

# **Immunologische Veränderungen und Anpassung der Tumorumgebung im Zuge der Glioblastomprogression**

## **- 2. Förderperiode, Stand November 2016 -**

In der ersten Förderperiode beschäftigten wir uns insbesondere mit der Charakterisierung der Tumorumgebung in Primärtumoren (pGBM) und korrespondierenden Glioblastomrezidiven (rGBM). Zu den wichtigsten Erkenntnissen zählten erhebliche Veränderungen im Anteil und der Polarisierung von Mikrogliazellen wie auch eine stark veränderte Einwanderung verschiedener T-Zell-Subtypen. Um diese Beobachtungen weiter zu untermauern, konnte das Studienkollektiv plangemäß von 40 auf 64 Patienten erweitert werden, für die gepaarte Proben von pGBM und rGBM zur Verfügung standen. In diesem erweiterten Kollektiv ließen sich die zuvor beschriebenen Beobachtungen umfänglich bestätigen. Auch die mittels Microarray-Analysen bereits in der 1. Förderperiode gezeigten Veränderungen hinsichtlich der Genexpression zwischen pGBM und rGBM desselben Patienten konnten weiter gefestigt werden. Hierbei wurden insbesondere differenziell exprimierte Gene identifiziert, die in immunrelevante Signalwege wie beispielsweise der Anlockung von Immunzellen eingebunden sind. Diese Beobachtungen wurden durch Untersuchungen auf Proteinebene mittels Luminexanalysen komplementiert und deuteten auf eine Abnahme positiver Immunmodulatoren im Zuge der Tumorerkrankung hin. Zur Abrundung und Vervollständigung unseres Bildes über Auftreten und Einfluss weiterer Immunzelltypen in primären und rezidivierten Glioblastomen wurde mit Analysen zur intratumoralen Infiltration von Natürlichen Killerzellen und B-Zellen in diesem einzigartigen Patientenkollektiv begonnen.

Des Weiteren wurde bereits in der 1. Förderperiode besonderes Augenmerk auf die Identifizierung von immunogenen Antigenen in Primärtumoren und korrespondierenden Glioblastomrezidiven gelegt. Mittels einer Kombination aus Proteomics-basierter Proteinauftrennung (PF2D) und einem T-Zell-Aktivierungsassay (IFN- $\gamma$  ELISpot Assay) von korrespondierenden pGBM- und rGBM-Paaren konnten wir bereits deutliche Veränderungen des immunogenen Repertoires im Zuge der Erkrankung feststellen. Aufgrund der intratumoralen Heterogenität, die in Glioblastomen unter anderem durch Gliomstammzellen (GSZ) verursacht wird, wurden diese Analysen ergänzend mit etablierten GSZ-Linien durchgeführt. Massenspektrometrische Analysen immunogener GSZ Fraktionen führten zur Identifizierung von mehr als 3000 potenziellen T-Zellantigenen, von denen 20 Peptide im Rahmen eines intensiven Selektionsprozesses für die weitere Validierung ausgewählt wurden. Es folgte eine zusätzliche Validierung an einem größeren Kollektiv von Glioblastom-Patienten und gesunden Spendern. Microarray-Analysen, die im Rahmen dieser Förderung durchgeführt worden waren, wurden nun genutzt, um die mRNA-Expressionsstärke potenzieller T-Zellantigene und damit deren mögliche Relevanz in pGBM und rGBM zu untersuchen. Dies führte zur Identifizierung mehrerer bisher nicht bekannter immunogener Zielstrukturen im Glioblastom, deren Expression nicht nur auf unreife GSZ beschränkt war, sondern die auch auf differenzierteren Zellen des Primärtumors und des Tumorrezidivs nachgewiesen werden konnten.