



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Identifizierung und Charakterisierung antigenspezifischer T-Zell-
Antworten gegen Glioblastome**

Autor: Kevin Hai-Ning Lu
Institut / Klinik: Neurologische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. M. Platten

Glioblastome (GBM) sind die häufigsten primären Hirntumore. Trotz maximaler Therapie mit Operation und Radiochemotherapie kommt es meist zu Rezidiven, so dass GBM-Patienten nur ein geringes Gesamtüberleben von unter 16 Monaten im Median zeigen. Die Immuntherapie, insbesondere Immuncheckpoint-Inhibitoren und zelluläre Therapien, haben in der Krebstherapie große Erfolge gezeigt. Auch in Glioblastomen werden aktuell zahlreiche klinische Studien dazu durchgeführt.

Vielversprechend sind neue Ansätze zur personalisierten, zellulären Therapie von Glioblastom-Patienten. Essenziell ist dafür eine Plattform zur effizienten Antigen-Identifikation und Zell-Modifikation. Im ersten Teil der Dissertation wurden Methoden zur *in vitro* Testung von humanen Leukozytenantigenen (HLA)-abhängigen Immunantworten untersucht, um grundlegende Bausteine für eine solche Plattform zu etablieren. Als antigenpräsentierende Zellen (APZ) wurden Dendritische Zellen (DZ) evaluiert, indem die Prozessierung und Antigenpräsentation mittels Transfektion von RNA-kodierten Antigenen untersucht wurde. Nach Prozessierung zeigte sich ein hoher Anteil an lebenden Zellen mit Expression von MHCII und CD80 als Zeichen einer effizienten Antigenpräsentation, die Transfektion der DZ mit Antigen-RNA zeigte jedoch nur eine geringe Effizienz. Alternativ wurde ein *in vitro* Ko-Kultur-Modell etabliert, bestehend aus antigenpräsentierenden Zellen (APZ), die patientenspezifisch mit HLA-Allelen ausgestattet werden können, sowie modifizierbaren Effektorzellen zur Testung der Antigenreaktivität von T-Zell-Rezeptoren (TZR). Dafür wurden HLA-Sequenzen aus Genmaterial von HLA-typisierten Spendern kloniert und eine Vektorenbank mit verschiedenen HLA-Allelen etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass K562-Zellen als APZ mit personalisierten HLA-Rezeptoren transduziert werden und erfolgreich HLA-konforme Antigene präsentieren können. Diese konnten wiederum von TZR-transduzierten Jurkat76-Zellen spezifisch erkannt werden. Daneben wurde auch die Transfektion von primären T-Zellen mit transgenen TZR etabliert. Die Spezifität der TZR-transfuzierten T-Zellen konnte mittels Tetramer-Färbung in der Durchflusszytometrie gezeigt werden.

Im Vergleich zu personalisierten Therapieansätzen mit genetisch modifizierten Zellen kann die Therapie mit expandierten, autologen Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) zeitaufwändige und technologisch anspruchsvolle Methoden, insbesondere die Antigen-Identifikation und Zell-Modifikation umgehen. In klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die zelluläre Therapie mit autologen TIL durchführbar und sicher ist. Im zweiten Teil der Dissertation wurde die Verwendung von autologen TIL für die zelluläre Therapie von Glioblastom-Patienten exploriert, indem die Spezifität und die Dynamik des TZR-Repertoires in TIL-Kulturen untersucht wurde. Dafür wurden TIL-Kulturen von GBM-Patienten für zwei Wochen *in vitro* expandiert und das TZR-Repertoire mittels TZR-Sequenzierungen (-Seq) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* TIL-Expansion zu einem starken Anstieg in der Klonalität des TZR-Repertoires führt. Gleichzeitig gibt es nur wenig Überschneidung zwischen den dominierenden TZR-Klonotypen vor und nach Expansion, was auf starke Unterschiede in den Expansionskapazitäten der einzelnen TZR-Klonotypen hindeutet.

GBM besitzen wenig Neoepitope, die zudem häufig patientenspezifisch und subklonal sind. Im Rahmen dieser Dissertation wurden daher die im GBM häufig überexprimierten, unmutierten Tumor-assoziierten Antigene (TAA) als Zielantigene untersucht. Mittels Microarray und RNA-Seq wurden vergleichende Expressionsanalysen der GBM-Proben sowie gesunder Gehirn-RNA durchgeführt, um überexprimierte TAA individuell für die Patienten zu identifizieren. Alle Studienpatienten wurden zudem HLA-typisiert. Epitope wurden auf Basis von experimentell, validierter Immunogenität und *in silico* prädizierter Wahrscheinlichkeit für intrazelluläre Prozessierung sowie HLA-Präsentation ausgewählt. 68 Epitope wurden als Peptide in Ko-Kultur mit autologen, expandierten TIL-Kulturen untersucht. Dabei zeigte sich lediglich eine spontane Immunantwort in einer TIL-Kultur gegen *RPS4Y1*. Im letzten Schritt wurde die

Relevanz von transkriptionellen Signaturen zum Zeitpunkt der Tumorresektion auf die TIL-Expansion untersucht. Kombinierte Einzelzell (sc)-TZR/RNA-Seq und TZRb-Seq vor und nach Expansion wurden durchgeführt. Die Expansionskapazität der einzelnen T-Zell-Klonotypen wurde mittels Vergleich der relativen Häufigkeit *ex vivo* und nach Expansion bestimmt. Für expandierte TIL-Subpopulationen konnte eine Gensignatur identifiziert werden. Diese Gensignatur beinhaltet *Granzyme A*, *Granzyme H*, *Chemokine ligand 5*, *Natural killer cell granule protein 7* und *Granulysin* und war in allen drei Studien-Patienten stark hochreguliert. Die Gen-Ontologie-Analyse der Gensignatur zeigte eine aktivierte, proinflammatorische Gensignatur und eine Assoziation mit Antigenverarbeitung und -präsentation sowie Zellaktivierung und Zytolyse.

Zusammenfassend wurden in dieser Dissertation wichtige Grundsteine für die personalisierte Immuntherapie gelegt, indem Methoden zur Antigen-Identifikation und Zell-Modifikation etabliert wurden. Weiterführend wurde die Dynamik und Spezifität von *in vitro* TIL-Kulturen als möglicher Therapieansatz für autologe Zelltherapien untersucht. Die Ergebnisse dieser Dissertation bieten somit wichtige Ansatzpunkte für die weitere Entwicklung der zellulären Immuntherapie in Glioblastom-Patienten.