

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Christian P. Speer, FRCPE

**Prognostischer Einfluss der systemischen Immunsuppression
bei Patienten mit hochgradigem Gliom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Benjamin Freitag
aus Stuttgart

Würzburg, Juni 2017

Referent: Professor Dr. med. Matthias Eyrich

Korreferent: Privatdozent Dr. med. Mario Löhr

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 1. August 2018

Der Promovend ist Arzt.

Meiner Familie und unseren Patienten.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Glioblastoma multiforme	1
1.1.1. Grundlagen	1
1.1.2. Prognose	1
1.1.3. Standardtherapie	2
1.2. Tumor-Escape-Mechanismen	3
1.2.1. Blut-Hirn-Schranke	3
1.2.2. Zelluläre Mechanismen	4
1.2.3. Humorale Mechanismen	6
1.3. Zielsetzung der Studie	7
2. Material und Methoden	8
2.1. Patientenkollektiv und biologisches Material	8
2.2. Hämatologie und Durchflusszytometrische Untersuchungen	9
2.2.1. Färbung von Oberflächenmolekülen	10
2.2.2. Färbung von intrazellulärem FoxP3	10
2.2.3. Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung	11
2.2.4. Durchflusszytometrische Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen	12
2.2.5. Durchflusszytometrische Quantifizierung und Phänotypisierung von peripheren dendritischen Zellen	13
2.3. Magnetische Separation, Reifung und Phänotypisierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen	13
2.3.1. Magnetische Separation der plasmazytoiden DZ	13
2.3.2. Reifung der isolierten plasmazytoiden DZ	14
2.3.3. Phänotypisierung der ausgereiften plasmazytoiden DZ	14
2.4. Durchflusszytometrische Quantifizierung und Phänotypisierung von peripheren myeloiden Suppressorzellen	14

2.5.	Biomarker	15
2.5.1.	Bestimmung von Serumproteinen mittels <i>Luminex</i> -Technologie	15
2.6.	Reagenzien	17
2.7.	Gerätschaften	18
2.8.	Antikörper	18
2.9.	Statistik	21
2.9.1.	Normalverteilung der Stichprobe	21
2.9.2.	Vergleich der prä- und postoperativ erhobenen Parameter	21
2.9.3.	Vergleich zwischen WHO °III, WHO °IV und Kontrollgruppe	21
2.9.4.	Zusammenhänge zwischen einzelnen Biomarkern	22
2.9.5.	Zusammenhang der Daten mit progressionsfreiem und Gesamtüberleben	22
3.	Ergebnisse	23
3.1.	Patientencharakteristika	23
3.2.	Dendritische Zellen	24
3.2.1.	Periphere myeloide und plasmazytoide DZ-Subpopulationen	24
3.2.2.	Kultivierung und Ausreifung plasmazytoider DZ	26
3.3.	Leukozyten-Populationen	28
3.3.1.	Neutrophile und Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio	28
3.3.2.	Lymphozyten	29
3.3.3.	Myeloide Suppressorzellen	31
3.4.	Biomarker	33
3.4.1.	Einfluss des WHO-Grades auf Biomarker	33
3.4.2.	Einfluss der Tumorentfernung auf Blutbild und Biomarker	35
3.5.	Einfluss der erhobenen Parameter auf das progressionsfreie und das Gesamtüberleben	36
3.5.1.	Einfluss von IL-12 und IP-10 auf das progressionsfreie Überleben	36
3.5.2.	Einfluss von EGF auf das Gesamtüberleben	36
3.5.3.	Einfluss von CD14 ⁺ HLA-DR-Monozyten auf das progressionsfreie und das Gesamtüberleben	37

4. Diskussion	38
5. Zusammenfassung	47
6. Abkürzungsverzeichnis	48
7. Literaturverzeichnis	50
8. Danksagung	
9. Lebenslauf	
10. Publikation	

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Durchflusszytometrisch quantifizierte plasmazytoide (linke Grafik) und myeloide DZ (rechte Grafik) im peripheren Blut von Gliom-Patienten im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe prä- und postoperativ. 25
- Abbildung 2: Phänotyp zirkulierender DZ prä- und postoperativ; die Auswertung erfolgte nach Selektion der CD45⁺SSC⁻-Zellen und Gating auf CD1c⁺ bzw. CD303⁺ im Histogramm-Plot. 26
- Abbildung 3: Kostimulatorischen Oberflächenmoleküle und Aktivierungsmarker auf plasmazytoiden DZ nach 48 h Stimulation mit Interleukin-3 (10 ng/ml) und Imiquimod (5 µg/ml) unter DZ-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂. 27
- Abbildung 4: Präoperativer Vergleich der durchflusszytometrisch erhobenen, absoluten Leukozyten-Zahlen bei WHO °III- und °IV-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. 29
- Abbildung 5: Präoperativer Vergleich der durchflusszytometrisch gemessenen Frequenzen von HLA-DR⁻-Monozyten sowie myeloiden und plasmazytoiden DZ bei WHO °III- und °IV-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. 31
- Abbildung 6: Patienten mit WHO °IV zeigen erhöhte Frequenzen von HLA-DR⁻-Monozyten (A), was sich nach durchflusszytometrischem Gating auf die Monozyten-Population auch im MFI bestätigt (B). Andere MDSC-Populationen (z.B. SSC⁺CD66b⁺CD125⁻) konnten in der vorliegenden Arbeit nicht detektiert werden (A). 32
- Abbildung 7: Präoperativer Vergleich der mittels Luminex-Technologie bestimmten Serumkonzentrationen von IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 sowie MACC1 bei WHO °III- und °IV-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. 34
- Abbildung 8: Einfluss der EGF-Konzentration im Serum auf das Gesamtüberleben. 36
- Abbildung 9: Einfluss der CD14⁺HLA-DR⁻-Frequenz im peripheren Blut auf das progressionsfreie Überleben. 37
- Abbildung 10: Einfluss der CD14⁺HLA-DR⁻-Frequenz im peripheren Blut auf das Gesamtüberleben. 37

1. Einleitung

1.1. Glioblastoma multiforme

1.1.1. Grundlagen

Das Glioblastoma multiforme (syn.: Glioblastom) gehört unter den Tumoren des zentralen Nervensystems zur Gruppe mit dem schlechtesten Outcome. Als neuroepithelialer Tumor zählt es zu den hirneigenen Tumoren, es geht von den Astrozyten aus ¹. Die Inzidenz liegt bei 3,2 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr ².

Die Klassifikation der hirneigenen Tumore erfolgt primär unabhängig von der ausgehenden Zellreihe entsprechend der Aggressivität und Invasivität des Tumors in vier aufsteigenden Graden gemäß der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Glioblastome werden in der WHO-Klassifikation dem °IV und damit dem höchsten Grad zugeordnet ³. Gemeinsam ist ihnen mit dem WHO °III eine - deutlicher ausgeprägte - Verkürzung der Überlebenszeit.

Aktuell präsentieren sich circa 90 % der Patienten mit primären Tumoren, 10 % entwickeln sich im Verlauf aus astrozytären Tumoren niedrigeren WHO-Grades, z.B. aus anaplastischen Astrozytomen oder anaplastischen Oligodendrogliomen ⁴. Die Inzidenz dieser beiden WHO °III-Neoplasien liegt mit 0,38 bzw. 0,1 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr ² deutlich unter der des Glioblastoms.

Der hohe Anteil an Glioblastomen bezogen auf alle primären, malignen Hirn- und ZNS-Tumoren von 46 % unterstreicht die Relevanz des Glioblastoms im klinischen Alltag ².

1.1.2. Prognose

Das Überleben nach Diagnosestellung, bezogen auf Patienten die mit der Standardtherapie bestehend aus operativer Tumorentfernung bzw. Tumor-

Debulking, systemischer Chemotherapie und Radiotherapie behandelt wurden, ist mit einer 2-Jahres-Überlebensrate von 26,5 % sowie einem medianen Überleben nach Diagnosestellung von 14,6 Monaten weiterhin nicht zufriedenstellend ⁵. Dies erklärt sich insbesondere durch die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits regional gestreuten Tumorzellen, die eine chirurgische Tumorentfernung *in toto* im Sinne einer R0-Resektion nicht ohne signifikanten Schaden im gesunden Hirnparenchym zulassen.

Ging man lange davon aus, dass Glioblastome trotz ihres invasiven Wachstums nicht systemisch metastasieren, so gibt es zwischenzeitlich Fallberichte, die dies widerlegen und neben regionalen Lymphknoten-Metastasen auch von einer hämatogenen Streuung im Sinne hepatischer, ossärer und pulmonaler Metastasen berichten ⁶. Bei 20,6 % der Glioblastom-Patienten wurden GFAP-positive Zellen im peripheren Blut als Indikator einer hämatogenen Streuung von Tumorzellen beschrieben ⁷.

1.1.3. Standardtherapie

Die Standardtherapie des Glioblastoms besteht aktuell aus einer Kombination von chirurgischer Tumorresektion, Radiotherapie (RTx) sowie systemischer Chemotherapie (CTx).

Die chirurgische Resektion hat das Ziel, die Tumormasse so radikal wie möglich zu entfernen. Unterschieden wird eine makroskopisch totale Resektion von einer makroskopisch subtotalen Resektion ⁴. Die mikrochirurgische Tumorentfernung erfolgt in der Regel unter Zuhilfenahme von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), wodurch eine bessere Abgrenzung maligne entarteter Zellen vom gesunden Hirnparenchym ermöglicht wird ⁸.

Für unsere Studie haben wir außerdem eine Gruppe der inoperablen Patienten definiert, bei denen lediglich eine offene oder stereotaktische Biopsie zur neuropathologischen Diagnosesicherung entnommen wurde.

Die zweite Säule der Standard-Therapie stellt die RTx dar ⁴. In der Regel besteht die Therapie aus einer fraktionierten Ganzhirnbestrahlung in sechs Zyklen, in denen an fünf Tagen pro Woche mit 2 Gy bestrahlt wird ^{8,9}.

Die dritte Säule stellt die CTx mit Temozolomid, einem alkylierenden Zytostatikum, dar. Therapiestandard ist die orale Therapie mit 75 mg/m² KOF/d während der RTx, gefolgt von fünftägigen Zyklen mit 150-200 mg/m² KOF/d alle 28 Tage.

Die CTx verbessert im Vergleich zur alleinigen operativen Tumorentfernung plus RTx das mediane Überleben von 12,1 Monaten auf 14,6 Monate; das 2-Jahres-Überleben verbessert sich entsprechend von 10,4 % auf 26,5 % ^{5,10}. Eine Dosiserhöhung erbringt keinen weiteren Überlebensvorteil ¹¹.

Zwischenzeitlich konnte gezeigt werden, dass insbesondere Patienten mit methyliertem O-6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase-Gen (MGMT) von der CTx mit Temozolomid profitieren. Bei 45 % der Patienten ist das MGMT-Gen methyliert, für sie konnte ein medianes Überleben im Vergleich zur alleinigen RTx von 21,7 Monaten anstatt 15,3 Monaten gezeigt werden. Für Patienten ohne methyliertes MGMT-Gen zeigte die Temozolomid-Therapie keinen statistisch signifikanten Vorteil bezüglich des Überlebens ¹².

Monoklonale Antikörper gegen VEGF (Bevacizumab) verlängern zwar das progressionsfreie Überleben, zeigen aber keinen relevanten Einfluss auf das Gesamtüberleben ^{13,14}.

1.2. Tumor-Escape-Mechanismen

Für hochgradige Gliome - insbesondere für das Glioblastom - wurden verschiedene Tumor-Escape-Mechanismen beschrieben, über die der Tumor sich der Detektion und Zerstörung durch das Immunsystem entzieht ^{15,16}.

1.2.1. Blut-Hirn-Schranke

Die frühere Vorstellung, dass sich das zentrale Nervensystem mit dem Hirnparenchym, den Ventrikeln und den Meningen der systemischen Immunüberwachung entzieht, wurde zwischenzeitlich durch neue Erkenntnisse

abgelöst, die eine in den Hirnhäuten lokalisierte Immunüberwachung und lymphatische Gefäße entlang der Sinus zeigen ¹⁷.

Antigene werden in zervikale Lymphknoten drainiert, zusätzlich erfolgt eine Aktivierung über antigenpräsentierende Zellen aus dem ZNS, welche sich ebenfalls im Lymphknoten sammeln und damit die Blut-Hirn-Schranke passieren können. Aktivierte T-Zellen wiederum können in entzündlich verändertes Gewebe im zentralen Nervensystem penetrieren. Der Tumor an sich wird mit Einbruch in die Blut-Hirn-Schranke für das Immunsystem detektierbar ¹⁸.

1.2.2. Zelluläre Mechanismen

In der monozytären Zellreihe wurde eine verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) sowie des antigenpräsentierenden Oberflächenmoleküls HLA-DR beschrieben ^{15,19-22}. Ursächlich hierfür sind unter anderem verschiedene im Tumor-Mikromilieu vorhandene Transmitter wie IL-10, PGE₂ und TGF-β ²³. Dies hat zur Folge, dass Tumor-Antigene schlechter präsentiert werden und konsekutiv die Bildung spezifischer T-Zellen negativ beeinträchtigt ist.

Weiterhin wurde eine veränderte Zytokin-Sekretion der Monozyten von einem immunaktivierenden Th1-Profil hin zu einem eher immunsuppressiven Th2-Profil mit vermehrter IL-10-Sekretion beschrieben ²⁰. Diese Veränderungen auf monozytärer Ebene affektieren direkt die zelluläre Immunantwort.

Eng verflochten mit den Monozyten sind die dendritischen Zellen. Allgemein bekannt sind sie als professionelle antigen-präsentierende Zellen mit Schlüsselposition der Regulation des Immunsystems ^{24,25}.

Im Kontext der vorliegenden Arbeit ist hier zum einen ihre Verwendung als Tumorlysat-gepulste, autologe Vakzine zu erwähnen. Verschiedene Arbeiten konnten bereits vielversprechende Ergebnisse im Sinne eines *partial response* bei sehr guter klinischer Verträglichkeit der Vakzine demonstrieren ^{26,27}.

Zum anderen spielen DZ aber auch im Kontext von Tumor-Escape-Mechanismus eine Rolle. Im Tumor wird in Gegenwart von IL-10 die Ausreifung von DZ inhibiert, was zu einer reduzierten Antigen-Präsentation führt ²⁰. Die Präsentation von

Antigenen in Gegenwart von IL-10 führt bei naiven DZ zur Induktion von regulatorischen T-Zellen ^{28,29}.

Verschiedene Mechanismen, die die qualitative Kompromittierung der T-Zellen erklären, wurden in der Vergangenheit beschrieben.

Hierzu zählen neben veränderten Phosphorylierungsprozessen insbesondere auch eine verminderte Sekretion von IL-2 sowie eine verminderte Expression von IL-2-Rezeptoren, auch die Reaktion auf IL-2 ist herabgesetzt ¹⁵.

Quantitativ wurden reduzierte Frequenzen sowohl von T-Helfer- ³⁰ als auch von T-Effektor-Zellen ¹⁵ detektiert. Diese T-Lymphopenie kann zum einen durch den Zytokin-Shift in Richtung eines Th2-Profiles mit vermehrter Sekretion von IL-4 und IL-10 erklärt werden. Zum anderen exprimieren Gliome vermehrt FAS, FAS-Ligand und APO, was die Apoptose von T-Lymphozyten induzieren kann ¹⁵.

Im Zusammenhang mit der T-Zell-Reihe müssen auch die regulatorischen T-Zellen als Tumor-Escape-Mechanismus erwähnt werden.

Regulatorische T-Zellen treten im gesunden Hirnparenchym nicht auf, bei Patienten mit hochgradigen Gliomen treten sie mit schlechterem Tumor-Grading proportional häufiger im Tumorgewebe auf ³¹. Sie haben, beeinflusst von MCP-1, eine erhöhte Migrationskapazität in Richtung des Tumors ³². Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der regulatorischen T-Zellen zu einer Zerstörung von Tumorzellen durch CD4- und CD8-positive T-Zellen führt ³³; in einem weiteren Versuch zeigte sich ein signifikantes Ansprechen auf Tumorlysat-gepulste DZ nach regulatorischer T-Zell-Depletion ³⁴.

Zuletzt sind bezüglich der zellulären Mechanismen myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*; MDSC) zu erwähnen.

Diese heterogene Population hat als funktionelle Gemeinsamkeit eine zelluläre Immunsuppression ³⁵. Im Mikromilieu von Glioblastomen konnten HLA-DR-Monozyten nachgewiesen werden, welche die T-Zell-Proliferation inhibieren ³⁶. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass monozytäre Zellen im GBM vermehrt IL-10 sowie als Hauptproduzent TGF- β sezernieren ³⁷ und hierdurch die

Apoptose von aktivierten Lymphozyten induzieren ³⁸ bzw. die zytotoxische T-Zell-Proliferation supprimieren.

Die Antikörper-vermittelte Reduktion der MDSC-Frequenz im murinen Gliom-Modell führte zu einer erhöhten Frequenz von zytotoxischen T-Zellen im Mikromilieu des Tumors sowie zu einem verzögerten Tumorwachstum ³⁹, was die Relevanz dieser Zellgruppe als Tumor-Escape-Mechanismus verdeutlicht.

1.2.3. Humorale Mechanismen

Im Bereich der humoralen Immunantwort sind sowohl lokal als auch systemisch veränderte Zytokinspiegel beim Gliom-Patienten bekannt.

Grauer et al. beschreiben unter anderem zahlreiche immunsuppressive Faktoren, die vom Tumor sezerniert werden, unter anderem IL-10, TGF- β und VEGF sowie einen Mangel an immunstimulierenden Faktoren wie IL-12, IL-18 und IFN- γ ¹⁸. Dieses veränderte Mikromilieu bewirkt kumulativ eine lokale Immunsuppression.

Ein weiterer Mechanismus, über den sich hochgradige Gliome der Detektion und Zerstörung durch das Immunsystem entziehen, ist die veränderte Expression von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen ¹⁶.

HLA-G kann mit Oberflächenmolekülen auf natürlichen Killer-Zellen interferieren und diese modulieren, so dass die Zytolyse der Zielzelle – in diesem Fall der Tumorzelle – verhindert wird. Weiterhin agiert HLA-G sowohl mit T-Helfer- als auch mit zytotoxischen T-Zellen. Über diese Interaktion wird die T-Zell-Reaktion dahingehend moduliert, dass zum einen die Tumor-Antigen-spezifische Proliferation der T-Zellen, zum anderen konsekutiv die T-Zell-abhängige Zytolyse inhibiert wird ^{40,41}.

Auch eine vermehrte HLA-E-Expression konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene in Gliomen nachgewiesen werden. Durch entsprechende Blockade von HLA-E kann die Natürliche-Killer-Zell-vermittelte Zytolyse von Tumorzellen wiederhergestellt werden ⁴².

Wie bereits erwähnt sind im Sinne eines Th₂-Zytokin-Profiles auf systemischer Ebene unter anderem erhöhte IL-10- und TGF-Konzentrationen beschrieben. TGF vermindert die Reaktivität von T-Zellen und reduziert sowohl die Expression von Oberflächenmolekülen als auch die Sekretion von Zytokinen in Monozyten¹⁵. Weiterhin beeinflusst TGF die Ausschüttung von IL-2 und IFN- γ und hemmt das Wachstum von B-Lymphozyten⁴³.

TGF- β 1 und TGF- β 2 wurden in präoperativ erhöhten Serumspiegeln detektiert, ein postoperativer Abfall des TGF- β 2 um > 6 ng/ml war signifikant mit einem Überlebensvorteil korreliert⁴⁴.

IL-10 inhibiert die Sekretion verschiedener Zytokine, unter anderem von IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ und GM-CSF, aus Lymphozyten und Monozyten und hat damit ebenfalls einen immunsuppressiven Effekt¹⁵.

Die vielfältigen Einflüsse des IL-10 wurden im vorigen Kapitel eingehend erörtert.

Im Kontext mit MDSC wurden in Patienten mit Gliom erhöhte Konzentrationen an Arginase und G-CSF beobachtet⁴⁵.

Verschiedene Zytokine wurden ferner mit der Prognose in Korrelation gebracht, so stellen IL-1R, IL-7, MCP-1 und sgp130 als gemeinsames Pattern einen unabhängigen Prädiktor für das Überleben dar⁴⁶.

1.3. Zielsetzung der Studie

Immunologische Tumor-Escape-Mechanismen können ein wichtiges Hindernis in der Therapie hochgradiger Gliome darstellen, besonders im Hinblick auf die zunehmende Anwendung von Immuntherapien. Etliche dieser Mechanismen sind in Zellkulturversuchen, Tierexperimenten oder auch kleineren Studien an Patienten bereits beschrieben worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die umfassende Charakterisierung des systemischen Immunstatus anhand eines breiten Portfolios von zellulären und plasmatischen Biomarkern bei Patienten mit hochgradigem Gliom (WHO °III und °IV) sowohl als *status quo* Erhebung als auch zur Detektion von Unterschieden

prä- und postoperativ, jeweils im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe. Weiterhin sollen die erhobenen Parameter mit dem progressionsfreien sowie dem Gesamtüberleben der Patienten in Korrelation gebracht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv und biologisches Material

Für die Studie wurden Patientinnen und Patienten der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg ausgewählt, die sich im Zeitraum von April 2012 bis April 2014 mit Verdacht auf ein hochgradiges Gliom (HGG) vorstellten.

Die Patienten wurden ausführlich über Inhalt und Zielsetzung der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Unter anderem wurden sie über die Notwendigkeit peripher-venöser Blutentnahmen und die Möglichkeit, ohne Angaben von Gründen ihr Einverständnis widerrufen zu können, aufgeklärt. Ein positives Votum der Ethik-Kommission bei der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg (Antrag-Nr. 135/09) liegt vor.

Bei 61 Patienten wurde im Verlauf nach stereotaktischer oder offen-chirurgischer Probenexzision ein hochgradiges Gliom (WHO °III: 8 Patienten, WHO °IV: 53 Patienten) durch die Abteilung für Neuropathologie des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg (Privatdozentin Dr. Camelia Monoranu) diagnostiziert. Bei 36 Patienten konnte zwischen dem fünften und siebten postoperativen Tag eine weitere Blutentnahme durchgeführt werden (WHO °III: 3 Patienten, WHO °IV: 33 Patienten).

Folgende patientenbezogene Daten wurden erfasst: Alter, Geschlecht, primäres oder sekundäres Gliom, ggf. Vortherapien (z.B. chirurgische Tumorentfernung, CTx mit Temozolomid und ggf. Bevacizumab, RTx), Datum der aktuellen OP, Resektionsgrad, Histologie und WHO-Grad, Karnofsky-Index, Dauer der

perioperativen Dexamethasonbehandlung, Dauer des progressionsfreien sowie des Gesamtüberlebens.

Als gesunde Referenzgruppe stellten sich neun klinisch gesunde Personen freiwillig zur Verfügung. 16 weitere Patienten wurden aufgrund anderer Diagnosen (entzündlicher Prozess, hämato-onkologische Neoplasie, niedriggradiges Gliom) nicht in die Studie eingeschlossen.

2.2. Hämatologie und Durchflusszytometrische Untersuchungen

Alle durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden aus EDTA-Blut an einem *FACSCanto II* (BD, Heidelberg) durchgeführt. Kalibrierung und Kompensation des Geräts erfolgten nach den Anweisungen des Herstellers.

Zur Berechnung der absoluten Zellzahlen wurde unmittelbar vor der Färbung ein Blutbild mit folgenden Parametern angefertigt (*Advia 2120i*, Siemens, Erlangen, D): Leukozyten [n/μl], Neutrophile [%], Lymphozyten [%], Monozyten [%], Eosinophile [%], Basophile [%], Hämoglobin [g/dl] und Thrombozyten [n*10³/μl]. Die Auswertung der durchflusszytometrisch erhobenen Daten erfolgte mittels *FlowJo* (FlowJo version 9.6, Treestar, Ashland, OR, USA).

Tabelle 1: Im Blutzellanalysator erhobene Parameter

Population	Subpopulation
Hämoglobin [g/dl]	
Thrombozyten [n*10 ³ /μL]	
Leukozyten [n/μL]	
	Lymphozyten [%]
	Lymphozyten [n/μL]
	Monozyten [%]
	Monozyten [n/μL]
	Neutrophile [%]
	Neutrophile [n/μL]
	Eosinophile [%]
	Eosinophile [n/μL]
Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio (berechnet)	

2.2.1. Färbung von Oberflächenmolekülen

Zunächst wurden 100 µL EDTA-Blut in ein Messröhrchen gegeben, in dem die entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörper vorgelegt waren. Nach Vortex-Durchmischung wurden die Proben für 10 min im Dunklen bei 4 °C inkubiert.

Im Anschluss wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 1 ml *FACS Lysing Solution* (BD, Heidelberg, D) für 10 min im Dunklen bei RT lysiert. Es folgten insgesamt drei Waschschriffe zur Entfernung der *FACS Lysing Solution*, der lysierten Erythrozyten sowie der überschüssigen Antikörper mit PBS-Puffer (Zentrifuge 300 g, 20 °C, 5 min, Beschleunigung 9, Bremse 9).

Danach wurden die Zellen nach Zugabe von 100 µL PBS-Puffer und erneuter Durchmischung am Durchflusszytometer gemessen und 10.000 Events gespeichert.

2.2.2. Färbung von intrazellulärem FoxP3

Für diese Färbung wurde primär eine Färbung der Oberflächenmoleküle wie oben beschrieben durchgeführt.

Anschließend wurden die Zellen entsprechend der Anweisungen des Herstellers in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in Fixierungs-/Permeabilisierungslösung gegeben und für 30 min im Dunklen bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Waschschriff (Zentrifuge 300 g, 4 °C, 5 min, Beschleunigung 9, Bremse 9) mit 1 ml PBS-Puffer und ein weiterer Waschschriff mit 1 ml Fixierungs-/Permeabilisierungspuffer. Anschließend wurden die Zellen in 80 µL Fixierungs-/Permeabilisierungspuffer resuspendiert und mit 20 µL FcR-Block für 5 min bei 4 °C inkubiert. Nun wurden 10 µL des Anti-FoxP3-Antikörpers hinzugegeben und abermals für 30 min im Dunklen bei 4 °C inkubiert. Nach einem letzten Waschschriff mit 1 ml Fixierungs-/Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen in 100 µL Puffer resuspendiert und am Durchflusszytometer gemessen und 10.000 Events gespeichert.

2.2.3. Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung

Zunächst wurde die Gesamtpopulation CD45 gegen SSC aufgetragen. Mithilfe der Positivität auf CD45 und dem SSC wurden nachfolgend die drei Leukozyten-Subpopulationen Lymphozyten (SSC⁻CD45⁺), Monozyten (SSC⁻CD45⁺) und Granulozyten (SSC⁺CD45⁻) gated.

Die Lymphozyten-Subpopulation wurde weiter differenziert: Zunächst bestimmten wir den Anteil der T-Zellen (CD3⁺). Diese Population wurde hinsichtlich der Expression der T-Zell-Rezeptoren TZR $\alpha\beta$ bzw. TZR $\gamma\delta$ untersucht.

Die T-Zell-Population wurde weiter in T-Helfer-Zellen (CD3⁺CD4⁺) und T-zytotoxische-Zellen (CD3⁺CD8⁺) unterteilt, woraus wir die CD4/CD8-Ratio berechneten.

Die Population der T-Helfer-Zellen (CD3⁺CD4⁺) unterteilten wir in naive T-Helfer-Zellen (CD45RA⁺) und Memory-T-Zellen (CD45RO⁺).

Die Population der zytotoxischen T-Zellen (CD3⁺CD8⁺) differenzierten wir in naive Zellen (CD27⁺CD45RA⁺), antigenerfahrene Zellen (CD27⁺CD45RA⁻) und terminal differenzierte Zellen (CD27⁻CD45RA⁺).

Die B-Zell-Population wurde aus der Lymphozyten-Population anhand der CD19-Positivität quantifiziert.

In der Population der Natürlichen Killer-Zellen differenzierten wir zum einen die einfach-positiven CD16⁻CD56⁺-Zellen, zum anderen die doppelt positiven Zellen (CD16⁺CD56⁺).

Tabelle 2: Im Rahmen der Immunphänotypisierung erhobene Parameter

Population	Subpopulation	Gating
Granulozyten		CD45 ⁺ SSC ⁺
Monozyten		CD45 ⁺ SSC ⁻
Lymphozyten		CD45 ⁺ SSC ⁻
	T-Zellen	CD3 ⁺
	T-Zellen mit T-Zell-Rezeptor $\alpha\beta$	CD3 ⁺ TZR $\alpha\beta$ ⁺
	T-Zellen mit T-Zell-Rezeptor $\gamma\delta$	CD3 ⁺ TZR $\gamma\delta$ ⁺
	T-Helfer-Zellen	CD3 ⁺ CD4 ⁺
	T-zytotoxische Zellen	CD3 ⁺ CD8 ⁺
		CD4/CD8-Ratio
	T-Helfer-Zellen, naiv	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45Ra ⁺
	T-Helfer-Zellen, memory	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45Ro ⁺
	T-zytotoxische-Zellen, naiv	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CD45Ra ⁺
	T-zytotoxische -Zellen, central memory	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CD45Ra ⁻
	T-zytotoxische -Zellen, effector	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁻ CD45Ra ⁺
	B-Zellen	CD19 ⁺
	Natürliche Killer-Zellen	CD16 ⁻ CD56 ⁺
	Natürliche Killer-Zellen	CD16 ⁺ CD56 ⁺

2.2.4. Durchflusszytometrische Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen

Ausgehend von der oben beschriebenen Definition der Lymphozyten-Population quantifizierten wir im nächsten Schritt die Anzahl der zirkulierenden regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut.

In der Lymphozyten-Population wurden zuerst die T-Helfer-Zellen (CD3⁺CD4⁺) gated. Danach trugen wir CD127 gegen CD25 auf. Als regulatorische T-Zellen in dieser Subpopulation wurden die Zellen definiert, die CD25 hoch exprimierten und gleichzeitig CD127-negativ waren (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD45⁺CD127⁻).

Zur Verifizierung dieser Gating-Strategie mittels Oberflächenmolekülen wurde initial parallel eine intrazelluläre Färbung auf FoxP3 (*Treg Detection Kit*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) entsprechend der Instruktionen des Herstellers durchgeführt.

Nach Gating der T-Helfer-Zellen (CD3⁺CD4⁺) stellten wir CD25 gegen FoxP3 dar. Als regulatorische T-Zellen wurden die doppelt-positiven Zellen auf CD25 und FoxP3 definiert und bezüglich der Negativität auf CD127 abgeglichen (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD45⁺CD127⁻FoxP3⁺).

2.2.5. Durchflusszytometrische Quantifizierung und Phänotypisierung von peripheren dendritischen Zellen

Die dendritischen Zellen definierten wir in der durchflusszytometrischen Messung des peripheren Blutes nach Gating auf CD45⁺-Zellen als positive Population in der Region SSC⁻ und CD1c⁺ (myeloide DZ) bzw. CD303⁺ (plasmazytoide DZ).

Die sich im Gating SSC gegen CD1c bzw. CD303 nun abgrenzende Population CD45⁺SSC⁻CD1c⁺ (myeloide DZ) bzw. CD45⁺SSC⁻CD303⁺ (plasmazytoide DZ) wurde nach Bestimmung der absoluten und relativen Zellzahl weiter untersucht.

Die Phänotypisierung erfolgte im Histogramm-Plot anhand der Oberflächenmoleküle CCR7, CD80, CD83, CD86, CD274, HLA-DR und IP10.

Für die Analyse der DZ wurden jeweils 100.000 Events am Durchflusszytometer registriert.

2.3. Magnetische Separation, Reifung und Phänotypisierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen

2.3.1. Magnetische Separation der plasmazytoiden DZ

18 ml EDTA-Blut der Patienten wurden mit 18 ml PBS-Puffer verdünnt und zur Dichtegradientenzentrifugation auf 10 ml Ficoll aufgetragen. Pro Patient wurden zwei unabhängige Ansätze erstellt. Die Zentrifugation erfolgte über 20 min bei 300 g und 4 °C (Beschleunigung 3, keine Bremse). Die sich abgrenzende Schicht der PBMC wurde vorsichtig abgetragen und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen (200 g, 10 min, 4 °C).

Die Isolation der plasmazytoiden DZ aus den gewonnenen PBMC erfolgte mittels magnetischer Zellseparation (*CD303 (BDCA-2) MicroBead Kit human*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) entsprechend der Angaben des Herstellers. Bei diesem Verfahren werden zunächst die CD303⁺-DZ mit einem Biotin-gekoppelten

Antikörper markiert und mit magnetischen Anti-Biotin MicroBeads konjugiert. Diese Suspension mit den jetzt magnetisch markierten plasmazytoiden DZ wird auf eine magnetisch geladene Säule (*LS Columns*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) aufgetragen, in der nur die gelabelten Zellen haften bleiben. Die restlichen, unmarkierten Zellen passieren die Säule ohne Bindung an den Magneten. Nach Entfernung der Säule aus dem magnetischen Feld (*QuadroMACS Separator*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) werden die gelabelten Zellen aus der Säule gewaschen und weiterverarbeitet.

2.3.2. Reifung der isolierten plasmazytoiden DZ

Die mittels magnetischer Zellseparation gewonnenen, CD303⁺ plasmazytoiden DZ wurden im nächsten Schritt in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in DZ-Medium (CellGro, CellGenix, Freiburg) gegeben. Zur Ausreifung über 48 h im Inkubator (Temperatur 37 °C, CO₂ 5 %) verwendeten wir IL-3 (Endkonzentration: 10 ng/ml) und Imiquimod (Endkonzentration: 5 µg/ml).

2.3.3. Phänotypisierung der ausgereiften plasmazytoiden DZ

Nach der Ausreifung über 48 h wurden die DZ zunächst für 10 min auf Eis gestellt und anschließend vorsichtig mit der Pipette resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Oberflächenfärbung für die durchflusszytometrische Phänotypisierung. Folgende Gating-Strategie wurde angewandt: Nach Ausschluss der nicht-vitalen Zellen mittels 7-AAD wurde die Population im SSC gegen CD303 aufgetragen. Die sich hier abgrenzende Population 7-AAD⁻SSC⁻CD45⁺CD303⁺ definierten wir als plasmazytoide DZ.

Die weitere Phänotypisierung erfolgte im Histogramm-Plot anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CCR7, CD11c, CD80, CD83, CD86, CD274, HLA-DR und IP10.

2.4. Durchflusszytometrische Quantifizierung und Phänotypisierung von peripheren myeloiden Suppressorzellen

In der durchflusszytometrischen Messung des peripheren Blutes untersuchten wir vier in der Literatur beschriebene MDSC-Populationen^{36,47-50}. Das primäre

Gating wurde zur besseren Abgrenzung der PBMC im FSC (linear) gegen SSC (logarithmisch) gewählt ⁴⁹. Die vier nachfolgend beschriebenen MDSC-Populationen wurden ausschließlich im PBMC-Gate gesucht und als prozentualer Anteil dieser Fraktion quantifiziert.

Am Durchflusszytometer wurden jeweils 100.000 Events registriert.

Die erste Population wurde nach Gating auf die CD14⁺-Monozyten als deren Anteil der HLA-DR⁻-Zellen definiert (CD14⁺HLA-DR⁻). Erfasst wurde sowohl der prozentuale Anteil der HLA-DR⁻-Zellen als auch die HLA-DR-MFI ^{36,47}.

Weiterhin wurde die Frequenz von CD14⁻CD33⁺ Zellen inklusive deren Expression von HLA-DR quantifiziert; als MDSC wurden auch hier die Zellen ohne HLA-DR-Expression abgegrenzt (CD14⁻CD33⁺HLA-DR⁻) ⁴⁸.

Die dritte und vierte Population definierten wir als SSC⁺CD66b⁺CD125⁻ ⁴⁹ bzw. CD14⁻CD16⁺CD66b⁺ Zellen ⁵⁰ innerhalb der PBMC.

2.5. Biomarker

2.5.1. Bestimmung von Serumproteinen mittels Luminex-Technologie

Von allen Patienten wurde unmittelbar nach Blutentnahme eine Plasmaprobe aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Aus diesen Plasmaproben bestimmten wir mittels *Luminex xMAP* auf der *MagPix*- bzw. *Luminex 200*-Plattform (Luminex, Austin, USA) insgesamt 35 Serumproteine (vgl. Tabelle 3).

Luminex xMAP basiert auf der Detektion und Isolation der Analyte mittels spezifischen, magnetgekoppelten Antikörpern sowie in einem zweiten Schritt der Quantifizierung anhand Fluorochrom-gekoppelter Antikörper.

Kalibrierung und Färbe-Prozedere erfolgten individuell für jedes der vier verwendeten Kits (Invitrogen Human Cytokine Magnetic 30-Plex Panel, Milliplex MAP Human Apolipoprotein Magnetic Bead Panel, Milliplex MAP Human Circulating Cancer Biomarker Magnetic Bead Panel 1, Milliplex MAP TGFβ1 Single Plex Magnetic Bead Kit; vgl. Tabelle 4) nach den Anweisungen der Hersteller.

Die Messung erfolgte anhand einer für jeden Assay individuell verdünnten Standard-Reihe, bestehend aus sechs Verdünnungsschritten im Verhältnis 1:3 sowie einer Messung des Hintergrunds, hier ungefärbtes Plasma.

Ferner wurden für jeden Assay zwei vom Hersteller zur Verfügung gestellte Qualitätskontrollen analysiert, die die Validität der gemessenen Analyte bestätigten. Aufgrund dieser Qualitätskontrollen wurden im Nachhinein IL-17 und RANTES aus der Auswertung entfernt (IL-17 alle Messwerte unterhalb des Standards, RANTES alle Messwerte oberhalb des Standards).

Prinzipiell wurden zunächst die 96-Well-Platten mit Waschpuffer befeuchtet. Nach Entfernung des selbigen pipettierten wir erneut Waschpuffer für den Hintergrund, Kontroll-Lösungen, die Standard-Reihe sowie die - gegebenenfalls verdünnten - Patientenproben in die entsprechenden Wells. Nach Zugabe von Waschpuffer und der magnetischen Beads zu allen Wells wurden die Platten entsprechend der Anweisungen für die verschiedenen Kits bei 4 °C auf einem Plattformschüttler inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Platten insgesamt dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Alle Waschschrte erfolgten unter Verwendung einer magnetischen Platte, um die Analyte in der 96-Well-Platte zu fixieren.

Nun gaben wir die Detektions-Antikörper in jedes Well und inkubierten die Platten bei Raumtemperatur entsprechend der Hersteller-Anweisungen auf dem Plattformschüttler.

Unmittelbar im Anschluss wurde zu allen Wells Streptavidin-Phycoerythrin hinzugegeben und abermals bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Beads mit *Drive Fluid* für 5 min auf dem Plattformschüttler resuspendiert und anschließend auf der *MagPix*- bzw. *Luminex 200*-Plattform gemessen.

Die Plasmaspiegel von MACC1 wurden in einem zuvor beschriebenen und validierten exosomalen PCR-Assay im Labor von Professor Dr. Ulrike Stein am Max-Delbrück Center, Berlin, Deutschland, analysiert ⁵¹.

Tabelle 3: Untersuchte Biomarker (* exkludiert)

ApoA1	IL-1RA	IL-17*
EGF	IL-2	IP-10
Eotaxin	IL-2R	MCP-1
FAS	IL-4	MIG
FAS-L	IL-5	MIP-1 α
FGF-basic	IL-6	MIP-1 β
G-CSF	IL-7	Osteopontin
GM-CSF	IL-8	RANTES*
HGF	IL-10	TGF- β 1
IFN- α	IL-12	TNF- α
IFN- γ	IL-13	VEGF
IL-1 β	IL-15	

2.6. Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnr.
CD303 (BDCA-2) MicroBead	Miltenyi Biotec, Bergisch	130-090-509
Kit human	Gladbach, D	
Cell Viability Solution (7-AAD)	BD, Heidelberg, D	555815
CellGro GMP Serum-free	CellGenix, Freiburg, D	20801-0500
Dendritic Cell Medium		
FACS Lysing Solution 10X	BD, Heidelberg, D	349202
Concentrate		
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, D	17-1440-03
Invitrogen Human Cytokine	Thermo Fisher Scientific Inc.,	LHC6003M
Magnetic 30-Plex Panel	Waltham, USA	
LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch	130-042-401
	Gladbach, D	
Milliplex MAP Human	Merck KGaA, Darmstadt, D	APOMAG-62K
Apolipoprotein Magnetic Bead		
Panel		

Milliplex MAP Human Circulating Cancer Biomarker Magnetic Bead Panel 1	Merck KGaA, Darmstadt, D	HCCBP1MAG-58K
Milliplex MAP TGF- β 1 Single Plex Magnetic Bead Kit	Merck KGaA, Darmstadt, D	TGFBMAG-64K-01
QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	130-090-976
Treg Detection Kit (CD4/CD25/FoxP3)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	130-094-163

2.7. Gerätschaften

Tabelle 5: Verwendete Gerätschaften

Bezeichnung	Hersteller
Advia 2120i Hematology System	Siemens, Erlangen, D
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD, Heidelberg, D
Inkubator Heracell 150	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Luminex 200	Luminex, Austin, USA
Magpix	Luminex, Austin, USA
Plattformschüttler Titramax 100	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D

2.8. Antikörper

Tabelle 6: Verwendete Antikörper

Antigen	Hersteller	Fluorochrom	Klon	Artikelnr.
CCR7	R&D Systems, Minneapolis, USA	PE	Mouse IgG2a, 150503	FAB197P
CD11c	BD, Heidelberg, D	V450	Mouse IgG1,	560369

			B-ly6	
CD125	R&D Systems, Minneapolis, USA	APC	Mouse IgG1, 26815	FAB253A
CD127	BD, Heidelberg, D	PE-Cy7	Mouse IgG1, HIL-7R-M21	560822
CD13	BD, Heidelberg, D	PE	Mouse IgG1, L138	347406
CD14	BD, Heidelberg, D	V500	Mouse IgG2a, M5E2	561391
CD16	BD, Heidelberg, D	PE-Cy7	Mouse IgG1, 3G8	557744
CD19	BD, Heidelberg, D	PerCP	Mouse IgG1, 4G7	345778
CD1c	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	APC	Mouse IgG2a, AD5-8E7	130-090-903
CD25	BD, Heidelberg, D	FITC	Mouse IgG1, M-A251	555431
CD27	BD, Heidelberg, D	PE-Cy7	Mouse IgG1, M-T271	560609
CD274	BD, Heidelberg, D	FITC	Mouse IgG1, MIH1	558065
CD3	BD, Heidelberg, D	APC	Mouse IgG1, SK7	345767
CD3	BD, Heidelberg, D	V450	Mouse IgG1 UCHT1	560365
CD303	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	APC	Mouse IgG1, AC144	130-090-905
CD33	BD, Heidelberg, D	V450	Mouse IgG1, WM53	561157
CD4	BD, Heidelberg, D	PE	Mouse IgG1, RPA-T4	555347
CD4	BD, Heidelberg, D	PerCP	Mouse IgG1, SK3	345770
CD45	BD, Heidelberg, D	V500	Mouse IgG1, HI30	560777

CD45RA	BD, Heidelberg, D	APC	Mouse IgG2b, HI100	550855
CD45RO	BD, Heidelberg, D	FITC	Mouse IgG2a, UCHL1	555492
CD56	BD, Heidelberg, D	APC	Mouse IgG1, B159	555518
CD66b	BD, Heidelberg, D	FITC	Mouse IgM, G10F5	555724
CD8	BD, Heidelberg, D	APC-H7	Mouse IgG1, SK1	560179
CD80	BD, Heidelberg, D	APC-H7	Mouse IgG1, L307.4	561134
CD83	BD, Heidelberg, D	PE-Cy7	Mouse IgG1, HB15e	561132
CD86	BD, Heidelberg, D	V450	Mouse IgG1, 2331	560357
FoxP3	BD, Heidelberg, D	PE	Mouse IgG1, 259D/C7	560046
HLA-DR	BD, Heidelberg, D	APC-H7	Mouse IgG2a, G46-6	561358
HLA-DR	BD, Heidelberg, D	FITC	Mouse IgG2, L243	347400
HLA-DR	BD, Heidelberg, D	PerCP	Mouse IgG2, L243	347402
IP-10	BD, Heidelberg, D	PE	Mouse IgG2a, 6D4/D6/G2	555049
TZR $\alpha\beta$	BD, Heidelberg, D	PE	Mouse IgM, T10B9.1A-31	555548
TZR $\gamma\delta$	BD, Heidelberg, D	FITC	Mouse IgG1, B1	559878

2.9. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte durch Herrn Professor Dr. Dr. Götz Gelbrich sowie Frau Sabrina Engelhardt (Lehrstuhl für Klinische Epidemiologie und Biometrie, Universität Würzburg).

Die statistische Signifikanz wird in der vorliegenden Arbeit bei einem p-Wert $\leq 0,05$ angenommen. Alle Berechnungen wurden mit SPSS Version 23 (IBM, Deutschland) durchgeführt.

Bei fünf Parametern, bei denen das Logarithmieren nicht möglich war, wurde eine vorkommende „0“ durch „0,01“ ersetzt (Eosinophile [%], Eosinophile [μl], $\text{CD3}^+\text{TZRgd}^+$ [%], $\text{SSC}^+\text{CD66b}^+\text{CD125}^-$ [%], $\text{CD66b}^+\text{CD16}^+\text{CD14}^-$ [%]).

2.9.1. Normalverteilung der Stichprobe

Mittels des Shapiro-Wilk-Tests wurden die Daten zunächst auf Normalverteilung geprüft. Wenn die Daten nicht normalverteilt waren, erfolgte die Logarithmierung, um einer Normalverteilung näher zu kommen.

2.9.2. Vergleich der prä- und postoperativ erhobenen Parameter

Um die erhobenen Parameter prä- und postoperativ zu vergleichen, wurden die Parameter mit signifikantem Unterschied mittels T-Test identifiziert.

2.9.3. Vergleich zwischen WHO °III, WHO °IV und Kontrollgruppe

Zunächst wurde die Homogenität der Varianzen mittels Levene-Test berechnet. Bei nicht-signifikantem Levene-Test wurde anschließend mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) berechnet, ob zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede bestehen. Bei positivem Ergebnis wurde anschließend im Least significant difference-Test dargestellt, zwischen welchen Gruppen ein signifikanter Unterschied besteht.

Im Falle eines signifikanten Levene-Tests wurde anstelle der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mittels Welch-Test ausgewertet, ob zwischen den

Gruppen ein signifikanter Unterschied besteht. Bei signifikantem Welch-Test erfolgte die Detektion der Unterschiede dann mittels Dunnett's-T3-Test.

2.9.4. Zusammenhänge zwischen einzelnen Biomarkern

Zusammenhänge zwischen den gemessenen Biomarkern wurden mit Spearmans Rangkorrelationskoeffizient beschrieben.

2.9.5. Zusammenhang der Daten mit progressionsfreiem und Gesamtüberleben

Zusammenhänge zwischen den erhobenen Parametern und dem progressionsfreien sowie dem Gesamtüberleben der Patienten werden anhand der präoperativ erhobenen Werte mittels Cox-Regressionsanalyse und Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Patientencharakteristika

Die insgesamt 61 präoperativ in die Studie eingeschlossenen Patienten waren im Median 60,2 Jahre alt (Range: 7,4 - 83,8 Jahre).

Eine postoperative Blutentnahme zwischen dem fünften und siebten Tag konnte bei 36 dieser Patienten durchgeführt werden.

Zum Ende der Datenerhebung waren noch 15 Patienten (25 %) am Leben, alle Patienten wurden im Median 13,7 Monate (8,2 - 36,5 Monate) nachbeobachtet. Das progressionsfreie Überleben betrug im Mittel 7,8 Monate, das Gesamtüberleben 8,2 Monate.

Tabelle 7: Gesamtkohorte

Insgesamt [n =]	61
Alter [Median (Range)]	60,2 Jahre (7,4 - 83,8)
Follow-Up [Median (Range)]	13,7 Monate (8,2 - 36,5)
PFS [Mittelwert]	7,8 Monate
OS [Mittelwert]	8,2 Monate
Lebend [n =]	15 (25 %)

Eine detaillierte Charakterisierung der Patienten gibt die nachfolgende Tabelle wieder:

Tabelle 8: Charakterisierung der Unterpopulationen

		PFS [Monate]	OS [Monate]	Lebend [n =]
Alter				
< 18 Jahre	n = 5 (8 %)	7,9	9,2	3 (60 %)
> 18 Jahre	n = 56 (92 %)	7,1	8,2	12 (21 %)
WHO-Grad				
°III	n = 8 (13 %)	7,1	12,1	3 (38 %)
°IV	n = 53 (87 %)	7,8	7,8	12 (23 %)
Erstdiagnose / Rezidiv				
Erstdiagnose	n = 46 (75 %)	7,8	8,2	11 (24 %)
Rezidiv	n = 15 (25 %)	7,4	8,4	5 (33 %)
Resektionsstatus				
Komplett	n = 23 (38 %)	7,8	8,6	6 (26 %)
Subtotal	n = 19 (31 %)	17	4,6	7 (37 %)
Biopsie	n = 19 (31 %)	7,1	6,9	2 (11 %)
Geschlecht				
Weiblich	n = 21 (34 %)	7,8	8,4	6 (29 %)
Männlich	n = 40 (66 %)	7,8	8,2	9 (23 %)

3.2. Dendritische Zellen

3.2.1. Periphere myeloide und plasmazytoide DZ-Subpopulationen

Unsere Untersuchungen der im peripheren Blut zirkulierenden DZ ergaben bezüglich der Frequenzen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduzierte Zellzahlen, sowohl bei den plasmazytoiden DZ ($p < 0,0001$; Abbildung 1, linke Grafik), als auch bei den myeloiden DZ ($p < 0,0023$; Abbildung 1, rechte Grafik).

Durch die chirurgische Tumorentfernung ändert sich die Frequenz sowohl der plasmazytoiden ($p = 0,38$) als auch der myeloiden DZ ($p = 0,28$) nicht signifikant (Abbildung 1), *post interventionem* ist im Vergleich zur Kontrollgruppe nur noch bei den plasmazytoiden DZ ein signifikanter Unterschied festzustellen ($p < 0,001$).

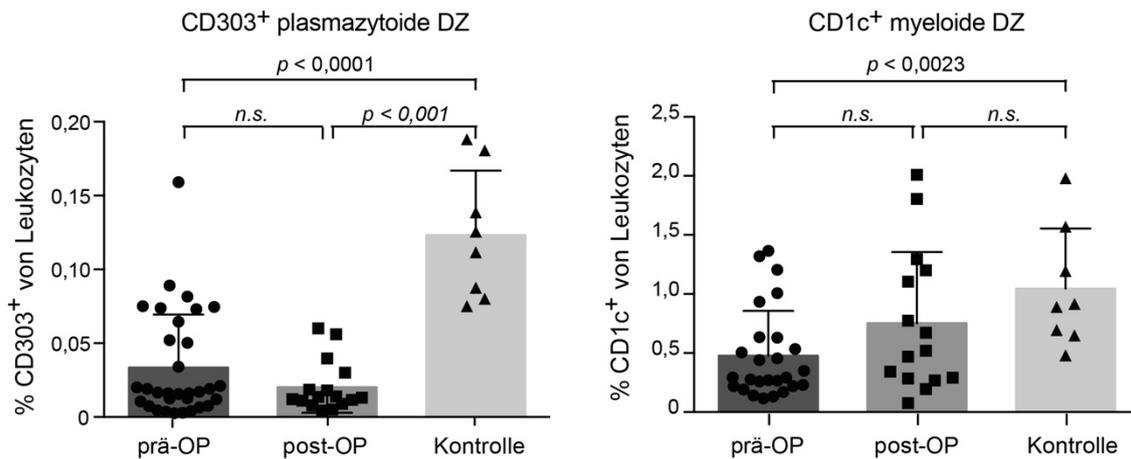


Abbildung 1: Durchflusszytometrisch quantifizierte plasmazytoide (linke Grafik) und myeloide DZ (rechte Grafik) im peripheren Blut von Gliom-Patienten im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe prä- und postoperativ.

Beide Populationen wurden anschließend qualitativ auf die Expression der Oberflächenmoleküle CCR7, CD11c, CD80, CD83, CD86, CD274 sowie CXCL10 untersucht (Abbildung 2).

Die plasmazytoiden DZ exprimieren tendenziell mehr kostimulatorische Oberflächenmarker bzw. Aktivierungsmarker als die Kontrollgruppe. Dies war für CD80 (prä- und postoperativ), IP-10 (präoperativ) sowie CD83 und PD-L1 (postoperativ) statistisch signifikant.

Bei den myeloiden DZ sind weder prä- noch postoperativ signifikante Unterschiede bezogen auf die Kontrollgruppe zu konstatieren. Die hier gewonnenen Erkenntnisse bilden die Grundlage für die Auswertung der kultivierten plasmazytoiden DZ.

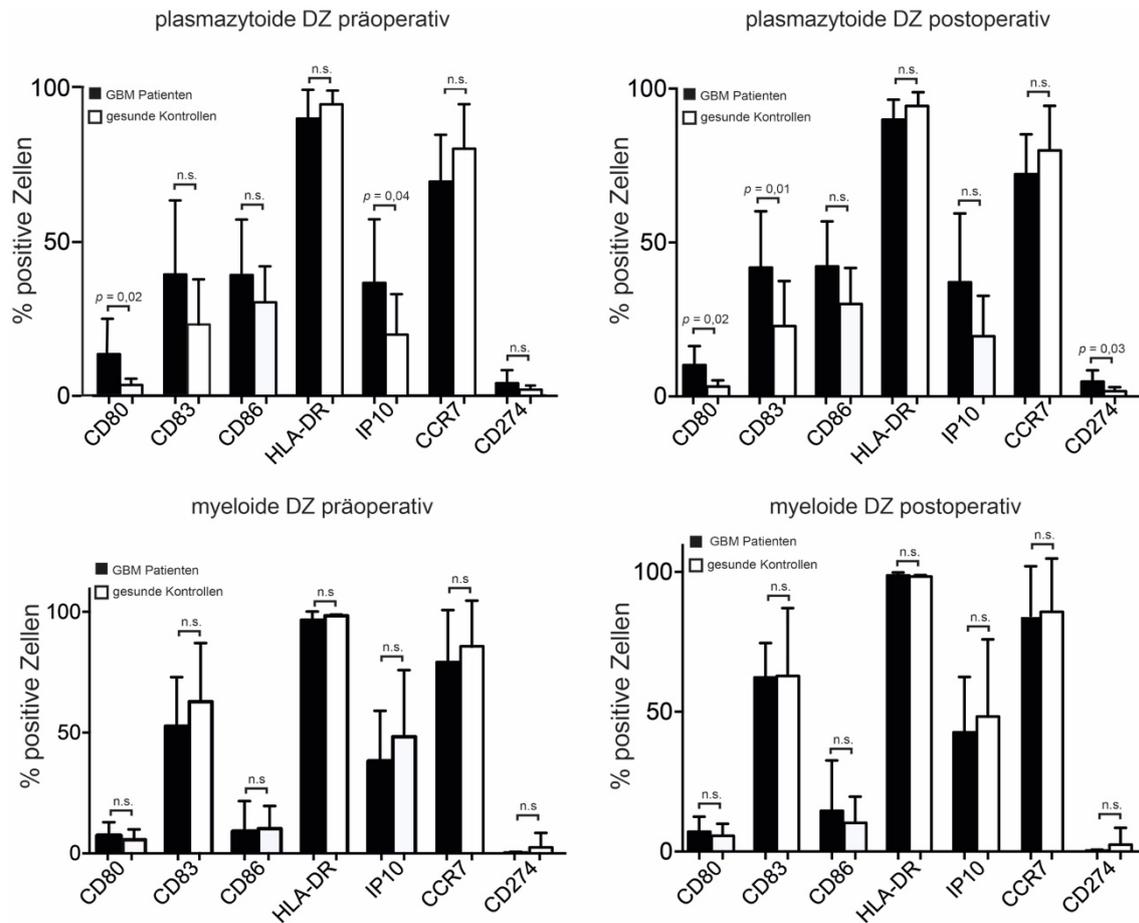


Abbildung 2: Phänotyp zirkulierender DZ prä- und postoperativ; die Auswertung erfolgte nach Selektion der CD45⁺SSC⁻-Zellen und Gating auf CD1c⁺ bzw. CD303⁺ im Histogramm-Plot.

3.2.2. Kultivierung und Ausreifung plasmazytoider DZ

Aufgrund der sowohl präoperativ als auch postoperativ signifikant reduzierten Frequenzen von plasmazytoiden DZ stellt sich die Frage, ob diese DZ auch funktionell kompromittiert sind. Nach magnetischer Zellseparierung und 48-stündiger Ausreifung mit IL-3 und Imiquimod wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenmoleküle CCR7, CD11c, CD80, CD83, CD86, CD274 sowie CXCL10 untersucht (Abbildung 3).

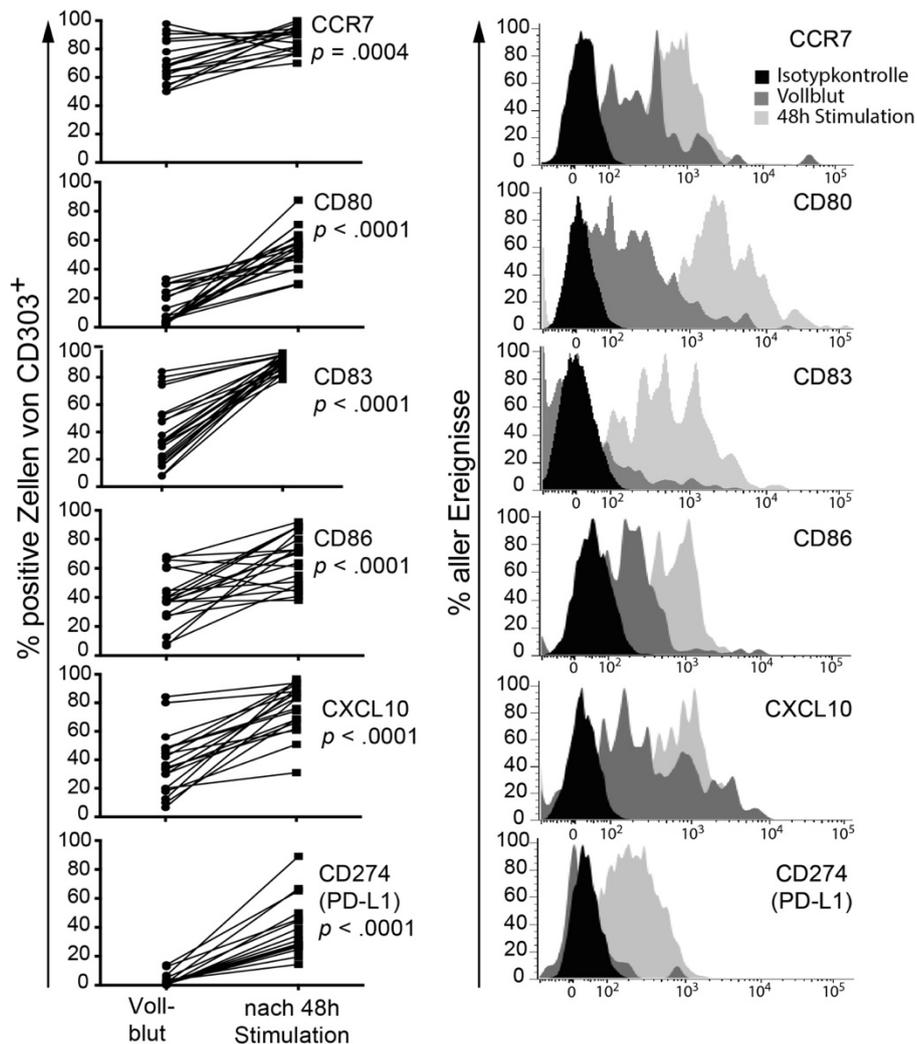


Abbildung 3: Kostimulatorischen Oberflächenmoleküle und Aktivierungsmarker auf plasmazytoiden DZ nach 48 h Stimulation mit Interleukin-3 (10 ng/ml) und Imiquimod (5 µg/ml) unter DZ-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂.

Sowohl die kostimulatorischen Moleküle (CD80, CD86) als auch die Aktivierungsmarker (CD83, PD-L1) und die Chemokin-Rezeptoren (CCR7, CXCL10) sind nach der 48-stündigen Ausreifung hochsignifikant stimulierbar ($p < 0,0001$).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die antigenpräsentierenden Zellen in Glioblastom-Patienten quantitativ reduziert sind, was bei den plasmazytoiden DZ deutlich ausgeprägter ist als bei den myeloiden DZ.

Die vorhandenen plasmazytoiden DZ scheinen funktionell jedoch intakt zu sein, da sie nativ *in vivo* bereits höhere Level von CD80, CD83, IP-10 und PD-L1 exprimieren und *in vitro* aktivierbar sind.

Aufgrund der sehr geringen Zellzahlen konnten keine weitergehenden, funktionellen Untersuchungen durchgeführt werden.

3.3. Leukozyten-Populationen

3.3.1. Neutrophile und Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio

Im Vergleich mit der Kontrollgruppe sind beim WHO °IV-Patienten die absoluten Zellzahlen der Leukozyten (11.379 ± 4592 / μ l vs. 6.119 ± 1.724 / μ l, $p = 0,005$), insbesondere die der Neutrophilen (8.836 ± 3.923 / μ l vs. 3.626 ± 1.283 / μ l, $p = 0,01$) signifikant erhöht (Abbildung 4).

Die Neutrophilie ist bei WHO °IV-Patienten mit im Mittel $+2.840$ / μ l ($p = 0,001$) im Vergleich mit WHO °III stärker ausgeprägt.

Die Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio ist bei WHO °IV-Patienten mit 6,9 im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 2,0 (3,5-fach, 95 %-KI 2,0 - 6,0, $p < 0,001$) signifikant erhöht.

Berücksichtigt werden muss hier der potentielle Effekt des perioperativ applizierten Dexamethasons, welches bei WHO °IV-Histologie bei 48 % der Patienten und bei WHO °III-Histologie bei 17 % der Patienten verabreicht wurde. Die univariate Varianzanalyse zeigt für die Leukozyten und Neutrophilen, dass der Effekt primär auf das Dexamethason und weniger auf die Histologie zurückzuführen ist:

Der Effektschätzer für die Leukozyten liegt bei $+4.189$ / μ l für Dexamethason (95 %-KI 1.383 - 6.995, $p = 0,004$) und bei $+3.094$ / μ l für WHO °IV (95 %-KI -360 - 6.548, $p = 0,078$); bei den Neutrophilen bei $+4.191$ / μ l für Dexamethason (95 %-KI 1.660 - 6.724, $p = 0,002$) und $+3.349$ / μ l für WHO °IV (95 %-KI 232 - 6.467, $p = 0,036$).

Dies zeigt, dass der Dexamethasongebrauch einen stärkeren Einfluss auf die beiden genannten Parameter ausübt als die Histologie.

3.3.2. Lymphozyten

Im Vergleich zur Kontrollgruppe sind bei Patienten mit WHO °IV-Histologie die relative Lymphozyten- ($p < 0,001$), monozytäre DZ- ($p = 0,002$) und plasmazytoide DZ-Frequenz ($p < 0,001$) signifikant reduziert.

Selbiges gilt für die absoluten Zellzahlen von T-Zellen ($CD3^+$, $p = 0,003$) und zytotoxischen T-Zellen ($CD3^+CD8^+$, $p = 0,004$).

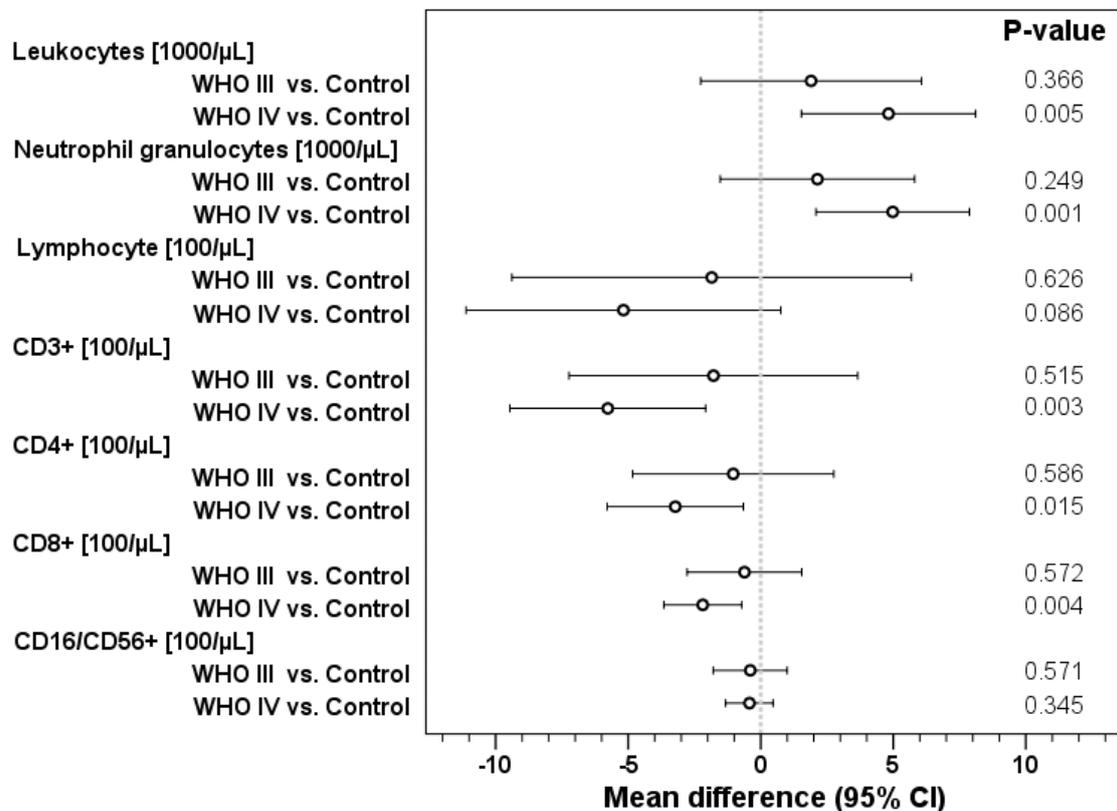


Abbildung 4: Präoperativer Vergleich der durchflusszytometrisch erhobenen, absoluten Leukozyten-Zahlen bei WHO °III- und °IV-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Tabelle 9: Lymphozytenparameter

Parameter	WHO °III	WHO °IV	Kontrolle
Lymphozyten-Frequenz [μl]	1.480 \pm 193	1.158 \pm 668	1.798 \pm 480
T-Zellen CD3 ⁺ [μl]	1.070 \pm 148	681 \pm 351	1.341 \pm 475
T-Zellen CD3 ⁺ CD4 ⁺ [μl]	634 \pm 144	415 \pm 204	792 \pm 302
T-Zellen CD3 ⁺ CD8 ⁺ [μl]	374 \pm 141	232 \pm 178	474 \pm 218
NK-Zellen CD16 ⁺ CD56 ⁺ [μl]	150 \pm 99	160 \pm 105	183 \pm 76

Tabelle 10: Univariate Varianzanalyse der Lymphozytenparameter

Parameter	Effekt Dexamethason	Effekt WHO °IV
Lymphozyten [μl]	-171,0 95 %-KI -611 bis 269 p = 0,436	-549 95 %-KI -1090 bis -8 p = 0,047
DZ CD1c ⁺ [%]	0,227 95 %-KI -0,1 bis 0,5 p = 0,153	-0,75 95 %-KI -1,1 bis -0,4 p < 0,001
DZ CD303 ⁺ [%]	-0,018 95 %-KI -0,05 bis -0,01 p = 0,188	-0,085 95 %-KI -0,1 bis -0,05 p < 0,001
T-Zellen CD3 ⁺ [μl]	-55 95 %-KI -338 bis 228 p = 0,695	-623 95 %-KI -962 bis -284 p < 0,001
T-Zellen CD3 ⁺ CD4 ⁺ [μl]	-22 95 %-KI -193 bis 150 p = 0,8	-361 95 %-KI -566 bis -155 p = 0,001
T-Zellen CD3 ⁺ CD8 ⁺ [μl]	-26 95 %-KI -168 bis 116 p = 0,716	-227 95 %-KI -397 bis -56 p = 0,011

Die univariate Varianzanalyse zeigt, dass die Parameter der Lymphozytensubgruppen bei Therapie mit Dexamethason nicht signifikant verändert sind, die WHO IV°-Histologie jedoch einen signifikanten Einfluss auf die Frequenz der Lymphozytensubgruppen hat.

3.3.3. Myeloide Suppressorzellen

Von der vier untersuchten MDSC-Phänotypen

CD14⁺HLA-DR⁻

CD14⁻CD33⁺HLA-DR⁻

SSC⁺CD66b⁺CD125⁻

CD14⁻CD16⁺CD66b⁺

kann für die HLA-DR⁻-Monozyten (CD14⁺HLA-DR⁻) bei WHO °IV eine signifikant erhöhte Frequenz im Vergleich mit der Kontrollgruppe festgestellt werden (34,7 ± 24,9 % vs. 6,0 ± 2,8 %, p = 0,003; Abbildung 5 und 6 A).

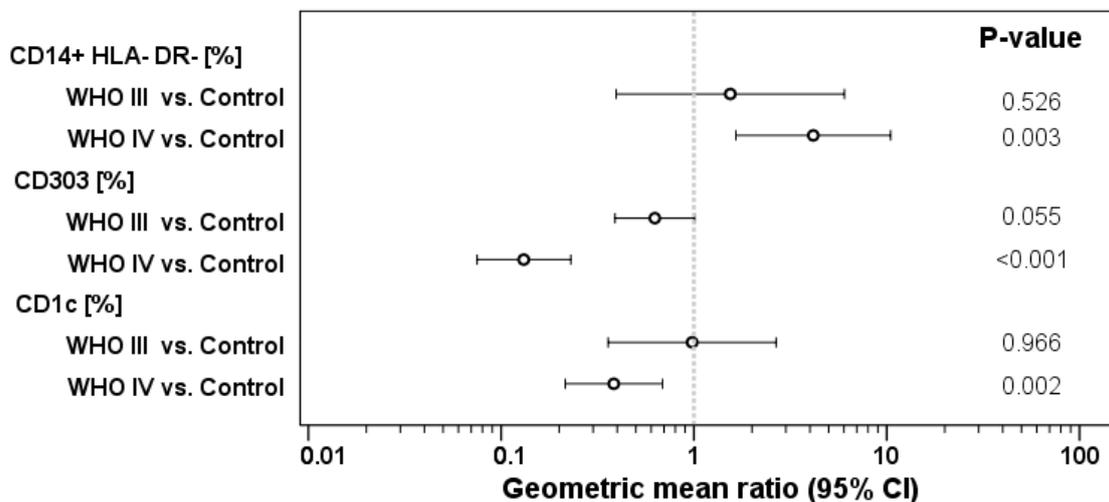
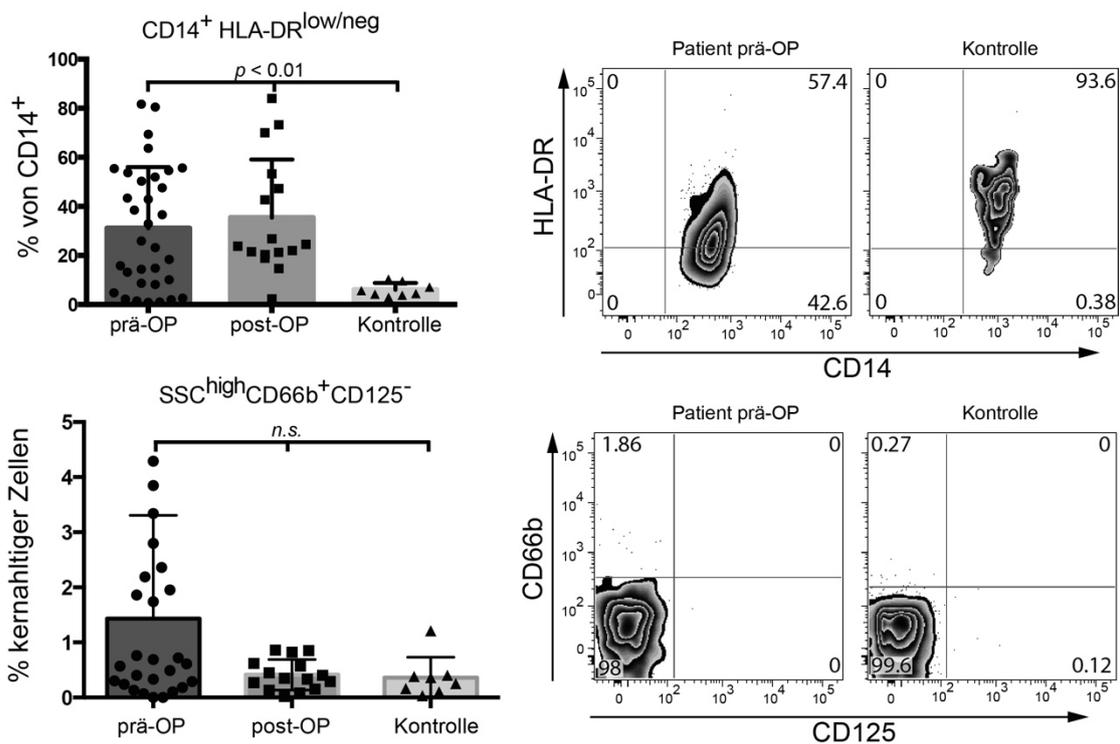


Abbildung 5: Präoperativer Vergleich der durchflusszytometrisch gemessenen Frequenzen von HLA-DR⁻-Monozyten sowie myeloiden und plasmazytoiden DZ bei WHO °III- und °IV-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die reduzierte HLA-DR-Expression wird außerdem durch einen erniedrigten MFI für HLA-DR auf Monozyten verifiziert (321 ± 258 vs. 649 ± 314 , $p < 0,01$; Abbildung 6 B). Die chirurgische Tumorentfernung hingegen hat keinen signifikanten Effekt auf die Frequenz von HLA-DR-Monozyten ($34,7 \pm 24,9$ % präoperativ vs. $37,4 \pm 24,8$ % postoperativ, Abbildung 6 A) respektive den HLA-DR-MFI (321 ± 258 vs. 354 ± 225 , Abbildung 6 B).

A



B

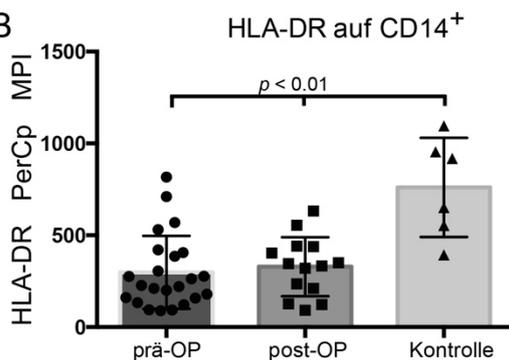


Abbildung 6: Patienten mit WHO °IV zeigen erhöhte Frequenzen von HLA-DR-Monozyten (A), was sich nach durchflusszytometrischem Gating auf die Monozyten-Population auch im MFI bestätigt (B). Andere MDSC-Populationen (z.B. SSC⁺CD66b⁺CD125⁻) konnten in der vorliegenden Arbeit nicht detektiert werden (A).

Dexamethason als regelhaft in der Therapie des Hirnödems applizierte Substanz beeinflusst potentiell die MDSC³⁶. Um diesen Effekt zu überprüfen, wurden die Proben entsprechend der Verwendung von Dexamethason gruppiert. 45 % der präoperativ untersuchten Patienten erhielten Dexamethason, postoperativ lag der Anteil bei 88 %.

Patienten unter Dexamethason-Therapie haben signifikant erhöhte Leukozyten-Frequenzen (8.900 ± 4.640 vs. 13.303 ± 3.663 / μ l, $p = 0,005$).

Weder die Frequenz der CD14⁺HLA-DR⁻MDSC (29 ± 26 vs. 34 ± 24 %) noch der MFI für HLA-DR auf Monozyten (395 ± 376 vs. 301 ± 197) zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen, was gegen einen wesentlichen Einfluss des Dexamethasons auf die HLA-DR-Expression spricht. Dieser Trend ist auch bei den postoperativ gewonnenen Proben festzustellen, die geringe Anzahl an Proben ohne Dexamethason-Therapie in dieser Gruppe erlaubt allerdings keine statistisch valide Aussage.

Bezüglich der anderen drei Phänotypen (CD14⁻CD33⁺HLA-DR⁻, SSC⁺CD66b⁺CD125⁻, CD14⁻CD16⁺CD66b⁺) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Gliompatienten prä- und postoperativ und der Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 6 A).

3.4. Biomarker

3.4.1. Einfluss des WHO-Grades auf Biomarker

Fünf der untersuchten Biomarker waren zwischen Gliompatienten und Kontrollgruppe verschieden, wobei ein signifikanter Einfluss des WHO-Grades nachgewiesen werden konnte:

IL-2 als Aktivator der T-Helferzellen ist bei WHO °III (11,26-fach) und bei WHO °IV (4,2-fach) signifikant erhöht.

Das antiinflammatorische Zytokin IL-4 ist signifikant erhöht (°III 3,82-fach, °IV 1,79-fach), IL-10 ist nur bei WHO °III erhöht und verfehlte bei WHO °IV das Signifikanzniveau (°III 9,26-fach, °IV n.s.).

Ebenso ist IL-5α lediglich bei WHO °III 8,36-fach erhöht, bei WHO °IV ist kein signifikanter Unterschied festzustellen.

MACC1 ist sowohl bei WHO °III (10,79-fach) als auch bei WHO °IV (31,95-fach) hochsignifikant erhöht.

Die Konfidenzintervalle und Signifikanzen der oben genannten Biomarker gibt Abbildung 7 wieder.

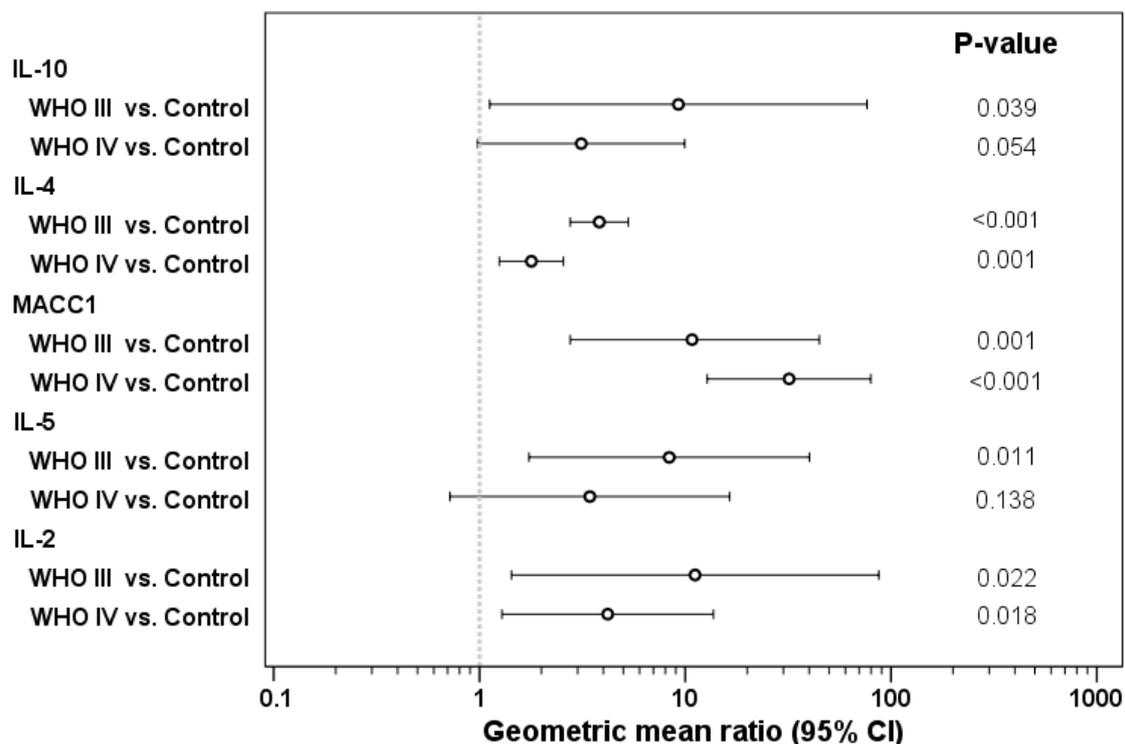


Abbildung 7: Präoperativer Vergleich der mittels Luminex-Technologie bestimmten Serumkonzentrationen von IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 sowie MACC1 bei WHO °III- und °IV-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Für folgende Biomarker konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Gliompatienten und Kontrollgruppe nachgewiesen werden: ApoA1, EGF, Eotaxin, FAS, FAS-L, FGF-basic, G-CSF, GM-CSF, HGF, IFN-α, IFN-γ, IL-1β, IL-1RA, IL-2R, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1α, MIP-1β, Osteopontin, TGF-β1, TNF-α und VEGF.

3.4.2. Einfluss der Tumorentfernung auf Blutbild und Biomarker

Die Hämoglobin-Konzentration im Serum fällt postoperativ vereinbar mit der chirurgischen Intervention um 2,2 g/dl (1,2-fach, 95 %-KI 1,1 - 1,3 p = 0,001) ab. Die weiteren absoluten Zellwerte (vgl. Material und Methoden, Tabelle 1 und 2) ändern sich *post interventionem* nicht signifikant.

Bezüglich der Zytokine ist ein diskreter Abfall der IL-12- (1,1-fach, 95 %-KI 1,0 - 1,2, p = 0,024) und der MIP-1 β -Konzentration im Serum (1,34-fach, 95 %-KI 1,0 - 1,7, p = 0,028) festzustellen. Die Osteopontin-Konzentration steigt 1,46-fach an (95 %-KI 1,1 - 2,0, p = 0,024).

3.5. Einfluss der erhobenen Parameter auf das progressionsfreie und das Gesamtüberleben

3.5.1. Einfluss von IL-12 und IP-10 auf das progressionsfreie Überleben

Eine Verdopplung der IL-12-Konzentration im Serum ist mit einem 2,56-fach erhöhten Risiko für Tumorprogress assoziiert ($p = 0,004$), ebenso eine Verdopplung der IP-10-Konzentration, welche mit einem 1,67-fach erhöhten Risiko einhergeht ($p = 0,008$).

3.5.2. Einfluss von EGF auf das Gesamtüberleben

Einziger Serummarker mit Einfluss auf das Gesamtüberleben war in der vorliegenden Arbeit EGF. Eine Verdopplung des EGF-Serumspiegels ist mit einem 1,3-fach erhöhten Risiko zu versterben assoziiert (95 %-KI 1,0 - 1,6, $p = 0,021$; Abbildung 8).

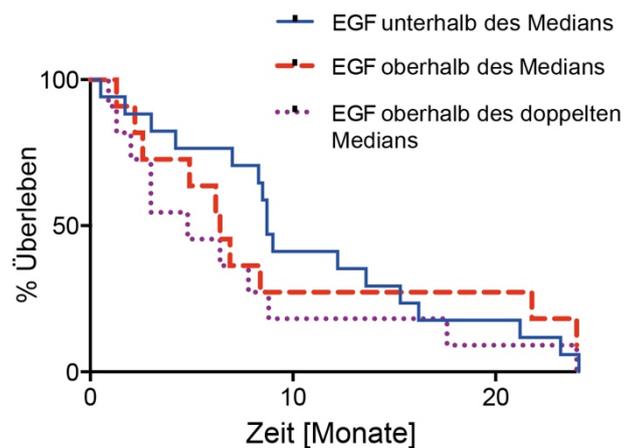


Abbildung 8: Einfluss der EGF-Konzentration im Serum auf das Gesamtüberleben.

3.5.3. Einfluss von CD14⁺HLA-DR⁻-Monozyten auf das progressionsfreie und das Gesamtüberleben

Bei den untersuchten Leukozyten-Subgruppen konnte für die CD14⁺HLA-DR⁻-Monozyten ein 3,6-fach schnellerer Tumorprogress (95 %-KI 1,4 - 6,8, p = 0,006) beim Patienten mit Frequenzen oberhalb des Medians gezeigt werden (Abbildung 9). Patienten mit CD14⁺HLA-DR⁻-Monozyten oberhalb des Gruppenmedians verstarben 2,2-fach schneller (95 %-KI 1,1 - 4,4, p = 0,021) als Patienten mit weniger Monozyten (Abbildung 10).

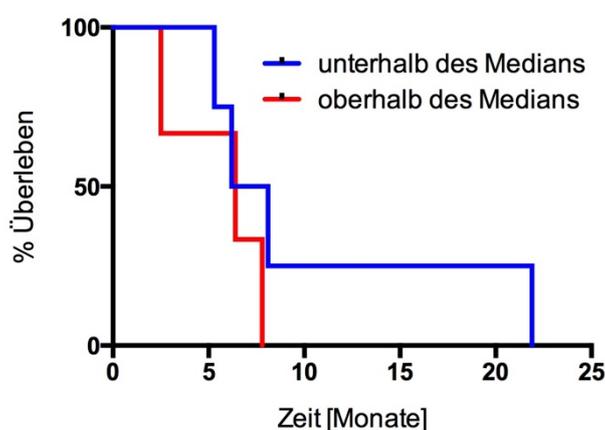


Abbildung 9: Einfluss der CD14⁺HLA-DR⁻-Frequenz im peripheren Blut auf das progressionsfreie Überleben.

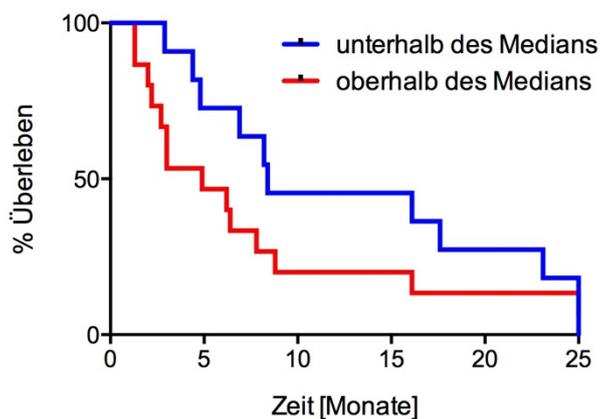


Abbildung 10: Einfluss der CD14⁺HLA-DR⁻-Frequenz im peripheren Blut auf das Gesamtüberleben.

4. Diskussion

Die untersuchte Kohorte entspricht bezüglich des Altersdurchschnitts und der Geschlechterverteilung den in der Literatur vorbeschriebenen Charakteristika maligner Gliome². Das Überleben nach Diagnosestellung unserer Kohorte zum Zeitpunkt der Datenerhebung war mit 8,2 Monaten schlechter als die publizierten 14,6 Monaten für eine Radiochemotherapie⁵. Ursächlich hierfür ist möglicherweise eine hohe Rate an subtotalen Resektionen (31 %) oder sogar nur Biopsien ohne Tumordebulking (31 %), welche jeweils im Vergleich zur vollständigen Resektion mit einem schlechteren Outcome vergesellschaftet sind^{52,53}. Die Follow-Up-Daten der 15 bei Statistikerstellung noch lebenden Patienten korrigieren das Gesamtüberleben möglicherweise ebenfalls noch nach oben.

Ferner muss der Anteil junger Patienten mit < 18 Jahren von 8 % in unserer Kohorte beachtet werden. Diese Kohorte zeigt häufig molekularbiologische Mutationen, die von denen erwachsener Patienten abweichen und in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht erfasst wurden⁵⁴. Weiterhin wurden sowohl Patienten mit Erstdiagnose (75 %) als auch mit Rezidiven eines hochgradigen Glioms (25 %) in die Studie eingeschlossen. Das potentiell aggressivere Verhalten des Tumors in der Rezidivsituation muss als Bias in Betracht gezogen werden.

Verschiedene Mechanismen der lokalen und systemischen Immunsuppression durch hochgradige Gliome sind beschrieben^{15,16,55-57}. In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 30 hämatologische und 36 Plasma-Marker präoperativ, postoperativ sowie im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Die absolute Anzahl an Leukozyten ist bei Patienten mit WHO °IV-Tumoren sowohl im Vergleich mit °III-Tumoren als mit der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht, dasselbe gilt für die Neutrophilen. Eine Erhöhung der Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio auf ≥ 4 ist mit einer höheren Neutrophilen-Infiltration bzw. reduzierter T-Zell-Infiltration in das Tumorgewebe

vergesellschaftet und unabhängiger Risikofaktor für ein reduziertes Gesamtüberleben^{58,59}.

Gustafson et al. beschreiben unter anderem eine Neutrophilie sowie eine Aggravierung der Lymphopenie bei Glioblastom-Patienten unter Dexamethason-Therapie³⁶. In der vorliegenden Arbeit konnten wir in der univariaten Varianzanalyse zeigen, dass die Applikation von Dexamethason auf die Leukozyten- bzw. Neutrophilen-Frequenz einen größeren Einfluss hat als der WHO-Grad. 48 % der Patienten mit WHO °IV erhielten Dexamethason, während es in der Gruppe mit °III nur 17 % waren.

Das invasivere Wachstum von °IV-Tumoren geht mit einer gesteigerten Hirnödemeinigung einher, die klinisch insbesondere perioperativ und zum Zeitpunkt der Strahlentherapie häufig einer medikamentösen Intervention bedarf und mit einer potentiellen, iatrogenen Immunsuppression erkaufte werden muss⁶⁰. Die persistierende Abhängigkeit von Steroiden ist als unabhängiger Risikofaktor für ein kürzeres Gesamtüberleben beim Glioblastom bekannt⁶¹.

Die detaillierte Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen zeigt, dass beim WHO °IV im Vergleich zur Kontrolle die relative Lymphozyten- und DZ-Frequenz (CD1c⁺ und CD303⁺) ebenso wie die Absolutwerte von T-Zellen (CD3⁺), zytotoxischen T-Zellen (CD3⁺CD8⁺) und Helfer-T-Zellen (CD3⁺CD4⁺) signifikant reduziert ist.

Die relativen Anteile von Lymphozyten, DZ (CD1c⁺ und CD303⁺) sowie die absolute Anzahl an NK-Zellen (CD56⁺) ist bei WHO °IV im Vergleich zu °III signifikant erniedrigt.

Brooks et al. beobachteten eine Lymphopenie bei Patienten mit primären Hirntumoren bereits 1977⁶². In der vorliegenden Arbeit konnten wir in der univariaten Varianzanalyse zeigen, dass dieser Effekt mit dem histologischen Grad korreliert und - im Gegensatz zu den Leukozyten und Neutrophilen - nicht signifikant vom applizierten Dexamethason abhängt.

Dieses Zellmuster unterstreicht die systemische Immunsuppression beim Gliom-Patienten, die Lymphopenie geht unmittelbar mit einem schlechteren Überleben einher⁶³. Verschiedene Mechanismen systemischer Immunsuppression sind

beschrieben, unter anderem eine qualitative und quantitative T-Zell-Immunsuppression¹⁵, die anhand der CD4⁺-Frequenzen unmittelbar prognoserelevant ist: Eine präoperative CD4⁺-Lymphopenie geht mit einem schlechteren Überleben einher^{53,55}. Umgekehrt gilt für CD8⁺-Lymphozyten, dass eine höhere Frequenz im Blut mit einem besseren Überleben vergesellschaftet ist⁶⁴.

Selbiges gilt für die natürlichen Killerzellen, die bei Verlust der MHC-I-Expression auf Tumorzellen ihr zytotoxisches Potential entfalten können¹⁶. Ein erhöhter Anteil aktivierter, CD16⁺-NK-Zellen korreliert mit einem Überlebensvorteil⁶⁴.

In der vorliegenden Arbeit kann unseres Wissens nach erstmals gezeigt werden, dass im peripheren Blut von Patienten mit hochgradigem Gliom sowohl die myeloiden als auch die plasmazytoiden DZ präoperativ in signifikant reduzierten Frequenzen zirkulieren. Dieser Effekt ist *post interventionem* nur noch bei den plasmazytoiden DZ zu beobachten, die Frequenzen sinken tendenziell sogar noch weiter ab.

Weitergehende Untersuchungen der plasmazytoiden DZ zeigen, dass diese präoperativ mehr kostimulatorische Moleküle und Aktivierungsmarker auf ihrer Oberfläche exprimieren als die entsprechenden Zellen der Kontrollgruppe. Nach *in vitro* Aktivierung zeigen sie trotz persistierend reduzierter Frequenzen eine adäquate Heraufregulierung von Aktivierungsmarkern, was in Zusammenschau mit dem präoperativ bereits aktivierten Phänotyp für eine funktionelle Intaktheit spricht.

In Anbetracht des hohen Anteils von Patienten, die Dexamethason erhielten, war zu klären, ob dieser Effekt iatrogen induziert ist, da Glucocorticoide auf verschiedenen Wegen in die Immunantwort eingreifen^{36,65}. Auch hier sind die Ergebnisse der univariaten Varianzanalyse so zu werten, dass die reduzierte Frequenz der natürlich vorkommenden DZ weniger auf das applizierte Dexamethason zurückzuführen ist, sondern eher vom WHO-Grad des Tumors abhängt.

DZ nehmen als professionelle Antigen-präsentierende Zellen mit Einfluss auf alle relevanten Lymphozyten-Subpopulationen eine Schlüsselrolle in der erworbenen Immunantwort ein ^{18,20,25,66}. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass DZ auch für eine antineoplastische Immunreaktion eine entscheidende Funktion haben. Bezüglich dieser Fragestellung konnten bereits verschiedene Interaktionen nachgewiesen werden.

DZ sind unter Einfluss von Typ-1-Interferonen maßgeblich am T-Zell-Priming gegen Antigene maligner Neoplasien beteiligt ^{67,68}. Bei Patientinnen mit Mamma-Karzinom sind reduzierte DZ-Frequenzen bei *in vitro* erhaltener Aktivierbarkeit bekannt ⁶⁹, in Patientenkollektiven mit hepatozellulärem Karzinom wurden ebenfalls erniedrigte DZ-Frequenzen beobachtet, hier konnte eine Korrelation mit einem erhöhten Risiko für Tumorprogress gezeigt werden ⁷⁰. Auch beim kolorektalen Karzinom ist die Kompromittierung der DZ auf allen Ebenen der Immunantwort, von der Antigen-Präsentation bis zur Effektor-Zell-Aktivierung, beschrieben ⁷¹.

Charles et al. führten beim malignen Melanom ähnliche Untersuchungen wie in der vorliegenden Arbeit durch, konnten allerdings weder Differenzen in den DZ-Frequenzen noch im Phänotyp feststellen ⁷². Möglicherweise kann dies als Korrelat für die makroskopisch größere Tumorlast eines hochgradigen Glioms im Vergleich mit einem malignen Melanom gewertet werden.

Im Kontext maligner Gliome ist eine qualitative, wie bereits erwähnt jedoch keine quantitative Kompromittierung der Monozyten und DZ bekannt ^{21,56,73}. *Rochet et al.* konnten bei Patienten mit malignem Melanom einen Überlebensvorteil zeigen, wenn die absolute Anzahl der Monozyten reduziert war ⁶³ - in der vorliegenden Arbeit konnte hier kein Unterschied festgestellt werden.

Eine bekannte Kompromittierung von DZ stellt ein Sekretionsbias in Richtung eines Th2-Zytokinprofils dar ^{15,74,75} und die damit verbundene Unfähigkeit, zytotoxische T-Zellen zu aktivieren. Aufgrund des geringen zur Verfügung stehenden Materials konnten in der vorliegenden Arbeit leider keine weiteren funktionellen Untersuchungen durchgeführt werden, um die Sekretionsfähigkeit der DZ zu überprüfen.

Ein weiterer Weg, die DZ-Funktion negativ zu beeinflussen, sind die von Tumorzellen sezernierten Faktoren. In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl bei Patienten mit WHO °III- als auch °IV-Gliomen erhöhte Serumkonzentrationen von IL-2, IL-4, IL-5 und IL-10 gezeigt werden, was einem Th2-Profil entspricht. Dies ist so bereits in verschiedenen Vorarbeiten beschrieben worden ^{64,76-79}. IL-10 führt bekanntermaßen auch bei Nicht-Gliom-Patienten zu einer qualitativen und quantitativen Kompromittierung von DZ ⁷⁰.

Ferner sind erhöhte Serumkonzentrationen von IL-1 β , IL-6, GM-CSF, TNF- α sowie VEGF bekannt ⁷⁷. Interessanterweise sind bei WHO °IV-Tumoren geringere Serumkonzentrationen der oben genannten Zytokine als bei °III-Tumoren festzustellen. Aufgrund des aggressiveren Verhaltens und der folglich stärker ausgeprägten Immunsuppression würde man eigentlich höhere Konzentrationen an IL-10 beziehungsweise generell an Th2-Zytokinen erwarten. Möglicherweise hat der Th2-Bias bei WHO °III-Tumoren seinen Höhepunkt und lässt anschließend bereits wieder nach.

Die zentrale Stellung von DZ wird ferner am Beispiel „tolerogener DZ“ unterstrichen, wenngleich diese unseres Wissens nach noch nicht als Tumor-Escape-Mechanismus beschrieben sind. So besitzen DZ immunsuppressive Funktionen im Sinne der Präsentation von Antigenen mit anschließender Zerstörung bzw. Inaktivierung der korrespondierenden T-Zellen ²⁹.

Als neuen Serummarker untersuchten wir *Metastasis-associated in colon-cancer-1* (MACC1) in unserer Kohorte. Die MACC1-Expression im Tumorgewebe ist bei Patienten mit Kolonkarzinom als unabhängiger Risikofaktor für Metastasierung und metastasenfreies Überleben beschrieben ⁸⁰.

Die MACC1-Serumkonzentration ist bei Patienten mit kolorektalem Karzinom in allen Stadien im Vergleich zu Kontrollgruppe erhöht, die Serumkonzentration korreliert mit einem schlechteren Überleben ⁵¹. Eine erste Arbeit in WHO °II- und °IV-Zelllinien und im konsekutiven Tierversuch zeigt, dass MACC1 die Invasivität der Tumorzellen erhöht; die Expression steigt mit zunehmendem WHO-Grad und korreliert mit einem schlechteren Überleben ⁸¹.

Unsere Ergebnisse stellen damit einen neuen Aspekt dar: Die bis dato noch nicht untersuchte MACC1-Serumkonzentration zeigt sich bei Patienten mit WHO °III (10,79-fach) und bei °IV (31,95-fach) jeweils hochsignifikant erhöht. Eine Korrelation mit dem progressionsfreien bzw. Gesamtüberleben konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die MACC1-Konzentration im Serum stellt damit auch bei Gliomen einen sehr interessanten und einfach zu bestimmenden Parameter dar, dessen klinische Relevanz in weiteren prospektiven Studien untersucht werden muss.

Bezüglich der Konzentrationen von IL-12 und IP-10 im Serum sind in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollgruppe festzustellen. Jedoch korreliert die Konzentration beider Proteine positiv und statistisch signifikant mit dem Risiko für Tumorprogress.

In der Literatur sind reduzierte IL-12-Konzentrationen im Serum von Gliom-Patienten beschrieben ⁷⁹, *Salmaggi et al.* konnten in ihrer Arbeit höhere intrakavitäre IL-12-Spiegel mit einem längeren Überleben assoziieren ⁸². Prinzipiell ist IL-12 ein wichtiger Kofaktor für die zytotoxische T-Zell-Antwort ⁸³ - es wäre daher zu erwarten, dass höhere Serumkonzentrationen analog zu den intrakavitären Konzentrationen mit einem reduzierten Risiko für Tumorprogress einhergehen.

IP-10 als chemotaktisches Protein mit antiangiogenetischen Funktionen war in einer Vakzinierungsstudie mit Tumorklysate-gepulsten DZ im murinen Gliom mit einer verbesserten antitumoralen Reaktion assoziiert ⁸⁴, so dass man auch hier eher mit einem geringeren Risiko für Tumorprogress bei erhöhten IP-10-Konzentrationen im Serum rechnen würde.

Die Relevanz von IL-12 und IP-10 bedarf daher der Reevaluation in weiteren prospektiven Studien.

Amplifikationen im EGF-Rezeptor sowie konstitutiv aktivierende Mutationen sind bei hochgradigen Gliomen bereits seit längerem beschrieben. Sie korrelieren mit dem WHO-Grad sowie dem Gesamtüberleben der Patienten, eine Verabreichung

von EGF-Rezeptor-Antagonisten stellt damit prinzipiell eine neue Therapieoption dar ⁸⁵.

Bezüglich des EGF existieren Arbeiten, die eine Assoziation von Einzelnukleotid-Polymorphismen bei Gliom-Patienten, also Variationen einzelner Basenpaare auf nicht-kodierenden DNS-Abschnitten, mit schlechterer Prognose im Sinne eines höheren Risikos für Progress und eines kürzeren progressionsfreien Überlebens zeigen ^{86,87}.

EGF wird von Gliom-assoziierten Monozyten im peripheren Blut unabhängig von verabreichten Steroiden in signifikant erhöhter Menge sezerniert ⁸⁸.

In der vorliegenden Arbeit kann unseres Wissens nach erstmalig gezeigt werden, dass höhere EGF-Konzentrationen entsprechend einer Verdopplung der Serumkonzentration mit einem 1,27-fach erhöhten Risiko zu versterben einhergehen. Dies unterstreicht zum einen den Einfluss des EGF/EGF-Rezeptor-Komplexes auf die Biologie der Gliomzellen, ferner stellt die EGF-Konzentration im Serum einen klinisch ebenfalls leicht zu quantifizierenden, prognoserelevanten Parameter dar.

Die Verlässlichkeit der EGF-Serumkonzentration als prädiktiver Biomarker bedarf der Validierung in zukünftigen prospektiven Studien. Ebenfalls sollte in künftigen Studien noch herausgearbeitet werden, ob erhöhte EGF-Werte im Serum tatsächlich eine proliferationsfördernde Wirkung auf Gliom-Zellen haben oder ein Epiphänomen aberrant aktivierter Monozyten darstellt.

MDSC stellen eine heterogene Zellpopulation dar, deren funktionelle Gemeinsamkeit eine zelluläre Immunsuppression ist ³⁵.

In verschiedenen Tumorentitäten wurden sowohl MDSC mit granulozytären Eigenschaften (z.B. CD11b⁺CD14⁻CD15⁺ im Nierenzell-Karzinom) als auch mit monozytären Eigenschaften (z.B. CD11b⁺CD14⁺HLA-DR⁻ im malignen Melanom, CD11b⁺CD13⁻CD15⁺CD44⁺ im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom) beschrieben ^{35,89,90}.

Zunächst ist zu erwähnen, dass von Gliomen sezerniertes GM-CSF die Bildung von MDSC induziert ⁵⁷. Die immunsuppressive Wirkung wird auf verschiedenen Wegen entfaltet. MDSC zeigen eine erhöhte Arginase-Aktivität ⁸⁹⁻⁹¹, sezernieren

ROS^{92,93} und TGF- β , welches wiederum direkt mit T-Helfer-Zellen interferiert^{37,47}. Auf zellulärer Ebene kompromittieren MDSC zum einen die DZ-Reifung⁹⁴, zum anderen inhibieren sie die T-Zell-Proliferation^{36,49,91} und bewirken eine Reduktion der Zytokinproduktion^{89,95}, insbesondere von IFN- γ in T-Helfer-Zellen^{49,96}. Ferner werden in Anwesenheit von MDSC regulatorische T-Zellen induziert⁹¹.

In der vorliegenden Arbeit können im peripheren Blut der untersuchten Patienten mit WHO °IV-Tumoren signifikant erhöhte Frequenzen von HLA-DR⁺-Monozyten im Sinne monozytärer MDSC nachgewiesen werden. Dies ändert sich auch eine Woche nach chirurgischer Tumorentfernung nicht.

Dieses Phänomen ist beispielsweise auch beim hepatozellulären Karzinom beschrieben⁹¹, *Diaz-Montero et al.* konnten bei Patienten mit verschiedenen Tumoren eine Korrelation zwischen MDSC-Frequenz und Tumorlast nachweisen⁹⁷. Bei Patienten mit CLL korreliert die MDSC-Frequenz mit dem progressionsfreien Überleben⁹⁸.

Gustafson et al. untersuchten unter anderem den Einfluss des zur Therapie des perioperativen Hirnödems eingesetzten Dexamethasons auf die MDSC und konstatierten, dass Dexamethason allein die hohen Frequenzen von HLA-DR⁺-Monozyten nicht erklärt³⁶. Auch unsere Arbeit zeigt, dass kein signifikanter Einfluss des Dexamethasons auf die MDSC festzustellen ist.

Aus der Beobachtung, dass die erhöhten Frequenzen nur bei WHO °IV-Tumoren und unabhängig von der Steroid-Applikation auftreten, kann konstatiert werden, dass die HLA-DR⁺-Monozyten Ausdruck der systemischen Immunsuppression sind und als solches einen wichtigen Tumor-Escape-Mechanismus maligner Gliome darstellen.

Die klinische Relevanz dieses prognostischen Markers wird durch unsere Beobachtung hervorgehoben, dass Patienten mit HLA-DR⁺-Monozyten oberhalb des Medians einen 3,06-fach schnelleren Tumorprogress haben und 2,41-fach schneller versterben als Patienten mit Frequenzen unterhalb des Medians.

Der Marker stellt damit einen im klinischen Alltag verhältnismäßig einfach und wenig invasiv messbaren Parameter dar, der weitere Informationen zur individuellen Risikostratifizierung liefern kann.

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die beim hochgradigen Gliom bekannte, systemische Kompromittierung des Immunsystems, indem sie sowohl einige bereits bekannte Mechanismen bestätigt, als auch neue, bislang noch nicht beschriebene Phänomene hinzufügen kann.

Am Beispiel der myeloiden DZ wird auch gezeigt, dass die anfänglich reduzierte Anzahl der Zellen durch einen therapeutischen Eingriff wie die neurochirurgische Tumorsektion wieder angehoben werden kann. Somit ist die Immunsuppression bei hochgradigen Gliomen durchaus als prinzipiell reversibel zu bewerten.

Dies ist im Kontext neuer Therapieansätze mit autologen Tumor-Vakzinen aus DZ ²⁷ oder immunmodulierender Therapien wie beispielsweise der Einführung von Checkpoint-Inhibitoren (Anti-PD1, *Pembrolizumab*; Anti-PD-L1/L2, *Nivolumab*; CTLA-4, *Ipilimumab*) eine wichtige Erkenntnis ⁹⁹.

Für die Wirksamkeit künftiger Immuntherapien könnte es von entscheidender Bedeutung sein, die systemisch immunsuppressiven Mechanismen durch gezielte Intervention zu durchbrechen, um der antitumoralen Immunantwort vollen Entfaltungsspielraum zu ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Beim Glioblastoma multiforme als Neoplasie des zentralen Nervensystems mit sehr schlechtem Outcome sind sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene verschiedene Tumor-Escape-Mechanismen beschrieben. Zur umfassenden Charakterisierung des systemischen Immunstatus wurden bei 61 Patienten mit hochgradigem Gliom entsprechend WHO °III und °IV 30 hämatologische und 36 Plasmamarker prä- und postoperativ sowie im Vergleich mit einer Kontrollgruppe untersucht.

Periphere myeloide und plasmazytoide dendritische Zellen zirkulieren im peripheren Blut in reduzierten Frequenzen, postoperativ ist dies nur noch bei den plasmazytoiden dendritischen Zellen festzustellen. Die durchflusszytometrische Phänotypisierung der dendritischen Zellen ergibt sowohl nativ als auch nach *in vitro*-Stimulation einen funktionell intakten Phänotyp. Eine Leukozytose und Neutrophilie mit erhöhter Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio ist überwiegend durch die perioperative Dexamethason-Applikation zu erklären. Im Gegensatz hierzu korreliert die Lymphopenie insbesondere der T-Zell-Reihe mit dem WHO-Grad. HLA-DR-negative Monozyten im Sinne myeloider Suppressorzellen sind in signifikant erhöhten Frequenzen im peripheren Blut zu beobachten und persistieren nach der chirurgischen Tumorentfernung. Patienten mit Frequenzen oberhalb des Medians haben ein 3,6-fach erhöhtes Risiko für Tumorprogress und ein 2,2-fach erhöhtes Risiko zu versterben.

Bezüglich der Plasmamarker sind beim Gliompatienten signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 und MACC1 zu messen. Dies verdeutlicht die potentielle Bedeutung von MACC1 als Biomarker in diesem Patientenkollektiv. EGF konnte in der vorliegenden Arbeit mit dem Gesamtüberleben korreliert werden: Eine Verdopplung der Serumkonzentration ist mit einem 1,3-fach erhöhten Sterberisiko assoziiert.

Zusammenfassend unterstreicht diese Arbeit die systemische Kompromittierung des Immunsystems und fügt noch nicht beschriebene Phänomene hinzu. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Immunsuppression prinzipiell als reversibel zu betrachten ist.

6. Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-actinomycin D
APC	Allophycocyanin
APO	Apolipoprotein A1
Aqua dest.	Aqua destillata
CCR7	C-C chemokine receptor 7 (CD197)
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTx	Onkologische Chemotherapie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting dt.: Durchflusszytometrie
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOXP3	Forkhead box P3
FSC	Forward Scatter
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
Gy	Gray
h	Hour dt.: Stunde
HGG	High grade glioma dt.: hochgradiges Gliom
HLA	Human leukocyte antigen
IP-10	Interferon gamma induced-protein 10
KI	Konfidenzintervall
KOF	Körperoberfläche
MACS	Magnetic cell separation

MDSC	Myeloid-derived suppressor cells dt.: myeloide Suppressorzellen
MFI	Mean fluorescence intensity
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
NK	Natürliche Killer-Zelle
OS	Overall survival dt.: Gesamtüberleben
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells dt.: mononukleäre Zellen im peripheren Blut
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-chain-reaction dt.: Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll
PFS	Progression free survival dt.: Progressionsfreies Überleben
ROS	Reactive oxygen species dt.: reaktive Sauerstoffspezies
RPM	Rounds per minute dt.: Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTx	Onkologische Strahlentherapie
SSC	Sideward Scatter
TGF	Transforming growth factor
Treg	Regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization dt.: Weltgesundheitsorganisation
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

7. Literaturverzeichnis

- 1 Feiden, S. & Feiden, W. WHO classification of tumours of the CNS: revised edition of 2007 with critical comments on the typing und grading of common-type diffuse gliomas. *Pathologie* **29**, 411-421, doi:10.1007/s00292-008-1064-5 (2008).
- 2 Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-oncology* **17 Suppl 4**, iv1-iv62, doi:10.1093/neuonc/nov189 (2015).
- 3 Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica* **114**, 97-109, doi:10.1007/s00401-007-0243-4 (2007).
- 4 Urbanska, K., Sokolowska, J., Szmidt, M. & Sysa, P. Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemp Oncol (Pozn)* **18**, 307-312, doi:10.5114/wo.2014.40559 (2014).
- 5 Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* **352**, 987-996, doi:10.1056/NEJMoa043330 (2005).
- 6 Hamilton, J. D. *et al.* Glioblastoma multiforme metastasis outside the CNS: three case reports and possible mechanisms of escape. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **32**, e80-84, doi:10.1200/JCO.2013.48.7546 (2014).
- 7 Muller, C. *et al.* Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Sci Transl Med* **6**, 247ra101, doi:10.1126/scitranslmed.3009095 (2014).
- 8 Carlsson, S. K., Brothers, S. P. & Wahlestedt, C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Mol Med* **6**, 1359-1370, doi:10.15252/emmm.201302627 (2014).
- 9 Hottinger, A. F., Stupp, R. & Homicsko, K. Standards of care and novel approaches in the management of glioblastoma multiforme. *Chin J Cancer* **33**, 32-39, doi:10.5732/cjc.013.10207 (2014).
- 10 Stupp, R. *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a

- randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* **10**, 459-466, doi:10.1016/S1470-2045(09)70025-7 (2009).
- 11 Gilbert, M. R. *et al.* Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**, 4085-4091, doi:10.1200/JCO.2013.49.6968 (2013).
 - 12 Hegi, M. E. *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine* **352**, 997-1003, doi:10.1056/NEJMoa043331 (2005).
 - 13 Gilbert, M. R. *et al.* A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine* **370**, 699-708, doi:10.1056/NEJMoa1308573 (2014).
 - 14 Woehrer, A., Bauchet, L. & Barnholtz-Sloan, J. S. Glioblastoma survival: has it improved? Evidence from population-based studies. *Curr Opin Neurol* **27**, 666-674, doi:10.1097/WCO.000000000000144 (2014).
 - 15 Dix, A. R., Brooks, W. H., Roszman, T. L. & Morford, L. A. Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *Journal of neuroimmunology* **100**, 216-232 (1999).
 - 16 Gomez, G. G. & Kruse, C. A. Mechanisms of malignant glioma immune resistance and sources of immunosuppression. *Gene Ther Mol Biol* **10**, 133-146 (2006).
 - 17 Louveau, A. *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* **523**, 337-341, doi:10.1038/nature14432 (2015).
 - 18 Grauer, O. M., Wesseling, P. & Adema, G. J. Immunotherapy of diffuse gliomas: biological background, current status and future developments. *Brain pathology* **19**, 674-693, doi:10.1111/j.1750-3639.2009.00315.x (2009).
 - 19 Kortylewski, M. & Yu, H. Role of Stat3 in suppressing anti-tumor immunity. *Current opinion in immunology* **20**, 228-233, doi:10.1016/j.coi.2008.03.010 (2008).

- 20 Palucka, K. & Banchereau, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews. Cancer* **12**, 265-277, doi:10.1038/nrc3258 (2012).
- 21 Woiciechowsky, C. *et al.* Diminished monocytic HLA-DR expression and ex vivo cytokine secretion capacity in patients with glioblastoma: effect of tumor extirpation. *Journal of neuroimmunology* **84**, 164-171 (1998).
- 22 Rapp, M. *et al.* Cellular immunity of patients with malignant glioma: prerequisites for dendritic cell vaccination immunotherapy. *J Neurosurg* **105**, 41-50, doi:10.3171/jns.2006.105.1.41 (2006).
- 23 Vicari, A. P., Caux, C. & Trinchieri, G. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol* **12**, 33-42, doi:10.1006/scbi.2001.0400 (2002).
- 24 Banchereau, J. & Palucka, A. K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature reviews. Immunology* **5**, 296-306, doi:10.1038/nri1592 (2005).
- 25 Ding, D., Mehta, H., McCune, W. J. & Kaplan, M. J. Aberrant Phenotype and Function of Myeloid Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* **177**, 5878-5889, doi:10.4049/jimmunol.177.9.5878 (2006).
- 26 Yamanaka, R. *et al.* Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 4160-4167, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0120 (2005).
- 27 Olin, M. R. *et al.* Vaccination with dendritic cells loaded with allogeneic brain tumor cells for recurrent malignant brain tumors induces a CD4(+)IL17(+) response. *Journal for immunotherapy of cancer* **2**, 4, doi:10.1186/2051-1426-2-4 (2014).
- 28 Levings, M. K. *et al.* Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* **105**, 1162-1169, doi:10.1182/blood-2004-03-1211 (2005).
- 29 Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 685-711, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040 (2003).

- 30 Fecci, P. E. *et al.* Systemic CTLA-4 blockade ameliorates glioma-induced changes to the CD4+ T cell compartment without affecting regulatory T-cell function. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**, 2158-2167, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2070 (2007).
- 31 Heimberger, A. B. *et al.* Incidence and prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in human gliomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**, 5166-5172, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0320 (2008).
- 32 Vasco, C. *et al.* Circulating T regulatory cells migration and phenotype in glioblastoma patients: an in vitro study. *Journal of neuro-oncology* **115**, 353-363, doi:10.1007/s11060-013-1236-x (2013).
- 33 Grauer, O. M. *et al.* CD4+FoxP3+ regulatory T cells gradually accumulate in gliomas during tumor growth and efficiently suppress antiglioma immune responses in vivo. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **121**, 95-105, doi:10.1002/ijc.22607 (2007).
- 34 Grauer, O. M. *et al.* Elimination of regulatory T cells is essential for an effective vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells in a murine glioma model. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **122**, 1794-1802, doi:10.1002/ijc.23284 (2008).
- 35 Peranzoni, E. *et al.* Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Current opinion in immunology* **22**, 238-244, doi:10.1016/j.coi.2010.01.021 (2010).
- 36 Gustafson, M. P. *et al.* Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14+HLA-DRlo/neg monocytes, tumor factors, and dexamethasone. *Neuro-oncology* **12**, 631-644, doi:10.1093/neuonc/noq001 (2010).
- 37 Umemura, N. *et al.* Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *Journal of leukocyte biology* **83**, 1136-1144, doi:10.1189/jlb.0907611 (2008).

- 38 Rodrigues, J. C. *et al.* Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties. *Neuro-oncology* **12**, 351-365, doi:10.1093/neuonc/nop023 (2010).
- 39 Fujita, M. *et al.* COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* **71**, 2664-2674, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3055 (2011).
- 40 Wiendl, H. *et al.* A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *Journal of immunology* **168**, 4772-4780 (2002).
- 41 Wiendl, H., Mitsdoerffer, M. & Weller, M. Hide-and-seek in the brain: a role for HLA-G mediating immune privilege for glioma cells. *Seminars in Cancer Biology* **13**, 343-351, doi:10.1016/s1044-579x(03)00025-7 (2003).
- 42 Wischhusen, J., Friese, M. A., Mittelbronn, M., Meyermann, R. & Weller, M. HLA-E protects glioma cells from NKG2D-mediated immune responses in vitro: implications for immune escape in vivo. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **64**, 523-528 (2005).
- 43 Siepl, C. *et al.* The glioblastoma-derived T cell suppressor factor/transforming growth factor-beta 2 inhibits T cell growth without affecting the interaction of interleukin 2 with its receptor. *European journal of immunology* **18**, 593-600, doi:10.1002/eji.1830180416 (1988).
- 44 Schneider, T., Sailer, M., Ansorge, S., Firsching, R. & Reinhold, D. Increased concentrations of transforming growth factor beta1 and beta2 in the plasma of patients with glioblastoma. *Journal of neuro-oncology* **79**, 61-65, doi:10.1007/s11060-005-9116-7 (2006).
- 45 Raychaudhuri, B. *et al.* Myeloid-derived suppressor cell accumulation and function in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neuro-oncology* **13**, 591-599, doi:10.1093/neuonc/nor042 (2011).
- 46 Lin, Y. *et al.* A panel of four cytokines predicts the prognosis of patients with malignant gliomas. *Journal of neuro-oncology* **114**, 199-208, doi:10.1007/s11060-013-1171-x (2013).
- 47 Filipazzi, P. *et al.* Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-

- macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**, 2546-2553, doi:10.1200/JCO.2006.08.5829 (2007).
- 48 Kusmartsev, S. *et al.* Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**, 8270-8278, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0165 (2008).
- 49 Brandau, S. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *Journal of leukocyte biology* **89**, 311-317, doi:10.1189/jlb.0310162 (2011).
- 50 Rodriguez, P. C. *et al.* Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer research* **69**, 1553-1560, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1921 (2009).
- 51 Stein, U. *et al.* Circulating MACC1 transcripts in colorectal cancer patient plasma predict metastasis and prognosis. *PloS one* **7**, e49249, doi:10.1371/journal.pone.0049249 (2012).
- 52 Stummer, W. *et al.* Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery* **62**, 564-576; discussion 564-576, doi:10.1227/01.neu.0000317304.31579.17 (2008).
- 53 Gousias, K. *et al.* Prognostic value of the preoperative immunological profile in patients with glioblastoma. *Surg Neurol Int* **5**, 89, doi:10.4103/2152-7806.134104 (2014).
- 54 Sturm, D. *et al.* Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* **22**, 425-437, doi:10.1016/j.ccr.2012.08.024 (2012).
- 55 Grossman, S. A. *et al.* Immunosuppression in patients with high-grade gliomas treated with radiation and temozolomide. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 5473-5480, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0774 (2011).

- 56 Zou, J. P. *et al.* Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers. *Journal of immunology* **162**, 4882-4892 (1999).
- 57 Nduom, E. K., Weller, M. & Heimberger, A. B. Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma. *Neuro-oncology* **17 Suppl 7**, vii9-vii14, doi:10.1093/neuonc/nov151 (2015).
- 58 Bambury, R. M. *et al.* The association of pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio with overall survival in patients with glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology* **114**, 149-154, doi:10.1007/s11060-013-1164-9 (2013).
- 59 Han, S. *et al.* Pre-treatment neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with neutrophil and T-cell infiltration and predicts clinical outcome in patients with glioblastoma. *BMC Cancer* **15**, 617, doi:10.1186/s12885-015-1629-7 (2015).
- 60 Deutsch, M. B., Panageas, K. S., Lassman, A. B. & Deangelis, L. M. Steroid management in newly diagnosed glioblastoma. *Journal of neuro-oncology* **113**, 111-116, doi:10.1007/s11060-013-1096-4 (2013).
- 61 Shields, L. B. *et al.* Dexamethasone administration during definitive radiation and temozolomide renders a poor prognosis in a retrospective analysis of newly diagnosed glioblastoma patients. *Radiat Oncol* **10**, 222, doi:10.1186/s13014-015-0527-0 (2015).
- 62 Brooks, W. H., Roszman, T. L., Mahaley, M. S. & Woosley, R. E. Immunobiology of primary intracranial tumours. II. Analysis of lymphocyte subpopulations in patients with primary brain tumours. *Clin Exp Immunol* **29**, 61-66 (1977).
- 63 Rochet, N. M., Kottschade, L. A., Grotz, T. E., Porrata, L. F. & Markovic, S. N. The prognostic role of the preoperative absolute lymphocyte count and absolute monocyte count in patients with resected advanced melanoma. *Am J Clin Oncol* **38**, 252-258, doi:10.1097/COC.0b013e31829b5605 (2015).

- 64 Mostafa, H. *et al.* Immune phenotypes predict survival in patients with glioblastoma multiforme. *J Hematol Oncol* **9**, 77, doi:10.1186/s13045-016-0272-3 (2016).
- 65 Girndt, M., Sester, U., Kaul, H., Hunger, F. & Kohler, H. Glucocorticoids inhibit activation-dependent expression of costimulatory molecule B7-1 in human monocytes. *Transplantation* **66**, 370-375 (1998).
- 66 Steinman, R. M. & Banchereau, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**, 419-426, doi:10.1038/nature06175 (2007).
- 67 Diamond, M. S. *et al.* Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med* **208**, 1989-2003, doi:10.1084/jem.20101158 (2011).
- 68 Fuertes, M. B. *et al.* Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8 α + dendritic cells. *J Exp Med* **208**, 2005-2016, doi:10.1084/jem.20101159 (2011).
- 69 Pinzon-Charry, A. *et al.* Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *British journal of cancer* **97**, 1251-1259, doi:10.1038/sj.bjc.6604018 (2007).
- 70 Beckebaum, S. *et al.* Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 7260-7269, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0872 (2004).
- 71 Legitimo, A., Consolini, R., Failli, A., Orsini, G. & Spisni, R. Dendritic cell defects in the colorectal cancer. *Hum Vaccin Immunother* **10**, 3224-3235, doi:10.4161/hv.29857 (2014).
- 72 Charles, J. *et al.* Characterization of circulating dendritic cells in melanoma: role of CCR6 in plasmacytoid dendritic cell recruitment to the tumor. *The Journal of investigative dermatology* **130**, 1646-1656, doi:10.1038/jid.2010.24 (2010).

- 73 Ogden, A. T. *et al.* Defective receptor expression and dendritic cell differentiation of monocytes in glioblastomas. *Neurosurgery* **59**, 902-909; discussion 909-910, doi:10.1227/01.NEU.0000233907.03070.7B (2006).
- 74 Shimato, S. *et al.* Profound tumor-specific Th2 bias in patients with malignant glioma. *BMC Cancer* **12**, 561, doi:10.1186/1471-2407-12-561 (2012).
- 75 Zisakis, A. *et al.* Comparative analysis of peripheral and localised cytokine secretion in glioblastoma patients. *Cytokine* **39**, 99-105, doi:10.1016/j.cyto.2007.05.012 (2007).
- 76 Fecci, P. E. *et al.* Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer research* **66**, 3294-3302, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3773 (2006).
- 77 Albuлесcu, R. *et al.* Cytokine patterns in brain tumour progression. *Mediators Inflamm* **2013**, 979748, doi:10.1155/2013/979748 (2013).
- 78 Steinbrink, K., Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J. & Enk, A. H. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *Journal of immunology* **159**, 4772-4780 (1997).
- 79 Kumar, R. *et al.* Th1/Th2 cytokine imbalance in meningioma, anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme patients. *Oncol Rep* **15**, 1513-1516 (2006).
- 80 Stein, U. *et al.* MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nature medicine* **15**, 59-67, doi:10.1038/nm.1889 (2009).
- 81 Hagemann, C. *et al.* Impact of MACC1 on human malignant glioma progression and patients' unfavorable prognosis. *Neuro-oncology* **15**, 1696-1709, doi:10.1093/neuonc/not136 (2013).
- 82 Salmaggi, A. *et al.* Intracavitary VEGF, bFGF, IL-8, IL-12 levels in primary and recurrent malignant glioma. *Journal of neuro-oncology* **62**, 297-303 (2003).

- 83 Nizzoli, G. *et al.* Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* **122**, 932-942, doi:10.1182/blood-2013-04-495424 (2013).
- 84 Jiang, X. B., Lu, X. L., Hu, P. & Liu, R. E. Improved therapeutic efficacy using vaccination with glioma lysate-pulsed dendritic cells combined with IP-10 in murine glioma. *Vaccine* **27**, 6210-6216, doi:10.1016/j.vaccine.2009.08.002 (2009).
- 85 Gadji, M. *et al.* EGF receptor inhibitors in the treatment of glioblastoma multiforme: old clinical allies and newly emerging therapeutic concepts. *Eur J Pharmacol* **625**, 23-30, doi:10.1016/j.ejphar.2009.10.010 (2009).
- 86 Sjostrom, S. *et al.* Genetic variations in EGF and EGFR and glioblastoma outcome. *Neuro-oncology* **12**, 815-821, doi:10.1093/neuonc/noq018 (2010).
- 87 Bhowmick, D. A., Zhuang, Z., Wait, S. D. & Weil, R. J. A functional polymorphism in the EGF gene is found with increased frequency in glioblastoma multiforme patients and is associated with more aggressive disease. *Cancer research* **64**, 1220-1223 (2004).
- 88 Fries, G., Pernecky, A. & Kempfski, O. Glioblastoma-associated circulating monocytes and the release of epidermal growth factor. *J Neurosurg* **85**, 642-647, doi:10.3171/jns.1996.85.4.0642 (1996).
- 89 Zea, A. H. *et al.* Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer research* **65**, 3044-3048, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4505 (2005).
- 90 Ochoa, A. C., Zea, A. H., Hernandez, C. & Rodriguez, P. C. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**, 721s-726s, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2197 (2007).
- 91 Hoechst, B. *et al.* A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* **135**, 234-243, doi:10.1053/j.gastro.2008.03.020 (2008).

- 92 Corzo, C. A. *et al.* Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology* **182**, 5693-5701, doi:10.4049/jimmunol.0900092 (2009).
- 93 Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D. & Gabrilovich, D. I. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *Journal of immunology* **172**, 989-999 (2004).
- 94 Lin, Y. *et al.* Immunosuppressive CD14+HLA-DR(low)/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **117**, 872-881, doi:10.1182/blood-2010-05-283820 (2011).
- 95 Melief, C. J. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity* **29**, 372-383, doi:10.1016/j.immuni.2008.08.004 (2008).
- 96 Jia, W., Jackson-Cook, C. & Graf, M. R. Tumor-infiltrating, myeloid-derived suppressor cells inhibit T cell activity by nitric oxide production in an intracranial rat glioma + vaccination model. *Journal of neuroimmunology* **223**, 20-30, doi:10.1016/j.jneuroim.2010.03.011 (2010).
- 97 Diaz-Montero, C. M. *et al.* Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **58**, 49-59, doi:10.1007/s00262-008-0523-4 (2009).
- 98 Gustafson, M. P. *et al.* Association of an increased frequency of CD14+ HLA-DR lo/neg monocytes with decreased time to progression in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *British journal of haematology* **156**, 674-676, doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08902.x (2012).
- 99 Reardon, D. A. *et al.* Glioblastoma Eradication Following Immune Checkpoint Blockade in an Orthotopic, Immunocompetent Model. *Cancer Immunol Res* **4**, 124-135, doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0151 (2016).

8. Danksagung

Ich danke Professor Dr. med. Matthias Eyrich für die Überlassung des Promotionsthemas, die außergewöhnlich engmaschige und geduldige Betreuung sowie die Durchsicht meiner Arbeit.

Ich danke dem gesamten Team des gemeinsamen Stammzelllabors der Universitätskinderklinik Würzburg sowie der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg, insbesondere Johannes Rachor, für die hervorragende Unterstützung und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Ich danke dem Team der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg, insbesondere Privatdozent Dr. med. Mario Löhr und Schwester Regina, für die allzeit kollegiale und konstruktive Zusammenarbeit.

Allen Patientinnen und Patienten sowie deren Familien sei von Herzen gedankt, dass sie sich in dieser schwierigen Situation bereit erklärt haben, an der vorliegenden Studie teilzunehmen.

Der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit durch Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Ich danke Sandra Oeding für die geduldige Unterstützung und die akribische Durchsicht dieser Arbeit sowie Hendrik Rathke für den allzeit kameradschaftlichen Beistand.

Ich danke meiner Familie für die immerwährende Unterstützung.

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes in der Online-Version entfernt.

10. Publikation

Teile dieser Dissertation wurden in folgender Veröffentlichung publiziert:

Löhr, M., Freitag, B. *et al.* High-grade glioma associated immunosuppression does not prevent immune responses induced by therapeutic vaccines in combination with Treg depletion. *Cancer Immunol. Immunother.*, doi:10.1007/s00262-018-2214-0 (2018)