

Zusammenfassung der Arbeiten zu dem Forschungsprojekt "Identifikation immunsuppressiver Mechanismen im Glioblastom und ihre Evaluation als therapeutische Angriffspunkte"

Ziel des Forschungsprojekts war es, immuntherapeutische Angriffspunkte zur Behandlung von Glioblastomen zu identifizieren. Hierzu wurden drei spezifische Projektziele definiert: 1. Die Identifikation von Genen, die in Tumorzellen und Wirtszellen herauf- oder herunterreguliert sind und für die Manifestation des immunsuppressiven Tumormikromilieus verantwortlich sind. 2. Die Evaluation einer Inhibierung von Arginase als Mono- und Kombinationstherapie. 3. Die Untersuchung der durch extrazelluläre Vesikel (EVs) vermittelten Interaktion zwischen Glioblastomzellen und Immunzellen.

Zur Erreichung des ersten Ziels verglichen wir das Tumorwachstum syngener Gliome im Hirn von immunkompetenten C57BL6/Wildtyp (WT) Mäusen und immundefizienten Pfp^{-/-} /Rag2^{-/-} Knockout-Mäusen. Immunkompetente Mäuse überlebten signifikant länger und die Tumore in immundefizienten Mäusen wuchsen erheblich invasiver. Experimente, in denen Gliomzellen mit einem lentiviralen rot-grün-blau (RGB) System vielfarbig markiert wurden, zeigten, dass die klonale Tumorerogenität in WT Mäusen erheblich reduziert war, so dass offenbar der Selektionsdruck des Immunsystems dazu führte, dass weniger Klone überlebten als in Pfp^{-/-} /Rag2^{-/-} Mäusen. Dieses Ergebnis wurde durch die Optical Barcoding (OBC) Methode validiert, die bestätigte, dass die klonale Heterogenität in den Pfp^{-/-} /Rag2^{-/-} Mäusen am größten und in WT Mäusen, sowie auch in PD1^{-/-} Knockout-Mäusen deutlich reduziert war. Dabei waren in Wiederholungsexperimente stets dieselben Klone in immunkompetenten Mäusen dominant, so dass diese Klone offenbar in besonderem Maße fähig sind, sich dem Angriff des Immunsystems zu entziehen. Zur Identifikation von Mechanismen mit Hilfe derer die Tumorzellen dem Immunangriff entkommen, führten wir Genexpressionsanalysen der Tumorzellen sowie Tumor-infiltrierender Stromazellen durch, welche überwiegend aus Macrophagen/Microglia bestehen. Diese Analysen zeigten, dass der Großteil der immunsuppressiven Expressionssignatur von den Stromazellen stammte und in geringerem Maße von den Tumorzellen selbst. Tumorzellen in immunkompetenten Mäusen regulierten vor allem Interferon-induzierbare Gene herauf, darunter sowohl immun-aktivierende als auch immunsuppressive. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Gliomzellen auf die Infiltration Interferon-produzierender T-Zellen mit einer Heraufregulation immunstimulatorischer sowie "Immune-Escape"-assoziierter Gene reagieren und im Zusammenspiel mit stromalen Macrophagen/Microgliazellen, welche noch erheblich stärker zu der immunsuppressiven Expressionssignatur beitragen, insgesamt ein Mikromilieu resultiert, das es den Tumoren ermöglicht, der Immunkontrolle zu entkommen.

Das zweite Ziel basierte auf der Beobachtung, dass ARG1 - das für das Enzym Arginase kodierende Gen - sowohl von Macrophagen/Microglia als auch von den Tumorzellen in immunkompetenten Mäusen stark heraufreguliert wird und dass Arginase eine immunsuppressive Wirkung hat, indem durch Depletierung von L-Arginin die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen gehemmt wird. Zur Inhibierung der Arginase verwendeten wir einen spezifischen Inhibitor, den wir direkt kontinuierlich intratumoral in Gliome infundierten, und führten zunächst Toxizitäts- und pharmakokinetische Tests durch. Anschließend behandelten wir die Mäuse über mehrere Wochen mit dem Inhibitor, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit einem anti-PD1 Antikörper. Die Behandlung mit dem anti-PD1 Antikörper verlängerte das Überleben der Mäuse signifikant, jedoch hatte die Kombination mit dem Arginase Inhibitor keinen zusätzlichen lebensverlängernden Effekt und auch die Monotherapie mit dem Inhibitor hatte allein keine lebensverlängernde Wirkung. Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse gegen unsere Hypothese, dass Arginase ein geeignetes Zielmolekül zur Verstärkung der Wirkung von Immuntherapien bei Gliomen sein könnte.

Im dritten Projektteil untersuchten wir die Wirkung von aktivierten T-Zellen auf die Zusammensetzung sezernierter EVs von humanen und murinen Glioblastomzellen. Zunächst wurde die Technik der Imaging Flow Cytometry (IFCM) zur Charakterisierung der EVs etabliert und weiterentwickelt, was in einer Publikation resultierte. Anschließend wurden Glioblastomzellen mit aktivierten T-Zellen, PBMCs oder Interferon- γ konfrontiert und Proteomanalysen der von den Tumorzellen sezernierten EVs durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass insbesondere FASN (fatty acid synthase) in den Tumorzell-EVs heraufreguliert durch

Konfrontation mit aktivierten Lymphozyten oder Interferon- γ heraufreguliert wird. Weitere Experimente bestätigten eine hohe Expression von FASN in Glioblastomgewebe und zeigten zudem, dass FASN-positive EVs im Blut von Glioblastompatienten erhöht sind. Zusammenfassend identifizierten mit FASN einen potenziellen Marker für zirkulierende Glioblastom-EVs, der bei einer Immun-Konfrontation der Tumorzellen heraufreguliert wird.