

Universitätsklinikum Tübingen
Abteilung Neurologie mit interdisziplinärem Schwerpunkt
Neuroonkologie

**Immunhistochemische Charakterisierung Tumor-
infiltrierender Zellen in neu diagnostizierten und
progredienten Glioblastome – Matched-pairs Analyse**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Korinetska, Nataliya**

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. Dr. G. Tabatabai

2. Berichterstatter: Professorin Dr. A. E. Staebler

Tag der Disputation: 29.04.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Glioblastoma	1
1.1.1 Epidemiologie	2
1.1.2 Ätiologie	3
1.1.3 Histologie und Pathogenese	4
1.1.4 Klinische Präsentation	6
1.1.5 Diagnostik	7
1.1.6 Therapie	8
1.1.7 Behandlungsoptionen progredienter GBMs	9
1.2 Tumorimmunantwort	13
1.2.1 Grundlagen der Immunologie	13
1.2.2 Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs)	14
1.2.3 Leukozyten-Dysregulation in der Tumormikroumgebung	18
1.2.4 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs)	20
1.3 Immuntherapeutische Strategien	24
1.3.1 Modulation Tumor-assoziiierter Makrophagen (TAMs).....	24
1.3.2 Inhibition der CTLA-4 / PD-1 vermittelten Immunflucht.....	26
1.3.3 Tumor-spezifische- (TSA) und Tumor-assoziierte (TAA) Antigene.....	28
1.3.4 Passive Immuntherapie	29
1.3.5 Aktive Immuntherapie – Krebsimpfstoffe	34
1.4 Zielsetzung	38
2 Material und Methodik	40
2.1 Patientenkollektiv	40
2.1.1 Gewebeproben	40

2.1.2	Charakteristika des Gesamtkollektivs – Alter, Geschlecht, Therapieform, Zeit bis zur Progression des GBMs	41
2.2	Materialien	43
2.3	Immunhistochemische Färbung	45
2.3.1	Gewebeaufarbeitung	45
2.3.2	Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung.....	45
2.3.3	Herstellung der Tissue Microarrays (TMA)	46
2.3.4	Immunhistochemische Färbung.....	47
2.4	Auswertung der Gewebeproben	48
2.5	Statistische Auswertung	55
3	Ergebnisse	57
3.1	Immunphänotypisierung von Matched-pairs GBM-Tumorproben in den Behandlungsgruppen.....	57
3.1.1	CD3 (TIL-Marker).....	57
3.1.2	CD8 (TIL-Marker).....	59
3.1.3	CD4 (TIL-Marker).....	61
3.1.4	CD163 (TAM-Marker)	64
3.1.5	MSR1 (TAM-Marker)	67
3.1.6	PD-1 (Immuncheckpoint).....	69
3.1.7	PD-L1 (Immuncheckpoint-Ligand)	71
3.1.8	CTLA-4 (Immuncheckpoint).....	73
3.1.9	Zusammenfassung der Matched-pairs Analyse.....	75
3.2	Potenzielle Korrelationen der Parameter der Immunphänotypisierung in den Matched-pairs GBM-Tumorproben.....	76
3.3	Potenzieller Einfluss der Expressionsscores zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und deren Änderung bis zur Progression auf das PFS ...	78
3.3.1	Potenzieller Einfluss von CD3 auf das PFS	78
3.3.2	Potenzieller Einfluss von CD4 auf das PFS	81
3.3.3	Potenzieller Einfluss von CD8 auf das PFS	83
3.3.4	Potenzieller Einfluss von PD-1 auf das PFS	86
3.3.5	Potenzieller Einfluss von PD-L1 auf das PFS	88
3.3.6	Potenzieller Einfluss von CTLA-4 auf das PFS.....	91

3.3.7	Potenzieller Einfluss von CD163 auf das PFS	92
3.3.8	Potenzieller Einfluss von MSR1 auf das PFS	94
3.3.9	Zusammenfassung der Einflussfaktoren auf das PFS	97
4	Diskussion.....	98
4.1	Studiendesign und Patientenkollektiv.....	98
4.2	Heterogenität der Matched-pairs Tumorproben	98
4.3	Vergleichende Analyse der Zielprotein-Expression in den Matched-pairs GBM-Tumorproben	101
4.3.1	Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs)	102
4.3.2	Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs)	103
4.3.3	Immuncheckpoints (ICs) PD-1/PD-L1 und CTLA-4.....	104
4.3.4	Zusammenfassung der Datenlage zur Marker-Expression in GBM-Tumoren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und der Progression	106
4.4	Korrelationen zwischen den TIL-, TAM- und IC-Markern	107
4.5	Prognostische Faktoren für das PFS	110
4.6	Limitationen der vorliegenden retrospektiven Matched-pairs Analyse	117
4.7	Schlussfolgerung und Ausblick	117
5	Zusammenfassung	119
6	Literaturverzeichnis.....	121
7	Erklärung zum Eigenanteil.....	147
8	Liste der Veröffentlichungen	147

Abkürzungsverzeichnis

Ab	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APVAC	aktive personalisierte Impfung
Arg1	Arginase 1
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CCL	Chemokin-Ligand
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CED	Convection-enhanced delivery
CI	Konfidenzintervall
CSF-1	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
CT	Chemotherapie
CTL	zytotoxische T-Zelle (engl. cytotoxic T-lymphocyte)
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DC(s)	Dendritische Zelle(n)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EGFRvIII	EGFR Variante III
FDA	Food and Drug Administration
FDG	Fluor-2-Desoxy-D-Glucose
FLT	3'-Desoxy-3'-Fluor-L-Thymidin (FLT)
FoxP3	Forkhead Box Protein 3
GBM(s)	Glioblastom(e)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

HLA	human lymphocyte antigen
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
IC	Immuncheckpoint
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
MET	Methyl-L-Methionin
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
MMP	Matrix-Metalloprotease
mAb	monoklonaler Antikörper
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
MSR1	Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OS	Gesamtüberleben
NO	Stickstoffmonoxid
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1/2	Programmed cell death protein ligand 1/2
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PFS	progressionsfreie Überleben

PGE	Prostaglandin E
R	Rezeptor
r_s	Spearman-Korrelationskoeffizient
RT	Radiotherapie, Strahlentherapie
SRS	Stereotaktische Radiochirurgie
STAT	Signal-transducer and activator of transcription
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAM / TAMs	Tumor-assoziierte(r) Makrophage(n)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	Transforming growth factor beta
Th	T-Helfer-Zelle
TIL / TILs	Tumor-infiltrierende(r) Lymphozyt(en)
TMA	Tissue-Microarray
TMZ	Temozolomid
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TP53	Tumorsuppressorprotein 53
Treg(s)	regulatorische T-Zelle(n)
TSA	Tumor-spezifisches Antigen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: T-Zellproliferation und -aktivierung bei Kontakt mit Gliomzellen (oben rechts) und Mechanismen der Gliomzell-Immunresistenz (unten links) .	16
Abbildung 2: Altersverteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Glioblastom-(GBM)-Erstdiagnose.....	41
Abbildung 3: Auftreten des Glioblastoms (GBM) nach Alter (Jahre) und Geschlecht	42
Abbildung 4: Progressionsfreies Überleben (PFS) in Monaten nach Geschlecht	42
Abbildung 5: Immunhistochemische Analyse der Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Expression	51
Abbildung 6: Immunhistochemische Analyse der Cluster-of-differentiation-(CD)-4 Expression.....	51
Abbildung 7: Immunhistochemische Analyse der Cluster-of-differentiation-(CD)-8 Expression.....	52
Abbildung 8: Immunhistochemische Analyse der Cluster-of-differentiation-(CD)-163 Expression.....	52
Abbildung 9: Immunhistochemische Analyse der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1 (MSR1/CD204) Expression.....	53
Abbildung 10: Immunhistochemische Analyse der Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Expression.....	54
Abbildung 11: Immunhistochemische Analyse der Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Expression	54
Abbildung 12: Immunhistochemischer Score der Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts).....	58
Abbildung 13: Immunhistochemischer Score der Cluster-of-differentiation-(CD)-8-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts).....	60
Abbildung 14: Immunhistochemischer Score der Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts).....	63

Abbildung 15: Immunhistochemischer Score der Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts).....	66
Abbildung 16: Immunhistochemischer Score der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor-1-(MSR1)-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts)	68
Abbildung 17: Immunhistochemischer Score der Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts).....	70
Abbildung 18: Immunhistochemischer Score der Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts).....	72
Abbildung 19: Immunhistochemischer Score der Cytotoxic-T-lymphocyte-associated-protein-4-(CTLA-4)-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts).....	74
Abbildung 20: Heatmap der Spearman-Korrelationskoeffizienten (r_s) der untersuchten Variablen	77
Abbildung 21: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	79
Abbildung 22: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression.....	80
Abbildung 23: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	

Expression > 16 %. Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten.	82
Abbildung 24: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of- differentiation-(CD)-4-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression.....	83
Abbildung 25: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation- (CD)-8-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	84
Abbildung 26: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of- differentiation-(CD)-8-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression.....	85
Abbildung 27: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Programmed-cell-death- protein-1-(PD-1)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	86
Abbildung 28: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Änderung der Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression	88
Abbildung 29: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Programmed-cell-death- protein-ligand-1-(PD-L1)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	89
Abbildung 30: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Änderung der Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression	90
Abbildung 31: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Cytotoxic-T-lymphocyte-	

associated-protein-4-(CTLA-4)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	91
Abbildung 32: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ...	93
Abbildung 33: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression.....	94
Abbildung 34: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1-(MSR1)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	95
Abbildung 35: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Änderung der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1-(MSR1)-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper für die Immunhistochemie	44
Tabelle 2: Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radiotherapie- vs. Stupp-Therapie-Gruppe.....	57
Tabelle 3: Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radiotherapie- vs. Stupp-Therapie-Gruppe.....	58
Tabelle 4: Veränderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose	59
Tabelle 5: Cluster-of-differentiation-(CD)-8-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe.....	59
Tabelle 6: Cluster-of-differentiation-(CD)-8-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe.....	60
Tabelle 7: Veränderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-8-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose	61
Tabelle 8: Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe.....	62
Tabelle 9: Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe.....	62
Tabelle 10: Veränderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose	64
Tabelle 11: Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe.....	64
Tabelle 12: Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe.....	65
Tabelle 13: Veränderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose	66

Tabelle 14: Makrophagen-Scavenger-Rezeptor-1-(MSR1)-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe	67
Tabelle 15: Makrophagen-Scavenger-Rezeptor-1-(MSR1)-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe	68
Tabelle 16: Veränderung der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor-1-(MSR1)-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose	69
Tabelle 17: Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe	69
Tabelle 18: Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe	70
Tabelle 19: Veränderung der Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose	71
Tabelle 20: Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe	71
Tabelle 21: Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe	72
Tabelle 22: Veränderung der Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose	73
Tabelle 23: Cytotoxic-T-lymphocyte-associated-protein-4-(CTLA-4)-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe	73
Tabelle 24: Cytotoxic-T-lymphocyte-associated-protein-4-(CTLA-4)-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe	74
Tabelle 25: Veränderung der Cytotoxic-T-lymphocyte-associated-protein-4-(CTLA-4)-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose	75

Tabelle 26: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.....	78
Tabelle 27: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression.....	80
Tabelle 28: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.....	81
Tabelle 29: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression.....	82
Tabelle 30: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-8-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.....	84
Tabelle 31: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression.....	85
Tabelle 32: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.....	86
Tabelle 33: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Änderung der Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression.....	87
Tabelle 34: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.....	88
Tabelle 35: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Änderung der Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression.....	90

Tabelle 36: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Cytotoxic-T-lymphocyte-associated-protein-4-(CTLA-4)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	91
Tabelle 37: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.....	92
Tabelle 38: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression	93
Tabelle 39: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1-(MSR1)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	95
Tabelle 40: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Änderung der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1-(MSR1)-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression	96

1 Einleitung

1.1 Glioblastoma

Die heterogenen Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS) werden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in 29 histologische Gruppen eingeteilt (Leece et al., 2017). Hirntumoren sind im Vergleich zu Tumoren anderer Organe eher selten (Ferlay et al., 2013); bei einem Anteil von etwa 1,4 % an allen Krebserkrankungen bei Erwachsenen beträgt der Anteil an tödlichen Verläufen bei Hirntumoren mit 2,7 % aber fast das Doppelte (Gladson et al., 2010, Leece et al., 2017). Die Inzidenz primärer ZNS-Tumoren liegt bei 28/100.000 Menschen, die Inzidenz bösartiger Hirntumoren bei 5,57/100.000 (Leece et al., 2017). 90 % der neuroepithelialen Tumoren sind Gliome. Gliome machen ca. 27 % aller Hirntumoren und ca. 80 % aller bösartigen Tumoren aus (Goodenberger and Jenkins, 2012).

Gliome werden nach ihrer Herkunftszelle (Agnihotri et al., 2013) in Astrozytome, Oligodendrogliome, Ependymome, embryonale Tumoren und Tumoren des Plexus choroideus eingeteilt (Crocetti et al., 2012). Astrozytäre Tumoren werden weiter in pilozytische Astrozytome (Grad I, meist keine höhergradige Progression), diffuse Astrozytome (Grad II), anaplastische Astrozytome (Grad III) und Glioblastome (GBMs, Grad IV) klassifiziert. Das GBM ist der häufigste und bösartigste Typ primärer Astrozytome, gefolgt von diffusen Astrozytomen (Bello Roufai et al., 2018). Das GBM macht > 60 % aller Hirntumoren bei Erwachsenen aus (Hanif et al., 2017).

GBM-Zellen entwickeln sich aus neuralen Stammzellen, Glia-Vorläuferzellen oder aus dedifferenzierten reifen Zellen (Agnihotri et al., 2013). GBMs wachsen schnell – im Schnitt verdoppeln sie ihre Größe alle 50 Tage (Stensjøen et al., 2015), dabei infiltrieren sie diffus das umgebende Gehirngewebe, dringen jedoch kaum in Blutgefäße ein und breiten sich selten außerhalb des ZNS aus (Seo et al., 2012).

Das GBM gilt als unheilbar – das mediane Gesamtüberleben (overall survival, OS) beträgt 15 Monate nach maximal sicherer chirurgischer Resektion und einer aggressiven Kombination aus adjuvanter Strahlentherapie (Radiotherapie, RT)

und Temozolomid-(TMZ)-Behandlung (Stupp et al., 2009). Trotz dieses aggressiven Behandlungsschemas erfolgt die Progression im Schnitt 6–9 Monate nach der Erstbehandlung, wobei mehr als 90 % der progredienten GBMs am Erstmanifestationsort auftreten (Wen and Kesari, 2008). Die 5-Jahres-Überlebensrate beim GBM beträgt 0,05–4,7 % (Ostrom et al., 2014). Zu den die Überlebensrate bei GBM-Patienten beeinflussenden Faktoren zählen das Alter, die Karnofsky-Performance-Status-Scale, das Tumolvolumen, die Tumorlokalisation, der Behandlungsplan, der Resektionsumfang, die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-(*MGMT*)-Promotor-Methylierung und der Isocitrat-Dehydrogenase-1-(*IDH-1*)-Mutationsstatus (Zhao et al., 2019).

1.1.1 Epidemiologie

Die altersbereinigte GBM-Inzidenz liegt zwischen 0,59 und 3,69 pro 100.000 Menschen (Ostrom et al., 2014). Seit der Einführung der Computer- und Magnetresonanztomografie (MRT) sind die Inzidenzen von Hirntumoren relativ stabil, wobei hoch entwickelte Industrieländer tendenziell höhere Raten aufweisen (Ohgaki and Kleihues, 2005).

GBMs können in jedem Alter auftreten, die meisten Menschen erkranken aber zwischen 55 und 60 Jahren (Ohgaki und Kleihues, 2005). Bei Kindern machen GBMs nur 3 % aller Hirntumoren aus (Mishra et al., 2018). Männer sind häufiger betroffen als Frauen in einem Verhältnis von 3,97:2,53 (Thakkar et al., 2014). GBMs treten meist in der supratentoriellen Region (frontal 40 %, temporal 29 %, parietal 14 %, occipital 3 %), selten im Kleinhirn (Barbarawi et al., 2009) und sehr selten im Rückenmark (Larjavaara et al., 2007) auf.

In den USA ist die Gliom-Inzidenz bei Weißen höher als bei Afroamerikanern (Ostrom et al., 2013). Die Inzidenz von Astrozyten-Tumoren liegt in asiatischen Populationen meist niedriger als in europäischen und nordamerikanischen Populationen (Leece et al., 2017). Solche Differenzen sind am ehesten auf sozioökonomische Unterschiede und eine Unterdiagnostik zurückzuführen und nicht auf differente genetische Prädispositionen (Ohgaki and Kleihues, 2005).

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie von Gehirn-Neoplasien ist weitgehend unerforscht. Bisher ist die Exposition gegenüber hochdosierter ionisierender Strahlung der einzige bestätigte Risikofaktor (Braganza et al., 2012). Studien belegen ein erhöhtes Hirntumorrisiko bei Kindern mit einer prophylaktischen ZNS-Bestrahlung bei akuter lymphoblastischer Leukämie. Bei einer Chemotherapie (CT) wird keine Risikozunahme beobachtet (Nygaard et al., 1991). Ebenso fehlt unabhängig vom Erkrankungsalter ein Zusammenhang zwischen dem GBM-Risiko und der Exposition gegenüber diagnostischer Strahlung (Prasad and Haas-Kogan, 2009). Die Analyse der Auswirkungen ionisierender Strahlung nach den Atombomben in Nagasaki und Hiroshima ergab eine erhöhte Inzidenz aller Hirntumortypen einschließlich Gliome (Preston et al., 2002).

Arbeitnehmer in bestimmten Branchen (z. B. chemische und petrochemische Industrie) tragen ein erhöhtes Risiko für Hirntumoren (Carozza et al., 2000). Das GBM-Auftreten ist nicht mit Umweltfaktoren wie Rauchen (Zheng et al., 2001), der Nutzung von Mobiltelefonen oder einer Exposition gegenüber elektromagnetischen Feldern (Ohgaki and Kleihues, 2005) assoziiert, dagegen erhöht der Verzehr von Wurstwaren mit einem hohen Nitrit-Gehalt das Gliomrisiko (Boeing et al., 1993). Laut Studien ist die Wahrscheinlichkeit an Gliomen zu erkranken bei Allergikern geringer (Linos et al., 2007, Cahoon et al., 2014).

Gliome treten in bestimmten Familien gehäuft auf, wobei das Suszeptibilitätsgen noch nicht identifiziert wurde (Bondy et al., 2008). In einer Studie hatten 2,1 % der Hirntumorpatienten Eltern mit Tumoren des Nervensystems; auch parentale Endometriumkarzinome und Melanome waren in der F1-Generation mit Astrozytomen assoziiert (Hemminki et al., 1999). Eine genetische Veranlagung wurde für 5 % der Gliome beschrieben (Dunbar et al., 2015). Zu den autosomal dominanten Syndromen mit erhöhter Inzidenz für Hirntumoren gehören die tuberöse Sklerose, die Neurofibromatose und das Li-Fraumeni-Syndrom (Blumenthal and Cannon-Albright, 2008).

1.1.3 Histologie und Pathogenese

1863 identifizierte Dr. Rudolf Virchow Gliazellen als den Ursprung von GBMs, wodurch der Grundstein für die moderne Klassifikation von Hirntumoren gelegt wurde (Agnihotri et al., 2013). Seit 1979 veröffentlicht die WHO regelmäßig eine Einstufung von ZNS-Tumoren, um weltweit einheitliche histopathologische Diagnosekriterien sicherzustellen (DeWitt et al., 2017). Die WHO klassifiziert Hirntumoren anhand histologischer Kriterien von niedriggradigen Läsionen (Grad I–II) bis zu hochgradigen (Grad III–IV) malignen Erkrankungen (Vigneswaran et al., 2015). Das GBM ist ein hochaggressiver Grad-IV-Tumor. Typische histologische Merkmale sind Nekrosen, eine mikrovaskuläre Proliferation sowie zahlreiche Mitosen und pleiomorphe Zellen (Wen and Kesari, 2008).

2016 veröffentlichte die WHO ein Update der vierten Auflage der Klassifikation von ZNS-Tumoren, die zusätzlich zu histologischen auch molekulare Kriterien berücksichtigt. Gemäß dieser Klassifikation werden GBMs in drei Gruppen eingeteilt: GBMs mit *IDH*-Wildtyp (einschließlich Riesenzell-GBM, Gliosarkom und Epithelioid-GBM), GBMs mit *IDH*-Mutante und GBMs „not otherwise specified“ (Louis et al., 2016).

IDH-Mutationen (Punktmutation in Kodon 132 (*IDH-1*) und in Kodon 172 (*IDH-2*)) sind ein diagnostischer und prognostischer Marker (Aldape et al., 2015). Mutierte *IDH*-Proteine katalysieren die Reduktion von α -Ketoglutarat zu 2-Hydroxyglutarat, anstatt wie der Wildtyp Isocitrat zu α -Ketoglutarat zu decarboxylieren, was zu einer veränderten Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Methylierung, zum Hypoxie-Sensing und zu einer Histon-Demethylierung führt (Aldape et al., 2015). Prognostisch zeigen GBM-Patienten mit *IDH-1*- oder *IDH-2*-Mutation einen Überlebensvorteil (Zou et al., 2013).

Ein GBM kann de novo (primäres GBM) entstehen oder sich aus Astrozytomen oder Oligodendrogliomen entwickeln (Kleihues and Ohgaki, 1999). Primäre Formen machen mehr als 80 % der GBMs aus; sie treten meist bei Personen über 55 Jahren auf (Durchschnittsalter 64 Jahre), während sekundäre GBMs vorzugsweise bei jüngeren Patienten vorkommen (Durchschnittsalter 45 Jahre) (Ohgaki and Kleihues, 2013).

Der Unterschied zwischen primären und sekundären GBMs liegt in Ihren molekularen Charakteristika. Primäre GBMs weisen häufig eine Amplifikation/Mutation des Gens des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (epidermal growth factor receptor, EGFR; 36–60 % der primären vs. 8 % der sekundären Tumoren), eine Phosphatase-and-tensin-homolog-(*PTEN*)-Mutation (25 % der primären vs. 4 % der sekundären Tumoren) und eine Cyclin-dependent-kinase-inhibitor-2A-(*CDKN2A*)-p16-Deletion (78 % der primären vs. 8 % der sekundären Tumoren) auf (Szopa et al., 2017). Sekundäre GBMs zeigen häufiger Tumorsuppressorprotein-53-(*TP53*)-Mutationen (28 % der primären vs. 65 % der sekundären Tumoren), eine *MGMT*-Promotor-Methylierung (36 % der primären vs. 75 % der sekundären Tumoren) und *IDH1*-Mutationen (5 % der primären vs. 75 % der sekundären Tumoren) (Szopa et al., 2017). Die kombinierte Deletion der Chromosomenarme 1p und 19q ist charakteristisch für einen oligodendroglialen Ursprung, *TP53*-Mutationen sprechen für einen astrozytären Hintergrund (Riemenschneider et al., 2010).

2010 wurden GBMs basierend auf genetischen Veränderungen und molekularen Profilen in vier Subtypen eingeteilt (Verhaak et al., 2010). Das Hauptmerkmal klassischer Tumoren ist die *EGFR*-Mutation/Amplifikation. Mesenchymale Tumoren zeichnen sich durch Neurofibromatose-Typ-1-(*NF1*)-Mutationen aus (Verhaak et al., 2010). Proneurale Tumoren zeigen Veränderungen in *IDH1*-, Platelet-derived-growth-factor-receptor-A-(*PDGFRFA*)- und *TP53*-Genen. Der neuronale Subtyp wird durch eine Überexpression neuronaler Marker ohne spezifische genetische Veränderungen charakterisiert (Verhaak et al., 2010). Proneurale/neuronale Subtypen treten oft bei niedriggradigen und klassische/mesenchymale Subtypen vermehrt bei hochgradigen Gliomen auf (Lin et al., 2014).

GBMs ohne *IDH1*-Mutation sind in allen Subtypen vertreten (Wilson et al., 2014). Die Mehrzahl der GBMs mit *IDH1*-Mutation weist ein proneurales Genexpressionsmuster auf; wobei nur 30 % der GBMs mit proneuralem Genexpressionsmuster eine *IDH1*-Mutation zeigen (Ohgaki and Kleihues, 2013). Diese Befunde stützen die Hypothese, dass sekundäre GBMs eine homogene Gruppe mit *IDH1*-

Mutationen und einem proneuralen Expressionsmuster darstellen, während primäre GBMs sich mit variablen Mutationen und Genexpressionsprofilen präsentieren (Ohgaki and Kleihues, 2013).

GBMs zeigen auch innerhalb der molekularen Subtypen eine deutliche Heterogenität. In einer Studie blieb das Genexpressionsmuster bei der Progression bei nur 50 von 91 *IDH*-Wildtyp-Fällen (55 %) konstant. Der mesenchymale Subtyp war am stabilsten (65 %), gefolgt von den klassischen (51 %) und proneuralen Subtypen (41 %) (Wang et al., 2017).

Unklar bleibt, welche Faktoren zur intratumoralen Heterogenität beitragen und welchen Einfluss ortständige Zellen auf das Entstehen unterschiedlicher Subtypen haben. Die klinische Relevanz dieser Subtypen ist ebenfalls noch nicht vollständig geklärt. Der mesenchymale Subtyp ist mit einer RT-Resistenz und einem schlechteren OS assoziiert (Bhat et al., 2013), während der proneurale Subtyp bei Patienten mit *IDH*-Wildtyp-GBM gut auf eine anti-angiogene Behandlung anspricht (Sandmann et al., 2015).

1.1.4 Klinische Präsentation

Die Mehrzahl der Patienten mit primären GBMs (68 %) hat eine klinische Vorgeschichte < 3 Monate (Ohgaki and Kleihues, 2013). GBM-Patienten weisen unterschiedliche Symptome auf. Durch die Zerstörung des Hirngewebes infolge von Nekrosen können fokale neurologische Defizite auftreten (20 %). Gelegentlich (32,2 %) entwickeln sich die Symptome so schnell, dass die Gefahr der Verwechslung mit einem Schlaganfall besteht (Omuro and DeAngelis, 2013). Seltener treten episodische Anfälle, Ohnmachtsanfälle oder Stürze (20,8 %) und Kopfschmerzen (20,8 %) auf (Ozawa et al., 2018). Obwohl Kopfschmerzen als „erstes Zeichen“ bei einem Hirntumor gelten, sind sie als alleinige Beschwerde selten. Laut einer prospektiven Studie treten singuläre Kopfschmerzen nur bei 8 % der Betroffenen auf (Vazquez-Barquero et al., 1994). 24–68 % der GBM-Patienten leiden früh im Erkrankungsverlauf an einer Epilepsie, bei 19–38 % entwickelt sich diese später (Vecht et al., 2014). Sekundär können durch den erhöhten Hirndruck

aufgrund der Tumormasse oder aufgrund einer Verlegung des Abflusses des Liquor cerebrospinalis Symptome der klassischen Triade (Kopfschmerzen, Übelkeit, Papillenödem) auftreten.

Tumoren im Frontallappen können zu kognitiven Störungen, unangemessenem Sozialverhalten, Persönlichkeitsveränderungen, geringerer Hemmung und verminderter Sprachproduktion führen (Broca-Zentrum). Mögliche Folgen von Tumoren im Parietallappen sind eine schlechte Interpretation von Sprache, Schwierigkeiten beim Sprechen, Schreiben, Zeichnen, Benennen und Erkennen sowie eine schlechte räumliche und visuelle Wahrnehmung. Okzipitallappen-Tumoren können Sehstörungen verursachen und Tumoren im Temporallappen Gedächtniseinbußen, Hörverluste und Schwierigkeiten beim Sprachverständnis (Wernicke-Zentrum).

1.1.5 Diagnostik

Die GBM-Diagnostik, Behandlungsplanung und das Follow-up basieren hauptsächlich auf konventionellen MRT-Befunden. Die MRT-Diagnostik sollte eine native T1- und T2-gewichtete Sequenz in mindestens einer Ebene, eine Fluid Attenuation Inversion Recovery (FLAIR) Sequenz sowie kontrastmittelverstärkte T1-Aufnahmen in axialer, sagittaler und koronarer Ebenen umfassen (Weller et al., 2015). Auf T1-gewichteten Bildern erscheint das GBM als heterogene Masse mit zentraler Nekrose (hypointenser Bereich), dickem unregelmäßigem Rand und peritumoralem Ödem. Eine Signalsteigerung in T1-gewichteten Sequenzen nach intravenöser Gabe von Gadolinium-haltigem Kontrastmittel ist ein Zeichen einer gestörten Blut-Hirn-Schranke. Pathologische Tumorgefäße sind ein wesentliches Charakteristikum der Neovaskularisation maligner Hirntumoren. In T2-gewichteten Sequenzen stellen sich GBMs als heterogene Raumforderungen dar, die solide, zellreiche hypointense Tumoranteile sowie zystisch-nekrotische hyperintense Areale enthalten (Weller et al., 2006).

Aufgrund der variablen Präsentation der GBMs in der Bildgebung ist eine gewebebasierte Diagnose unabdingbar. Eine Magnetresonanzspektroskopie (MRS)

ist im Gegensatz zur konventionellen MRT-Diagnostik hilfreich in der Unterscheidung von akuten entzündlichen Prozessen, hirneigenen Tumoren sowie Metastasen (Lanfermann et al., 2004). Zur Charakterisierung von Hirntumoren werden meist Stoffwechselprodukte wie N-Acetylaspartat, Kreatin, Cholin und Laktat verwendet. Der Anstieg Cholin-haltiger Verbindungen und N-Acetyl-Aspartat korreliert mit dem Grad der Tumorinfiltration (Croteau et al., 2001). Das Vorkommen von Kreatin unterscheidet Gliome von Kreatin-freien Metastasen (Ishimaru et al., 2001).

Bei Patienten mit Hirntumoren liefert die Positronen-Emissions-Tomografie (PET) Informationen zum Ausmaß des Tumors, zur proliferativen Aktivität, zum Metabolismus und zu den Beziehungen des Tumors zu funktionell relevanten Teilen des Gehirns. Die am häufigsten verwendeten Tracer bei der Diagnose von Hirntumoren sind Fluor-2-Desoxy-D-Glucose (FDG), Methyl-L-Methionin (MET) und 3'-Desoxy-3'-Fluor-L-Thymidin (FLT) (Jacobs et al., 2005).

FDG ist ein Tracer für den Glukoseverbrauch. Der intratumorale Glukoseverbrauch korreliert mit dem Tumorgrad (Di Chiro et al., 1982). Eine erhöhte Methioninaufnahme (Faktor 1,3–3,5 Tumor vs. kontralaterale Kontrollregion) korreliert mit der Zellproliferation, der Expression von Ki-67 sowie mit der Mikrogefäßdichte (Jacobs et al., 2005). Die MET-PET ermöglicht die Beurteilung von Behandlungseffekten und die Unterscheidung zwischen progredienten Tumoren und Strahlennekrosen (Galldiks et al., 2006). Die Bewertung der Thymidinkinase-1-(TK1)-Aktivität bei der FLT-PET ist ein Mittel zur Bestimmung der Zellproliferation und erlaubt eine Quantifikation des Ansprechens auf eine CT (Krohn, 2001).

1.1.6 Therapie

Die aktuelle GBM-Therapie besteht aus einer maximalen chirurgischen Resektion, gefolgt von einer externen RT (60 Gy in 30 Fraktionen) und einer TMZ-CT (75 mg / m² / Tag über 6 Wochen, Stupp-Schema) (Stupp et al., 2005a). Anschließend erfolgt eine adjuvante TMZ-CT (150–200 mg / m² / Tag) an den Tagen 1–5 eines 28-Tage-Zyklus für 6–12 Zyklen (Stupp et al., 2015, Stupp et al., 2005b).

Trotz dieses aggressiven Behandlungsplans ist die Prognose schlecht. Nach einer alleinigen chirurgischen Resektion beträgt das mittlere OS etwa 6 Monate (Wilson et al., 2014). Die kombinierte chirurgische Resektion und RT verlängert das mediane OS auf 12,1 Monate (Stupp et al., 2005b) und die zusätzliche TMZ-CT weiter auf 14,6 Monate (Stupp et al., 2005b).

Ältere Patienten (>70 Jahre) stellen aufgrund ihrer schlechten Prognose eine Herausforderung dar. Bei diesen Patienten verlängert die RT das mediane OS auf 29,1 Wochen im Vergleich zu 16,9 Wochen bei einer unterstützenden Behandlung (Fiorentino et al., 2012). Da ältere Patienten die RT häufig weniger gut vertragen, kann ein verkürztes Regime (40 Gy in 15 Fraktionen) über einen Zeitraum von 3 Wochen (Roa et al., 2004) oder eine TMZ-CT (Glantz et al., 2003) durchgeführt werden.

Als Alkylierungsmittel modifiziert TMZ die DNA durch Methylierung der Guanin-Basen und leitet so das Absterben der Tumorzellen ein. Das Reparaturenzym MGMT macht die DNA-Modifizierung alkylierender Chemotherapeutika rückgängig (Verbeek et al., 2008). Patienten mit aktivem MGMT-Gen zeigen daher eine Therapieresistenz gegenüber alkylierenden Chemotherapeutika (Johannessen et al., 2018). Etwa 50 % der GBMs zeigen eine verminderte MGMT-Expression durch Methylierung des *MGMT*-Promotors (Wick et al., 2014). Das mittlere OS (21,7 vs. 12,7 Monate) und die 2-Jahresüberlebensrate (46 % vs. 13,8 %) von GBM-Patienten mit und ohne *MGMT*-Promotor-Methylierung unter TMZ-Therapie unterscheidet sich signifikant (Hegi et al., 2005).

Trotz maximaler initialer Resektion und multimodaler Therapie zeigen etwa 70 % der GBM-Patienten innerhalb eines Jahres nach der Diagnose eine Progression der Erkrankung (Stupp et al., 2005a); weniger als 5% der Patienten sind 5 Jahre nach der Diagnose noch am Leben (Ostrom et al., 2014).

1.1.7 Behandlungsoptionen progredienter GBMs

Derzeit fehlt eine Standardbehandlung für progrediente GBMs. Progrediente Tumoren sind weniger therapiesensitiv als Tumoren bei der Erstdiagnose (Campos

et al., 2016). Bei einer Progressionsbehandlung muss das Morbiditätsrisiko gegen den möglichen therapeutischen Nutzen abgewogen werden.

Re-Resektion

In Abhängigkeit von der Lage und der Größe der Tumorprogression sollte eine Re-Resektion zur Zytoreduktion in Betracht gezogen werden. Die intraoperative Neuronavigation und die Verwendung von 5-Aminolevulinsäure (ALA) tragen zur Verbesserung der Tumorresektion bei (Mallick et al., 2016).

Der Effekt einer Re-Resektion auf das OS wird kontrovers diskutiert. Laut Studien ist ein größeres Ausmaß der Resektion bei Tumorprogression mit einem verbesserten OS assoziiert (Chen et al., 2018b, Wann et al., 2018, Suchorska et al., 2016). GBM-Patienten mit einer Resektion der ersten Tumorprogression zeigen im Vergleich zu Patienten ohne Resektion ein besseres medianes OS nach einer erneuten Progression (12 vs. 5 Monate) (Chen et al., 2018b). Andere Studien fanden keinen Überlebensvorteil nach einer Re-Resektion (Goldman et al., 2018, Ortega et al., 2016). Laut einer aktuellen Meta-Analyse mit acht Beobachtungsstudien bietet eine Re-Resektion einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil (Lu et al., 2018). Verschiedene Parameter beeinflussen das OS nach der ersten Resektion signifikant; dazu zählen die präoperative und postoperative Karnofsky-Performance-Status-Scale, das Ausmaß der ersten Resektion und die CT nach der ersten Resektion (Ringel et al., 2016).

Aufgrund des Fehlens zuverlässiger Richtlinien zur Identifikation von Kandidaten für eine GBM-Re-Resektion entwarfen Park et al. (2013) eine Skala zur Vorhersage des Überlebens nach Re-Resektion. Die dreistufige Skala (Bewertungsbereich 0–2 Punkte) setzt sich aus der Karnofsky-Performance-Status-Scale (0 für $\geq 70\%$ und 1 für $< 70\%$) und der ependymalen Beteiligung (0 für keine Beteiligung und 1 für der Ventrikelwandinfiltration) zusammen und unterscheidet Gruppen mit guter (0 Punkte; medianes Überleben 18,0 Monate), mittlerer (1 Punkt; medianes Überleben 10,0 Monate) und schlechter Prognose (2 Punkte; medianes Überleben 4,0 Monate) (Park et al., 2013).

Re-Radiotherapie

Patienten mit einem Karnofsky-Performance-Status-Scale-Wert ($> 60\%$) und einem Läsionsdurchmesser $< 40\text{ mm}$, deren Erstbehandlung mindestens vor 6 Monate abgeschlossen wurde, eignen sich am besten für eine erneute RT (Shanker et al., 2019). Diese kann durch eine externe RT oder durch eine Brachytherapie erfolgen. Meist wird eine Hypofraktionierte stereotaktische RT (HFSRT) oder Stereotaktische Radiochirurgie (SRS) verwendet. Allgemein gilt die Richtlinie, bei Volumina $< 4\text{--}5\text{ cm}$ die kumulative Dosis bei $< 100\text{ Gy}$ zu halten, um das Ausmaß der Toxizität zu begrenzen (Mayer and Sminia, 2008). Übliche Nachbestrahlungsdosen sind eine Gesamtdosis von $20\text{--}40\text{ Gy}$ in $2\text{--}6\text{ Gy}$ -Fraktionen für die fraktionierte RT und $15\text{--}20\text{ Gy}$ für die Einzeldosis-RT (Ryu et al., 2014). Die Einzeldosis-SRS ist auf kleinere, gut abgrenzbare Läsionen mit einem Durchmesser $< 3\text{ cm}$ beschränkt (Ryu et al., 2014).

Re-TMZ

Trotz des Fehlens eines Standard-CT-Regimes ist die zytotoxische CT die bevorzugte Zweitlinien-Behandlungsoption für progrediente GBMs. TMZ wirkt prinzipiell auch gegen progrediente Tumoren (Yung et al., 2000b), wobei die Identifikation von Patienten, die von einer solchen Behandlung profitieren (z. B. Patienten mit Tumoren mit methyliertem *MGMT*-Promotor), wichtig ist (Weller et al., 2015). Das behandlungsfreie Intervall seit dem letzten adjuvanten TMZ-Zyklus sollte > 5 Monate betragen (Franceschi et al., 2018).

Laut einer Meta-Analyse zur Wirksamkeit verschiedener TMZ-Schemata (metronomisch/Standard, hohe/niedrige Dosis) bei progredienten GBMs lässt sich das OS mit einem metronomischen Schema und einer hohen durchschnittlichen TMZ-Tagesdosis ($> 100\text{ mg / m}^2$) verlängern (Chen et al., 2012).

Andere Therapien

Neben einer erneuten Chemotherapie mit TMZ stehen medikamentöse Therapieoptionen mit Nitroharnstoffen (Carmustin, Lomustin) sowie Hydrazin-Derivaten (Procarbazin) zur Verfügung. Die Wirksamkeit einer Procarbazin- und Lomustin-CT bei TMZ-refraktären GBMs war nicht nachweisbar (Kim et al., 2018, Yung et al., 2000a). Auch andere Chemotherapeutika wie Carboplatin (Field et al., 2015), Erlotinib (Sathornsumetee et al., 2010) und Cetuximab (Hasselbalch et al., 2010) zeigten keinen eindeutigen Überlebensvorteil.

Bevacizumab erhielt 2009 von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) basierend auf den Ergebnissen der Phase-II-BRAIN-Studie (Friedman et al., 2009b) und einer weiteren Phase-II-Studie (Kreisl et al., 2009) eine Zulassung für progrediente GBMs. In einer Studie betrug das progressionsfreie Überleben (PFS) nach 6 Monaten für die Monotherapie 43 % und für Bevacizumab + Irinotecan (Topoisomerase I-Inhibitor) 50 % (Friedman et al., 2009a).

Die Europäische Arzneimittel-Agentur lehnte die Zulassung von Bevacizumab aufgrund der teilweise fehlenden Kontrollgruppen in den Studien ab (Wick et al., 2010). Bei einer systemischen Analyse der vorhandenen Daten (2000–2016) zur therapeutischen Wirksamkeit von Bevacizumab wurden keine Belege für die Wirksamkeit von Bevacizumab bei Patienten mit einem Karnofsky-Performance-Status-Scale-Wert < 60 % gefunden (Diaz et al., 2017). Obwohl bei einer GBM-Progression eine Bevacizumab-Therapie einen Überlebensvorteil bietet, ist der Effekt auf 4 Monate begrenzt. Eine Bevacizumab-Therapie geht mit erheblichen Nebenwirkungen einher. In den Studien mit GBM-Patienten trat unter einer Bevacizumab-Therapie (10 mg/kg alle 2 Wochen) durchschnittlich eine Nebenwirkung pro Patient auf (563 Ereignisse bei 503 Patienten). 74 % (417/563) der Nebenwirkungen zeigten einen Schweregrad von \geq Grad 3. Die häufigste kumulative Nebenwirkung war eine Leukopenie (31,2 %) gefolgt von Bluthochdruck (17 %) (Diaz et al., 2017).

1.2 Tumorimmunantwort

1.2.1 Grundlagen der Immunologie

Das aus einem angeborenen und erworbenen (adaptiven) Anteil bestehende Immunsystem schützt den Körper vor Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Parasiten, Pilze), fremden Makromolekülen und entarteten Zellen. An der adaptiven und angeborenen Abwehr sind Zellen und humorale Faktoren beteiligt; beide Systeme sind eng miteinander verflochten.

Zu Beginn einer Immunreaktion setzt sich das angeborene Abwehrsystem mit dem Pathogen auseinander. Die angeborene Abwehr ist immer verfügbar, wirkt aber unspezifisch. Die Zellen der angeborenen Immunität (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen (DC) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)) phagozytieren die Pathogene, töten diese direkt und/oder indirekt durch Sekretion von Zytokinen und Defensinen, die zur humoralen Abwehr gehören. Zum humoralen Teil der angeborenen Immunantwort gehört auch das Komplementsystem, das kaskadenartig bei einer Immunreaktion aktiviert wird.

Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems gehören T- und B-Zellen. T-Zellen exprimieren Antigen-spezifische T-Zell-Rezeptoren (TCR), die im Gegensatz zu den zunächst noch membrangebundenen Antikörpern (Ab) auf B-Zellen keine isolierten Antigene erkennen, sondern Komplexe aus Antigenpeptiden und Major-Histocompatibility-Complex-(MHC)-Molekülen. Bei Menschen werden MHC-Proteine als humane Leukozytenantigene (human lymphocyte antigens, HLA) bezeichnet. Zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs; Cluster of differentiation (CD)8⁺-T-Zellen) interagieren mit Peptid/MHC-I-Komplexen. Diese von allen kernhaltigen Zellen exprimierten Moleküle präsentieren intrazelluläre Antigene (Mohme and Neidert, 2020). CD4⁺-T-Zellen interagieren mit Peptid/MHC-II-Komplexen. MHC-II-Moleküle werden von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) exprimiert und präsentieren extrazelluläre Antigene (Mohme and Neidert, 2020). CD4⁺-Zellen können die Immunantwort entweder verstärken (T-Helferzellen Typ 1 und 2 Th1-/Th2-Zellen) oder dämpfen (regulatorische T-Zellen, Tregs).

1.2.2 Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs)

TILs sind Teil einer komplexen Mikroumgebung, die die Entwicklung von Tumoren reguliert. TILs spielen eine Schlüsselrolle bei der Inhibition bzw. Förderung des Tumorwachstums und damit für die Prognose (Domingues et al., 2016). In den vergangenen Jahren wurden Fortschritte bei der Charakterisierung von Immunzellinfiltraten bei ZNS-Tumoren erzielt. Die Mikroumgebung von Gliomen enthält CD4⁺-Th-Zellen, CD8⁺-CTLs und CD4⁺-Tregs (Giering et al., 2017).

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs, CD8⁺-T-Lymphozyten)

Zu den Aufgaben der CTLs gehört die Beseitigung viraler und intrazellulärer bakterieller Infektionen (Harty et al., 2000). Sie spielen aber auch eine Rolle bei der Verhinderung des Tumorwachstums (Apetoh et al., 2015). Zur CTL-Aktivierung sind Wechselwirkungen mit DCs, NK-Zellen und CD4⁺-T-Zellen (Farhood et al., 2018) erforderlich.

Bei der Entwicklung der Effektor-Funktionen durchlaufen CD8⁺-T-Lymphozyten einen mehrstufigen Prozess (Cohen-Inbar and Zaaroor, 2016). Die Anti-Tumor-Antwort gliedert sich in eine Priming-Phase, die zur Generierung von de novo Anti-Tumor-CD8⁺-T-Lymphozyten führt, und eine Effektorphase, die eine Zerstörung des Tumors zur Folge hat (de Charette et al., 2016). Während der Priming-Phase binden die CD8⁺-T-Lymphozyten an von DCs oder Tumorzellen über den MHC-I präsentierte Antigene (Signal 1) (Reading et al., 2018). Für eine vollständige Aktivierung benötigt eine T-Zelle neben dieser Bindung an den TCR ein kostimulatorisches Signal (Abb. 1) (Reading et al., 2018). Die von APCs und Tumorzellen exprimierten CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) wirken als aktivierende Liganden des kostimulierenden Rezeptors CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen (Chen et al., 1992, Budd and Fortner, 2017). Dieses Signal ist für die TCR-Signalkaskade und die Differenzierung und Aktivierung der T-Zellen unverzichtbar (Cohen-Inbar and Zaaroor, 2016, Budd and Fortner, 2017). Eine TCR-MHC-I-Antigenpeptid-Interaktion allein löst keine Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen aus (Cohen-Inbar and Zaaroor, 2016, Budd and Fortner, 2017).

Die Interleukin-(IL)-2-Produktion durch aktivierte T-Zellen führt zur Proliferation und klonalen Expansion ausdifferenzierter, Antigen-spezifischer CTLs, die den Lymphknoten verlassen und zum Zielort migrieren (Pennock et al., 2013). Aktivierte CTLs töten Zielzellen mittels Granula-Exozytose oder Fas-Ligand-vermittelter Apoptose-Induktion ab (Farhood et al., 2018, Pross, 2007). CTLs sezernieren auch Interferon-(IFN)- γ und Tumornekrosefaktor-(TNF)- α , die auf Tumorzellen zytotoxisch wirken (Thomas and Massagué, 2005). Das von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen produzierte IFN- γ stimuliert die anti-kanzerogene Wirkung von M1-Makrophagen (Farhood et al., 2018).

Bei den T-Zellen verhindern verschiedene Mechanismen eine Fehlstimulation. Binden CD80 und CD86 an Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4) anstelle an den Korezeptor CD28, wird die T-Zellaktivierung inhibiert (Abb. 1) (Pennock et al., 2013).

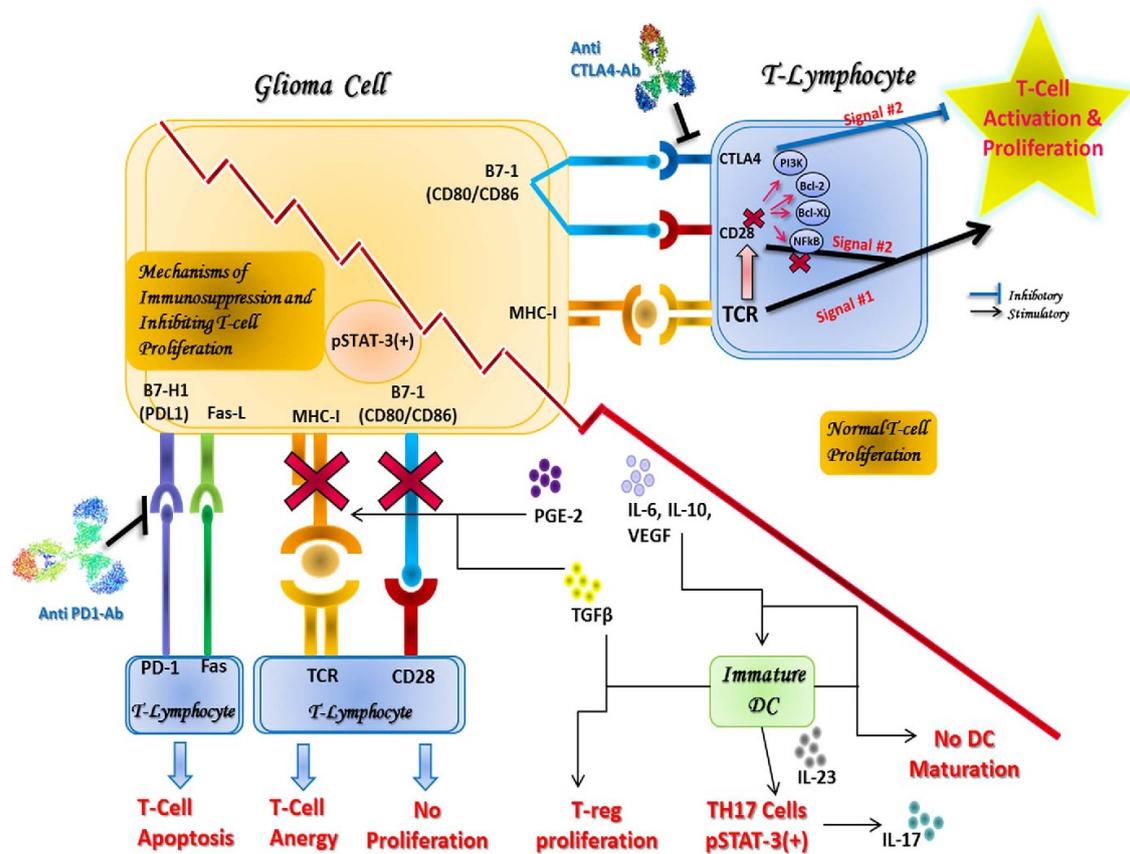


Abbildung 1: T-Zellproliferation und -aktivierung bei Kontakt mit Gliomzellen (oben rechts) und Mechanismen der Gliomzell-Immunresistenz (unten links)

Ab: Antikörper; B7-H1 (PD-L1): Programmed cell death 1 ligand 1; Bcl-2 / Bcl-XL: B-cell lymphoma 2 / XL; CD: Cluster of differentiation; CTLA4: Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4; DC: Dendritische Zelle; Fas: Fas cell surface death receptor; Fas-L: Fas-ligand; IL: Interleukin; MHC: Major-Histocompatibility Complex; NF- κ B: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer; PD-1: Programmed cell death protein 1; PGE-2: Prostaglandin E2; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; STAT-3: Signal transducers and activators of transcription; TCR: T-Zell-Rezeptor; TGF- β : Transforming growth factor beta; TH: T-Helferzellen; T-reg: regulatorische T-Zelle; VEGF: Vascular-endothelial growth factor
Quelle: (Cohen-Inbar and Zaaroor, 2016)

Weiter kann bei der T-Zellaktivierung das Programmed cell death protein 1 (PD-1) verstärkt exprimiert werden. Dieser Rezeptor bindet an den Programmed cell death protein ligand 1 (PD-L1; synonym B7H1, CD274) und PD-L2 (synonym B7DC, CD273) (Ostrand-Rosenberg et al., 2014). Das durch die Ligandenbindung an PD-1 ausgelöste Signal, inhibiert die zytotoxischen Funktionen der T-Zellen (Abb. 1) (Ostrand-Rosenberg et al., 2014). Während CTLA4 vorwiegend die frühen Stadien der T-Zellaktivierung reguliert, wirkt PD-1 auf bereits aktivierte T-Zellen (Ostrand-Rosenberg et al., 2014).

T-Helfer-Zellen (Th-Zellen)

Durch Antigen-MHC-II-Komplexe aktivierte CD4⁺-T-Zellen unterstützen (Th1/Th2/Th17) oder dämpfen (Tregs) die adaptive Immunantwort (Le Gallo et al., 2017). Die Rolle der CD4⁺-T-Zellsubtypen bei der Anti-Tumo-Immunität ist derzeit noch nicht ganz verstanden.

Th1-Zellen fördern zellvermittelte Immunreaktionen bzw. die zelluläre zytolytische Aktivität, die den Organismus vor intrazellulären Pathogenen (Viren, intrazelluläre Bakterien) schützt (Wan, 2010). Die Th2-Reaktion ist mit der humoralen Reaktion verbunden, die extrazelluläre Krankheitserreger (Bakterien, Parasiten) bekämpft (Wan, 2010). Th1-Zellen wirken pro-inflammatorisch, indem sie Zytokine (z. B. IFN- γ , IL-12) sekretieren und Makrophagen, Mikroglia sowie CTLs aktivieren (Galvão and Zong, 2013). Da Th1-Zytokine zellvermittelte Immunantworten fördern, wirken sie potenziell auch gegen Tumoren (Nishimura et al., 2000).

Th2-Zellen bilden Zytokine (z. B. IL-4, IL-10, IL-13), die die Aktivierung von B-Lymphozyten und die Ab-Produktion fördern, aber auch die Th1-Immunantwort unterdrücken (Galvão and Zong, 2013). Th1-Zellen können entzündungshemmende Zytokine (IL-10, Transforming growth factor beta (TGF- β)) produzieren, um die Länge der zytotoxischen, gewebschädigenden Phase zu begrenzen (Galvão and Zong, 2013).

Rolle der Zytokine für die Immunantwort beim GBM

Zytokine werden von Immunzellen in peripheren Geweben und im Blut, aber auch von Gliazellen und anderen residenten Zellen des ZNS synthetisiert (Kennedy and Silver, 2016). Die pleiotrop wirkenden Zytokine modulieren die Immunfunktion und zeigen dabei pro- und/oder anti-Tumoreffekte.

IFN- γ fördert die MHC-I-Antigenpräsentation über die Aktivierung des Januskinase/Signal-transducer and activator for transcription 1 (JAK/STAT1) Signaltransduktionswegs (Zhou, 2009). IFN- γ hemmt durch Steigerung der Fas-Rezeptor-(FasR, CD95)-Expression das Wachstum von Gliomzellen und die Migration von Zellen der menschlichen A172-GBM-Zelllinie (Knüpfer et al., 2001).

IL-12 zeigte in präklinischen Studien eine robuste Anti-Tumor-Aktivität und ein starkes immunstimulierendes Potenzial. Die systemische Verabreichung von IL-12 hat sich jedoch als toxisch erwiesen (Leonard et al., 1997). Zur Nutzung des therapeutischen Potenzials von IL-12 werden derzeit lokale Applikationsformen in verschiedenen Krebsmodellen getestet (Nguyen et al., 2020).

GBM-Proben enthalten im Vergleich zu Kontrollgehirngewebe signifikant höhere IL-6-Spiegel (Choi et al., 2002). Höhere IL-6-messenger-Ribonukleinsäure-(mRNA)-Spiegel korrelieren mit einem schlechten OS der GBM-Patienten (Tchirkov et al., 2007). IL-6 erhöht beim GBM die Vascular Endothelial Growth Factor-(VEGF)-Expression durch STAT3-Aktivierung, was die potenzielle Beteiligung von IL-6 und STAT3 an der Angiogenese verdeutlicht (Loeffler et al., 2005). Die Hemmung von konstitutiv aktivem STAT3 unterdrückt die Proliferation und induziert die Apoptose in GBM-Zellen (Rahaman et al., 2002). IL-6 trägt durch die

Förderung des Wachstums und des Überlebens von Glioma-Stammzellen zur Malignität bei (Wang et al., 2009).

Das angiogene IL-8 begünstigt gemeinsam mit anderen angiogenen Faktoren (VEGF, Angiopoetin-2) die GBM-Progression (Conroy et al., 2018). IL-8-Antikörper verringern die Invasivität von Gliomen durch Hemmung der Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) deutlich (Raychaudhuri and Vogelbaum, 2011).

Gliomzellen sezernieren IL-10; die IL-10-mRNA-Expression nimmt mit dem Tumorstadium signifikant zu (Huettner et al., 1995). IL-10 ist an der Tumorzellproliferation und -migration beteiligt, die die Infiltration in das umgebende Gewebe fördern (Huettner et al., 1997). Die Hauptfunktion von IL-10 ist die Inhibition der Antigenpräsentation in DCs und Makrophagen und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (Moore et al., 2001).

Auch IL-4 und IL-13 werden in Gliomzelllinien im Vergleich zu normalem Hirngewebe überexprimiert. Zudem unterscheidet sich die Struktur der Rezeptoren (R) dieser Zytokine auf Tumorzellen von der auf normalen Immunzellen (Shimamura et al., 2006). Da IL-4R und IL-13R das IL-4R-alpha-Protein als Rezeptorkomponente enthalten, aktivieren diese Zytokine gemeinsame Signalwege, an denen JAKs und STAT6 beteiligt sind (Jiang et al., 2000). Das pleiotrope IL-4 gilt als Induktor der Th2-Antwort, spielt aber auch bei der Th1-Antwort eine Rolle (Okada and Kuwashima, 2002). Polymorphismen im IL-4R-Gen sind mit einem besseren Überleben bei GBM-Patienten verbunden (Scheurer et al., 2008). Über den Crosstalk mit Tyrosinkinase-Rezeptoren moduliert der IL-13R α 2 die Migration und Proliferation von GBM-Tumorzellen (Newman et al., 2017).

Aufgrund der pleiotropen Wirkung der Zytokine ist die Vorhersage ihrer Auswirkungen komplex (Budd and Fortner, 2017).

1.2.3 Leukozyten-Dysregulation in der Tumormikroumgebung

TILs umfassen CD8⁺-CTLs, CD4⁺-Th-Zellen und Tregs (Mohme and Neidert, 2020). Insgesamt sind aber CD3⁺-T-Zellen eine seltene Population in Tumoren

und normalen Hirngewebe (Han et al., 2016). Mehrere Studien belegen eine Assoziation zwischen einer erhöhten T-Zelltumor-Infiltration und einem verlängerten OS beim GBM (Mohme and Neidert, 2020). Der T-Zelleffekt auf das OS bei GBM-Patienten ist unabhängig vom Alter, der postoperativen Behandlung und dem Methylierungsstatus des *MGMT*-Promotors (Kmiecik et al., 2013).

Tumor-infiltrierende CD3⁺-T-Zellen besitzen ein niedrigeres CD8⁺/CD4⁺-T-Zellverhältnis als CD3⁺-T-Zellen im peripheren Blut (Han et al., 2016). Laut Yu et al. (2003) korreliert ein hohes CD8⁺/CD4⁺-T-Zellverhältnis bei primären Hirntumoren mit einer weniger aggressiven Erkrankung. Andere Autoren berichten von einem längeren OS bei einer stärkeren Infiltration mit CD8⁺-T-Zellen (Lohr et al., 2011; Kmiecik et al., 2013). Das CTL-Expressionsprofil (u. a. PD-1⁺, Lymphozyten-Aktivierungsgen 3 (LAG-3)⁺, T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT)⁺, CD39⁺, Killer-cell Lectin-like receptor G1 (KLRG1)⁻, CD57⁻) in GBM-Patientenproben weist meist auf einen erschöpften Phänotyp hin (Martikainen and Essand, 2019). Laut Waziri et al. (2008) unterdrücken die meisten der im GBM vorhandenen CD4⁺-TILs die zelluläre Immunantwort.

Sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen zeigen bei GBM-Patienten eine erhöhte Apoptose-Neigung und eine signifikant erhöhte Fas-Expression (Walker et al., 2006). Durch die Bindung des Fas-Liganden an Fas wird ein Apoptose-Programm ausgelöst, das zum Tod der T-Zelle führt (Arakaki et al., 2014). Laut einer Studie befinden sich 22,6 % der TILs beim GBM im Frühstadium der Apoptose; < 50 % sind lebensfähig (Woroniciecka et al., 2018b). Astrozyten im gesunden Nervensystem exprimieren anders als von Astrozyten abgeleitete Gliomzellen keine Fas-Liganden. Das GBM weist die höchste Expressionsrate (81 %) unter Astrozyten-Tumoren auf (Didenko et al., 2002).

Typisch für Tregs ist die Expression des Transkriptionsfaktors Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) (Thomas et al., 2015). Die für Tregs charakteristischen Zytokine IL-10 und TGF- β unterdrücken die tumorspezifische T-Zellaktivierung (Mohme and Neidert, 2020). Bei insgesamt niedrigen CD4⁺-T-Zellzahlen liegt der Anteil der CD4⁺FoxP3⁺-Tregs bei Gliompatienten mit generalisierter Lymphopenie deutlich höher (Fecci et al., 2006). Eine Treg-Depletion fördert die Proliferation

von CD4⁺-T-Zellen, wobei der Anteil der Th2-Zellen ab- (IL-4 und IL-10) und der Anteil der Th1 (IL-6, IL-2, TNF- α und IFN- γ) zunimmt (Fecci et al., 2006). Aktuelle Daten belegen die Dysregulation des Th1- und Th2-Gleichgewichts bei Gliompatienten sowohl in peripherem Blut als auch in der Tumorumgebung (Zisakis et al., 2007). Bei Gliompatienten beruht die geringere Sekretion von IFN- γ auf einer verringerten Anzahl von CD4⁺-T-Zellen, die als Hauptproduzenten des Zytokins gelten (Dix et al., 1999). Die IFN- γ -Sekretion wird durch das bei Gliompatienten deutlich erhöhte IL-10 gehemmt.

In der Tumormikroumgebung besteht ein gestörtes Gleichgewicht zwischen stimulierenden und hemmenden Mitgliedern der B7-Familie (s. Abb. 1) (Zou and Chen, 2008). Eine verminderte Expression des kostimulatorischen Moleküls B7-1 (CD80/CD86) führt zu einer fehlenden Kostimulation und T-Zellanergie (Anderson et al., 2007). Weiter hemmt die verstärkte Expression von B7-H1 (PD-L1) auf Tumorzellen die Funktion der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen (Wintterle et al., 2003).

GBMs fördern zudem ein immunsuppressives Milieu durch eine veränderte Expression des HLA-E (Wischhusen et al., 2005). Maligne Gliomzellen verhindern Anti-Tumor-Immunantworten durch die Expression eines Lektin-ähnlichen Transkripts-1 (Roth et al., 2007).

Die Tumormikroumgebung ist zudem durch eine Gewebhypoxie gekennzeichnet, die durch eine unregelmäßige Vaskularisierung und einen hohen Sauerstoffverbrauch des Tumors verursacht wird (Jensen, 2009). Die Gewebhypoxie aktiviert den STAT3-Signalweg, was zu einer Aktivierung von Tregs (Ben-Shoshan et al., 2008) und Hemmung der DC-Reifung und -Funktion führt (Bauer et al., 2009).

1.2.4 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs)

Makrophagen beeinflussen verschiedene Aspekte der Karzinogenese (Wynn et al., 2013). Makrophagen können einerseits die Entstehung und Ausbreitung von Tumorzellen verhindern, andererseits aber auch das Tumorstadium unterstützen (Sica et al., 2002). Makrophagen machen 20 % der GBM-infiltrierenden

myeloischen Zellen aus (Gabrusiewicz et al., 2016). Die Mehrzahl der Makrophagen im Gehirn scheinen von zirkulierenden Monozyten abzustammen; wobei ein geringer Anteil (~ 15 %) aus Mikroglia hervorgeht (Chen et al., 2017).

Makrophagen werden durch vom Tumor sezernierte Lockstoffe rekrutiert; dazu zählen der Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (CSF-1), CC-Chemokine (CC-Chemokinligand (CCL) 2, CCL3, CCL4, CCL5 und CCL8) und VEGF (Lewis and Pollard, 2006). In menschlichen Tumoren sind die Spiegel dieser Proteine positiv mit der Anzahl der TAMs assoziiert (Murdoch et al., 2004).

Makrophagen differenzieren in Abhängigkeit von den in der Tumormikroumgebung vorhandenen Signalmolekülen und Zytokinen zu einem pro-inflammatorischen M1- oder zu einem anti-inflammatorischen M2-Phänotyp (Sica and Mantovani, 2012). Unter dem Einfluss von IFN- γ , Lipopolysaccharid und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) entstehen M1-Makrophagen. Dagegen fördern der CSF-1, Prostaglandin E (PGE) und Vitamin D3 die Entwicklung zu M2-Makrophagen (Lu et al., 2019).

Pro-inflammatorische M1-Makrophagen sind zur Phagozytose, Zytotoxizität, und Antigenverarbeitung/-präsentation befähigt. M1-Makrophagen sezernieren pro-inflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23) und fördern die Entwicklung von Th1-Lymphozyten (Arango Duque and Descoteaux, 2014). Weiter sezernieren M1-Makrophagen Stickstoffmonoxid (NO). NO entsteht bei der Umsetzung von Arginin zu Citrullin durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) (Bogen et al., 2019). NO diffundiert in benachbarte Tumorzellen und setzt dort weitere reaktive Stickstoffspezies wie Peroxynitrit frei. Die folgende Nitrosylierung von Proteinen löst eine Apoptose über den intrinsischen Weg aus (Bogen et al., 2019). In M2-Makrophagen setzt die Arginase 1 (Arg1) Arginin zu Ornithin und Polyaminen um (Sharda et al., 2011). Arginin ist essentiell für die Reifung des TCR ζ . Beim Fehlen von Arginin aufgrund der hohen Arg1-Expression in Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) interagieren T-Zellen nicht mehr mit Tumorantigenen (Szeffel et al., 2019).

M2-Makrophagen fehlt die pro-inflammatorische Anti-Tumor-Immunkompetenz. Sie produzieren anti-inflammatorische Faktoren, wie IL-10, IL-13 und TGF- β (Lu et

al., 2019). Hohe IL-10-Spiegel hemmen die Makrophagenaktivierung und Produktion von TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 und GM-CSF (Fiorentino et al., 1991). IL-10 inhibiert die MHC-II-Expression in aktivierten Makrophagen und somit die Antigenpräsentation (Chadban et al., 1998). M2-Makrophagen werden oft als Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) bezeichnet.

M2-TAMs unterstützen die Tumorprogression, indem sie die Angiogenese, Metastasierung und die Immunsuppression fördern (Kubota et al., 2017):

- **Angiogenese:** Zur Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen ist die Neubildung von Gefäßen erforderlich. TAMs sezernieren pro-angiogene Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie VEGF, TNF- α , IL-8 und den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) (Lewis and Pollard, 2006). Darüber hinaus exprimieren sie Angiogenese-modulierende Enzyme. Dazu zählen die Matrix-Metalloprotease-(MMP)-2, MMP-9 (Nakada et al., 2003) und die Cyclooxygenase-2 (Wang et al., 2019a, Hao et al., 2012).
- **Metastasierung:** TAMs spielen auch bei der Freisetzung metastatischer Zellen aus der Ursprungslokalisierung eine Rolle (Lewis and Pollard, 2006). Die Metastasierung wird durch von TAMs sezernierte Chemokine, MMPs und Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- α) gefördert (Mantovani and Sica, 2010, Biswas and Mantovani, 2010). Außerdem erleichtert der durch TAMs getriggerte kontinuierliche Gewebeumbau den Tumorzellen eine Invasion in umliegende Gewebe (Solinas et al., 2009).
- **Immunsuppression:** Durch die Expression von PGE2 und IL-10 verlieren TAMs ihre tumoriziden Fähigkeiten (Elgert et al., 1998). PGE2 und IL-10 hemmen die Funktion von T-Zellen und anderen Effektorzellen des Immunsystems (Elgert et al., 1998). Zusammen mit der hypoxischen Hemmung der Makrophagen-Phagozytose und der Antigenpräsentation wird die adaptive Immunantwort gegen den Tumor unterdrückt.

Kürzlich wurde gezeigt, dass die Tumor-assoziierte Immunevasion auf einer verminderten Toll-like receptor 4 (TLR4) Expression in GBM-Zellen und TAMs zurückzuführen ist. Resistendere GBMs zeigten im Vergleich zu empfindlichen Zellen eine geringere TLR4-Expression (da Cruz et al., 2021).

Die Dominanz des M2-Subtyps in der Tumormikroumgebung weist auf die Rolle der TAMs in der Tumorgenese hin (Lu et al., 2019). Wichtige M2-Makrophagen-Marker sind CD163 und CD204 (Komohara et al., 2008).

Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1 (MSR1/CD204)

MSR1 ist an verschiedenen Stoffwechselprozessen (Adhäsion, Phagozytose, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, Wirtsabwehr) von Makrophagen beteiligt (Kelley et al., 2014).

Die Invasion durch MSR1⁺-Makrophagen korreliert mit der Progression und Prognose von Gliomen (Komohara et al., 2008), Ovarialepithel- (Kawamura et al., 2009) und Pankreastumoren (Kurahara et al., 2011). Die MSR1-Expression nimmt mit dem Alter und dem Gliomgrad zu; Wildtyp-*IDH*-Gliome zeigen eine MSR1-Überexpression (Yuan et al., 2019). MSR1 korreliert mit der Expression von T-Zellimmunglobulin und Mucin-Domäne-3-Protein (TIM-3) und PD-1 auf T-Zellen, was auf einen möglichen Effekt dieser Proteine auf die Hemmung der T-Zellfunktion beim Gliom hinweist (Yuan et al., 2019).

Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor (CD163)

Das Makrophagen-spezifische Protein CD163 eignet sich aufgrund seiner hohen Expression beim Wechsel zum alternativen M2-Phänotyp als Entzündungsbio-marker (Etzerodt and Moestrup, 2013). CD163 bindet an Hämoglobin/Haptoglobin-Komplexe und spielt eine wesentliche Rolle bei deren Eliminierung und bei der Induktion der angeborenen Immunantwort (Kristiansen et al., 2001). Durch das Abfangen des oxidativen und pro-inflammatorischen Hämoglobins, das zur Stimulation der Hämoxxygenase-1 und zur Produktion von entzündungshemmenden Häm-Metaboliten führt, trägt CD163 zur Entzündungshemmung bei (Etzerodt and Moestrup, 2013). Die CD163-Expression wird durch Glukokortikoide (Schaer et al., 2002) und durch das anti-inflammatorische IL-10 induziert (Sulahian et al., 2000). Laut präklinischen Befunden hemmt der Verlust der CD163-Expression die Proliferation von Gliomzellen (Chen et al., 2019). Die

CD163-Expression auf TAMs korreliert mit einer schlechteren Prognose bei Gliomen (Liu et al., 2019). Daher ist ein Targeting von CD163⁺-Makrophagen ein möglicher Ansatz für eine GBM-Therapie.

1.3 Immuntherapeutische Strategien

1.3.1 Modulation Tumor-assoziiierter Makrophagen (TAMs)

Das Ziel einiger immuntherapeutischer Strategien ist die Verringerung der Anzahl der TAMs oder die Förderung des pro-inflammatorischen, tumorsuppressiven M1-Phänotyps (Majety et al., 2018).

Der CSF-1R spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der TAMs. Eine Fehlregulation des CSF-1R-Signalwegs wird bei vielen Tumoren mit einer Tumorprogression und Immunsuppression in Verbindung gebracht (Cannarile et al., 2017). Laut Pyonteck et al. (2013) leitet die CSF-1R-Hemmung die Differenzierung in Richtung M1-Phänotyp ein, wodurch in Maus-Modellen das Wachstum und die Progression von Gliomen inhibiert wird. In einer Phase-II-Studie erwies sich ein CSF-1R-Inhibitor bei Patienten mit progredientem GBM jedoch als unwirksam (Butowski et al., 2016).

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg wird in progredienten GBMs durch den von TAMs produzierten Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) und den IGF-1R auf Tumorzellen aktiviert. Die Kombination einer IGF-1R-/PI3K- und CSF-1R-Hemmung verlängerte in Maus-Modellen das OS bei progredienten Tumoren signifikant (Quail et al., 2016).

An den intrazellulären Signalen, die zur Entwicklung des M2-Phänotyps in TAMs führen, ist NF-κB beteiligt. Die Inaktivierung des NF-κB-Wegs erhöhte in präklinischen Studien die tumorizide Aktivität der TAMs signifikant (Achyut et al., 2017). In GBM-Maus-Modellen sank in TAMs die Produktion der M2-Aktivierungsmarker (IL-10, Arg1), während die Expression der Marker der M1-Aktivierung (IL-12, induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS)) anstieg (Achyut et al., 2017).

Bei dem von Makrophagen und DCs exprimierten CD40 handelt es sich um ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie. Nach Bindung an den von T-Zellen, Basophilen und Mastzellen exprimierten Liganden CD40L erhöht sich die Expression von MHC-Molekülen und die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wodurch die T-Zellaktivierung gefördert wird (Belgiovine et al., 2020, van Kooten and Banchereau, 2000). Eine erhöhte Expression von CD40/CD40L ist bei GBM-Patienten mit einer guten Prognose assoziiert (Chonan et al., 2015). In einem Gliom-Mausmodell steigerte eine Behandlung mit einem Anti-CD40-Ab die Apoptose der Gliomzellen und die Infiltration von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in den Tumor (Shoji et al., 2016).

Die CD47-Hemmung fördert die Phagozytose von Tumorzellen durch Makrophagen. Gliomzellen und Gliomstammzellen zeigen eine starke CD47-Expression (Li et al., 2018a). Die Bindung von CD47 an das Signalregulierende Protein alpha (SIRP α) auf Makrophagen löst eine Signalkaskade aus, die die Makrophagen-vermittelte Tumorzellphagozytose hemmt (Zhang et al., 2020). Eine CD47-Blockade verzögert das Gliomwachstum und verlängert das OS in Mausmodellen (Li et al., 2018a). In vivo fördert eine Anti-CD47-Ab-Behandlung die Entwicklung in Richtung M1-Phänotyp (Zhang et al., 2016).

Chemokine und Chemokinrezeptoren (CCR) spielen bei der Tumorentwicklung, beim Tumorwachstum und bei der Angiogenese eine wichtige Rolle. CCR5 wurde in verschiedenen Krebsmodellen untersucht. In humanen GBMs korreliert eine hohe CCR5-Expression mit einer schlechten Prognose. Die CCR5-Blockade hemmt die Expression der M2-Phänotyp-Marker Arg1 und IL-10 und steigert die Expression der M1-Phänotyp-Marker NO und IL-1 β (Laudati et al., 2017).

Makrophagen sind aufgrund ihrer Präsenz in der Tumormikroumgebung und ihrer potenziellen Anti-Tumoreffekte vielversprechende Zielzellen für die Entwicklung innovativer therapeutischer Strategien. Dazu müssen im Vorfeld die Mechanismen der Effekte dieser Zellen im Tumorkontext aufgeklärt werden.

1.3.2 Inhibition der CTLA-4 / PD-1 vermittelten Immunflucht

Als Immuncheckpoints (ICs) werden T-Lymphozyten-Rezeptoren bezeichnet, die die Immunantwort der Zellen dämpfen (anti-inflammatorische ICs) oder steigern (pro-inflammatorische ICs) (Lanuza et al., 2019). Die Immunresistenz verschiedener Tumoren gegen Tumorantigen-spezifische T-Zellen beruht primär auf IC-Signalen (Pardoll, 2012b). Bisher wurden zwei ICs identifiziert, die bei Immunfluchtmechanismen von Tumoren eine Rolle spielen. CTLA-4 (CD152) und PD-1 (CD279) hemmen beide die T-Zellaktivierung (Calinescu et al., 2015).

Die CTLA-4-Wirkung tritt früh während der Immunreaktion in erster Linie in sekundären lymphoiden Organen auf, der PD-1-Effekt dagegen während die Effektorphase direkt in der Tumormikroumgebung (Calinescu et al., 2015).

CTLA-4 ist ein inhibitorischer T-Zellrezeptor, der an B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf der Oberfläche von APCs oder Tumorzellen bindet (s. Abb. 1), deren Bindung an den kostimulatorischen T-Zellrezeptor CD28 antagonisiert und damit die T-Zellproliferation und Zytokinproduktion hemmt (Chambers et al., 2001) (Huang et al., 2017). Anders als das konstitutiv von T-Zellen exprimierte CD28 (in 90 % der CD4⁺- und 50 % der CD8⁺-T-Zellen) wird CTLA-4 nur in aktivierten konventionellen T-Zellen und CD4⁺/FoxP3⁺-Tregs gefunden (Huang et al., 2017). CTLA-4 hat im Vergleich zu CD28 eine 10- bis 20-fach höhere Affinität zu B7-1/B7-2 (Brzostek et al., 2016). Das Verhältnis von CD28/B7-Bindung zu CTLA-4/B7-Bindung bestimmt, ob eine T-Zelle aktiv oder anergisch wird (Krummel and Allison, 1995).

PD-1 ist ein Oberflächenprotein von aktivierten T-Zellen (Kelly et al., 2020). Bei Bindung des PD-L1 wird die TCR-Signalübertragung und in Folge die T-Zellproliferation und -aktivierung gehemmt (Kelly et al., 2020). Mikrogliazellen, Astrozyten, Oligodendrozyten, Makrophagen, DCs, Neuronen und eine Vielzahl anderer nicht hämatopoetischer Zelltypen einschließlich mikrovaskulärer Endothelzellen sowie Epithelzellen können PD-L1 exprimieren (Chauhan and Lokensgard, 2019). Die Aktivierung des Toll-like Receptors (TLR), EGFRs, IFN- α -Rezeptors (IFNAR) und IFN- γ -Rezeptors (IFNGR) verstärkt die PD-L1-Expression in GBM-Zellen (Litak et al., 2019).

In präklinischen Untersuchungen mit Anti-CTLA-4-Antikörpern an primären Hirntumoren kam es zu einer signifikanten OS-Verlängerung. Die Verabreichung von Anti-CTLA-4-Antikörpern führte bei 80 % der immunkompetenten Mäuse mit syngenen intrakraniellen SMA-560-Tumoren zu einem langfristigen OS. Die Behandlung normalisierte die systemischen CD4⁺-T-Zellzahlen und verringerte die Anzahl der Tregs (Fecci et al., 2007).

In präklinischen Gliomstudien verdoppelte eine Behandlung aus Anti-PD-1-Antikörpern und RT das mediane OS verglichen mit einer RT allein. Unter Kombinationsbehandlung zeigte die Tumormikroumgebung eine erhöhte CTL-Infiltration (CD8⁺/IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺) und verminderte Treg-Infiltration (CD4⁺/FoxP3) im Vergleich zur Einzeltherapie (Zeng et al., 2013).

Nach vielversprechenden Ergebnissen der IC-Blockade bei Nicht-ZNS-Tumoren untersuchten die Studien CheckMate-143, -498 und -548 die IC-Hemmung in GBMs.

Die erste große klinische Phase III Studie am Menschen mit Anti-PD-1 (CheckMate 143) verglich die Wirksamkeit von Nivolumab (Anti-PD-1-Antikörper) \pm Ipilimumab (Anti-CTLA-4-Antikörper) sowie Bevacizumab (Anti-VEGF-Antikörper) bei Patienten mit progredientem GBM (Reardon et al., 2017). Bei 10 % der Patienten im reinen Anti-PD-1-Arm und bei 20–30 % der Patienten im Anti-PD-1- + Anti-CTLA-4-Arm traten unerwünschte Wirkungen Grad 3 oder 4 auf, so dass der kombinierte Therapiearm beendet wurde (Omuro et al., 2018). Bei progredientem GBM bestand kein signifikanter Unterschied beim OS nach einer Anti-PD-1- (9,8 Monate) und Bevacizumab-Therapie (10 Monate) (Filley et al., 2017).

CheckMate-498 und -548 untersuchen den Effekt von Nivolumab (Anti-PD-1-Antikörper) bei neu diagnostiziertem GBM mit nicht-methyliertem bzw. methyliertem *MGMT*-Promotor. Die Phase-III-Studie CheckMate 498 fand keinen Unterschied in der klinischen Wirksamkeit einer Nivolumab- + RT-Therapie im Vergleich zu einer TMZ- + RT-Therapie (n ~ 275 pro Arm). Die Phase II Studie CheckMate-548 verglich die Therapiearme Anti-PD-1 + TMZ + RT und TMZ + RT bei neu diagnostizierten GBM-Patienten mit methyliertem *MGMT*-Promotor (n ~ 160 pro Arm). Vor

Veröffentlichung der Daten gab Bristol-Myers Squibb im September 2019 bekannt, dass die Triple-Therapie mit Anti-PD-1 beim PFS keinen Vorteil zeigte (Medikonda et al., 2020). Diese Studie wird wie geplant fortgesetzt, um das OS als weiteren Endpunkt auszuwerten.

Zusammenfassend scheint die Therapie mit einem einzelnen IC-Inhibitor keinen klaren Vorteil zu bieten. Folglich bieten sich Analysen mit Kombinationstherapien an.

1.3.3 Tumor-spezifische- (TSA) und Tumor-assoziierte (TAA) Antigene

Eine weitere Form der Immuntherapie zielt darauf ab, selektiv Tumorzellen zu zerstören (Srinivasan et al., 2017). Ein wesentlicher Schritt zur Entwicklung immuntherapeutischer Strategien gegen maligne Gliome ist die Identifizierung geeigneter Zielstrukturen. Ein ideales Ziel für die Immuntherapie ist ein für den Tumor spezifisches Protein, das stabil exprimiert wird, in normalen Geweben fehlt und für das Überleben der Krebszelle entscheidend ist (Grauer et al., 2009). Solche TSA werden auf der Tumorzelloberfläche exprimiert und im Komplex mit MHC-I-Molekülen von TSA-spezifischen TCR erkannt (Jiang et al., 2019). TSA basieren auf genetischen Varianten wie Einzelnukleotidaustauschen, Insertionen und Deletionen, Genfusionen, Frameshift-Mutationen und Strukturvarianten (Jiang et al., 2019). Beispiele für TSA in GBMs sind die EGFR Variante III (*EGFRvIII*) und *IDH-1* (McGranahan et al., 2017).

Im Gegensatz zu TSA werden TAA nicht exklusiv auf der Tumorzelloberfläche exprimiert, sondern in geringen Mengen auch in gesunden Geweben (Jiang et al., 2019). Bei TAA handelt es sich um auf Tumorzellen amplifizierte Genprodukte (EGFR, Survivin, Ephrin-A2, IL-13R α 2) oder Differenzierungsantigene (gp100, Wilm's Tumorgen 1 (WT1)). Krebs-Keimbahn-Antigene (CGA, z. B. Melanoma Antigen A1/A3 (MAGE-A1/A3)) finden sich auf der Tumorzelloberfläche und in Gewebe von Fortpflanzungsorganen (einschließlich Hoden, fetale Eierstöcke und Trophoblasten) (McGranahan et al., 2017). Bei einer Expression in normalen Geweben kann ein therapeutisches Targeting zu schweren Autoimmuntoxizitäten

führen (z. B. Hepatitis, Kolitis, Atemversagen, Nierenfunktionsstörung, Tod) (Jiang et al., 2019).

Die auf die Zerstörung der Tumorzellen abzielende Immuntherapie umfasst sowohl passive als auch aktive Strategien. Bei der passiven Immuntherapie werden Ab, Immunzellen oder andere Komponenten des Immunsystems verwendet, um Tumorzellen anzugreifen (Wilson et al., 2014). Dieser Ansatz erfordert keine Aktivierung des nativen Immunsystems des Patienten. Die Immunzellen werden in vitro aktiviert und dem Patienten injiziert (Thomas et al., 2012). Übertragene Immuneffektoren wirken sofort, erzeugen jedoch keine langfristige Immunität (Clarke et al., 2010). Zu den passiven Immuntherapeutika zählen monoklonale Ab (mAb), Zytokin-vermittelte Therapien und adoptive Zelltransferansätze (Thomas et al., 2012). Eine aktive Immuntherapie zielt darauf ab, die native Immunantwort des Patienten gegen den Tumor zu stimulieren. Die dadurch potenziell erzielte langfristige Immunität bietet möglicherweise auch Schutz vor einer Tumorprogression (Clarke et al., 2010). Die aktive Immuntherapie umfasst Peptid- und zellbasierte Ansätze (Wilson et al., 2014). Die Therapeutika werden oft als Krebsimpfstoffe bezeichnet.

1.3.4 Passive Immuntherapie

Eine mögliche Strategie der passiven Immuntherapie zur Zerstörung der Tumorzellen ist die direkte Injektion von mAb. Man unterscheidet nackte und mit Chemotherapeutika, bakteriellen Toxinen oder Radionuklide konjugierte mAb (Chandramohan et al., 2013).

Für das GBM wurde bislang nur ein humanisierter mAb (Bevacizumab/Avastin) gegen VEGF zugelassen, der die Tumorangiogenese beeinflusst. Bevacizumab erhielt 2009 von der US-amerikanischen FDA eine Zulassung für progrediente GBMs. Bei Patienten mit neu diagnostiziertem GBM, die zusätzlich zur Standard-Therapie (RT+TMZ) Bevacizumab erhielten, konnte in einer Meta-Analyse eine Verlängerung des OS und der 6-Monats-Überlebensrate nicht nachgewiesen werden (Fu et al., 2016). In einer weiteren Studie zur Analyse der Wirksamkeit von Bevacizumab auf die Lebensqualität zeigten Patienten, die Bevacizumab +

RT/TMZ (n = 461) erhielten, im Vergleich zu Patienten, die Placebo + RT/TMZ bekamen (n = 461), signifikant häufiger (66,8 % vs. 51,3 %) schwerwiegende unerwünschte Ereignisse \geq Grad 3 (Chinot et al., 2014).

Ein weiteres potenzielles therapeutisches Ziel bei GBMs ist der EGFR. Ungefähr 40 % aller GBMs zeigen eine Amplifikation des *EGFR*-Gens und circa 50 % tragen die *EGFRvIII*-Variante mit einer In-Frame-Deletion der Exons 2–7. Diese Variante führt zu einer konstitutiven EGFR-Aktivierung (Nejo et al., 2020). Die EGFRvIII-Überexpression in GBM-Zellen fördert das Tumorstadium über die Stimulation der Tumorzellproliferation, der Induktion der Angiogenese und CT-Resistenzmechanismen (Du et al., 2019). Eine bei der Erstdiagnose eines GBM auftretende *EGFR*-Amplifikation bleibt bei einer Progression meist erhalten; der *EGFRvIII*-Status bei GBMs mit *EGFR*-Amplifikation kann sich jedoch bei der Progression ändern (Felsberg et al., 2017).

Bislang wurden chimäre (Cetuximab), humanisierte (Nimotuzumab) und vollständig humane (Panitumumab) gegen die extrazelluläre Domäne des EGFR gerichtete mAb entwickelt. In klinischen Studien erwies sich Cetuximab bei progredienten GBMs weder als Einzelwirkstoff (Neyns et al., 2009) noch in Kombination mit Bevacizumab und Irinotecan (Hasselbalch et al., 2010) oder einer RT (Combs et al., 2006) als wirksam und wurde daher klinisch nicht über die Phase II hinaus entwickelt. Nimotuzumab besitzt eine geringere Affinität als Cetuximab und bindet somit spezifischer an EGFR-überexprimierende Zellen (Westphal et al., 2017). In einer Phase III-Studie war das mediane OS von Patienten in der Nimotuzumab-Gruppe (Nimotuzumab + Standard-TMZ/RT \rightarrow TMZ) und in der Kontrollgruppe (Standard-TMZ/RT \rightarrow TMZ) nicht signifikant verschieden (22,3 vs. 19,6 Monate) (Westphal et al., 2015). Panitumumab hat sich bislang bei kolorektalen Karzinomen als wirksam erwiesen (Li et al., 2018b). Untersuchungen zur Anwendung bei malignen Gliomen fehlen bisher weitgehend.

Eine mögliche Erklärung für die begrenzte Wirksamkeit von EGFR-mAb bei systemischer Verabreichung ist die Blut-Hirn-Schranke, über die nur $< 0,5$ % der zirkulierenden Ab das Gehirn erreichen (Hicks et al., 2016). Eine Phase-I-Studie mit einer selektiven intraarteriellen cerebralen Infusion (SIACI) von Cetuximab nach

osmotischer Störung der Blut-Hirn-Schranke mit Mannit in Patienten mit progredientem malignem Gliom ergab akzeptable Sicherheits- und Verträglichkeitsprofile (Chakraborty et al., 2016); Derzeit laufen Phase-I/II-Studien bei neu diagnostiziertem und progredientem GBM (NCT02861898, NCT01238237).

Nackte Ab reichen möglicherweise für eine starke Anti-Tumor-Reaktion nicht aus. Beim Drug-Targeting werden potentere Wirkstoffe an Trägermoleküle (z. B. Ab, Zytokine, lösliche Rezeptormoleküle) gekoppelt. Mithilfe von TSA-Ab sollen Wirkstoffe spezifisch zu den Tumorzellen geleitet werden, um diese gezielt abzutöten und das gesunde Gewebe zu schonen und damit Nebenwirkungen zu reduzieren. Als Wirkstoffe werden Radionuklide, Toxine, Zytostatika oder Zytokine an den Ab gebunden. Die häufigsten Konjugate in der mAb-Therapie enthalten Radionuklide (Chandramohan et al., 2013); bei Gliomen wird meist Iod-131 (¹³¹I) genutzt (Loya et al., 2019).

Eine große Phase-II-Studie untersuchte die Wirksamkeit einer adjuvanten Radioimmuntherapie mit ¹²⁵I-markiertem murinem mAb425 gegen den EGFR bei Patienten mit neu diagnostiziertem GBM. Die Gabe von ¹²⁵I mAb425, allein oder in Kombination mit TMZ zeigte eine gute Verträglichkeit und verlängerte das OS (14,5 bzw. 20,2 Monate) (Li et al., 2010).

Die bisherigen klinischen Studien mit bakteriellen Toxinen als Effektormoleküle in Ab-Konjugaten nutzten meist Diphtherietoxin oder Pseudomonas aeruginosa-Exotoxin A. Beide Toxine hemmen die Proteinsynthese. Nach Bindung an die Tumorzellen wird des Ab-Toxin-Konjugat endozytiert. Das in der Zelle freigesetzte Toxin kann die Apoptose der Krebszelle einleiten. Bei Immuntoxinen reicht ein Molekül zur Abtötung einer Krebszelle, bei Chemotherapeutika werden circa 10⁵ Moleküle benötigt. Daher sind solche Toxine im Vergleich zu herkömmlichen Chemotherapeutika wirksamer (Li and Hall, 2010).

Ab-Toxin-Konjugate können aufgrund ihrer Größe die Blut-Hirn-Schranke nur unzureichend passieren; bei systemischer Verabreichung besteht ein hohes Risiko für unerwünschte Nebenwirkungen. Daher wurden neue Applikationsmethoden entwickelt. Bei der Convection-enhanced delivery (CED) passieren die Therapeutika die Blut-Hirn-Schranke über ein Kathetersystem. Das Verfahren eignet

sich für Therapeutika mit schlechter Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität oder für Medikamente, bei denen eine systemische Exposition z. B. aufgrund der Toxizität nicht möglich ist (Shi and Sanche, 2019).

In der Phase-II-PRECISE-Studie wurde die Wirksamkeit von über eine CED appliziertes IL-13/Pseudomonas aeruginosa-Exotoxin A-Konjugat und Carmustin bei nach einer Tumorresektion progredientem GBM verglichen. Das PFS verlängerte sich durch die Behandlung mit dem Konjugat (17,7 vs. 11,4 Wochen); es wurde jedoch kein Unterschied im OS zwischen beiden Gruppen beobachtet (Kunwar et al., 2010). Auch die Nebenwirkungsprofile waren bis auf eine höhere Rate an Lungenembolien im CED-Arm vergleichbar (8 % vs. 1 %, $p = 0,014$). Die Wirksamkeit mittels CED-Technik verabreichter Immuntoxine ist bei einer ineffektiven Infusion stark eingeschränkt (Sampson et al., 2008).

Ein weiterer Ansatz der passiven Krebsimmuntherapie ist die Stimulation des Immunsystems mit Zytokinen. In diesem Kontext wurde die Wirksamkeit von IL-2 bei einer Vielzahl von Entitäten untersucht. Obwohl dieser Ansatz bei Melanomen und Nierenzelltumoren erfolgreich war, erwies er sich beim GBM als ungeeignet (Thomas et al., 2012).

Zur Erhöhung der Effektivität der Ab wurden bispezifische Ab entwickelt, die gleichzeitig Antigene auf der Tumorzelle und Antigene auf Effektorzellen des Immunsystems erkennen. Bei Applikation eines bispezifischen Ab gegen CD3 und EGFRvIII in einem Gliom-Mausmodell griffen die T-Zellen die Tumorzellen selektiv an, was zu einer Tumorregression und einem verlängerten OS führte (Choi et al., 2013, Gedeon et al., 2018). Ein potenzieller Einsatz dieses bispezifischen Ab bei Patienten wird derzeit untersucht (NCT02766699).

Bei einem alternativen immuntherapeutischen Ansatz werden TILs aus Patienten isoliert und kultiviert. Bei dieser adoptiven autologen T-Zellimmuntherapie erhalten die Patienten die TAS-spezifischen TILs nach einer klonalen Expansion zurück. Diese Therapie ist für immungeschwächte Patienten vorteilhaft, da sie die klonale Expansion der T-Zellen nach einer Antigenpräsentation überflüssig macht. Auch die Fähigkeit von T-Zellen, die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen, legt

nahe, dass diese Therapie bei Hirntumoren besonders wirksam sein könnte (Gust et al., 2017).

Vielversprechend ist auch der adoptive Zelltransfer von T-Zellen mit chimären Antigenrezeptoren (CARs). Bei der CAR-T-Immuntherapie werden modifizierte T-Zellen eingesetzt, die Krebszellen besser erkennen und effektiver zerstören können. CARs sind Fusionsproteine aus einer Antigenbindungsstelle eines mAb für ein TAA und der Signalaktivierungskomponente einer T-Zelle, was eine von TCR-MHC-Wechselwirkungen unabhängige T-Zellaktivierung erlaubt (Jain, 2018, Fecci and Sampson, 2019). Die intrazelluläre CAR-Domäne der ersten Generation enthält für die T-Zellaktivierung eine CD3 ζ -Kette, CARs der zweiten Generation zusätzlich eine intrazelluläre Domäne des kostimulierenden CD28. Bei CARs der dritten Generation wurden die CD28-Sequenzen durch Sequenzen eines Protein der TNF-Rezeptorfamilie (z. B. CD27, CD137, Inducible T-cell costimulator (ICOS), CD134, CD244) ergänzt, was die Proliferation und Persistenz von T-Zellen fördert (Wang et al., 2020).

Die FDA hat 2017 zwei CAR-T-Zell-basierte Therapien aufgrund beeindruckender Ergebnisse in Phase-II-Studien für B-Zell-Malignome zugelassen. Daraufhin wurde die Wirksamkeit der CAR-T-Zell-basierten Therapien auch bei GBMs untersucht.

Die Mehrzahl der GBM-Studien mit CAR-T-Zellen nutzt Antigenbindungsstellen für EGFRvIII, IL-13R α 2 oder für den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) (Fecci and Sampson, 2019). In einer Phase-I-Studie (NCT01109095) zeigten 17 Patienten mit progressivem HER2⁺-GBM nach intravenöser Verabreichung autologer HER2-CAR-T-Zellen der zweiten Generation keine schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse. In der Studienkohorte betrug das mediane OS 11,1 Monate (95%-Konfidenzintervall (KI), 4,1–27,2 Monate) ab der ersten T-Zellinfusion und 24,5 Monate (95%-KI, 17,2–34,6 Monate) ab der Diagnose (Ahmed et al., 2017). Eine Pilot-Studie zeigte potenzielle Vorteile der lokalen intraventrikulären Verabreichung von CAR-T-Zellen im Vergleich zur intrakavitären Verabreichung. In dieser Arbeit wurde mit einer CAR-T-Zelltherapie der dritten Generation (CD137) gegen den IL-13R α 2 bei einem Patienten (50

Jahre, nicht-methylierter *MGMT*-Promotor, *IDH*-Wildtyp) eine komplette Remission erzielt. Es traten keine Toxizitäten Grad ≥ 3 auf. Das klinische Ansprechen hielt 7,5 Monate nach Beginn der CAR-T-Zelltherapie an; anschließend entwickelten sich vier neue Läsionen (Brown et al., 2016). Die Autoren spekulierten, dass dieser Rückfall auf eine verminderte Expression des IL-13R α 2 zurückzuführen sein könnte, die durch den selektiven Druck der CAR-T-Zelltherapie verursacht wurde. Laut O'Rourke et al. (2017) zeigten Patienten mit progredientem GBM nach einer Therapie mit EGFRvIII-CAR-T-Zellen der zweiten Generation eine verstärkte Immunsuppression, einschließlich einer erhöhten Expression von PD-L1, Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) und IL-10.

Der insgesamt begrenzte klinische Nutzen einer Einzelepitop-CAR-T-Zelltherapie ist vermutlich auf die inter- und intratumorale Heterogenität zurückzuführen (Salinas et al., 2020). Eine CAR-T-Zelltherapie, die auf drei Gliomantigene (IL-13R α 2, HER2, Ephrin-A2) abzielt, tötete fast 100 % der Tumorzellen in einem präklinischen GBM-Modell ab (Bielamowicz et al., 2018). Es bleibt abzuwarten, ob dreiwertige CARs in der Klinik über ausreichende Anti-Tumor-Effekte verfügen. Trotz vielversprechender Ergebnisse bei einigen malignen Tumoren, sind mögliche schwerwiegende, unbehandelt zum Teil letale Toxizitäten (z. B. Zytokin-Freisetzungssyndrom, das Immuneffektorzell-assoziierte Neurotoxizitätssyndrom) zu berücksichtigen (Sievers et al., 2020).

1.3.5 Aktive Immuntherapie – Krebsimpfstoffe

Aufgrund der GBM-Heterogenität sind individualisierte Immuntherapien dringend erforderlich. Aktuell liegt der Fokus der Forscher auf der Entwicklung von Impfstoffen gegen GBMs.

In der aktiven Immuntherapie werden verschiedene GBM-assoziierte Antigenquellen (z. B. intakte Tumorzellen, Tumorzelllysate, Tumorpeptide, mRNA, synthetische Peptide) verwendet (Vauleon et al., 2010). Die Therapieansätze umfassen somit peptid- und zellbasierte Strategien. Bei peptidbasierten Therapien erhält der Patient GBM-verwandte Antigene als Impfstoff. Diese Antigene werden

von DCs internalisiert und den Immuneffektorzellen präsentiert, um eine Immunantwort zu stimulieren (Wilson et al., 2014). Bei zellbasierten Therapien werden APCs (z. B. DCs) mit Tumorantigenen ex vivo inkubiert und anschließend dem Patienten injiziert. Die spezifische Antigenpräsentation führt zur Amplifikation tumorspezifischer T-Zellantworten (Srinivasan et al., 2017).

Peptidbasierte Therapien

Die bislang umfangreichste Studie mit Peptidimpfstoffen verwendete als Antigen den EGFRvIII (Rindopepimut). Die randomisierte, doppelblinde Phase-III-Studie ergab jedoch keinen Überlebensvorteil für Patienten mit neu diagnostiziertem GBM (medianes OS 20,1 Monate in der Rindopepimut + TMZ-Gruppe vs. 20,0 Monate in der TMZ-Kontrollgruppe) (Weller et al., 2017). Ein Problem bei Einzelpeptid-Impfungen ist die Entwicklung von für das Impfstoff-Antigen negativen Tumorzellen; in den EGFRvIII-Studien wurde bei 82 % der Patienten ein EGFRvIII-negatives Tumorprogression beobachtet (Sampson et al., 2010).

Da das GBM immunologisch als resistenter Tumor mit nur wenigen therapeutisch nutzbaren spezifischen Antigenen gilt, sind neue personalisierte Immuntherapien erforderlich. In einer klinischen Phase-I-Studie wurde eine aktive personalisierte Impfung (APVAC) untersucht, die nicht nur auf der Sequenzierung des gesamten Exoms basierte, sondern auch HLA-Ligandom-Analysen beinhaltete, die einen Einblick in die Präsentation relevanter Epitope in individuellen Tumoren gaben. 15 neu diagnostizierte GBM-Patienten erhielten neben der Standardtherapie zwei therapeutische Impfstoffe. Zunächst wurde ein aktiver personalisierter, auf nicht mutierte Antigene abzielender Impfstoff 1 (APVAC1) verabreicht, gefolgt von APVAC2, der bevorzugt auf TSA abzielte. Bei Patienten mit beiden APVAC-Impfungen betrug das mediane OS 29 Monate nach der Diagnose; zwei Patienten entwickelten anaphylaktische Reaktionen und Hirnödeme. Nicht mutierte APVAC1-Antigene induzierten anhaltende CD8⁺-T-Zellantworten, APVAC2 Th1-CD4⁺- sowie CD8⁺-T-Zellantworten. Insgesamt zeichnete sich die Behandlung durch ein günstiges Sicherheitsprofil und eine hohe biologische Aktivität aus, die eine weitere Entwicklung rechtfertigen (Wick et al., 2018).

In einer klinische Phase-I/II-Studie verbesserte eine Gabe von IMA-95 (Multi-Peptid-Impfstoff aus neun Gliom-assoziierten CD8-Peptiden und zwei Tumor-assoziierten CD4-Peptiden) trotz des Anstiegs der CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen das OS in Kombination mit Polyribonucleosin-Polyribocytidylsäure-Polylysin-Carboxymethylcellulose und TMZ-Behandlung nicht signifikant (21,2 Monate) (Dutoit et al., 2017). Die fehlende Korrelation zwischen der Prognose und der peripheren Immunantwort bei einer Therapie mit Peptidimpfstoffen deutet auf eine gestörte Interaktion zwischen peripheren Immunzellen und GBM-Zellen aufgrund der immunsuppressiven Tumormikroumgebung hin (Dutoit et al., 2017).

Das zu erwartende Potenzial personalisierter Impfstofftherapien bei der Inhibition der Tumorprogression rechtfertigt weitere Untersuchungen. Eine derzeit durchgeführte klinische Studie analysiert eine Kombination aus personalisierten Peptidimpfstoffen und IC-Inhibitoren (NCT03422094).

Zellbasierte Therapien

Beim zellbasierten Ansatz der Immuntherapie werden meist DCs zur Stimulierung des Immunsystems eingesetzt. DCs präsentieren antigene Peptide sowohl über MHC-II- als auch über MHC-I-Moleküle und aktivieren daher CD4⁺-Th-Zellen, und CD8⁺-CTLs (Dudek et al., 2013). Da DCs auch NK-Zellen aktivieren, ist für den cytotoxischen Effekt gegenüber Tumorzellen der MHC-I nicht zwingend erforderlich (Van Gool et al., 2009). Durch die Stimulation der NK-Zellen lässt sich auch die immunsuppressive Tumormikroumgebung überwinden. Anders als T-Lymphozyten erkennen NK-Zellen Tumorzellen nicht über Antigen-MHC-I-Komplexe. Vielmehr detektieren sie eine verminderte Expression der MHC-Moleküle auf Tumorzellen und leiten die Apoptose ein. Dieses Prinzip wird Missing-self-Hypothese genannt (Kärre, 2002). Aus Monozyten differenzierte DCs werden typischerweise durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 kultiviert und ex vivo mit Tumor-assoziierten Peptiden aktiviert. Nach der Reifung unter dem Einfluss verschiedener Zytokine (IL-1 β , TNF α , PGE2, IFN- γ) erhalten die Patienten die Zellen zurück (Kong et al., 2018).

Die Ergebnisse einer randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten klinischen Phase-III-Studie mit einem autologen Tumor-Lysat-gepulsten dendritischen Zellimpfstoff (DCVax-L) (integriert in die Standardtherapie) bei neu diagnostiziertem GBM waren positiv. Das Ausmaß der T-Zellinfiltration korrelierte mit dem klinischen Überleben (Liau et al., 2018). Das mediane OS betrug 23,1 Monate; 25,4 % der Patienten überlebten > 3 Jahre nach der Operation. Die Therapie wurde gut vertragen; nur 2,1 % der Patienten zeigten Nebenwirkungen Grad ≥ 3 (Liau et al., 2018).

Eine klinische Phase-I-Studie mit sieben GBM-Patienten, die zusätzlich zur Standardtherapie mit mRNA autologer Stammzellen transfizierte DCs erhielten, ergab ähnliche Ergebnisse bezüglich des OS (23 Monate) (Vik-Mo et al., 2013).

Der klinisch am weitesten fortgeschrittene Impfstoff auf DC-Basis ist ICT-107, der durch eine Exposition autologer DCs von Patienten gegenüber verschiedenen Antigenen (HLA-A1-Antigene: Melanoma Antigen A1 (MAGE-A1), Absent in Melanoma 2 (AIM-2); HLA-A2-Antigene: gp100, HER2, IL-13R α 2, Tyrosinase related protein 2 (TRP-2)) erzeugt wurde. Über 90 % der Patienten exprimierten alle HLA-A2-Antigene. In einer doppelblinden randomisierten, Placebo-kontrollierten Phase-II-Studie bei Patienten mit neu diagnostiziertem GBM nach Resektion und RT + TMZ-Behandlung wurde ICT-107 gut vertragen. Das mediane OS war zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden (17 Monate vs. 15 Monate; $p = 0,58$), jedoch erhöhte sich das PFS in der Impfstoffgruppe signifikant (11,2 Monate vs. 9 Monate; $p = 0,011$). Die Immunaktivierung durch den Impfstoff manifestierte sich in IL-12- und IFN- γ -Antworten (Wen et al., 2019).

Neben zellulären Proteinen exprimieren GBMs auch Cytomegalovirus-Proteine, die ein potenzielles Ziel für DC-Impfstoffe darstellen. In einer klinischen Phase-I-Studie wurden elf Patienten nach Resektion und Radiochemotherapie mit DCs geimpft, die mit der mRNA für das Cytomegalovirus pp65-Lysosomen-assoziierte-Membranglykoprotein transfiziert waren. Diese Patienten zeigten ein medianes OS von 41,1 Monaten. Die auftretenden Nebenwirkungen konnten nicht auf

die zelluläre Komponente der Behandlung zurückgeführt werden (Batich et al., 2017).

DC-Impfstoffe gegen GBM-spezifische Proteine zeigen ein großes klinisches Potenzial, müssen jedoch für die Etablierung in der klinischen Praxis in größerem Maßstab evaluiert werden.

1.4 Zielsetzung

Der Krankheitsverlauf, das Ansprechen des Tumors auf eine CT und RT und die Prognose hängen beim GBM stark von der Tumormikroumgebung und von den Eigenschaften der Tumor-infiltrierenden Zellen ab. Aufgrund der hohen Therapieresistenz des GBMs und dem trotz multimodaler Therapien eingeschränkten OS der Patienten liegt der Fokus der medizinischen GBM-Forschung auf der Suche nach spezifischen Zielstrukturen, um das Outcome der Therapien zu verbessern.

Die Unterschiede in der Tumormikroumgebung bei erstmals diagnostiziertem und progredientem GBM und eine potenzielle Assoziation dieser Unterschiede mit der Tumorprognose wurden bislang kaum erforscht. Vorhandene Studien beschränken sich meist auf eine Analyse der Infiltration von Immunzellen bei neu diagnostiziertem GBM. Studien zu progredientem GBM bzw. Vergleiche zwischen neu diagnostiziertem und progredientem GBM unter Verwendung gepaarter Proben (Matched-pairs) derselben Patienten fehlen bislang.

In der präsentierten retrospektiven Kohorte aus Matched-pairs Gewebeproben von neu diagnostizierten und progredienten GBMs soll die Expression von TIL-Markern (CD3, CD4, CD8), TAM-Markern (CD163, MSR1) sowie von IC-Inhibitoren (PD-1, CTLA-4, PD-L1) analysiert werden.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- Unterscheiden sich die Expressionsprofile der TIL-, TAM- und IC-Marker in neu diagnostizierten und korrespondierenden progredienten GBMs?
- Unterscheiden sich die Expressionsprofile der TIL-, TAM- und IC-Marker zwischen verschiedenen Patienten?

- Bestehen Korrelationen zwischen den Expressionsprofilen der TIL-, TAM- und IC-Marker in neu diagnostizierten Tumoren und den Änderungen dieser Expressionsprofile von der Erstdiagnose bis zur Progression der Tumoren?
- Welchen Einfluss haben die Expression der TIL-, TAM- und IC-Marker in neu diagnostizierten Tumoren sowie die Änderung dieser Marker im Krankheitsverlauf bis zur ersten Tumorprogression auf das PFS?

2 Material und Methodik

2.1 Patientenkollektiv

2.1.1 Gewebeproben

Alle Patienten, die in der Neurochirurgie Tübingen an einem GBM operiert wurden (2008–2017), wurden in die Datenbank erfasst. Bei den Patienten wurden das Alter bei der Diagnose, die Lokalisation des Hirntumors, Symptome, das Operationsdatum, das Resektionsausmaß (partiell, komplett), die Therapieform und die supportive Therapie, das PFS, die Therapieform nach der Progression, der *IDH*-Status (Mutationen im *IDH-1*- oder *-2*-Gen) und eine potenzielle *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung erfasst.

In die vorliegende retrospektive Matched-pairs Kohortenstudie wurden alle Patienten aufgenommen, von denen Tumorgewebe von der Erstdiagnose und der ersten Progression im Archiv vorhanden war ($n = 45$). Die Gewebe wurden im Rahmen der neurochirurgischen Resektion entnommen. Das Gewebe wurde anschließend zur neuropathologischen Begutachtung in die Abteilung Neuropathologie der Universität Tübingen verbracht und in Paraffin eingebettet archiviert. Alle Proben wurden gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation von Tumoren des ZNS als GBM, *IDH*-Wildtyp, WHO-Grad IV klassifiziert.

Für die Tissue Microarrays (TMA) und immunhistochemische Färbung mit acht Ab wurden von den in Paraffin eingebetteten korrespondierenden Tumorgewebspaaren (Erstdiagnose/erste Progression) jeweils zwei Gewebeproben entnommen ($2 \times 2 \times 8 = 32$). Bei 45 Patienten waren das insgesamt 1440 Gewebeproben. Die Herstellung der TMA-Schnitte erfolgte durch eine Arbeitsgruppe des Hertie-Instituts in Tübingen. Die Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten TMA-Schnitte wurden auf dem Ventana Benchmark XT gefärbt.

Aufgrund unzureichend vorhandener Gewebe auf manchen TMA-Schnitten konnten die Proben von zwölf Patienten nicht ausgewertet werden. In die Matched-pairs Auswertung gingen somit 1056 Proben (33 Patienten \times 32 immunhistochemische Färbungen) ein. Bei den inkludierten Matched-pairs Patientenproben ($n = 33$) wurden die immunhistochemischen Profile der TILs (CD3, CD4,

CD8), der TAMs (CD163, MSR1) sowie der ICs (CTLA-4, PD-L1, PD-1) in beiden Stadien erfasst.

Die Verwendung von menschlichem Patientenmaterial wurde von der örtlichen Ethikkommission genehmigt (Nummer 077/2016BO2).

2.1.2 Charakteristika des Gesamtkollektivs – Alter, Geschlecht, Therapieform, Zeit bis zur Progression des GBMs

Die Kohorte der retrospektiven Matched-pairs Analyse umfasste 33 Patienten mit einem gesicherten GBM WHO Grad IV. Das GBM wurde durchschnittlich im Alter von $53,3 \pm 14,4$ Jahren (Median: 55 Jahre, Min–Max: 15–78 Jahre) diagnostiziert. Abbildung 2 zeigt die Altersverteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose.

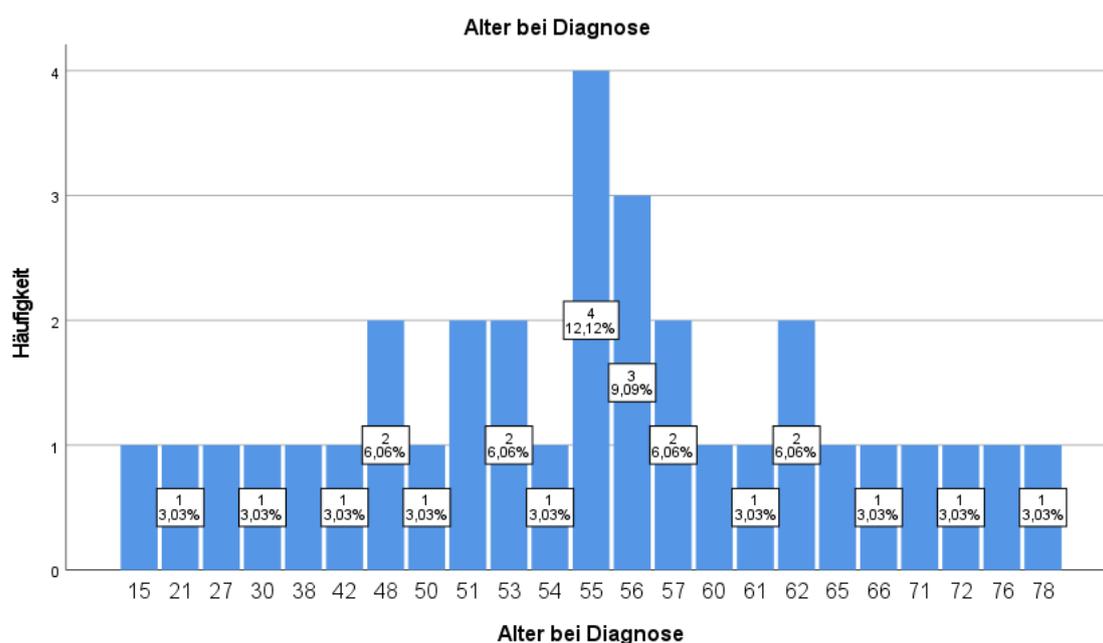


Abbildung 2: Altersverteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Glioblastom-(GBM)-Erstdiagnose

Insgesamt stammten 23 (69,7 %) der untersuchten Gewebepaare (Erstdiagnose / Progression) von Männern und zehn (30,3 %) von Frauen.

Das GBM trat bei den männlichen Patienten im Mittel mit $50 \pm 11,2$ Jahren (Median: 53 Jahre; Min–Max: 15–72 Jahre) deutlich früher auf als bei den weiblichen Patienten ($60,8 \pm 14,6$ Jahre; Median: 56,50 Jahre; Min–Max: 42–78 Jahre) (s. Abb. 3).

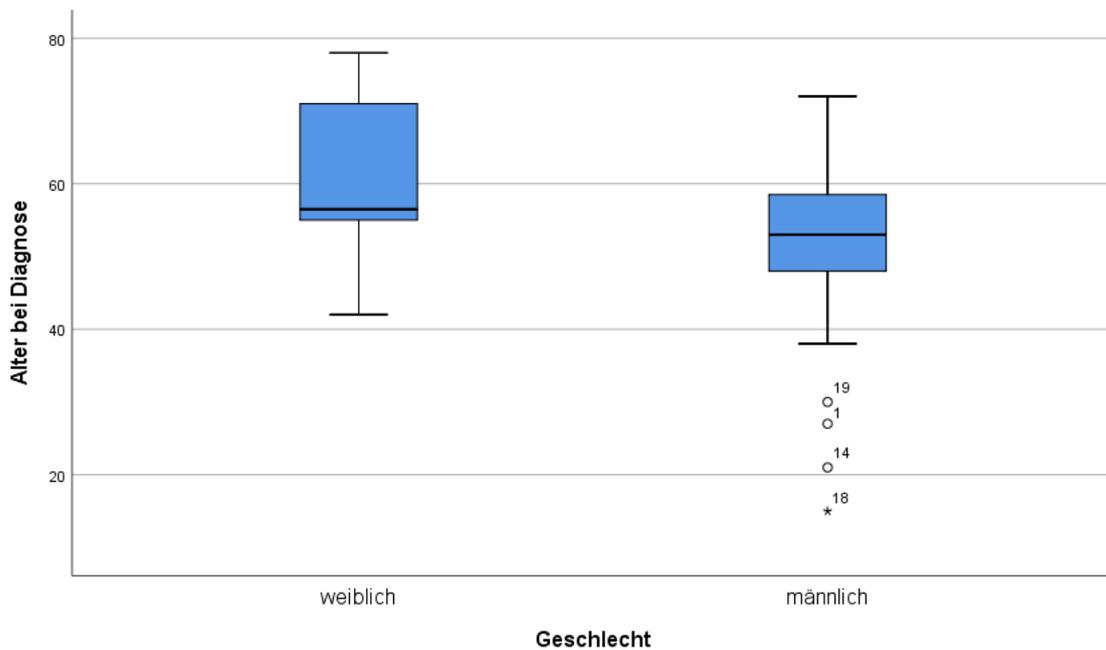


Abbildung 3: Auftreten des Glioblastoms (GBM) nach Alter (Jahre) und Geschlecht
 Einfache Ausreißer (°) = Die Entfernung (Fälle 19, 1 und 14) vom unteren Quartil beträgt maximal das Anderthalbfache der Boxlänge. Extreme Ausreißer (*) = Die Entfernung (Fall 18) vom unteren Quartil beträgt das Anderthalb- bis Dreifache der Boxlänge.

Im Mittel trat eine Tumorprogression bei Frauen nach $26 \pm 27,8$ Monaten (Median: 11,5 Monate; Min–Max: 4–70 Monate) und bei Männern nach $14,2 \pm 8,7$ Monaten (Median: 7 Monate; Min–Max: 3–84 Monate) auf (s. Abb. 4).

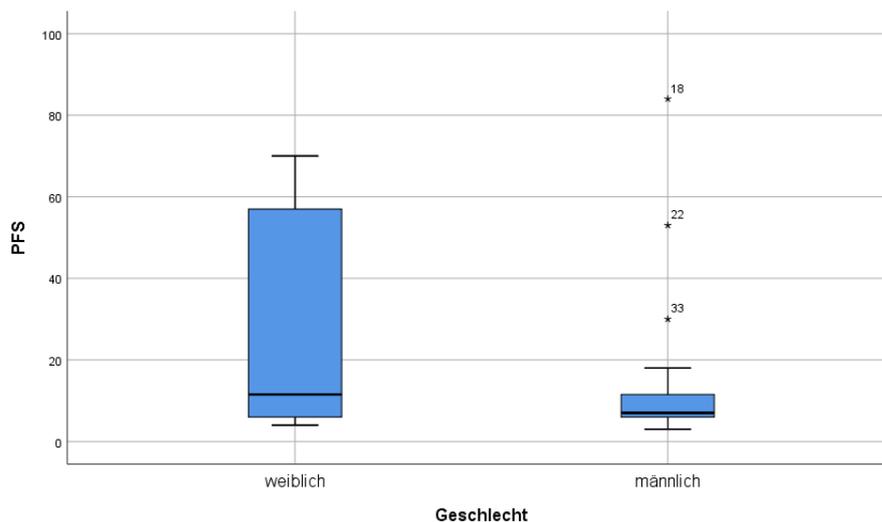


Abbildung 4: Progressionsfreies Überleben (PFS) in Monaten nach Geschlecht

27 Patienten (81,8 %) des Kollektivs erhielten eine Therapie nach dem Stupp-Protokoll, sechs Patienten (18,2 %) wurden mit einer RT behandelt.

2.2 Materialien

Materialien zur Formalinfixierung

Gebrauchsfertige Formalinlösung mit 4 % Formaldehyd, gepuffert mit Phosphat auf pH 7,4.

Materialien zur Einbettung der Gewebe in Paraffin

- Ethanol (70 %, 96 %, 100 %)
- Xylol
- Paraffin

Materialien für die Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

- Xylol
- Ethanol (70 %, 96 %, 100 %)
- Mayers Hämalaunlösung
- 0,1 % wässriges Erythrosin

Materialien für die Immunhistochemie

Die für die Immunhistochemie verwendeten Primär-Ab sind in Tabelle 1 gelistet.

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper für die Immunhistochemie

Antigen	Marker	Beschreibung
CD3	T-Zellen	1:500, 40 min CC1-Vorbehandlung, Klon SP7, ThermoFisher, Waltham, MA, USA
CD4	Th-Zellen	1:2, 24 min CC1-Vorbehandlung, Klon SP35, Ventana Medical Systems, Roche Group, Indianapolis, IN, USA
CD8	CTL	RTU, 64 min CC1-Vorbehandlung, Klon SP57, Ventana Medical Systems, Roche Group, USA
CD163	Makrophagen	RTU, MRQ-26, Ventana Medical Systems, Roche Group, USA Group
Programmed cell death protein 1 (PD-1)	IC	1:100, 64 min CC2-Vorbehandlung, Klon MRQ-22, Zytomed, Berlin, Deutschland
Programmed cell death protein ligand 1 (PD-L1)	IC-Ligand	1:100, 64 min CC1-Vorbehandlung, ab205921, Abcam, Cambridge, UK
Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1 (MSR1)/CD204	Makrophagen	1:2500, 32 min CC1-Vorbehandlung, HPA000272, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA
Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4)	IC	1:100, LOT: D2916, Santa Cruz Biotechnology, Shanghai, China

CD = Cluster of differentiation; CTL = zytotoxische T-Zelle; IC = Immuncheckpoint; Th = T-Helferzelle; RTU = ready-to-use, CC1 = Cell Conditioning Solution 1 (Tris-Ethylendiamintetraacetat-(EDTA)-Puffer-Lösung, pH 7,8), CC2 = Cell Conditioning Solution 2 (Citrat-basierte Puffer-Lösung, pH 6,5)

Die weiteren für die Immunhistochemie verwendeten Reagenzien wurden von Ventana Medical Systems (Tucson, AZ, USA) bezogen:

- EZ-Prep-Lösung (Entparaffinierungslösung)
- Reaktionspuffer (Tris-basierter Puffer pH 7,6–7,8)
- Zellkonditionierungslösung (CC1, Tris-Ethylendiamintetraacetat-(EDTA)-basierter Puffer pH 7,8; CC2, Citrat-basierter Puffer pH 6,5)
- Die Blockierung der endogenen Peroxidase wurde mit dem CM-Inhibitor (ChromoMap-Inhibitor) durchgeführt.
- OmniMap Anti-Maus-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat
- ChromoMap Diaminobenzidin-(DAB)-Kit
- 0,04–3 % Wasserstoffperoxid-Lösung
- Kupfersulfat
- Hämatoxylin

2.3 Immunhistochemische Färbung

2.3.1 Gewebeaufarbeitung

Formalin-Fixierung

Nach der operativen Entnahme wurden die Tumorgewebe in Formalin-Lösung (4 % Formaldehyd in Kochsalzlösung mit Phosphatpuffer pH 7,4) fixiert. Die Fixierung dient der Konservierung, indem die Autolyse durch Inaktivierung lysosomaler Enzyme und das Wachstum von Bakterien und Pilzen gestoppt wird (Singh et al., 2019). Weiter kommt es zur Stabilisierung der Zellbestandteile, wodurch Gewebeschäden durch nachfolgende Behandlungen oder durch osmotische Einflüsse (Schrumpfung, Schwellung) verhindert werden (Singh et al., 2019).

Paraffin-Einbettung

Die fixierten Gewebe müssen für die Generierung der wenige Mikrometer dicken Schnitte in Paraffin eingebettet werden. Dazu wurden die fixierten Gewebe zunächst entwässert. Zuerst wurde die Fixierlösung durch Waschen in Aqua dest. entfernt. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 %). Nach einer Inkubation in Xylol wurde das Gewebe in heißem Paraffin in Blöckchen eingegossen.

Anfertigung der Schnitte

Von den Paraffinblöcken eingebetteten Gewebeproben wurden an einem Mikrotom (Microm HM 355 S, Walldorf, Germany) ca. 3 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Silan-beschichtete Objektträger aufgezogen und vor der Weiterverwendung in einem Wärmeschrank bei 55 °C getrocknet.

2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Zur Analyse der Epithelform, des Differenzierungsgrads des Tumors sowie der Tumorbelastung und zur Auswahl des Gewebeabschnittes für die nachfolgende

TMA wurde eine HE-Übersichtsfärbung durchgeführt. Bei dieser Färbung werden durch zwei Farbstoffe (Hämatoxylin, Erythrosin B) unterschiedliche Strukturen dargestellt. Basophile Bestandteile der Zelle (z. B. Zellkerne) erscheinen blau und eosinophile (z. B. Zytoplasma) rot.

Für die HE-Färbung wurden die histologischen Schnittpräparate in einer Xylol- und absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 %) entparaffiniert und mit Aqua dest. gespült. Dann wurden die Schnitte 1 min in Mayers Hämalaunlösung gefärbt und unter fließendem Leitungswasser 10 min lang gewässert. Nach einer weiteren Spülung in Aqua dest. wurden die Schnitte mit 0,1 % wässriger Erythrosin-B-Lösung gegengefärbt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %) und Xylol entwässert. Anhand der HE-Färbung wurde das Tumorgewebe histologisch unter dem Mikroskop begutachtet. Dabei wurden Bereiche für die Entnahme der Gewebestanden für die TMA und Immunhistochemie aus den Paraffinblöcken markiert.

2.3.3 Herstellung der Tissue Microarrays (TMA)

Die TMA-Technik ermöglicht eine effiziente Analyse auf DNA-, RNA- oder Proteinniveau (Kallioniemi et al., 2001). Ein TMA bestand aus ausgestanzten Gewebezylindern und einem neu konstruierten Akzeptor-Paraffinblock. Die TMAs wurden mit einer TMA-Maschine (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA; Model MTA – 1, Serial No: MTA1777) hergestellt. Dazu wurden Löcher in gleichmäßigen Abständen von 2 mm in einen leeren Paraffinblock gestanzt.

Die Extraktion der Tumorzylinder für die TMA-Herstellung erfolgte nach der Festlegung geeigneter Bereiche (Areale mit neoplastischem Gewebe) in der HE-Färbung. Mit einer 0,6 mm Stanze wurden aus dem Donor-Paraffinblock an den markierten Stellen repräsentative Gewebeproben ausgestanzt und an definierter Position in den neuen Paraffinblock übertragen. Die Anordnung der Gewebeproben wurde tabellarisch festgehalten. Die Paraffinblöcke wurden durch dreiminütiges Erwärmen auf 40 °C und durch Flachdrücken mit einem Objektträger versiegelt.

Als Positivkontrolle wurde GBM-Gewebe WHO Grad IV verwendet. Als Negativkontrollen dienten Endothel- und Epithel-Proben (für CD3, CD4, CD8, CTLA4,

PD-1), Monozyten/Makrophagen (für CD163), Fibroblasten (für MSR1) und Stroma (für PD-L1).

2.3.4 Immunhistochemische Färbung

Mittels Immunhistochemie lassen sich auf Gewebsschnitten einzelne Proteine über eine spezifische Antigen-Ab-Reaktion detektieren. Der primäre Ab bindet über seine Fab-Fragmente (von engl. Fragment antigen binding) an das Antigen. Der im nachfolgenden Schritt aufgetragene, speziesspezifische sekundäre Ab erkennt das Fc-Fragment (von engl. fragment crystallisable) des primären Ab und bindet daran. Der sekundäre Ab ist mit einem Enzym gekoppelt, das bei Substratzugabe, dieses zu einem gefärbten Produkt umsetzt. Zur Signalverstärkung können auch Tertiär-Ab, die an den Sekundär-Ab binden, verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis mit der Avidin-Biotin Peroxidase-Methode. Bei der Avidin-Biotin-Methode werden die Schnitte zunächst mit einem Primär-Ab, dann mit einem Biotin-markierten Sekundär-Ab inkubiert und zuletzt mit einem Avidin-Biotin-Enzymkomplex. Als Enzym wird die Meerrettichperoxidase verwendet. Die Meerrettichperoxidase besitzt eine eisenhaltige Häm-Gruppe im aktiven Zentrum, die einen Komplex mit Wasserstoffperoxid bildet. Das Substrat Wasserstoffperoxid wird im Überschuss angeboten. Bei der enzymatischen Reaktion oxidieren die freierwerdenden Protonen das vorher fast farblose Chromogen 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) zu einem braunen, in Wasser unlöslichen, aber in Ethanol löslichen Farbstoff.

Ablauf der Immunhistochemie

Insgesamt wurden 1056 repräsentative Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete TMA-Stanzen auf dem Ventana Benchmark XT gefärbt. Bei dem Ventana Discovery XT handelt es sich um ein geschlossenes System, in dem alle Schritte (Entparaffinierung bis Gegenfärbung) im Gerät durchgeführt werden:

1. Das Gewebe wurde zuerst bei 75 °C 8 min lang mit der EZ-Prep-Lösung entparaffiniert und gewaschen.

2. Im zweiten Schritt wurde der Cell-Conditioner-1 (CC-1, Tris EDTA-Puffer pH 7,8) bzw. -2 (CC-2, Citrat-basierter Puffer, pH 6,5) aufgetragen und die Objektträger auf 95 °C erwärmt. Die CC1-Vorbehandlung dauerte 24 min (CD8), 32 min (MSR1, CTLA-4), 40 min (CD3, CD163) oder 64 min (PD-1, PD-L1). Die CC2-Vorbehandlung dauerte bei PD-1 64 min.
3. Im Anschluss wurde der Objektträger auf 37 °C gekühlt und gewaschen. Zur Blockierung endogener Peroxide und Proteine wurde ein CM-Inhibitor (ChromoMap-Inhibitor) verwendet.
4. Nach dem Waschvorgang wurde pro Schnitt 100 µl der Primär-Ab-Lösung auf den Objektträger aufgetragen und 32 min (PD-1, PD-L1, CTLA-4, MRS1) bei 37 °C, 20 min (CD3, CD163) bei 42 °C oder 26 min (CD8) bei 42 °C inkubiert.
5. Danach wurden 100 µl der Sekundär-Ab-Lösung zugegeben (OmniMap Anti-Maus-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat) und 16 min inkubiert.
6. Anschließend wurden die Proben mit Diaminobenzidin (DAB) und Wasserstoffperoxid 8 min inkubiert
7. Nach Auftragen eines Tropfens Kupfersulfat (Copper-CM) wurden die Proben 5 min inkubiert.
8. Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (8 min).
9. Zum Schluss wurden die Objektträger gereinigt.

2.4 Auswertung der Gewebeproben

Zur Analyse der Tumor-infiltrierenden Zellen wurde der Prozentsatz der gefärbten Zellen (keine, schwache, mäßige, starke, sehr starke Expression) unter Verwendung eines Carl Zeiss Axio Mikroskops (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) in 20-facher Vergrößerung bestimmt. Die immunhistochemischen TMA-Schnitte wurden durch zwei Untersucher (Herrn Prof. Dr. med. Jens Schittenhelm, Neuropathologe am Uniklinikum Tübingen + Autorin der vorliegenden Dissertation) verblindet ausgewertet.

In jedem TMA-Schnitt wurden vier oder fünf Untersuchungsfelder bestimmt. Der Prozentsatz der gefärbten Zellen pro Feld wurde mit der Formel „Anzahl positiv

gefärbter Zellen geteilt durch die Gesamtzahl der Zellen, multipliziert mit 100“ berechnet. Die Anzahl der gefärbten Zellen der Untersuchungsfelder wurden mit Score-Werten von 0–4 (Details s. u.) beurteilt. Anschließend wurden die Mittelwerte berechnet. Bereiche mit reduzierter oder fehlender Färbung wurden nicht ausgewertet. Weiter wurden Bereiche mit unzureichendem Tumorgehalt, Nekrosen und Hämatomablagerungen ausgeschlossen.

Bei den TAM-Markern und ICs wurde zur Beurteilung der Anzahl der gefärbten Zellen der von Prof. Schittenhelm empfohlene 4-Punkt-Expressionsscore verwendet:

- 0 – keine Expression (< 1 % der Zellen gefärbt),
- 1 – schwache Expression (1–24 % der Zellen gefärbt),
- 2 – mäßige Expression (25–49 % der Zellen gefärbt),
- 3 – starke Expression (50–75 % der Zellen gefärbt),
- 4 – sehr starke Expression (75–100 % der Zellen gefärbt).

Aufgrund der geringeren TIL-Dichte wurde bei der CD3-, CD4-, CD8- Expression ein abweichender Score verwendet:

- 0 – keine Expression (< 1 % der Zellen gefärbt),
- 1 – schwache Expression (1–5 % der Zellen gefärbt),
- 2 – mäßige Expression (6–10 % der Zellen gefärbt),
- 3 – starke Expression (11–15 % der Zellen gefärbt),
- 4 – sehr starke Expression (16–100 % der Zellen gefärbt).

Aufgrund der zu geringen Fallzahl enthielten einzelne Score-Kategorien in der histologischen Auswertung zu wenige Patienten. Daher wurden verschiedene Score-Kategorien im Kapitel 3.3 „Potenzieller Einfluss der Expressionsscores zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und der Änderung dieser Scores bis zur Progression auf das PFS“ zusammengefasst, um die Fallzahl zu erhöhen.

Expression bei der Erstdiagnose der Tumoren

Bei den Lymphozyten-Markern CD3, CD4 und CD8 wurden die Score-Kategorien 0 und 1 zu 1 (< 1–5 %) bzw. 2 und 3 zu 2 (6–15 %) zusammengefasst. Bei CD163 und PD-L1 wurden aus den Scores 0 und 1 der Score 1 (< 1–24 %) bzw. aus den Scores 2 und 3 der Score 2 (25–74 %) gebildet. Bei MSR1 wurden die Scores 1 und 2 zu 1 (1–49 %) bzw. 3 und 4 zu 2 (50–100 %) zusammengefasst. Bei PD-1 und CTLA-4 lagen nur zwei Score-Kategorien (0 und 1) vor.

Expressionsänderung in der Tumoren von der Erstdiagnose bis zur Progression

Bei der Analyse der potenziellen Korrelation des PFS mit der Änderung der Markerexpression vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Zeitpunkt der Progression wurden folgende Gruppen untersucht: Abnahme (-1), konstante Expression (0), Zunahme (1). Negative (Score-Stufen -4, -3, -2, -1) und positive Expressionsänderungen (Score-Stufen 1, 2, 3, 4) wurden unabhängig von der Anzahl der Score-Stufen gemeinsam ausgewertet, um die Fallzahl in den Gruppen zu erhöhen.

Die TMA-Objektträger wurden anschließend mit einem Carl Zeiss Scanner (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany) eingescannt. Die Aufnahmen wurden mit dem Case Viewer (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary) verarbeitet. Die folgenden Abbildungen 5–11 zeigen exemplarisch die mikroskopische Auswertung.

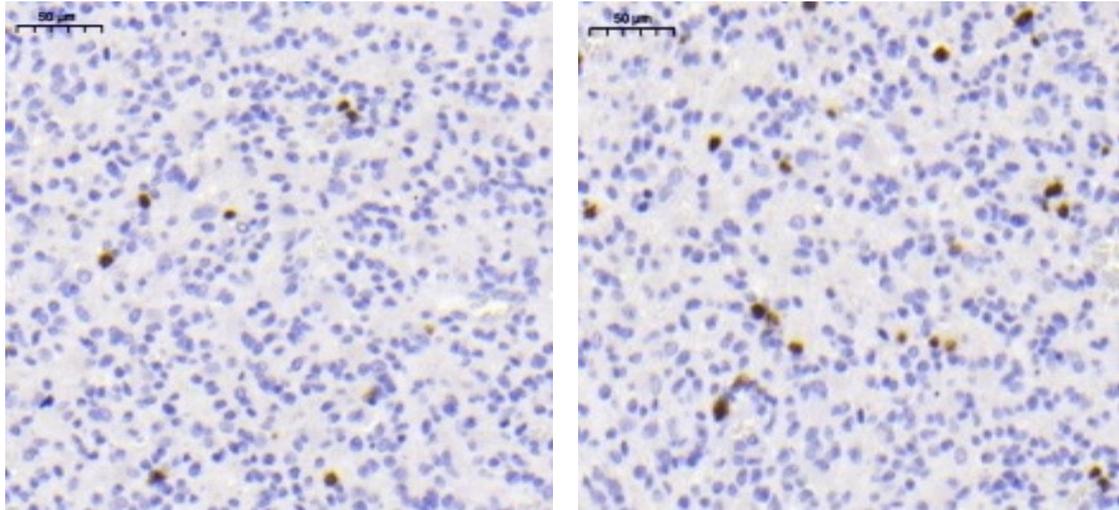


Abbildung 5: Immunhistochemische Analyse der Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Expression – Score 1 (links), Score 2 (rechts)

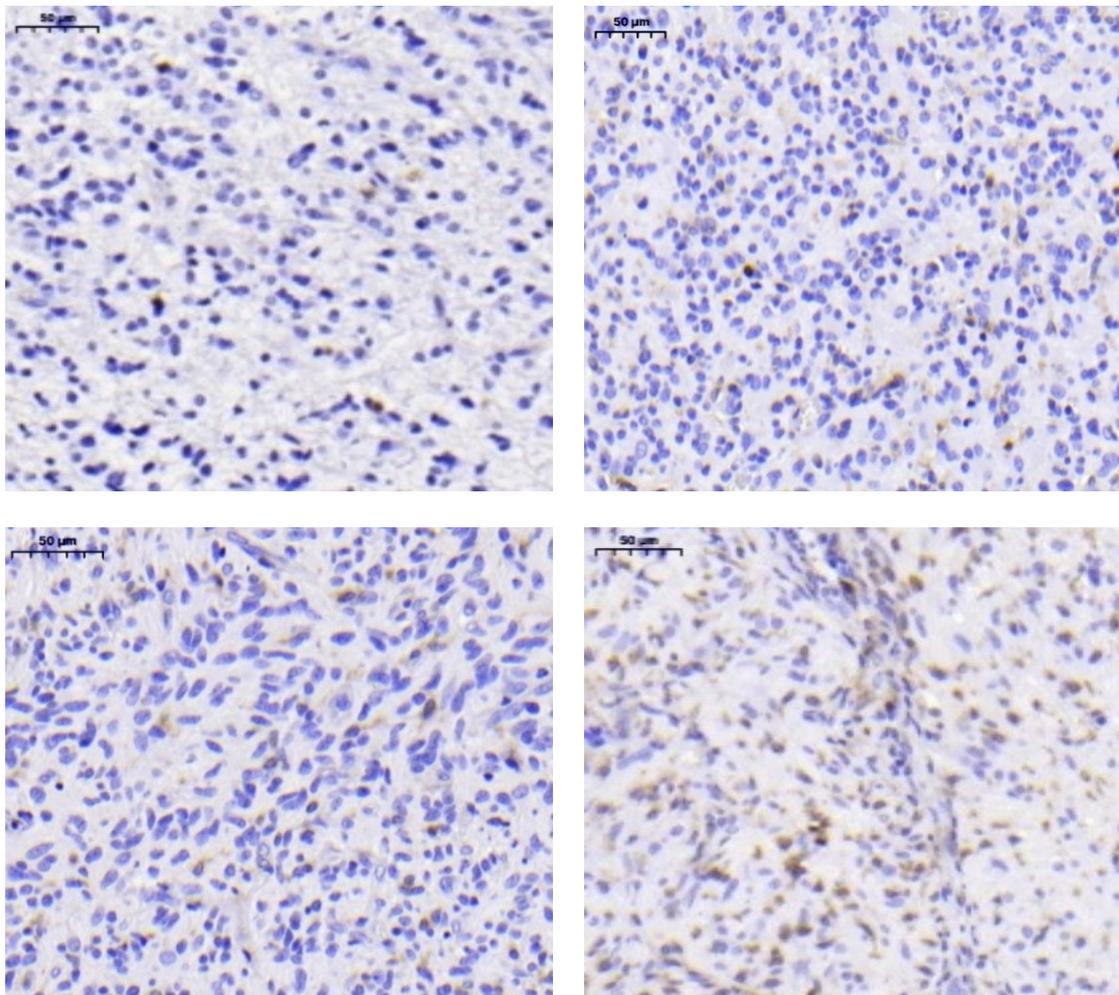


Abbildung 6: Immunhistochemische Analyse der Cluster-of-differentiation-(CD)-4 Expression – Score 1 (oben links), Score 2 (oben rechts), Score 3 (unten links), Score 4 (unten rechts)

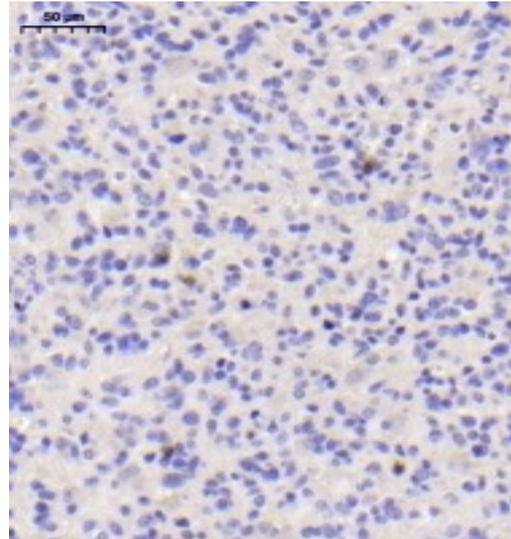
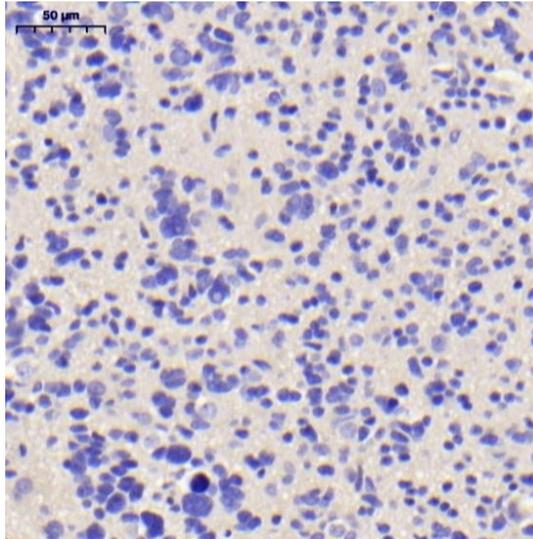


Abbildung 7: Immunhistochemische Analyse der Cluster-of-differentiation-(CD)-8 Expression – Score 0 (links), Score 1 (rechts)

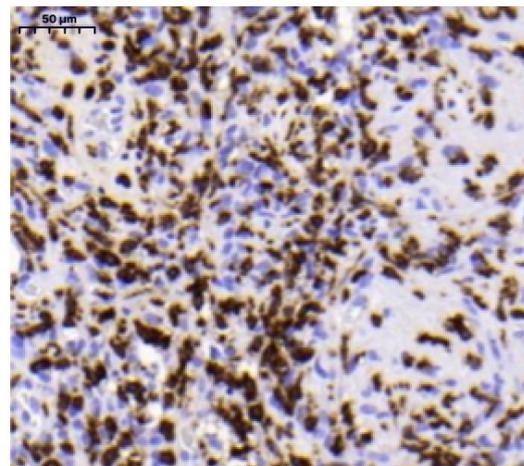
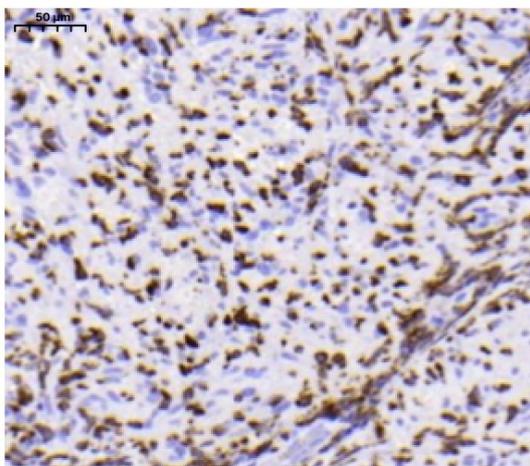
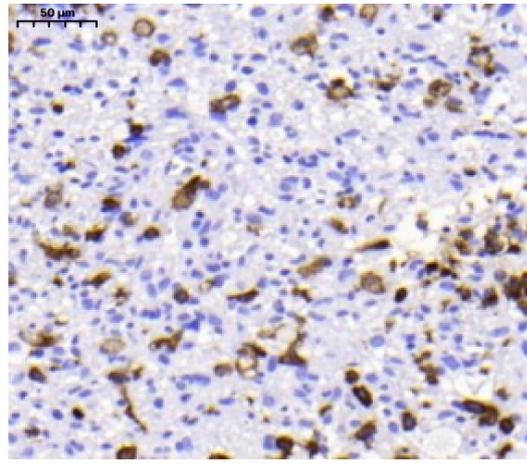
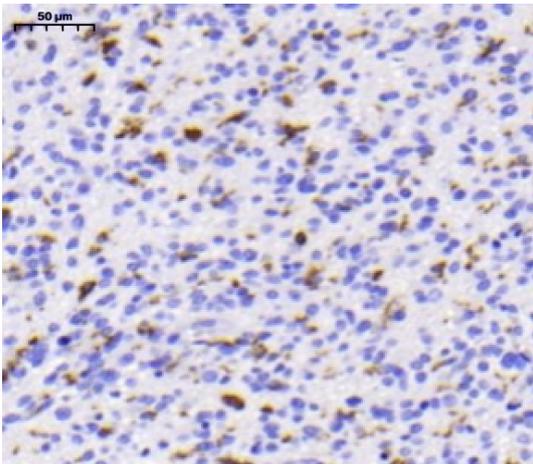


Abbildung 8: Immunhistochemische Analyse der Cluster-of-differentiation-(CD)-163 Expression – Score 1 (oben links), Score 2 (oben rechts) Score 3 (unten links), Score 4 (unten rechts)

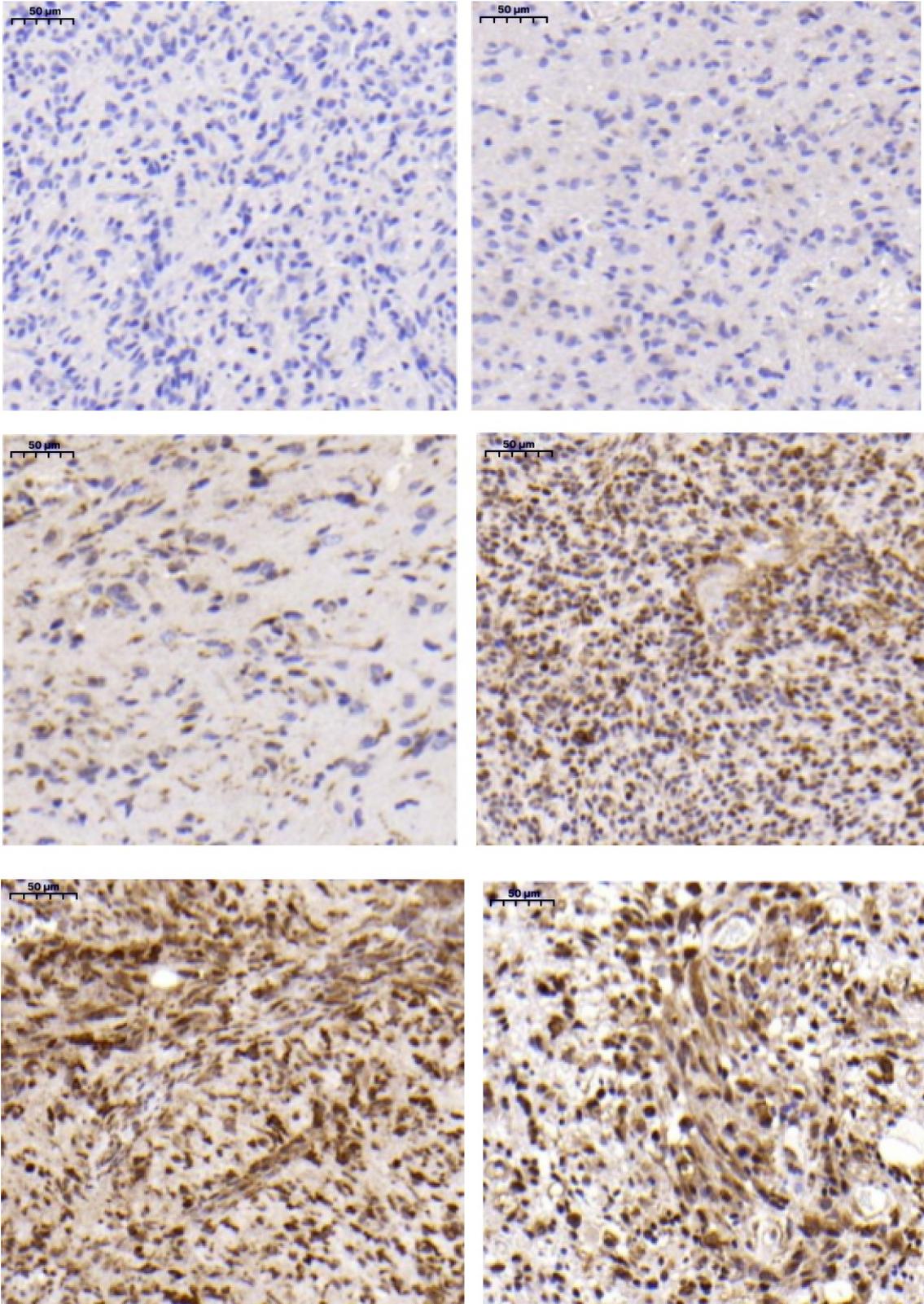


Abbildung 9: Immunhistochemische Analyse der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1 (MSR1/CD204) Expression – Score 0 (obere Reihe, links), Score 1 (obere Reihe, rechts), Score 2 (mittlere Reihe, links), Score 3 (mittlere Reihe, rechts), Score 4 (untere Reihe)

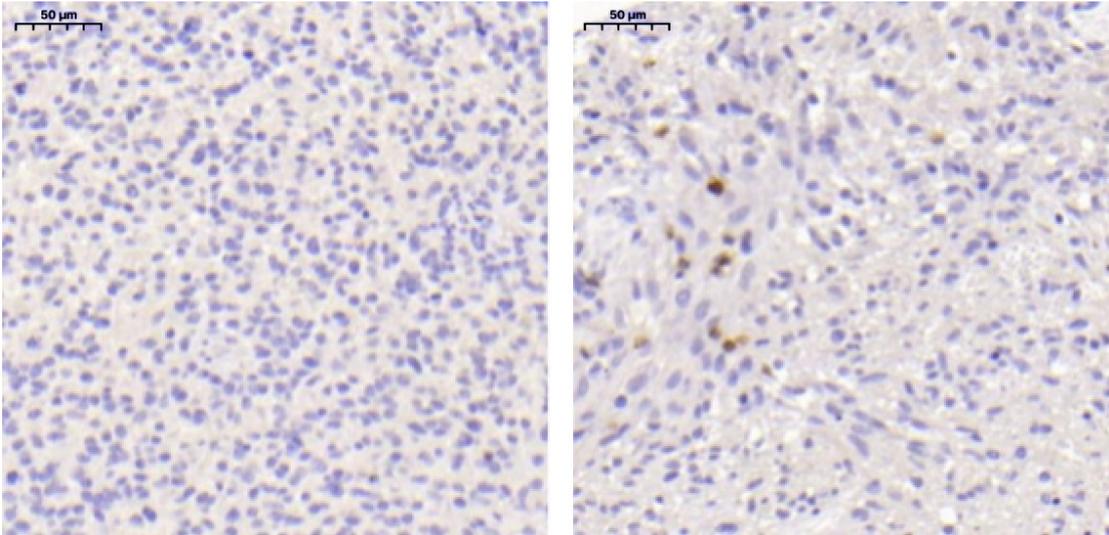


Abbildung 10: Immunhistochemische Analyse der Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Expression – Score 0 (links), Score 1 (rechts)

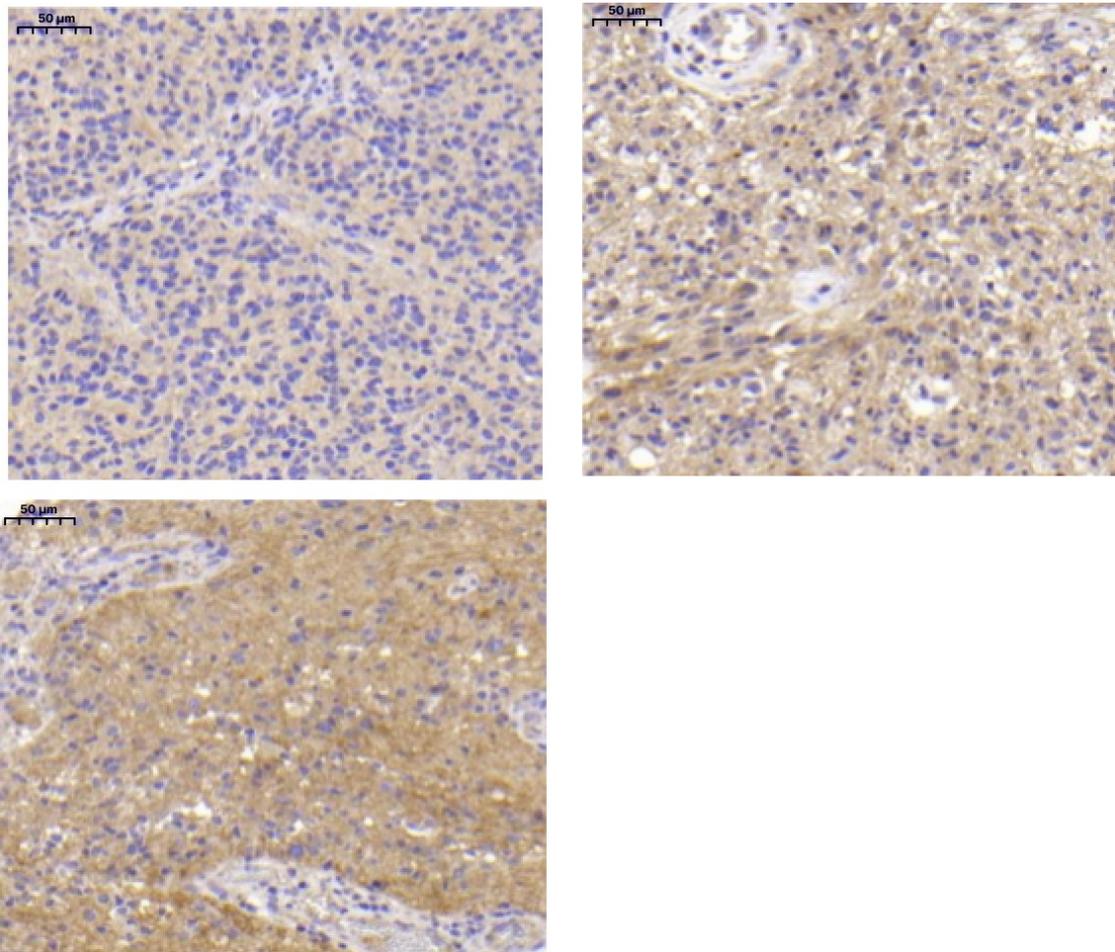


Abbildung 11: Immunhistochemische Analyse der Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Expression – Score 0 (obere reihe, links), Score 2 (obere Reihe, rechts), Score 3 (untere Reihe, links)

2.5 Statistische Auswertung

Expressionsniveaus der TIL-, TAM- und IC-Marker

Die Häufigkeit des Auftretens der Expressionsscores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose und Progression (Matched-pairs) wurden als absolute Werte und prozentuale Anteile in den Therapie-Gruppen (Stupp, RT) angegeben. Für die Beobachtung des Krankheitsverlaufes wurde die Änderung des Expressionsscores vom Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose bis zur Progression dokumentiert.

Korrelationsanalyse nach Spearman – mögliche Assoziationen zwischen TIL-, TAM- und IC-Marker-Scores bei der GBM-Erstdiagnose und der Änderung dieser Scores im Krankheitsverlauf

Mögliche Korrelationen zwischen den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Niveaus der TIL-, TAM und IC-Marker und weiterer Parameter wurden mit der Spearman-Korrelationsanalyse untersucht. Mithilfe der Einteilung von Mukaka (Mukaka, 2012) wurde die Güte des Zusammenhangs anhand der Höhe der Spearman-Korrelationskoeffizienten (r_s) bestimmt:

- $r_s = 0,90-1,00$ ($-0,90$ bis $-1,00$): sehr hohe positive (negative) Korrelation
- $r_s = 0,70-0,90$ ($-0,70$ bis $-0,90$): hohe positive (negative) Korrelation
- $r_s = 0,50-0,70$ ($-0,50$ bis $-0,70$): moderate positive (negative) Korrelation
- $r_s = 0,30-0,50$ ($-0,30$ bis $-0,50$): niedrige positive (negative) Korrelation
- $r_s = 0,00-0,30$ ($0,00$ bis $-0,30$): keine Korrelation

Einfluss der TIL-, TAM- und IC-Marker-Scores zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose und der Änderung dieser Scores bis zur Progression auf das PFS

Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode wurden die Auswirkungen der Scores der Zielproteine in den Tumorproben bei der GBM-Erstdiagnose und die Änderung dieser Scores bis zur Progression (Score bei Progression minus Score bei Erst-diagnose) auf das PFS identifiziert. Das PFS wurde als das Zeitintervall von der GBM-Erstdiagnose (erste *operative* Resektion) bis zur Diagnose einer Progres-sion definiert.

In allen Analysen wurden Wahrscheinlichkeitswerte (p-Wert) kleiner oder gleich 0,05 als signifikant erachtet. Da die Wahrscheinlichkeitswerte in der vorliegenden Analyse nicht signifikant waren, wurde auf die Beschreibung der p-Werte nicht eingegangen.

Alle statistischen Analysen mit Ausnahme der Korrelationsanalyse wurden mit der Software SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) durchgeführt. Die Korrelation nach Spearman wurden mittels Python 3.7.0. (Python Software Foundation, Delaware, USA) ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Immunphänotypisierung von Matched-pairs GBM-Tumorproben in den Behandlungsgruppen

Die GBM-Gewebeproben der Tumoren bei der Erstdiagnose und der korrespondierenden progredienten Tumoren (Matched-pairs) wurden auf das Vorhandensein von TILs (CD3, CD4, CD8), TAMs (CD163, MSR1) und IC-Inhibitoren (PD-1, PD-L1, CTLA-4) untersucht. Die Expressionsscores der Matched-pairs Tumorproben wurden nach Therapiegruppen (RT, Stupp-Therapie) getrennt ausgewertet. Aufgrund der niedrigen Fallzahl in der RT-Gruppe werden im Folgenden nur die Daten der Stupp-Gruppe thematisiert. Die RT-Gruppe enthielt wesentlich ältere Patienten als die Stupp-Gruppe. Aufgrund des möglichen Effektes des Alters auf die Expressionsniveaus, wurde auf eine gemeinsame Auswertung der beiden Gruppen verzichtet.

3.1.1 CD3 (TIL-Marker)

CD3 zeigte in den Tumorproben bei der Erstdiagnose insgesamt ein niedriges Expressionsniveau von Score 0 (< 1 %) bis Score 2 (6–10 %). Bei der Erstdiagnose wiesen die meisten Tumorproben der Stupp-Gruppe (70,8 %) eine schwache (1–5 %, Score 1) CD3-Expression auf (s. Tab. 2).

Tabelle 2: Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radiotherapie- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

CD3-Score bei Erstdiagnose		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
0 (< 1 %)	Anzahl	2	2	4
	Anteile *	50,0 %	8,3 %	14,3 %
1 (1–5 %)	Anzahl	0	17	17
	Anteile *	0,0 %	70,8 %	60,7 %
2 (6–10 %)	Anzahl	2	5	7
	Anteile *	50,0 %	20,8 %	25,0 %
Gesamt	Anzahl	4	24	28
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

Die CD3-Expression in den Matched-pairs Proben der progredienten Tumoren war vergleichbar niedrig (Score 0–2). Der Anteil der Proben mit Score 1 (1–5 %)

in der Stupp-Gruppe fiel von 70,8 % (GBM-Erstdiagnose) auf 58,3 % (Progression) ab. Parallel dazu stieg in dieser Gruppe der Anteil der Patienten mit einem Score 0 um 4,2 % (von 8,3 % auf 12,5 %) und mit einem Score 2 um 8,4 % (von 20,8 % auf 29,2 %) an (s. Tab. 3).

Tabelle 3: Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radiotherapie- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

CD3-Score bei Progression		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
0 (< 1 %)	Anzahl	1	3	4
	Anteile *	25,0 %	12,5 %	14,3 %
1 (1–5 %)	Anzahl	2	14	16
	Anteile *	50,0 %	58,3 %	57,1 %
2 (6–10 %)	Anzahl	1	7	8
	Anteile *	25,0 %	29,2 %	28,6 %
Gesamt	Anzahl	4	4	24
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

Die Veränderungen der CD3-Expressionsscores nach einer Stupp-Therapie oder RT sind in Abbildung 12 dargestellt.

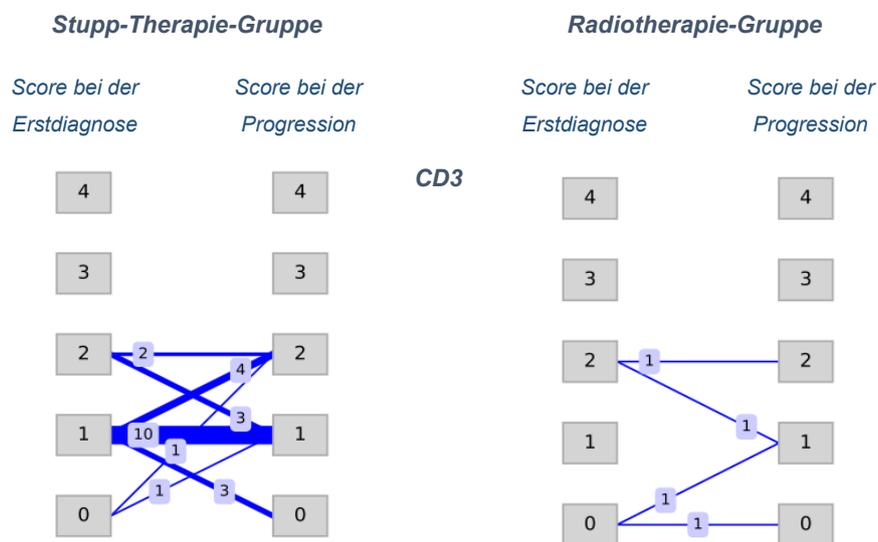


Abbildung 12: Immunhistochemischer Score der Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts). Die Änderungen der Expressionsscores von der Erstdiagnose zur Progression sind durch blaue Linien mit Anzahl der Patienten gekennzeichnet.

In der Stupp-Gruppe blieben bei zwölf Patienten (50 %) die CD3-Expressionscores konstant. Eine Erhöhung bzw. Erniedrigung des CD3-Expressionscores trat bei jeweils sechs Patienten (25 %) in der Stupp-Gruppe auf (s. Tab. 4).

Tabelle 4: Veränderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose

Differenz CD3-Score		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
-1	Anzahl	1	6	7
	Anteile *	25,0 %	25,0 %	25,0 %
0	Anzahl	2	12	14
	Anteile *	50,0 %	50,0 %	50,0 %
1	Anzahl	1	5	6
	Anteile *	25,0 %	20,8 %	21,4 %
2	Anzahl	0	1	1
	Anteile *	0,0 %	4,2 %	3,6 %
Gesamt	Anzahl	4	24	28
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

3.1.2 CD8 (TIL-Marker)

Auch die CD8-Expression war mit Scores zwischen 0 (< 1 %) und 2 (6–10 %) insgesamt gering. Bei der GBM-Erstdiagnose zeigten die Tumorproben der meisten Patienten in der Stupp-Gruppe (70,8 %) eine schwache (Score 1, 1–5 %) CD8-Expression (s. Tab. 5).

Tabelle 5: Cluster-of-differentiation-(CD)-8-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

CD8-Score bei Erstdiagnose		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
0 (< 1 %)	Anzahl	2	3	5
	Anteile *	50,0 %	12,5 %	17,9 %
1 (1–5 %)	Anzahl	0	17	17
	Anteile *	0,0 %	70,8 %	60,7 %
2 (6–10 %)	Anzahl	2	4	6
	Anteile *	50,0 %	16,7 %	21,4 %
Gesamt	Anzahl	4	24	28
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

Auch die Matched-pairs Proben der progredienten Tumoren wiesen eine niedrige CD8-Expression (Score 0–2) auf. Die Ausnahme bildete eine Probe mit einem Score von 4. Die Anteile der Patienten in der Stupp-Gruppe mit einem Score 1 (1–5 %) bzw. 2 (6–10 %) blieben mit 70,8 % bzw. 16,7 % konstant; der Anteil mit einem Score 0 fiel um 4,2 % ab (von 12,5 % auf 8,3 %, s. Tab. 6).

Tabelle 6: Cluster-of-differentiation-(CD)-8-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

CD8-Score bei Progression		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
0 (< 1 %)	Anzahl	0	2	2
	Anteile *	0,0 %	8,3 %	7,1 %
1 (1–5 %)	Anzahl	3	17	20
	Anteile *	75,0 %	70,8 %	71,4 %
2 (6–10 %)	Anzahl	1	4	5
	Anteile *	25,0 %	16,7 %	17,9 %
4 (16–100 %)	Anzahl	0	1	1
	Anteile *	0,0 %	4,2 %	3,6 %
Gesamt	Anzahl	4	24	28
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

Die Veränderungen der CD8-Expressionscores nach einer Stupp-Therapie (links) oder RT (rechts) sind schematisch in Abb. 13 dargestellt.

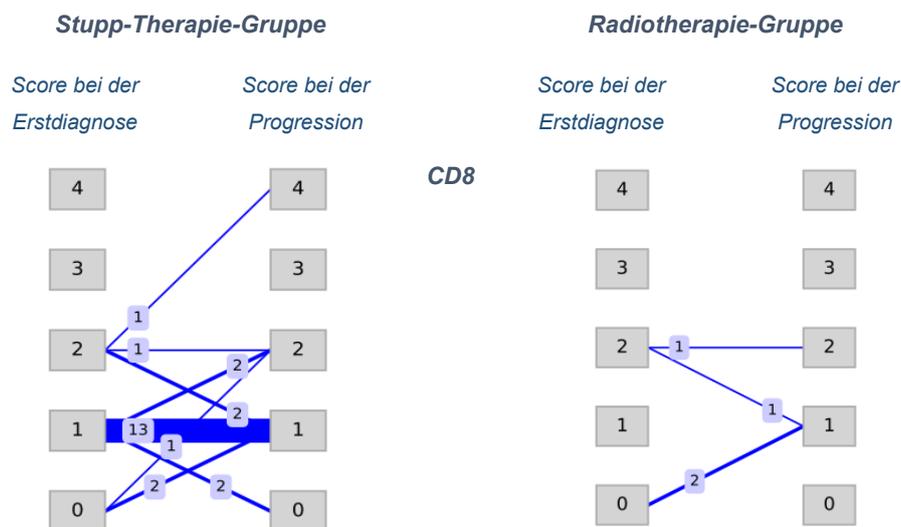


Abbildung 13: Immunhistochemischer Score der Cluster-of-differentiation-(CD)-8-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts). Die Änderungen der Expressionsscores von der Erstdiagnose zur Progression sind durch blaue Linien mit Anzahl der Patienten gekennzeichnet.

In der Stupp-Therapie-Gruppe blieben bei 14 Patienten (58,3 %) die CD8-Expressionsscores konstant. Eine Erhöhung des CD8-Expressionsscores trat bei sechs (25 %) Patienten auf und eine Erniedrigung bei vier (16,7 %) Patienten (s. Tab. 7).

Tabelle 7: Veränderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-8-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose

Differenz CD8-Score		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
-1	Anzahl	1	4	5
	Anteile *	25,0 %	16,7 %	17,9 %
0	Anzahl	1	14	15
	Anteile *	25,0 %	58,3 %	53,6 %
1	Anzahl	2	4	6
	Anteile *	50,0 %	16,7 %	21,4 %
2	Anzahl	0	2	2
	Anteile *	0,0 %	8,3 %	7,1 %
Gesamt	Anzahl	4	24	28
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

3.1.3 CD4 (TIL-Marker)

Zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose waren die CD4-Expressionsniveaus in den Tumorproben variabel (Scores 0–4), wobei nur 4 % der Patienten einen Score 0 (< 1 %) aufwiesen. Die restlichen Patienten verteilten sich gleichmäßig auf die Scores 1–4 (Score 1: 20 %, Score 2: 28 %, Score 3: 24 %, Score 4: 24 %, s. Tab. 8).

Tabelle 8: Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

CD4-Score bei Erstdiagnose		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
0 (< 1 %)	Anzahl	2	1	3
	Anteile *	40,0 %	4,0 %	10,0 %
1 (1–5 %)	Anzahl	0	5	5
	Anteile *	0,0 %	20,0 %	16,7 %
2 (6–10 %)	Anzahl	2	7	9
	Anteile *	40,0 %	28,0 %	30,0 %
3 (11–15 %)	Anzahl	0	6	6
	Anteile *	0,0 %	24,0 %	20,0 %
4 (16–100 %)	Anzahl	1	6	7
	Anteile *	20,0 %	24,0 %	23,3 %
Gesamt	Anzahl	5	25	30
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

In den Matched-pairs Proben der progredienten Tumoren blieb die breite Streuung der CD4-Expression (Score 0–4) erhalten (s. Tab. 9), wobei ein leichter Anstieg erkennbar war (Score 2: 32 % (+ 4 %), Score 3: 28 % (+ 4 %), Score 4: 32 % (+ 8 %).

Tabelle 9: Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

CD4-Score bei Progression		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
0 (< 1 %)	Anzahl	1	0	1
	Anteile *	20,0 %	0,0 %	3,3 %
1 (1–5 %)	Anzahl	1	2	3
	Anteile *	20,0 %	8,0 %	10,0 %
2 (6–10 %)	Anzahl	2	8	10
	Anteile *	40,0 %	32,0 %	33,3 %
3 (11–15 %)	Anzahl	0	7	7
	Anteile *	0,0 %	28,0 %	23,3 %
4 (16–100 %)	Anzahl	1	8	9
	Anteile *	20,0 %	32,0 %	30,0 %
Gesamt	Anzahl	5	25	30
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

Die Veränderungen der CD4-Expressionsscores nach einer Stupp-Therapie oder RT sind schematisch in Abbildung 14 dargestellt.

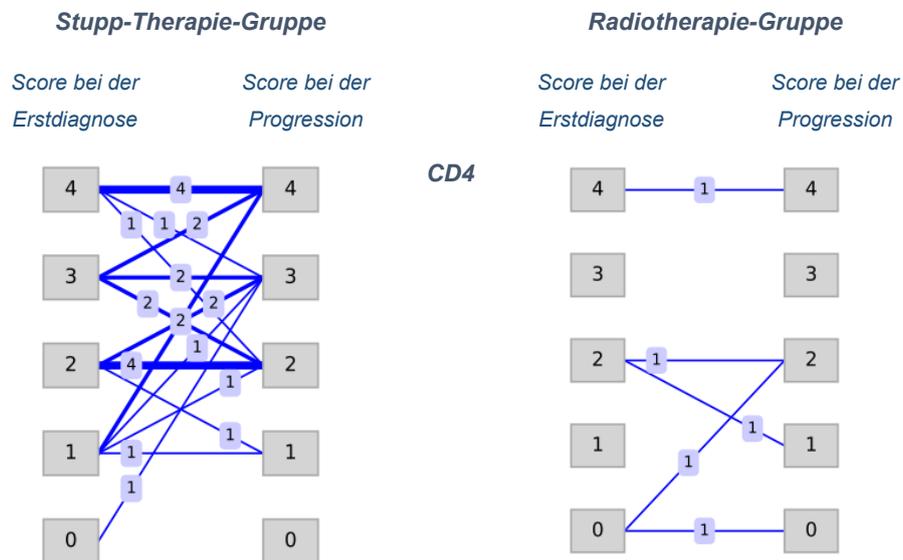


Abbildung 14: Immunhistochemischer Score der Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts). Die Änderungen der Expressionsscores von der Erstdiagnose zur Progression sind durch blaue Linien mit Anzahl der Patienten gekennzeichnet.

In der Stupp-Gruppe blieb bei elf Patienten (44 %) der CD4-Expressionsscore konstant. Eine Erhöhung des Scores trat in dieser Gruppe bei neun Patienten (36 %) auf, eine Erniedrigung bei fünf Patienten (20 %, s. Tab. 10).

Tabelle 10: Veränderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose

Differenz CD8-Score		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
-2	Anzahl	0	1	1
	Anteile *	0,0 %	4,0 %	3,3 %
-1	Anzahl	1	4	5
	Anteile *	20,0 %	16,0 %	16,7 %
0	Anzahl	3	11	14
	Anteile *	60,0 %	44,0 %	46,7 %
1	Anzahl	0	5	5
	Anteile *	0,0 %	20,0 %	16,7 %
2	Anzahl	1	1	2
	Anteile *	20,0 %	4,0 %	6,7 %
3	Anzahl	0	3	3
	Anteile *	0,0 %	12,0 %	10,0 %
Gesamt	Anzahl	5	25	30
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

3.1.4 CD163 (TAM-Marker)

Die Tumorproben der Patienten, die mit einer Stupp-Therapie behandelt wurden, zeigten bei der GBM-Erstdiagnose eine negative bis starke (Score 0–3) CD163-Expression, bei einer gleichmäßigen Verteilung der Patienten auf die Scores (Score 0: 24 %, Score 1: 24 %, Score 2: 28 %, Score 3: 24 %, s. Tab. 11).

Tabelle 11: Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

CD163-Score bei Erstdiagnose		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
0 (< 1 %)	Anzahl	2	6	8
	Anteile *	33,3 %	24,0 %	25,8 %
1 (1– 24 %)	Anzahl	3	6	9
	Anteile *	50,0 %	24,0 %	29,0 %
2 (25–49 %)	Anzahl	0	7	7
	Anteile *	0,0 %	28,0 %	22,6 %
3 (50–74 %)	Anzahl	1	6	7
	Anteile *	16,7 %	24,0 %	22,6 %
Gesamt	Anzahl	6	25	31
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

In den Matched-pairs Proben der progredienten Tumoren dieser Patienten dominierten CD163-Expressionsscores von 1 (56 %) und 2 (40 %, s. Tab. 12). 24 % der Fälle ohne CD163-Expression bei der GBM-Erstdiagnose zeigten eine Expression im progredienten Stadium. In 20 % der Fälle (n = 5) mit einer initial starken CD163-Expression (Score 3) nahm der CD163-Expressionsscore ab (von 24 % auf 4 %). Der Anteil der Patienten mit Score 1 (1–24 %) stieg in der Stupp-Gruppe von 24 % auf 56 % und der Anteil mit Score 2 von 28 % auf 40 % an (s. Abb. 15).

Tabelle 12: Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

CD163-Score bei Progression		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
0 (< 1 %)	Anzahl	1	0	1
	Anteile *	16,7 %	0,0 %	3,2 %
1 (1–24 %)	Anzahl	4	14	18
	Anteile *	66,7 %	56,0 %	58,1 %
2 (25–49 %)	Anzahl	0	10	10
	Anteile *	0,0 %	40,0 %	32,3 %
3 (50–74 %)	Anzahl	1	1	2
	Anteile *	16,7 %	4,0 %	6,5 %
Gesamt	Anzahl	6	25	31
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

Die Veränderungen der CD163-Expressionsscores nach einer Stupp-Therapie oder RT sind schematisch in Abbildung 15 dargestellt.

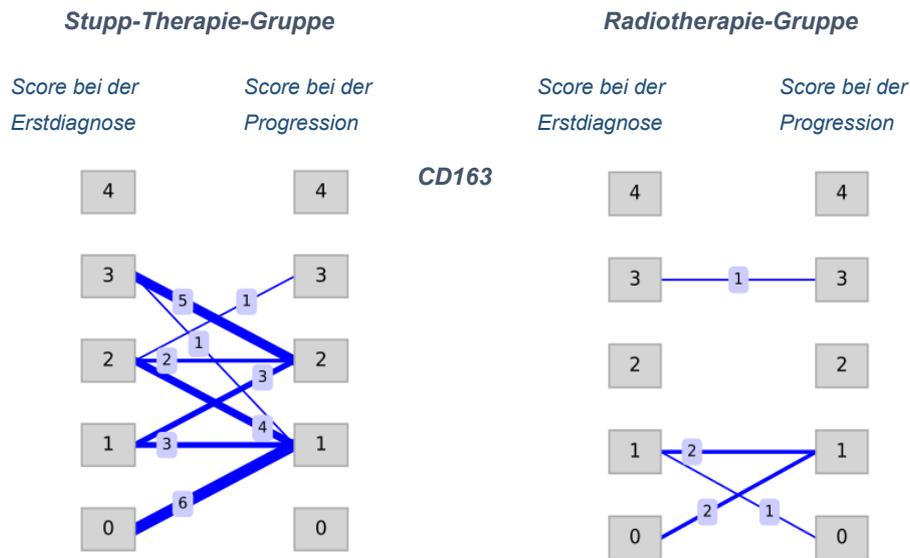


Abbildung 15: Immunhistochemischer Score der Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts). Die Änderungen der Expressionsscores von der Erstdiagnose zur Progression sind durch blaue Linien mit Anzahl der Patienten gekennzeichnet.

In der Stupp-Gruppe blieben in den Matched-pairs Proben der progredienten Tumoren bei fünf Patienten (20 %) die CD163-Expressionsscores konstant. Eine Erhöhung bzw. Erniedrigung des CD163-Expressionsscores trat in dieser Gruppe bei jeweils zehn Patienten (40 %) auf (s. Tab. 13).

Tabelle 13: Veränderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose

Differenz CD163-Score		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
-2	Anzahl	0	1	1
	Anteile *	0,0 %	4,0 %	3,2 %
-1	Anzahl	1	9	10
	Anteile *	16,7 %	36,0 %	32,3 %
0	Anzahl	3	5	8
	Anteile *	50,0 %	20,0 %	25,8 %
1	Anzahl	2	10	12
	Anteile *	33,3 %	40,0 %	38,7 %
Gesamt	Anzahl	6	25	31
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

3.1.5 MSR1 (TAM-Marker)

Bei der GBM-Erstdiagnose zeigten die Tumorproben negative bis sehr starke MSR1-Expressionsniveaus (Score 0–4), wobei die meisten Patienten (72,8 %) der Stupp-Therapiegruppe eine mäßige bis starke Expression aufwiesen (Score 2: 36,4 %, Score 3: 36,4 %). Eine fehlende MSR1-Expression lag bei zwei Patienten (9,1 %) vor und eine sehr starke MSR1-Expression bei vier Patienten (18,2 %, s. Tab. 14).

Tabelle 14: Makrophagen-Scavenger-Rezeptor-1-(MSR1)-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

MSR1-Score bei Erstdiagnose		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
1 (1–24 %)	Anzahl	1	2	3
	Anteile *	20,0 %	9,1 %	11,1 %
2 (25–49 %)	Anzahl	0	8	8
	Anteile *	0,0 %	36,4 %	29,6 %
3 (50–74 %)	Anzahl	2	8	10
	Anteile *	40,0 %	36,4 %	37,0 %
4 (>75 %)	Anzahl	2	4	6
	Anteile *	40,0 %	18,2 %	22,2 %
Gesamt	Anzahl	5	22	27
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

In den Matched-pairs Proben der progredienten Tumoren war eine erhöhte MSR1-Expression erkennbar. Tumorproben mit negativer und schwacher Expression traten seltener (Stupp-Therapie-Gruppe: Abnahme Score 0: von 9,1 % auf 0 %; Abnahme Score 1: von 36,4 % auf 4,5 %) auf, Tumorproben mit starker und sehr starker MSR1-Expression häufiger (Zunahme Score 3: von 18,2 % auf 31,8 %; Zunahme Score 4: von 0 % auf 27,3 %). Der Anteil mit einer mäßigen Expression (Score 2) blieb unverändert (36,4 %, s. Tab. 15).

Tabelle 15: Makrophagen-Scavenger-Rezeptor-1-(MSR1)-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

MSR1-Score bei Progression		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
1 (1–24 %)	Anzahl	2	1	3
	Anteile *	40,0 %	4,5 %	11,1 %
2 (25–49 %)	Anzahl	2	8	10
	Anteile *	40,0 %	36,4 %	37,0 %
3 (50–74 %)	Anzahl	0	7	7
	Anteile *	0,0 %	31,8 %	25,9 %
4 (> 75 %)	Anzahl	1	6	7
	Anteile *	20,0 %	27,3 %	25,9 %
Gesamt	Anzahl	5	22	27
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

Die Veränderungen der MSR1-Expressionscores in der Stupp-Therapie-Gruppe und RT-Gruppe sind schematisch in Abbildung 16 dargestellt.

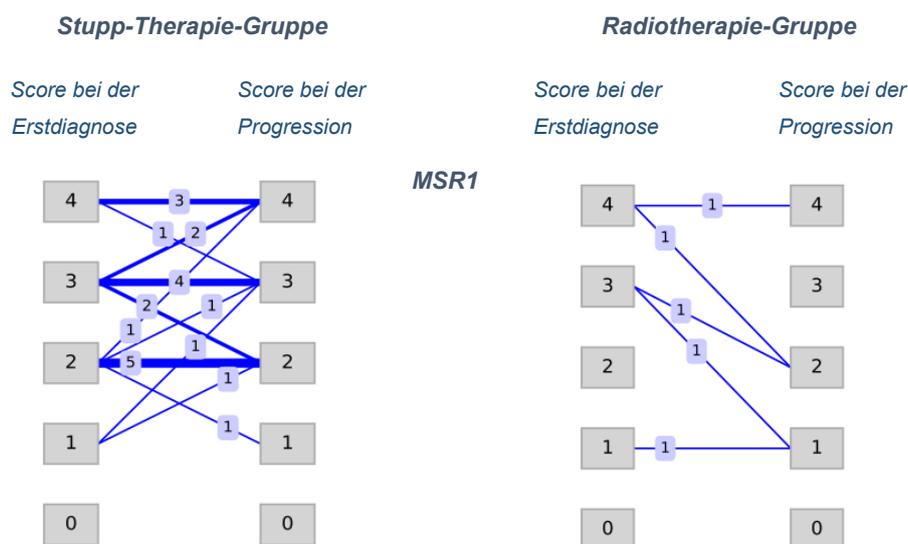


Abbildung 16: Immunhistochemischer Score der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor-1-(MSR1)-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts)

Die Änderungen der Expressionsscores von der Erstdiagnose zur Progression sind durch blaue Linien mit Anzahl der Patienten gekennzeichnet

In der Stupp-Therapie-Gruppe blieben bei zwölf Patienten (54,5 %) die MSR1-Expressionsscores konstant. Eine Erhöhung trat in dieser Gruppe bei sechs Patienten auf (27,3 %), eine Erniedrigung bei vier Patienten (18,2 %, s. Tab. 16).

Tabelle 16: Veränderung der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor-1-(MSR1)-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose

Differenz MSR1-Score		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
-2	Anzahl	2	0	2
	Anteile *	40,0 %	0,0 %	7,4 %
-1	Anzahl	1	4	5
	Anteile *	20,0 %	18,2 %	18,5 %
0	Anzahl	2	12	14
	Anteile *	40,0 %	54,5 %	51,9 %
1	Anzahl	0	4	4
	Anteile *	0,0 %	18,2 %	14,8 %
2	Anzahl	0	2	2
	Anteile *	0,0 %	9,1 %	7,4 %
Gesamt	Anzahl	5	22	27
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

3.1.6 PD-1 (Immuncheckpoint)

Die Tumorproben zeigten in 73,1 % der Fälle bei der GBM-Erstdiagnose in der Stupp-Therapie-Gruppe keine und in 26,9 % der Fälle eine schwache PD-1-Expression (Score 1, s. Tab. 17).

Tabelle 17: Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

PD-1-Score bei Erstdiagnose		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
0 (< 1 %)	Anzahl	2	19	0 (< 1 %)
	Anteile *	50,0 %	73,1 %	70,0 %
1 (1–24 %)	Anzahl	2	7	1 (1–24 %)
	Anteile *	50,0 %	26,9 %	30,0 %
Gesamt	Anzahl	4	26	Gesamt
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

Auch die Matched-pairs Proben der progredienten Tumoren zeigten bei den mit einer Stupp-Therapie behandelten Patienten keine (Score 0: 73,1 %) oder maximal eine schwache (Score 1: 26,9 %) PD-1-Expression (Tab. 18).

Tabelle 18: Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

PD-1-Score bei Progression		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
0 (< 1 %)	Anzahl	4	19	23
	Anteile *	100,0 %	73,1 %	76,7 %
1 (1–24 %)	Anzahl	0	7	7
	Anteile *	0,0 %	26,9 %	23,3 %
Gesamt	Anzahl	4	26	30
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

Die Veränderungen der PD-1-Expressionscores nach einer Stupp-Therapie oder einer RT sind schematisch in Abbildung 17 dargestellt.

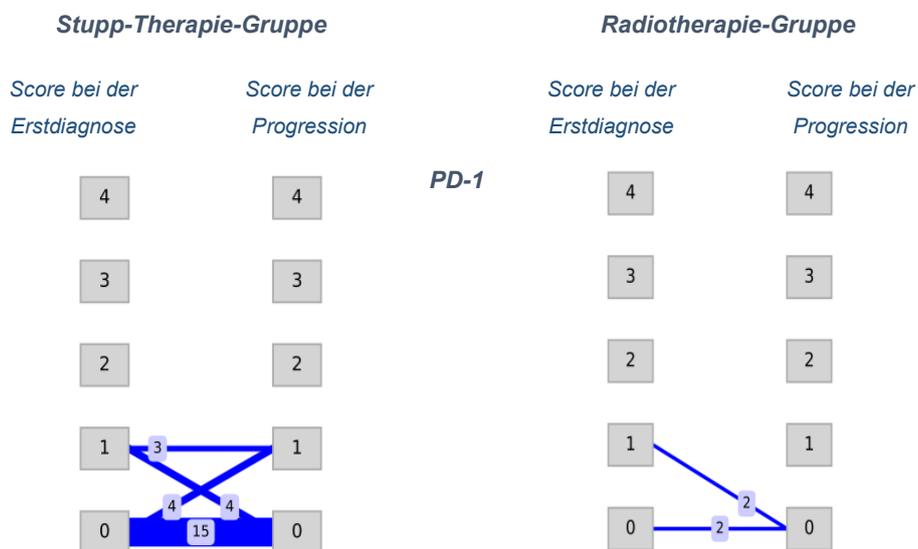


Abbildung 17: Immunhistochemischer Score der Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts).

Die Änderungen der Expressionsscores von der Erstdiagnose zur Progression sind durch blaue Linien mit Anzahl der Patienten gekennzeichnet.

In der Stupp-Therapie-Gruppe blieb bei 18 Patienten (69,2 %) der PD-1-Expressionscore konstant. Eine Erhöhung bzw. Erniedrigung des MSR1-Expressionscores trat bei jeweils vier Patienten (je 15,4 %) auf (s. Tab. 19).

Tabelle 19: Veränderung der Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose

Differenz PD-1-Score		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
-1	Anzahl	2	4	6
	Anteile *	50,0 %	15,4 %	20,0 %
0	Anzahl	2	18	20
	Anteile *	50,0 %	69,2 %	66,7 %
1	Anzahl	0	4	4
	Anteile *	0,0 %	15,4 %	13,3 %
Gesamt	Anzahl	4	26	30
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

3.1.7 PD-L1 (Immuncheckpoint-Ligand)

Der PD-L1 zeigte in 80,8 % der Fälle eine schwache bis mäßige (Score 1: 50 %; Score 2: 30,8 %) Expression in den Tumorproben bei der GBM-Erstdiagnose. Eine fehlende PD-L1-Expression lag bei drei Patienten (11,5 %), eine starke bei zwei Patienten (7,7 %) vor (s. Tab. 20).

Tabelle 20: Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

PD-L1-Score bei Erstdiagnose		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
0 (< 1 %)	Anzahl	1	3	4
	Anteile *	20,0 %	11,5 %	12,9 %
1 (1–24 %)	Anzahl	3	13	16
	Anteile *	60,0 %	50,0 %	51,6 %
2 (25–49 %)	Anzahl	0	8	8
	Anteile *	0,0 %	30,8 %	25,8 %
3 (50–74 %)	Anzahl	1	2	3
	Anteile *	20,0 %	7,7 %	9,7 %
Gesamt	Anzahl	5	26	31
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

Die Matched-pairs Proben der progredienten Tumoren der drei zum Zeitpunkt der Erstdiagnose PD-L1-negativen Tumorproben (11,5 %, Score 0) zeigten nach der Stupp-Therapie alle eine PD-L1-Expression. Die Anteile mit einer schwachen und mäßigen PD-L1-Expression hatten zugenommen (Score 1: von 50,0 % auf

53,0 %; Score 2: von 30,8 % auf 38,5 %). Der Anteil mit einer starken Expression (Score 3) blieb unverändert (7,7 %, s. Tab. 21).

Tabelle 21: Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

PD-L1-Score bei Progression		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
0 (< 1 %)	Anzahl	1	0	1
	Anteile *	20,0 %	0,0 %	3,2 %
1 (1–24 %)	Anzahl	3	14	17
	Anteile *	60,0 %	53,8 %	54,8 %
2 (25–49 %)	Anzahl	1	10	11
	Anteile *	20,0 %	38,5 %	35,5 %
3 (50–74 %)	Anzahl	0	2	2
	Anteile *	0,0 %	7,7 %	6,5 %
Gesamt	Anzahl	5	26	31
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

Die Veränderungen der PD-L1-Expressionsscores nach einer Stupp-Therapie oder einer RT sind schematisch in Abbildung 18 dargestellt.

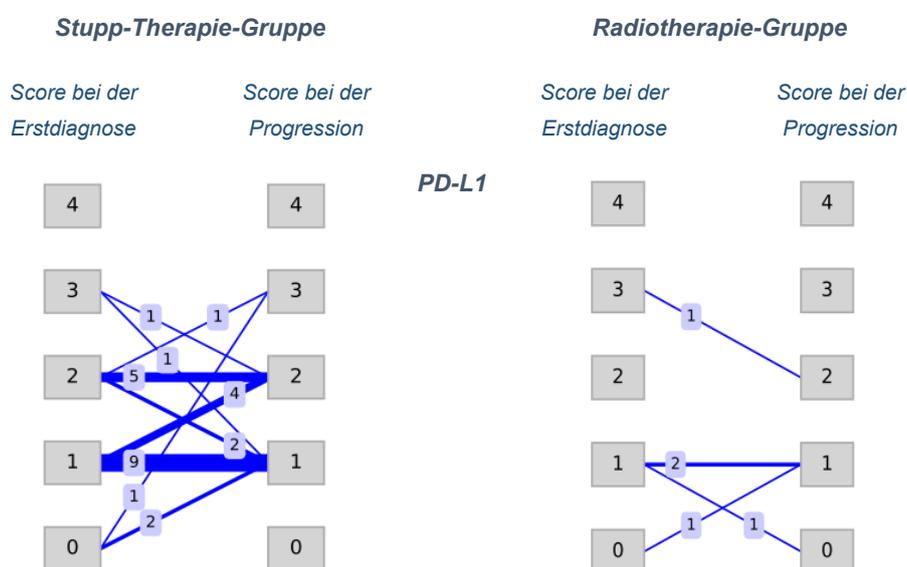


Abbildung 18: Immunhistochemischer Score der Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts). Die Änderungen der Expressionsscores von der Erstdiagnose zur Progression sind durch blaue Linien mit Anzahl der Patienten gekennzeichnet

In der Stupp-Therapie-Gruppe blieb bei 13 Patienten (50 %) der PD-L1-Expressionsscore konstant. Eine Erhöhung trat in dieser Gruppe bei neun Patienten (34,6 %) und eine Erniedrigung bei vier Patienten (15,3 %) auf (s. Tab. 22).

Tabelle 22: Veränderung der Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose

Differenz PD-L1-Score		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
-2	Anzahl	0	1	1
	Anteile *	0,0 %	3,8 %	3,2 %
-1	Anzahl	2	3	5
	Anteile *	40,0 %	11,5 %	16,1 %
0	Anzahl	2	13	15
	Anteile *	40,0 %	50,0 %	48,4 %
1	Anzahl	1	8	9
	Anteile *	20,0 %	30,8 %	29,0 %
3	Anzahl	0	1	1
	Anteile *	0,0 %	3,8 %	3,2 %
Gesamt	Anzahl	5	26	31
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

3.1.8 CTLA-4 (Immunecheckpoint)

Bei der GBM-Erstdiagnose zeigten die Tumorproben in 88,5 % der Fälle keine CTLA-4-Expression. Die restlichen Proben (11,5 %) wiesen eine schwache CTLA-4-Expression (Score 1) auf (s. Tab. 23).

Tabelle 23: Cytotoxic-T-lymphocyte-associated-protein-4-(CTLA-4)-Scores in den Tumorproben bei Erstdiagnose – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

CTLA-4-Score bei Erstdiagnose		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
0 (< 1 %)	Anzahl	3	23	26
	Anteile *	75,0 %	88,5 %	86,7 %
1 (1–24 %)	Anzahl	1	3	4
	Anteile *	25,0 %	11,5 %	13,3 %
Gesamt	Anzahl	4	26	30
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

In den Matched-pairs Proben der progredienten Tumoren hatte die CTLA-4-Expression zugenommen. Der Anteil der Proben mit Score 1 hatte sich nach einer

Stupp-Therapie verdoppelt (11,5 % vs. 23,1 %). 11,6 % der Patienten ohne CTLA-4-Expression in den Tumorproben bei der GBM-Erstdiagnose zeigten eine schwache Expression in den Proben der progredienten Tumoren (s. Tab. 24).

Tabelle 24: Cytotoxic-T-lymphocyte-associated-protein-4-(CTLA-4)-Scores in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Progression – Radio- vs. Stupp-Therapie-Gruppe

CTLA-4-Score bei Progression		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
0 (< 1 %)	Anzahl	2	20	22
	Anteile *	50,0 %	76,9 %	73,3 %
1 (1–24 %)	Anzahl	2	6	8
	Anteile *	50,0 %	23,1 %	26,7 %
Gesamt	Anzahl	4	26	30
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

Die Veränderungen der CTLA-4-Expressionsscores nach einer Stupp-Therapie (links) oder RT (rechts) sind in Abbildung 19 dargestellt.

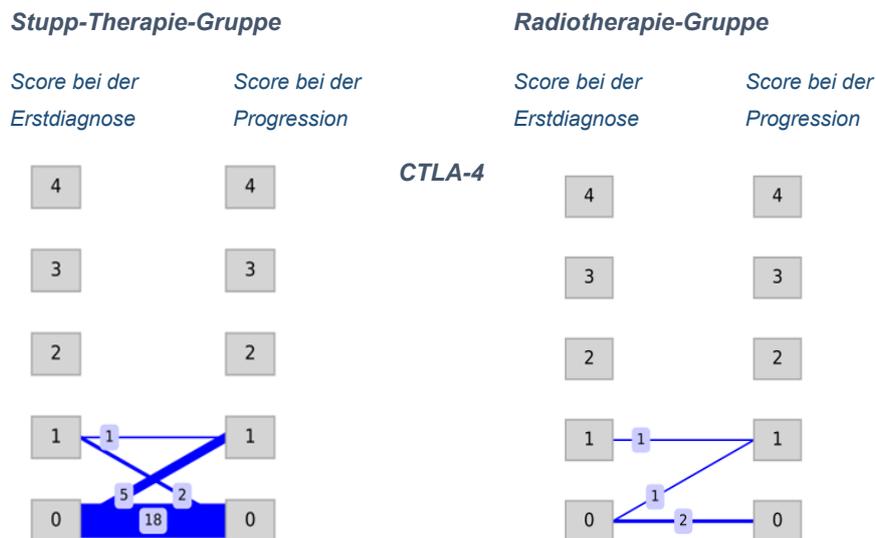


Abbildung 19: Immunhistochemischer Score der Cytotoxic-T-lymphocyte-associated-protein-4-(CTLA-4)-Expression in Matched-pairs bei der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression in der Stupp- (links) und Radiotherapie-Gruppe (rechts). Die Änderungen der Expressionsscores von der Erstdiagnose zur Progression sind durch blaue Linien mit Anzahl der Patienten gekennzeichnet.

In der Stupp-Therapie-Gruppe blieben bei 19 Patienten (73,1 %) die CTLA-4-Expressionsscores konstant. Eine Erhöhung trat in dieser Gruppe bei fünf Patienten (19,2 %) und eine Erniedrigung bei zwei Patienten (7,7 %) auf (s. Tab. 25).

Tabelle 25: Veränderung der Cytotoxic-T-lymphocyte-associated-protein-4-(CTLA-4)-Scores in der Radio- und Stupp-Therapie-Gruppe – Werte zum Zeitpunkt der Progression minus Werte bei der Erstdiagnose

Differenz CTLA-4-Score		Radiotherapie	Stupp-Therapie	Gesamt
-1	Anzahl	0	2	2
	Anteile *	0,0 %	7,7 %	6,7 %
0	Anzahl	3	19	22
	Anteile *	75,0 %	73,1 %	73,3 %
1	Anzahl	1	5	6
	Anteile *	25,0 %	19,2 %	20,0 %
Gesamt	Anzahl	4	26	30
	Anteile *	100,0 %	100,0 %	100,0 %

* Prozentangaben beziehen sich auf die Therapiegruppen

3.1.9 Zusammenfassung der Matched-pairs Analyse

Zusammengefasst ergab die Matched-pairs Analyse der Tumorproben der Stupp-Therapie-Gruppe eine schwache bis mäßige CD8-, PD-1- und CTLA-4-Expression zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose, die im progredienten Stadium weitgehend erhalten blieb. Die CD4- und PD-L1-Expression nahm dagegen nach der Stupp-Therapie im progredienten Stadium deutlich zu. Die Expressionsscores von CD4, MSR1 und CD163 (mäßig bis sehr stark) lagen im Vergleich zu den anderen Markern deutlich höher.

3.2 Potenzielle Korrelationen der Parameter der Immunphänotypisierung in den Matched-pairs GBM-Tumorproben

Weiter wurden potenzielle Korrelationen der Parameter der Immunphänotypisierung in den Matched-pairs Tumorproben bei der GBM-Erstdiagnose und bei der Progression sowie weitere Parameter untersucht. In der folgenden Heatmap (s. Abb. 21) sind die Spearman-Korrelationskoeffizienten (Expressions-Scores der Marker zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und der Progression (PT_Marker/RT_Marker), Änderungen der Scores von der Erstdiagnose bis zur Progression (Change_Marker), PFS (diff), Therapiegruppe (Gruppe), Alter dargestellt.

Eine hohe positive Korrelation bestand beim GBM zwischen der MSR1- und PD-L1-Expression in progredienten Tumorproben (RT_MSR/RT_PD-L1; $r_s = 0,8$). Bei der GBM-Erstdiagnose zeigten die PD-1- und CD8- (PT_PD-1/PT_CD8; $r_s = 0,7$), die CD4- und CD163- (PT-CD4/PT_CD163; $r_s = 0,7$) sowie die CD163- und PD-L1-Expression (PT_CD163/PT_PD-L1; $r_s = 0,6$) eine moderate Korrelation. Relevante negative Korrelationen waren nicht erkennbar.

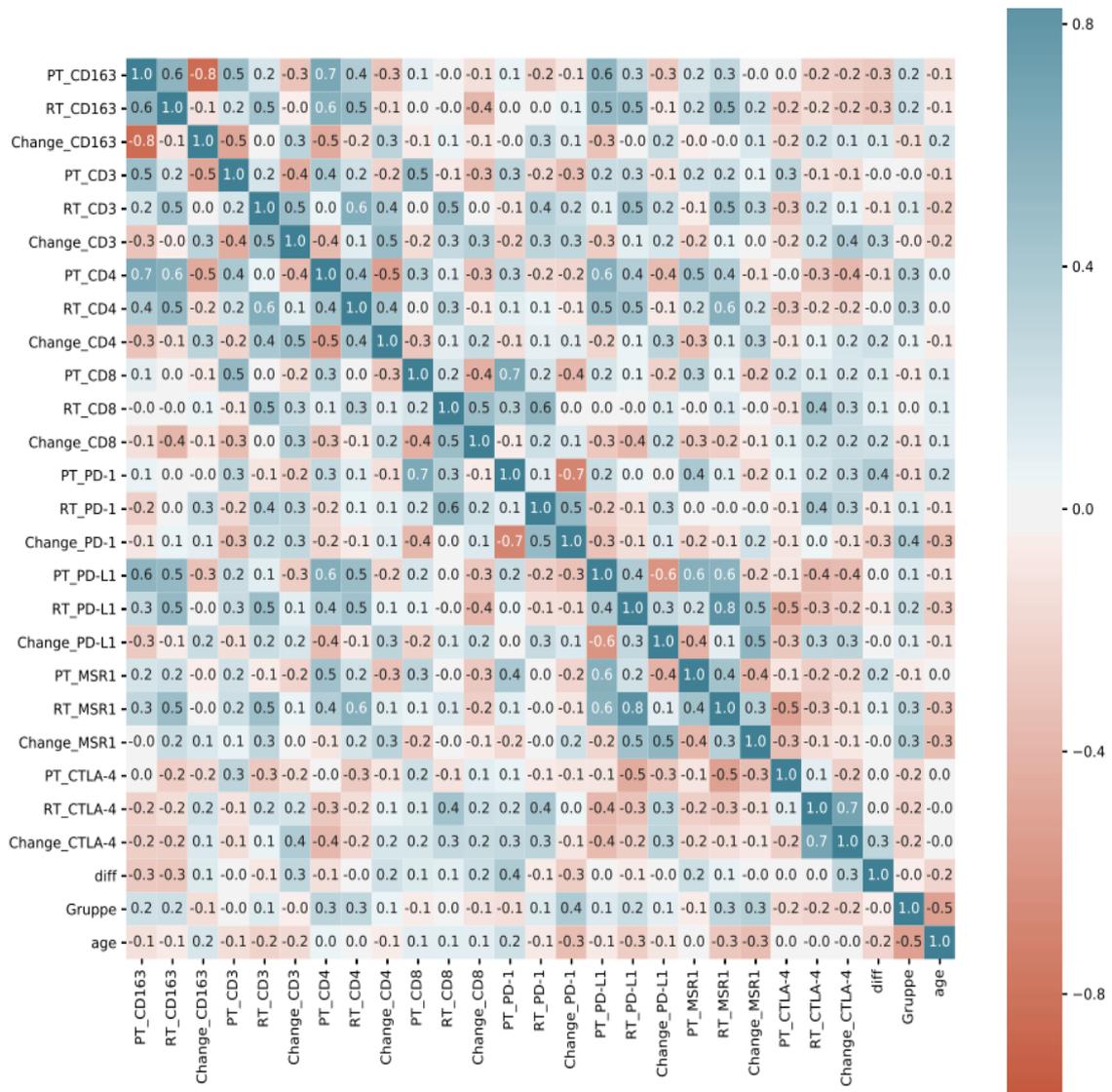


Abbildung 20: Heatmap der Spearman-Korrelationskoeffizienten (r_s) der untersuchten Variablen. Positive Korrelationen = blau, negative Korrelationen = rot; Intensität der Farbe entspricht dem Ausmaß der Korrelation (siehe Skala rechts); diff = progressionsfreies Überleben, Gruppe = Therapiegruppen (Radiotherapie, Stupp-Therapie), PT = Expression zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, RT = Expression zum Zeitpunkt der Progression, Change_Marker (CD3, CD4, CD8, PD-1, PD-L1, MSR1, CD163, CTLA-4): Expression zum Zeitpunkt der Progression minus Expression zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. CD = Cluster of differentiation; CTLA-4 = Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4; MSR1 = Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1; PD-1 = Programmed cell death protein 1; PD-L1 = Programmed cell death protein ligand 1

3.3 Potenzieller Einfluss der Expressionsscores zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und deren Änderung bis zur Progression auf das PFS

Trotz des aggressiven Behandlungsschemas tritt eine Progression beim GBM im Mittel nur 6–9 Monate nach der Erstbehandlung auf (Wen and Kesari, 2008). Diese schlechte Prognose unterstreicht die Bedeutung der Identifikation von Faktoren, die das PFS beeinflussen. Im Folgenden wird der Einfluss der Marker-Expression (Lymphozyten, Makrophagen, ICs) in den Tumorproben zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose und der Expressionsänderung dieser Marker von der Erstdiagnose bis zur Progression auf das PFS untersucht.

3.3.1 Potenzieller Einfluss von CD3 auf das PFS

Die mediane Zeit zwischen der GBM-Erstdiagnose und der Progression betrug bei Patienten mit einem CD3-Expressionsscore 0 (< 1–5 %, n = 22) bei der GBM-Erstdiagnose 8 Monate (95-%-KI: 5,8–10,3 Monate) und bei einem Score 1 (6–15 %, n = 7) 7 Monate (95-%-KI: 4,5–9,6 Monate, s. Tab. 26).

Tabelle 26: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

CD3-Expres- sion	Schät- zer	Mittelwert ^a			Schät- zer	Median		
		SE	95-%-KI			SE	95-%-KI	
			UG	OG			UG	OG
0 (< 1–5 %), n = 22	12,864	3,621	5,766	19,961	8,000	1,173	5,702	10,298
1 (6–15 %), n = 7	14,857	7,096	,949	28,765	7,000	1,309	4,434	9,566
Gesamt	13,345	3,177	7,118	19,571	8,000	1,153	5,740	10,260

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Ein Jahr nach der GBM-Erstdiagnose (PFS 12) waren etwa 28 % der GBM-Patienten in beiden CD3-Expressionsscore-Gruppen progressionsfrei (s. Abb. 21).

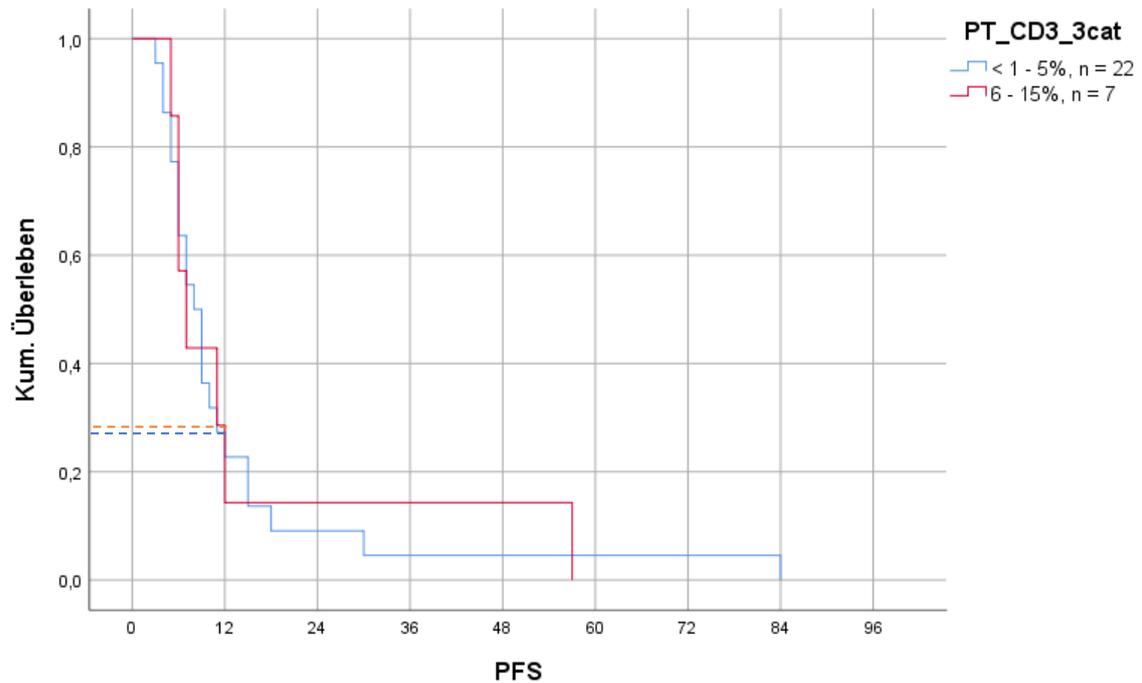


Abbildung 21: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

Blaue Linie: CD3-Expression < 1–5 %, rote Linie: CD3-Expression 6–15 %. Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten

Anschließend wurde die potenzielle Korrelation der Änderung der CD3-Expression vom Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose bis zur Progression (Abnahme (-1), keine Änderung (0), Zunahme (1)) mit dem PFS untersucht. Bei einer Zunahme der CD3-Expression (Score: 1, n = 7, 15 Monate) nach der Therapie zeigten die Patienten ein höheres medianes PFS als bei einer Abnahme (Score: -1, n = 7, 6 Monate) bzw. bei einer konstanten Expression (Score: 1, n = 14, 7 Monate, Tab. 27).

Tabelle 27: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression

Differenz CD3-Ex- pression ^b	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	SE	95%-KI		Schätzer	SE	95%-KI	
			UG	OG			UG	OG
-1, n = 7	7,857	1,056	5,787	9,927	6,000	,436	5,145	6,855
0, n = 14	11,714	3,573	4,712	18,716	7,000	,935	5,167	8,833
1, n = 7	23,429	10,666	2,524	44,333	15,000	7,856	,000	30,397
Gesamt	13,679	3,274	7,261	20,096	8,000	1,134	5,778	10,222

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. b. Abnahme (-1), konstante Expression (0), Zunahme (1), KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Ein Jahr nach der GBM-Erstdiagnose waren jeweils etwa 20 % der GBM-Patienten mit einer abnehmenden (Score: -1, n = 7) oder konstanten (Score: 0, n = 14) CD3-Expression progressionsfrei. Bei den Patienten mit einer Zunahme (Score: 1, n = 7) der CD3-Expression betrug der Anteil ~ 58 % (Abb. 22).

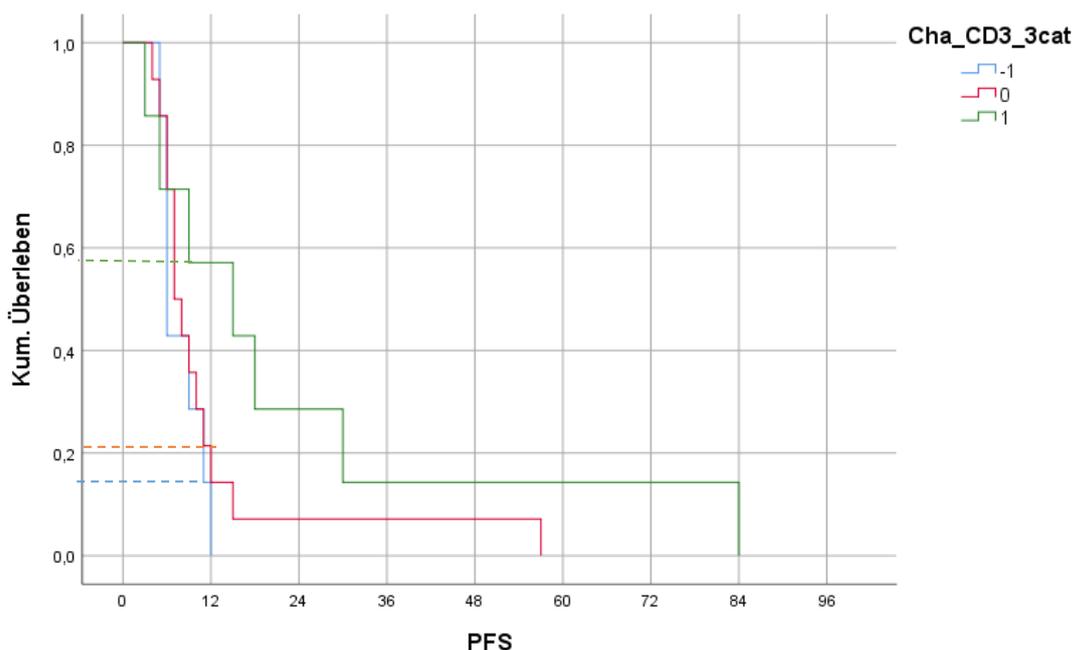


Abbildung 22: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-3-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression. Abnahme (-1, blaue Linie), konstante Expression (0, rote Linie), Zunahme (1, grüne Linie). Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten

3.3.2 Potenzieller Einfluss von CD4 auf das PFS

Das mediane PFS betrug bei Patienten mit einer CD4-Expression von < 1–5 % (n = 9) zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose 15 Monate (95-%-KI: < 1–32,6 Monate). Bei einer Expression von 6–15 % (n = 15, 95-%-KI: 4–10,1 Monate) und bei einer Expression von > 16 % (n = 7, 95-%-KI: 5,8–8,3 Monate) lag das PFS jeweils bei 7 Monaten (s. Tab 28).

Tabelle 28: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

CD4-Expression	Schätzer	Mittelwert ^a			Median			
		SE	95-%-KI		SE	95-%-KI		
			UG	OG	Schätzer	SE	UG	OG
< 1–5 %, n = 9	26,889	9,907	7,471	46,307	15,000	8,944	,000	32,531
6–15 %, n = 15	11,000	3,400	4,335	17,665	7,000	1,546	3,970	10,030
> 16 %, n = 7	8,000	,845	6,343	9,657	7,000	,655	5,717	8,283
Gesamt	14,935	3,498	8,079	21,792	8,000	1,192	5,663	10,337

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Nach einem Jahr waren < 20 % der Patienten mit einer CD4-Expression zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose von > 16 % progressionsfrei. Bei einer CD4-Expression von 6–15 % betrug der Anteil 20 % und bei einer Expression < 5 % etwa 58 % (Abb. 23).

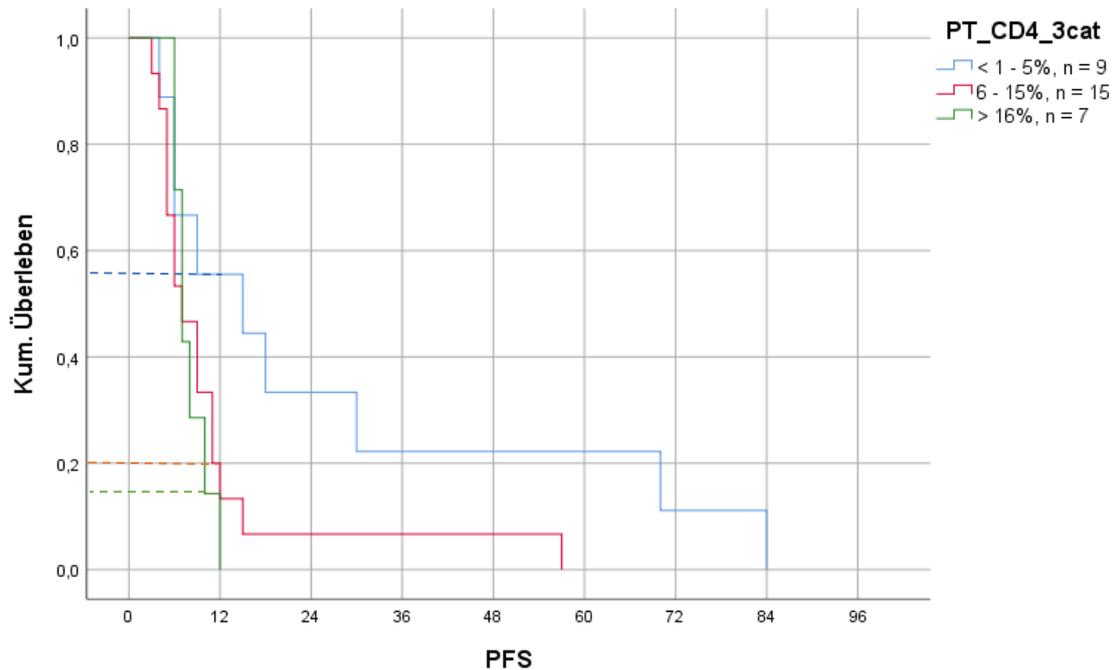


Abbildung 23: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

Blaue Linie: Expression <math>< 1-5\%</math>, rote Linie: Expression $6-15\%$, grüne Linie: Expression $> 16\%$. Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten.

Bei einer Zunahme der CD4-Expression (Score 1, $n = 10$) nach der Operation zeigten die Patienten ein höheres medianes PFS (9 Monate) als bei einer Abnahme (Score -1, $n = 6,6$ Monate) oder konstanten Expression (Score 0, $n = 14$, 8 Monate, s. Tab. 29).

Tabelle 29: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression

Differenz CD4-Ex- pression ^b	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	SE	95-%-KI		Schätzer	SE	95-%-KI	
			UG	OG			UG	OG
-1, $n = 6$	7,333	1,308	4,769	9,897	6,000	1,633	2,799	9,201
0, $n = 14$	15,929	5,463	5,222	26,635	8,000	1,247	5,555	10,445
1, $n = 10$	19,200	7,627	4,251	34,149	9,000	4,743	,000	18,297
Gesamt	15,300	3,597	8,250	22,350	8,000	1,174	5,700	10,300

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. b. Abnahme (-1), konstante Expression (0), Zunahme (1), KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Ein Jahr nach der Operation waren etwa 50 % der GBM-Patienten mit einer Zunahme der CD4-Expression (Score: 1, n = 10) progressionsfrei. Bei einer konstanten Expression (Score: 0, n = 14) oder Expressionsabnahme (Score: -1, n = 6) betrug der Anteil jeweils etwa 20 % (s. Abb. 24).

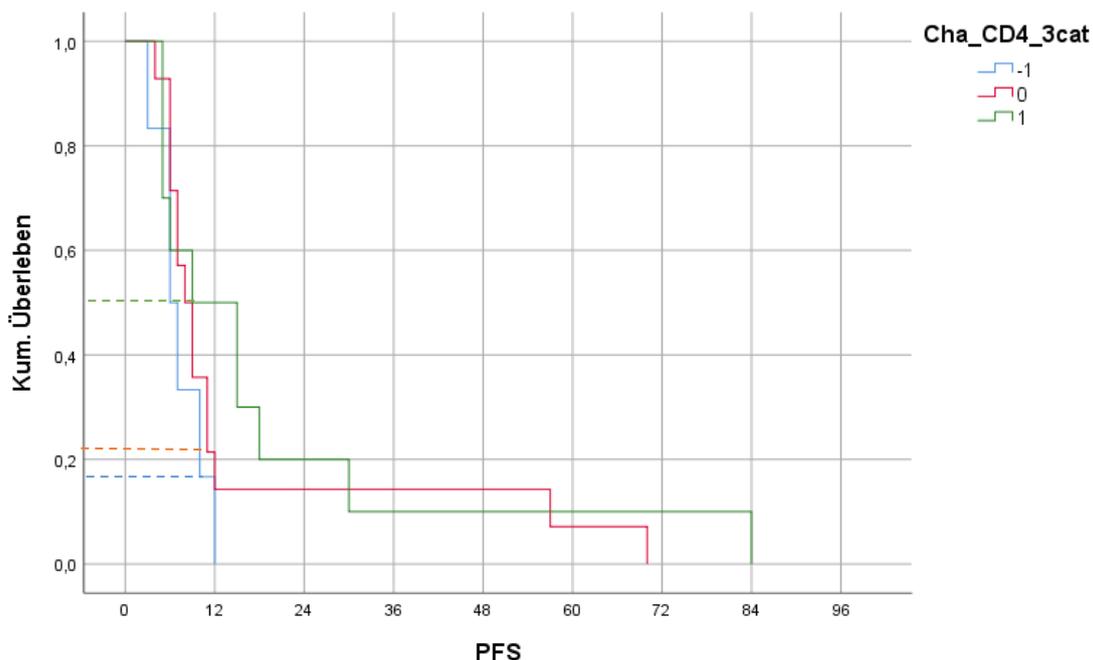


Abbildung 24: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression. Abnahme (-1, blaue Linie), konstante Expression (0, rote Linie), Zunahme (1, grüne Linie). Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten.

3.3.3 Potenzieller Einfluss von CD8 auf das PFS

Das mediane PFS betrug bei Patienten mit einer CD8-Expression von < 1–5 % (n = 24) bei der GBM-Erstdiagnose 7 Monate (95%-KI: 5,9–8,2 Monate). Bei einer CD8-Expression von 6–15 % (n = 6) lag der Wert bei 10 Monaten (95%-KI: 7,6–12,5 Monate, s. Tab. 30).

Tabelle 30: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-8-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

CD8-Expres- sion	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	SE	95%-KI		Schätzer	SE	95%-KI	
			UG	OG			UG	OG
< 1–5 %, n = 24	13,875	3,842	6,344	21,406	7,000	,604	5,817	8,183
6–15 %, n = 6	10,000	,931	8,175	11,825	10,000	1,225	7,600	12,400
Gesamt	13,100	3,079	7,066	19,134	7,000	1,174	4,700	9,300

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Ein Jahr nach der Operation waren ~ 25 % der Patienten (n = 24) mit einer CD8-Expression von < 1–5 % progressionsfrei. Bei Patienten mit einer CD8-Expression von 6–15 % betrug der Anteil ~ 33 % (n = 6) (Abb. 25).

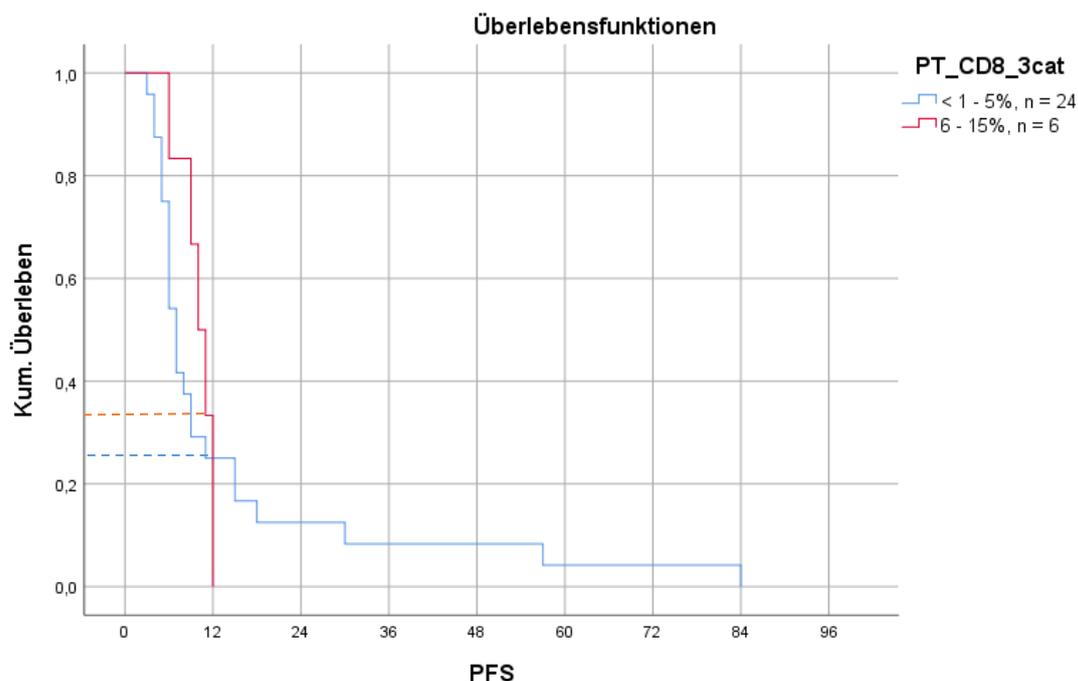


Abbildung 25: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-8-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

Blaue Linie: Expression < 1–5 %, rote Linie: Expression 6–15 %. Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten.

Da sich bei 53,6 % der Patienten (15/28) der CD8-Score nach der Therapie nicht veränderte, enthielt die Gruppe mit einer Abnahme der CD8-Expression (Score -1) nur fünf Fälle und ein breites 95%-KI (1,4–18,5 Monate), was die Aus-

sagekraft der Daten einschränkt. Patienten mit einer Zunahme der CD8-Expression zeigten ein besseres PFS als Patienten mit einer konstanten Expression (9 vs. 7 Monate, s. Tab. 31).

Tabelle 31: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-4-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression

Differenz CD8-Ex- pression ^b	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	SE	95%-KI		Schätzer	SE	95%-KI	
			UG	OG			UG	OG
-1, n = 5	8,600	1,536	5,589	11,611	10,000	4,382	1,412	18,588
0, n = 15	10,867	3,373	4,255	17,478	7,000	,632	5,760	8,240
1, n = 8	21,000	9,494	2,391	39,609	9,000	2,828	3,456	14,544
Gesamt	13,357	3,285	6,918	19,796	7,000	1,134	4,778	9,222

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. b. Abnahme (-1), konstante Expression (0), Zunahme (1), KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Ein Jahr nach der Operation waren jeweils etwa 20 % der GBM-Patienten mit einer Abnahme der CD8-Expression (Score: -1, n = 5) oder einer konstanten Expression (Score: 0, n = 15) progressionsfrei. Bei Patienten mit einer Zunahme der CD8-Expression (Score: 1, n= 8) betrug der Anteil ~ 38 % (s. Abb. 26).

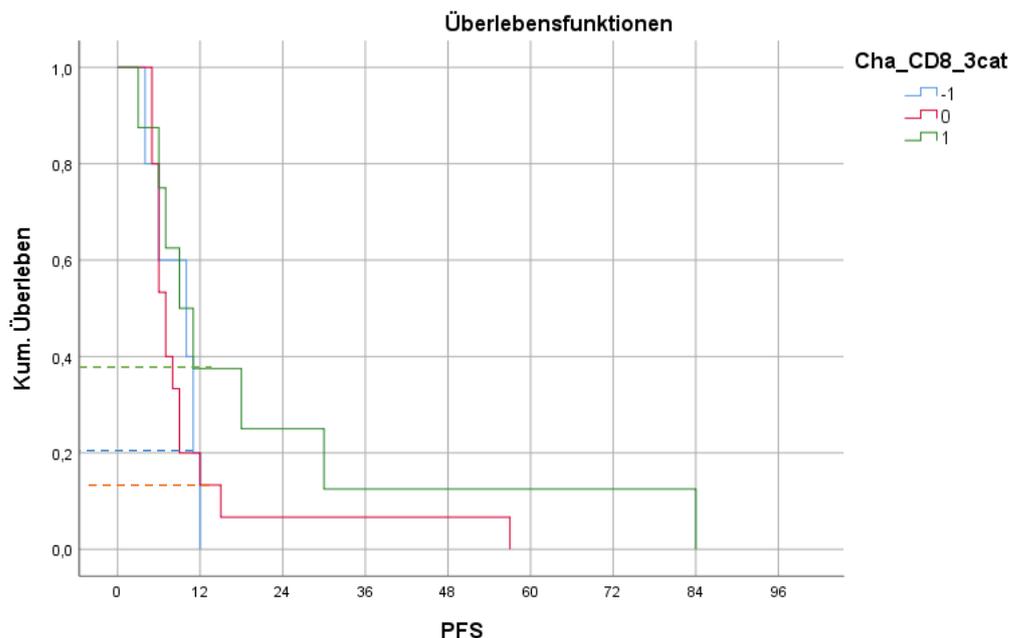


Abbildung 26: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-8-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression
Abnahme (-1, blaue Linie), konstante Expression (0, rote Linie), Zunahme (1, grüne Linie). Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten.

3.3.4 Potenzieller Einfluss von PD-1 auf das PFS

Die mediane Zeit zwischen der Operation und der Progression betrug bei Patienten mit einer PD-1-Expression von < 1 % (n = 22) bzw. 1–24 % (n = 9) bei der GBM-Erstdiagnose 6 Monate (95%-KI: 4,7–7,4 Monate) bzw. 11 Monate (95%-KI: 8,1–14 Monate, s. Tab. 32).

Tabelle 32: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

PD-1-Ex-pression	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	SE	95%-KI		Schätzer	SE	95%-KI	
			UG	OG			UG	OG
< 1 %, n = 22	14,091	4,189	5,881	22,301	6,000	,670	4,687	7,313
1–24 %, n = 9	15,111	4,823	5,658	24,564	11,000	1,491	8,078	13,922
Gesamt	14,387	3,244	8,029	20,745	8,000	1,192	5,663	10,337

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Ein Jahr nach der Operation waren ~ 22 % der Patienten (n = 22) mit einer PD-1-Expression < 1 % bzw. ~ 43 % der Patienten (n= 9) mit einer Expression von 1–24 % zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose progressionsfrei (s. Abb. 27).

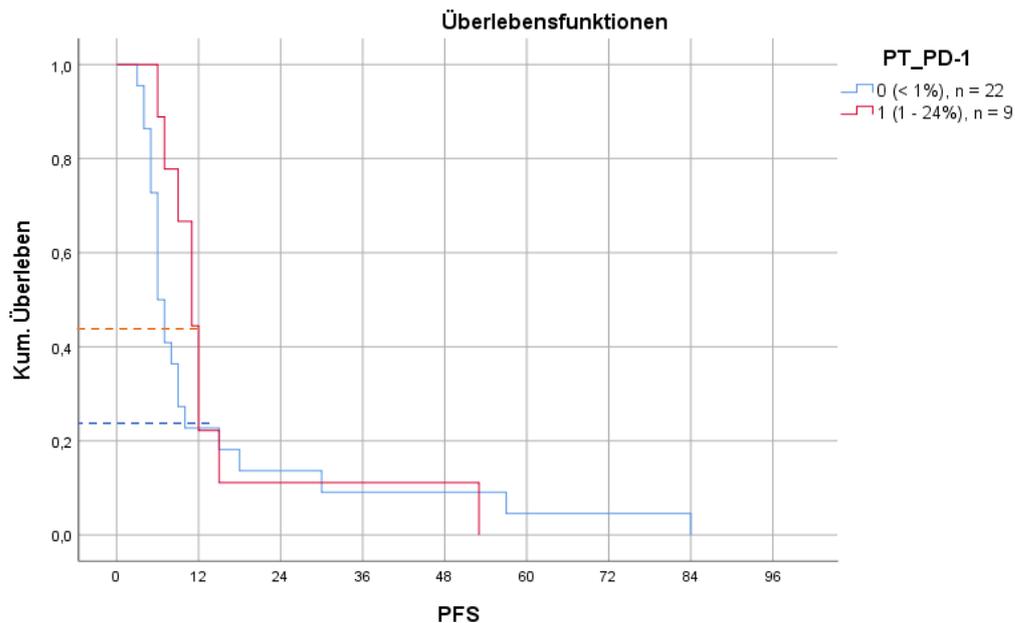


Abbildung 27: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose
Blaue Linie: Expression < 1 %, rote Linie: Expression 1–24 %. Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten.

Bei einer Abnahme der PD-1-Expression (Score -1, n = 6, 11 Monate) nach der Therapie zeigten die Patienten ein höheres medianes PFS als bei einer Zunahme (Score 1, n = 4, 5 Monate) bzw. konstanten Expression (Score 0, n = 14, 7 Monate, s. Tab. 33). Die Gruppe mit einer Zunahme der PD-1-Expression enthielt nur vier Patienten und zeigte ein breites 95%-KI und wurde daher nicht weiter analysiert.

Tabelle 33: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Änderung der Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression

Differenz PD-1-Ex- pression ^b	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	SE	95%-KI		Schätzer	SE	95%-KI	
			UG	OG			UG	OG
-1, n = 6	17,167	7,287	2,885	31,448	11,000	2,309	6,474	15,526
0, n = 20	14,900	4,532	6,018	23,782	7,000	1,491	4,078	9,922
1, n = 4	10,250	3,683	3,032	17,468	5,000	6,000	,000	16,760
Gesamt	14,733	3,335	8,197	21,270	8,000	1,174	5,700	10,300

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. b. Abnahme (-1), konstante Expression (0), Zunahme (1), KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Ein Jahr nach der Operation betrug das PFS bei GBM-Patienten mit einer Abnahme der PD-1-Expression (Score: -1, n = 6) ~ 33 %. Bei Patienten mit einer konstanten PD-1-Expression (Score: 0, n = 20) waren ~ 25 % progressionsfrei (s. Abb. 28).

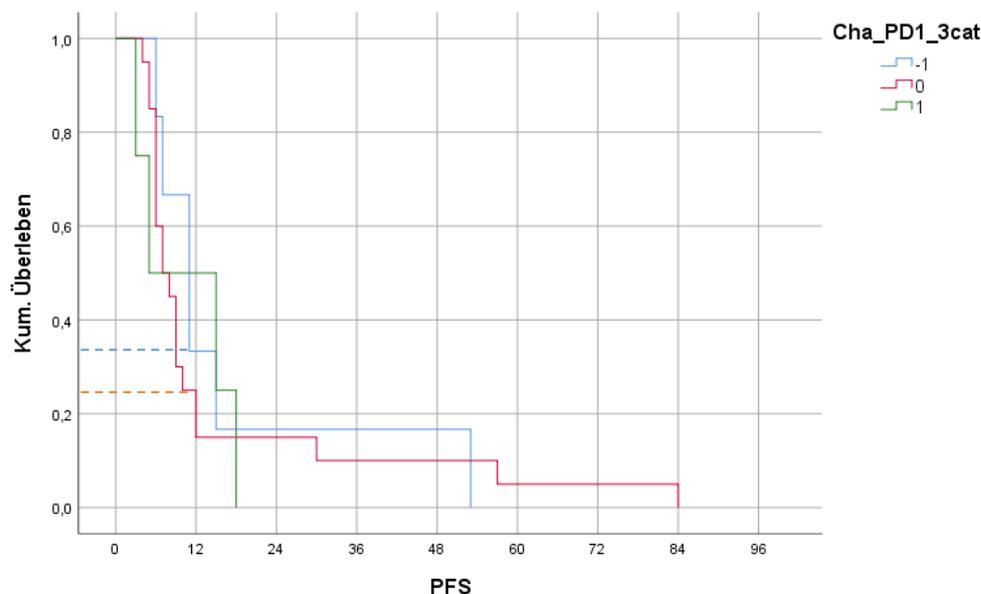


Abbildung 28: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Änderung der Programmed-cell-death-protein-1-(PD-1)-Expression in den Tumormproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression Abnahme (-1, blaue Linie), konstante Expression (0, rote Linie), Zunahme (1, grüne Linie). Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten

3.3.5 Potenzieller Einfluss von PD-L1 auf das PFS

Die mediane Zeit zwischen der GBM-Erstdiagnose und der Progression betrug bei Patienten mit einer PD-L1-Expression von 1–24 % (n = 21) bei der GBM-Erstdiagnose 7 Monate (95-%-KI: 2,6–11,5 Monate). Bei einer PD-L1-Expression von 25–49 % (n = 11) lag der Wert bei 9 Monaten (95-%-KI: 7–11,1 Monate) (s. Tab. 34).

Tabelle 34: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Expression in den Tumormproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

PD-L1-Expression	Schätzer	Mittelwert ^a			Median			
		SE	95-%-KI		SE	95-%-KI		
			UG	OG			UG	OG
1–24 %, n = 21	18,429	5,332	7,978	28,879	7,000	2,289	2,514	11,486
25–49 %, n = 11	13,273	4,456	4,539	22,007	9,000	1,064	6,915	11,085
Gesamt	16,656	3,799	9,210	24,102	8,000	1,212	5,624	10,376

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Ein Jahr nach der Operation waren ~ 32 % der Patienten (n = 21) mit einer PD-L1-Expression von 1–24 % bzw. ~ 26 % (n = 11) der Patienten mit einer PD-L1-Expression von 25–49 % progressionsfrei (s. Abb. 29).

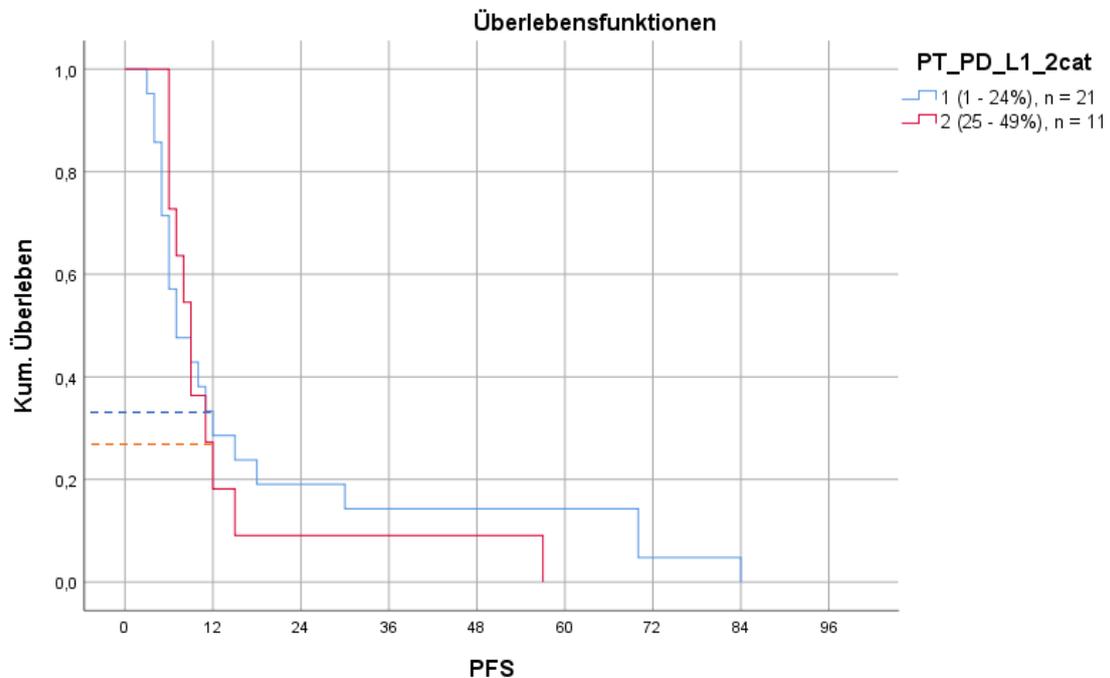


Abbildung 29: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose
Blaue Linie: Expression < 1–24 %, rote Linie: Expression 25–49 %. Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten.

Bei einer Zunahme der PD-L1-Expression (Score 1, n= 10, 7 Monate) nach der Therapie zeigten die Patienten ein niedrigeres medianes PFS als bei einer Abnahme (Score -1, n = 6, 8 Monate) bzw. konstanten Expression (Score 0, n = 15, 9 Monate, s. Tab. 35).

Tabelle 35: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Änderung der Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression

Differenz PD-L1-Ex- pression ^b	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	SE	95-%-KI		Schätzer	SE	95-%-KI	
			UG	OG			UG	OG
-1, n = 6	18,333	10,362	,000	38,643	8,000	1,837	4,399	11,601
0, n = 15	16,200	5,131	6,144	26,256	9,000	3,220	2,688	15,312
1, n = 10	17,600	7,730	2,448	32,752	7,000	1,581	3,901	10,099
Gesamt	17,065	3,901	9,419	24,710	9,000	1,177	6,692	11,308

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. b. Abnahme (-1), konstante Expression (0), Zunahme (1), KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Ein Jahr nach der Operation waren ~ 34 % der GBM-Patienten mit einer Abnahme der PD-L1-Expression (Score: -1, n = 6) progressionsfrei. In der Gruppe der Patienten mit einer konstanten Expression (Score: 0, n = 15) betrug der Anteil ~ 40 % und bei Patienten mit einer Zunahme der PD-L1-Expression (Score: 1, n = 10) ~ 30 % (s. Abb. 30).

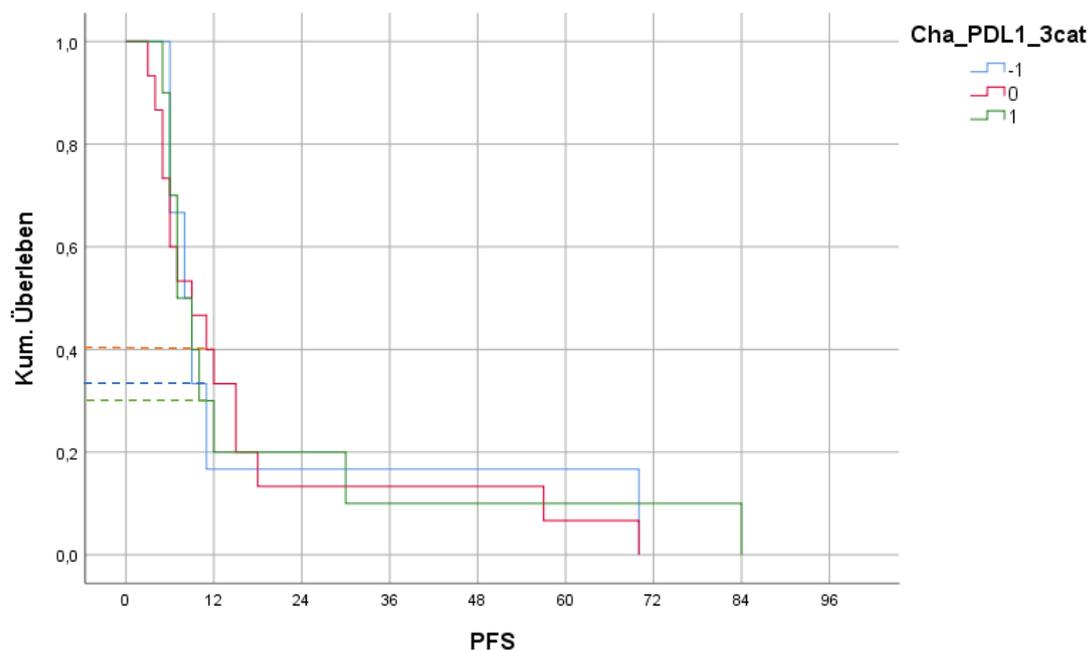


Abbildung 30: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Änderung der Programmed-cell-death-protein-ligand-1-(PD-L1)-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression Abnahme (-1, blaue Linie), konstante Expression (0, rote Linie), Zunahme (1, grüne Linie). Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten.

3.3.6 Potenzieller Einfluss von CTLA-4 auf das PFS

Die mediane Zeit zwischen der Operation und der GBM-Progression betrug bei Patienten mit einer CTLA-4 Expression von < 1 % (n = 27) bei der GBM-Erstdiagnose 8 Monate (95-%-KI: 5,5–10,6 Monate) und bei Patienten mit einer CTLA-4-Expression von 1–24 % (n = 5) 5 Monate (95-%-KI: 0–10,9 Monate, s. Tab. 36).

Tabelle 36: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Cytotoxic-T-lymphocyte-associated-protein-4-(CTLA-4)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

CTLA-4-Expression	Schätzer	SE	Mittelwert ^a		Schätzer	SE	Median	
			UG	OG			UG	OG
< 1 %, n = 27	15,481	3,678	8,272	22,690	8,000	1,298	5,456	10,544
1–24 %, n = 5	7,000	1,826	3,422	10,578	5,000	3,000	,000	10,880
Gesamt	14,387	3,244	8,029	20,745	8,000	1,192	5,663	10,337

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Ein Jahr nach der Operation war kein Patient (0 %) mit einer CTLA-4-Expression von 1–24 % (n = 5) progressionsfrei. Bei Patienten mit einer CTLA-4-Expression < 1 % bei GBM-Erstdiagnose (n = 27) betrug der Anteil ~ 33 % (s. Abb. 31).

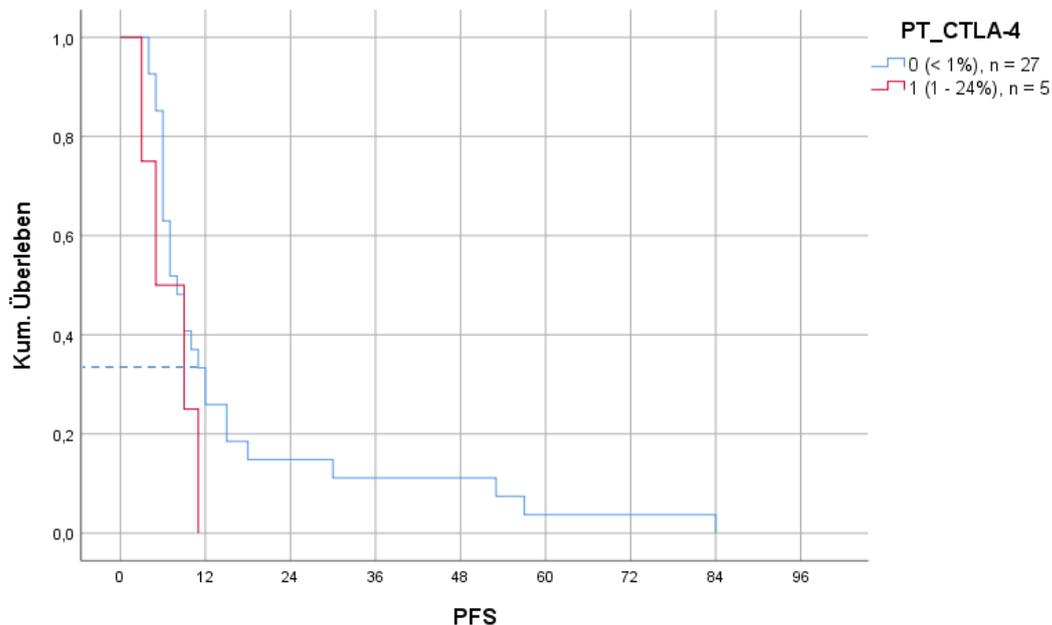


Abbildung 31: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Cytotoxic-T-lymphocyte-associated-protein-4-(CTLA-4)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose
Blaue Linie: Expression < 1 %, rote Linie: Expression 1–24 %. Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten.

Da 73,4 % (22/30) der Patienten eine konstante CTLA-4-Expression bei der Progression im Vergleich zur CTLA-4-Expression zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose aufwiesen, enthielten die Patientengruppen mit einer Zu- (n = 6) und Abnahme (n = 2) zu wenige Patienten für eine vergleichende Analyse.

3.3.7 Potenzieller Einfluss von CD163 auf das PFS

Die mediane Zeit zwischen der GBM-Erstdiagnose und der Progression betrug bei Patienten mit einer CD163-Expression von 1–24 % (n = 17) bei der GBM-Erstdiagnose 10 Monate (95-%-KI: 6,8–13,3 Monate) und bei Patienten mit einer CD163-Expression von 25–49 % (n = 14) 6 Monate (95-%-KI: 4,6–7,5 Monate, s. Tab. 37).

Tabelle 37: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

CD163-Expression	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	SE	95-%-KI		Schätzer	SE	95-%-KI	
			UG	OG			UG	OG
1–24 %, n = 17	18,824	5,549	7,947	29,700	10,000	1,646	6,773	13,227
25–49 %, n = 14	13,571	4,740	4,281	22,862	6,000	,748	4,533	7,467
Gesamt	16,452	3,692	9,215	23,688	9,000	1,177	6,692	11,308

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Ein Jahr nach der Operation waren ~ 40 % der Patienten (n =17) mit einer CD163-Expression von 1–24 % progressionsfrei. Bei Patienten mit einer CD163-Expression von 25–49 % (n = 14) betrug der Anteil ~ 20 % (s. Abb. 32).

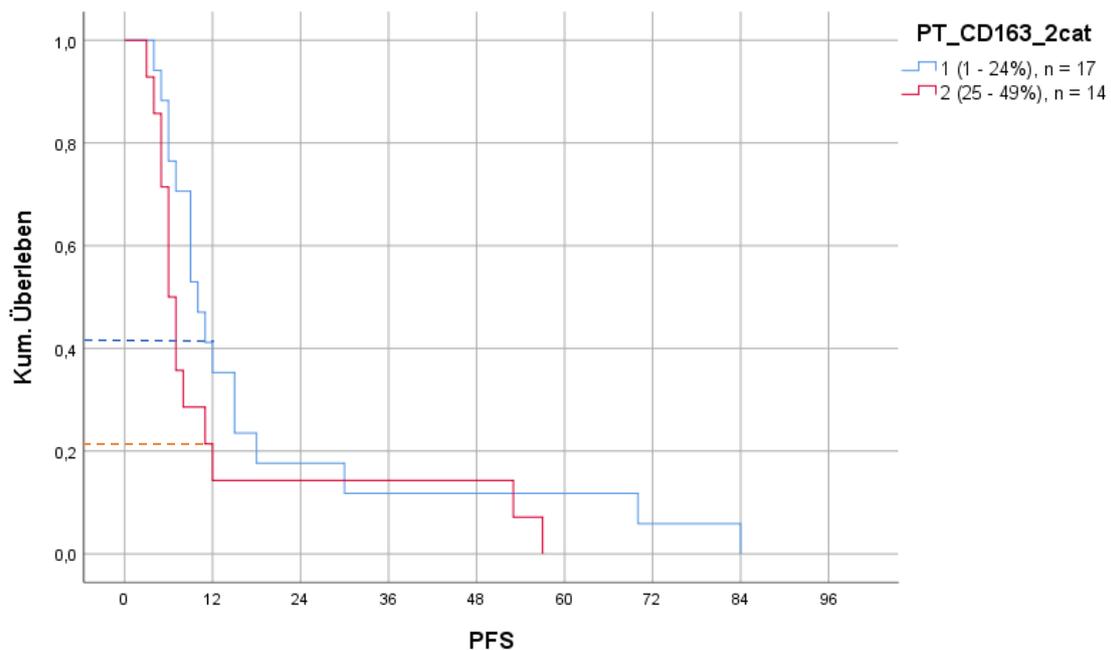


Abbildung 32: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose
 Blaue Linie: Expression < 1–24 %, rote Linie: Expression 25–49 %. Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten.

Patienten mit einer Zunahme der CD163-Expression (Score 1, n = 12, 10 Monate) nach der Therapie zeigten ein höheres medianes PFS als Patienten mit einer Abnahme (Score -1, n = 11, 8 Monate) bzw. einer konstanten Expression (Score 0, n = 8, 7 Monate, s. Tab. 38).

Tabelle 38: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression

Differenz CD163-Ex- pression ^b	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	SE	95%-KI		Schätzer	SE	95%-KI	
			UG	OG			UG	OG
-1, n = 11	21,455	7,601	6,557	36,352	8,000	2,477	3,145	12,855
0, n = 8	9,750	2,950	3,967	15,533	7,000	,685	5,658	8,342
1, n = 12	16,333	6,277	4,031	28,636	10,000	1,732	6,605	13,395
Gesamt	16,452	3,692	9,215	23,688	9,000	1,177	6,692	11,308

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. b. Abnahme (-1), konstante Expression (0), Zunahme (1), KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Ein Jahr nach der Operation waren etwa 41 % der GBM-Patienten mit einer Zunahme der CD163-Expression (Score: 1, n = 10) progressionsfrei. Bei einer konstanten CD163-Expression (Score: 0, n = 7) oder Expressionsabnahme (Score: -1, n = 8) betrug der Anteil jeweils etwa 37 % (s. Abb. 33).

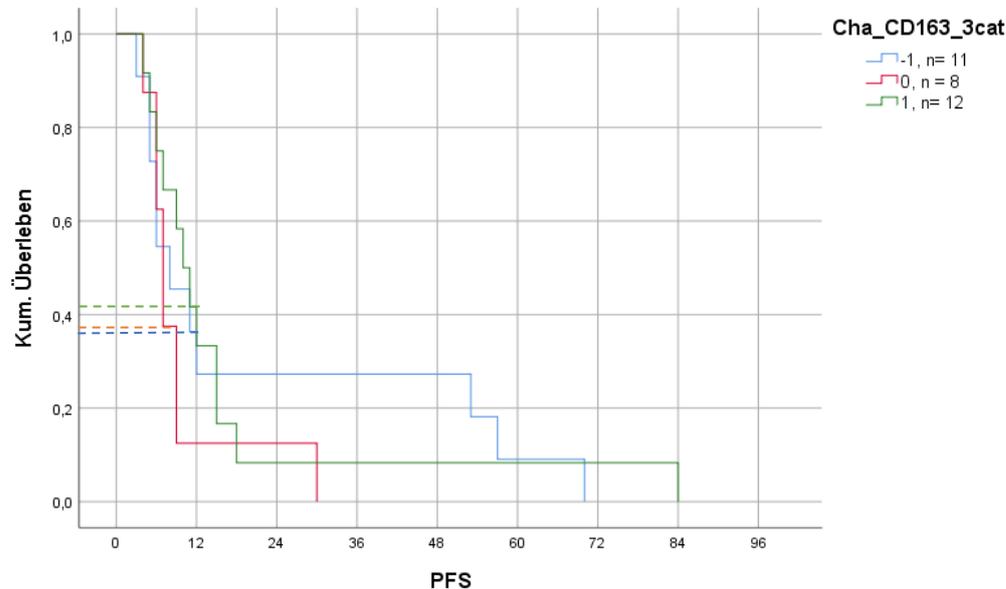


Abbildung 33: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Änderung der Cluster-of-differentiation-(CD)-163-Expression in den Tumorzellen vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression Abnahme (-1, blaue Linie), konstante Expression (0, rote Linie), Zunahme (1, grüne Linie). Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten.

3.3.8 Potenzieller Einfluss von MSR1 auf das PFS

Die mediane Zeit zwischen der GBM-Erstdiagnose und der Progression betrug bei Patienten mit einer MSR1-Expression von 1–49 % (n = 12) bei der GBM-Erstdiagnose 6 Monate (95%-KI: 4,4–7,7 Monate). Bei Patienten mit einer MSR1-Expression \geq 50 % (n = 19) dauerte es im Median 10 Monate (95%-KI: 6,9–13,2 Monate) bis zur Progression (s. Tab. 39).

Tabelle 39: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1-(MSR1)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

MSR1-Expression	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	SE	95%-KI		Schätzer	SE	95%-KI	
			UG	OG			UG	OG
1–49 %, n = 12	8,333	2,105	4,208	12,458	6,000	,854	4,326	7,674
50–100 %, n = 19	19,105	5,392	8,538	29,673	10,000	1,632	6,801	13,199
Gesamt	14,935	3,498	8,079	21,792	8,000	1,192	5,663	10,337

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Ein Jahr nach der Operation (PFS 12) waren ~ 18 % der Patienten mit einer MSR1-Expression < 50 % bei der GBM-Erstdiagnose progressionsfrei. Bei Patienten mit einer MSR1-Expression ≥ 50 % betrug der Anteil ~ 38 % (s. Abb. 34).

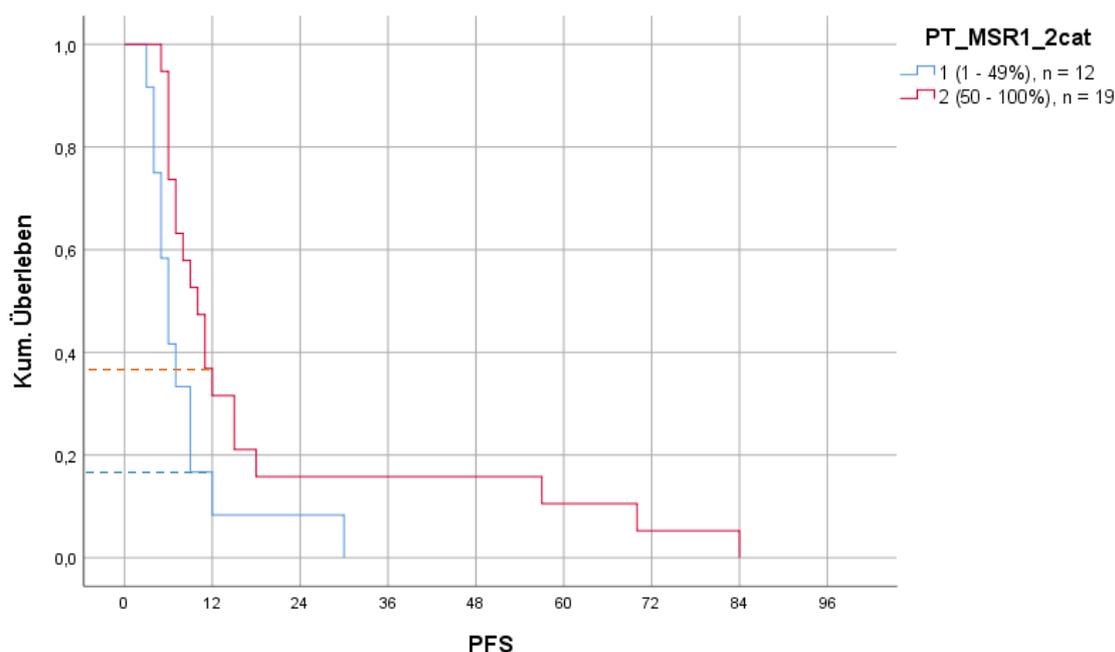


Abbildung 34: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1-(MSR1)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

Blaue Linie: Expression < 1–49 %, rote Linie: Expression 50–100 %. Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten.

Bei einer Abnahme der MSR1-Expression (Score -1, n= 7, 8 Monate) nach der Therapie zeigten die Patienten ein höheres medianes PFS als bei einer Zunahme (Score 1, n = 6, 6 Monate) bzw. bei einer konstanten Expression (Score 0, n = 14, 7 Monate, s. Tab. 40).

Tabelle 40: Progressionsfreies Überleben (PFS, Monate) in Abhängigkeit von der Änderung der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1-(MSR1)-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression

Differenz MSR1-Ex- pression ^b	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	SE	95-%-KI		Schätzer	SE	95-%-KI	
			UG	OG			UG	OG
-1, n = 7	16,571	8,968	,000	34,148	8,000	1,309	5,434	10,566
0, n = 14	13,643	3,832	6,131	21,155	7,000	2,806	1,500	12,500
1, n = 6	19,667	12,875	,000	44,903	6,000	.	.	.
Gesamt	15,741	3,991	7,918	23,564	7,000	1,298	4,456	9,544

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist. b. Abnahme (-1), konstante Expression (0), Zunahme (1), KI = Konfidenzintervall, OG/UG = obere/untere Grenze, SE = Standardfehler

Ein Jahr nach der Operation waren etwa 33 % der GBM-Patienten mit einer Zunahme der MSR1-Expression (Score: 1, n = 6) progressionsfrei. Bei einer konstanten Expression (Score: 0, n = 14) oder Expressionsabnahme (Score: -1, n = 8) lag der Anteil jeweils bei etwa 43 % (s. Abb. 35).

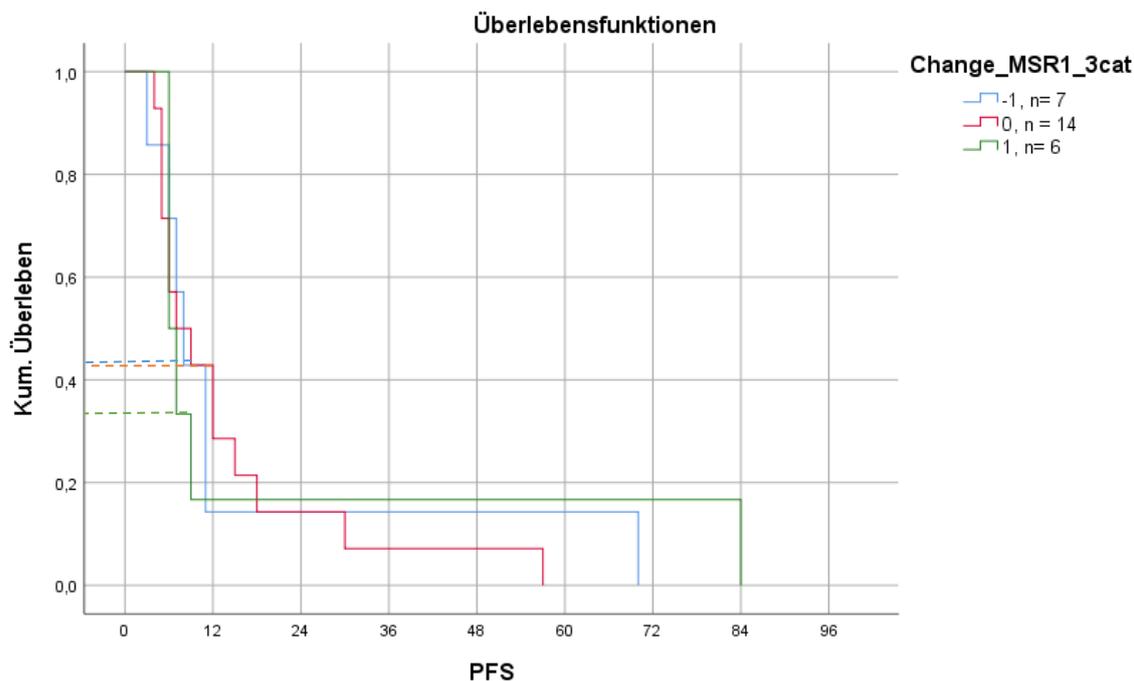


Abbildung 35: Kumulatives progressionsfreies Überleben (PFS in Monaten) der Glioblastom-(GBM)-Patienten in Abhängigkeit von der Änderung der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1-(MSR1)-Expression in den Tumorproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression Abnahme (-1, blaue Linie), konstante Expression (0, rote Linie), Zunahme (1, grüne Linie). Gestrichelte Linien: Markierung der PFS nach 12 Monaten

3.3.9 Zusammenfassung der Einflussfaktoren auf das PFS

Lymphozyten-Marker

Patienten mit einer niedrigen CD4- (< 1–5 %) und hohen CD8-Expression (6–15 %) in den Tumorproben zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose zeigten ein besseres PFS nach 12 Monaten. Patienten mit einer Zunahme der CD3-, CD4-, CD8-Lymphozyten im Krankheitsverlauf von der GBM-Erstdiagnose bis zur Progression wiesen im Vergleich zu Patienten mit einer Abnahme oder konstanten Lymphozytenzahl ein verlängertes PFS nach 12 Monaten auf.

Immuncheckpoints

Eine höhere PD-1- (1–24 % vs. < 1 %) und niedrigere PD-L1- (< 25 % vs. > 25 %)-Expression in den Tumorproben zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose und eine Abnahme der PD-1- und PD-L1-Expression im Krankheitsverlauf (GBM-Erstdiagnose bis Progression) führten in den Matched-pairs Gruppen zu einem längeren medianen PFS und erhöhten den Anteil der progressionsfreien Patienten nach 12 Monaten. Patienten mit einer CTLA-4-Expression < 1 % in den Tumorproben bei der GBM-Erstdiagnose zeigten ein besseres medianes PFS als Patienten mit einer CTLA-4-Expression von 1–24 % (8 Monate vs. 5 Monate). Zudem lag der Anteil der progressionsfreien Patienten nach 12 Monaten deutlich höher (33 % vs. 0 %). Bei 87 % der Patienten blieb die CTLA-4-Expression im Krankheitsverlauf (von der GBM-Erstdiagnose bis zur Progression) unverändert.

Makrophagen-Marker

Patienten mit einer niedrigeren CD163-Expression in den Tumorproben bei der GBM-Erstdiagnose (< 25 %) und einer Zunahme der CD163-Expression (vs. Abnahme oder konstante Expression) im Krankheitsverlauf (von der GBM-Erstdiagnose bis zur Progression) zeigten ein längeres medianes PFS. Zudem lag der Anteil der progressionsfreien Patienten mit diesen Tumorcharakteristika nach 12 Monaten deutlich höher. Eine höhere MSR1-Expression (\geq 50 %) bei der GBM-Erstdiagnose und eine Abnahme der MSR1-Expression im Krankheitsverlauf (vs. Zunahme oder konstante Expression) verlängerten das PFS und erhöhten den Anteil der progressionsfreien Patienten nach 12 Monaten.

4 Diskussion

Beim GBM handelt es sich um einen aggressiven Tumor mit schlechter Prognose. Für die Entwicklung effektiver tumorspezifischer Immuntherapien zur Eindämmung der Krankheitsprogression und zur Verringerung der Mortalität sind Kenntnisse zur Tumormikroumgebung unverzichtbar.

4.1 Studiendesign und Patientenkollektiv

In die vorliegende retrospektive Matched-pairs Kohorte wurden 33 Patienten mit GBMs eingeschlossen, die im Zeitraum von 2008–2017 an der Neurochirurgischen Universitätsklinik Tübingen behandelt wurden und von denen Matched-pairs Gewebeproben (Proben vom Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose und korrespondierende Proben vom Zeitpunkt der Progression) zur Verfügung standen. Der aufgrund von fehlendem Gewebe auf den TMA-Proben der RT-Gruppe notwendige Ausschluss von zwölf Patienten aus der Analyse führte zu einer unterschiedlichen Gruppenstärke der Therapiegruppen (RT-Gruppe: $n = 6$ vs. Stupp-Gruppe: $n = 27$) und einer verminderten Fallzahl insgesamt. Außerdem war ein Vergleich der Zielproteine in den beiden Therapiegruppen aus diesem Grund nicht sinnvoll.

Die Patientenkohorte der vorliegenden retrospektiven Matched-pairs Studie wies eine heterogene Struktur auf. Die Altersspanne der Patienten reichte von 15–78 Jahren. Der Allgemeinzustand der Patienten variierte erheblich, bis auf das GBM waren keine weiteren Diagnosen bekannt. In Kombination mit dem relativ kleinen Patientenkollektiv verringerte diese Heterogenität die Aussagekraft von Subgruppenanalysen. Aufgrund dieser Einschränkungen sollten die Befunde mit einer größeren Anzahl von Patienten validiert werden.

4.2 Heterogenität der Matched-pairs Tumorproben

Eine detaillierte Charakterisierung des individuellen Tumormilieus ist die Voraussetzung für die Entwicklung von patientenspezifischen therapeutischen Ansätzen. Die vergleichende Analyse von 33 Matched-pairs Gewebeproben (Zeitpunkt

der GBM-Erstdiagnose und Zeitpunkt der Progression) in der vorliegenden Analyse verdeutlicht eindrucksvoll, dass sich das Vorkommen potenzieller therapeutischer Zielproteine während des Krankheitsverlaufs erheblich ändern kann. Dabei ist sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der Expression möglich.

Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien (Schäfer et al., 2019b). Daher ist ein zum Zeitpunkt der primären Resektion ermittelter Expressionsstatus der Zielproteine für die Festlegung der Behandlung von progredientem GBM nur bedingt geeignet. Die vorliegenden Befunde und weitere Studien unterstreichen vielmehr die Notwendigkeit einer erneuten Gewebearanalyse zum Zeitpunkt der Progression (Schäfer et al., 2019a, Wood et al., 2016).

Zusätzlich zeigten die Tumorproben der untersuchten Matched-pairs Kohorte zum Zeitpunkt der Erstdiagnose interindividuell eine variable Zielprotein-Expression. Diese Heterogenität bei GBM-Patienten wurde auch in anderen Analysen beschrieben (Skaga et al., 2019, Xiong et al., 2020). Molekulare GBM-Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich der Infiltration mit Immunzellen deutlich. Mesenchymale GBMs eine ausgeprägtere Mikroglia-, Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration auf als proneurale GBMs (Martinez-Lage et al., 2019). Möglicherweise sprechen mesenchymale GBMs daher besser auf eine Immuntherapie an. Aufgrund der geringeren Immuninfiltration sind bei proneuralen GBMs vermutlich zusätzliche Strategien für eine wirksame Immuntherapie erforderlich.

Zunehmend wird auch die Bedeutung intratumoraler Heterogenitäten erkannt. Neu diagnostizierte GBMs zeigen eine variable Immunzellinfiltration innerhalb derselben GBM-Probe (Martinez-Lage et al., 2019). Mögliche Ursachen für diesen Befund sind räumliche Unterschiede innerhalb der Tumormikroumgebung, beispielsweise bezüglich der Konzentration von Wachstumsfaktoren, dem Sauerstoffdruck, der Blutgefäßdichte und hinsichtlich der extrazellulären Matrix (Inda et al., 2014, Bonavia et al., 2011). Molekulare Unterschiede in der gleichen GBM-Probe resultieren auch aus einer dynamischen Expansion koexistierender Tumorsubklone unter der Therapie (Patel et al., 2009, Sottoriva et al., 2013). Das

Verständnis der Mechanismen der Heterogenität des GBMs und seiner Umgebung sind wesentlich für die Entwicklung personalisierter GBM-Behandlungen (Osuka and Van Meir, 2017).

In diesem Kontext nimmt die intratumorale Heterogenität von PD-L1 einen besonderen Stellenwert ein (Heynckes et al., 2017a), da Patienten falsch klassifiziert werden könnten. Eine Einstufung könnte therapeutische Konsequenzen haben und darüber entscheiden, ob ein Patient zukünftig IC-Inhibitoren erhält oder nicht. Die Genexpression der gesamten Biopsie wird durch eine quantitative reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) robuster und untersucherunabhängig erfasst (Brüggemann et al., 2017).

Die bislang begrenzte Wirksamkeit von immuntherapeutischen Strategien beruht vermutlich zumindest teilweise auf dem Einsatz der Wirkstoffe an unselektierten Patientenpopulationen ohne Stratifizierung der Zielprotein-Expression. Beispielsweise hätten bei einem auf PD-1 abzielenden Behandlungsansatz 70 % der Patienten (PD-1-Expression < 1 % bei der GBM-Erstdiagnose, s. Tab. 17) in der vorliegenden Kohortenanalyse eine nicht adäquate Behandlung erhalten. Bei einer auf CTLA-4 abzielenden Therapie hätten 86,7 % (CTLA-4-Expression < 1 %, s. Tab. 23) der Patienten von der Therapie nicht profitiert. Für die Vorhersage des Ansprechens auf eine personalisierte Behandlung ist daher eine möglichst aktuelle immunhistochemische und molekulare Analyse potenzieller Zielstrukturen erforderlich.

Bislang fehlen für solche Therapieentscheidungen definitive Cut-off-Werte für die Expression der Zielproteine. Ein weiteres Problem ist die fehlende Standardisierung der Methoden zur Bestimmung der Zielprotein-Expression.

Die Expression und subzelluläre Verteilung von PD-L1 in Gliomzellen weisen in Studien große Unterschiede auf, was die Wertigkeit von PD-L1 als therapeutischer und prognostischer Biomarker limitiert. Das nachgewiesene PD-L1-Expressionsmuster hängt in hohem Maße von den verwendeten PD-L1-Ab ab: Erkennt der eingesetzte Ab sowohl membrangebundenes als auch zytoplasmatisches PD-L1 (z. B. Clone 5H1, Clone MIH1 eBioscience, ab58810 Abcam,

E1LRN Cell Signaling, ab205921 Abcam) ist der Anteil an PD-L1⁺-Proben deutlich höher als bei der Nutzung von Ab, die nur membrangebundenes PD-L1 nachweisen (z. B. SP142, EPR1161) (Chen et al., 2018a).

In einer Studie mit 41 hochgradigen Gliomen (HGG) waren bei der Verwendung des Ab ab205921/Abcam 87,8 % (n = 36) alle Proben diffus/fibrillär PD-L1⁺ (Xue et al., 2017). In der vorliegenden retrospektiven Matched-pairs Kohorte zeigte der Ab vergleichbare Ergebnisse: 87,1 % aller Proben bei der GBM-Erstdiagnose waren PD-L1⁺. In einer weiteren Studie mit 117 neu diagnostizierten GBMs betrug der Anteil PD-L1⁺-Proben 84,6 % (99/117) bei Verwendung des Klon-5H1-Ab (Berghoff et al., 2015). Beim Nachweis mit den PD-L1-Ab SP142 bzw. EPR1161 waren die Anteile der PD-L1⁺-Proben mit 35 % (57/163) (Garber et al., 2016) und 38,3 % (38/99 \geq 5 %) (Nduom et al., 2016) deutlich geringer.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Entwicklung diagnostischer Standards und deren Implementierung in die klinische Praxis.

4.3 Vergleichende Analyse der Zielprotein-Expression in den Matched-pairs GBM-Tumorproben

Die Veränderung der Tumormikroumgebung bei einer GBM-Progression wurde bislang kaum untersucht. Noch schlechter ist die Datenlage zur Immunumgebung und zur Immunogenität bei progredienten Tumoren. Nur 20–30 % der progredienten GBM-Fälle sind einer chirurgischen Behandlung zugänglich (Barbagallo et al., 2008). Die meisten Studien beschränken sich auf eine Charakterisierung der Infiltration von Immunzellen bei der GBM-Erstdiagnose. Insbesondere fehlen vergleichende Analysen von gepaarten Proben (Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose und Zeitpunkt der Progression) derselben Patienten. In der vorliegenden retrospektiven Matched-pairs Kohorte wurden die Infiltration von Lymphozyten (CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen) und Makrophagen (CD163, MSR1 (CD204)) sowie die Expression der IC-Inhibitoren (PD-1, CTLA-4, PD-L1) in Gewebeprobenpaaren zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose und Progression verglichen.

4.3.1 Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs)

In der vorliegenden Matched-pairs Kohorte war der Anteil der CD4⁺-Lymphozyten an den TILs in den Tumorproben zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose und Progression größer als der Anteil an CD8⁺-Lymphozyten. Zu beiden Zeitpunkten wiesen die Tumorproben meist eine niedrige CD8-Expression (Score 0–2) auf; bei einem Patienten waren jedoch > 16 % CD8⁺-Zellen nachweisbar (Score 4), 70,8 % der Patienten zeigten eine schwache CD8-Expression (1–5 % CD8⁺-Zellen). Die CD4-Expression war deutlich variabler (Score 0–4). 48 % der Tumorproben bei der GBM-Erstdiagnose bzw. 60 % der Proben der progredienten Tumoren zeigten eine starke (11–15 % CD4⁺-Zellen) bis sehr starke (> 16 % CD4⁺-Zellen) CD4-Expression. Dieser Befund steht im Einklang mit der immunhistochemischen Studie von Han et al. (2014), in der bei der GBM-Erstdiagnose (n = 9) CD4⁺-T-Zellen bei den TILs dominierten (mittlere Anzahl pro high-power field: CD4⁺-TILs: 16,7 vs. CD8⁺-TILs 3,4). Dagegen fanden Orrego et al. (2018) in ihren GBM-Proben (n = 43) einen höheren Anteil an CD8⁺-TILs im Vergleich zu CD4⁺-TILs (1,6 % (0,016–12,1 %) vs. 0,032 % (0–5,5 %)).

In der vorliegenden Matched-pairs Analyse wiesen die Gewebeproben der progredienten GBMs im Vergleich zu den Proben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose mehr CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten auf. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen einer japanischen (n = 16) (Miyazaki et al., 2017) und amerikanischen Studie (n = 11) (Wang et al., 2021) überein. In diesen ebenfalls im Matched-pairs Design durchgeführten Analysen war die CD4⁺- und CD8⁺-TIL-Infiltration bei den progredienten Tumoren im Vergleich zu den erstmals diagnostizierten GBMs signifikant erhöht.

In der vorliegenden Matched-pairs Analyse war die Rekrutierung von CD4⁺-TILs im Vergleich zur Rekrutierung von CD8⁺-TILs zum Zeitpunkt der Progression stärker ausgeprägt als bei der GBM-Erstdiagnose. 36,6 % der Gewebeproben der progredienten Tumoren zeigten eine Zunahme der CD4-Expression. Eine Zunahme der CD8-Expression wurde nur bei 28,5 % der progredienten Tumoren detektiert.

In einer anderen Matched-pairs Studie (n = 38) zeigten progrediente GBMs im Vergleich zu den Tumoren bei der Erstdiagnose eine reduzierte CD8⁺-Lymphozyten-Infiltration (5,3 vs. 17,5 % CD8⁺-Zellen) (Heynckes et al., 2017a). Analysen ohne Matched-pairs Design fanden dagegen keine Unterschiede bei der CD3⁺- und CD8⁺-TIL-Dichte zwischen erstmals diagnostizierten und progredienten GBMs (n = 18 (Berghoff et al. 2015), n = 38 Tumoren bei der Erstdiagnose, n = 12 progrediente Tumoren (Rahman et al., 2018)).

4.3.2 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs)

Wie die vorliegende Analyse und andere Studien belegen, sind in der GBM-Mikroumgebung Makrophagen der dominante Immunzelltyp (Kurdi et al., 2021, Liu et al., 2019, Parney et al., 2009). In der vorliegenden Matched-pairs Kohorte zeigten 24 % bzw. 18,2 % der Proben zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose eine CD163- bzw. MSR1-Expression von > 50 %. Eine ähnlich hohe Expression erreichte von den untersuchten Zielproteinen lediglich PD-L1 (7,7 % PD-L1-Expression > 50 %).

Trotz ausgiebiger Recherchen konnte keine Matched-pairs Studie (Expression bei Erstdiagnose vs. Progression) zu den analysierten TAM-Markern gefunden werden. Laut Wang et al. (2021) weisen progrediente GBMs mehr Makrophagen auf als GBMs bei der Erstdiagnose, wobei die Autoren nicht M2-Makrophagen (CD163, MSR1) sondern Gesamtmakrophagen (CD64) untersuchten. In der vorliegenden Matched-pairs Kohorte war eine Zunahme der TAM-Marker (CD163, MSR1) im Krankheitsverlauf erkennbar. Marker-negative Tumورproben traten zum Zeitpunkt der Progression anders als zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nicht mehr auf (Anteil mit CD163-Score 0: 24 % vs. auf 0 %; Anteil mit MSR1-Score 0: 9,1 % vs. 0 %). Die Anteile der CD163⁺- und MSR1⁺-Makrophagen nahmen bei der Progression bei 40 % bzw. 27,3 % der Proben zu.

Laut einiger Studien führt eine GBM-Therapie zu einer vermehrten TAM-Rekrutierung. In einer TAM-Genexpressionsprofilstudie zum Zeitpunkt der GBM-Erstdiagnose und Progression (keine Matched-pairs) trat nach einer CT mit TMZ vermehrt der M2-Phänotyp auf. Die M2-Makrophagen verstärkten die Migration

TMZ-resistenter Gliomzellen, was das Tumorwachstum und die Progression begünstigte (Hudson et al., 2018).

Laut Leblond et al. (2017) sind M2-Makrophagen strahlenresistenter als M1-Makrophagen, wodurch sich der Anteil an M2-Makrophagen in bestrahlten Geweben erhöht. In der vorliegenden retrospektiven Matched-pairs Kohorte erwiesen sich MSR1⁺-TAMs im Vergleich zu CD163⁺-TAMs gegenüber einer Stupp-Therapie als insensitiver. In über der Hälfte der Fälle blieb der Anteil der MSR1⁺-TAMs nach der Stupp-Therapie unverändert (54,5 % vs. 20 %, s. Tab. 13 und Tab. 16). Diese Befunde könnten darauf hinweisen, dass die MSR1-Expression durch eine CT und RT weniger stark beeinflusst wird. Die Infiltration MSR1- und CD163-exprimierender Zellen könnte möglicherweise auch die Natur der progredienten Erkrankung abbilden.

Das Auftreten von TAMs im Gehirn ist tendenziell mit einer schlechten Prognose verbunden. TAMs werden tumorfördernde Aktivitäten (z. B. Förderung der Angiogenese, Migration und Invasivität von Tumorzellen, Unterdrückung der adaptiven Anti-Tumor-Immunität) zugeschrieben (Fu et al., 2020, Pan et al., 2020). Daher werden aktuell TAM-Anteil reduzierende Therapieansätze entwickelt (s. Kap 1.3.1).

Eine Abnahme der CD163⁺- und MSR1⁺-Makrophagen war in 40 % bzw. 18,2 % der progredienten Tumoren zu verzeichnen. Die Ursachen für diese Abnahme der TAMs sollte in weiteren Studien untersucht werden.

4.3.3 Immuncheckpoints (ICs) PD-1/PD-L1 und CTLA-4.

CTLA-4 und PD-1 greifen in unterschiedliche Stadien einer Immunantwort ein und beeinträchtigen die T-Zellaktivität. CTLA-4 wirkt inhibitorisch auf die frühen Stadien der T-Zellaktivierung (Pardoll, 2012a). Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen (z. B. Tumoren) erhöht eine verlängerte T-Zellaktivierung die Anzahl CTLA-4-exprimierender Tregs und verstärkt die Expression von CTLA-4 auf CTLs. Die Interaktion von CTLA-4 mit Proteinen der B7-Rezeptorfamilie verringert die T-Zellproliferation (Buchbinder and Desai, 2016). PD-1 blockiert T-Zellen in einem späteren Stadium der Immunantwort durch die Bindung an PD-L1 und

PD-L2 (Pardoll, 2012b). Bei Gliomen wird diese Immunsuppression durch die verstärkte Expression von PD-L1 auf Tumorzellen und zirkulierenden Monozyten/Makrophagen unterstützt, wodurch die Aktivierung von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen weiter gehemmt wird (Zheng et al., 2019).

In der vorliegenden retrospektiven Matched-pairs Kohorte zeigten die Proben in den meisten Fällen keine PD-1- und CTLA-4-Expression (PD-1-Score 0 bei Erstdiagnose / Progression jeweils 73,1 %; CTLA-4-Score 0 bei Erstdiagnose / Progression 88,5 % / 76,9 %). Die restlichen Proben wiesen eine schwache Expression auf (Score 1, 1–24 % positive Zellen). Dagegen zeigte der IC-Ligand PD-L1 in 80 % der Proben eine mäßige bis starke Expression.

Die CTLA-4- und PD-1-Expression blieb in den progredienten Tumoren bei den meisten Matched-pairs konstant (CTLA-4: 73,1 %; PD-1: 69,2 %). Die Anteile der Proben mit einer Expressionszunahme und -abnahme waren vergleichbar (CTLA-4: 9,2 % vs. 7,7 %, PD-1: 15,4 % vs. 15,4 %). Dagegen zeigten die Proben der progredienten Tumoren häufiger eine Zunahme der PD-L1-Expression (siehe unten).

In einer Analyse mit neu diagnostizierten und korrespondierenden progredienten GBM-Tumorproben (n = 18) wurden bei der ersten und zweiten Resektion ebenfalls keine Unterschiede bezüglich der PD-1⁺-TIL-Dichte detektiert (Berghoff et al. 2015). Dagegen berichteten Miyazaki et al. (2017) bei 16 Patienten von einer erhöhten PD-1-Expression bei progredientem GBM im Vergleich zu neu diagnostiziertem GBM (keine Matched-pairs). Die Kohorte erhielt jedoch teilweise eine Immuntherapie, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert.

Derzeit fehlen immunhistochemische Studien zur CTLA-4-Expression in gepaarten Proben aus Tumoren bei Erstdiagnose und Progression. Mittels Western-Blots wurde eine verminderte CTLA-4-Expression in progredienten Tumoren nachgewiesen (Kuhl et al., 2018).

Der vorliegende Befund einer erhöhten PD-L1-Expression bei progredientem GBM stimmt mit den Ergebnissen einer amerikanischen Matched-pairs Immunhistochemie-Studie (n = 11) überein (Wang et al., 2021). In der vorliegenden

Matched-pairs Kohorte exprimierten alle progredienten Tumoren PD-L1. Im Vergleich zu den Tumoren bei Erstdiagnose war die PD-L1-Expression in den progredienten Tumoren in 34,6 % der Fälle erhöht und in 15,3 % der Fälle erniedrigt. 50 % der Proben wiesen eine konstante PD-L1-Expression auf.

Laut Derer et al. (2016) erhöht eine RT/TMZ die PD-L1-Expression in präklinischen GBM-Modellen. TMZ fördert die PD-L1-Expression über den STAT3-Signalweg und begünstigt die Immunabwehr von GBM-Zellen (Wang et al., 2019b). Dabei scheint die Dauer der TMZ-Therapie eine Rolle zu spielen. In einer klinischen Studie verringerte sich bei Patienten, die im Vergleich zum klassischen Stupp-Protokoll eine verlängerte CT mit TMZ (> 6 Zyklen) erhielten, die PD-L1-Expression signifikant (Matched-pairs n = 38: Erstdiagnose vs. Progression: 20,8 % vs. 7,6 % PD-L1⁺-Zellen; immunhistochemischer Nachweis mit E1LRN-Ab) (Heynckes et al., 2017b). Eine weitere Analyse mit neu diagnostizierten und korrespondierenden progredienten GBMs zeigte dagegen keine eindeutige PD-L1-Expressionsänderung (n = 18, immunhistochemischer Nachweis mit Clone 5H1 Ab) (Berghoff et al., 2015). Möglicherweise beruhen diese unterschiedlichen Befunde auf der Verwendung unterschiedlicher Ab (s. Kap. 4.2).

4.3.4 Zusammenfassung der Datenlage zur Marker-Expression in GBM-Tumoren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und der Progression

Die derzeitige Datenlage ist widersprüchlich. Die Expression von TIL-, TAM- und IC-Markern wird nicht nur durch eine vorangegangene CT und/oder RT beeinflusst, sondern möglicherweise auch durch individuelle GBM-Charakteristika. Die potenziellen Einflussfaktoren der Expression sind unzureichend erforscht. Laut einer Studie sind immunbiologische Marker stärker mit den molekularen Eigenschaften des Tumors (*IDH*-Status, *p53*-Mutation, *MGMT*-Promotor-Methylierung) assoziiert als mit dem Status (Tumor bei Erstdiagnose / Progression) oder dem Alter (Conroy et al., 2014). Für eine valide Identifikation von Einflussfaktoren auf die TIL- und TAM-Infiltration sowie IC-Expression in GBMs sind größere Studien mit homogenen Kohorten und bezüglich der molekularen GBM-Eigenschaften definierten Fallgruppen erforderlich.

4.4 Korrelationen zwischen den TIL-, TAM- und IC-Markern

Bisherige Erfahrungen mit selektiven Mono-Target-Wirkstoffen (z. B. Anti-PD-1-Ab) beim GBM belegen eine unzureichende klinische Wirksamkeit, was den Einsatz von Kombinationstherapien rechtfertigt. Für solche Therapieregimes ist das Zusammenwirken von TILs, TAMs und IC-Inhibitoren von großer Bedeutung.

In der vorliegenden Matched-pairs Kohorte wurden mögliche Korrelationen zwischen Markern Tumor-infiltrierender Zellen und IC-Markern untersucht. Für die Parameter der Tumor-infiltrierenden Zellen war dies die erste Korrelationsanalyse. In den Tumoren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose / Progression korrelierte die PD-1/PD-L1-Achse mit histologischen Markern für TAMs (MSR1/CD163) und TILs (CD4).

Korrelation zwischen der Expression von MSR1/CD163 und PD-L1

Auffällig war eine hohe positive Korrelation zwischen der MSR1- und PD-L1-Expression in den Tumorproben bei Erstdiagnose ($r_s = 0,6$) und zum Zeitpunkt der Progression ($r_s = 0,8$). Weiter korrelierte die CD163-Expression positiv mit der PD-L1-Expression ($r_s = 0,6$ Erstdiagnose, $r_s = 0,6$ Progression).

Laut mehrerer Studien ist die PD-L1-Expression in der Mikroumgebung von Gliomen hauptsächlich auf Tumor-infiltrierende myeloische Zellen (TIMs, einschließlich Makrophagen) und nicht auf die Tumorzellen selbst zurückzuführen (Antonios et al., 2017, Chauhan and Lokensgard, 2019). Auch in der vorliegenden Analyse deutet die Korrelation auf eine PD-L1-Expression in TAMs hin. Der Anstieg von PD-L1 und Tumor-infiltrierenden myeloischen Zellen ist in GBMs mit einer starken Immunsuppression verbunden (Mirghorbani et al., 2013). In Tumoren führt die Bindung von PD-1 auf T-Zellen an PD-L1 auf Makrophagen zur T-Zelldysfunktion, Erschöpfung, Neutralisation und IL-10-Produktion (Alsaab et al., 2017).

Laut Zhu et al. (2020) ist die PD-L1-Expression positiv mit dem Vorhandensein immunsuppressiver Zellen (Makrophagen, Neutrophile, unreife DC) und negativ

mit der Infiltration von cytotoxischen Immunzellen (CD8⁺-T-Zellen) und Th1-Zellen assoziiert. Insbesondere korreliert eine hohe PD-L1-Expression signifikant mit der M2-Polarisation von Makrophagen (M2-TAMs) (Zhu et al., 2020). GBMs rekrutieren TAMs für die Tumormikroumgebung und fördern deren Differenzierung zu einem immunsuppressiven Phänotyp mit einer hohen PD-L1-Expression und Produktion von tumorfördernden Zytokinen. Dadurch wird die Anti-Tumor-Wirkung von TILs antagonisiert (Devalaraja et al., 2020).

Die deutliche Korrelation der MSR1-Expression mit der Expression von IC-Proteinen (z. B. PD-1, T-Zellimmunoglobulin, Mucin-Domäne-3-Protein (TIM-3)) weist auf eine mögliche Synergie von TAMs und IC-Regulatoren bei der Hemmung der T-Zellfunktion beim Gliom hin (Yuan et al., 2019). Auch die CD163- und IC-Protein-Expression (PD-1, PD-L1, T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 3 (TIM-3), Lymphocyte activation gene (LAG3), B7 Homolog 3/4 (B7H3, B7H4)) korreliert bei Gliomen deutlich (Liu et al., 2019).

Diese Ergebnisse deuten an, dass eine auf MSR1/CD163 und IC abzielende Kombinationstherapie die eingeschränkte Wirksamkeit IC-basierter Therapeutika überwinden könnte. Der genaue Effekt der PD-L1-Expression auf TAMs bei der Unterdrückung der Anti-Tumor-Immunität innerhalb der Tumormikroumgebung muss jedoch noch untersucht werden.

Korrelation zwischen CD4 und CD163

Weiter bestand in der vorliegenden Matched-pairs Kohorte eine moderate bis hohe positive Korrelation zwischen der CD4- und CD163-Expression in den Tumorproben bei Erstdiagnose ($r_s = 0,7$) und zum Zeitpunkt der Progression ($r_s = 0,5$).

Makrophagen können die Funktion von CD4⁺-T-Zellen beeinflussen; umgekehrt haben Effektor- bzw. regulatorische CD4⁺-T-Zelluntergruppen Auswirkungen auf die Monozyten-/Makrophagen-Funktion. CD4⁺-T-Zellen spielen eine Rolle bei der Differenzierung von Makrophagen. Das von CD4⁺-Th1-Zellen produzierte IFN- γ fördert den M1-Phänotyp und von Th2 oder Tregs produzierte Zytokine (IL-10, IL-4, IL-13) den M2-Phänotyp (Galvão and Zong, 2013). Die Rolle der CD4⁺-T-

Zelluntergruppen bei der Entwicklung zum tumoriziden M1- und tumorfördernden M2-Phänotyp unterstreicht die mögliche Bedeutung dieser Korrelation.

Umgekehrt beeinflussen möglicherweise TAMs auch die Funktion von CD4⁺-Tregs. TAMs verhindern die Produktion von Zytokinen, die tumorspezifische CD8⁺-T-Zellen und CD4⁺-Th1-Zellen (Th1) aktivieren, und wirken über die Förderung der Funktion von CD4⁺-Tregs tumorunterstützend (Wei et al., 2013).

Korrelation zwischen PD-1 und CD8

Weiter könnte die moderate positive Korrelation zwischen der PD-1- und CD8-Expression in den Tumorproben bei Erstdiagnose ($r_s = 0,7$) und zum Zeitpunkt der Progression ($r_s = 0,6$) in der vorliegenden Matched-pairs Kohorte auf eine immunsuppressive Situation in der Tumorumgebung hinweisen. Das Oberflächenprotein PD-1 wird von aktivierten T-Zellen exprimiert (Kelly et al., 2020). Das durch die Interaktion von PD-L1 exprimierenden Tumorzellen mit PD-1 ausgelöste negative Signal unterdrückt die Anti-Tumor-Aktivität der CD8⁺-T-Zellen (Nowicki et al., 2017).

Auch in einer anderen Studie bestand bei GBM-Patienten eine signifikante Korrelation zwischen Tumor-infiltrierenden CD8⁺-PD-1⁺-T-Zellen und PD-1⁺-Lymphozyten ($p < 0,001$), aber keine Korrelation zwischen PD-L1 und CD8 (Berghoff et al., 2015).

Li et al. (2018a) beobachteten eine signifikant verstärkte PD-1-Expression in CD8⁺-T-Zellen nach RT. In einer weiteren Studie an GBM-Mausmodellen erhöhte eine fraktionierte RT die PD-1-Expression in CD8⁺-T-Zellen. Zudem verlängerten IC-Inhibitoren das Überleben (Dovedi et al., 2014). Weiter verstärkte ebenfalls in GBM-Mausmodellen Anti-PD-1 die Wirksamkeit von TMZ deutlich, indem es die Expression von PD-1 und des Lymphozyten-Aktivierungsgens 3 (LAG-3) verringerte (Park et al., 2019). Diese Befunde lassen vermuten, dass die Verabreichung von IC-Inhibitoren die Ansprechraten von RT-/CT-Ansätzen verbessern kann.

In einer Standarddosierung verabreichtes TMZ erhöhte die Expression von Erschöpfungsmarkern (PD-1) in T-Zellen, wohingegen metronomische Dosen von TMZ diesen Effekt nicht zeigten (Karachi et al., 2019). In Mäusen bewirkte eine Anti-PD-1-Therapie bei der Gabe metronomischer TMZ-Dosen, nicht aber bei der Gabe von Standard-TMZ-Dosen einen Überlebensvorteil (Dai et al., 2018).

4.5 Prognostische Faktoren für das PFS

Obwohl die GBM-Progression derzeit nicht vermeidbar ist, fehlen etablierte Standards für einen Zweitlinien-Behandlungsansatz. Klinische Faktoren wie das Alter bei der Diagnose, die Tumorlokalisation, die Karnofsky-Performance-Scale sowie das Operationsausmaß und histopathologische Faktoren sind wichtige prognostische Faktoren für das GBM (Lamborn et al., 2004). Laut Studien zeigen Frauen ein längeres OS als Männer (Barone et al., 2009, Tseng and Tseng, 2005). Frauen besitzen im Vergleich zu Männern eine stärkere angeborene und adaptive Immunantwort. Dazu zählen eine effizientere APC- und Makrophagenaktivierung, höhere Spiegel von B-Zellen, Ab und CD4⁺-T-Zellen, ein höheres CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis und eine verstärkte Th2-Zellantwort. Männer zeigen dagegen im Durchschnitt höhere Konzentrationen an CD8⁺-T-Zellen, Tregs und eine stärkere Th1-Zellantwort (Klein and Flanagan, 2016).

Ein fortgeschrittenes Alter ist ein etablierter Prädiktor für eine schlechte Prognose beim GBM. Eine mögliche Ursache für die altersabhängige Erhöhung der Morbidität und Mortalität ist die mit dem Alter abnehmende CD8⁺-T-Zellfunktion und damit abnehmende Anti-Tumorwirkung (Schwab et al., 1997). Eine Abnahme der Produktion von T-Zellen im Thymus begleitet die Alterung und verläuft parallel zur altersabhängigen Zunahme der GBM-Progression (Wheeler et al., 2003). Diese Daten unterstützen die Bedeutung neu generierter T-Zellen für das Tumor-Outcome.

Mehrere Studien beschreiben eine Korrelation zwischen Tumor-infiltrierenden Immunzellen und dem Outcome von GBM-Patienten. Mögliche Unterschiede in der Immunumgebung von Tumoren bei der Erstdiagnose und progredienten Tumoren und deren potenzielle Assoziation mit der Tumorprognose wurden bislang

nicht untersucht. Insbesondere fehlen Studien mit gepaarten Proben (Tumor bei Erstdiagnose / Progression) derselben Patienten. In der vorliegenden Matched-pairs Kohorte wurde der Einfluss der TILs (CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen), TAMs (CD163, MSR1 (CD204)) sowie der Expression von IC-Inhibitoren (PD-1, CTLA-4, PD-L1) auf das PFS untersucht. Analysiert wurden die Werte im Tumor bei der Erstdiagnose und die Veränderung der Werte von der Erstdiagnose bis zum progredienten Tumor.

Lymphozyten-Marker (CD3, CD4, CD8) und PFS

Eine stärkere Infiltration mit CD8⁺-Zellen (> 5 % vs. ≤ 5 %: medianes PFS 10 Monate vs. 7 Monate) und eine geringere Infiltration mit CD4⁺-Zellen (≤ 5 % vs. > 5 %: medianes PFS 15 Monate vs. 7 Monate) im Tumor bei der Erstdiagnose war in der vorliegenden Matched-pairs Kohorte mit einem verlängerten PFS assoziiert. Im Krankheitsverlauf verlängerte eine Zunahme der Infiltration mit CD3⁺-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen im progredienten Tumor das PFS im Vergleich zu einer Abnahme bzw. konstanten Infiltration.

Laut zahlreicher Studien sind eine erhöhte Anzahl CD3⁺- und CD8⁺-T-Zellen bei der Erstdiagnose mit einem verlängerten OS von GBM-Patienten verbunden. Bezüglich der Korrelation zwischen der CD4⁺-T-Zellinfiltration und dem OS der Patienten liegen kontroverse Befunde vor.

In der Studie von Yang et al. (2010) mit 108 GBM-Fällen waren höhere Konzentrationen von CD8⁺-TILs bei neu diagnostizierten GBMs mit einem längeren OS assoziiert (T-Zellinfiltration bei Langzeit- vs. Kurzzeitüberlebenden: 38 vs. 20 %; $p < 0,006$). Auch in einer anderen Studie korrelierte eine ausgeprägtere CD8⁺-TIL-Infiltration mit einer guten Prognose (Madkouri et al., 2017). In einer weiteren Analyse erwiesen sich ein hoher CD4⁺- und niedriger CD8⁺-TIL-Spiegel in GBMs bei der Erstdiagnose als unabhängige Prädiktoren für ein schlechtes PFS und OS (n = 90) (Han et al., 2014).

Kmieciak et al. (2013) fanden bei GBM-Patienten (n = 65) eine Korrelation zwischen einer erhöhten CD3⁺- und CD8⁺-Zellinfiltration bei der Erstdiagnose und einem verlängerten OS; eine Korrelation zwischen der CD4⁺-Zellinfiltration und

dem OS war nicht erkennbar. Dagegen bestand in einer weiteren Studie eine Assoziation zwischen der CD4⁺-Zellinfiltration und dem OS: Eine erhöhte Anzahl intratumoraler Effektor-T-Zellen (CD8⁺- und CD4⁺- Lymphozyten) bei der Diagnose korrelierte signifikant mit einem besseren OS (n = 44, immunhistochemische Analyse mit computergestütztem TissueFAXS) (Lohr et al., 2011). In einer weiteren Studie waren jedoch höhere CD4⁺-Zellwerte signifikant mit einem kürzeren OS verbunden (Orrego et al., 2018). Wang et al. (2021) wiederum wiesen keine signifikante Korrelation zwischen den Spiegeln Tumor-infiltrierender CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen oder dem CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis bei der Erstdiagnose und dem OS von GBM-Patienten nach.

Die Rolle der CD4⁺-T-Zellen in der Tumormikroumgebung ist aufgrund ihrer funktionell unterschiedlichen Subgruppen (Th, Tregs, CD56⁺-immunsuppressive T-Zellen) umstritten. CD4⁺-Th-Zellen spielen eine entscheidende Rolle für die adaptive Immunantwort, einschließlich der Aktivierung von CD8⁺-TILs (Bos et al., 2012, Ho et al., 2002). Daher wurde das Vorhandensein von CD4⁺-Th-Zellen mit einem besseren Überleben bei malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Andererseits dämpfen CD4⁺-Tregs die Anti-Tumor-Immunität und fördern die Tumorprogression (Zamarron and Chen, 2011). Tregs sind ungünstige prognostische Marker beim GBM (Quillien et al., 2019) und bei anderen Tumoren wie Brustkrebs (Bates et al., 2006) und Leberzellkarzinome (Gao et al., 2007).

Ein Ungleichgewicht im Th1/Th2-Verhältnis ist ein wichtiger Induktor der GBM-Progression. Zu den Ursachen einer Th-Zelldysfunktion in der GBM-Mikroumgebung zählt die Expression von immunsuppressiven Molekülen (Kumar et al., 2006). Th1-Zellen töten Tumorzellen ab, indem sie IFN- γ in die Tumormikroumgebung sezernieren. Die von Th2-Zellen abgegebenen Typ-2-Zytokine (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) fördern dagegen die Tumorprogression (Gong et al., 2018). Die Abnahme des IL-12-Spiegels und der Anstieg des IL-10-Spiegels im Kreislauf von GBM-Patienten spiegeln eine systematische Immunsuppression wider (Kumar et al., 2006). GBM-Patienten weisen eine signifikante Zunahme von Th2-Zellen auf; dies trifft insbesondere auf Patienten mit progredientem GBM zu (Shimato et al., 2012). Bei einer Anreicherung von Th1^{low}-Th2^{low}- und Th1^{high}-Th2^{low}-Zellen in der Tumormikroumgebung zeigen GBM-Patienten eine bessere

Prognose als bei einer Zunahme von Th1high-Th2high-Zellen. Dieser Befund deutet darauf hin, dass eine Zunahme von Th2-Zellen die Entwicklung von GBM fördert (Takashima et al., 2018).

Immunecheckpoint-Parameter (PD-1, PD-L1, CTLA-4) und PFS

Bei PD-1 und CTLA-4 handelt es sich um inhibitorische, auf T-Zellen exprimierte Immunrezeptoren (IC-Inhibitoren), deren Funktion in der Tumormikroumgebung fehlreguliert ist (Parry et al., 2005). PD-1 wird überwiegend von T-Zellen und seltener von B-Zellen, aktivierten Monozyten, DCs und NK-Zellen exprimiert (Akinleye and Rasool, 2019). Die Wechselwirkung von PD-1 mit seinen Liganden (PD-L1, PD-L2) auf Tumorzellen hemmt die T-Zellaktivierung und Zytokinproduktion. Die Abschwächung der T-Zellantwort ermöglicht dem Tumor eine Immunflucht (immune escape) (Seliger, 2019). Das auf aktivierten Tregs exprimierte CTLA-4 interagiert mit CD80 und CD86 auf APCs. Dadurch werden kostimulatorische Signalwege gehemmt und die Aktivierung von T-Zellen verringert (Romani et al., 2018). Die Interaktion von PD-1 und CTLA-4 mit ihren Liganden verursacht eine T-Zellinaktivierung bzw. Apoptose (Fecci and Sampson, 2019). Eine erhöhte Expression von PD-1 und CTLA-4 auf Hirntumorzellen verringert die Phagozytose durch TAMs (Gordon et al., 2017) und verursacht eine Erschöpfung der T-Effektorzellen (You et al., 2021).

In der vorliegenden Matched-pairs Kohorte war eine höhere PD-1/PD-L1-Expression bei der Erstdiagnose und eine Abnahme der PD-1/PD-L1-Expression im Krankheitsverlauf (gemessen im progredienten Tumor) mit einem längeren PFS verbunden. Weiter führte eine fehlende CTLA-4-Expression im Tumor bei der Erstdiagnose zu einem verlängerten PFS. Ein Anstieg der PD-1-Expression nach der Therapie war im Vergleich zu einer konstanten Expression bzw. Abnahme der Expression mit einem kürzeren PFS verbunden.

Eine hohe PD-1-Expression und seiner Liganden geht auch in anderen Studien mit einer schlechten Prognose einher (Chen et al., 2018a). Gliome mit einer hohen CTLA-4-Expression zeigten eine stärkere Infiltration von Immunzellen und ein schlechteres OS (Liu et al., 2020). Beim GBM korrelierte die Expression von

CTLA-4 auf CD4⁺- und CD8⁺-Zellen negativ mit OS (Fong et al., 2012). Laut immunhistochemischer Studien war ein hohes PD-L1-Expressionsniveau mit einem signifikant kürzeren OS bei Gliompatienten assoziiert (Han et al., 2017, Lee et al., 2018, Nduom et al., 2016, Liu et al., 2013, Pratt et al., 2019). Andere immunhistochemische Analysen fanden dagegen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und dem OS bei Gliompatienten (Berghoff et al., 2015, Miyazaki et al., 2017, Zeng et al., 2016).

Das Fehlen standardisierter experimenteller Parameter, definierter Cut-off-Werte und die Heterogenität der Kohorten sind mögliche Gründe für diese teils widersprüchlichen Befunde zum Effekt der untersuchten IC-Parameter auf das PFS und OS. Zur Validierung der Befunde sind Studien an größeren homogenen Kohorten mit definiertem molekularem Subtyp erforderlich.

Die Wirksamkeit von Inhibitoren der Wechselwirkung von PD-1 und PD-L1 als Monotherapie oder in Kombination mit CTLA-4-Inhibitoren wurde beim Melanom (Larkin et al., 2015) und nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (Brahmer et al., 2015) nachgewiesen. Studien zum therapeutischen Einsatz von IC-Inhibitoren beim GBM zeigten jedoch enttäuschende Ergebnisse (Sanders and Debinski, 2020, Yang et al., 2021). In einer Phase-II-Studie erhöhte präoperativ verabreichtes Nivolumab (PD-1-Inhibitor) jedoch die Chemokin-Expression und die klonale Diversität der T-Zellrezeptoren und damit vermutlich die Immunzellinfiltration und die Anti-Tumor-Immunantwort (Schalper et al., 2019).

Neuere Studien belegen, dass Anti-CTLA-4 hauptsächlich durch die Eliminierung von Tregs wirkt (Sharma et al., 2019) und Anti-PD-1 / Anti-PD-L1 durch die Anregung der IFN- γ -Produktion in CTLs, die wiederum die IL-12-Abgabe in DCs und in Folge die weitere Stimulierung der CTLs fördert (Garris et al., 2018).

Neben PD-1 und CTLA-4 inhibieren auch das T-Zellimmunglobulin und Mucin-Domäne-3-Protein (TIM-3) das Lymphozyten-Aktivierungsgen 3 (Lag-3) und der T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT) die T-Zellfunktionen (Woroniecka et al., 2018a). Diese Proteine sind daher weitere mögliche Zielstrukturen für eine Tumorthherapie.

Die Blockade eines einzelnen IC scheint beim GBM für eine Reaktivierung der unterdrückten Immunantwort nicht auszureichen, da sich dieser Tumor durch eine ausgeprägte Immunsuppression auszeichnet (Wang et al., 2019c). Für höhere Ansprechraten ist die Entwicklung von Kombinationstherapien erforderlich. Für eine bessere Prognose therapeutischer Reaktionen ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Immunantworten in der Tumormikroumgebung erforderlich.

Makrophagen-Marker (CD163, MRS1) und PFS

TAMs beeinflussen die Prognose je nach Tumortyp unterschiedlich. Laut einer Metaanalyse von 55 Studien korreliert eine hohe TAM-Expression bei einigen Tumorentitäten (z. B. Magen-, Blasen-, Ovarialkarzinom) mit einem schlechteren Überleben, bei anderen (z. B. nicht-kleinzelliger Lungenkrebs, Kolorektalkarzinom) ist sie dagegen mit einer besseren Prognose assoziiert (Zhang et al., 2012). Bei Hirntumoren sind TAMs tendenziell mit einer schlechten Prognose verbunden. Vermutlich fördern TAMs zahlreiche tumorfördernde Aktivitäten wie die Angiogenese, die Migration und Invasivität von Tumorzellen und unterdrücken die adaptive Anti-Tumor-Immunität (Fu et al., 2020, Pan et al., 2020).

Laut Studien kommunizieren TAMs aktiv über die Produktion von löslichen Faktoren (IL-6, IL-10, TGF- β 1) mit Tumorzellen (Ye et al., 2012, Wagner et al., 1999). Diese parakrinen Zytokine sind meist tumorunterstützend und aktivieren in Tumorzellen intrinsische Signalwege, die die Proliferation, Invasion und Vaskularisierung fördern. Weiter sind TAMs eng mit Gliomstammzellen (GSCs) assoziiert. Diese Untergruppe neoplastischer Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften weisen tumorinitiierende Charakteristika auf, die die maligne GBM-Progression fördern (Zhou and Bao, 2014, Wu et al., 2010).

Tumorzellen sezernieren immunmodulatorische Zytokine, die eine Differenzierung der TAMs in den immunsuppressiven M2-Phänotyp unterstützen. Immunsuppressive myeloide Zellen (M2-TAMs, Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)) sezernieren Zytokine (IL-6, IL-10, IL-4R-alpha, Fas-Ligand, CCL2,

PGE2, Epidermal growth factor (EGF), VEGF und MMP-9), die die CTL-Funktion unterdrücken und die Proliferation von Tumorzellen fördern (Wang et al., 2019c).

In einer immunhistochemischen Studie war ein höherer Anteil an CD163⁺-Zellen mit einer schlechteren Prognose bei GBM-Patienten (n = 98) verbunden (Martinez-Lage et al., 2019). In einer weiteren Analyse korrelierte eine hohe CD163-Expression signifikant mit einem kürzeren OS bei GBM-Patienten (n = 95) (Annovazzi et al., 2018). Laut verschiedener Datenbanken (Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA), The Cancer Genome Atlas (TCGA)) zeigen GBM-Patienten mit einer höheren CD163-Expression ein signifikant kürzeres OS als Patienten mit niedriger CD163-Expression (Liu et al., 2019). Bei Astrozytomen Grad III zeigten Patienten (n = 36) mit geringen im Vergleich zu Patienten mit hohen immunhistochemisch nachgewiesenen CD163⁺-Zellzahlen im Tumor eine signifikant längere 5-Jahres-Überlebensrate (mediane Überlebenszeit 239 vs. 57 Wochen) (Prosniak et al., 2013). Dagegen fanden Zeiner et al. (2019) eine signifikant positive Korrelation zwischen der immunhistochemisch nachgewiesenen Anzahl an CD163⁺-TAMs im vitalen Tumorkern und dem OS von GBM-Patienten ohne *IDH1*-(R132H)-Mutation (n = 241).

In der vorliegenden Matched-pair Kohorte war eine niedrigere CD163-Expression zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (CD163 1–24 %: 10 Monate vs. CD163 25–50 %: 6 Monate) und eine Zunahme der CD163-Expression (Zunahme: 10 Monate vs. Abnahme: 8 Monate) nach der Therapie mit einem verlängerten PFS verbunden.

Auch die MSR1-Expression scheint die Überlebensrate von GBM-Patienten zu beeinflussen. Eine mittels automatisierter quantitativer Immunfluoreszenz nachgewiesene hohe MSR1-Expression war bei Gliom Grad III–IV (n = 460) mit einem kürzeren OS verbunden (Sorensen et al., 2018). Laut dem Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA) und dem Cancer Genome Atlas (TCGA) zeigen Patienten mit einer hohen MSR1-Expression ein kürzeres OS (Liu et al., 2019).

In der vorliegenden Matched-pair Kohorte war eine niedrigere MSR1-Expression zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (< 50 %: 6 Monate vs. > 50 %: 10 Monate) und

eine Zunahme der MSR1-Expression im Krankheitsverlauf (Zunahme: 8 Monate vs. Abnahme: 6 Monate) mit einem kürzeren PFS assoziiert.

Zu den Aufgaben der mutmaßlich M2-ähnlichen MSR1⁺-TAM-Subpopulationen in der GBM-Mikroumgebung zählen die Phagozytose und Antigenpräsentation; sie zeigen wahrscheinlich keinen entzündungshemmenden und potenziell tumorfördernden TAM-Phänotyp (Zeiner et al., 2019).

Die teils widersprüchlichen Ergebnisse belegen, dass die Funktion der TAM-Subpopulationen in Gliomen und die Bedeutung der MSR1- und CD163-Expression noch unverstanden ist.

4.6 Limitationen der vorliegenden retrospektiven Matched-pairs Analyse

Bei der Interpretation der Daten der vorliegenden Matched-pairs Kohorte sind verschiedene Limitationen zu berücksichtigen. Aufgrund der auch in dieser Analyse deutlich werdenden Heterogenität der GBMs sind für die Charakterisierung der GBM-Immunumgebung und für den Vergleich von Tumoren bei Erstdiagnose und progredienten Tumoren größere Fallzahlen erforderlich. Möglicherweise sollten in Zukunft Cluster-Analysen beispielsweise mit definiertem molekularem Subtyp durchgeführt werden, um die Heterogenität zu minimieren.

Aufgrund der geringen Fallzahl in der RT-Gruppe schien ein Vergleich der Therapie-Gruppen nicht sinnvoll, da keine validen Ergebnisse zu erwarten waren.

Zum Ausschluss untersucherabhängiger Faktoren und zur besseren Erfassung der Heterogenität der Proben würde sich anstelle einer immunhistochemischen Auswertung eine Einzelzell-RNA-Sequenzierung anbieten.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende retrospektive Matched-pairs Kohortenstudie belegt die außerordentlich hohe Heterogenität von GBMs. Varianzen wurden sowohl bei den Tumoren verschiedener Patienten als auch bei Tumoren desselben Patienten im

Zeitverlauf (Erstdiagnose vs. Progression) detektiert. Daher ist ein zum Zeitpunkt der primären Resektion ermittelter Expressionsstatus zur Festlegung der Zielproteine für die Behandlung von progredienten GBMs nur bedingt geeignet. Vielmehr unterstreichen die Abweichungen in den vorliegenden Matched-pairs Daten die Notwendigkeit einer Gewebeanalyse zum Zeitpunkt des Auftretens einer Progression.

Zudem fehlen derzeit definierte Cut-off-Werte für die Expression der Zielproteine, die eine standardisierte Therapieentscheidung erlauben.

Die widersprüchliche Datenlage zur Expression der untersuchten Marker lässt sich durch die hohe GBM-Heterogenität, variable Detektionsverfahren und durch unterschiedliche Therapieverfahren (CT und/oder RT) erklären. Zur Analyse der Einflussfaktoren auf die Marker-Expression sind homogene Kohorten mit definitivem molekularem Subtyp, größere Fallgruppen und standardisierte Verfahren erforderlich.

Laut der vorliegenden Spearman-Korrelationsanalyse korreliert die PD-1/PD-L1-Achse mit histologischen TAM-Markern (MSR1/CD163) und die PD-1-Expression mit der CD8-Expression. Beide Befunde weisen auf eine Immunsuppression in der Tumormikroumgebung hin. Die Korrelation zwischen der CD4- und CD163-Expression unterstützt die Theorie der Förderung des tumorunterstützenden M2-Phänotyps und der Infiltration von CD4⁺-Tregs in die Tumormikroumgebung.

Bei der vorliegenden Matched-pairs Kohorte erwies sich eine Zunahme der Lymphozyten- (CD3, CD4 und CD8) und der CD163⁺-TAM-Infiltration sowie eine Abnahme der PD-1/PD-L1- bzw. MSR1-Expression im Krankheitsverlauf für das PFS als prognostisch günstiger. Die begrenzte Wirksamkeit immuntherapeutischer Strategien beruht vermutlich teilweise auf einem Einsatz der Wirkstoffe an unselektierten Patientenpopulationen mit unbekannter Zielprotein-Expression.

Das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen den Akteuren des komplexen Immunnetzwerkes ist für die Entwicklung wirksamer und spezifischer Krebstherapeutika unverzichtbar.

5 Zusammenfassung

Glioblastome (GBMs) sind aggressive Tumoren mit schlechter Prognose. Trotz maximaler initialer Resektion und multimodaler Therapie zeigen etwa 70 % der GBM-Patienten innerhalb eines Jahres nach der Diagnose eine Progression; weniger als 5 % der Patienten überleben die Diagnose länger als 5 Jahre. Aktuell zielen Bestrebungen bei der Entwicklung von Therapien darauf ab, Wechselwirkungen von Immunzellen und Tumorzellen zu identifizieren, die das Tumorstadium hemmen. Trotz zahlreicher Studien zu den Merkmalen Tumor-infiltrierender Immunzellen bei neu diagnostizierten GBMs fehlen entsprechende Daten für progrediente GBMs und Analysen mit Matched-pairs Proben (Tumor bei Erstdiagnose / progredienter Tumor) derselben Patienten. In der vorliegenden retrospektiven Studie wurden 33 Matched-pairs Gewebeprobe von im Zeitraum von 2008–2017 am Universitätsklinikum Tübingen behandelten GBM-Patienten (Stupp-Therapie, Radiotherapie) immunhistochemisch analysiert. Dabei wurde die Expression von Markern für Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs; Marker: Cluster of Differentiation (CD)3, CD4, CD8) und Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs; Marker: CD163, Makrophagen-Scavenger-Rezeptor 1 (MSR1)) sowie die Expression von Immuncheckpoint-(IC)-Inhibitoren (Programmed cell death protein 1 (PD-1), Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4), Programmed cell death protein ligand 1 (PD-L1)) und deren Einfluss auf das progressionsfreie Überleben (PFS) untersucht.

Bei den TILs dominierten zu beiden Zeitpunkten (Erstdiagnose / Progression) CD4⁺-T-Zellen in den Tumorproben. Bei einem Drittel der Tumorproben machten bei der Erstdiagnose CD163⁻- bzw. MSR1⁻-exprimierende TAMs > 50 % der Zellen aus. Der Anteil der CD163⁺- bzw. MSR1⁺-TAMs nahm in Proben progredienter Tumoren bei 40 % bzw. 27,3 % der Matched-pairs zu. MSR1⁺-TAMs erwiesen sich als Stupp-resistenter als CD163⁺-TAMs. In über der Hälfte der Fälle blieb der Anteil der MSR1⁺-TAMs nach der Stupp-Therapie unverändert (54,5 %), bei den CD163⁺-TAMs waren es 20 %. Die Proben zeigten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in 73,1 % bzw. 88,5 % der Fälle keine PD-1 bzw. CTLA-4-Expression. In Proben progredienter Tumoren gab es keine klare Tendenz. Die PD-L1-Ana-

lyse ergab in 80 % der Fälle eine mäßige bis starke Expression bei der Erstdiagnose und häufig eine Zunahme PD-L1-Expression in den Proben progredienter Tumoren.

Laut Spearman-Korrelationsanalyse war die PD-1/PD-L1-Achse mit histologischen TAM-Markern (MSR1/CD163) assoziiert und die PD-1-Expression mit der CD8-Expression. Beide Korrelationen weisen auf eine immunsuppressive Tumormikroumgebung hin. Die Korrelation zwischen der CD4- und CD163-Expression spiegelt eine Koexistenz von tumorunterstützenden TAMs vom M2-Phänotyp und CD4⁺-regulatorischen-T-Zellen wider.

Eine Zunahme der Lymphozyten- (CD3-, CD4- und CD8) und CD163⁺-TAM-Infiltration und eine Abnahme der PD-1/PD-L1-Expression und MSR1⁺-TAM-Infiltration im Krankheitsverlauf war mit einem verlängerten PFS assoziiert.

Für die Entwicklung immuntherapeutischer Strategien im Rahmen personalisierter GBM-Behandlungen sind Kenntnisse der individuellen Charakteristika des GBMs und der GBM-Mikroumgebung unverzichtbar. Die vorliegende Analyse im Matched-pair Design verdeutlicht die Variabilität der Tumoren und ihrer Mikroumgebung bezüglich TILs, TAMs und der IC-Markereexpression sowie die Häufigkeit von Veränderungen dieser Parameter bei einer Progression. Für die Therapieplanung bei progredientem GBM ist daher ein im Rahmen der primären Resektion ermittelter Status nur bedingt geeignet, vielmehr sind zur Sicherstellung der Wirksamkeit des therapeutischen Vorgehens aktuelle Gewebeanalysen unverzichtbar.

6 Literaturverzeichnis

- ACHYUT, B. R., ANGARA, K., JAIN, M., BORIN, T. F., RASHID, M. H., ISKANDER, A. S. M., ARA, R., KOLHE, R., HOWARD, S., VENUGOPAL, N., RODRIGUEZ, P. C., BRADFORD, J. W. & ARBAB, A. S. 2017. Canonical NF κ B signaling in myeloid cells is required for the glioblastoma growth. *Scientific Reports*, 7, 13754.
- AGNIHOTRI, S., BURRELL, K. E., WOLF, A., JALALI, S., HAWKINS, C., RUTKA, J. T. & ZADEH, G. 2013. Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61, 25-41.
- AHMED, N., BRAWLEY, V., HEGDE, M., BIELAMOWICZ, K., KALRA, M., LANDI, D., ROBERTSON, C., GRAY, T. L., DIOUF, O., WAKEFIELD, A., GHAZI, A., GERKEN, C., YI, Z., ASHOORI, A., WU, M. F., LIU, H., ROONEY, C., DOTTI, G., GEE, A., SU, J., KEW, Y., BASKIN, D., ZHANG, Y. J., NEW, P., GRILLEY, B., STOJAKOVIC, M., HICKS, J., POWELL, S. Z., BRENNER, M. K., HESLOP, H. E., GROSSMAN, R., WELS, W. S. & GOTTSCHALK, S. 2017. HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *JAMA Oncol*, 3, 1094-1101.
- AKINLEYE, A. & RASOOL, Z. 2019. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol*, 12, 92.
- ALDAPE, K., ZADEH, G., MANSOURI, S., REIFENBERGER, G. & VON DEIMLING, A. 2015. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathologica*, 129, 829-848.
- ALSAAB, H. O., SAU, S., ALZHRANI, R., TATIPARTI, K., BHISE, K., KASHAW, S. K. & IYER, A. K. 2017. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol*, 8, 561.
- ANDERSON, R. C., ANDERSON, D. E., ELDER, J. B., BROWN, M. D., MANDIGO, C. E., PARSA, A. T., GOODMAN, R. R., MCKHANN, G. M., SISTI, M. B. & BRUCE, J. N. 2007. Lack of B7 expression, not human leukocyte antigen expression, facilitates immune evasion by human malignant gliomas. *Neurosurgery*, 60, 1129-36; discussion 1136.
- ANNOVAZZI, L., MELLAI, M., BOVIO, E., MAZZETTI, S., POLLO, B. & SCHIFFER, D. 2018. Microglia immunophenotyping in gliomas. *Oncol Lett*, 15, 998-1006.
- ANTONIOS, J. P., SOTO, H., EVERSON, R. G., MOUGHON, D., ORPILLA, J. R., SHIN, N. P., SEDIGHIM, S., TREGER, J., ODESA, S., TUCKER, A., YONG, W. H., LI, G., CLOUGHESY, T. F., LIAU, L. M. & PRINS, R. M. 2017. Immunosuppressive tumor-infiltrating myeloid cells mediate adaptive immune resistance via a PD-1/PD-L1 mechanism in glioblastoma. *Neuro Oncol*, 19, 796-807.
- APETOH, L., SMYTH, M. J., DRAKE, C. G., ABASTADO, J. P., APTE, R. N., AYYOUB, M., BLAY, J. Y., BONNEVILLE, M., BUTTERFIELD, L. H., CAIGNARD, A., CASTELLI, C., CAVALLO, F., CELIS, E., CHEN, L., COLOMBO, M. P., COMIN-ANDUIX, B., COUKOS, G., DHODAPKAR, M. V., DRANOFF, G., FRAZER, I. H., FRIDMAN, W. H., GABRILOVICH, D. I., GILBOA, E., GNJATIC, S., JÄGER, D., KALINSKI, P., KAUFMAN, H. L., KIESSLING, R., KIRKWOOD, J., KNUTH, A., LIBLAU, R., LOTZE, M. T., LUGLI, E., MARINCOLA, F., MELERO, I., MELIEF, C. J., MEMPEL, T. R., MITTENDORF, E. A., ODUN, K., OVERWIJK, W. W., PALUCKA, A. K., PARMIANI, G., RIBAS, A., ROMERO, P., SCHREIBER, R. D., SCHULER, G., SRIVASTAVA, P. K., TARTOUR, E., VALMORI, D., VAN DER BURG, S. H., VAN DER BRUGGEN, P., VAN DEN EYNDE, B. J., WANG, E., ZOU, W., WHITESIDE, T. L., SPEISER, D. E., PARDOLL, D. M., RESTIFO, N. P. & ANDERSON, A. C. 2015. Consensus nomenclature for CD8(+) T cell phenotypes in cancer. *Oncimmunology*, 4, e998538.

- ARAKAKI, R., YAMADA, A., KUDO, Y., HAYASHI, Y. & ISHIMARU, N. 2014. Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FasL expression. *Crit Rev Immunol*, 34, 301-14.
- ARANGO DUQUE, G. & DESCOTEAUX, A. 2014. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, 5.
- BARBAGALLO, G., JENKINSON, M. & BRODBELT, A. 2008. 'Recurrent' glioblastoma multiforme, when should we reoperate? *British journal of neurosurgery*, 22, 452-5.
- BARBARAWI, M., SUHAIR, Q., GHAZZAWI, M. & SMITH, S. 2009. Glioblastoma multiforme of the cerebellum. *Neurosciences (Riyadh, Saudi Arabia)*, 14, 84-8.
- BARONE, T. A., GORSKI, J. W., GREENBERG, S. J. & PLUNKETT, R. J. 2009. Estrogen increases survival in an orthotopic model of glioblastoma. *J Neurooncol*, 95, 37-48.
- BATES, G. J., FOX, S. B., HAN, C., LEEK, R. D., GARCIA, J. F., HARRIS, A. L. & BANHAM, A. H. 2006. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*, 24, 5373-80.
- BATICH, K. A., REAP, E. A., ARCHER, G. E., SANCHEZ-PEREZ, L., NAIR, S. K., SCHMITTLING, R. J., NORBERG, P., XIE, W., HERNDON, J. E., HEALY, P., MCLENDON, R. E., FRIEDMAN, A. H., FRIEDMAN, H. S., BIGNER, D., VLAHOVIC, G., MITCHELL, D. A. & SAMPSON, J. H. 2017. Long-term Survival in Glioblastoma with Cytomegalovirus pp65-Targeted Vaccination. *Clinical Cancer Research*, 23, 1898-1909.
- BAUER, K., BINDER, S., KLEIN, C., SIMON, J. C. & HORN, F. 2009. Inhibition of dendritic cell maturation and activation is mediated by STAT3. *Cell Communication and Signaling*, 7, A68.
- BELGIOVINE, C., DIGIFICO, E., ANFRAY, C., UMMARINO, A. & TORRES ANDÓN, F. 2020. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Anti-Cancer Therapies: Convincing the Traitors to Do the Right Thing. *J Clin Med*, 9.
- BELLO ROUFAI, D., CAILLET, P., LAPÔTRE-LEDOUX, B., TRECHEREL, E., BAUCHET, L., CHAUFFERT, B. & GANRY, O. 2018. Incidence and survival rates for adult malignant neuro-epithelial brain tumors in the Somme county (France): A retrospective, population-based study from 2003 to 2013. *Journal of Cancer Policy*, 15, 5-9.
- BEN-SHOSHAN, J., MAYSEL-AUSLENDER, S., MOR, A., KEREN, G. & GEORGE, J. 2008. Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha. *Eur J Immunol*, 38, 2412-8.
- BERGHOF, A. S., KIESEL, B., WIDHALM, G., RAJKY, O., RICKEN, G., WOHRER, A., DIECKMANN, K., FILIPITS, M., BRANDSTETTER, A., WELLER, M., KURSCHEID, S., HEGI, M. E., ZIELINSKI, C. C., MAROSI, C., HAINFELLNER, J. A., PREUSSER, M. & WICK, W. 2015. Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. *Neuro Oncol*, 17, 1064-75.
- BHAT, K. P. L., BALASUBRAMANIYAN, V., VAILLANT, B., EZHILARASAN, R., HUMMELINK, K., HOLLINGSWORTH, F., WANI, K., HEATHCOCK, L., JAMES, J. D., GOODMAN, L. D., CONROY, S., LONG, L., LELIC, N., WANG, S., GUMIN, J., RAJ, D., KODAMA, Y., RAGHUNATHAN, A., OLAR, A., JOSHI, K., PELLOSKI, C. E., HEIMBERGER, A., KIM, S. H., CAHILL, D. P., RAO, G., DEN DUNNEN, W. F. A., BODDEKE, H., PHILLIPS, H. S., NAKANO, I., LANG, F. F., COLMAN, H., SULMAN, E. P. & ALDAPE, K. 2013. Mesenchymal differentiation mediated by NF-κB promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell*, 24, 331-46.
- BIELAMOWICZ, K., FOUSEK, K., BYRD, T. T., SAMAHA, H., MUKHERJEE, M., AWARE, N., WU, M. F., ORANGE, J. S., SUMAZIN, P., MAN, T. K., JOSEPH, S. K., HEGDE, M. & AHMED, N. 2018. Trivalent CAR T cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma. *Neuro Oncol*, 20, 506-518.

- BISWAS, S. K. & MANTOVANI, A. 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*, 11, 889.
- BLUMENTHAL, D. T. & CANNON-ALBRIGHT, L. A. 2008. Familiality in brain tumors. *Neurology*, 71, 1015-20.
- BOEING, H., SCHLEHOFER, B., BLETTNER, M. & WAHRENDORF, J. 1993. Dietary carcinogens and the risk for glioma and meningioma in Germany. *International Journal of Cancer*, 53, 561-565.
- BOGEN, B., FAUSKANGER, M., HAABETH, O. A. & TVEITA, A. 2019. CD4+ T cells indirectly kill tumor cells via induction of cytotoxic macrophages in mouse models. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 68, 1865-1873.
- BONAVIA, R., INDA, M. M., CAVENEE, W. K. & FURNARI, F. B. 2011. Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network. *Cancer Res*, 71, 4055-60.
- BONDY, M. L., SCHEURER, M. E., MALMER, B., BARNHOLTZ-SLOAN, J. S., DAVIS, F. G., IL'YASOVA, D., KRUCHKO, C., MCCARTHY, B. J., RAJARAMAN, P., SCHWARTZBAUM, J. A., SADETZKI, S., SCHLEHOFER, B., TIHAN, T., WIEMELS, J. L., WRENSCH, M. & BUFFLER, P. A. 2008. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*, 113, 1953-68.
- BOS, R., MARQUARDT, K. L., CHEUNG, J. & SHERMAN, L. A. 2012. Functional differences between low- and high-affinity CD8(+) T cells in the tumor environment. *Oncoimmunology*, 1, 1239-1247.
- BRAGANZA, M. Z., KITAHARA, C. M., BERRINGTON DE GONZÁLEZ, A., INSKIP, P. D., JOHNSON, K. J. & RAJARAMAN, P. 2012. Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: a systematic review. *Neuro Oncol*, 14, 1316-24.
- BRAHMER, J., RECKAMP, K. L., BAAS, P., CRINÒ, L., EBERHARDT, W. E., PODDUBSKAYA, E., ANTONIA, S., PLUZANSKI, A., VOKES, E. E., HOLGADO, E., WATERHOUSE, D., READY, N., GAINOR, J., ARÉN FRONTERA, O., HAVEL, L., STEINS, M., GARASSINO, M. C., AERTS, J. G., DOMINE, M., PAZ-ARES, L., RECK, M., BAUDELET, C., HARBISON, C. T., LESTINI, B. & SPIGEL, D. R. 2015. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 373, 123-35.
- BROWN, C. E., ALIZADEH, D., STARR, R., WENG, L., WAGNER, J. R., NARANJO, A., OSTBERG, J. R., BLANCHARD, M. S., KILPATRICK, J., SIMPSON, J., KURIEN, A., PRICEMAN, S. J., WANG, X., HARSHBARGER, T. L., D'APUZZO, M., RESSLER, J. A., JENSEN, M. C., BARISH, M. E., CHEN, M., PORTNOW, J., FORMAN, S. J. & BADIE, B. 2016. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *New England Journal of Medicine*, 375, 2561-2569.
- BRÜGGEMANN, C., KIRCHBERGER, M. C., GOLDINGER, S. M., WEIDE, B., KONRAD, A., ERDMANN, M., SCHADENDORF, D., CRONER, R. S., KRÄHENBÜHL, L., KÄHLER, K. C., HAFNER, C., LEISGANG, W., KIESEWETTER, F., DUMMER, R., SCHULER, G., STÜRZL, M. & HEINZERLING, L. 2017. Predictive value of PD-L1 based on mRNA level in the treatment of stage IV melanoma with ipilimumab. *J Cancer Res Clin Oncol*, 143, 1977-1984.
- BRZOSTEK, J., GASCOIGNE, N. R. & RYBAKIN, V. 2016. Cell Type-Specific Regulation of Immunological Synapse Dynamics by B7 Ligand Recognition. *Front Immunol*, 7, 24.
- BUCHBINDER, E. I. & DESAI, A. 2016. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *American Journal of Clinical Oncology*, 39.
- BUDD, R. C. & FORTNER, K. A. 2017. Chapter 12 - T Lymphocytes. In: FIRESTEIN, G. S., BUDD, R. C., GABRIEL, S. E., MCINNES, I. B. & O'DELL, J. R. (eds.) *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology (Tenth Edition)*. Elsevier.
- BUTOWSKI, N., COLMAN, H., DE GROOT, J. F., OMURO, A. M., NAYAK, L., WEN, P. Y., CLOUGHESY, T. F., MARIMUTHU, A., HAIDAR, S., PERRY, A., HUSE, J., PHILLIPS, J., WEST, B. L., NOLOP, K. B., HSU, H. H., LIGON, K. L., MOLINARO, A. M. & PRADOS, M. 2016.

- Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 in recurrent glioblastoma: an Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium phase II study. *Neuro Oncol*, 18, 557-64.
- CAHOON, E. K., INSKIP, P. D., GRIDLEY, G. & BRENNER, A. V. 2014. Immune-related conditions and subsequent risk of brain cancer in a cohort of 4.5 million male US veterans. *Br J Cancer*, 110, 1825-33.
- CALINESCU, A., KAMRAN, N., BAKER, G., MINEHARU, Y., LOWENSTEIN, P. & CASTRO, M. 2015. Overview of current immunotherapeutic strategies for glioma. *Immunotherapy*, 7, 1073-1104.
- CAMPOS, B., OLSEN, L. R., URUP, T. & POULSEN, H. S. 2016. A comprehensive profile of recurrent glioblastoma. *Oncogene*, 35, 5819.
- CANNARILE, M. A., WEISSER, M., JACOB, W., JEGG, A. M., RIES, C. H. & RÜTTINGER, D. 2017. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *J Immunother Cancer*, 5, 53.
- CAROZZA, S. E., WRENSCH, M., MIIKE, R., NEWMAN, B., OLSHAN, A. F., SAVITZ, D. A., YOST, M. & LEE, M. 2000. Occupation and Adult Gliomas. *American Journal of Epidemiology*, 152, 838-846.
- CHADBAN, S. J., TESCH, G. H., FOTI, R., LAN, H. Y., ATKINS, R. C. & NIKOLIC-PATERSON, D. J. 1998. Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo. *Immunology*, 94, 72-8.
- CHAKRABORTY, S., FILIPPI, C. G., WONG, T., RAY, A., FRALIN, S., TSIOURIS, A. J., PRAMINICK, B., DEMOPOULOS, A., MCCREA, H. J., BODHINAYAKE, I., ORTIZ, R., LANGER, D. J. & BOOCKVAR, J. A. 2016. Superselective intraarterial cerebral infusion of cetuximab after osmotic blood/brain barrier disruption for recurrent malignant glioma: phase I study. *Journal of Neuro-Oncology*, 128, 405-415.
- CHAMBERS, C. A., KUHN, M. S., EGEN, J. G. & ALLISON, J. P. 2001. CTLA-4-Mediated Inhibition in Regulation of T Cell Responses: Mechanisms and Manipulation in Tumor Immunotherapy. *Annual Review of Immunology*, 19, 565-594.
- CHANDRAMOHAN, V., MITCHELL, D. A., JOHNSON, L. A., SAMPSON, J. H. & BIGNER, D. D. 2013. Antibody, T-cell and dendritic cell immunotherapy for malignant brain tumors. *Future Oncol*, 9, 977-90.
- CHAUHAN, P. & LOKENSGARD, J. R. 2019. Glial Cell Expression of PD-L1. *Int J Mol Sci*, 20.
- CHEN, C., XU, T., LU, Y., CHEN, J. & WU, S. 2012. The efficacy of temozolomide for recurrent glioblastoma multiforme. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, 20.
- CHEN, L., ASHE, S., BRADY, W. A., HELLSTRÖM, I., HELLSTRÖM, K. E., LEDBETTER, J. A., MCGOWAN, P. & LINSLEY, P. S. 1992. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell*, 71, 1093-1102.
- CHEN, R. Q., LIU, F., QIU, X. Y. & CHEN, X. Q. 2018a. The Prognostic and Therapeutic Value of PD-L1 in Glioma. *Front Pharmacol*, 9, 1503.
- CHEN, T., CHEN, J., ZHU, Y., LI, Y., WANG, Y., CHEN, H., WANG, J., LI, X., LIU, Y., LI, B., SUN, X. & KE, Y. 2019. CD163, a novel therapeutic target, regulates the proliferation and stemness of glioma cells via casein kinase 2. *Oncogene*, 38, 1183-1199.
- CHEN, Y. R., SOLE, J., UGILIWENEZA, B., JOHNSON, E., BURTON, E., WOO, S. Y., KOUTOUROUSIOU, M., WILLIAMS, B., BOAKYE, M. & SKIRBOLL, S. 2018b. National Trends for Reoperation in Older Patients with Glioblastoma. *World Neurosurg*, 113, e179-e189.
- CHEN, Z., FENG, X., HERTING, C. J., GARCIA, V. A., NIE, K., PONG, W. W., RASMUSSEN, R., DWIVEDI, B., SEBY, S., WOLF, S. A., GUTMANN, D. H. & HAMBARDZUMYAN, D. 2017.

- Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer Res*, 77, 2266-2278.
- CHINOT, O. L., WICK, W., MASON, W., HENRIKSSON, R., SARAN, F., NISHIKAWA, R., CARPENTIER, A. F., HOANG-XUAN, K., KAVAN, P., CERNEA, D., BRANDES, A. A., HILTON, M., ABREY, L. & CLOUGHESY, T. 2014. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*, 370, 709-22.
- CHOI, B. D., KUAN, C. T., CAI, M., ARCHER, G. E., MITCHELL, D. A., GEDEON, P. C., SANCHEZ-PEREZ, L., PASTAN, I., BIGNER, D. D. & SAMPSON, J. H. 2013. Systemic administration of a bispecific antibody targeting EGFRvIII successfully treats intracerebral glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 270-5.
- CHOI, C., GILLESPIE, G. Y., VAN WAGONER, N. J. & BENVENISTE, E. N. 2002. Fas engagement increases expression of interleukin-6 in human glioma cells. *J Neurooncol*, 56, 13-9.
- CHONAN, M., SAITO, R., SHOJI, T., SHIBAHARA, I., KANAMORI, M., SONODA, Y., WATANABE, M., KIKUCHI, T., ISHII, N. & TOMINAGA, T. 2015. CD40/CD40L expression correlates with the survival of patients with glioblastomas and an augmentation in CD40 signaling enhances the efficacy of vaccinations against glioma models. *Neuro Oncol*, 17, 1453-62.
- CLARKE, J., BUTOWSKI, N. & CHANG, S. 2010. Recent Advances in Therapy for Glioblastoma. *Archives of Neurology*, 67, 279-283.
- COHEN-INBAR, O. & ZAARoor, M. 2016. Immunological Aspects of Malignant Gliomas. *Can J Neurol Sci*, 43, 494-502.
- COMBS, S. E., HEEGER, S., HASELMANN, R., EDLER, L., DEBUS, J. & SCHULZ-ERTNER, D. 2006. Treatment of primary glioblastoma multiforme with cetuximab, radiotherapy and temozolomide (GERT)--phase I/II trial: study protocol. *BMC Cancer*, 6, 133.
- CONROY, S., KRUYT, F. A., JOSEPH, J. V., BALASUBRAMANIYAN, V., BHAT, K. P., WAGEMAKERS, M., ENTING, R. H., WALENKAMP, A. M. & DEN DUNNEN, W. F. 2014. Subclassification of newly diagnosed glioblastomas through an immunohistochemical approach. *PLoS One*, 9, e115687.
- CONROY, S., KRUYT, F. A. E., WAGEMAKERS, M., BHAT, K. P. L. & DEN DUNNEN, W. F. A. 2018. IL-8 associates with a pro-angiogenic and mesenchymal subtype in glioblastoma. *Oncotarget*, 9, 15721-15731.
- CROCKETTI, E., TRAMA, A., STILLER, C., CALDARELLA, A., SOFFIETTI, R., JAAL, J., WEBER, D. C., RICARDI, U., SLOWINSKI, J. & BRANDES, A. 2012. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *European Journal of Cancer*, 48, 1532-1542.
- CROTEAU, D., SCARPACE, L., HEARSHEN, D., GUTIERREZ, J., FISHER, J. L., ROCK, J. P. & MIKKELSEN, T. 2001. Correlation between magnetic resonance spectroscopy imaging and image-guided biopsies: semiquantitative and qualitative histopathological analyses of patients with untreated glioma. *Neurosurgery*, 49, 823-9.
- DA CRUZ, L. L. P., DE SOUZA, P. O., DAL PRÁ, M., FALCHETTI, M., DE ABREU, A. M., AZAMBUJA, J. H., BERTONI, A. P. S., PAZ, A. H. R., ARAÚJO, A. B., VISIOLI, F., FAZOLO, T., DA SILVA, G. G., WORM, P. V., WINK, M. R., ZANOTTO-FILHO, A. & BRAGANHOL, E. 2021. TLR4 expression and functionality are downregulated in glioblastoma cells and in tumor-associated macrophages: A new mechanism of immune evasion? *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1867, 166155.
- DAI, B., QI, N., LI, J. & ZHANG, G. 2018. Temozolomide combined with PD-1 Antibody therapy for mouse orthotopic glioma model. *Biochem Biophys Res Commun*, 501, 871-876.
- DE CHARENTE, M., MARABELLE, A. & HOUOT, R. 2016. Turning tumour cells into antigen presenting cells: The next step to improve cancer immunotherapy? *European Journal of Cancer*, 68, 134-147.

- DERER, A., SPILIAR, M., BAUMLER, M., HECHT, M., FIETKAU, R., FREY, B. & GAIPL, U. S. 2016. Chemoradiation Increases PD-L1 Expression in Certain Melanoma and Glioblastoma Cells. *Front Immunol*, 7, 610.
- DEVALARAJA, S., TO, T. K. J., FOLKERT, I. W., NATESAN, R., ALAM, M. Z., LI, M., TADA, Y., BUDAGYAN, K., DANG, M. T., ZHAI, L., LOBEL, G. P., CIOTTI, G. E., EISINGER-MATHASON, T. S. K., ASANGANI, I. A., WEBER, K., SIMON, M. C. & HALDAR, M. 2020. Tumor-Derived Retinoic Acid Regulates Intratumoral Monocyte Differentiation to Promote Immune Suppression. *Cell*, 180, 1098-1114.e16.
- DEWITT, J. C., MOCK, A. & LOUIS, D. N. 2017. The 2016 WHO classification of central nervous system tumors: what neurologists need to know. *Curr Opin Neurol*, 30, 643-649.
- DI CHIRO, G., DELAPAZ, R. L., BROOKS, R. A., SOKOLOFF, L., KORNBILTH, P. L., SMITH, B. H., PATRONAS, N. J., KUFTA, C. V., KESSLER, R. M., JOHNSTON, G. S., MANNING, R. G. & WOLF, A. P. 1982. Glucose utilization of cerebral gliomas measured by [¹⁸F] fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. *Neurology*, 32, 1323-9.
- DIAZ, R. J., ALI, S., QADIR, M. G., DE LA FUENTE, M. I., IVAN, M. E. & KOMOTAR, R. J. 2017. The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma. *J Neurooncol*, 133, 455-467.
- DIDENKO, V. V., NGO, H. N., MINCHEW, C. & BASKIN, D. S. 2002. Apoptosis of T lymphocytes invading glioblastomas multiforme: a possible tumor defense mechanism. *J Neurosurg*, 96, 580-4.
- DIX, A. R., BROOKS, W. H., ROSZMAN, T. L. & MORFORD, L. A. 1999. Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *Journal of Neuroimmunology*, 100, 216-232.
- DOMINGUES, P., GONZÁLEZ-TABLAS, M., OTERO, Á., PASCUAL, D., MIRANDA, D., RUIZ, L., SOUSA, P., CIUDAD, J., GONÇALVES, J. M., LOPES, M. C., ORFAO, A. & TABERNERO, M. D. 2016. Tumor infiltrating immune cells in gliomas and meningiomas. *Brain, Behavior, and Immunity*, 53, 1-15.
- DOVEDI, S. J., ADLARD, A. L., LIPOWSKA-BHALLA, G., MCKENNA, C., JONES, S., CHEADLE, E. J., STRATFORD, I. J., POON, E., MORROW, M., STEWART, R., JONES, H., WILKINSON, R. W., HONEYCHURCH, J. & ILLIDGE, T. M. 2014. Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent PD-L1 blockade. *Cancer Res*, 74, 5458-68.
- DU, X. J., LI, X. M., CAI, L. B., SUN, J. C., WANG, S. Y., WANG, X. C., PANG, X. L., DENG, M. L., CHEN, F. F., WANG, Z. Q., CHEN, F. R., ZHANG, H. H., WANG, H. Y., PIEDRA, P., CHEN, Z. P., LIN, J. & WU, S. X. 2019. Efficacy and safety of nimotuzumab in addition to radiotherapy and temozolomide for cerebral glioblastoma: a phase II multicenter clinical trial. *J Cancer*, 10, 3214-3223.
- DUDEK, A. M., MARTIN, S., GARG, A. D. & AGOSTINIS, P. 2013. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Front Immunol*, 4, 438.
- DUNBAR, E. M., EPPOLITO, A. & HENSON, J. W. 2015. Genetic counseling and tumor predisposition in neuro-oncology practice. *Neuro-Oncology Practice*, 3, 17-28.
- DUTOIT, V., MIGLIORINI, D., PATRIKIDOU, A., MAYER-MOKLER, A., HILF, N., WALKER, P. & DIETRICH, P. Y. 2017. 11PDIMA950 multi-peptide vaccine adjuvanted with poly-ICLC in combination with standard therapy in newly diagnosed HLA-A2 glioblastoma patients. *Annals of Oncology*, 28.
- ELGERT, K. D., ALLEVA, D. G. & MULLINS, D. W. 1998. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol*, 64, 275-90.
- ETZERODT, A. & MOESTRUP, S. K. 2013. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal*, 18, 2352-63.
- FARHOOD, B., NAJAFI, M. & MORTEZAEI, K. 2018. CD8 + cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of Cellular Physiology*.

- FECCI, P. E., MITCHELL, D. A., WHITESIDES, J. F., XIE, W., FRIEDMAN, A. H., ARCHER, G. E., HERNDON, J. E., 2ND, BIGNER, D. D., DRANOFF, G. & SAMPSON, J. H. 2006. Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res*, 66, 3294-302.
- FECCI, P. E., OCHIAI, H., MITCHELL, D. A., GROSSI, P. M., SWEENEY, A. E., ARCHER, G. E., CUMMINGS, T., ALLISON, J. P., BIGNER, D. D. & SAMPSON, J. H. 2007. Systemic CTLA-4 Blockade Ameliorates Glioma-Induced Changes to the CD4⁺ T Cell Compartment without Affecting Regulatory T-Cell Function. *Clinical Cancer Research*, 13, 2158.
- FECCI, P. E. & SAMPSON, J. H. 2019. The current state of immunotherapy for gliomas: an eye toward the future. 131, 657.
- FELSBERG, J., HENTSCHEL, B., KAULICH, K., GRAMATZKI, D., ZACHER, A., MALZKORN, B., KAMP, M., SABEL, M., SIMON, M., WESTPHAL, M., SCHACKERT, G., TONN, J. C., PIETSCH, T., VON DEIMLING, A., LOEFFLER, M., REIFENBERGER, G. & WELLER, M. 2017. Epidermal Growth Factor Receptor Variant III (EGFRvIII) Positivity in EGFR-Amplified Glioblastomas: Prognostic Role and Comparison between Primary and Recurrent Tumors. *Clinical Cancer Research*, 23, 6846-6855.
- FERLAY, J., STELIAROVA-FOUCHER, E., LORTET-TIEULENT, J., ROSSO, S., COEBERGH, J. W. W., COMBER, H., FORMAN, D. & BRAY, F. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49, 1374-1403.
- FIELD, K. M., SIMES, J., NOWAK, A. K., CHER, L., WHEELER, H., HOVEY, E. J., BROWN, C. S., BARNES, E. H., SAWKINS, K., LIVINGSTONE, A., FREILICH, R., PHAL, P. M., FITT, G. & ROSENTHAL, M. A. 2015. Randomized phase 2 study of carboplatin and bevacizumab in recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol*, 17, 1504-13.
- FILLEY, A. C., HENRIQUEZ, M. & DEY, M. 2017. Recurrent glioma clinical trial, CheckMate-143: the game is not over yet. *Oncotarget*, 8, 91779-91794.
- FIORENTINO, A., BALDUCCI, M., CHIESA, S. & FUSCO, V. 2012. Elderly people with glioblastoma. *The Lancet Oncology*, 13, e327-e328.
- FIORENTINO, D. F., ZLOTNIK, A., MOSMANN, T. R., HOWARD, M. & O'GARRA, A. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*, 147, 3815-22.
- FONG, B., JIN, R., WANG, X., SAFAEE, M., LISIERO, D. N., YANG, I., LI, G., LIAU, L. M. & PRINS, R. M. 2012. Monitoring of regulatory T cell frequencies and expression of CTLA-4 on T cells, before and after DC vaccination, can predict survival in GBM patients. *PLoS One*, 7, e32614.
- FRANCESCHI, E., LAMBERTI, G., VISANI, M., PACCAPELO, A., MURA, A., TALLINI, G., PESSION, A., DE BIASE, D., MINICHILLO, S., TOSONI, A., DI BATTISTA, M., CUBEDDU, A., BARTOLINI, S. & BRANDES, A. A. 2018. Temozolomide rechallenge in recurrent glioblastoma: when is it useful? *Future Oncol*, 14, 1063-1069.
- FRIEDMAN, H. S., PRADOS, M. D., WEN, P. Y., MIKKELSEN, T., SCHIFF, D., ABREY, L. E., YUNG, W. K., PALEOLOGOS, N., NICHOLAS, M. K., JENSEN, R., VREDENBURGH, J., HUANG, J., ZHENG, M. & CLOUGHESY, T. 2009a. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*, 27, 4733-40.
- FRIEDMAN, H. S., PRADOS, M. D., WEN, P. Y., MIKKELSEN, T., SCHIFF, D., ABREY, L. E., YUNG, W. K. A., PALEOLOGOS, N., NICHOLAS, M. K., JENSEN, R., VREDENBURGH, J., HUANG, J., ZHENG, M. & CLOUGHESY, T. 2009b. Bevacizumab Alone and in Combination With Irinotecan in Recurrent Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 4733-4740.
- FU, L.-Q., DU, W.-L., CAI, M.-H., YAO, J.-Y., ZHAO, Y.-Y. & MOU, X.-Z. 2020. The roles of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis and metastasis. *Cellular Immunology*, 353, 104119.

- FU, P., HE, Y. S., HUANG, Q., DING, T., CEN, Y. C., ZHAO, H. Y. & WEI, X. 2016. Bevacizumab treatment for newly diagnosed glioblastoma: Systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Mol Clin Oncol*, 4, 833-838.
- GABRUSIEWICZ, K., RODRIGUEZ, B., WEI, J., HASHIMOTO, Y., HEALY, L. M., MAITI, S. N., THOMAS, G., ZHOU, S., WANG, Q., ELAKKAD, A., LIEBELT, B. D., YAGHI, N. K., EZHILARASAN, R., HUANG, N., WEINBERG, J. S., PRABHU, S. S., RAO, G., SAWAYA, R., LANGFORD, L. A., BRUNER, J. M., FULLER, G. N., BAR-OR, A., LI, W., COLLEN, R. R., CURRAN, M. A., BHAT, K. P., ANTEL, J. P., COOPER, L. J., SULMAN, E. P. & HEIMBERGER, A. B. 2016. Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype. *JCI Insight*, 1.
- GALLDIKS, N., KRACHT, L. W., BURGHHAUS, L., THOMAS, A., JACOBS, A. H., HEISS, W. D. & HERHOLZ, K. 2006. Use of 11C-methionine PET to monitor the effects of temozolomide chemotherapy in malignant gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 33, 516-24.
- GALVÃO, R. P. & ZONG, H. 2013. Inflammation and Gliomagenesis: Bi-Directional Communication at Early and Late Stages of Tumor Progression. *Curr Pathobiol Rep*, 1, 19-28.
- GAO, Q., QIU, S. J., FAN, J., ZHOU, J., WANG, X. Y., XIAO, Y. S., XU, Y., LI, Y. W. & TANG, Z. Y. 2007. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol*, 25, 2586-93.
- GARBER, S. T., HASHIMOTO, Y., WEATHERS, S. P., XIU, J., GATALICA, Z., VERHAAK, R. G., ZHOU, S., FULLER, G. N., KHASRAW, M., DE GROOT, J., REDDY, S. K., SPETZLER, D. & HEIMBERGER, A. B. 2016. Immune checkpoint blockade as a potential therapeutic target: surveying CNS malignancies. *Neuro Oncol*, 18, 1357-66.
- GARRIS, C. S., ARLAUCKAS, S. P., KOHLER, R. H., TREFNY, M. P., GARREN, S., PIOT, C., ENGBLOM, C., PFIRSCHKE, C., SIWICKI, M., GUNGABEESON, J., FREEMAN, G. J., WARREN, S. E., ONG, S., BROWNING, E., TWITTY, C. G., PIERCE, R. H., LE, M. H., ALGAZI, A. P., DAUD, A. I., PAI, S. I., ZIPPELIUS, A., WEISSLEDER, R. & PITTET, M. J. 2018. Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN- γ and IL-12. *Immunity*, 49, 1148-1161.e7.
- GEDEON, P. C., SCHALLER, T. H., CHITNENI, S. K., CHOI, B. D., KUANG, C. T., SURYADEVARA, C. M., SNYDER, D. J., SCHMITTLING, R. J., SZAFRANSKI, S. E., CUI, X., HEALY, P. N., HERNDON, J. E., 2ND, MCLENDON, R. E., KEIR, S. T., ARCHER, G. E., REAP, E. A., SANCHEZ-PEREZ, L., BIGNER, D. D. & SAMPSON, J. H. 2018. A Rationally Designed Fully Human EGFRvIII:CD3-Targeted Bispecific Antibody Redirects Human T Cells to Treat Patient-derived Intracerebral Malignant Glioma. *Clin Cancer Res*, 24, 3611-3631.
- GIERYNG, A., PSZCZOLKOWSKA, D., WALENTYNOWICZ, K. A., RAJAN, W. D. & KAMINSKA, B. 2017. Immune microenvironment of gliomas. *Laboratory Investigation*, 97, 498-518.
- GLADSON, C. L., PRAYSON, R. A. & LIU, W. M. 2010. The pathobiology of glioma tumors. *Annu Rev Pathol*, 5, 33-50.
- GLANTZ, M., CHAMBERLAIN, M., LIU, Q., LITOFSKY, N. S. & RECHT, L. D. 2003. Temozolomide as an alternative to irradiation for elderly patients with newly diagnosed malignant gliomas. *Cancer*, 97, 2262-2266.
- GOLDMAN, D. A., HOVINGA, K., REINER, A. S., ESQUENAZI, Y., TABAR, V. & PANAGEAS, K. S. 2018. The relationship between repeat resection and overall survival in patients with glioblastoma: a time-dependent analysis. *J Neurosurg*, 129, 1231-1239.
- GONG, P., SHI, B., WANG, J., CAO, P., DIAO, Z., WANG, Y., HU, Y. & LI, S. 2018. Association between Th1/Th2 immune imbalance and obesity in women with or without polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*, 34, 709-714.
- GOODENBERGER, M. L. & JENKINS, R. B. 2012. Genetics of adult glioma. *Cancer Genetics*, 205, 613-621.

- GORDON, S. R., MAUTE, R. L., DULKEN, B. W., HUTTER, G., GEORGE, B. M., MCCRACKEN, M. N., GUPTA, R., TSAI, J. M., SINHA, R., COREY, D., RING, A. M., CONNOLLY, A. J. & WEISSMAN, I. L. 2017. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*, 545, 495-499.
- GOUGH, P. J. & GORDON, S. 2000. The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect*, 2, 305-11.
- GRAUER, O. M., WESSELING, P. & ADEMA, G. J. 2009. Immunotherapy of diffuse gliomas: biological background, current status and future developments. *Brain Pathol*, 19, 674-93.
- GUST, J., HAY, K. A., HANAFI, L. A., LI, D., MYERSON, D., GONZALEZ-CUYAR, L. F., YEUNG, C., LILES, W. C., WURFEL, M., LOPEZ, J. A., CHEN, J., CHUNG, D., HARJU-BAKER, S., ÖZPOLAT, T., FINK, K. R., RIDDELL, S. R., MALONEY, D. G. & TURTLE, C. J. 2017. Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discov*, 7, 1404-1419.
- HAN, J., HONG, Y. & LEE, Y. S. 2017. PD-L1 Expression and Combined Status of PD-L1/PD-1-Positive Tumor Infiltrating Mononuclear Cell Density Predict Prognosis in Glioblastoma Patients. *J Pathol Transl Med*, 51, 40-48.
- HAN, S., MA, E., WANG, X., YU, C., DONG, T., ZHAN, W., WEI, X., LIANG, G. & FENG, S. 2016. Rescuing defective tumor-infiltrating T-cell proliferation in glioblastoma patients. *Oncol Lett*, 12, 2924-2929.
- HAN, S., ZHANG, C., LI, Q., DONG, J., LIU, Y., HUANG, Y., JIANG, T. & WU, A. 2014. Tumour-infiltrating CD4(+) and CD8(+) lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br J Cancer*, 110, 2560-8.
- HANIF, F., MUZAFFAR, K., PERVEEN, K., MALHI, S. M. & SIMJEE SH, U. 2017. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 18, 3-9.
- HAO, N. B., LU, M. H., FAN, Y. H., CAO, Y. L., ZHANG, Z. R. & YANG, S. M. 2012. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol*, 2012, 948098.
- HARTY, J. T., TVINNEREIM, A. R. & WHITE, D. W. 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol*, 18, 275-308.
- HASSELBALCH, B., LASSEN, U., HANSEN, S., HOLMBERG, M., SORENSEN, M., KOSTELJANETZ, M., BROHOLM, H., STOCKHAUSEN, M. T. & POULSEN, H. S. 2010. Cetuximab, bevacizumab, and irinotecan for patients with primary glioblastoma and progression after radiation therapy and temozolomide: a phase II trial. *Neuro Oncol*, 12, 508-16.
- HEGI, M. E., DISERENS, A.-C., GORLIA, T., HAMOU, M.-F., DE TRIBOLET, N., WELLER, M., KROS, J. M., HAINFELLNER, J. A., MASON, W., MARIANI, L., BROMBERG, J. E. C., HAU, P., MIRIMANOFF, R. O., CAIRNCROSS, J. G., JANZER, R. C. & STUPP, R. 2005. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352, 997-1003.
- HEMMINKI, K., VAITTINEN, P. & KYRÖNEN, P. 1999. Modification of cancer risk in offspring by parental cancer (Sweden). *Cancer Causes & Control*, 10, 125-129.
- HEYNCKES, S., GAEBELEIN, A., HAAKER, G., GRAUVOGEL, J., FRANCO, P., MADER, I., CARRO, M. S., PRINZ, M., DELEV, D., SCHNELL, O. & HEILAND, D. 2017a. Expression differences of programmed death ligand 1 in de-novo and recurrent glioblastoma multiforme. *Oncotarget*, 8.
- HEYNCKES, S., GAEBELEIN, A., HAAKER, G., GRAUVOGEL, J., FRANCO, P., MADER, I., CARRO, M. S., PRINZ, M., DELEV, D., SCHNELL, O. & HEILAND, D. H. 2017b. Expression differences of programmed death ligand 1 in de-novo and recurrent glioblastoma multiforme. *Oncotarget*, 8, 74170-74177.

- HICKS, M. J., CHIUCHIOLO, M. J., BALLON, D., DYKE, J. P., ARONOWITZ, E., FUNATO, K., TABAR, V., HAVLICEK, D., FAN, F., SONDHI, D., KAMINSKY, S. M. & CRYSTAL, R. G. 2016. Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Gene Therapy for Glioblastoma. *PLoS One*, 11, e0162978.
- HO, W. Y., YEE, C. & GREENBERG, P. D. 2002. Adoptive therapy with CD8(+) T cells: it may get by with a little help from its friends. *J Clin Invest*, 110, 1415-7.
- HUANG, J., LIU, F., LIU, Z., TANG, H., WU, H., GONG, Q. & CHEN, J. 2017. Immune Checkpoint in Glioblastoma: Promising and Challenging. *Front Pharmacol*, 8, 242.
- HUDSON, A. L., PARKER, N. R., KHONG, P., PARKINSON, J. F., DWIGHT, T., IKIN, R. J., ZHU, Y., CHEN, J., WHEELER, H. R. & HOWELL, V. M. 2018. Glioblastoma Recurrence Correlates With Increased APE1 and Polarization Toward an Immuno-Suppressive Microenvironment. *Frontiers in Oncology*, 8.
- HUETTNER, C., CZUB, S., KERKAU, S., ROGGENDORF, W. & TONN, J. C. 1997. Interleukin 10 is expressed in human gliomas in vivo and increases glioma cell proliferation and motility in vitro. *Anticancer Res*, 17, 3217-24.
- HUETTNER, C., PAULUS, W. & ROGGENDORF, W. 1995. Messenger RNA expression of the immunosuppressive cytokine IL-10 in human gliomas. *Am J Pathol*, 146, 317-22.
- INDA, M. M., BONAVIDA, R. & SEOANE, J. 2014. Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature. *Cancers (Basel)*, 6, 226-39.
- ISHIMARU, H., MORIKAWA, M., IWANAGA, S., KAMINOGO, M., OCHI, M. & HAYASHI, K. 2001. Differentiation between high-grade glioma and metastatic brain tumor using single-voxel proton MR spectroscopy. *Eur Radiol*, 11, 1784-91.
- JACOBS, A. H., KRACHT, L. W., GOSSMANN, A., RÜGER, M. A., THOMAS, A. V., THIEL, A. & HERHOLZ, K. 2005. Imaging in neurooncology. *NeuroRx*, 2, 333-47.
- JAIN, K. K. 2018. A Critical Overview of Targeted Therapies for Glioblastoma. *Front Oncol*, 8, 419.
- JENSEN, R. L. 2009. Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *J Neurooncol*, 92, 317-35.
- JIANG, H., HARRIS, M. B. & ROTHMAN, P. 2000. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J Allergy Clin Immunol*, 105, 1063-70.
- JIANG, T., SHI, T., ZHANG, H., HU, J., SONG, Y., WEI, J., REN, S. & ZHOU, C. 2019. Tumor neoantigens: from basic research to clinical applications. *J Hematol Oncol*, 12, 93.
- JOHANNESSEN, L. E., BRANDAL, P., MYKLEBUST, T., HEIM, S., MICCI, F. & PANAGOPOULOS, I. 2018. MGMT Gene Promoter Methylation Status - Assessment of Two Pyrosequencing Kits and Three Methylation-specific PCR Methods for their Predictive Capacity in Glioblastomas. *Cancer Genomics Proteomics*, 15, 437-446.
- KALLIONIEMI, O. P., WAGNER, U., KONONEN, J. & SAUTER, G. 2001. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*, 10, 657-62.
- KARACHI, A., YANG, C., DASTMALCHI, F., SAYOUR, E. J., HUANG, J., AZARI, H., LONG, Y., FLORES, C., MITCHELL, D. A. & RAHMAN, M. 2019. Modulation of temozolomide dose differentially affects T-cell response to immune checkpoint inhibition. *Neuro Oncol*, 21, 730-741.
- KÄRRE, K. 2002. NK Cells, MHC Class I Molecules and the Missing Self. *Scandinavian Journal of Immunology*, 55, 221-228.
- KAWAMURA, K., KOMOHARA, Y., TAKAISHI, K., KATABUCHI, H. & TAKEYA, M. 2009. Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathology International*, 59, 300-305.

- KELLEY, J. L., OZMENT, T. R., LI, C., SCHWEITZER, J. B. & WILLIAMS, D. L. 2014. Scavenger receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease. *Crit Rev Immunol*, 34, 241-61.
- KELLY, W. J., GILES, A. J. & GILBERT, M. 2020. T lymphocyte-targeted immune checkpoint modulation in glioma. *J Immunother Cancer*, 8.
- KENNEDY, R. H. & SILVER, R. 2016. Neuroimmune Signaling: Cytokines and the CNS. *In*: PFAFF, D. W. & VOLKOW, N. D. (eds.) *Neuroscience in the 21st Century*. New York, NY: Springer New York.
- KIM, S. H., YOO, H., CHANG, J. H., KIM, C. Y., CHUNG, D. S., KIM, S. H., PARK, S. H., LEE, Y. S. & YANG, S. H. 2018. Procarbazine and CCNU Chemotherapy for Recurrent Glioblastoma with MGMT Promoter Methylation. *J Korean Med Sci*, 33, e167.
- KLEIHUES, P. & OHGAKI, H. 1999. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol*, 1, 44-51.
- KLEIN, S. L. & FLANAGAN, K. L. 2016. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*, 16, 626-38.
- KMIECIK, J., POLI, A., BRONS, N. H., WAHA, A., EIDE, G. E., ENGER, P., ZIMMER, J. & CHEKENYA, M. 2013. Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *J Neuroimmunol*, 264, 71-83.
- KNÜPFER, M. M., KNÜPFER, H., JENDROSSEK, V., VAN GOOL, S., WOLFF, J. E. & KELLER, E. 2001. Interferon-gamma inhibits growth and migration of A172 human glioblastoma cells. *Anticancer Res*, 21, 3989-94.
- KOMOHARA, Y., OHNISHI, K., KURATSU, J. & TAKEYA, M. 2008. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *The Journal of Pathology*, 216, 15-24.
- KONG, Z., WANG, Y. & MA, W. 2018. Vaccination in the immunotherapy of glioblastoma. *Hum Vaccin Immunother*, 14, 255-268.
- KREISL, T. N., KIM, L., MOORE, K., DUIC, P., ROYCE, C., STROUD, I., GARREN, N., MACKEY, M., BUTMAN, J. A., CAMPHAUSEN, K., PARK, J., ALBERT, P. S. & FINE, H. A. 2009. Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*, 27, 740-5.
- KRISTIANSEN, M., GRAVERSEN, J. H., JACOBSEN, C., SONNE, O., HOFFMAN, H.-J., LAW, S. K. A. & MOESTRUP, S. K. 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 409, 198-201.
- KROHN, K. A. 2001. Evaluation of alternative approaches for imaging cellular growth. *Q J Nucl Med*, 45, 174-8.
- KRUMMEL, M. F. & ALLISON, J. P. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*, 182, 459-65.
- KUBOTA, K., MORIYAMA, M., FURUKAWA, S., RAFIUL, H. A. S. M., MARUSE, Y., JINNO, T., TANAKA, A., OHTA, M., ISHIGURO, N., YAMAUCHI, M., SAKAMOTO, M., MAEHARA, T., HAYASHIDA, J.-N., KAWANO, S., KIYOSHIMA, T. & NAKAMURA, S. 2017. CD163+CD204+ tumor-associated macrophages contribute to T cell regulation via interleukin-10 and PD-L1 production in oral squamous cell carcinoma. *Scientific Reports*, 7, 1755.
- KUHL, S., RÖHN, G., GOLDBRUNNER, R. & TIMMER, M. 2018. P04.76 The expression of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4) is upregulated in high grade gliomas. *Neuro-Oncology*, 20, iii297-iii298.
- KUMAR, R., KAMDAR, D., MADDEN, L., HILLS, C., CROOKS, D., O'BRIEN, D. & GREENMAN, J. 2006. Th1/Th2 cytokine imbalance in meningioma, anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme patients. *Oncol Rep*, 15, 1513-6.

- KUNWAR, S., CHANG, S., WESTPHAL, M., VOGELBAUM, M., SAMPSON, J., BARNETT, G., SHAFFREY, M., RAM, Z., PIEPMEIER, J., PRADOS, M., CROTEAU, D., PEDAIN, C., LELAND, P., HUSAIN, S. R., JOSHI, B. H., PURI, R. K. & GROUP, P. S. 2010. Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology*, 12, 871-881.
- KURAHARA, H., SHINCHI, H., MATAKI, Y., MAEMURA, K., NOMA, H., KUBO, F., SAKODA, M., UENO, S., NATSUGOE, S. & TAKAO, S. 2011. Significance of M2-Polarized Tumor-Associated Macrophage in Pancreatic Cancer. *Journal of Surgical Research*, 167, e211-e219.
- KURDI, M., ALGHAMDI, B., BUTT, N. S. & BAEESA, S. 2021. The relationship between CD204 M2-polarized tumour-associated macrophages (TAMs), tumour-infiltrating lymphocytes (TILs), and microglial activation in glioblastoma microenvironment: a novel immune checkpoint receptor target. *Discover Oncology*, 12, 28.
- LAMBORN, K. R., CHANG, S. M. & PRADOS, M. D. 2004. Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. *Neuro Oncol*, 6, 227-35.
- LANFERMANN, H., HERMINGHAUS, S., PILATUS, U., HATTINGEN, E. & ZANELLA, F. E. 2004. Bedeutung der 1H-MR-Spektroskopie bei der Differenzialdiagnose und Graduierung intrakranieller Tumoren. *Dtsch Arztebl International*, 101, 649-.
- LANUZA, P. M., PESINI, C., ARIAS, M. A., CALVO, C., RAMIREZ-LABRADA, A. & PARDO, J. 2019. Recalling the Biological Significance of Immune Checkpoints on NK Cells: A Chance to Overcome LAG3, PD1, and CTLA4 Inhibitory Pathways by Adoptive NK Cell Transfer? *Front Immunol*, 10, 3010.
- LARJAVAARA, S., MÄNTYLÄ, R., SALMINEN, T., HAAPASALO, H., RAITANEN, J., JÄÄSKELÄINEN, J. & AUVINEN, A. 2007. Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro Oncol*, 9, 319-25.
- LARKIN, J., CHIARION-SILENI, V., GONZALEZ, R., GROB, J. J., COWEY, C. L., LAO, C. D., SCHADENDORF, D., DUMMER, R., SMYLLIE, M., RUTKOWSKI, P., FERRUCCI, P. F., HILL, A., WAGSTAFF, J., CARLINO, M. S., HAANEN, J. B., MAIO, M., MARQUEZ-RODAS, I., MCARTHUR, G. A., ASCIERTO, P. A., LONG, G. V., CALLAHAN, M. K., POSTOW, M. A., GROSSMANN, K., SZNOL, M., DRENO, B., BASTHOLT, L., YANG, A., ROLLIN, L. M., HORAK, C., HODI, F. S. & WOLCHOK, J. D. 2015. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*, 373, 23-34.
- LAUDATI, E., CURRÒ, D., NAVARRA, P. & LISI, L. 2017. Blockade of CCR5 receptor prevents M2 microglia phenotype in a microglia-glioma paradigm. *Neurochemistry International*, 108, 100-108.
- LE GALLO, M., POISSONNIER, A., BLANCO, P. & LEGEMBRE, P. 2017. CD95/Fas, Non-Apoptotic Signaling Pathways, and Kinases. *Frontiers in Immunology*, 8.
- LEBLOND, M. M., PÉRÈS, E. A., HELAINE, C., GÉRAULT, A. N., MOULIN, D., ANFRAY, C., DIVOUX, D., PETIT, E., BERNAUDIN, M. & VALABLE, S. 2017. M2 macrophages are more resistant than M1 macrophages following radiation therapy in the context of glioblastoma. *Oncotarget*, 8, 72597-72612.
- LEE, K. S., LEE, K., YUN, S., MOON, S., PARK, Y., HAN, J. H., KIM, C. Y., LEE, H. S. & CHOE, G. 2018. Prognostic relevance of programmed cell death ligand 1 expression in glioblastoma. *J Neurooncol*, 136, 453-461.
- LEECE, R., XU, J., OSTROM, Q. T., CHEN, Y., KRUCHKO, C. & BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. 2017. Global incidence of malignant brain and other central nervous system tumors by histology, 2003–2007. *Neuro-Oncology*, 19, 1553-1564.
- LEONARD, J. P., SHERMAN, M. L., FISHER, G. L., BUCHANAN, L. J., LARSEN, G., ATKINS, M. B., SOSMAN, J. A., DUTCHER, J. P., VOGELZANG, N. J. & RYAN, J. L. 1997. Effects of single-

- dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood*, 90, 2541-8.
- LEWIS, C. E. & POLLARD, J. W. 2006. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Research*, 66, 605-612.
- LI, F., LV, B., LIU, Y., HUA, T., HAN, J., SUN, C., XU, L., ZHANG, Z., FENG, Z., CAI, Y., ZOU, Y., KE, Y. & JIANG, X. 2018a. Blocking the CD47-SIRPalpha axis by delivery of anti-CD47 antibody induces antitumor effects in glioma and glioma stem cells. *Oncoimmunology*, 7, e1391973.
- LI, L., QUANG, T. S., GRACEY, E. J., KIM, J. H., EMRICH, J. G., YAEGER, T. E., JENRETTE, J. M., COHEN, S. C., BLACK, P. & BRADY, L. W. 2010. A Phase II study of anti-epidermal growth factor receptor radioimmunotherapy in the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*, 113, 192-8.
- LI, Y. M. & HALL, W. A. 2010. Targeted toxins in brain tumor therapy. *Toxins (Basel)*, 2, 2645-62.
- LI, Z., HUANG, Y., ZHAO, R., CUI, Y., ZHOU, Y. & WU, X. 2018b. Chemotherapy plus Panitumumab Versus Chemotherapy plus Bevacizumab in Metastatic Colorectal Cancer: A Meta-analysis. *Scientific Reports*, 8, 510.
- LIAU, L. M., ASHKAN, K., TRAN, D. D., CAMPBELL, J. L., TRUSHEIM, J. E., COBBS, C. S., HETH, J. A., SALACZ, M., TAYLOR, S., D'ANDRE, S. D., IWAMOTO, F. M., DROPCHO, E. J., MOSHEL, Y. A., WALTER, K. A., PILLAINAYAGAM, C. P., AIKEN, R., CHAUDHARY, R., GOLDLUST, S. A., BOTA, D. A., DUIC, P., GREWAL, J., ELINZANO, H., TOMS, S. A., LILLEHEI, K. O., MIKKELSEN, T., WALBERT, T., ABRAM, S. R., BRENNER, A. J., BREM, S., EWEND, M. G., KHAGI, S., PORTNOW, J., KIM, L. J., LOUDON, W. G., THOMPSON, R. C., AVIGAN, D. E., FINK, K. L., GEOFFROY, F. J., LINDHORST, S., LUTZKY, J., SLOAN, A. E., SCHACKERT, G., KREX, D., MEISEL, H.-J., WU, J., DAVIS, R. P., DUMA, C., ETAME, A. B., MATHIEU, D., KESARI, S., PICCIONI, D., WESTPHAL, M., BASKIN, D. S., NEW, P. Z., LACROIX, M., MAY, S.-A., PLUARD, T. J., TSE, V., GREEN, R. M., VILLANO, J. L., PEARLMAN, M., PETRECCA, K., SCHULDER, M., TAYLOR, L. P., MAIDA, A. E., PRINS, R. M., CLOUGHESY, T. F., MULHOLLAND, P. & BOSCH, M. L. 2018. First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Translational Medicine*, 16, 142.
- LIN, N., YAN, W., GAO, K., WANG, Y., ZHANG, J. & YOU, Y. 2014. Prevalence and clinicopathologic characteristics of the molecular subtypes in malignant glioma: a multi-institutional analysis of 941 cases. *PLoS One*, 9, e94871.
- LINOS, E., RAINE, T., ALONSO, A. & MICHAUD, D. 2007. Atopy and Risk of Brain Tumors: A Meta-analysis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 99, 1544-1550.
- LITAK, J., MAZUREK, M., GROCHOWSKI, C., KAMIENIAK, P. & ROLINSKI, J. 2019. PD-L1/PD-1 Axis in Glioblastoma Multiforme. *Int J Mol Sci*, 20.
- LIU, F., HUANG, J., LIU, X., CHENG, Q., LUO, C. & LIU, Z. 2020. CTLA-4 correlates with immune and clinical characteristics of glioma. *Cancer Cell Int*, 20, 7.
- LIU, S., ZHANG, C., MAIMELA, N. R., YANG, L., ZHANG, Z., PING, Y., HUANG, L. & ZHANG, Y. 2019. Molecular and clinical characterization of CD163 expression via large-scale analysis in glioma. *Oncoimmunology*, 8, 1601478.
- LIU, Y., CARLSSON, R., AMBJØRN, M., HASAN, M., BADN, W., DARABI, A., SIESJÖ, P. & ISSAZADEH-NAVIKAS, S. 2013. PD-L1 expression by neurons nearby tumors indicates better prognosis in glioblastoma patients. *J Neurosci*, 33, 14231-45.
- LOEFFLER, S., FAYARD, B., WEIS, J. & WEISSENBERGER, J. 2005. Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int J Cancer*, 115, 202-13.

- LOHR, J., RATLIFF, T., 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. 2011. Effector T-cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumor-derived TGF-beta. *Clin Cancer Res*, 17, 4296-308.
- LOUIS, D. N., PERRY, A., REIFENBERGER, G., VON DEIMLING, A., FIGARELLA-BRANGER, D., CAVENEE, W. K., OHGAKI, H., WIESTLER, O. D., KLEIHUES, P. & ELLISON, D. W. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131, 803-820.
- LOYA, J., ZHANG, C., COX, E., ACHROL, A. S. & KESARI, S. 2019. Biological intratumoral therapy for the high-grade glioma part II: vector- and cell-based therapies and radioimmunotherapy. *CNS Oncology*, 8, CNS40.
- LU, D., NI, Z., LIU, X., FENG, S., DONG, X., SHI, X., ZHAI, J., MAI, S., JIANG, J., WANG, Z., WU, H. & CAI, K. 2019. Beyond T Cells: Understanding the Role of PD-1/PD-L1 in Tumor-Associated Macrophages. *Journal of Immunology Research*, 2019, 1919082.
- LU, V. M., JUE, T. R., MCDONALD, K. L. & ROVIN, R. A. 2018. The Survival Effect of Repeat Surgery at Glioblastoma Recurrence and its Trend: A Systematic Review and Meta-Analysis. *World Neurosurg*, 115, 453-459.e3.
- MADKOURI, R., KADERBHAI, C. G., BERTAUT, A., TRUNTZER, C., VINCENT, J., AUBRIOT-LORTON, M. H., FARAH, W., LIMAGNE, E., LADOIRE, S., BOIDOT, R., DERANGÈRE, V. & GHIRINGHELLI, F. 2017. Immune classifications with cytotoxic CD8(+) and Th17 infiltrates are predictors of clinical prognosis in glioblastoma. *Oncoimmunology*, 6, e1321186.
- MAJETY, M., RUNZA, V., LEHMANN, C., HOVES, S. & RIES, C. H. 2018. A drug development perspective on targeting tumor-associated myeloid cells. *Febs j*, 285, 763-776.
- MALLICK, S., BENSON, R., HAKIM, A. & RATH, G. K. 2016. Management of glioblastoma after recurrence: A changing paradigm. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 28, 199-210.
- MANTOVANI, A. & SICA, A. 2010. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*, 22, 231-7.
- MARTIKAINEN, M. & ESSAND, M. 2019. Virus-Based Immunotherapy of Glioblastoma. *Cancers (Basel)*, 11.
- MARTINEZ-LAGE, M., LYNCH, T. M., BI, Y., COCITO, C., WAY, G. P., PAL, S., HALLER, J., YAN, R. E., ZIOBER, A., NGUYEN, A., KANDPAL, M., O'ROURKE, D. M., GREENFIELD, J. P., GREENE, C. S., DAVULURI, R. V. & DAHMANE, N. 2019. Immune landscapes associated with different glioblastoma molecular subtypes. *Acta Neuropathol Commun*, 7, 203.
- MAYER, R. & SMINIA, P. 2008. Reirradiation tolerance of the human brain. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 70, 1350-60.
- MCGRANAHAN, T., LI, G. & NAGPAL, S. 2017. History and current state of immunotherapy in glioma and brain metastasis. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 9, 347-368.
- MEDIKONDA, R., DUNN, G., RAHMAN, M., FECCI, P. & LIM, M. 2020. A review of glioblastoma immunotherapy. *J Neurooncol*.
- MIRGHORBANI, M., VAN GOOL, S. & REZAEI, N. 2013. Myeloid-derived suppressor cells in glioma. *Expert Rev Neurother*, 13, 1395-406.
- MISHRA, S., PATNAIK, A., MAJUMDAR, S. & PARIDA, D. 2018. Glioblastoma multiforme in a pediatric child. *Oncology Journal of India*, 2, 38-40.
- MIYAZAKI, T., ISHIKAWA, E., MATSUDA, M., AKUTSU, H., OSUKA, S., SAKAMOTO, N., TAKANO, S., YAMAMOTO, T., TSUBOI, K. & MATSUMURA, A. 2017. Assessment of PD-1 positive cells on initial and secondary resected tumor specimens of newly diagnosed glioblastoma and its implications on patient outcome. *J Neurooncol*, 133, 277-285.

- MOHME, M. & NEIDERT, M. C. 2020. Tumor-Specific T Cell Activation in Malignant Brain Tumors. *Frontiers in Immunology*, 11.
- MOORE, K. W., MALEFYT, R. D. W., COFFMAN, R. L. & O'GARRA, A. 2001. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annual Review of Immunology*, 19, 683-765.
- MUKAKA, M. M. 2012. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J*, 24, 69-71.
- MURDOCH, C., GIANNOUDIS, A. & LEWIS, C. E. 2004. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*, 104, 2224-2234.
- NAKADA, M., OKADA, Y. & YAMASHITA, J. 2003. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Front Biosci*, 8, e261-9.
- NDUOM, E. K., WEI, J., YAGHI, N. K., HUANG, N., KONG, L. Y., GABRUSIEWICZ, K., LING, X., ZHOU, S., IVAN, C., CHEN, J. Q., BURKS, J. K., FULLER, G. N., CALIN, G. A., CONRAD, C. A., CREASY, C., RITTHIPICHAI, K., RADVANYI, L. & HEIMBERGER, A. B. 2016. PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. *Neuro Oncol*, 18, 195-205.
- NEJO, T., YAMAMICHI, A., ALMEIDA, N. D., GORETSKY, Y. E. & OKADA, H. 2020. Tumor antigens in glioma. *Seminars in Immunology*, 47, 101385.
- NEWMAN, J. P., WANG, G. Y., ARIMA, K., GUAN, S. P., WATERS, M. R., CAVENEE, W. K., PAN, E., ALIWARGA, E., CHONG, S. T., KOK, C. Y. L., ENDAYA, B. B., HABIB, A. A., HORIBE, T., NG, W. H., HO, I. A. W., HUI, K. M., KORDULA, T. & LAM, P. Y. P. 2017. Interleukin-13 receptor alpha 2 cooperates with EGFRvIII signaling to promote glioblastoma multiforme. *Nat Commun*, 8, 1913.
- NEYNS, B., SADONES, J., JOOSENS, E., BOUTTENS, F., VERBEKE, L., BAURAIN, J. F., D'HONDT, L., STRAUVEN, T., CHASKIS, C., IN'T VELD, P., MICHOTTE, A. & DE GREVE, J. 2009. Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. *Ann Oncol*, 20, 1596-603.
- NGUYEN, K. G., VRABEL, M. R., MANTOOTH, S. M., HOPKINS, J. J., WAGNER, E. S., GABALDON, T. A. & ZAHAROFF, D. A. 2020. Localized Interleukin-12 for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 11, 575597.
- NISHIMURA, T., NAKUI, M., SATO, M., IWAKABE, K., KITAMURA, H., SEKIMOTO, M., OHTA, A., KODA, T. & NISHIMURA, S. 2000. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 46, S52-S61.
- NOWICKI, T. S., AKIYAMA, R., HUANG, R. R., SHINTAKU, I. P., WANG, X., TUMEH, P. C., SINGH, A., CHMIELOWSKI, B., DENNY, C., FEDERMAN, N. & RIBAS, A. 2017. Infiltration of CD8 T Cells and Expression of PD-1 and PD-L1 in Synovial Sarcoma. *Cancer Immunol Res*, 5, 118-126.
- NYGAARD, R., GARWICZ, S., HALDORSEN, T., HERTZ, H., JONMUNDSSON, G. K., LANNING, M., MOE, P. J., ONCOLOGY, F. T. N. S. O. P. & HEMATOLOGY 1991. Second Malignant Neoplasms in Patients Treated for Childhood Leukemia: A Population-based Cohort Study from the Nordic Countries. *Acta Paediatrica*, 80, 1220-1228.
- OHGAKI, H. & KLEIHUES, P. 2005. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*, 109, 93-108.
- OHGAKI, H. & KLEIHUES, P. 2013. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19, 764-772.
- OKADA, H. & KUWASHIMA, N. 2002. Gene therapy and biologic therapy with interleukin-4. *Curr Gene Ther*, 2, 437-50.
- OMURO, A. & DEANGELIS, L. M. 2013. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *Jama*, 310, 1842-50.
- OMURO, A., VLAHOVIC, G., LIM, M., SAHEBJAM, S., BAEHRING, J., CLOUGHESY, T., VOLOSCHIN, A., RAMKISSOON, S. H., LIGON, K. L., LATEK, R., ZWIRTES, R., STRAUSS, L., PALIWAL, P.,

- HARBISON, C. T., REARDON, D. A. & SAMPSON, J. H. 2018. Nivolumab with or without ipilimumab in patients with recurrent glioblastoma: results from exploratory phase I cohorts of CheckMate 143. *Neuro Oncol*, 20, 674-686.
- ORREGO, E., CASTANEDA, C. A., CASTILLO, M., BERNABE, L. A., CASAVILCA, S., CHAKRAVARTI, A., MENG, W., GARCIA-CORROCHANO, P., VILLA-ROBLES, M. R., ZEVALLOS, R., MEJIA, O., DEZA, P., BELMAR-LOPEZ, C. & OJEDA, L. 2018. Distribution of tumor-infiltrating immune cells in glioblastoma. *CNS Oncol*, 7, Cns21.
- ORTEGA, A., SARMIENTO, J. M., LY, D., NUNO, M., MUKHERJEE, D., BLACK, K. L. & PATIL, C. G. 2016. Multiple resections and survival of recurrent glioblastoma patients in the temozolomide era. *J Clin Neurosci*, 24, 105-11.
- OSTRAND-ROSENBERG, S., HORN, L. A. & HAILE, S. T. 2014. The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity. *J Immunol*, 193, 3835-41.
- OSTROM, Q. T., BAUCHET, L., DAVIS, F. G., DELTOUR, I., FISHER, J. L., LANGER, C. E., PEKMEZCI, M., SCHWARTZBAUM, J. A., TURNER, M. C., WALSH, K. M., WRENSCH, M. R. & BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. 2014. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro-Oncology*, 16, 896-913.
- OSTROM, Q. T., GITTLEMAN, H., FARAH, P., ONDRACEK, A., CHEN, Y., WOLINSKY, Y., STROUP, N. E., KRUCHKO, C. & BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. 2013. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncology*, 15, ii1-ii56.
- OSUKA, S. & VAN MEIR, E. G. 2017. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J Clin Invest*, 127, 415-426.
- OZAWA, M., BRENNAN, P. M., ZIENIUS, K., KURIAN, K. M., HOLLINGWORTH, W., WELLER, D., HAMILTON, W., GRANT, R. & BEN-SHLOMO, Y. 2018. Symptoms in primary care with time to diagnosis of brain tumours. *Fam Pract*, 35, 551-558.
- PAN, Y., YU, Y., WANG, X. & ZHANG, T. 2020. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front Immunol*, 11, 583084.
- PARDOLL, D. M. 2012a. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12, 252-64.
- PARDOLL, D. M. 2012b. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 12, 252-264.
- PARK, C. K., KIM, J. H., NAM, D. H., KIM, C. Y., CHUNG, S. B., KIM, Y. H., SEOL, H. J., KIM, T. M., CHOI, S. H., LEE, S. H., HEO, D. S., KIM, I. H., KIM, D. G. & JUNG, H. W. 2013. A practical scoring system to determine whether to proceed with surgical resection in recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol*, 15, 1096-101.
- PARK, J., KIM, C. G., SHIM, J. K., KIM, J. H., LEE, H., LEE, J. E., KIM, M. H., HAAM, K., JUNG, I., PARK, S. H., CHANG, J. H., SHIN, E. C. & KANG, S. G. 2019. Effect of combined anti-PD-1 and temozolomide therapy in glioblastoma. *Oncoimmunology*, 8, e1525243.
- PARNEY, I. F., WALDRON, J. S. & PARSA, A. T. 2009. Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma-associated macrophages. Laboratory investigation. *J Neurosurg*, 110, 572-82.
- PARRY, R. V., CHEMNITZ, J. M., FRAUWIRTH, K. A., LANFRANCO, A. R., BRAUNSTEIN, I., KOBAYASHI, S. V., LINSLEY, P. S., THOMPSON, C. B. & RILEY, J. L. 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*, 25, 9543-53.
- PATEL, M., SIDDIQUI, F., JIN, J. Y., MIKKELSEN, T., ROSENBLUM, M., MOVSAS, B. & RYU, S. 2009. Salvage reirradiation for recurrent glioblastoma with radiosurgery: radiographic response and improved survival. *J Neurooncol*, 92, 185-91.
- PENNOCK, N. D., WHITE, J. T., CROSS, E. W., CHENEY, E. E., TAMBURINI, B. A. & KEDL, R. M. 2013. T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ*, 37, 273-83.

- PRASAD, G. & HAAS-KOGAN, D. A. 2009. Radiation-induced gliomas. *Expert Rev Neurother*, 9, 1511-7.
- PRATT, D., DOMINAH, G., LOBEL, G., OBUNGU, A., LYNES, J., SANCHEZ, V., ADAMSTEIN, N., WANG, X., EDWARDS, N. A., WU, T., MARIC, D., GILES, A. J., GILBERT, M. R., QUEZADO, M. & NDUOM, E. K. 2019. Programmed Death Ligand 1 Is a Negative Prognostic Marker in Recurrent Isocitrate Dehydrogenase-Wildtype Glioblastoma. *Neurosurgery*, 85, 280-289.
- PRESTON, D. L., RON, E., YONEHARA, S., KOBUE, T., FUJII, H., KISHIKAWA, M., TOKUNAGA, M., TOKUOKA, S. & MABUCHI, K. 2002. Tumors of the Nervous System and Pituitary Gland Associated With Atomic Bomb Radiation Exposure. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 94, 1555-1563.
- PROSNIAK, M., HARSHYNE, L. A., ANDREWS, D. W., KENYON, L. C., BEDELBAEVA, K., APANASOVICH, T. V., HEBER-KATZ, E., CURTIS, M. T., COTZIA, P. & HOOPER, D. C. 2013. Glioma grade is associated with the accumulation and activity of cells bearing M2 monocyte markers. *Clin Cancer Res*, 19, 3776-86.
- PROSS, S. 2007. T-Cell Activation. In: ENNA, S. J. & BYLUND, D. B. (eds.) *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. New York: Elsevier.
- PYONTECK, S. M., AKKARI, L., SCHUHMACHER, A. J., BOWMAN, R. L., SEVENICH, L., QUAIL, D. F., OLSON, O. C., QUICK, M. L., HUSE, J. T., TEJEIRO, V., SETTY, M., LESLIE, C. S., OEI, Y., PEDRAZA, A., ZHANG, J., BRENNAN, C. W., SUTTON, J. C., HOLLAND, E. C., DANIEL, D. & JOYCE, J. A. 2013. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med*, 19, 1264-72.
- QUAIL, D. F., BOWMAN, R. L., AKKARI, L., QUICK, M. L., SCHUHMACHER, A. J., HUSE, J. T., HOLLAND, E. C., SUTTON, J. C. & JOYCE, J. A. 2016. The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas. *Science*, 352, aad3018.
- QUILLIEN, V., CARPENTIER, A. F., GEY, A., AVRIL, T., TARTOUR, E., SEJALON, F., CAMPILLO-GIMENEZ, B. & VAULEON, E. 2019. Absolute numbers of regulatory T cells and neutrophils in corticosteroid-free patients are predictive for response to bevacizumab in recurrent glioblastoma patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 68, 871-882.
- RAHAMAN, S. O., HARBOR, P. C., CHERNOVA, O., BARNETT, G. H., VOGELBAUM, M. A. & HAQUE, S. J. 2002. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene*, 21, 8404-13.
- RAHMAN, M., KRESAK, J., YANG, C., HUANG, J., HISER, W., KUBILIS, P. & MITCHELL, D. 2018. Analysis of immunobiologic markers in primary and recurrent glioblastoma. *J Neurooncol*, 137, 249-257.
- RAYCHAUDHURI, B. & VOGELBAUM, M. A. 2011. IL-8 is a mediator of NF- κ B induced invasion by gliomas. *J Neurooncol*, 101, 227-35.
- READING, J. L., GÁLVEZ-CANCINO, F., SWANTON, C., LLADSER, A., PEGGS, K. S. & QUEZADA, S. A. 2018. The function and dysfunction of memory CD8+ T cells in tumor immunity. *Immunological Reviews*, 283, 194-212.
- REARDON, D. A., OMURO, A., BRANDES, A. A., RIEGER, J., WICK, A., SEPULVEDA, J., PHUPHANICH, S., DE SOUZA, P., AHLUWALIA, M. S., LIM, M., VLAHOVIC, G. & SAMPSON, J. 2017. OS10.3 Randomized Phase 3 Study Evaluating the Efficacy and Safety of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: CheckMate 143. *Neuro-Oncology*, 19, iii21-iii21.
- RIEMENSCHNEIDER, M. J., JEUKEN, J. W. M., WESSELING, P. & REIFENBERGER, G. 2010. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathologica*, 120, 567-584.
- RINGEL, F., PAPE, H., SABEL, M., KREX, D., BOCK, H. C., MISCH, M., WEYERBROCK, A., WESTERMAIER, T., SENFT, C., SCHUCHT, P., MEYER, B. & SIMON, M. 2016. Clinical

- benefit from resection of recurrent glioblastomas: results of a multicenter study including 503 patients with recurrent glioblastomas undergoing surgical resection. *Neuro Oncol*, 18, 96-104.
- ROA, W., BRASHER, P. M. A., BAUMAN, G., ANTHES, M., BRUERA, E., CHAN, A., FISHER, B., FULTON, D., GULAVITA, S., HAO, C., HUSAIN, S., MURTHA, A., PETRUK, K., STEWART, D., TAI, P., URTASUN, R., CAIRNCROSS, J. G. & FORSYTH, P. 2004. Abbreviated Course of Radiation Therapy in Older Patients With Glioblastoma Multiforme: A Prospective Randomized Clinical Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 22, 1583-1588.
- ROMANI, M., PISTILLO, M. P., CAROSIO, R., MORABITO, A. & BANELLI, B. 2018. Immune Checkpoints and Innovative Therapies in Glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 8.
- ROTH, P., MITTELBRONN, M., WICK, W., MEYERMANN, R., TATAGIBA, M. & WELLER, M. 2007. Malignant Glioma Cells Counteract Antitumor Immune Responses through Expression of Lectin-Like Transcript-1. *Cancer Research*, 67, 3540-3544.
- RYU, S., BUATTI, J. M., MORRIS, A., KALKANIS, S. N., RYKEN, T. C. & OLSON, J. J. 2014. The role of radiotherapy in the management of progressive glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 118, 489-499.
- SALINAS, R. D., DURGIN, J. S. & O'ROURKE, D. M. 2020. Potential of Glioblastoma-Targeted Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy. *CNS Drugs*, 34, 127-145.
- SAMPSON, J. H., AKABANI, G., ARCHER, G. E., BERGER, M. S., COLEMAN, R. E., FRIEDMAN, A. H., FRIEDMAN, H. S., GREER, K., HERNDON, J. E., KUNWAR, S., MCLENDON, R. E., PAOLINO, A., PETRY, N. A., PROVENZALE, J. M., REARDON, D. A., WONG, T. Z., ZALUTSKY, M. R., PASTAN, I. & BIGNER, D. D. 2008. Intracerebral infusion of an EGFR-targeted toxin in recurrent malignant brain tumors. *Neuro-oncology*, 10, 320-329.
- SAMPSON, J. H., HEIMBERGER, A. B., ARCHER, G. E., ALDAPE, K. D., FRIEDMAN, A. H., FRIEDMAN, H. S., GILBERT, M. R., HERNDON, J. E., 2ND, MCLENDON, R. E., MITCHELL, D. A., REARDON, D. A., SAWAYA, R., SCHMITTLING, R. J., SHI, W., VREDENBURGH, J. J. & BIGNER, D. D. 2010. Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol*, 28, 4722-9.
- SANDERS, S. & DEBINSKI, W. 2020. Challenges to Successful Implementation of the Immune Checkpoint Inhibitors for Treatment of Glioblastoma. *Int J Mol Sci*, 21.
- SANDMANN, T., BOURGON, R., GARCIA, J., LI, C., CLOUGHESY, T., CHINOT, O. L., WICK, W., NISHIKAWA, R., MASON, W., HENRIKSSON, R., SARAN, F., LAI, A., MOORE, N., KHARBANDA, S., PEALE, F., HEGDE, P., ABREY, L. E., PHILLIPS, H. S. & BAIS, C. 2015. Patients With Proneural Glioblastoma May Derive Overall Survival Benefit From the Addition of Bevacizumab to First-Line Radiotherapy and Temozolomide: Retrospective Analysis of the AVAglio Trial. *J Clin Oncol*, 33, 2735-44.
- SATHORNSUMETEE, S., DESJARDINS, A., VREDENBURGH, J. J., MCLENDON, R. E., MARCELLO, J., HERNDON, J. E., MATHE, A., HAMILTON, M., RICH, J. N., NORFLEET, J. A., GURURANGAN, S., FRIEDMAN, H. S. & REARDON, D. A. 2010. Phase II trial of bevacizumab and erlotinib in patients with recurrent malignant glioma. *Neuro Oncol*, 12, 1300-10.
- SCHAER, D. J., BORETTI, F. S., SCHOEDON, G. & SCHAFFNER, A. 2002. Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Br J Haematol*, 119, 239-43.
- SCHÄFER, N., GIELEN, G. H., RAUSCHENBACH, L., KEBIR, S., TILL, A., REINARTZ, R., SIMON, M., NIEHUSMANN, P., KLEINSCHNITZ, C., HERRLINGER, U., PIETSCH, T., SCHEFFLER, B. & GLAS, M. 2019a. Longitudinal heterogeneity in glioblastoma: moving targets in recurrent versus primary tumors. *J Transl Med*, 17, 96.

- SCHÄFER, N., GIELEN, G. H., RAUSCHENBACH, L., KEBIR, S., TILL, A., REINARTZ, R., SIMON, M., NIEHUSMANN, P., KLEINSCHNITZ, C., HERRLINGER, U., PIETSCH, T., SCHEFFLER, B. & GLAS, M. 2019b. Longitudinal heterogeneity in glioblastoma: moving targets in recurrent versus primary tumors. *Journal of Translational Medicine*, 17, 96.
- SCHALPER, K. A., RODRIGUEZ-RUIZ, M. E., DIEZ-VALLE, R., LÓPEZ-JANEIRO, A., PORCIUNCUA, A., IDOATE, M. A., INOGÉS, S., DE ANDREA, C., LÓPEZ-DIAZ DE CERIO, A., TEJADA, S., BERRAONDO, P., VILLARROEL-ESPINDOLA, F., CHOI, J., GÚRPIDE, A., GIRALDEZ, M., GOICOECHEA, I., GALLEGO PEREZ-LARRAYA, J., SANMAMED, M. F., PEREZ-GRACIA, J. L. & MELERO, I. 2019. Neoadjuvant nivolumab modifies the tumor immune microenvironment in resectable glioblastoma. *Nat Med*, 25, 470-476.
- SCHEURER, M. E., AMIRIAN, E., CAO, Y., GILBERT, M. R., ALDAPE, K. D., KORNGUTH, D. G., ELZEIN, R. & BONDY, M. L. 2008. Polymorphisms in the interleukin-4 receptor gene are associated with better survival in patients with glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 14, 6640-6.
- SCHWAB, R., SZABO, P., MANAVALAN, J. S., WEKSLER, M. E., POSNETT, D. N., PANNETIER, C., KOURILSKY, P. & EVEN, J. 1997. Expanded CD4+ and CD8+ T cell clones in elderly humans. *The Journal of Immunology*, 158, 4493-4499.
- SELIGER, B. 2019. Basis of PD1/PD-L1 Therapies. *J Clin Med*, 8.
- SEO, Y. J., CHO, W. H., KANG, D. W. & CHA, S. H. 2012. Extraneural metastasis of glioblastoma multiforme presenting as an unusual neck mass. *J Korean Neurosurg Soc*, 51, 147-50.
- SHANKER, M., CHUA, B., BETTINGTON, C., FOOTE, M. C. & PINKHAM, M. B. 2019. Re-irradiation for recurrent high-grade gliomas: a systematic review and analysis of treatment technique with respect to survival and risk of radionecrosis. *Neurooncol Pract*, 6, 144-155.
- SHARDA, D. R., YU, S., RAY, M., SQUADRITO, M. L., DE PALMA, M., WYNN, T. A., MORRIS, S. M., JR. & HANKEY, P. A. 2011. Regulation of macrophage arginase expression and tumor growth by the Ron receptor tyrosine kinase. *J Immunol*, 187, 2181-92.
- SHARMA, N., VACHER, J. & ALLISON, J. P. 2019. TLR1/2 ligand enhances antitumor efficacy of CTLA-4 blockade by increasing intratumoral Treg depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 10453-10462.
- SHI, M. & SANCHE, L. 2019. Convection-Enhanced Delivery in Malignant Gliomas: A Review of Toxicity and Efficacy. *Journal of Oncology*, 2019, 9342796.
- SHIMAMURA, T., HUSAIN, S. & PURI, R. 2006. The IL-4 and IL-13 Pseudomonas exotoxins: new hope for brain tumor therapy. *Neurosurgical focus*, 20, E11.
- SHIMATO, S., MAIER, L. M., MAIER, R., BRUCE, J. N., ANDERSON, R. C. & ANDERSON, D. E. 2012. Profound tumor-specific Th2 bias in patients with malignant glioma. *BMC Cancer*, 12, 561.
- SHOJI, T., SAITO, R., CHONAN, M., SHIBAHARA, I., SATO, A., KANAMORI, M., SONODA, Y., KONDO, T., ISHII, N. & TOMINAGA, T. 2016. Local convection-enhanced delivery of an anti-CD40 agonistic monoclonal antibody induces antitumor effects in mouse glioma models. *Neuro Oncol*, 18, 1120-8.
- SICA, A. & MANTOVANI, A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*, 122, 787-95.
- SICA, A., SACCANI, A. & MANTOVANI, A. 2002. Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. *Int Immunopharmacol*, 2, 1045-54.
- SIEVERS, S., WATSON, G., JOHNCY, S. & ADKINS, S. 2020. Recognizing and Grading CAR T-Cell Toxicities: An Advanced Practitioner Perspective. *Frontiers in Oncology*, 10.
- SINGH, H. P., BISHEN, K. A., GARG, D., SUKHIJA, H., SHARMA, D. & TOMAR, U. 2019. Fixation and Fixatives: Roles and Functions—A Short Review. *Dental Journal of Advance Studies*.

- SKAGA, E., KULESSKIY, E., FAYZULLIN, A., SANDBERG, C. J., POTDAR, S., KYTTÄLÄ, A., LANGMOEN, I. A., LAAKSO, A., GAÁL-PAAVOLA, E., PEROLA, M., WENNERBERG, K. & VIK-MO, E. O. 2019. Intertumoral heterogeneity in patient-specific drug sensitivities in treatment-naïve glioblastoma. *BMC Cancer*, 19, 628.
- SOLINAS, G., GERMANO, G., MANTOVANI, A. & ALLAVENA, P. 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 86, 1065-1073.
- SORENSEN, M. D., DAHLROT, R. H., BOLDT, H. B., HANSEN, S. & KRISTENSEN, B. W. 2018. Tumour-associated microglia/macrophages predict poor prognosis in high-grade gliomas and correlate with an aggressive tumour subtype. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 44, 185-206.
- SOTTORIVA, A., SPITERI, I., PICCIRILLO, S. G., TOULOU MIS, A., COLLINS, V. P., MARIONI, J. C., CURTIS, C., WATTS, C. & TAVARÉ, S. 2013. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 4009-14.
- SRINIVASAN, V. M., FERGUSON, S. D., LEE, S., WEATHERS, S. P., KERRIGAN, B. C. P. & HEIMBERGER, A. B. 2017. Tumor Vaccines for Malignant Gliomas. *Neurotherapeutics*, 14, 345-357.
- STENSJØEN, A. L., SOLHEIM, O., KVISTAD, K. A., HÅBERG, A. K., SALVESEN, Ø. & BERNTSEN, E. M. 2015. Growth dynamics of untreated glioblastomas in vivo. *Neuro-Oncology*, 17, 1402-1411.
- STUPP, R., HEGI, M. E., MASON, W. P., VAN DEN BENT, M. J., TAPHOORN, M. J. B., JANZER, R. C., LUDWIN, S. K., ALLGEIER, A., FISHER, B., BELANGER, K., HAU, P., BRANDES, A. A., GIJTENBEEK, J., MAROSI, C., VECHT, C. J., MOKHTARI, K., WESSELING, P., VILLA, S., EISENHAUER, E., GORLIA, T., WELLER, M., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J. G. & MIRIMANOFF, R.-O. 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 10, 459-466.
- STUPP, R., MASON, W. P., VAN DEN BENT, M. J., WELLER, M., FISHER, B., TAPHOORN, M. J., BELANGER, K., BRANDES, A. A., MAROSI, C., BOGDHANN, U., CURSCHMANN, J., JANZER, R. C., LUDWIN, S. K., GORLIA, T., ALLGEIER, A., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J. G., EISENHAUER, E. & MIRIMANOFF, R. O. 2005a. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, 987-96.
- STUPP, R., MASON, W. P., VAN DEN BENT, M. J., WELLER, M., FISHER, B., TAPHOORN, M. J. B., BELANGER, K., BRANDES, A. A., MAROSI, C., BOGDHANN, U., CURSCHMANN, J., JANZER, R. C., LUDWIN, S. K., GORLIA, T., ALLGEIER, A., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J. G., EISENHAUER, E. & MIRIMANOFF, R. O. 2005b. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352, 987-996.
- STUPP, R., TAILLIBERT, S., KANNER, A. A., KESARI, S., STEINBERG, D. M., TOMS, S. A., TAYLOR, L. P., LIEBERMAN, F., SILVANI, A., FINK, K. L., BARNETT, G. H., ZHU, J. J., HENSON, J. W., ENGELHARD, H. H., CHEN, T. C., TRAN, D. D., SROUBEK, J., TRAN, N. D., HOTTINGER, A. F., LANDOLFI, J., DESAI, R., CAROLI, M., KEW, Y., HONNORAT, J., IDBAIH, A., KIRSON, E. D., WEINBERG, U., PALT, Y., HEGI, M. E. & RAM, Z. 2015. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *Jama*, 314, 2535-43.
- SUCHORSKA, B., WELLER, M., TABATABAI, G., SENFT, C., HAU, P., SABEL, M. C., HERRLINGER, U., KETTER, R., SCHLEGEL, U., MAROSI, C., REIFENBERGER, G., WICK, W., TONN, J. C. & WIRSCHING, H. G. 2016. Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is

- associated with improved survival in recurrent glioblastoma-results from the DIRECTOR trial. *Neuro Oncol*, 18, 549-56.
- SULAHIAN, T. H., HOGGER, P., WAHNER, A. E., WARDWELL, K., GOULDING, N. J., SORG, C., DROSTE, A., STEHLING, M., WALLACE, P. K., MORGANELLI, P. M. & GUYRE, P. M. 2000. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine*, 12, 1312-21.
- SZEFEL, J., DANIELAK, A. & KRUSZEWSKI, W. J. 2019. Metabolic pathways of L-arginine and therapeutic consequences in tumors. *Adv Med Sci*, 64, 104-110.
- SZOPA, W., BURLEY, T. A., KRAMER-MAREK, G. & KASPERA, W. 2017. Diagnostic and Therapeutic Biomarkers in Glioblastoma: Current Status and Future Perspectives. *Biomed Res Int*, 2017, 8013575.
- TAKASHIMA, Y., KAWAGUCHI, A., KANAYAMA, T., HAYANO, A. & YAMANAKA, R. 2018. Correlation between lower balance of Th2 helper T-cells and expression of PD-L1/PD-1 axis genes enables prognostic prediction in patients with glioblastoma. *Oncotarget*, 9, 19065-19078.
- TCHIRKOV, A., KHALIL, T., CHAUTARD, E., MOKHTARI, K., VÉRONÈSE, L., IRTHUM, B., VAGO, P., KÉMÉNY, J. L. & VERRELLE, P. 2007. Interleukin-6 gene amplification and shortened survival in glioblastoma patients. *Br J Cancer*, 96, 474-6.
- THAKKAR, J. P., DOLECEK, T. A., HORBINSKI, C., OSTROM, Q. T., LIGHTNER, D. D., BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. & VILLANO, J. L. 2014. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 23, 1985-1996.
- THOMAS, A. A., ERNSTOFF, M. S. & FADUL, C. E. 2012. Immunotherapy for the treatment of glioblastoma. *Cancer J*, 18, 59-68.
- THOMAS, A. A., FISHER, J. L., RAHME, G. J., HAMPTON, T. H., BARON, U., OLEK, S., SCHWACHULA, T., RHODES, C. H., GUI, J., TAFE, L. J., TSONGALIS, G. J., LEFFERTS, J. A., WISHART, H., KLEEN, J., MILLER, M., WHIPPLE, C. A., DE ABREU, F. B., ERNSTOFF, M. S. & FADUL, C. E. 2015. Regulatory T cells are not a strong predictor of survival for patients with glioblastoma. *Neuro Oncol*, 17, 801-9.
- THOMAS, D. A. & MASSAGUÉ, J. 2005. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, 8, 369-380.
- TSENG, M. Y. & TSENG, J. H. 2005. Survival analysis for adult glioma in England and Wales. *J Formos Med Assoc*, 104, 341-8.
- VAN GOOL, S., MAES, W., ARDON, H., VERSCHUERE, T., VAN CAUTER, S. & DE VLEESCHOUWER, S. 2009. Dendritic cell therapy of high-grade gliomas. *Brain Pathol*, 19, 694-712.
- VAN KOOTEN, C. & BANCHEREAU, J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*, 67, 2-17.
- VAULEON, E., AVRIL, T., COLLET, B., MOSSER, J. & QUILLIEN, V. 2010. Overview of cellular immunotherapy for patients with glioblastoma. *Clin Dev Immunol*, 2010.
- VAZQUEZ-BARQUERO, A., IBANEZ, F. J., HERRERA, S., IZQUIERDO, J. M., BERCIANO, J. & PASCUAL, J. 1994. Isolated headache as the presenting clinical manifestation of intracranial tumors: a prospective study. *Cephalalgia*, 14, 270-2.
- VECHT, C. J., KERKHOF, M. & DURAN-PENA, A. 2014. Seizure prognosis in brain tumors: new insights and evidence-based management. *Oncologist*, 19, 751-9.
- VERBEEK, B., SOUTHGATE, T. D., GILHAM, D. E. & MARGISON, G. P. 2008. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *British Medical Bulletin*, 85, 17-33.
- VERHAAK, R. G., HOADLEY, K. A., PURDOM, E., WANG, V., QI, Y., WILKERSON, M. D., MILLER, C. R., DING, L., GOLUB, T., MESIROV, J. P., ALEXE, G., LAWRENCE, M., O'KELLY, M., TAMAYO, P., WEIR, B. A., GABRIEL, S., WINCKLER, W., GUPTA, S., JAKKULA, L., FEILER, H. S., HODGSON, J. G., JAMES, C. D., SARKARIA, J. N., BRENNAN, C., KAHN, A., SPELLMAN, P. T., WILSON, R. K., SPEED, T. P., GRAY, J. W., MEYERSON, M., GETZ, G.,

- PEROU, C. M. & HAYES, D. N. 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17, 98-110.
- VIGNESWARAN, K., NEILL, S. & HADJIPANAYIS, C. G. 2015. Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann Transl Med*, 3, 95.
- VIK-MO, E. O., NYAKAS, M., MIKKELSEN, B. V., MOE, M. C., DUE-TØNNESEN, P., SUSO, E. M., SÆBØE-LARSSSEN, S., SANDBERG, C., BRINCHMANN, J. E., HELSETH, E., RASMUSSEN, A. M., LOTE, K., AAMDAL, S., GAUDERNACK, G., KVALHEIM, G. & LANGMOEN, I. A. 2013. Therapeutic vaccination against autologous cancer stem cells with mRNA-transfected dendritic cells in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother*, 62, 1499-509.
- WAGNER, S., CZUB, S., GREIF, M., VINCE, G. H., SÜSS, N., KERKAU, S., RIECKMANN, P., ROGGENDORF, W., ROOSEN, K. & TONN, J. C. 1999. Microglial/macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas. *Int J Cancer*, 82, 12-6.
- WALKER, D. G., CHUAH, T., RIST, M. J. & PENDER, M. P. 2006. T-cell apoptosis in human glioblastoma multiforme: implications for immunotherapy. *J Neuroimmunol*, 175, 59-68.
- WAN, Y. Y. 2010. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology*, 130, 166-71.
- WANG, C., CHEN, Y., WANG, Y., LIU, X., LIU, Y., LI, Y., CHEN, H., FAN, C., WU, D. & YANG, J. 2019a. Inhibition of COX-2, mPGES-1 and CYP4A by isoliquiritigenin blocks the angiogenic Akt signaling in glioma through ceRNA effect of miR-194-5p and lncRNA NEAT1. *J Exp Clin Cancer Res*, 38, 371.
- WANG, F., CATHCART, S., DIMAIO, D., ZHAO, N., CHEN, J., AIZENBERG, M., SHONKA, N., LIN, C. & ZHANG, C. 2021. *Comparison of Tumor Immune Environment Between Newly Diagnosed and Recurrent Glioblastoma in Matched Patients*.
- WANG, H., LATHIA, J. D., WU, Q., WANG, J., LI, Z., HEDDLESTON, J. M., EYLER, C. E., ELDERBROOM, J., GALLAGHER, J., SCHUSCHU, J., MACSWORDS, J., CAO, Y., MCLENDON, R. E., WANG, X. F., HJELMELAND, A. B. & RICH, J. N. 2009. Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem Cells*, 27, 2393-404.
- WANG, J., SHEN, F., YAO, Y., WANG, L. L., ZHU, Y. & HU, J. 2020. Adoptive Cell Therapy: A Novel and Potential Immunotherapy for Glioblastoma. *Front Oncol*, 10, 59.
- WANG, Q., HU, B., HU, X., KIM, H., SQUATRITO, M., SCARPACE, L., DECARVALHO, A. C., LYU, S., LI, P., LI, Y., BARTHEL, F., CHO, H. J., LIN, Y. H., SATANI, N., MARTINEZ-LEDESMA, E., ZHENG, S., CHANG, E., SAUVÉ, C. G., OLAR, A., LAN, Z. D., FINOCCHIARO, G., PHILLIPS, J. J., BERGER, M. S., GABRUSIEWICZ, K. R., WANG, G., ESKILSSON, E., HU, J., MIKKELSEN, T., DEPINHO, R. A., MULLER, F., HEIMBERGER, A. B., SULMAN, E. P., NAM, D. H. & VERHAAK, R. G. W. 2017. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*, 32, 42-56.e6.
- WANG, S., YAO, F., LU, X., LI, Q., SU, Z., LEE, J. H., WANG, C. & DU, L. 2019b. Temozolomide promotes immune escape of GBM cells via upregulating PD-L1. *Am J Cancer Res*, 9, 1161-1171.
- WANG, X., GUO, G., GUAN, H., YU, Y., LU, J. & YU, J. 2019c. Challenges and potential of PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy for glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 38, 87.
- WANN, A., TULLY, P. A., BARNES, E. H., LWIN, Z., JEFFREE, R., DRUMMOND, K. J., GAN, H. & KHASRAW, M. 2018. Outcomes after second surgery for recurrent glioblastoma: a retrospective case-control study. *J Neurooncol*, 137, 409-415.

- WEI, J., GABRUSIEWICZ, K. & HEIMBERGER, A. 2013. The Controversial Role of Microglia in Malignant Gliomas. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 285246.
- WELLER, M., BUTOWSKI, N., TRAN, D. D., RECHT, L. D., LIM, M., HIRTE, H., ASHBY, L., MECHTLER, L., GOLDLUST, S. A., IWAMOTO, F., DRAPPATZ, J., O'ROURKE, D. M., WONG, M., HAMILTON, M. G., FINOCCHIARO, G., PERRY, J., WICK, W., GREEN, J., HE, Y., TURNER, C. D., YELLIN, M. J., KELER, T., DAVIS, T. A., STUPP, R. & SAMPSON, J. H. 2017. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRVIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 18, 1373-1385.
- WELLER, M., TABATABAI, G., KASTNER, B., FELSBERG, J., STEINBACH, J. P., WICK, A., SCHNELL, O., HAU, P., HERRLINGER, U., SABEL, M. C., WIRSCHING, H. G., KETTER, R., BAHR, O., PLATTEN, M., TONN, J. C., SCHLEGEL, U., MAROSI, C., GOLDBRUNNER, R., STUPP, R., HOMICKO, K., PICHLER, J., NIKKHAH, G., MEIXENSBERGER, J., VAJKOCZY, P., KOLLIAS, S., HUSING, J., REIFENBERGER, G. & WICK, W. 2015. MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clin Cancer Res*, 21, 2057-64.
- WELLER, M., TONN, J. C., ERNEMANN, U., WIESTLER, O. D. & BAMBERG, M. 2006. Diagnostik und Therapie des Glioblastoms. *Der Onkologe*, 12, 500-507.
- WEN, P. Y. & KESARI, S. 2008. Malignant Gliomas in Adults. *New England Journal of Medicine*, 359, 492-507.
- WEN, P. Y., REARDON, D. A., ARMSTRONG, T. S., PHUPHANICH, S., AIKEN, R. D., LANDOLFI, J. C., CURRY, W. T., ZHU, J. J., GLANTZ, M., PEEREBOOM, D. M., MARKERT, J. M., LAROCCA, R., O'ROURKE, D. M., FINK, K., KIM, L., GRUBER, M., LESSER, G. J., PAN, E., KESARI, S., MUZIKANSKY, A., PINILLA, C., SANTOS, R. G. & YU, J. S. 2019. A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Phase II Trial of Dendritic Cell Vaccine ICT-107 in Newly Diagnosed Patients with Glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 25, 5799-5807.
- WESTPHAL, M., HEESE, O., STEINBACH, J. P., SCHNELL, O., SCHACKERT, G., MEHDORN, M., SCHULZ, D., SIMON, M., SCHLEGEL, U., SENFT, C., GELETNEKY, K., BRAUN, C., HARTUNG, J. G., REUTER, D., METZ, M. W., BACH, F. & PIETSCH, T. 2015. A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. *Eur J Cancer*, 51, 522-32.
- WESTPHAL, M., MAIRE, C. L. & LAMSZUS, K. 2017. EGFR as a Target for Glioblastoma Treatment: An Unfulfilled Promise. *CNS Drugs*, 31, 723-735.
- WHEELER, C. J., BLACK, K. L., LIU, G., YING, H., YU, J. S., ZHANG, W. & LEE, P. K. 2003. Thymic CD8+ T cell production strongly influences tumor antigen recognition and age-dependent glioma mortality. *J Immunol*, 171, 4927-33.
- WICK, W., DIETRICH, P.-Y., KUTTRUFF, S., HILF, N., FRENZEL, K., ADMON, A., BURG, S. H. V. D., DEIMLING, A. V., GOUTTEFANGEAS, C., KROEP, J. R., MARTINEZ-RICARTE, F., OKADA, H., OTTENSMEIER, C. H. H., PONSATI, B., POULSEN, H. S., STEVANOVIC, S., TABATABAI, G., RAMMENSEE, H.-G., SAHIN, U., SINGH, H. & CONSORTIUM, G. 2018. GAPVAC-101: First-in-human trial of a highly personalized peptide vaccination approach for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 36, 2000-2000.
- WICK, W., WELLER, M., VAN DEN BENT, M., SANSON, M., WEILER, M., VON DEIMLING, A., PLASS, C., HEGI, M., PLATTEN, M. & REIFENBERGER, G. 2014. MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol*, 10, 372-85.
- WICK, W., WELLER, M., VAN DEN BENT, M. & STUPP, R. 2010. Bevacizumab and recurrent malignant gliomas: a European perspective. *J Clin Oncol*, 28, e188-9; author reply e190-2.

- WILSON, T. A., KARAJANNIS, M. A. & HARTER, D. H. 2014. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int*, 5, 64.
- WINTTERLE, S., SCHREINER, B., MITSDOERFFER, M., SCHNEIDER, D., CHEN, L., MEYERMANN, R., WELLER, M. & WIENDL, H. 2003. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res*, 63, 7462-7.
- WISCHHUSEN, J., FRIESE, M. A., MITTELBRONN, M., MEYERMANN, R. & WELLER, M. 2005. HLA-E Protects Glioma Cells from NKG2D-Mediated Immune Responses In Vitro: Implications for Immune Escape In Vivo. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 64, 523-528.
- WOOD, M. D., REIS, G. F., REUSS, D. E. & PHILLIPS, J. J. 2016. Protein Analysis of Glioblastoma Primary and Posttreatment Pairs Suggests a Mesenchymal Shift at Recurrence. *J Neuropathol Exp Neurol*, 75, 925-935.
- WORONIECKA, K., CHONGSATHIDKIET, P., RHODIN, K., KEMENY, H., DECHANT, C., FARBER, S. H., ELSAMADICY, A. A., CUI, X., KOYAMA, S., JACKSON, C., HANSEN, L. J., JOHANNIS, T. M., SANCHEZ-PEREZ, L., CHANDRAMOHAN, V., YU, Y.-R. A., BIGNER, D. D., GILES, A., HEALY, P., DRANOFF, G., WEINHOLD, K. J., DUNN, G. P. & FECCI, P. E. 2018a. T-Cell Exhaustion Signatures Vary with Tumor Type and Are Severe in Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 24, 4175-4186.
- WORONIECKA, K. I., RHODIN, K. E., CHONGSATHIDKIET, P., KEITH, K. A. & FECCI, P. E. 2018b. T-cell Dysfunction in Glioblastoma: Applying a New Framework. *Clin Cancer Res*, 24, 3792-3802.
- WU, A., WEI, J., KONG, L. Y., WANG, Y., PRIEBE, W., QIAO, W., SAWAYA, R. & HEIMBERGER, A. B. 2010. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro Oncol*, 12, 1113-25.
- WYNN, T. A., CHAWLA, A. & POLLARD, J. W. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496, 445-55.
- XIONG, Z., YANG, Q. & LI, X. 2020. Effect of intra- and inter-tumoral heterogeneity on molecular characteristics of primary IDH-wild type glioblastoma revealed by single-cell analysis. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 26.
- XUE, S., HU, M., LI, P., MA, J., XIE, L., TENG, F., ZHU, Y., FAN, B., MU, D. & YU, J. 2017. Relationship between expression of PD-L1 and tumor angiogenesis, proliferation, and invasion in glioma. *Oncotarget*, 8, 49702-49712.
- YANG, I., TIHAN, T., HAN, S. J., WRENSCH, M. R., WIENCKE, J., SUGHRUE, M. E. & PARSA, A. T. 2010. CD8+ T-cell infiltrate in newly diagnosed glioblastoma is associated with long-term survival. *J Clin Neurosci*, 17, 1381-5.
- YANG, T., KONG, Z. & MA, W. 2021. PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in glioblastoma: clinical studies, challenges and potential. *Hum Vaccin Immunother*, 17, 546-553.
- YE, X. Z., XU, S. L., XIN, Y. H., YU, S. C., PING, Y. F., CHEN, L., XIAO, H. L., WANG, B., YI, L., WANG, Q. L., JIANG, X. F., YANG, L., ZHANG, P., QIAN, C., CUI, Y. H., ZHANG, X. & BIAN, X. W. 2012. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF- β 1 signaling pathway. *J Immunol*, 189, 444-53.
- YOU, R., ARTICHOKER, J., FRIES, A., EDWARDS, A. W., COMBES, A. J., REEDER, G. C., SAMAD, B. & KRUMMEL, M. F. 2021. Active surveillance characterizes human intratumoral T cell exhaustion. *J Clin Invest*, 131.
- YUAN, Y., ZHAO, Q., ZHAO, S., ZHANG, P., ZHAO, H., LI, Z., DU, Y., TIAN, X. & LU, J. 2019. Characterization of transcriptome profile and clinical features of a novel immunotherapy target CD204 in diffuse glioma. *Cancer Med*, 8, 3811-3821.
- YUNG, W. K., ALBRIGHT, R. E., OLSON, J., FREDERICKS, R., FINK, K., PRADOS, M. D., BRADA, M., SPENCE, A., HOHL, R. J., SHAPIRO, W., GLANTZ, M., GREENBERG, H., SELKER, R. G., VICK, N. A., RAMPLING, R., FRIEDMAN, H., PHILLIPS, P., BRUNER, J., YUE, N., OSOBA, D.,

- ZAKNOEN, S. & LEVIN, V. A. 2000a. A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer*, 83, 588-93.
- YUNG, W. K. A., ALBRIGHT, R. E., OLSON, J., FREDERICKS, R., FINK, K., PRADOS, M. D., BRADA, M., SPENCE, A., HOHL, R. J., SHAPIRO, W., GLANTZ, M., GREENBERG, H., SELKER, R. G., VICK, N. A., RAMPLING, R., FRIEDMAN, H., PHILLIPS, P., BRUNER, J., YUE, N., OSOBA, D., ZAKNOEN, S. & LEVIN, V. A. 2000b. A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *British Journal of Cancer*, 83, 588-593.
- ZAMARRON, B. F. & CHEN, W. 2011. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci*, 7, 651-8.
- ZEINER, P. S., PREUSSE, C., GOLEBIEWSKA, A., ZINKE, J., IRIONDO, A., MULLER, A., KAOMA, T., FILIPSKI, K., MÜLLER-ESCHNER, M., BERNATZ, S., BLANK, A. E., BAUMGARTEN, P., ILINA, E., GROTE, A., HANSMANN, M. L., VERHOFF, M. A., FRANZ, K., FEUERHAKE, F., STEINBACH, J. P., WISCHHUSEN, J., STENZEL, W., NICLOU, S. P., HARTER, P. N. & MITTELBRONN, M. 2019. Distribution and prognostic impact of microglia/macrophage subpopulations in gliomas. *Brain Pathol*, 29, 513-529.
- ZENG, J., SEE, A. P., PHALLEN, J., JACKSON, C. M., BELCAID, Z., RUZEVICK, J., DURHAM, N., MEYER, C., HARRIS, T. J., ALBESIANO, E., PRADILLA, G., FORD, E., WONG, J., HAMMERS, H. J., MATHIOS, D., TYLER, B., BREM, H., TRAN, P. T., PARDOLL, D., DRAKE, C. G. & LIM, M. 2013. Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 86, 343-9.
- ZENG, J., ZHANG, X. K., CHEN, H. D., ZHONG, Z. H., WU, Q. L. & LIN, S. X. 2016. Expression of programmed cell death-ligand 1 and its correlation with clinical outcomes in gliomas. *Oncotarget*, 7, 8944-55.
- ZHANG, M., HUTTER, G., KAHN, S. A., AZAD, T. D., GHOLAMIN, S., XU, C. Y., LIU, J., ACHROL, A. S., RICHARD, C., SOMMERKAMP, P., SCHOEN, M. K., MCCRACKEN, M. N., MAJETI, R., WEISSMAN, I., MITRA, S. S. & CHESHER, S. H. 2016. Anti-CD47 Treatment Stimulates Phagocytosis of Glioblastoma by M1 and M2 Polarized Macrophages and Promotes M1 Polarized Macrophages In Vivo. *PLoS One*, 11, e0153550.
- ZHANG, Q. W., LIU, L., GONG, C. Y., SHI, H. S., ZENG, Y. H., WANG, X. Z., ZHAO, Y. W. & WEI, Y. Q. 2012. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One*, 7, e50946.
- ZHANG, W., HUANG, Q., XIAO, W., ZHAO, Y., PI, J., XU, H., ZHAO, H., XU, J., EVANS, C. E. & JIN, H. 2020. Advances in Anti-Tumor Treatments Targeting the CD47/SIRPα Axis. *Frontiers in Immunology*, 11.
- ZHAO, Y.-H., WANG, Z.-F., PAN, Z.-Y., PÉUS, D., DELGADO-FERNANDEZ, J., PALLUD, J. & LI, Z.-Q. 2019. A Meta-Analysis of Survival Outcomes Following Reoperation in Recurrent Glioblastoma: Time to Consider the Timing of Reoperation. *Frontiers in Neurology*, 10.
- ZHENG, T., CANTOR, K. P., ZHANG, Y., CHIU, B. C. H. & LYNCH, C. F. 2001. Risk of Brain Glioma not Associated with Cigarette Smoking or Use of Other Tobacco Products in Iowa. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 10, 413-414.
- ZHENG, Y., FANG, Y. C. & LI, J. 2019. PD-L1 expression levels on tumor cells affect their immunosuppressive activity. *Oncol Lett*, 18, 5399-5407.
- ZHOU, F. 2009. Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int Rev Immunol*, 28, 239-60.
- ZHOU, W. & BAO, S. 2014. Reciprocal Supportive Interplay between Glioblastoma and Tumor-Associated Macrophages. *Cancers (Basel)*, 6, 723-40.
- ZHU, Z., ZHANG, H., CHEN, B., LIU, X., ZHANG, S., ZONG, Z. & GAO, M. 2020. PD-L1-Mediated Immunosuppression in Glioblastoma Is Associated With the Infiltration and M2-Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Front Immunol*, 11, 588552.

- ZISAKIS, A., PIPERI, C., THEMISTOCLEOUS, M. S., KORKOLOPOULOU, P., BOVIATIS, E. I., SAKAS, D. E., PATSOURIS, E., LEA, R. W. & KALOFOUTIS, A. 2007. Comparative analysis of peripheral and localised cytokine secretion in glioblastoma patients. *Cytokine*, 39, 99-105.
- ZOU, P., XU, H., CHEN, P., YAN, Q., ZHAO, L., ZHAO, P. & GU, A. 2013. IDH1/IDH2 mutations define the prognosis and molecular profiles of patients with gliomas: a meta-analysis. *PLoS One*, 8, e68782.
- ZOU, W. & CHEN, L. 2008. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*, 8, 467-77.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Abteilung Neurologie mit interdisziplinären Schwerpunkt Neuroonkologie unter Betreuung von Prof. Dr. med Dr. rer. nat. Ghazaleh Tabatabai durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Professor für Neuropathologie Dr. med. Jens Schittenhelm. Die immunhistochemischen Auswertungen wurden nach Einarbeitung durch Dr. med. Schittenhelm von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie (Dr. You-Shan Feng) durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 22.05.2023

8 Liste der Veröffentlichungen

Przystal, J. M., Becker, H., Canjuga, D., Tsiami, F., Anderle, N., Keller, A. L., Pohl, A., Ries, C. H., Schmittnaegel, M., Korinetska, N., et al. (2021). Targeting CSF1R Alone or in Combination with PD1 in Experimental Glioma. *Cancers*, 13, 2400.