G. S. Taylor, and C. Münz, "Robust T-cell stimulation by Epstein-Barr virus-transformed B cells after antigen targeting to DEC-205," *Blood* **121** (9), 1584–1594 (2013).
216. R. A. M. Rossetti, N. P. C. Lorenzi, K. Yokochi, M. B. S. d. F. Rosa, L. Benevides, P. F. R. Margarido, E. C. Baracat, J. P. Carvalho, L. L. Villa, and A. P. Lepique, "B lymphocytes can be activated to act as antigen presenting cells to promote anti-tumor responses," *PLOS ONE* **13** (7), e0199034 (2018).
217. Q. Qi, Y. Liu, Y. Cheng, J. Glanville, D. Zhang, J.-Y. Lee, R. A. Olshen, C. M. Weyand, S. D. Boyd, and J. J. Goronzy, "Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111** (36), 13139–13144 (2014).
218. W. Zhang, Q. Yin, H. Huang, J. Lu, H. Qin, S. Chen, W. Zhang, X. Su, W. Sun, Y. Dong, and Q. Li, "Personal Neoantigens From Patients With NSCLC Induce Efficient Antitumor Responses," *Front. Oncol.* **11**, 628456 (2021).
219. V. Ferrari, A. Tarke, H. Fields, L. Ferrari, T. Conley, F. Ferrari, Z. Koşaloğlu-Yalçın, A. Sette, B. Peters, C. L. McCarthy, A. Bashey, D. Tzachanis, E. D. Ball, T. N. Tanaka, R. Bejar, T. A. Lane, and A. Vitiello, "In vitro induction of neoantigen-specific T cells in myelodysplastic syndrome, a disease with low mutational burden," *Cytotherapy* **23** (4), 320–328 (2021).
-

220. D. Perumal, N. Imai, A. Laganà, J. Finnigan, D. Melnekoff, V. V. Leshchenko, A. Solovyov, D. Madduri, A. Chari, H. J. Cho, J. T. Dudley, J. D. Brody, S. Jagannath, B. Greenbaum, S. Gnjatic, N. Bhardwaj, and S. Parekh, "Mutation-derived Neoantigen-specific T-cell Responses in Multiple Myeloma," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **26** (2), 450–464 (2020).
221. M. A. Biernacki, K. A. Foster, K. B. Woodward, M. E. Coon, C. Cummings, T. M. Cunningham, R. G. Dossa, M. Brault, J. Stokke, T. M. Olsen, K. Gardner, E. Estey, S. Meshinchi, A. Rongvaux, and M. Bleakley, "CBFB-MYH11 fusion neoantigen enables T cell recognition and killing of acute myeloid leukemia," *The Journal of clinical investigation* **130** (10), 5127–5141 (2020).
222. M. R. Parkhurst, P. F. Robbins, E. Tran, T. D. Prickett, J. J. Gartner, L. Jia, G. Ivey, Y. F. Li, M. El-Gamil, A. Lalani, J. S. Crystal, A. Sachs, E. Groh, S. Ray, L. T. Ngo, S. Kivitz, A. Pasetto, R. Yossef, F. J. Lowery, S. L. Goff, W. Lo, G. Cafri, D. C. Deniger, P. Malekzadeh, M. Ahmadzadeh, J. R. Wunderlich, R. P. T. Somerville, and S. A. Rosenberg, "Unique Neoantigens Arise from Somatic Mutations in Patients with Gastrointestinal Cancers," *Cancer discovery* **9** (8), 1022–1035 (2019).
223. L. Li, X. Zhang, X. Wang, S. W. Kim, J. M. Herndon, M. K. Becker-Hapak, B. M. Carreno, N. B. Myers, M. A. Sturmoski, M. D. McLellan, C. A. Miller, T. M. Johanns, B. R. Tan, G. P. Dunn, T. P. Fleming, T. H. Hansen, S. P. Goedegebuure, and W. E. Gillanders, "Optimized polypeptide neoantigen DNA vaccines elicit neoantigen-specific immune responses in preclinical models and in clinical translation," *Genome medicine* **13** (1), 56 (2021).
224. S. Kreiter, M. Vormehr, N. van de Roemer, M. Diken, M. Löwer, J. Diekmann, S. Boegel, B. Schrörs, F. Vascotto, J. C. Castle, A. D. Tadmor, S. P. Schoenberger, C. Huber, Ö. Türeci, and U. Sahin, "Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer," *Nature* **520** (7549), 692–696 (2015).
225. E. K. Duperret, A. Perales-Puchalt, R. Stoltz, H. G. H, N. Mandloi, J. Barlow, A. Chaudhuri, N. Y. Sardesai, and D. B. Weiner, "A Synthetic DNA, Multi-Neoantigen Vaccine Drives Predominately MHC Class I CD8+ T-cell Responses, Impacting Tumor Challenge," *Cancer immunology research* **7** (2), 174–182 (2019).
226. P. S. Bhojnagarwala, A. Perales-Puchalt, N. Cooch, N. Y. Sardesai, and D. B. Weiner, "A synDNA vaccine delivering neoAg collections controls heterogenous, multifocal murine lung and ovarian tumors via robust T cell generation," *Molecular Therapy - Oncolytics* **21**, 278–287 (2021).
227. Z. Hu, D. E. Leet, R. L. Allesøe, G. Oliveira, S. Li, A. M. Luoma, J. Liu, J. Forman, T. Huang, J. B. Iorgulescu, R. Holden, S. Sarkizova, S. H. Gohil, R. A. Redd, J. Sun, L. Elagina, A. Giobbie-Hurder, W. Zhang, L. Peter, Z. Ciantra, S. Rodig, O. Olive, K. Shetty,
-

- J. Pyrdol, M. Uduman, P. C. Lee, P. Bachireddy, E. I. Buchbinder, C. H. Yoon, D. Neuberg, B. L. Pentelute, N. Hacohen, K. J. Livak, S. A. Shukla, L. R. Olsen, D. H. Barouch, K. W. Wucherpfennig, E. F. Fritsch, D. B. Keskin, C. J. Wu, and P. A. Ott, "Personal neoantigen vaccines induce persistent memory T cell responses and epitope spreading in patients with melanoma," *Nat Med* **27** (3), 515–525 (2021).
228. P. A. Ott, Z. Hu, D. B. Keskin, S. A. Shukla, J. Sun, D. J. Bozym, W. Zhang, A. Luoma, A. Giobbie-Hurder, L. Peter, C. Chen, O. Olive, T. A. Carter, S. Li, D. J. Lieb, T. Eisenhaure, E. Gjini, J. Stevens, W. J. Lane, I. Javeri, K. Nellaiappan, A. M. Salazar, H. Daley, M. Seaman, E. I. Buchbinder, C. H. Yoon, M. Harden, N. Lennon, S. Gabriel, S. J. Rodig, D. H. Barouch, J. C. Aster, G. Getz, K. Wucherpfennig, D. Neuberg, J. Ritz, E. S. Lander, E. F. Fritsch, N. Hacohen, and C. J. Wu, "An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma," *Nature* **547** (7662), 217–221 (2017).
229. Z. Ding, Q. Li, R. Zhang, L. Xie, Y. Shu, S. Gao, P. Wang, X. Su, Y. Qin, Y. Wang, J. Fang, Z. Zhu, X. Xia, G. Wei, H. Wang, H. Qian, X. Guo, Z. Gao, Y. Wang, Y. Wei, Q. Xu, H. Xu, and L. Yang, "Personalized neoantigen pulsed dendritic cell vaccine for advanced lung cancer," *Signal transduction and targeted therapy* **6** (1), 26 (2021).
230. Z. Chen, S. Zhang, N. Han, J. Jiang, Y. Xu, D. Ma, L. Lu, X. Guo, M. Qiu, Q. Huang, H. Wang, F. Mo, S. Chen, and L. Yang, "A Neoantigen-Based Peptide Vaccine for Patients With Advanced Pancreatic Cancer Refractory to Standard Treatment," *Front. Immunol.* **12**, 691605 (2021).
231. Z. Cai, X. Su, L. Qiu, Z. Li, X. Li, X. Dong, F. Wei, Y. Zhou, L. Luo, G. Chen, H. Chen, Y. Wang, Y. Zeng, and X. Liu, "Personalized neoantigen vaccine prevents postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients with vascular invasion," *Mol Cancer* **20** (1), 164 (2021).
232. D. B. Keskin, A. J. Anandappa, J. Sun, I. Tirosh, N. D. Mathewson, S. Li, G. Oliveira, A. Giobbie-Hurder, K. Felt, E. Gjini, S. A. Shukla, Z. Hu, L. Li, P. M. Le, R. L. Allesøe, A. R. Richman, M. S. Kowalczyk, S. Abdelrahman, J. E. Geduldig, S. Charbonneau, K. Pelton, J. B. Iorgulescu, L. Elagina, W. Zhang, O. Olive, C. McCluskey, L. R. Olsen, J. Stevens, W. J. Lane, A. M. Salazar, H. Daley, P. Y. Wen, E. A. Chiocca, M. Harden, N. J. Lennon, S. Gabriel, G. Getz, E. S. Lander, A. Regev, J. Ritz, D. Neuberg, S. J. Rodig, K. L. Ligon, M. L. Suvà, K. W. Wucherpfennig, N. Hacohen, E. F. Fritsch, K. J. Livak, P. A. Ott, C. J. Wu, and D. A. Reardon, "Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial," *Nature* **565** (7738), 234–239 (2019).
233. M. Kloor, M. Reuschenbach, C. Pauligk, J. Karbach, M.-R. Rafiyan, S.-E. Al-Batran, M. Tariverdian, E. Jäger, and M. von Knebel Doeberitz, "A Frameshift Peptide Neoantigen-Based Vaccine for Mismatch Repair-Deficient Cancers: A Phase I/IIa Clinical
-

- Trial," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **26** (17), 4503–4510 (2020).
234. P. A. Ott, S. Hu-Lieskovan, B. Chmielowski, R. Govindan, A. Naing, N. Bhardwaj, K. Margolin, M. M. Awad, M. D. Hellmann, J. J. Lin, T. Friedlander, M. E. Bushway, K. N. Balogh, T. E. Sciuto, V. Kohler, S. J. Turnbull, R. Besada, R. R. Curran, B. Trapp, J. Scherer, A. Poran, D. Harjanto, D. Barthelme, Y. S. Ting, J. Z. Dong, Y. Ware, Y. Huang, Z. Huang, A. Wanamaker, L. D. Cleary, M. A. Moles, K. Manson, J. Greshock, Z. S. Khondker, E. Fritsch, M. S. Rooney, M. DeMario, R. B. Gaynor, and L. Srinivasan, "A Phase Ib Trial of Personalized Neoantigen Therapy Plus Anti-PD-1 in Patients with Advanced Melanoma, Non-small Cell Lung Cancer, or Bladder Cancer," *Cell* **183** (2), 347-362.e24 (2020).
235. C. L. Slingluff, H. M. Zarour, H. A.-H. Tawbi, J. M. Kirkwood, M. A. Postow, P. Friedlander, C. E. Devoe, E. M. Gaughan, I. S. Mauldin, W. C. Olson, K. T. Smith, M. J. Macri, T. Ricciardi, A. Ryan, R. Venhaus, and J. D. Wolchok, "A phase 1 study of NY-ESO-1 vaccine + anti-CTLA4 antibody Ipilimumab (IPI) in patients with unresectable or metastatic melanoma," *Oncoimmunology* **10** (1), 1898105 (2021).
236. K. Kontani, S. Sawai, J. Hanaoka, N. Tezuka, S. Inoue, and S. Fujino, "Involvement of granzyme B and perforin in suppressing nodal metastasis of cancer cells in breast and lung cancers," *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* **27** (2), 180–186 (2001).
237. S. X. Hu, S. Wang, J. P. Wang, G. B. Mills, Y. Zhou, and H.-J. Xu, "Expression of endogenous granzyme B in a subset of human primary breast carcinomas," *British journal of cancer* **89** (1), 135–139 (2003).
238. D. D'Eliseo, P. Pisu, C. Romano, A. Tubaro, C. de Nunzio, S. Morrone, A. Santoni, A. Stoppacciaro, and F. Velotti, "Granzyme B is expressed in urothelial carcinoma and promotes cancer cell invasion," *International journal of cancer. Journal international du cancer* **127** (6), 1283–1294 (2010).
239. J. P. Medema, J. de Jong, L. T. Peltenburg, E. M. Verdegaal, A. Gorter, S. A. Bres, K. L. Franken, M. Hahne, J. P. Albar, C. J. Melief, and R. Offringa, "Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** (20), 11515–11520 (2001).
240. M. Ray, D. R. Hostetter, C. R. K. Loeb, J. Simko, and C. S. Craik, "Inhibition of Granzyme B by PI-9 protects prostate cancer cells from apoptosis," *The Prostate* **72** (8), 846–855 (2012).
-

241. C. Soriano, V. Mukaro, G. Hodge, J. Ahern, M. Holmes, H. Jersmann, D. Moffat, D. Meredith, C. Jurisevic, P. N. Reynolds, and S. Hodge, "Increased proteinase inhibitor-9 (PI-9) and reduced granzyme B in lung cancer: mechanism for immune evasion?," *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* **77** (1), 38–45 (2012).
242. I. Rousalova, E. Krepela, J. Prochazka, J. Cermak, and K. Benkova, "Expression of proteinase inhibitor-9/serpinB9 in non-small cell lung carcinoma cells and tissues," *International journal of oncology* **36** (1), 275–283 (2010).
243. O. Repetto, V. de Re, A. de Paoli, C. Belluco, L. Alessandrini, V. Canzonieri, and R. Cannizzaro, "Identification of protein clusters predictive of tumor response in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemo-radiotherapy," *Oncotarget* **8** (17), 28328–28341 (2017).
244. L. Jiang, Y.-J. Wang, J. Zhao, M. Uehara, Q. Hou, V. Kasinath, T. Ichimura, N. Banouni, L. Dai, X. Li, D. L. Greiner, L. D. Shultz, X. Zhang, Z.-Y. J. Sun, I. Curtin, N. E. Vangos, Z. C. Yeoh, E. A. Geffken, H.-S. Seo, Z.-X. Liu, G. J. Heffron, K. Shah, S. Dhe-Paganon, and R. Abdi, "Direct Tumor Killing and Immunotherapy through Anti-SerpinB9 Therapy," *Cell* **183** (5), 1219-1233.e18 (2020).
245. V. P. Balachandran, M. Łuksza, J. N. Zhao, V. Makarov, J. A. Moral, R. Remark, B. Herbst, G. Askan, U. Bhanot, Y. Senbabaoglu, D. K. Wells, C. I. O. Cary, O. Grbovic-Huezo, M. Attiyeh, B. Medina, J. Zhang, J. Loo, J. Saglimbeni, M. Abu-Akeel, R. Zappasodi, N. Riaz, M. Smoragiewicz, Z. L. Kelley, O. Basturk, M. Gönen, A. J. Levine, P. J. Allen, D. T. Fearon, M. Merad, S. Gnjatic, C. A. Iacobuzio-Donahue, J. D. Wolchok, R. P. DeMatteo, T. A. Chan, B. D. Greenbaum, T. Merghoub, and S. D. Leach, "Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer," *Nature* **551** (7681), 512–516 (2017).
246. D. M. Lussier, E. Alspach, J. P. Ward, A. P. Miceli, D. Runci, J. M. White, C. Mpoy, C. D. Arthur, H. N. Kohlmeier, T. Jacks, M. N. Artyomov, B. E. Rogers, and R. D. Schreiber, "Radiation-induced neoantigens broaden the immunotherapeutic window of cancers with low mutational loads," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118** (24) (2021).
247. Y. Komatsu, K. Shigeyasu, S. Yano, S. Takeda, K. Takahashi, N. Hata, H. Umeda, K. Yoshida, Y. Mori, K. Yasui, R. Yoshida, Y. Kondo, H. Kishimoto, F. Teraishi, Y. Umeda, S. Kagawa, H. Michiue, H. Tazawa, A. Goel, and T. Fujiwara, "RNA editing facilitates the enhanced production of neoantigens during the simultaneous administration of oxaliplatin and radiotherapy in colorectal cancer," *Sci Rep* **12** (1), 13540 (2022).
248. E. Vacchelli, L. Galluzzi, W. H. Fridman, J. Galon, C. Sautès-Fridman, E. Tartour, and G. Kroemer, "Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers," *Oncoimmunology* **1** (2), 179–188 (2012).
-

VIII. Anhang

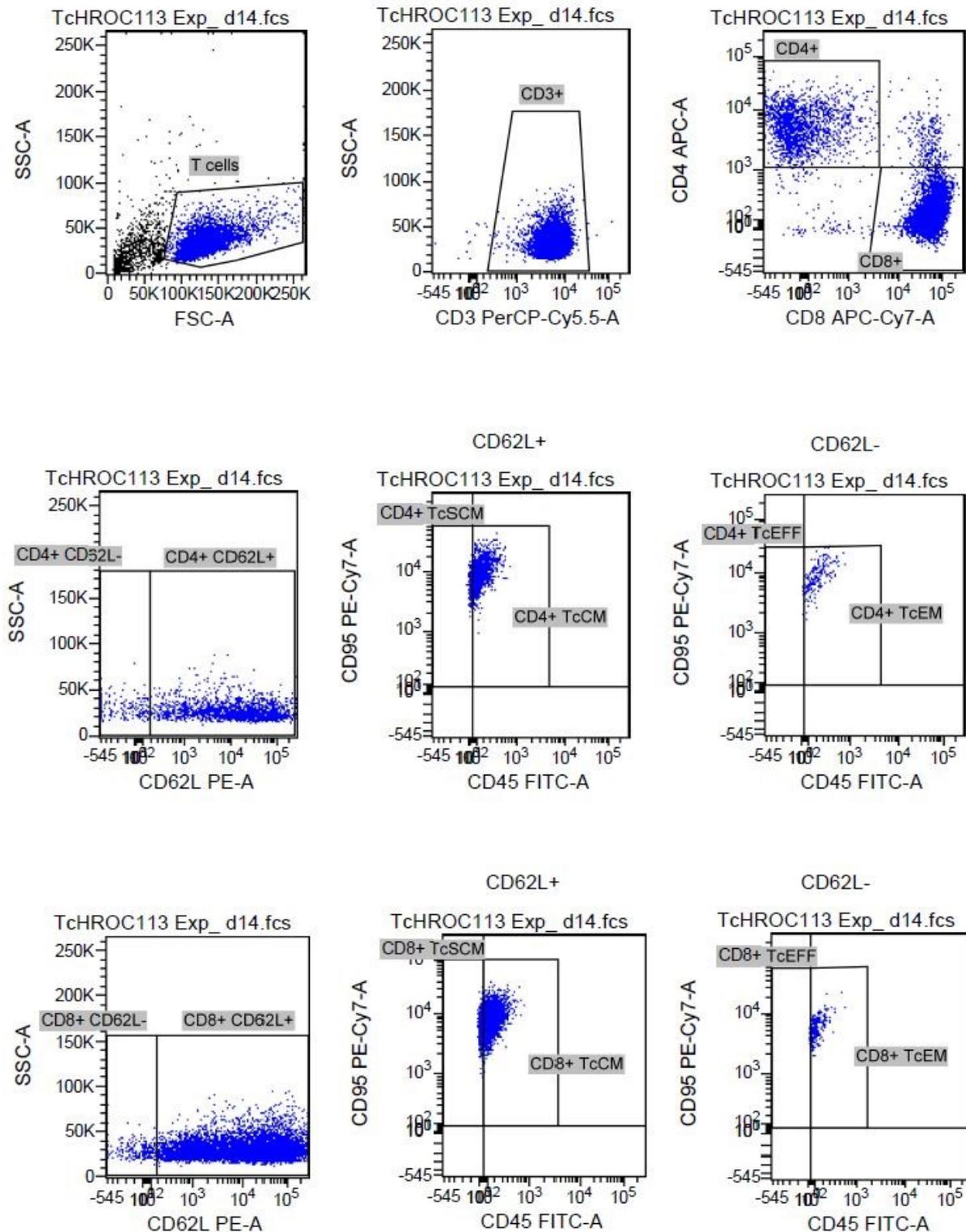


Abbildung A 1: Beispielhafte Auswertung der Subpopulationsanalyse expandierter T-Zellen

Die T-Zellen wurden anhand der Detektion der Oberflächenproteine CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD62L und CD95 in der Durchflusszytometrie in folgende Subpopulationen kategorisiert: TCM: zentrale T-Gedächtniszellen (*central memory T cells*); TEFF: T-Effektorzellen; TEM: T-Efforgedächtniszellen (*effector memory T cells*), TN: Naive T-Zellen, TSCM: stammzellähnliche T-Gedächtniszellen (*stem cell-like memory T cells*).

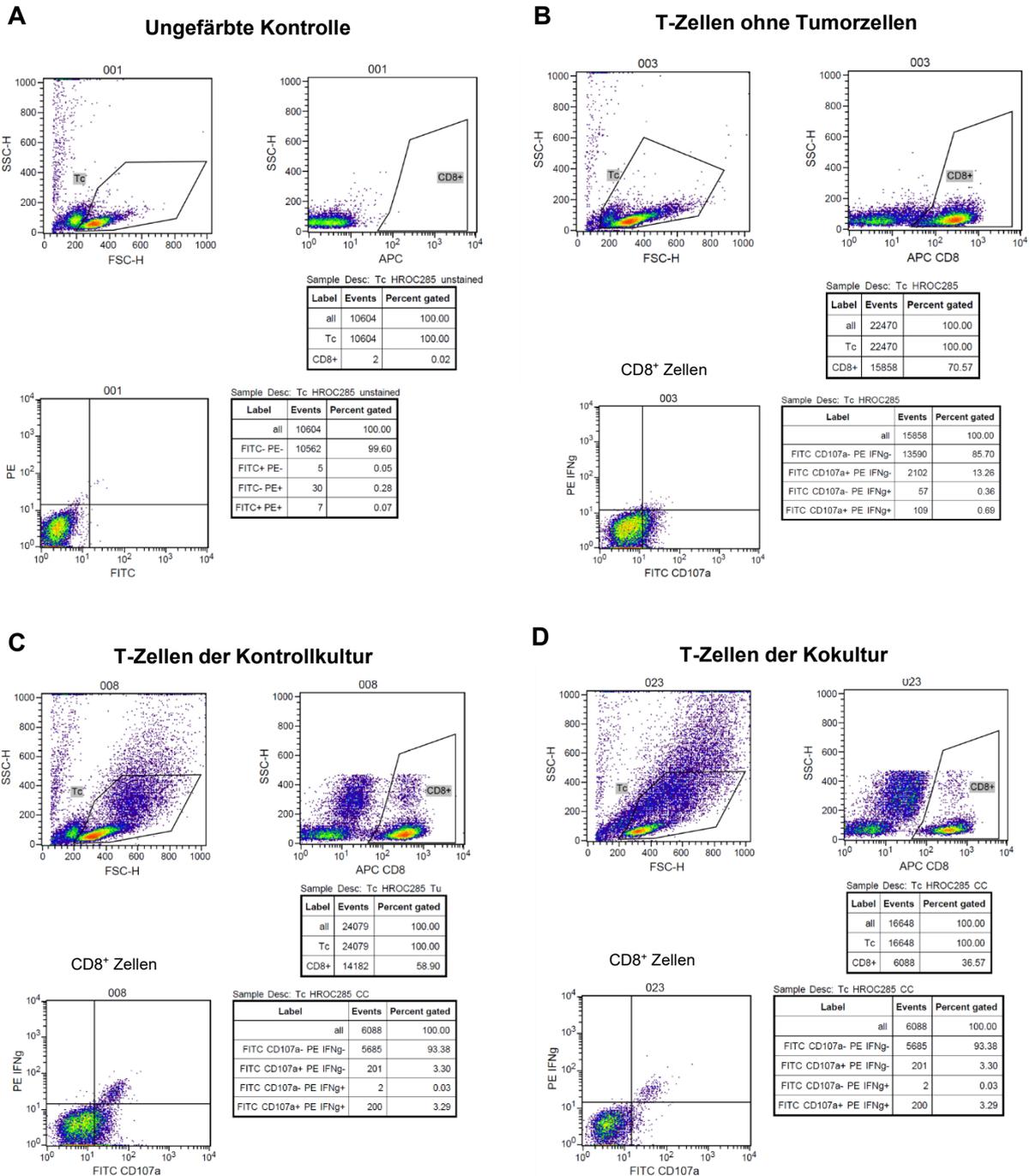


Abbildung A 2: Degranulationstest

Die durchflusszytometrische Bestimmung degranulierender T-Zellen erfolgte durch die Bestimmung von CD8, CD107a und IFN γ . Der Anteil CD8+ Zellen wurde hinsichtlich der Detektion von CD107a und IFN γ analysiert. CD8/CD107a/ IFN γ dreifach positive Zellen wurden als degranulierend klassifiziert. Ungefärbte Kontrollen dienen der Ausrichtung der Gates und Quadranten (A). T-Zellen, die keinen Kontakt zu Tumorzellen hatten, wurden für die Bestimmung der Hintergrundaktivität der T-Zellen genutzt (B). Das Degranulierungsverhalten der T-Zellen der Kontrollkultur (C) und Kokultur (D) wurde in Relation gesetzt zu Anteil degranulierender Zellen aus (B).

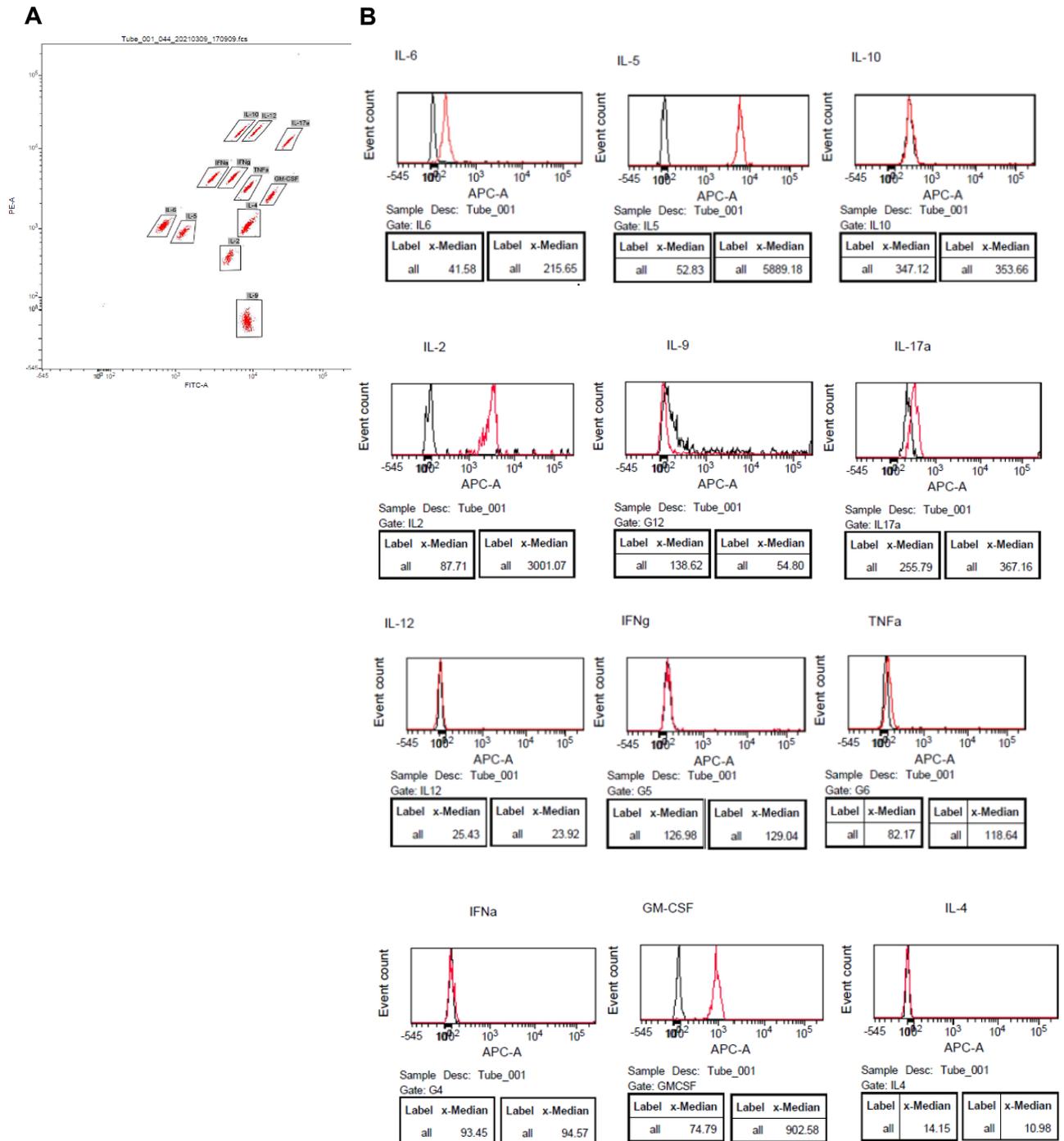


Abbildung A 3: Zytokinbestimmung in Zellkulturüberständen

Dargestellt ist ein Beispiel der Bestimmung der Zytokinanzahl in Überständen von Tumorzellen, T-Zellen und Kokulturen, die mithilfe des MACSPlex Cytokine 12 Kit (Miltenyi Biotec) durchgeführt wurde. Mittels spezifischer PE- und FITC-Fluoreszenzintensität erfolgte die Zuordnung der verschiedenen Zytokine (A). Anhand des Medians der APC-Fluoreszenzintensität und definierter Standardkonzentrationen wurde dann die Zytokinanzahl bestimmt (B: schwarz: ungefärbte Kontrolle; rot: Probe).

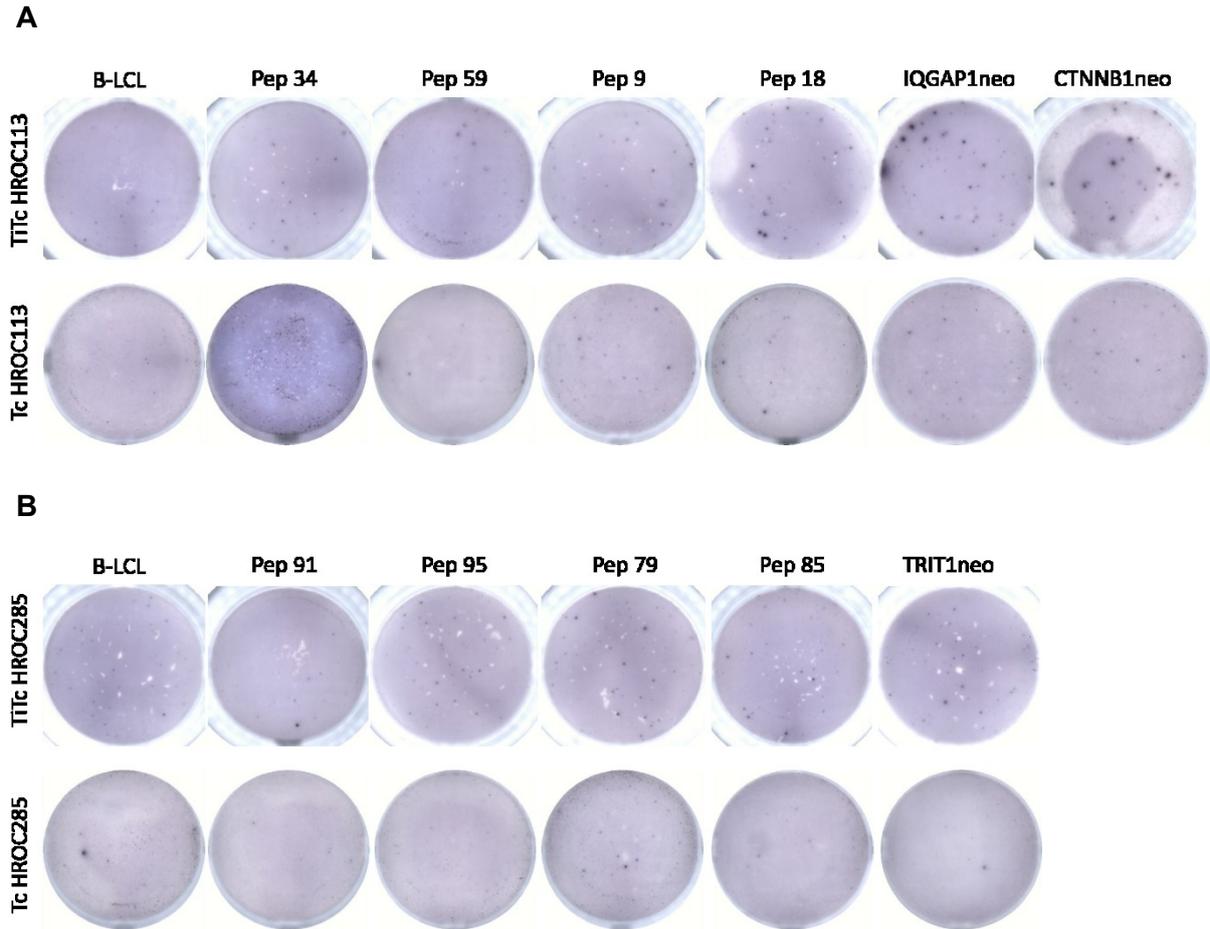


Abbildung A 4: Repräsentative ELISpot-Ergebnisse

Dargestellt sind repräsentative Wells der ELISpot-Analysen. Dabei wurden T-Zellen, die mit B-LCL inkubiert wurden als Negativkontrollen genutzt. In Tc oder TiTc HROC113 (A) stehen Pep 34 und Pep 59 stellvertretend für Peptide, die keine deutliche T-Zell-Reaktion induzierten, wohingegen die Stimulation mit Pep 9 und Pep 18 in einer signifikant erhöhte Anzahl IFN γ -sezernierender Zellen resultierte. In Tc oder TiTc HROC285 (B) stehen Pep 91 und Pep 95 stellvertretend für Peptide, die keine deutliche T-Zell-Reaktion induzierten, wohingegen die Stimulation mit Pep 79 und Pep 85 in einer signifikant erhöhte Anzahl IFN γ -sezernierender Zellen resultierte. Zudem sind repräsentative Ergebnisse der Neoantigenstimulation dargestellt.

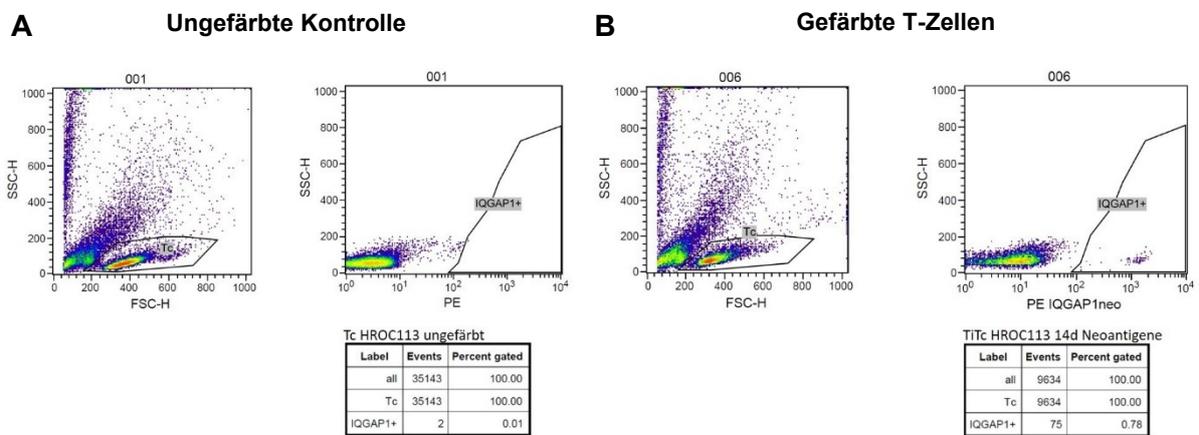


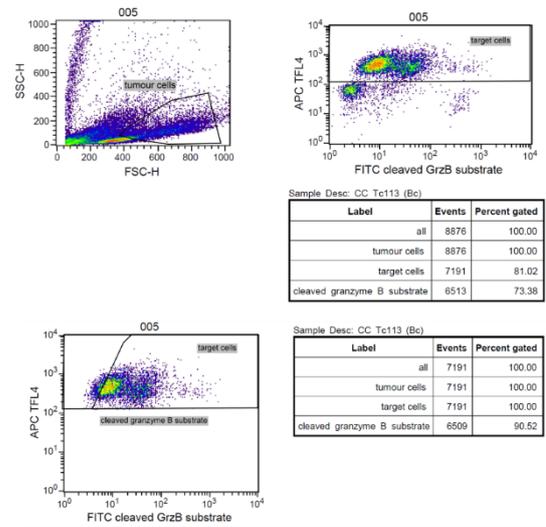
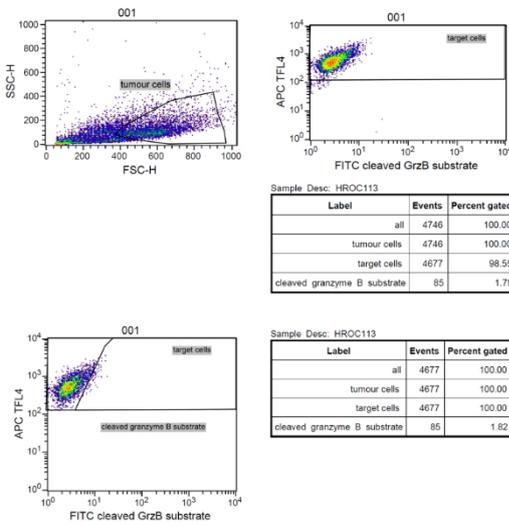
Abbildung A 5: Tetramerfärbung

Die Bestimmung der neoantigenspezifischen T-Zellen erfolgte nach 30-minütiger Inkubation mit dem Tetramer. Ungefärbte Kontrollen (A) dienten der Ausrichtung der Gates für gefärbte T-Zell-Proben (B).

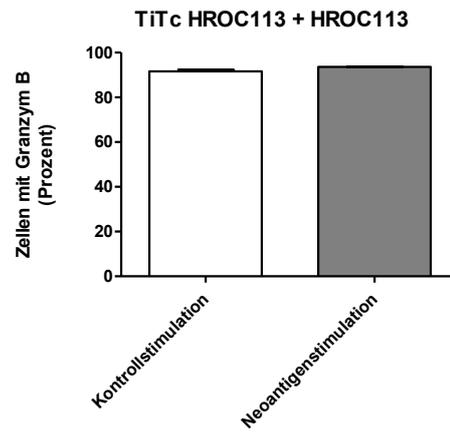
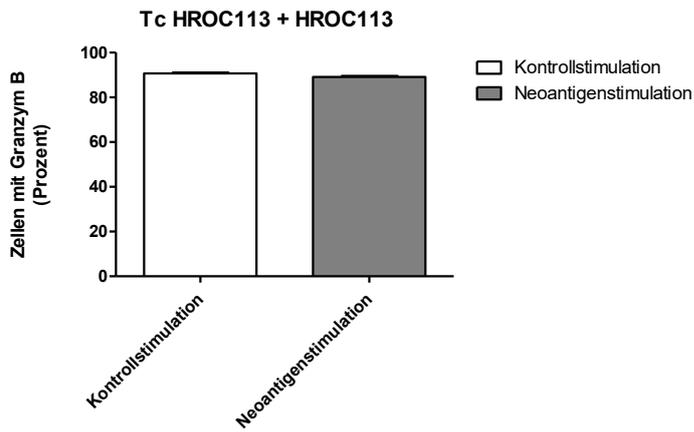
A

Gefärbte Tumorzellen ohne Granzym B-Substrat

Gefärbte Tumorzellen mit stimulierten T-Zellen
und Granzym B-Substrat



B



C

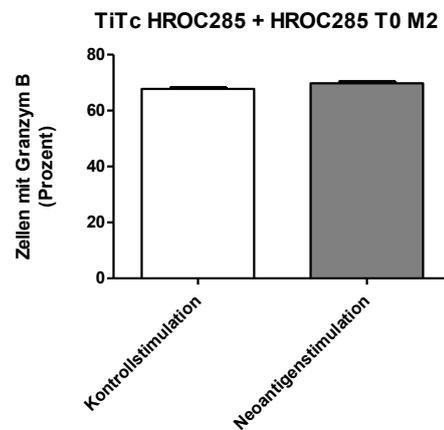
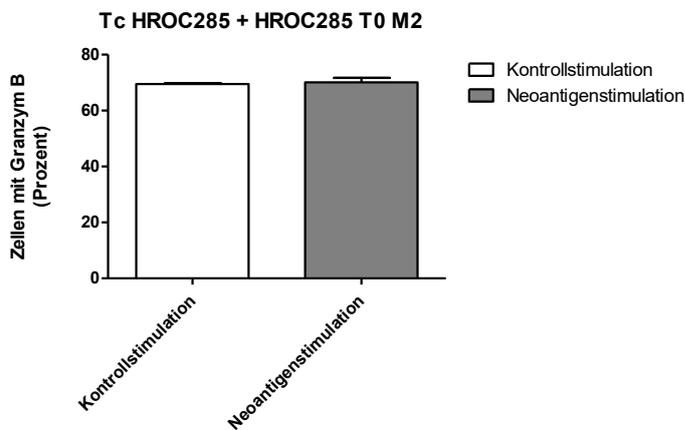


Abbildung A 6: GranToxiLux-Test neoantigenstimulierter T-Zellen

Die T-Zellen wurden entweder für 14 d mit neoantigenbeladenen B-LCL kultiviert oder B-LCL ohne Peptid als Kontrollstimulation. Im Anschluss erfolgte der GranToxiLux-Test, in dem die Granzym B-Aktivität in gefärbten Zielzellen (autologen Tumorzellen) bestimmt wird (A). Dargestellt sind Tc und TiTc HROC113 (B) und Tc und TiTc HROC285 (C).

Tabelle A 1: Tumorspezifische kryptische Peptide und Neoantigene

Peptid	Zelllinie	Behandlung	Peptidsequenz detektiert	Peptidsequenz synthetisiert	Kategorie	Gensymbol	netMHC % rank	Bindungs-prädiktion	HLA-Allel	Peptid-pool	Immuno-genität
1	HROC113	IFNg & unbehandelt	ALPEVQKQV	ALPEVQKQV	UTR5	ATRAID	0,28	strong binder	HLA-A*02:01	HROC113 strong I	+
2	HROC113	IFNg	YLGDSHVLL	YLGDSHVLL	UTR5	ICK	0,02	strong binder	HLA-A*02:01	HROC113 strong I	
3	HROC113	IFNg	SLYDVPVGA	SLYDVPVGA	UTR5	FAM65A	0,01	strong binder	HLA-A*02:01	HROC113 strong I	
4	HROC113	IFNg	VSDGVLKEV	VSDGVLKEV	ncRNA	KLHL17	1,4	weak binder	HLA-A*01:01	HROC113 weak	
5	HROC113	IFNg & unbehandelt	LQREKTESL	IQREKTESL	OffFrame	RNF216	0,05	strong binder	HLA-B*08:01	HROC113 strong I	
6	HROC285	IFNg	NLKRKGNLSL	NLKRKGNLSL	OffFrame	SCP2	0	strong binder	HLA-B*08:01	HROC113 strong I	
7	HROC113	IFNg	LTDTPKATSY	LTDTPKATSY	ncRNA	CCDC58	0,01	strong binder	HLA-A*01:01	HROC113 strong I	
8	HROC285	IFNg & unbehandelt	MAALRALL	MAALRALL	UTR5	ZFYVE26	0,19	strong binder	HLA-B*08:01	HROC113 strong I	+
9	HROC113	IFNg	QTELSQLLK	QTELSQLLK	UTR3	BTF3	1,22	weak binder	HLA-A*01:01	HROC113 weak	+
10	HROC113	IFNg	TLKDRNFQL	TLKDRNFQI	UTR5	CTNND1	0,01	strong binder	HLA-B*08:01	HROC113 strong I	+
11	HROC113	IFNg	AGKMKLSL	AGKMKLSL	UTR5	HSPA5	0,07	strong binder	HLA-B*08:01	HROC113 strong I	
12	HROC113	unbehandelt	LWEEKPVCL	LWEEKPVCL	UTR5	NET1	0,08	strong binder	HLA-C*04:01	HROC285 strong	

ANHANG

13	HROC113	IFNg	ETDLEMETRY	ETDIOMETRY	ncRNA	GS1-25119.4	0,02	strong binder	HLA-A*01:01	HROC113 strong I	+
14	HROC113	IFNg	QAKEYHF	QAKEYHF	UTR5	B4GALT4	0,2	strong binder	HLA-B*08:01	HROC113 strong I	
15	HROC113	IFNg	LLDLPGGKY	LLDLPGGKY	OffFrame	NEDD1	0,03	strong binder	HLA-A*01:01	HROC113 strong I	
16	HROC285	IFNg	NSKKRLNTL	NSKKRLNTL	OffFrame	SET	0	strong binder	HLA-B*08:01	HROC113 strong I	+
17	HROC113	IFNg	YSSELWDLY	YSSEIWDLY	UTR5	ARHGAP5	0,02	strong binder	HLA-A*01:01	HROC113 strong I	+
18	HROC113	IFNg & unbehandelt	NMKQRTERL	NMKQRTERL	OffFrame	ARHGAP12	0,01	strong binder	HLA-B*08:01	HROC113 strong I	+
19	HROC113	IFNg	RYTSQFLRL	RYTSQFIRL	OffFrame	DCAF17	0,37	strong binder	HLA-C*04:01	HROC285 strong	
20	HROC113	IFNg	STLPTVTKV	STLPTVTKV	OffFrame	CTD-2545G14.7	0,27	strong binder	HLA-C*12:03	HROC113 strong I	
21	HROC113	IFNg	TVLSLLHSV	TVLSLLHSV	OffFrame	ARID2	0,33	strong binder	HLA-A*02:01	HROC113 strong I	
22	HROC113	IFNg	HHDAQGCTF	HHDAQGCTF	UTR5	ADNP	0,02	strong binder	HLA-B*38:01	HROC113 strong I	
23	HROC285	IFNg & unbehandelt	AHAPPEQHL	AHAPPEQHL	OffFrame	SLC19A1	0,05	strong binder	HLA-B*38:01	HROC113 strong I	
24	HROC113	unbehandelt	WAAPFPKLL	WAAPFPKLL	UTR5	PRDM4	0,07	strong binder	HLA-C*12:03	HROC113 weak	+
25	HROC113	IFNg	HHGPAEGLL	HHGPAEGLL	OffFrame	CHMP1A	0,08	strong binder	HLA-B*38:01	HROC113 strong I	
26	HROC113	IFNg	YHSSTDSL	YHSSTDSL	UTR5	CTNNB1	0,01	strong binder	HLA-B*38:01	HROC113 strong I	+

ANHANG

27	HROC113	unbehandelt	LLLGTTTHQL	ILLGTTHQL	UTR5	PCGF5	0,06	strong binder	HLA-A*02:01	HROC113 strong I
28	HROC285	unbehandelt	FHDPLTLKF	FHDPLTLKF	UTR5	ZC3H11A	0	strong binder	HLA-B*38:01	HROC113 strong I; HROC285 strong
29	HROC285	unbehandelt	LHDQEDSARFF	IHDQEDSARFF	UTR5	TOR1AIP2	1,53	weak binder	HLA-B*38:01	HROC113 weak
30	HROC285	unbehandelt	SLQPKLPLL	SLQPKLPIL	OffFrame	TTN	0,15	strong binder	HLA-B*08:01	HROC285 weak
31	HROC285	IFNg & unbehandelt	VSVFPVTH	VSVFPVTH	UTR3	TMEM261	1,68	weak binder	HLA-C*12:03	HROC113 weak
32	HROC113	IFNg	MARARAVAA	MARARAVAA	UTR5	METTL9	0,12	strong binder	HLA-B*08:01	HROC113 strong I +
33	HROC285	IFNg & unbehandelt	DLHMRLYTM	DIHMRIYTM	OffFrame	SLC39A7	0,02	strong binder	HLA-B*08:01	HROC113 strong I
34	HROC113	IFNg	MPKKSRLSF	MPKKSRLSF	OffFrame	FDPS	0,06	strong binder	HLA-B*08:01	HROC113 weak
35	HROC113	IFNg & unbehandelt	KM(+15.99)EPVLPLL	KMEPVLPIIL	OffFrame	NR113	0,17	strong binder	HLA-C*04:01	HROC285 strong
36	HROC113	unbehandelt	LSDVLVKQY	LSDVLVKQY	UTR5	NET1	0,02	strong binder	HLA-A*01:01	HROC113 strong I
37	HROC285	unbehandelt	VPLTRLLTL	VPLTRILTL	OffFrame	WARS	0,02	strong binder	HLA-B*08:01	HROC113 strong I +
38	HROC113	IFNg & unbehandelt	LFFGKVFLV	IFFGKVFLV	OffFrame	POMP	1,18	weak binder	HLA-C*07:01	HROC113 weak
39	HROC113	IFNg & unbehandelt	LEYQRKETL	LEYQRKETL	Intronic	NRXN3	0,35	strong binder	HLA-B*08:01	HROC113 strong I

ANHANG

40	HROC113	IFNg	ALVVEVAEA	AIVVEVAEA	OffFrame	FNDC3B	0,39	strong binder	HLA-A*02:01	HROC113 strong II
41	HROC113	IFNg	SLLQSLVPA	SILQSLVPA	UTR5	ATF5	0,32	strong binder	HLA-A*02:01	HROC113 strong II
42	HROC113	IFNg	LKKEKKERL	LKKEKKERL	UTR3	FBXO9	0,57	weak binder	HLA-B*08:01	HROC113 weak
43	HROC285	unbehandelt	STEVAGTGHY	STEVAGTGHY	ncRNA	SLC20A2	0,04	strong binder	HLA-A*01:01	HROC113 strong II
44	HROC285	unbehandelt	DHVSVGSGSL	DHVSVGSGSL	UTR5	STAT6	0,06	strong binder	HLA-B*38:01	HROC113 strong II
45	HROC113	unbehandelt	MHAETAFESL	MHAETAFESL	OffFrame	PREPL	0,08	strong binder	HLA-B*38:01	HROC113 strong II
46	HROC113	IFNg	LMDPSSQSLY	LMDPSSQSLY	ncRNA	MYO15B	0,02	strong binder	HLA-A*01:01	HROC113 strong II
47	HROC113	IFNg & unbehandelt	FLLSHVPSV	FLLSHVPSV	UTR5	CALB1	0	strong binder	HLA-A*02:01	HROC113 strong II
48	HROC285	unbehandelt	DLDYMGNLKY	DLDYMGNLKY	ncRNA	WARS	0,05	strong binder	HLA-A*01:01	HROC113 strong II
49	HROC113	IFNg & unbehandelt	TQDDTGFYTL	TQDDTGFYTL	ncRNA	CEACAMP4	0,11	strong binder	HLA-B*38:01	HROC113 strong II
50	HROC113	unbehandelt	MHFLENLSL	MHFLENISL	OffFrame	RAC1	0,01	strong binder	HLA-B*38:01	HROC113 strong II
51	HROC113	IFNg	HHAGETTGRHL	HHAGETTGRHL	OffFrame	DES11	0,87	weak binder	HLA-B*38:01	HROC113 weak
52	HROC113	IFNg	EHSADAHQL	EHSADAHQL	OffFrame	ADORA2B	0,03	strong binder	HLA-B*38:01	HROC113 strong II
53	HROC113	IFNg	MHHDHETQL	MHHDHETQL	UTR5	IL18BP	0,02	strong binder	HLA-B*38:01	HROC113 strong II

ANHANG

54	HROC113	IFNg	QSDGQSGGKSLY	QSDGQSGGKSI Y	OffFrame	EVI5	0,03	strong binder	HLA- A*01:01	HROC113 strong II	
55	HROC285	IFNg	MLKTSAAAA	MLKTSAAAA	UTR5	SCAF4	1,5	weak binder	HLA- B*08:01	HROC113 weak	
56	HROC113	IFNg	FHSDHVSSL	FHSDHVSSI	OffFrame	MTPAP	0,01	strong binder	HLA- B*38:01	HROC113 strong II	
57	HROC285	IFNg & unbehandelt	HHSDWGNLM(+15.99)	HHSDWGNIM	OffFrame	TRIM31	0,01	strong binder	HLA- B*38:01	HROC113 strong II	+
58	HROC113	IFNg	MLYFKKERL	MLYFKKERL	UTR5	ITGB6	0,06	strong binder	HLA- B*08:01	HROC113 strong II	
59	HROC285	IFNg & unbehandelt	HHFLAPSTF	HHFLAPSTF	OffFrame	TICAM1	0	strong binder	HLA- B*38:01	HROC113 strong II	
60	HROC285	IFNg & unbehandelt	GHSFPDPGL	GHSFPDPGL	OffFrame	TMEM248	0,2	strong binder	HLA- B*38:01	HROC113 strong II	
61	HROC113	IFNg	MHLFQSERW	MHLFQSERW	OffFrame	FAM84A	0,2	strong binder	HLA- B*38:01	HROC113 strong II	
62	HROC285	IFNg & unbehandelt	HHSDWGNLM(+15.99) W	HHSDWGNIMW	OffFrame	TRIM31	0,05	strong binder	HLA- B*38:01	HROC113 strong II	+
63	HROC113	IFNg	LLTVESAVFL	LLTVESAVFL	ncRNA	CEP250	1,43	weak binder	HLA- A*02:01	HROC113 weak	
64	HROC113	IFNg	MQLWGDFAL	MQIWGDFAI	UTR5	MTFR1	0,04	strong binder	HLA- B*38:01	HROC113 strong II	
65	HROC113	IFNg	NTDRPGGYSY	NTDRPGGYSY	ncRNA	MPHOSP 9	0,01	strong binder	HLA- A*01:01	HROC113 strong II	
66	HROC113	IFNg & unbehandelt	RLATLKSTV	RLATLKSTV	UTR5	PLS1	0,85	weak binder	HLA- A*02:01	HROC113 weak	+
67	HROC285	IFNg & unbehandelt	ASDPSSSSGRY	ASDPSSSSGRY	Intronic	SMOC2	0,03	strong binder	HLA- A*01:01	HROC113 strong II	

ANHANG

68	HROC285	IFNg & unbehandelt	TSDRLFLGY	TSDRLFLGY	UTR5	TMEM139	0,01	strong binder	HLA-A*01:01	HROC113 strong II	
69	HROC113	unbehandelt	LLDLDLKY	LLDIDLKY	ncRNA	RP11-624L4.1	0,05	strong binder	HLA-A*01:01	HROC113 strong II	+
70	HROC113	unbehandelt	FLLEDPANQF	FLLEDPANQF	ncRNA	RP11-59E19.1	0,78	weak binder	HLA-A*02:01	HROC113 weak	
71	HROC113	IFNg	HTDRSEARTGLY	HTDRSEARTGLY	UTR3	FAM84A	0,02	strong binder	HLA-A*01:01	HROC113 strong II	
72	HROC285	IFNg & unbehandelt	FLPDHWAVL	FLPDHWAVL	OffFrame	TMEM45B	0,09	strong binder	HLA-A*02:01	HROC113 strong II	
73	HROC113	unbehandelt	VLLGGHGSSL	VLLGGHGSSL	ncRNA	RP11-1094H24.4	1,53	weak binder	HLA-A*02:01	HROC113 weak	
74	HROC113	IFNg	LLEDNLLTL	ILEDNLLTL	OffFrame	ANXA7	0,12	strong binder	HLA-A*02:01	HROC113 strong II	
75	HROC285	unbehandelt	RVPKGDVSL	RVPKGDVSL	UTR5	TPST2	1,35	weak binder	HLA-C*07:01	HROC285 weak	
76	HROC113	unbehandelt	RRPAAALDL	RRPAAALDL	UTR5	PRR15	0,23	strong binder	HLA-C*07:01	HROC285 strong	
77	HROC113	IFNg & unbehandelt	LFDTSVNSA	IFDTSVNSA	UTR5	QSER1	0,39	strong binder	HLA-C*04:01	HROC285 strong	
78	HROC113	IFNg & unbehandelt	VYDEQKLVF	VYDEQKLVF	Intronic	PPP6R3	0	strong binder	HLA-C*04:01	HROC285 strong	
79	HROC285	IFNg & unbehandelt	SLNLRTPLL	SLNIRTPIL	OffFrame	ZNF146	0,07	strong binder	HLA-B*08:01	HROC285 strong	+
80	HROC113	IFNg	KLAKAGLKL	KLAKAGLKL	UTR5	DHRS11	1,07	weak binder	HLA-C*04:01	HROC285 weak	
81	HROC113	IFNg	RLVKPLSL	RIVKPLSL	UTR5	DNMBP	0,33	strong binder	HLA-B*08:01	HROC285 strong	

ANHANG

82	HROC113	IFNg & unbehandelt	KQPWASLLL	KQPWASILL	UTR5	MRPL55	1,18	weak binder	HLA-C*04:01	HROC285 weak
83	HROC113	IFNg	LRVDGKASL	IRVNGKASL	Intronic	GLI2	0,04	strong binder	HLA-C*07:01	HROC285 strong
84	HROC113	IFNg & unbehandelt	SGPDKFVEL	SGPDKFVEL	Intronic	POLA2	0,34	strong binder	HLA-B*08:01	HROC285 strong
85	HROC285	unbehandelt	LFDYEVRL	LFDYEVRL	ncRNA	UHRF1	0,1	strong binder	HLA-C*04:01	HROC285 strong +
86	HROC285	unbehandelt	VFDAQEWPL	VFDAQEWPL	UTR5	TRIM2	0,05	strong binder	HLA-C*04:01	HROC285 strong
87	HROC113	IFNg	KLLQNGVEL	KILQNGVEL	OffFrame	CTDSPL2	0,95	weak binder	HLA-C*04:01	HROC285 weak
88	HROC113	unbehandelt	KLALQLKTL	KLALQIKTL	Intronic	RP11-187O7.3	0,99	weak binder	HLA-B*08:01	HROC285 weak
89	HROC113	IFNg	RVASAGLLL	RVASAGLLL	UTR5	MAP2K6	0,56	weak binder	HLA-C*07:01	HROC285 weak
90	HROC113	unbehandelt	FFDLTLKQV	FFDLTLKQV	Intergenic	null	0,02	strong binder	HLA-C*04:01	HROC285 strong
91	HROC113	unbehandelt	HGPEGRVVL	HGPEGRVVL	UTR5	RPL32	1,04	weak binder	HLA-B*08:01	HROC285 weak
92	HROC113	IFNg	RSPTQYWRL	RSPTQYWRL	OffFrame	FBXO42	1,96	weak binder	HLA-C*04:01	HROC285 weak
93	HROC113	IFNg	RSLPSAVVL	RSLPSAVVL	UTR5	CHCHD10	0,92	weak binder	HLA-C*07:01	HROC285 weak
94	HROC285	unbehandelt	RAPQWYLHL	RAPQWYLHL	OffFrame	WDR43	0,8	weak binder	HLA-C*04:01	HROC285 weak
95	HROC113	IFNg	LTLGESLLR	ITLGESILR	Intronic	CEP57L1	0,5	weak binder	HLA-A*11:01	HROC285 weak

ANHANG

96	HROC113	IFNg	VFDSQTVEL	VFDSQTVEL	UTR5	INSIG2	0	strong binder	HLA-C*04:01	HROC285 strong	
97	HROC285	unbehandelt	RLLSFPLVL	RILSFPLVL	UTR5	ZDHHC5	0,57	weak binder	HLA-C*04:01	HROC285 weak	
98	HROC113	IFNg	KM(+15.99)WEEVLTL	KMWEEVITL	CDS - neoantigen	IQGAP1	0,01	strong binder	HLA-A*02:01	HROC113 neo	+
99	HROC285	unbehandelt	TVLDRKVEL	TVIDRKVEL	CDS - neoantigen	TRIT1	0,07	strong binder	HLA-B*08:01	HROC285 neo	+
100	HROC113	IFNg & unbehandelt	YLDISGLHSGATA	YLDISGIHSGATA	CDS - neoantigen	CTNNB1	0,62	weak binder	HLA-A*02:01	HROC113 neo	+

IX. Danksagung

Während die Recherchen und Experimente der vergangenen Jahre Stück für Stück in dieser Arbeit resultierten, konnte ich während dieser ereignisreichen und herausfordernden Zeit auch als Wissenschaftlerin und Mensch wachsen. An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Clemens Schafmayer bedanken, der als Leiter der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie die Rahmenbedingungen für diese Arbeit geschaffen hat.

Mein herzlicher Dank gilt zudem PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher, der mir die Möglichkeit bot, dieses überaus spannende Thema zu bearbeiten. Ich bin dankbar für die intensiven Diskussionen und wertvollen Anregungen sowie auch für die Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit und weiterer Veröffentlichungen. Vielen Dank ebenso für die Ermutigung meine Ergebnisse zu präsentieren und durch die Betreuung anderer Abschlussarbeiten erste Lehrerfahrungen sammeln zu können.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, Dr. Markus Löffler und Dr. Michael Ghosh der Universität Tübingen sowie Dr. Andreas Schlosser der Universität Würzburg, die durch die Ligandomanalyse der Tumorzelllinien und die Identifizierung der relevanten Peptide die grundlegenden Daten für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben. Ebenso danke ich Andrzej Dzionek und dem gesamten Team der „Personalized Immunotherapy“-Abteilung bei Miltenyi Biotec für die Kooperation.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe MOI bedanken. Vielen Dank für die kollegiale Zusammenarbeit, gegenseitige Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre im manchmal chaotischen und hektischen Laboralltag. Doch natürlich dürfen auch die aufmunternden Worte, das Ablassen von Frust und die humorvolle Ablenkung vom ernstesten Forschungsleben nicht unerwähnt bleiben.

Außerdem möchte ich mich bei Wendy Bergmann aus der Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse und Robby Engelmann aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin für ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Danke, dass ihr eure Expertise im Bereich der Durchflusszytometrie mit mir geteilt habt.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Freunden, meiner Familie und ganz besonders meinem Mann für die Unterstützung während aller Phasen dieser Promotion. Danke, dass ihr mich bei Rückschlägen aufgebaut, bei Erfolgen mit mir gefeiert und auch sonst ausreichend Zerstreuung geboten habt.

X. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock, 28.09.2022

Sandra Schwarz