

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

Prof. Dr. Christel Herold-Mende, Experimentelle Neurochirurgie Heidelberg

## **Zusammenfassung**

Ziel des von uns durchgeführten Forschungsprojektes war die Charakterisierung des immunrelevanten Mikromilieus im Zuge der Glioblastomprogression sowie die Identifizierung immungener Zielstrukturen, die sich im Rahmen einer Immuntherapie künftig nutzen lassen könnten. Hierzu wurden u.a. die Tumorproben von extrem unterschiedlich überlebenden Glioblastompatienten genutzt sowie ein Kollektiv von gepaarten Proben von primären und rezidivierenden Glioblastomen (pGBM, rGBM).

Als besonders dominante Immunzellpopulation im Glioblastom und als wichtige Einflussgröße von T-Zell-vermittelten Immunantworten wurde zunächst Anteil und Polarisierung der Microglia in Assoziation mit dem Überleben von Glioblastompatienten untersucht. Diese Analysen zeigten eine signifikante Anreicherung von immunsuppressiver M2 Microglia in Glioblastompatienten mit einem Überleben von weniger als 10 Monaten im Vergleich zu länger überlebenden Patienten (> 3 Jahre, *Geisenberger et al., Acta Neuropathol. 2015*). Der Vergleich von Primärtumor und Rezidiv ergab ebenfalls eine deutliche Zunahme des Anteils an M2-polarisierter Microglia und war sowohl im Primärtumor wie auch im Rezidiv mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Die gleichzeitige Analyse einwandernder T-Zellen ergab einen signifikanten Anstieg an Effektor-T-Zellen im Rezidiv, während sich der Anteil an regulatorischen T-Zellen nicht veränderte. Insbesondere der Anstieg an zytotoxischen Effektor-T-Zellen war überraschenderweise hoch korreliert mit der Menge an ungünstiger M2-polarisierter Microglia. Die zusätzliche Quantifizierung von Immunmodulatoren in denselben Geweben zeigten insbesondere im Rezidiv eine Abnahme von Faktoren, die eine Tumorabstoßung begünstigen und legen somit nahe, dass trotz Zunahme intratumoraler Effektor-T-Zellen diese vermutlich nicht mehr zu einer zytotoxischen Antwort in der Lage sind. Darüber hinaus wurden in denselben Tumorproben massive Transkriptomveränderungen vom Primärtumor hin zum Rezidiv festgestellt, die auf Selektionsprozesse in Richtung eines ungünstigen immunologischen Milieus hindeuten und damit ebenfalls zu einer beeinträchtigten T-Zell-Aktivität beitragen könnten. Die weitere Klärung dieser Frage wird Gegenstand der nächsten Förderperiode sein.

Um in unseren weiterführenden Analysen therapeutisch nutzbare, immunogene Strukturen und Veränderungen des immunogenen Repertoires vom Primärtumor hin zum Rezidiv zu identifizieren, wurde eine Kombination aus Proteomics-basierter Proteinauftrennung (PF2D) und einem T-Zell-Aktivierungsassay (IFN- $\gamma$  ELISpot Assay) genutzt. Im Einklang mit den zuvor durchgeführten Transkriptomanalysen zeigten sich in allen untersuchten Patienten erhebliche Veränderungen in Form einer Abnahme wie auch einer Zunahme immunogener Tumorproteinfraktionen im Rezidiv bis hin zu einem völligen Shift des immunogenen Repertoires. Durch massenspektrometrische Analysen der Fraktionen, die eine signifikante Immunantwort zeigten, wurden bislang mehr als 1500 Proteine identifiziert. Nach einem intensiven Selektionsprozess wurden 19 Proteine, die sowohl in immunogenen Fraktionen von Primärtumoren wie auch in Rezidiven nachweisbar waren, hinsichtlich ihrer Eignung als Impfantigene zunächst durch eine Validierung im Ursprungspatienten, in gesunden Spendern sowie in weiteren Glioblastom-Patienten getestet. Als besonders viel versprechend zeigten vier Proteine eine hohe Immunantwort in mehr als 30% der getesteten Glioblastom-Patienten und keine oder nur geringe Immunantworten in gesunden Spendern. Als weiteren Hinweis hinsichtlich der Eignung als Impfantigene zur Behandlung des Glioblastoms konnte für drei dieser Proteine zusätzlich eine massive Überexpression und für zwei Proteine sogar eine inverse Überlebensabhängigkeit gezeigt werden.

Um abschließend einen umfassenderen Eindruck über die Immunantworten von Glioblastom-Patienten zu erhalten und die Wirksamkeit von Immuntherapien gegen definierte Antigene testen zu können, wurde in unserer Gruppe ein diagnostisches Werkzeug entwickelt, mit dessen Hilfe sich Immunantworten im peripheren Blut überprüfen lassen (*Mock et al., Oncotarget 2015*). Sechs GBM-assoziierte Antigene wurden auf Glas-Arrays gedruckt und eine bestehende Antikörper-vermittelte Immunantwort im Serum getestet. Dabei konnte für das Peptid VCED des Antigens Tenascin C prognostische Antikörperantworten nachgewiesen werden und wird nun hinsichtlich seines Einsatzes als potenzieller Biomarker weiter validiert.

## **Einleitung**

Trotz intensiver Forschung zählen Glioblastome auch heute noch zu den aggressivsten und schwer behandelbaren Tumoren. Ein Grund dafür liegt in der Fähigkeit von Glioblastomzellen tief in umliegendes Gehirngewebe einzuwandern. Durch die Infiltration von normalem Hirngewebe entgehen Tumorzellen nicht nur der chirurgischen Entfernung, sondern auch aufgrund von

Resistenzmechanismen anderen Therapien wie Chemo- und Strahlentherapie und verursachen in den meisten Fällen nach kurzer Zeit ein Rezidiv (1-2).

Deshalb gewinnen systemische Therapien wie z.B. die Immuntherapie zunehmend an Bedeutung, da sie im Falle einer Wirksamkeit gezielt auch verstreute Tumorzellen erreichen und eliminieren können. Für die Abstoßung von Tumoren spielen einwandernde Immunzellen und hier insbesondere in den Tumor einwandernde T-Zellen eine maßgebliche Rolle. Allerdings zeigen umfangreiche Untersuchungen an intra- und extrakraniellen Tumoren, dass sich Tumorzellen bereits bei Auftreten des Primärtumors z.T. äußerst effektiv gegen antitumorale Immunantworten schützen können (3). Es wird außerdem vermutet, dass Rezidivtumore möglicherweise über einen noch besseren Schutz nicht nur gegen Standardtherapien, sondern auch gegen Immunantworten verfügen (4).

Von besonderer Bedeutung für die immunologische Tumorabstoßung ist die jeweilige Umgebung des Tumors. Unter dem Einfluss von Tumorzellen werden geno- und phänotypisch normale Zellen wie z.B. Mikrogliazellen dazu veranlasst, Faktoren abzugeben, die das Tumorstadium fördern können, und zusätzlich dazu angeregt, ein Umgebungsmilieu aufzubauen, das eine effektive Immunabwehr verhindert (5). Die genauen immunsuppressiven Vorgänge in der Tumorumgebung werden bislang allerdings nur unzureichend verstanden. Daher war es ein wichtiges Ziel des von uns durchgeführten Projektes, die Tumorumgebung von Glioblastomen hinsichtlich ihrer zellulären und molekularen Zusammensetzung genauer zu charakterisieren. Besonderes Augenmerk galt hierbei Veränderungen, die im Zuge der Tumorstadium, d.h. zwischen Primärtumor und Rezidiv desselben Patienten, stattfinden.

Da für effektive Immuntherapien nicht nur Kenntnisse über mögliche Beeinträchtigungen einer Immunantwort, sondern auch über geeignete Zielstrukturen notwendig sind, haben wir uns zusätzlich mithilfe einer in unserem Labor entwickelten Methode der Identifizierung solcher Strukturen gewidmet. Im Vordergrund standen vom Tumor gebildete Proteine, die spontan und frequent durch das Immunsystem von Glioblastompatienten, nicht jedoch von dem gesunden Spender erkannt werden.

Diese Untersuchungen waren mit der Hoffnung verbunden, die Wirksamkeit zukünftiger Immuntherapien durch genauere Erkenntnisse zu verbessern, wie i) dem immunsuppressiven Einfluss der Tumorumgebung entgegen gewirkt werden kann und ii) welche immunogenen Strukturen in primären und rezidivierenden Glioblastomen nachweisbar sind und sich so therapeutisch besonders effektiv nutzen lassen.

## Ergebnisse

### Schlechtes Überleben bei Glioblastompatienten geht mit einer erhöhten Anzahl an M2-polarisierten Mikrogliazellen einher

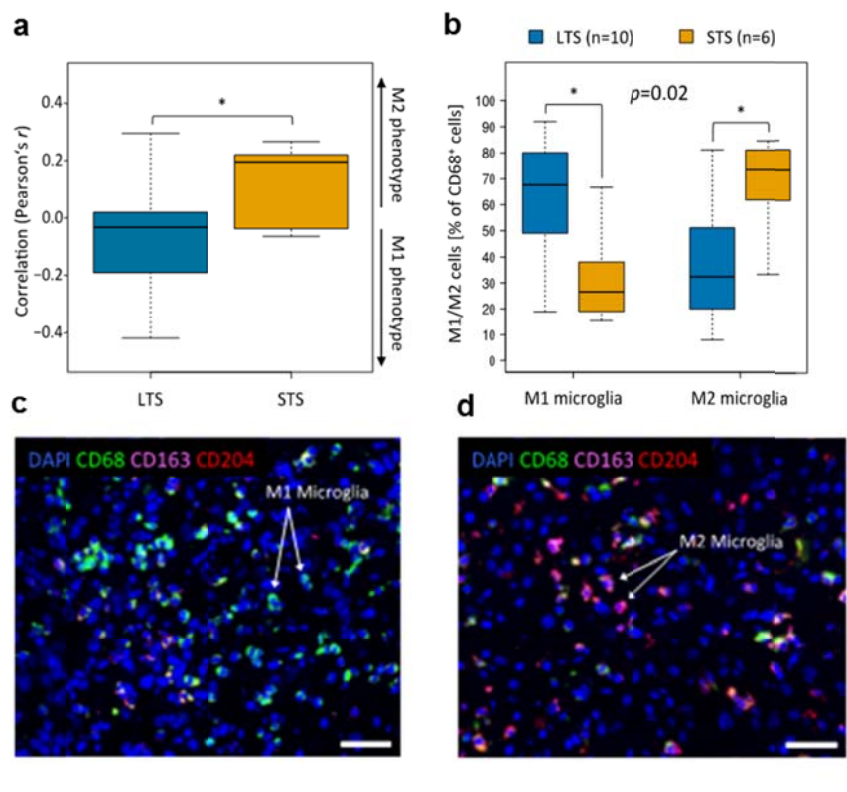
Um in einem ersten Schritt zu prüfen, ob die Prognose von Glioblastompatienten mit einer besonders günstigen bzw. ungünstigen zellulären Tumorumgebung verbunden ist, haben wir Auftreten und phänotypische Ausprägung von Mikrogliazellen in Tumorgewebe von Glioblastompatienten analysiert, die besonders kurz bzw. besonders lang überlebten.

Mikrogliazellen machen mit bis zu 30 % zahlenmäßig den größten Anteil an den im Tumor vertretenen normalen Zellen aus (6). Als antigenpräsentierende Zellen des angeborenen Immunsystems im Gehirn erfüllen Mikrogliazellen unter normalen Bedingungen verschiedene Funktionen, die durch unterschiedliche Phänotypen gekennzeichnet sind. So genannte M1-polarisierte Mikrogliazellen greifen im Falle eines entzündlichen Geschehens wie einer Virusinfektion ein oder sind an Abstoßungsreaktionen von entarteten Zellen eines Tumors beteiligt. Hingegen haben M2-polarisierte Mikrogliazellen eine immunsuppressive Funktion und schützen so beispielsweise vor Autoimmunreaktionen wie Multipler Sklerose. Unter dem Einfluss von Tumorzellen nehmen Mikrogliazellen phänotypisch jedoch zunehmend eine so genannte M2-Polarisierung an, die mit einem Verlust der beschriebenen anti-tumoralen Eigenschaften verbunden ist und vermutlich eine effektive Immunreaktion gegen den Tumor behindert (7-8).

Zunächst wurden mittels Kryostat von Tumorgewebe von kurz (short-term survivors = STS, Überleben < 10 Monate) und besonders lang (long-term survivors = LTS, Überleben > 36 Monate) überlebenden Glioblastompatienten histologische Gewebedünnschnitte angefertigt. Die Bestimmung von dem Tumoranteil, dem Anteil vitaler Zellen und die Bestätigung der ursprünglichen Diagnose wurde histopathologisch in Zusammenarbeit mit Prof. Andreas von Deimling (Neuropathologie Heidelberg) durchgeführt. Ausschlusskriterium war ein Nekroseanteil größer 20%, ein Tumoranteil unter 60% sowie das Vorliegen einer prognostisch besonders günstigen und damit unsere Analyse verfälschenden IDH-1-Mutation. Diese tritt typischerweise v.a. in niedriggradigen Gliomen und davon abstammenden sekundären Glioblastomen auf und nur in seltensten Fällen in primären Glioblastomen (9). Der Ausschluss erfolgte entweder durch Sequenzierung oder diagnostische Immunhistochemie-Färbung. Gewebe, die die entsprechenden Kriterien erfüllten, wurden

anschließend mithilfe von Mehrfachfluoreszenzfärbungen und darauffolgender quantitativer und automatisierter TissueFAXS-basierter Auswertung hinsichtlich ihrer Mikrogliazell-Infiltration analysiert. Ebenso wurde RNA für entsprechende Expressionsanalysen von denselben Geweben extrahiert.

Die mithilfe von M1- und M2-typischen Mikroglia-Gensignaturen durchgeführten mRNA-Analysen sowie die auf Proteinebene durchgeführten Multifluoreszenz-Untersuchungen lieferten uns einen eindrücklichen Hinweis hinsichtlich der Bedeutung des Verhältnisses von M1- zu M2-polarisierten Mikrogliazellen. So konnten wir sowohl auf mRNA- (Abb. 1a) wie auf Proteinebene (Abb. 1b, c, d) eine signifikant höhere ungünstige M2-Polarisierung in Tumorgeweben von STS-Patienten nachweisen, die sich zusätzlich mithilfe von unabhängigen öffentlichen Datensätzen bestätigen ließ (10). Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass eine Veränderung des Mikroglia-Phänotyps in Richtung der M1-Polarisierung das Überleben von GBM-Patienten verbessern könnte.

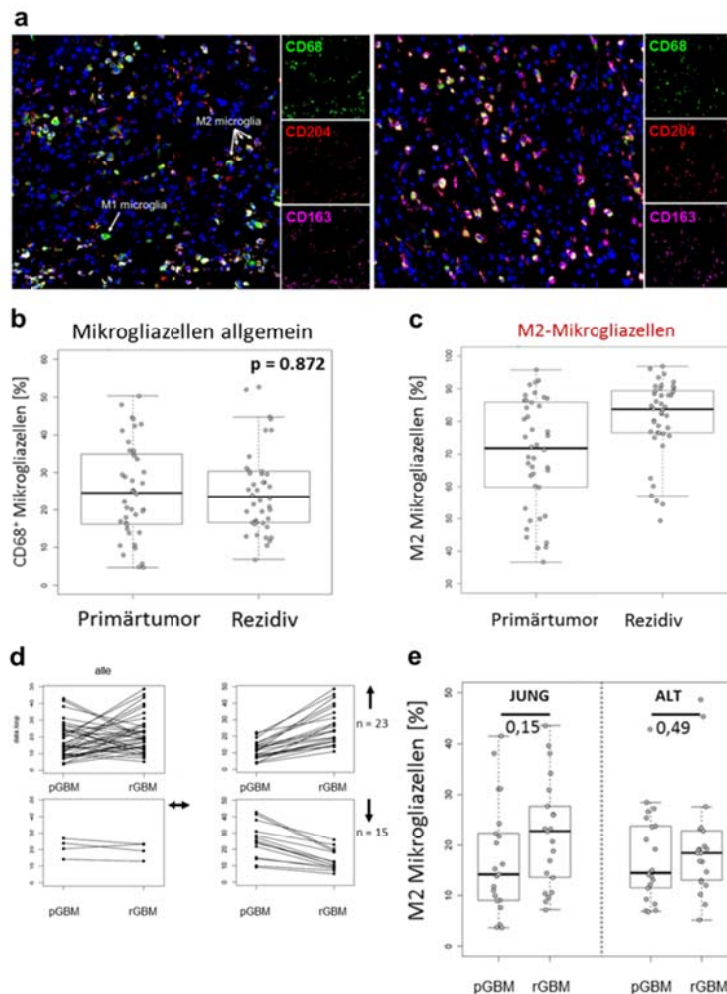


**Abb.1** Mikroglia-Infiltration und Aktivierungsstatus in kurz- (short-term survivors = STS) und langzeitüberlebenden (long-term survivors = LTS) Glioblastompatienten. **(a)** Signifikante Anreicherung von Genen einer M2-Polarisierung in STS-Patienten auf mRNA-Ebene. **(b)** Signifikant erhöhte Proteinexpression von M2-Markern in Geweben von STS und von M1 in LTS. **(c, d)** Exemplarische Mikrogliafärbung im Tumorgewebe eines LTS- **(c)** und STS-Patienten **(d)**. Aus Geisenberger et al., *Acta Neuropathologica* 2015.

### **Zunehmende ungünstige M2-Polarisierung von Mikroglia im Rezidiv von Glioblastompatienten**

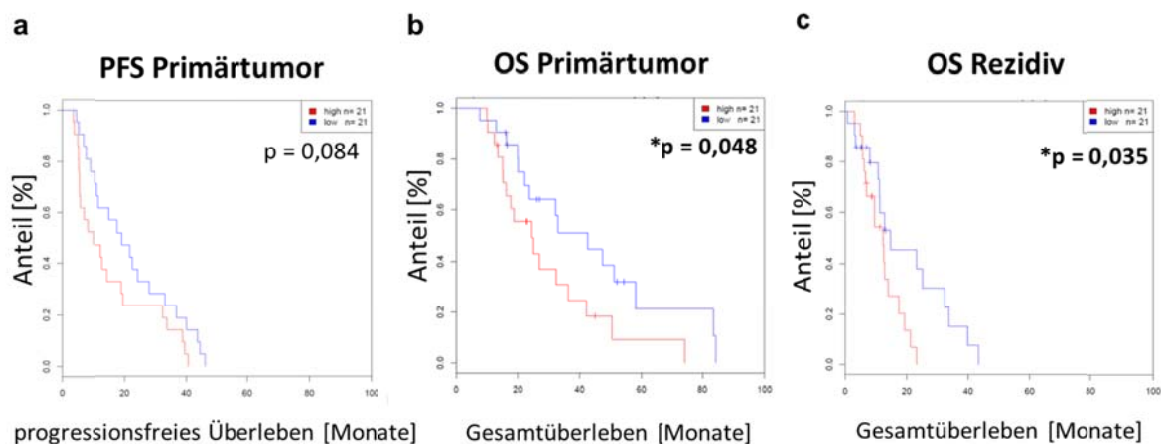
In einem nächsten Schritt sollte wieder mithilfe der TissueFAXS-Multifluoreszenz-Analyse geprüft werden, ob sich im Zuge der Tumorprogression vom Primärtumor hin zum Rezidiv weitere Veränderungen der zellulären Zusammensetzung und des Mikromilieus beobachten lassen, die einen Einfluss auf Immunantworten haben könnten. Hierzu wurden gepaarte Gewebe von primären und rezidivierenden Glioblastomen (pGBM, rGBM) von insgesamt 42 Patienten untersucht, die die zuvor beschriebenen Qualitätskriterien umfänglich erfüllten. Das ursprünglich angestrebte Kollektiv von 40 Paaren konnte somit erreicht werden.

Zunächst konnten diese Analysen die bereits aus der Literatur bekannte vergleichsweise hohe Anzahl an Mikrogliazellen innerhalb des Tumors mit einem prozentualen Anteil von im Mittel 25 % bestätigen (Abb. 2a, b). Während sich die Gesamtzahl von Mikrogliazellen zwischen Primärtumor und Rezidiv nicht zu verändern schien, konnten wir jedoch eine signifikante Zunahme an M2-polarisierten Mikrogliazellen von im Durchschnitt 73 % zu 84 % bezogen auf die gesamte Mikrogliapopulation im Rezidiv nachweisen (Abb. 2c). Anhand der Klassifizierung der Tumoren in abfallende, gleichbleibende und ansteigende Infiltration der M2-polarisierten Mikrogliazellen zeigte sich, dass sich die Mikroglia-polarisierung in der Mehrheit der Patienten in Richtung M2 verändert (Abb. 2d). Da das Patientenalter beim Glioblastom ein wichtiger prognostischer Faktor ist (11), wurde weiterhin der Frage nachgegangen, ob die beobachtete zunehmende M2-Polarisierung auf eine bestimmte Altersgruppe zurückgeführt werden kann. Dafür wurde das Patientenkollektiv Median-basiert in eine jüngere und ältere Patientengruppe eingeteilt. Es zeigte sich, dass der Anstieg der immunsupprimierenden M2-Mikrogliazellen in beiden Patientengruppen beobachtet werden konnte (Abb. 2e). Tendenziell war dieser Effekt jedoch in jüngeren Patienten ausgeprägter.



**Abb. 2** Während sich die Gesamtzahl an Mikrogliazellen in primären und rezidierten Glioblastomen nicht verändert (**a** und **b**), nimmt die Anzahl der M2-polarisierten Mikrogliazellen im Rezidiv zu (**c**). In über der Hälfte der Patienten ist eine Zunahme zu verzeichnen (**d**), wobei diese besonders auf die ältere Patientengruppe zurückzuführen ist (**e**). (**a**) Repräsentative Mehrfachfärbung, (**b**, **c**, **e**) kumulative Daten von 42 Patienten im Primärtumor und Rezidiv, (**c**) M2-Polarisierung, (**d**) detaillierte Veränderungen der M2-Polarisierung, (**e**) Veränderungen der M2-Polarisierung nach einer medianen Auftrennung des Patientenkollektivs in eine jüngere und ältere Patientengruppe.

Die basierend auf den zuvor erhobenen Daten durchgeführten Überlebensanalysen konnten den von uns bereits für kurz und langzeitüberlebende Glioblastompatienten publizierten Zusammenhang von erhöhter M2-Mikroglia-infiltration und schlechterem Gesamtüberleben im primären Glioblastom bestätigen. Auch für das progressionsfreie Intervall konnte ein entsprechender Überlebens-trend beobachtet werden. Darüber hinaus konnten wir mit Hilfe dieses wertvollen Kollektivs gepaarter Proben auch für die M2-Infiltration im Rezidiv erstmals den gleichen Überlebenszusammenhang herstellen (Abb. 3).



**Abb. 3** M2-polarisierte Mikrogliazellen und Überleben. (a) Während eine hohe Anzahl an M2-polarisierten Mikrogliazellen nur tendenziell einen Einfluss auf das progressionsfreie Intervall zeigte, war (b) eine hohe Anzahl sowohl im Primärtumor als auch (c) in der Rezidivsituation mit einem schlechteren Gesamtüberleben verbunden. Die Auftrennung der Gruppen erfolgte Median-basiert. OS = Overall survival (Überleben); PFS = progression-free survival (progressionsfreies Intervall).

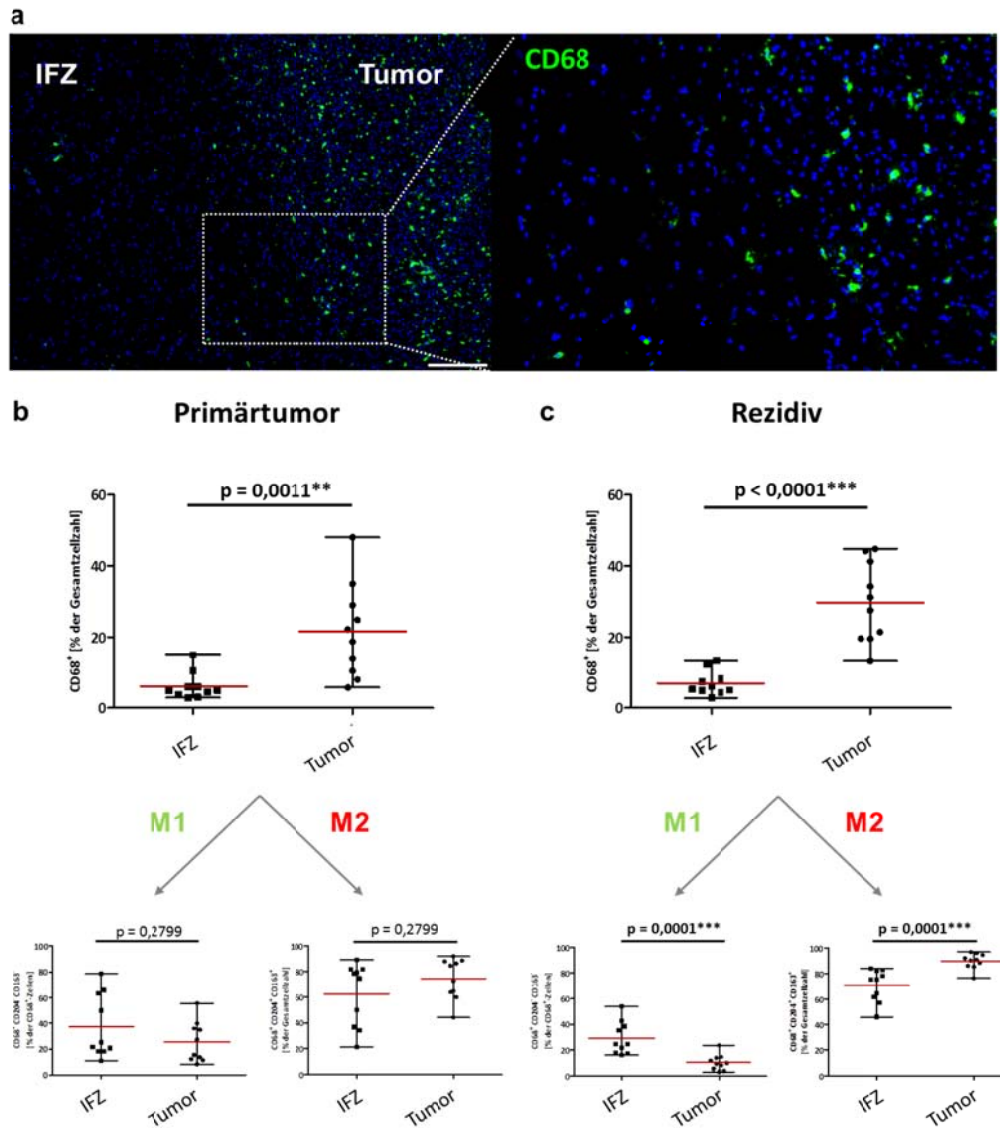
### **Rezidivglioblastome zeigen eine besonders ausgeprägte quantitative und qualitative Zunahme M2-polarisierter Mikroglia im Tumorzentrum**

Eine weitere Bestätigung des ungünstigen Einflusses von Tumorzellen auf die Polarisierung von Mikrogliazellen und der Anreicherung M2-polarisierter Microglia im Tumorbett erhielten wir durch den direkten Vergleich von im Tumorzentrum und angrenzender Infiltrationszone lokalisierten Mikrogliazellen. Diese Analyse wurde in jeweils 10 primären und 10 rezidierten Glioblastomen und den daran angrenzenden Infiltrationszonen durchgeführt. Das in Abbildung 4a gezeigte Fluoreszenzbild belegt sehr eindrücklich, in welcher hohen Anzahl Mikrogliazellen in den Tumor einwandern. Während in der Infiltrationszone nur sehr vereinzelt Mikrogliazellen nachweisbar sind, steigt die Mikrogliazell-Anzahl im Tumor signifikant an (Abb. 4b, c). Diese Zunahme scheint im Rezidivtumor noch stärker ausgeprägt zu sein als in primären Glioblastomen. Ebenfalls konnten wir zeigen, dass insbesondere im Rezidiv die Zahl der M1-polarisierten Mikrogliazellen im Tumor signifikant abnimmt bei gleichzeitig signifikanter Zunahme von M2-polarisierten Mikrogliazellen.

Insgesamt legt der direkte Vergleich von Tumorzentrum und angrenzender Invasionszone nahe, dass der Einfluss des Tumors nicht nur zu einer massiven Einwanderung von Mikrogliazellen in das Tumorbett führt, sondern dass dies darüber hinaus eine ausgeprägte Umpolarisierung der Mikrogliazellen in Richtung eines tumorimmunologisch ungünstigen M2-Phänotyps bewirkt.



Wiederum ist dieser Effekt am stärksten in der Rezidivsituation und untermauert somit sehr eindrücklich die zuvor beschriebenen Beobachtungen.

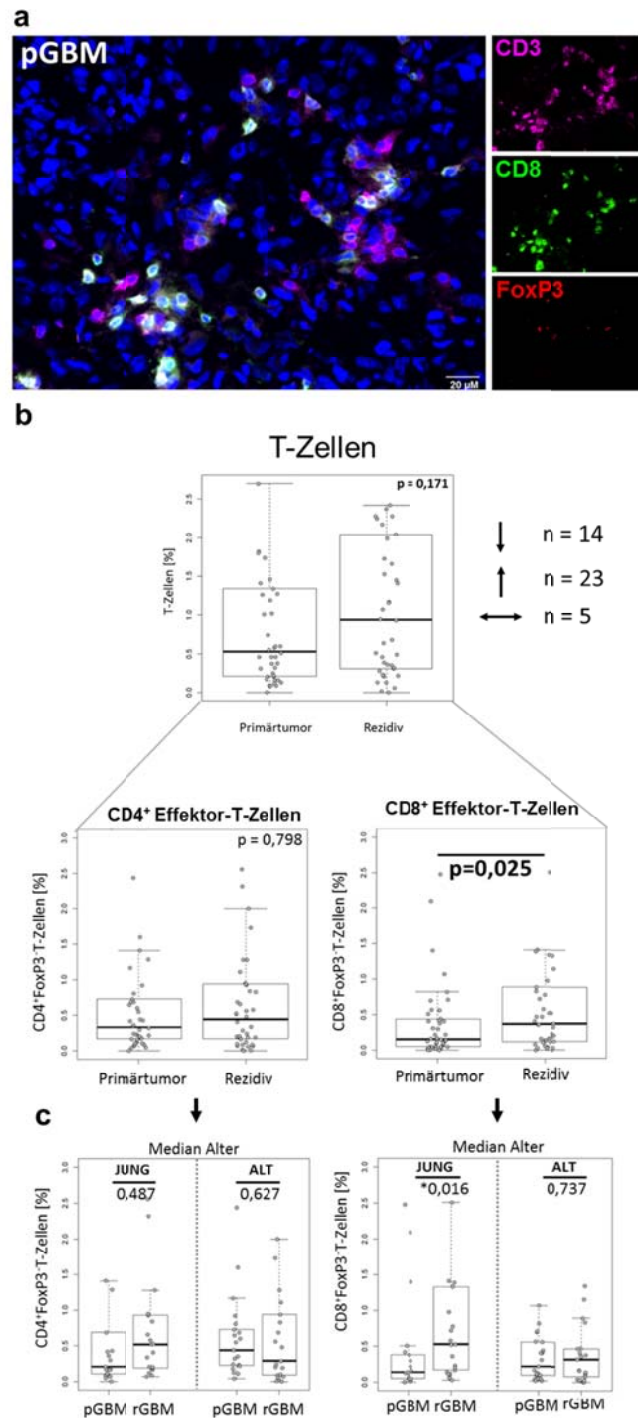


**Abb. 4** Die Anzahl an Mikrogliazellen nimmt im Tumorzentrum vergleichend zur angrenzenden Infiltrationszone signifikant zu. Der starke Anstieg von M2-polarisierten Mikrogliazellen im Tumor verdeutlicht den Einfluss der Tumorzellen auf Mikrogliazellen. (a) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung, (b, c) Anteil von Mikrogliazellen in der Infiltrationszone vergleichend zum Tumorzentrum. Analysiert wurden je zehn primäre und rezidierte Glioblastom-Gewebeschnitte. Im unteren Teil der jeweiligen Abbildung wurde zusätzlich die M1- und M2-Polarisierung der Mikrogliazellen analysiert. IFZ = Infiltrationszone.

**Inbesondere im Glioblastomgewebe jüngerer Patienten nimmt die Anzahl an zytotoxischen Effektor-T-Zellen in der Rezidivsituation signifikant zu**

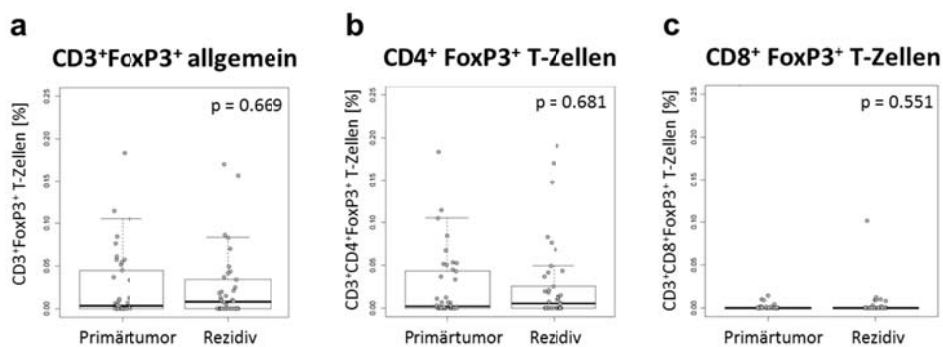
Die Aktivierung von Mikrogliazellen erfolgt durch die Aufnahme von Antigenen aus ihrer Umgebung. Die daraufhin freigesetzten zahlreichen Cytokine und Chemokine greifen die Tumorzellen jedoch nicht direkt an, sondern locken vielmehr weitere Immunzellen an, aktivieren diese und lösen somit eine komplexe Immunantwort aus. T-Zellen benötigen auch noch nach der Einwanderung in den Tumor die Präsentation von Antigenen z.B. auf der Oberfläche von Mikrogliazellen, um vollständig aktiviert zu werden. Aufgrund dieses Zusammenspiels und der Bedeutung von T-Zellen im Rahmen einer effektiven Immunantwort, wurde im nächsten Schritt die Infiltration von T-Zellen in denselben primären und den jeweils korrespondierenden rezidierten Glioblastomen untersucht (Abb. 5).

Interessanterweise zeigte mehr als die Hälfte der untersuchten gepaarten Glioblastomproben dabei eine Zunahme an intratumoralen T-Zellen (Marker CD3) in der Rezidivsituation im Vergleich zum Primärtumor. Weiter wurden infiltrierende T-Zellen nach ihrem Subtyp unterschieden (CD4 und CD8). Während dabei die Einwanderung von CD4+ Effektor-T-Helferzellen keine Veränderung während der Tumorprogression hin zum Rezidiv zeigte, konnte eine signifikante Zunahme von CD8+ zytotoxischen Effektor-T-Zellen beobachtet werden (Abb. 5b). Im nächsten Schritt wurde dieser Anstieg detailliert hinsichtlich seiner Altersabhängigkeit charakterisiert. Dafür wurde das bestehende Patientenkollektiv Median-basiert in eine jüngere und eine ältere Patientengruppe aufgeteilt. Diese Analyse ergab, dass dieser Anstieg vor allem in der jüngeren Patientengruppe zu beobachten war (Abb. 5c).



**Abb. 5** Während sich die Anzahl von infiltrierten T-Zellen im Allgemeinen zwischen primären und rezidivierenden Glioblastomen nicht verändert, konnte eine signifikante Zunahme an zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Rezidiv nachgewiesen werden (**b**). Diese Zunahme war besonders in der jüngeren Patientengruppe zu verzeichnen (**c**). (**a**) repräsentative Mehrfachfärbung, (**b**) kumulative Daten von 42 Patienten im Primärtumor und Rezidiv, oben in Bezug auf CD3 und unten weiter aufgetrennt in die Subpopulationen CD4 und CD8. (**c**) Infiltration von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen nach Auftrennung des Patientenkollektivs in eine jüngere und ältere Patientengruppe entlang des Medians.

Aufgrund des zu erwartenden immunsuppressiven Tumormilieus im Glioblastom wurde zusätzlich die gleichzeitige Infiltration von regulatorischen T-Zellen in denselben Gewebeproben anhand des Markers FoxP3 untersucht. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen an einem Kollektiv von ausschließlich primären Glioblastomen (12) lag der Anteil FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen unter 0,2 % aller eingewanderten T-Zellen (Abb. 6a). Bei einer weiteren Auftrennung in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen zeigte sich, dass die regulatorischen T-Zellen wie häufig in der Literatur beschrieben (13) fast ausschließlich dem CD4<sup>+</sup> T-Zellsubtyp angehören (Abb. 6b, c). Ebenso wurden keine nennenswerten Unterschiede zwischen pGBM und rGBM beobachtet.

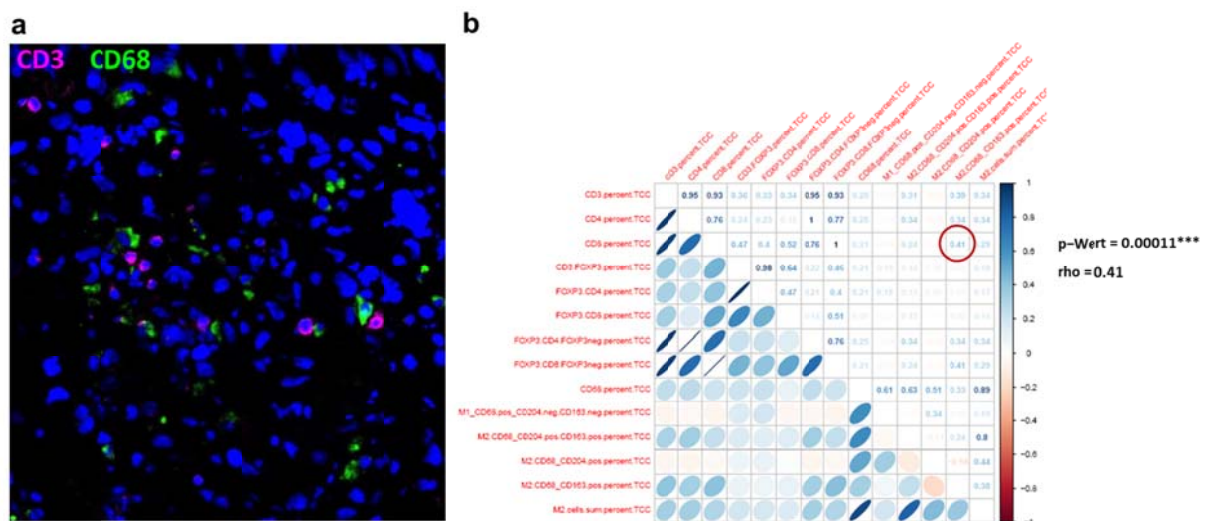


**Abb. 6** Infiltration FoxP3<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen in primäre und rezidivierende Glioblastome (n = 42 Patienten) (a). Dabei wurde zudem zwischen CD4<sup>+</sup> (b) und CD8<sup>+</sup> (c) regulatorischen T-Zellen unterschieden.

### Korrelation von M2-polarisierten Mikrogliazellen und CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen deutet auf eine beeinträchtigte Funktionalität von zytotoxischen T-Zellen

Für die paradoxe Zunahme an zytotoxischen T-Zellen im Glioblastomrezidiv bei gleichzeitiger Zunahme an immunsuppressiv wirkenden M2 Mikrogliazellen sind folgende Erklärungsansätze denkbar: Es gibt zunehmende Evidenz, dass Strahlentherapie, wie sie Glioblastompatienten typischerweise nach der Entfernung des Primärtumors erhalten, zu einer verstärkten Einwanderung von zytotoxischen T-Zellen führt (14). Es kann jedoch vermutet werden, dass diese aufgrund des immunsuppressiven Einflusses und der ungünstigen Überlebensassoziation von M2-polarisierter Mikrogliazellen in ihrer Funktionalität erheblich beeinträchtigt sind und so nicht in der Lage sind, ihre zytotoxische Wirkung zu entfalten. Deshalb war es von besonderem Interesse, einen möglichen Zusammenhang zwischen Mikrogliazellen und infiltrierenden T-Zellen anhand von Korrelationsanalysen weiter zu prüfen. Dabei zeigte sich, dass das Auftreten von CD163<sup>+</sup> M2-polarisierten Mikrogliazellen in der Tat signifikant mit einer erhöhten Anzahl an intratumoralen

CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen verbunden ist (Abb. 7). Insbesondere die erhobenen Daten hinsichtlich einer ungünstigen Überlebensassoziation legen deshalb nahe, dass v.a. im Rezidiv CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen ihre zytotoxische Immunreaktion aufgrund immunsupprimierender M2-Mikrogliazellen nicht ausüben können und vorzeitig ausgeschaltet werden. Diese Hypothese wollen wir in zukünftigen Analysen überprüfen unter Hinzunahme von zusätzlichen Erschöpfungsmarkern wie CTLA-4 und PD-1 in Kombination mit den bekannten T-Zellmarkern.

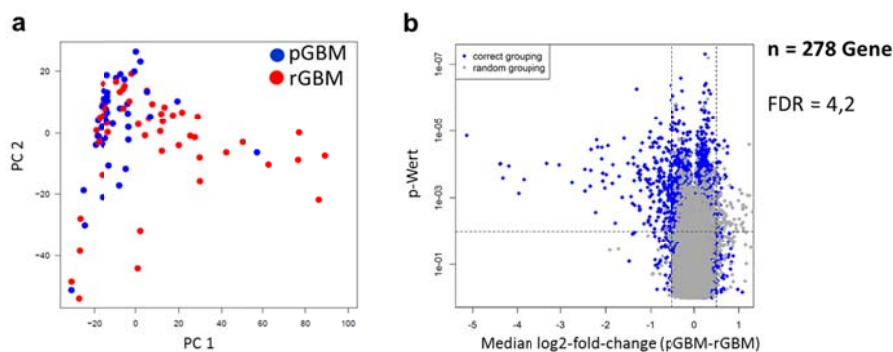


**Abb. 7** CD163<sup>+</sup> M2-polarisierte Mikrogliazellen korrelieren mit der Infiltration von CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen (p-Wert = 0.00011\*\*\*, rho = 0.41). (a) repräsentative Mehrfachfärbung, (b) Korrelationsanalysen der Immunzellinfiltrationsdaten.

### Primärtumore und Rezidive zeigen erhebliche Unterschiede in ihren Genexpressionsprofilen

Um mehr über die zugrunde liegenden Mechanismen zu lernen, die mit einer erhöhten oder erniedrigten Einwanderung verschiedener Immunzellen und deren Funktionalität einhergehen, wurden von allen verfügbaren primären und rezidierten Glioblastomproben Microarray-Analysen durchgeführt. Darüber hinaus dienten diese Analysen als wichtiger Datensatz, um das Expressionsniveau der in den nachfolgenden Analysen identifizierten immunogenen Strukturen mit der ermittelten Immunogenität vergleichen zu können. Vor der hierzu notwendigen RNA-Extraktion wurde die eingangs bereits beschriebene Qualitätssicherung durchgeführt. Die gleichzeitige Nukleinsäuren- und Proteinextraktion erfolgte mithilfe des im Labor etablierten AllPrep-Kits. Für die Microarray-Untersuchungen wurde ein Illumina HumanHT-12 v4 Expressions BeadChip Kit verwendet

und durch die Core Facility Genomics und Proteomics am DKFZ in Heidelberg analysiert. Auch hierbei konnte das angestrebte Kollektiv von 40 Paaren erreicht werden. Die Analysen ermöglichten die Untersuchung der Expression von mehr als 20.000 Genen und entsprechenden Signalwegen (Abb. 8). Dabei konnten wir erhebliche patientenunabhängige Unterschiede zwischen primären und rezidierten Glioblastomen feststellen (Abb. 8a). Interessanterweise beobachteten wir größere Ähnlichkeiten innerhalb der Gruppe der primären Glioblastome als zwischen Primärtumor und rezidiertem Glioblastom desselben Patienten. Dies resultierte in der differentiellen Expression von 278 Genen, die Primärtumore von Rezidiven trennten (Abb. 8b). Interessanterweise waren unter diesen 16 Gene mit dem Auftreten von Immunantworten assoziiert. Weiterführende Analysen dieser Gene sollen nun klären, inwieweit diese einen Einfluss auf anti-Tumor-Immunantworten haben und ob sie eine Vorhersage erlauben, welcher Patient im Primärtumor oder im Rezidiv von einer Immuntherapie profitieren könnte.

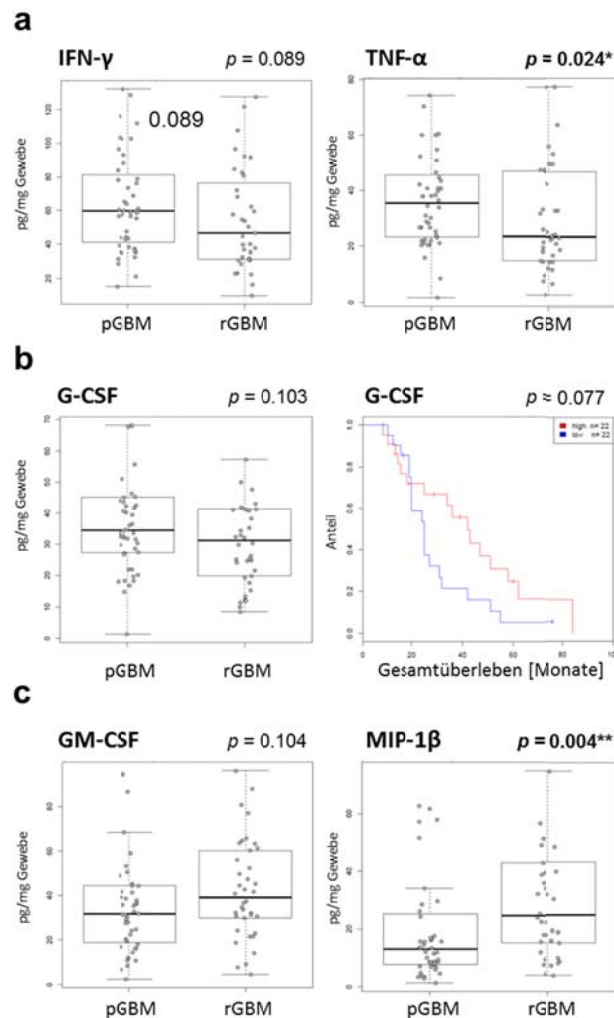


**Abb. 8** Ähnlichkeitsanalyse des Transkriptoms von primären und rezidierten Glioblastomen (a) und Volcano Plot Analyse zur Identifizierung von differenziell exprimierten Genen (b). FDR = false discovery rate.

### **Abnahme von Immunmodulatoren im Glioblastomrezidiv**

Wie bereits zuvor erwähnt spielen Cytokine und Chemokine eine bedeutende Rolle in der anti-tumoralen Immunabwehr. Um die beobachteten Veränderungen hinsichtlich der Infiltration von Immunzellen besser zu verstehen und um zusätzlich gezielte Informationen über Veränderungen von immunrelevanten Chemokinen bzw. Cytokinen in Tumorlysaten von pGBM und rGBM auf Proteinebene zu erhalten, wurden in Zusammenarbeit mit unserem Kooperationspartner Prof. Philipp Beckhove (Translationale Immunologie, DKFZ) quantitative Luminex-Analysen durchgeführt. Diese Analysen erlauben die simultane Quantifizierung von 27 immunrelevanten Chemokinen und

Cytokinen auf Proteinebene. Insgesamt konnten 38 Primärtumor-Rezidiv-Paare sowie 14 Einzelgewebe untersucht werden.



**Abb. 9** Cytokinanalysen von primären und korrespondierenden Rezidiv-Glioblastomgeweben. (a) Deutliche Abnahme der Expression von positiven Immunmodulatoren wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und G-CSF im Rezidivgewebe. (b) Niedrige Expression des Cytokins G-CSF ist mit schlechterem Überleben verbunden. (b) Sekretion von GM-CSF und des Chemokins MIP-1 $\beta$  steigt im Rezidiv an.

Dabei konnte gezeigt werden, dass immunstimulierende Cytokine wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in Rezidivgeweben deutlich schwächer sekretiert werden (Abb. 9a). Diese Cytokine werden von Immunzellen wie T-Zellen und Makrophagen nach Aktivierung ausgeschüttet und haben einen bedeutenden Einfluss auf eine effektiv ablaufende anti-tumorale Immunreaktion. Dies bestätigt die Annahme, dass wichtige Immunmodulatoren in Rezidivgeweben schwächer exprimiert werden und

sich daher der Tumor in der Rezidivsituation noch besser gegen Immunantworten schützen kann. Bei der Analyse des Cytokins G-CSF, welches eine wichtige Rolle in Entzündungen bezüglich spielt, konnten wir zeigen, dass die Sekretion tendenziell im Rezidiv ebenfalls abnimmt und dass eine niedrigere Expression mit einem Trend zu einem schlechteren Überleben assoziiert ist (Abb. 9b).

Ein umgekehrtes Bild zeigte sich bei der Betrachtung immunsupprimierender Faktoren: im Rezidiv war tendenziell eine Zunahme im Falle des Cytokins GM-CSF sowie eine signifikante Zunahme des Chemokins MIP-1 $\beta$ , welches u.a. von Mikrogliazellen sekretiert wird (15), zu beobachten (Abb. 9c).

Die mittels Luminex-Analyse beobachteten Veränderungen in der Bildung wichtiger Immunmodulatoren sind ein weiteres wichtiges Indiz, dass im Zuge der Glioblastomprogression hin zum Rezidiv eine Verschlechterung des immunologischen Milieus eintritt, die sich ungünstig auf anti-Tumor-Immunantworten auswirken könnte.

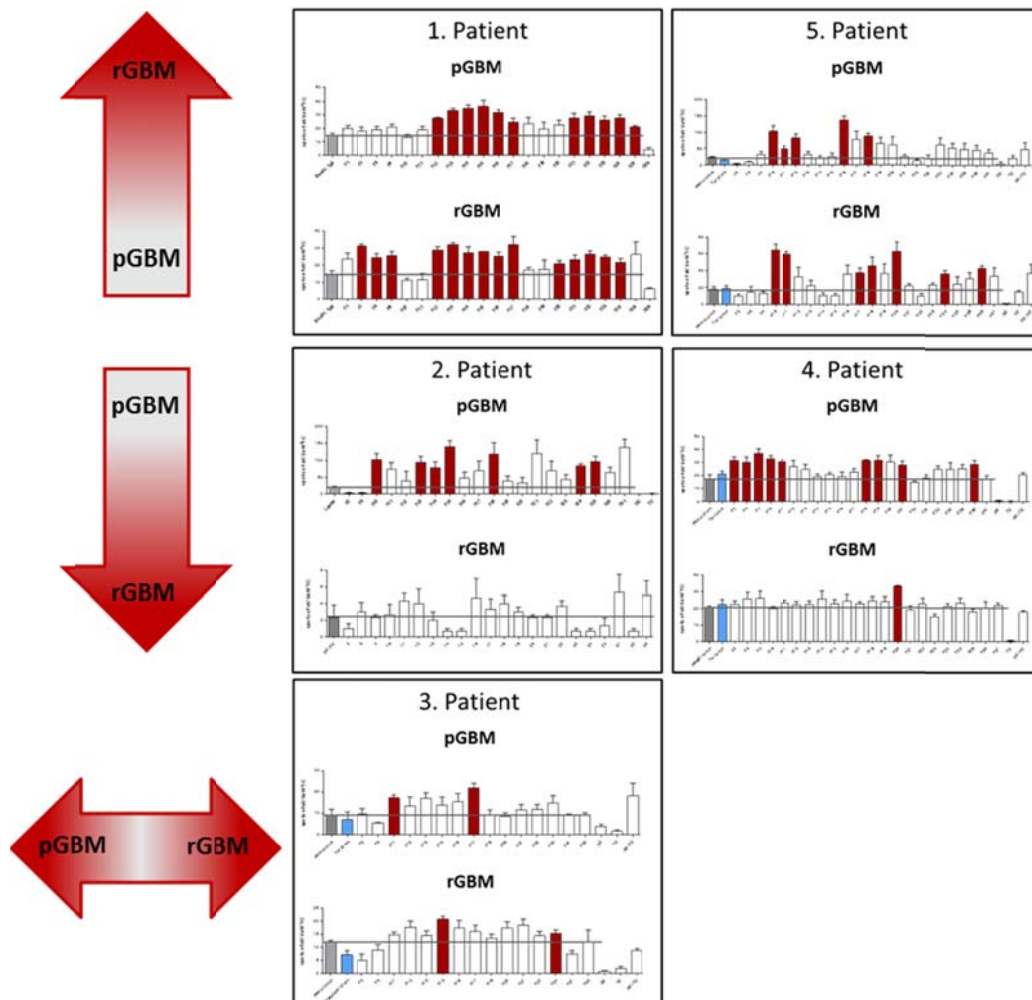
### **Identifizierung immunogener Zielstrukturen in primären und rezidierten Glioblastomen**

Neben einem besseren Verständnis der immunologisch relevanten Tumorumgebung bestand ein weiteres Ziel des durchgeführten Projektes darin, immunogene Antigene im pGBM und rGBM zu identifizieren und zugleich Veränderungen der Antigenexpression während der Tumorprogression aufzuzeigen. Dafür wurden die Gewebelysate von fünf Patienten (jeweils pGBM und rGBM) mittels einer in unserem Labor entwickelten Technologie analysiert (16). Dabei werden die in einem Tumor enthaltenen Proteine mithilfe des Protein Fractionation System 2D (PF2D) aufgetrennt und mittels T-Zell-Aktivierungsanalyse (ELISpot) auf T-Zell-Antworten gegen die so aufgetrennten Proteine untersucht. Diese Methodik ermöglicht eine HLA-Typ-unabhängige Identifizierung von potentiell immunogenen Antigenen. Die Immunogenität der fraktionierten Tumorproteine wurde dabei nach jeder Dimension mittels autologer T-Zell-spezifischer Immunantwort im IFN- $\gamma$  ELISpot Assay analysiert und anschließend mittels massenspektrometrischer Protein-Fingerprint Analyse in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Schnölzer identifiziert (Core Facility Genomics und Proteomics, DKFZ Heidelberg). Zur Vorhersage natürlich präsentierter Antigene wurde mittels SYFPEITHI- ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)) und Immune Epitope Datenbank-Algorithmus ([www.iedb.org](http://www.iedb.org)) die TAP-Prozessierung und die HLA-Epitopdichte untersucht. Kandidatenproteine wurden durch lange synthetische Peptide mittels ELISpot Assay validiert (hergestellt durch die Core Facility Translational Immunology, DKFZ Heidelberg).

Die Analyse von Primärtumor und Rezidiv von insgesamt fünf Patienten zeigte bereits in der 1. Dimension z.T. erhebliche Unterschiede hinsichtlich des Nachweises immunogener Fraktionen (Abb.



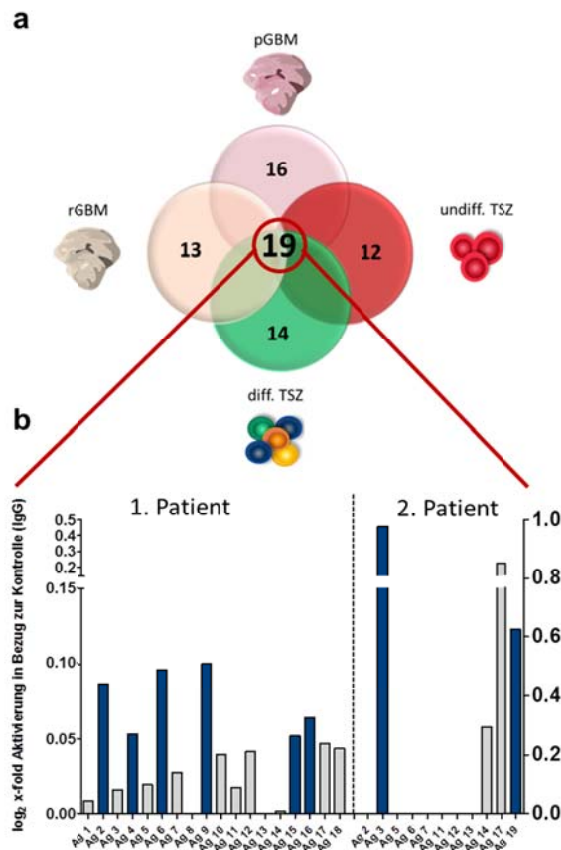
10). Während die Anzahl an immunogenen Fraktionen z.B. im Falle von Patient 1 und 5 zunahm, kam es bei Patient 2 und 4 zu einem ausgeprägten Verlust an immunogenen Fraktionen. Im Falle von Patient 5 blieb zwar die Anzahl an immunogenen Fraktionen im Rezidiv gleich, aber es kam zu einer Verschiebung, was die Vermutung nahelegt, dass nicht dieselben Proteine in der jeweiligen Tumorsituation erkannt wurden.



**Abb. 10** Dargestellt sind die IFN- $\gamma$  ELISpot Assay Ergebnisse von fünf Patienten. Jeweils oben sind die Ergebnisse der 1. Fraktionen dargestellt, jeweils unten dagegen die Ergebnisse der 2. Dimension. Rote Säulen entsprechen Fraktionen, die immunogene Strukturen enthalten. Deutlich wird, dass in manchen Patienten (Patient 2+4) die Immunantwort im Rezidiv schwächer wird, wohingegen andere Patienten eine stärkere Immunantwort entwickeln (Patient 1+5).

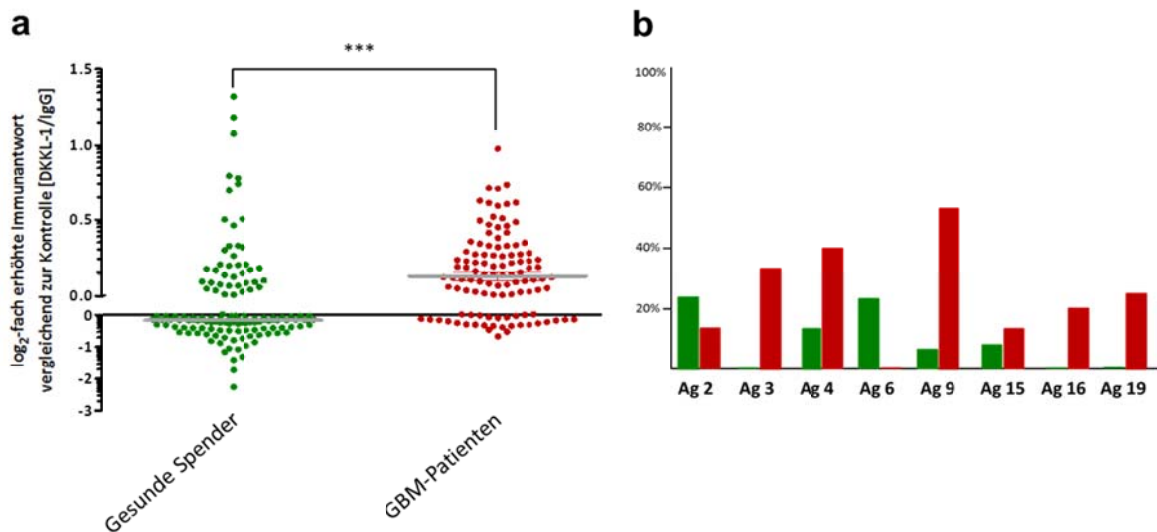
Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es im Zuge der fortschreitenden Glioblastomerkrankung nicht nur zu Veränderungen in der Genexpression, sondern auch zu Veränderungen in der Expression immunogener Zielstrukturen kommt. Letzteres legt nahe, dies im Rahmen einer immuntherapeutischen Behandlung insofern zu berücksichtigen, als dass beispielsweise geprüft werden muss inwieweit in der Rezidivsituation verwendete Impfantigene auch in relevanter Menge vom Rezidivtumor exprimiert werden.

Zur Identifizierung der Zielstrukturen der in Abb. 10 identifizierten immunogenen Fraktionen (rote Säulen) wurden diese weiter fraktioniert (2. Dimension), erneut hinsichtlich signifikanter Immunantworten getestet und daraufhin mittels Massenspektrometrie analysiert. Insgesamt wurden mehr als 1500 Proteine identifiziert, die letztlich potentielle Kandidaten für neue immunogene Zielstrukturen darstellen. Um aussichtsreiche Kandidaten besser eingrenzen zu können, wurde zunächst ein Abgleich mit Datenbanken wie ‚The Human Protein Atlas‘, ‚The Cancer Genome Atlas‘, ‚Uniprot‘ und ‚Genecards‘ und eine gleichzeitige intensive Literaturrecherche durchgeführt, die in der Auswahl von 45 besonders vielversprechenden Proteinen resultierte. Analog wurden gleichzeitig Lysate von Tumorstammzellen und differenzierten Tumorstammzellen derselben Patienten analysiert, um die Heterogenität in Glioblastomgeweben noch besser abbilden zu können. Diese Daten wurden genutzt, um überlappende Proteine zu identifizieren, die sowohl auf Tumorstammzellen und differenzierten Tumorzellen als auch in primären und rezidierten GBM exprimiert werden. 19 der vorerst 45 ausgewählten Proteine konnten in allen Proben nachgewiesen werden (Abb 11). Um die Immunogenität der ausgewählten Antigene zu überprüfen, wurden zunächst die Glioblastompatienten, in denen die Antigene ursprünglich identifiziert worden waren, auf Immunantworten gegen die entsprechenden Peptide getestet. Dabei zeigten die Ursprungspatienten gegen acht Antigene eine signifikante Immunantwort, deren Eignung als Impfantigen daraufhin weiter validiert wurde (Abb. 11).



**Abb. 11** 19 der Antigene, die in Gewebelysaten von primären und rezidierenden Glioblastomgeweben identifiziert wurden, konnten in allen untersuchten Patientenproben nachgewiesen werden (oben). Im Ursprungspatienten zeigten acht dieser Antigene im IFN- $\gamma$  ELISpot Assay eine signifikante Immunantwort (unten, dunkelblau dargestellt).

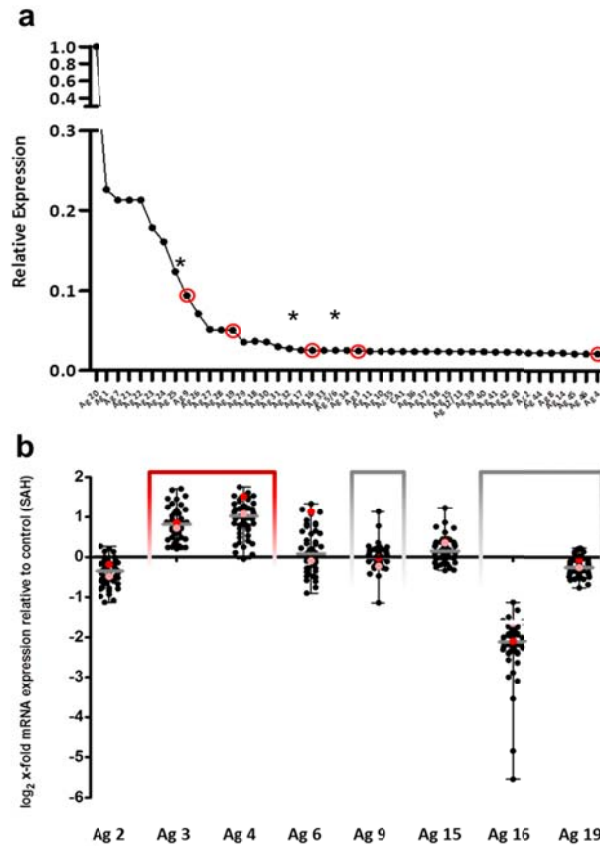
Um unspezifische Immunantworten ausschließen zu können, wurde die Immunogenität der Peptide mit T-Zellen von gesunden Spendern (n = 16) getestet. Ebenfalls erfolgte eine Analyse mit Blut von Glioblastompatienten, um sicherzustellen, dass es sich bei den ausgewählten Antigenen nicht um patientenspezifische Immunantworten handelt (n = 15). Dabei zeigten Glioblastompatienten im Allgemeinen eine deutlich höhere Immunantwort gegen die identifizierten Antigene als die getesteten gesunden Spender (Abb. 12). Drei der acht Antigene erzeugten keinerlei Immunantwort in gesunden Spendern, jedoch eine hohe Immunantwort in 20-33 % der untersuchten Glioblastompatienten (Antigen 3, 16, 19). Zwei weitere Antigene (Antigen 4 und 9) zeigten zwar eine schwache Immunantwort in gesunden Spendern (6-13 %), aber eine starke Immunantwort in nahezu der Hälfte aller Glioblastompatienten (40-53 %).



**Abb. 12** Validierung der Immunogenität ausgewählter Antigene in gesunden Spendern (grün) und Glioblastompatienten (rot). Links ist die Gesamtheit der Immunantworten gegen alle Antigene aufgetragen. Auf der rechten Seite ist der Anteil an gesunden Spendern und Glioblastompatienten aufgeführt, die eine signifikante Immunantwort gegen die identifizierten Antigene gezeigt hatten.

Weiter wurde die Expressionsstärke der Antigene auf RNA-Ebene charakterisiert. Dafür wurden die zuvor beschriebenen Microarraydatensätze von 40 primären und korrespondierenden Rezidiv-Glioblastomen genutzt und die relative Expression aller 45 ausgewählten Antigene miteinander verglichen (Abb. 13a). Die fünf interessantesten Antigene, die besonders hohe Immunantworten in Glioblastompatienten hervorgerufen hatten, waren dabei sehr unterschiedlich stark exprimiert (markiert mit einem roten Kreis). Dies zeigt, dass mittels der angewandten Methode ebenfalls schwächer exprimierte Antigene nachgewiesen werden können, die dennoch eine hohe Immunogenität aufweisen. Während drei der Antigene in Rezidivgeweben geringer exprimiert waren als in Primärtumoren (markiert mit Sternchen), waren zwei Antigene auf RNA-Ebene ebenfalls im Rezidiv stark exprimiert.

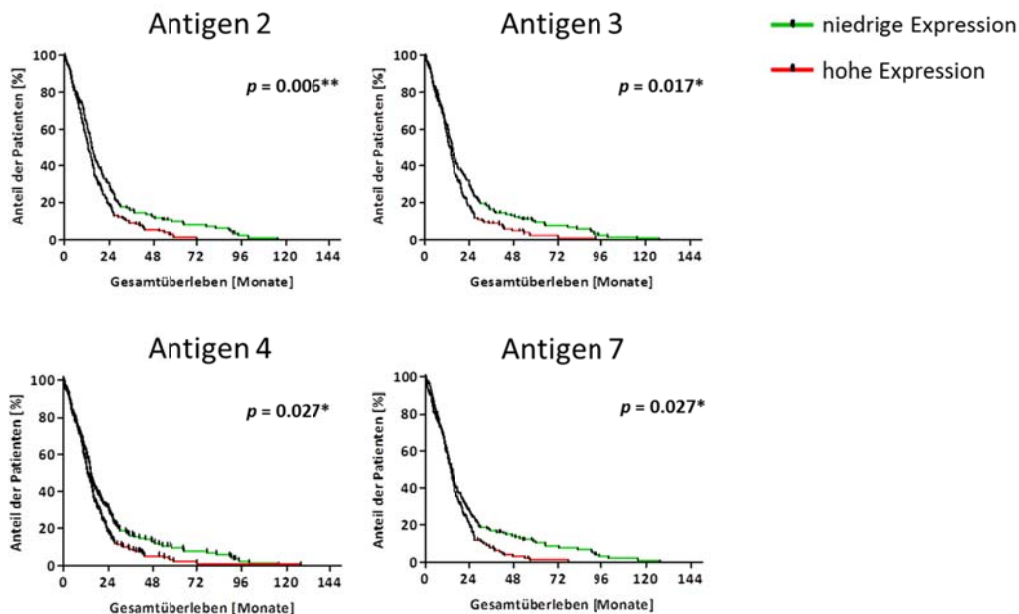
Zur weiteren Absicherung wurde das RNA-Expressionslevel mittels qPCR an 56 weiteren primären Glioblastomen untersucht, wobei die Expressionsstärke in Bezug zu einer Normalhirnkontrolle analysiert wurde (Abb. 13b). Zwei der vielversprechenden Antigene waren dabei in Glioblastomgeweben stärker exprimiert als in gesundem Hirngewebe (rotes Kästchen).



**Abb. 13** RNA-Expressionslevel der ausgewählten Antigene. **(a)** Relative Expressionsstärke der 45 ausgewählten Antigene in Bezug zueinander. Dafür wurden Microarraydaten von 40 korrespondierenden primären und rezidivierenden Glioblastomen genutzt. Rot umkreist sind diejenigen Antigene, die hohe Immunantworten in Glioblastompatienten hervorgerufen hatten. Mit einem Sternchen markiert sind Antigene, die in Rezidiv-Glioblastomen signifikant schwächer exprimiert waren als in den Primärtumoren. **(b)** Überprüfung der RNA-Expressionsstärke mittels qPCR. Die Expressionsstärke ist in Relation zur Expression in Normalhirngewebe gezeigt. Mit einem Kasten versehen sind wiederum die fünf interessantesten Antigene basierend auf Immunogenitätsanalysen mittels IFN- $\gamma$  ELISpot Assay (rot: stärker exprimiert im GBM-Gewebe, grau: kein Unterschied oder niedrigere Expression im GBM-Gewebe).

Anhand der öffentlichen Datenbank TCGA (The Cancer Genome Atlas), die Expressionsdaten von mehr als 400 Glioblastompatienten zur Verfügung stellt, wurde nun untersucht, inwiefern die Expression der identifizierten Antigene einen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten ausübt (Abb. 14). Bei vier der acht weiter charakterisierten Antigene konnte ein Bezug zum Überleben aufgezeigt werden. Dabei war eine hohe Expression bei allen Antigenen mit einem schlechteren Überleben verbunden (Antigen 2, 3, 4). Diese Daten bestätigen die Bedeutung der identifizierten Antigene für die Aggressivität von Glioblastomen. Besonders vielversprechend zeigten sich die

Antigene 3 und 4, die zuvor bereits eine hohe Immunogenität gezeigt hatten und sich demnach nach weiterer Validierung und Charakterisierung für zukünftige Immuntherapien eignen könnten.

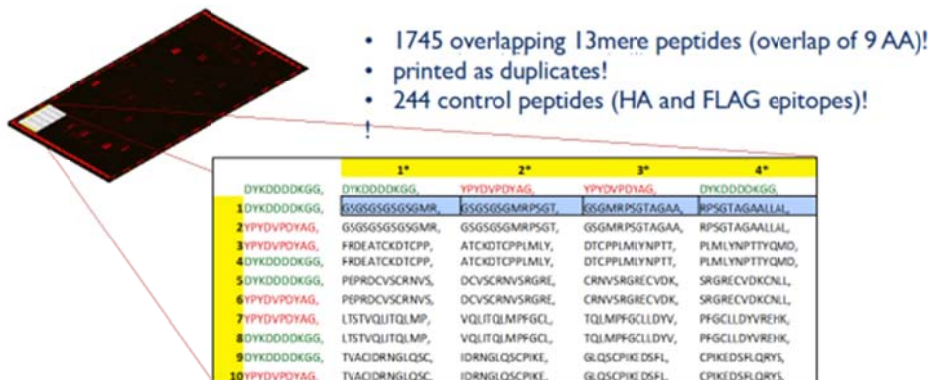


**Abb. 14** Überlebensanalysen der identifizierten Antigene. Genutzt wurden dafür TCGA-Datensätze, die die RNA-Expressionsdaten von 419 Glioblastompatienten beinhalten. In grün dargestellt sind Glioblastompatienten mit einer niedrigen Expression des Antigens, wobei eine hohe Expression in rot dargestellt wurde.

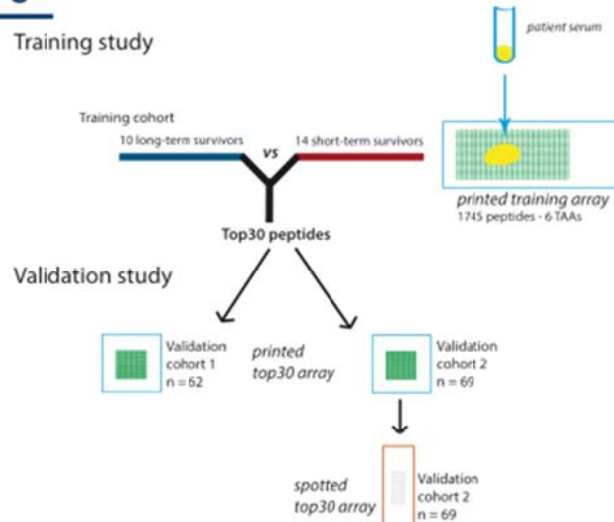
### Einsatz und Optimierung von Peptidarrays als Monitoringwerkzeug für künftige Immuntherapiestudien

Im letzten Teil unseres Projektes haben wir uns mit der Optimierung von Verlaufskontrollen von Immunantworten gegen Tumorantigene zu Monitoringzwecken künftiger Immuntherapiestudien beschäftigt. Als experimentelle Plattform wurden maßgeschneiderte Peptidarrays verwendet, deren Aussagekraft zunächst mittels Antigenen überprüft wurde, deren Immunogenität im Glioblastom bereits aus der Literatur bekannt war. Es handelte sich um EGFR, FABP5, Tenascin-C, MAGEA3, GLEA2 und PFH3, die mit einem Versatz von 9 Aminosäuren als 13mere auf Glasobjektträger gedruckt wurden (17). Immunantworten wurden in 3 verschiedenen Patientenkollektiven analysiert (Abb. 15).

## EGFR, FABP5, TNC, MAGEA3, GLEA2, PFH3



## Studiendesign



**Abb. 15** Maßgeschneiderte Peptidarrays und Studiendesign zur Prüfung von Antikörperantworten im Serum von Glioblastompatienten gegen die aufgebracht Peptide.

Gegen 30 Peptide konnten signifikante Immunantworten im Serum von Glioblastompatienten nachgewiesen werden (Abb. 16). Diese zeigten in mindestens einem Studienkollektiv eine hoch signifikante Überlebensabhängigkeit (Abb. 17 oben). Die Überlebensabhängigkeit von Immunantworten gegen ein Tenascin-C gerichtetes Peptid konnte in allen Patientenkollektiven bestätigt werden (Abb. 17 unten) und soll nun in weiterführenden Studien hinsichtlich seiner Eignung als neuer Biomarker für einen besseren klinischen Verlauf beim Glioblastom getestet werden.

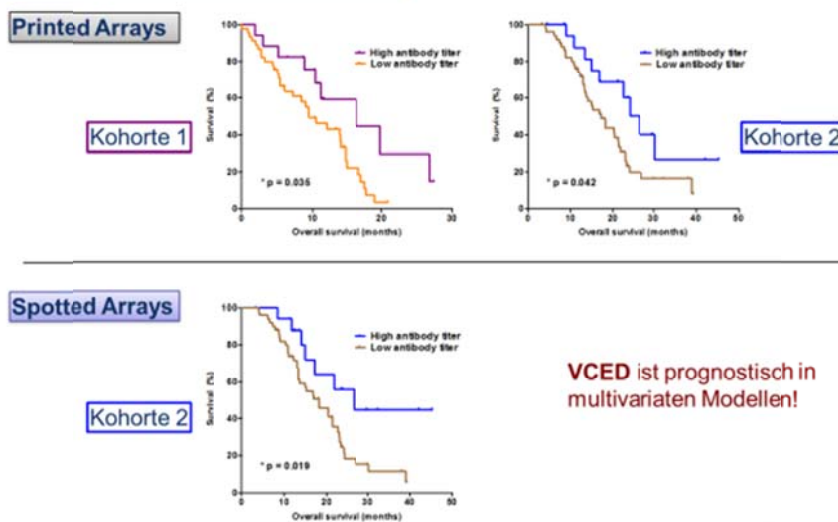
**Table 15 | Top30 differential peptides between LTS and STS patients**

Peptides are assigned to their corresponding antigen and ordered according to their p-value. A positive log2 Fold-Change (log2 FC) and difference in signal intensity (intensity diff) equals a higher titer in LTS patients.

peptide	antigen	p-value	intensity diff	log2 FC
VCEDGFTGPDCAE	TNC	0.000633244	1570.269	0.8745
KLICSEKGVSEK	GLEA2	0.00065385	-611.7965	-0.578
KETVKLSHEDDHI	PHF3	0.001009832	692.643	0.5615
VSGNTVEYALTDL	TNC	0.001521112	1303.234	0.7635
QAHSVLLKTLQDQ	PHF3	0.003270692	566.2445	0.4935
TGFLLIQAWPENR	EGFR	0.003687734	-713.4405	-0.6515
KKLFGTSGQTKI	EGFR	0.004568125	-1066.191	-0.9985
KVVDCLKFFRKAK	GLEA2	0.004801176	-1280.414	-0.8375
EGKYSFGATCVKK	EGFR	0.00611762	-1535.3945	-1.0485
KLSHEDDHILEDA	PHF3	0.006157174	1806.9675	0.8915
KDKEKNKEKKFKE	GLEA2	0.006621059	-1308.243	-0.9535

**Abb. 16** Top30 differenziell erkannte Peptide.

### Tenascin C Peptid - VCED



**Abb. 17** Überlebensanalysen von Antikörperantworten gegen ein Tenascin-C spezifisches Peptid unter Verwendung verschiedener technologischer Plattformen und Patientenkollektiven.

Insgesamt zeigt dieser erfolgreiche Proof of Principle die Anwendungsfähigkeit von Peptidarrays zur Überprüfung von Immunantworten gegen definierte Antigene, wie sie im Rahmen von Peptidvakzinen verwendet werden, und legt die Prüfung ihres Einsatzes in Rahmen von Immuntherapiestudien nahe. Sie bieten den Vorteil, dass nur geringe Mengen an Blutserum benötigt werden und ermöglichen so problemlos wiederholte Kontrollen.



## Literatur

1. Jhanwar-Uniyal M, Labagnara M, Friedman M, Kwasnicki A, Murali R. Glioblastoma: molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. *Cancers (Basel)*. 7(2), 538-55 (2015).
2. Jackson M, Hassiotou F, Nowak A. Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis*. 36(2), 177-85 (2015).
3. Pellegatta S, Cuppini L, Finocchiaro G. Brain cancer immunoediting: novel examples provided by immunotherapy of malignant gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther* 11, 1759-74 (2011).
4. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359, 492-507 (2008).
5. Kees T, Lohr J., Noack J., Mora R., Gdynia G., Tödt G., Ernst A., Radlwimmer B., Falk C.S., **Herold-Mende C.**, Regnier-Vigouroux, A. Mikroglia isolated from patients with glioma gain antitumor activities on poly (I:C) stimulation. *Neuro Oncol* 14, 64-78 (2012).
6. B. Badie and J. M. Scharfner. Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. *Neurosurgery* 46, pp. 957–962 (2000).
7. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol* 216(1), 15-24 (2008).
8. Wei J, Gabrusiewicz K, Heimberger A. The controversial role of microglia in malignant gliomas. *Clin Dev Immunol* , 2013:285246 (2013).
9. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, **Herold-Mende C**, Unterberg A, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol* 118(4), 469-74 (2009).
10. Geisenberger C, Mock A, Warta R, Rapp C, Schwager C, Korshunov A, Nied AK, Capper D, Brors B, Jungk C, Jones D, Collins VP, Ichimura K, Bäcklund LM, Schnabel E, Mittelbron M, Lahrmann B, Zheng S, Verhaak RG, Grabe N, Pfister SM, Hartmann C, von Deimling A, Debus J, Unterberg A, Abdollahi A, **Herold-Mende C**. Molecular profiling of long-term survivors identifies a subgroup of glioblastoma characterized by chromosome 19/20 co-gain. *Acta Neuropathol* 130, 419-34 (2015).
11. Iwamoto FM1, Reiner AS, Panageas KS, Elkin EB, Abrey LE. Patterns of care in elderly glioblastoma patients. *Ann Neurol* 64(6), 628-34 (2008).
12. Lohr J, Huppertz A., Ge Y., Dictus C., Ahmadi R., Grau S., Hiraoka N., Eckstein V., Ecker R.C., Korff T., von Deimling A., Unterberg A., Beckhove P., **Herold-Mende C**. Effector T-cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumor-derived TGF-beta. *Clin Cancer Res* 17, 4296-4308 (2011).
13. El Andaloussi A1, Lesniak MS. An increase in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol* 8(3), 234-43 (2006).
14. Klug F, Prakash H, Huber PE, Seibel T, Bender N, Halama N, Pfirschke C, Voss RH, Timke C, Umansky L, Klapproth K, Schäkel K, Garbi N, Jäger D, Weitz J, Schmitz-Winnenthal H, Hämmerling GJ, Beckhove P. Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS<sup>+</sup>/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. *Cancer Cell*, 24(5):589-602 (2013).
15. McManus CM1, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine induction of MIP-1 alpha and MIP-1 beta in human fetal microglia. *J Immunol*. 160(3), 1449-55 (1998)
16. Beckhove P, Warta R, Lemke B, Stoycheva D, Momburg F, Schnölzer M, Warnken U, Schmitz-Winnenthal H, Ahmadi R, Dyckhoff G, Bucur M, Jünger S, Schoeler T, Lennerz V, Woelfel T, Unterberg A, **Herold-Mende C** Rapid T cell-based identification of human tumor tissue

- antigens by automated two-dimensional protein fractionation. *J Clin Invest* 120, 2230-2242 (2010).
17. Mock A, Warta R, Geisenberger C, Bischoff R, Schulte A, Lamszus K, Stadler V, Felgenhauer T, Schichor C, Schwartz C, Matschke J, Jungk C, Ahmadi R, Sahm F, Capper D, Glass R, Tonn JC, Westphal M, von Deimling A, Unterberg A, Bermejo JL, **Herold-Mende C**. Printed peptide arrays identify prognostic TNC serumantibodies in glioblastoma patients. *Oncotarget* 30(13579-90) (2015).