

## **Immunomodulatory effects of anti-angiogenic treatment and radiotherapy in glioblastoma models**

Das Forschungsprojekt verfolgt zwei Ziele. Erstes Ziel ist, in einem Mausmodell zu untersuchen, ob die Blockierung von VEGF eine Immunstimulation innerhalb von Glioblastomen sowie im Blut hervorruft und somit dazu beitragen kann, die anti-Tumor Wirkung des Immunsystems und den Effekt von Immuntherapien zu verstärken. Zweites Ziel ist, den Effekt der Strahlentherapie auf die Immunzellen im Tumor und im Blut zu charakterisieren, sowie zu untersuchen, inwiefern die klonale Heterogenität durch die Bestrahlung und Immuntherapie beeinflusst wird und welche Rolle der Austausch extrazellulärer Vesikel für die Strahlenresistenz spielt. Das Arbeitsprogramm untergliedert sich in 6 Work Packages (WP).

In WP1 wurde die Methodik zur Charakterisierung von Immunzellen in Mäusen etabliert. Hierbei wurden mehrere Antikörper-Panels für durchflusszytometrische Analysen zusammengestellt und experimentell validiert. Mit diesen Panels lassen sich in WP2-WP5 die verschiedenen Immunzelltypen sowie deren Differenzierungs-, Aktivierungs- und Erschöpfungszustand untersuchen.

In WP2 wird der immunmodulatorische Effekt der anti-VEGF Behandlung untersucht. In dem ersten Experiment hierzu wurden Mäuse mit GL261 Gliomen entweder mit einem anti-VEGF Antikörper (B20) oder einem Kontrollantikörper (IgG) über 15 Tage behandelt. Dabei zeigte sich, dass T-Zellen aus Tumoren generell eine sehr viel stärkere Aktivierung aufwiesen als periphere T-Zellen. Da die Tumore in der B20 behandelten Gruppe oft noch sehr klein am Tag 15 waren, wurde ein zweites Experiment mit dem Endpunkt Überleben durchgeführt. Die mit B20 behandelten Mäuse überlebten hierbei etwa doppelt so lange wie die Kontrolltiere und es zeigte sich, dass Gedächtniszellen und naive T-Zellen in B20 Tumoren erhöht und Effektorzellen erniedrigt waren. Um herauszufinden, ob möglicherweise in den B20 behandelten Tumoren insgesamt mehr T-Zellen in den Tumor eindringen, sodass die Gesamtzahl der T-Zellen erhöht ist bei gleichzeitiger relativer Erhöhung der naiven, führten wir ein drittes Experiment durch. Hierbei schlossen wir zudem eine Gruppe ein, die mit Dexamethason behandelt wurde. Immunhistochemische Analysen zeigten, dass B20 behandelte Tumore in der Tat eine erheblich stärkere Infiltration mit T-Zellen sowie Microglia und Macrophagen aufwiesen, bei relativer Erniedrigung regulatorischer T-Zellen und dass die Immunzellinfiltration zu frühen Zeitpunkten (Tag 17-20) deutlich stärker war als am Überlebensendpunkt. Die Untersuchung des Bluts ergab, dass sich hier vor allem die mit Dexamethason behandelte Gruppe von allen anderen unterschied und insbesondere eine starke Erniedrigung der CD4 T-Zellen aufwies. Um direkt Tumor-infiltrierende Immunzellen sowohl zu demselben Zeitpunkt als auch am Endpunkt Überleben mit den Immunzellen im Blut vergleichen zu können, führten wir ein viertes Experiment durch. Hier analysierten wir zusätzlich auch die Tumorzellen selbst und verwendeten als Methode die RNA Sequenzierung, um noch tiefere und objektivere Informationen über den Immunstatus zu erhalten. Die Auswertung der Sequenzierungsdaten ist für die Tumorzellen bereits größtenteils erfolgt und zeigte, dass die Tumorzellen in der mit B20 behandelten Gruppe eine starke Heraufregulation von pro-inflammatorischen Genen sowie von Chemo- und Zytokinen, die Immunzellen anlocken, aufwiesen. Die Auswertung der Sequenzierungsdaten der Immunzellen erfolgt in den nächsten Wochen und Monaten. In einem fünften Experiment untersuchten wir schließlich, ob der vermutete immunstimulierende Effekt von B20 wirklich maßgeblich mit zu der überlebensverlängernden Wirkung beiträgt, oder ob diese eventuell doch lediglich auf einer anti-angiogenetischen Wirkung des Antikörpers beruht. Hierbei zeigte sich, dass B20 ausschließlich in immunkompetenten Mäusen einen signifikanten überlebensverlängernden Effekt hatte, nicht jedoch in immundefizienten Pfp/Rag2 Knockout-Mäusen, was unsere Hypothese bestätigt, dass der Effekt abhängig von der immunstimulierenden Wirkung des Antikörpers ist. In den kommenden 6 Monaten werden wir die bisher gewonnenen Daten weiter auswerten und zusätzliche in vivo Experimente durchführen, um die Daten noch zu erweitern und zu komplettieren.

In WP3 wurde die Methodik zur stereotaktischen Bestrahlung von Mäusen etabliert. Dies gelang erst mit 15-monatiger Verzögerung, da aufgrund der Corona-Pandemie der Techniker aus den USA, der das SmART+ (Small Animal Radiation Therapy) Bestrahlungsgerät in Betrieb nehmen musste, über sehr lange Zeit nicht einreisen durfte.

Mit WP4 konnten wir dementsprechend ebenfalls erst mit 15-monatiger Verzögerung beginnen. Hierbei injizierten wir Mäusen 21 verschiedene Tumorzellklone, die jeweils unterschiedlich mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren und bestrahlten die hieraus resultierenden Tumore mit 10 x 2 Gy. Dabei zeigte sich, dass unbestrahlte Kontrolltiere nach ca. 30 Tagen verstarben, wohingegen die bestrahlten Tiere jetzt seit über 90 Tagen weiterhin symptomfrei leben, sodass die Bestrahlung offenbar sehr gut wirkt und die Tiere möglicherweise hierdurch geheilt wurden, was bedeuten würde, dass Mechanismen klonaler Strahlenresistenz und immunmodulatorische Effekte nur unter Modifikation dieses Modells untersucht werden könnten. Geplant ist, diese Arbeiten im Laufe des nächsten Jahres als "side project" kontinuierlich weiterzuführen.

WP5 sollte im Anschluss an WP4 erfolgen und hier sollte die Wirkung einer kombinierten single-dose oder fraktionierten Strahlentherapie und anti-PD-1 Immuntherapie versus Monotherapie auf Überleben, Immunantwort und Klonalität verglichen werden. Hiermit konnte aufgrund der Verzögerungen bei WP3 und WP4 noch nicht begonnen werden. Abhängig vom Fortgang der Arbeiten zu WP4 ist geplant, auch WP5 als "side project" im nächsten Jahr fortzusetzen.

In WP6 untersuchten wir die Relevanz des Transfers extrazellulärer Vesikel für die Strahlenresistenz in vitro. Hierbei zeigte sich, dass Tumorzellklone, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert worden waren, teilweise eine sehr unterschiedliche Strahlensensitivität aufwiesen. Um zu untersuchen, ob diese Strahlenresistenz durch extrazelluläre Vesikel, bzw. die darin enthaltenen Proteine, RNAs und andere Moleküle übertragen werden kann, inkubierten wir strahlensensitive Tumorzellklone mit Vesikeln resistenter Klone. Das Ergebnis war sehr heterogen. So erhöhte sich bei einem der Klone die Strahlenresistenz, bei einem anderen Klon hatten die Vesikel hingegen keinen Effekt und bei einem dritten Klon starben die Zellen sogar ab bei Inkubation mit den Vesikeln. Insofern lassen die Ergebnisse dieser Untersuchungen keine generalisierende Aussage bezüglich der Übertragbarkeit der Strahlenresistenz zwischen unterschiedlichen Klonen zu.

Der Hauptschwerpunkt der im ersten Halbjahr 2022 fortzuführenden Arbeiten wird auf WP2 liegen. Diese Arbeiten sollen ergänzt und erweitert werden, um schließlich eine tiefgreifende und umfassende Untersuchung der immunmodulatorischen Effekte der anti-VEGF Behandlung publizieren zu können.