

Aus dem Institut für Experimentelle Neurochirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung CCR2-defizienter Mikroglia/Makrophagen
im murinen Glioblastom

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Alexander D. Bungert
aus Mainz

Datum der Promotion: 18.12.2020

„Man soll die Dinge so einfach wie möglich machen, aber nicht einfacher.“

Albert Einstein

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Zusammenfassung/Abstract	7
2.1	Zusammenfassung.....	7
2.2	Abstract	9
3	Einleitung.....	11
3.1	Glioblastoma multiforme (GBM).....	11
3.1.1	Klassifikation.....	11
3.1.2	Klinik und Diagnostik	12
3.1.3	Verlauf und Therapie	12
3.2	Die Rolle des angeborenen Immunsystems im ZNS.....	12
3.2.1	Makrophagen.....	12
3.2.2	Mikroglia	15
3.2.3	Die Rolle von Mikroglia und Makrophagen im GBM	16
3.2.3.1	Chimärengenerierung als Methode zur Unterscheidung von Mikroglia und Makrophagen im GBM.....	18
3.2.3.2	Der CCR2/CCL2-Signalweg.....	19
3.2.3.3	Die Rolle des CCR2/CCL2-Signalweges im GBM.....	20
3.3	Metabolismus von Tumoren und ¹ H-Magnetresonanztomographie (¹ H-MRS)	21
3.4	Zielsetzung der Arbeit	22
4	Material und Methoden	24
4.1	Übersicht über verwendete Materialien	24
4.1.1	Geräte.....	24
4.1.2	Materialien	25
4.1.3	Reagenzien und Kits.....	25
4.1.4	Zellkulturmedien und -zusätze.....	26
4.1.5	Verwendete Puffer und Lösungen	26
4.1.6	Verwendete Software	27
4.2	Tierexperimentelles Arbeiten.....	27
4.2.1	Tierstämme.....	27
4.2.2	Narkose und Vorbehandlung	29
4.2.3	Generierung von Knochenmarkchimären	29
4.2.3.1	Gruppenübersicht.....	29
4.2.3.2	Präparation der Hinterbeine zur Knochenmarkisolierung.....	30
4.2.3.3	Kopfschutzbestrahlung.....	31

4.2.3.4	Transfer der gewonnenen Knochenmarkzellen	32
4.2.4	Blutentnahme und weitere Aufbereitung	32
4.2.5	Stereotaktische intrazerebrale Implantation von GL261-Tumorzellen	33
4.2.6	Kardiale Gehirnperfusion und -entnahme	33
4.2.7	Bildgebende Verfahren	34
4.2.7.1	Magnetresonanztomographie (MRT).....	34
4.2.7.2	¹ H-Magnetresonanzspektroskopie (¹ H-MRS).....	34
4.3	Zellbiologische Methoden.....	36
4.3.1	Isolierung von Knochenmarkzellen zum Knochenmarktransfer und zur Makrophagendifferenzierung	36
4.3.2	Arbeiten mit der Zelllinie GL261.....	36
4.3.2.1	Kultur von GL261-Zellen	36
4.3.2.2	Subkultivierung/Passagieren.....	37
4.3.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
4.3.2.4	Herstellung von Tumor-konditioniertem Medium (TCM).....	38
4.3.3	Kultur von murinen Monozyten/Makrophagen	38
4.3.4	Zellzahlbestimmung.....	38
4.3.5	Phagozytose-Assay	39
4.3.6	Stimulation von Mikroglia/Makrophagen <i>in vitro</i>	40
4.3.7	Zellseparation und Aufreinigung von Mikroglia/Makrophagen	40
4.3.7.1	Herstellung einer Einzelzellsuspension	40
4.3.7.2	Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) via CD11b-Markierung	41
4.3.8	Durchflusszytometrische Analysen	42
4.3.8.1	Aufbereitung und Färbung von Blutproben.....	42
4.3.8.2	Färbung von Knochenmarkzellen.....	43
4.3.8.3	Aufbereitung und Färbung von primären Mikroglia/Makrophagen aus der Einzelzellsuspension	44
4.3.8.4	Reinheitsbestimmung der isolierten Mikroglia/Makrophagen	45
4.3.8.5	Weitere Aufbereitung der Zellen.....	46
4.3.8.5.1	Direkte Fixierung mittels PFA	46
4.3.8.5.2	Aufbereitung der Zellen zur Messung von intrazellulären Zytokinen.....	46
4.3.8.5.3	Färbung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Zytokinen an fixierten Zellen	47
4.3.8.5.4	Färbung von kultivierten primären Mikroglia/Makrophagen	49
4.4	Histologische Methoden	49
4.4.1	Präparation des Gewebes	49
4.4.2	Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung.....	50
4.4.3	Immunhistochemie/Immunfluoreszenzfärbung	51

4.4.3.1	Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten	51
4.4.3.2	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	52
4.4.3.3	Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung.....	52
4.5	Molekularbiologische Methoden.....	53
4.5.1	RNA-Isolierung	53
4.5.2	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	53
4.5.3	Reverse Transkription (RT).....	54
4.5.4	Real Time quantitative PCR (RTQ-PCR).....	55
4.6	Statistische Methoden	57
5	Ergebnisse.....	58
5.1	Mikroglia und Makrophagen im Chimärenmodell	58
5.1.1	Nachweis von CCR2 auf Mikroglia und Makrophagen.....	58
5.1.2	Analyse der unterschiedlichen Mausstämmen.....	60
5.1.2.1	Knochenmarkanalyse von C57BL/6J-, CX3CR1-eGFP- und CCR2ko-Mäusen.....	60
5.1.2.2	Blutanalyse hinsichtlich Rekonstitutionseffizienzen.....	62
5.1.2.3	Blutanalyse hinsichtlich der lymphozytären Zusammensetzung	63
5.1.3	Analyse der Einwanderung und Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen ins Gehirn mittels Durchflusszytometrie	65
5.1.3.1	Infiltration von Mikroglia und Makrophagen in die tumortragende Hemisphäre an d21 nach GL261-Tumorzellimplantation.....	65
5.1.3.1.1	Zusammensetzung der CD11b ⁺ CD45 ⁺ -Fraktion.....	65
5.1.3.1.2	Zusammensetzung der kontralateralen CD11b ⁺ CD45 ⁺ -Fraktion	68
5.1.3.1.3	Prozentualer Anteil der CD11b ⁺ CD45 ^{high} -Fraktion an allen CD11b ⁺ CD45 ⁺ -Zellen.....	68
5.1.3.1.4	Zusammensetzung der CD45 ^{high} -Fraktion	70
5.1.3.1.5	Zusammensetzung der CD45 ^{low} -Fraktion.....	71
5.1.3.2	Analyse von Mikroglia und Makrophagen hinsichtlich verschiedener Moleküle	72
5.1.3.2.1	Vergleich der Expression verschiedener Moleküle zwischen der CD45 ^{high} - und CD45 ^{low} -Fraktion.....	73
5.1.3.2.2	Expression verschiedener Moleküle von CD45 ^{high} -Mikroglia	75
5.1.3.2.3	Expression verschiedener Moleküle von CD45 ^{high} -Makrophagen.....	77
5.1.4	Analyse der Akkumulation von Mikroglia und Makrophagen mittels fluoreszenzbasierter Immunhistochemie	79
5.1.5	<i>In-vitro</i> -Experimente	81
5.1.5.1	CD45-Hochregulation.....	81

5.1.5.2	Analyse der CD45-Expression von Mikroglia und Makrophagen an d3 und d6.....	82
5.1.5.3	Phagozytose-Assay.....	84
5.1.6	Tumorvolumetrie mittels 7T-Magnetresonanztomographie.....	86
5.1.7	Magnetresonanzspektroskopische Messungen.....	87
5.2	Genexpressionsanalyse anti- und proinflammatorischer Moleküle von wt- und CCR2ko-CD11b ⁺ -Zellen im Tumor.....	89
6	Diskussion.....	91
6.1	Kritische Betrachtung der Methodik: Das GL261-Mausmodell und seine Alternativen.....	91
6.2	Einteilung der Mikroglia und Makrophagen in den M1/M2-Status.....	92
6.3	Einfluss des CCR2ko auf Mikroglia und Makrophagen.....	92
6.3.1	Migration.....	93
6.3.1.1	Migratorischer Effekt des CCR2ko auf Mikroglia.....	93
6.3.1.2	Migratorischer Effekt des CCR2ko auf Makrophagen.....	94
6.3.2	CD45-Expression.....	95
6.3.2.1	Veränderungen der CD45-Expression von Mikroglia.....	95
6.3.2.2	Veränderungen der CD45-Expression von Makrophagen.....	96
6.3.3	Expressionsprofile.....	97
6.3.3.1	Expression bestimmter Moleküle von CD11b ⁺ CD45 ^{high} -Mikroglia.....	97
6.3.3.2	Expression bestimmter Moleküle von CD11b ⁺ CD45 ^{high} -Makrophagen.....	97
6.3.4	Relevanz der CCR2-Defizienz im Tumorkontext.....	98
6.3.5	Tumorvolumina im Chimärenmodell.....	99
6.4	Zukünftige Therapieansätze.....	100
7	Verzeichnisse.....	103
7.1	Literaturverzeichnis.....	103
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	114
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	115
7.4	Tabellenverzeichnis.....	116
8	Anhang.....	118
8.1	Eidesstattliche Versicherung.....	118
8.2	Curriculum vitae.....	119
8.3	Publikationsliste.....	122
8.4	Danksagung.....	123

2 Zusammenfassung/Abstract

2.1 Zusammenfassung

Einleitung Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste und zugleich aggressivste Tumor unter allen malignen Tumoren des ZNS. Trotz intensiver Forschung liegt das mediane Überleben nach Diagnosestellung bei ca. einem Jahr. Gliome bestehen grundsätzlich nicht nur aus Tumorzellen, sondern auch aus Tumor assoziierten Mikroglia und Makrophagen. Der CCR2/CCL2-Signalweg ist bekannt als relevanter Rekrutierungsweg für Makrophagen. Außerdem spielt er eine große Rolle im Rahmen des Tumorwachstums. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der CCR2-Defizienz sowohl auf Mikroglia als auch auf Makrophagen durch Verwendung von Chimären zur Unterscheidung der beiden Populationen untersucht werden.

Methoden Die Chimären wurden durch Kopfschutzbestrahlung und anschließender Knochenmarktransplantation von Wildtyp-(wt-) oder CCR2-Knockout-(CCR2ko-)Zellen generiert. Insgesamt erhielt man vier verschiedene Gruppen: wt/wt-, wt/ko-, ko/wt- und ko/ko-Gruppe, wobei der erste Teil des Ausdrucks den CCR2-Status der Mikrogliazellen und der zweite Teil den CCR2-Status der Makrophagen definiert. Dadurch wurden spezifische Untersuchungen der beiden Populationen in Abhängigkeit der CCR2-Defizienz ermöglicht. 21 Tage nach Implantation der syngenen Gliomzelllinie GL261 wurde die Tumorthemisphäre durchflusszytometrischen und immunfluoreszenz-basierten Messungen zugeführt. Tumorumfänge wurden magnetresonanztomographisch bestimmt. Des Weiteren wurden *In-vitro*-Versuche an isolierten Mikroglia und kultivierten Makrophagen durchgeführt.

Ergebnisse Die durchgeführten Experimente ergaben, dass die Rekrutierung von Makrophagen zum Hirntumor fast ausschließlich auf dem CCR2/CCL2-Signalweg beruhte, wohingegen Mikroglia in ihrer Migration durch einen CCR2ko weniger beeinträchtigt waren. In der wt/ko-Gruppe wanderten nahezu keine Makrophagen ein, währenddessen sich die Mikrogliaanzahl in dieser Gruppe erhöhte. Die Gesamtzahl an IBA1⁺-Zellen blieb konstant. In der ko/wt-Gruppe kam es zu einem analogen Phänomen mit reduzierter Mikroglia- und erhöhter Makrophagenanzahl. In der ko/ko-Gruppe waren die myeloiden Zellen zwar signifikant vermindert, die CCR2-Defizienz

betrifft aber vorrangig Makrophagen. FACS-Analysen ergaben, dass sich die Zusammensetzung der tumoraktivierten Zellpopulation, der CD45^{high}-Fraktion, durch einen CCR2ko drastisch änderte. Das Fehlen des CCR2 führte zu einer Reduktion von CD45^{high}-Mikroglia bzw. Makrophagen, die zusätzlich in der Expression von immunrelevanten Molekülen wie MHCII, CD86, Ly6C und TNF α eingeschränkt wurden. Eine Verminderung des CD45^{high}-Anteils an allen CD11b⁺CD45⁺-Zellen konnte nur für die ko/ko-Gruppe festgestellt werden. Die Tumorumfänge unterschieden sich insgesamt nicht signifikant voneinander.

Schlussfolgerung In dieser Arbeit konnte der Effekt einer CCR2-Defizienz auf Mikroglia und Makrophagen sowie ihr gegenseitiger Einfluss näher beleuchtet werden. In erster Linie führt ein CCR2ko zu reduzierter Akkumulation der ko- sowie zu vermehrter Migration der wt-Zellpopulation. Die Gesamtzahl an myeloiden Zellen als auch der Anteil der CD45^{high}-Fraktion verringert sich nur bei dualer Defizienz. Myeloide Zellen versuchen folglich, den fehlenden Counterpart auszugleichen. Die Bedeutung dessen kann bisher nicht abgeschätzt werden und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

2.2 Abstract

Introduction Glioblastoma multiforme is the most frequent and most aggressive tumor amongst all malignant CNS tumors. Median overall survival is about one year after diagnosis. Notably, gliomas not only consist of tumor cells, but to a significant proportion of tumor associated microglia and macrophages. The CCR2/CCL2 signaling pathway is known as a relevant recruiting mechanism for macrophages and plays a pivotal role in glioma progression. In this study, we examined the impact of CCR2 deficiency on both microglia and macrophages using chimeric mice to differentiate between these cell types.

Methods Chimeras were generated by head protected irradiation and consecutive bone marrow transplantation of wildtype (wt) or CCR2 knockout (ko) cells. Four different groups were obtained: wt/wt, wt/ko, ko/wt and the ko/ko group, the first term indicating the CCR2 status of microglia, the second one those of macrophages. Thus, specific analyses of both populations (\pm CCR2ko) could be performed. 21 days after implantation of the syngeneic glioma cells GL261, tumor hemispheres were analyzed by flow cytometry and immunofluorescence staining. Tumor volumes were measured by MRI. Moreover, *in vitro* studies were conducted with isolated microglia and cultivated macrophages.

Results Experiments revealed that recruitment of macrophages to the brain tumor relies almost exclusively on the CCR2/CCL2 signaling pathway, whereas microglia were less affected in migratory functions by CCR2 deficiency. Macrophages were barely found in the wt/ko group and microglia count increased simultaneously. Count of IBA1⁺ cells stayed constant. The ko/wt group showed analogous results with reduced microglia and increased macrophages. Overall count of myeloid cells in the ko/ko group was significantly diminished, particularly affecting macrophages. FACS analyses revealed an alteration of the tumor activated CD45^{high} fraction based on CCR2 deficiency. Lack of CCR2 led to reduced CD45^{high} microglia and macrophages, that are additionally restricted in expressing immunologically relevant molecules like MHCII, CD86, Ly6C and TNF α . Reduction of the CD45^{high} fraction of all CD11b⁺CD45⁺ cells could only be found in the ko/ko group. Tumor volumes remained unchanged in all groups.

Conclusion In this study, the effect of CCR2 deficiency on both microglia and macrophages as well as their reciprocal effect was clearly demonstrated. Primarily, CCR2 deficiency leads to diminished accumulation of the CCR2ko cell population and at the same time to increased migration of the wt cell fraction. Reduced overall count of myeloid cells and reduction of CD45^{high} fraction only occurs with dual deficiency. Consequently, myeloid cells try to counterbalance themselves, which should be the subject of further studies.

3 Einleitung

3.1 Glioblastoma multiforme (GBM)

3.1.1 Klassifikation

Üblicherweise werden Tumore des Zentralen Nervensystems hinsichtlich histologischer sowie genetischer Eigenschaften nach der *2016 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System* eingeordnet (1). Im Unterschied zu anderen Tumoren werden Tumore des ZNS nicht nach der allgemein üblichen TNM-Klassifikation eingeteilt (2), sondern nach Einteilung der WHO in die Grade I-IV aufgrund der erwarteten Malignität und Überlebensrate eingestuft. Gliome oder auch neuroepitheliale Tumoren entstehen aus glialen (Vorläufer-)Zellen. Dazu gehören u. a. Astrozytome (auch das Glioblastom), Oligodendrogliome, Ependymome und Oligoastrozytome (Mischgliome). Gliome sind dabei von primären Tumoren anderer Zelltypen wie z. B. Lymphomen, hämatopoetischen Neoplasien oder auch Meningeomen, die in den meisten Fällen als benigne anzusehen sind, abzugrenzen (3). Metastasen peripherer Tumore sind etwa 10-fach häufiger als primäre Tumore des ZNS (4). Innerhalb der malignen ZNS-Tumore stellen Glioblastome mit 47,1 % die größte Gruppe dar. Auch innerhalb der Gliome repräsentieren sie mehr als die Hälfte aller Tumore (56,1 %). Die Inzidenzrate für das Glioblastoma multiforme beträgt 3,20 pro 100.000 Einwohner und ist somit die höchste aller neuroepithelialen Tumore. Das mediane Alter bei Diagnosestellung beträgt 64 Jahre (3). Das Glioblastoma multiforme gehört als neuroepithelialer Tumor zu den Astrozytomen, die wiederum der Gruppe der Gliome zuzuordnen sind. Die WHO stuft den Tumor als Grad-IV-Tumor ein. Damit zählt das GBM zu den aggressivsten aller Hirntumoren und wird deshalb auch als *high-grade glioma* bezeichnet (HGG) (5). Das zeichnet sich insbesondere durch eine kurze 5-Jahres-Überlebensrate von 5,5 % aus (3). Prinzipiell lässt sich das Glioblastom in ein primäres (Isocitrat-Dehydrogenase-Wildtyp (IDH-WT)) und ein sekundäres (IDH-Mutation) Glioblastom unterteilen. Hierbei handelt es sich im ersteren Falle um ein *de novo* Glioblastom, im letzteren Fall um ein Astrozytom, welches sich aus einem Astrozytom Grad II oder III entwickelt (1). Mutationen in der IDH sind mit einem deutlich besseren Outcome assoziiert als IDH-WT-Glioblastome. Allerdings sind primäre Glioblastome um ein Vielfaches häufiger als sekundäre (1, 6, 7).

3.1.2 Klinik und Diagnostik

Das Glioblastom präsentiert sich mit relativ unspezifischen Symptomen wie Kopfschmerzen, Krampfanfällen, Übelkeit, Erbrechen oder neurologischen Ausfallerscheinungen. Die Bildgebung der Wahl ist die Magnetresonanztomographie (MRT) mit und ohne Kontrastmitteldarstellung. Dabei zeigt sich häufig eine heterogene Läsion mit zentraler Nekrose und peritumoralem Ödem (5). Gesichert wird die Diagnose üblicherweise über eine Biopsie oder chirurgischer Resektion mit anschließender pathologischer Begutachtung (6).

3.1.3 Verlauf und Therapie

Das Glioblastom ist im Allgemeinen mit einer schlechten Überlebensrate assoziiert und gilt daher als nicht heilbar. Die chirurgische Resektion von mehr als 98 % der Tumormasse hat einen großen signifikant unabhängigen Einfluss auf eine höhere Überlebensdauer (8). Die Standardtherapie des Glioblastoms ist die chirurgische Resektion und die anschließende Radiotherapie (60 Gy, fraktioniert à 2 Gy täglich) bei gleichzeitiger Gabe von Temozolomid (TMZ), gefolgt von sechs Zyklen adjuvanten TMZ (6, 9). Die mediane Überlebenszeit beträgt dann 14,6-16,1 Monate nach Diagnostikstellung (10-12). Neue Behandlungsansätze, besonders im Bereich der gezielten Krebs- und Immuntherapie, werden bereits in klinischen Studien getestet. Dabei wird u. a. versucht, tumorfördernde Signalwege zu inhibieren bzw. das Immunsystem durch Manipulation zu einer antitumoralen Reaktion zu bewegen (13). Momentan jedoch gehört keines dieser Verfahren zur Standardtherapie.

3.2 Die Rolle des angeborenen Immunsystems im ZNS

3.2.1 Makrophagen

Makrophagen sowie Mikroglia sind Zellen des angeborenen Immunsystems und gehören zum mononukleär-phagozytären System (14). Makrophagen bzw. ihre Vorläuferzellen entstammen dem Knochenmark und werden daher auch als myeloide Zellen bezeichnet. Sie gehören zu den Leukozyten. Als zirkulierende Zellen werden sie Monozyten genannt und differenzieren sich zu gewebespezifischen Makrophagen aus, die, je nach Lokalisation, spezifische Aufgaben und Namen besitzen. Dendritische Zellen beispielsweise befinden sich in der Haut, wo sie Langerhans-Zellen genannt

werden, alveoläre Makrophagen in der Lunge und Mikroglia im Gehirn (14-16). Hierbei ist anzumerken, dass Mikrogliazellen im Gegensatz zu Makrophagen ausschließlich pränatal aus dem Dottersack entstehen und sich dann im Hirn ansiedeln (17, 18). Obwohl diese Zellen morphologisch verschiedentlich auftreten, ähneln sich ihre Aufgaben. Sie dienen vor allem als erste Verteidigungslinie gegen infektiöse Mikroorganismen, sorgen auf der anderen Seite aber auch für die Phagozytose toter Zellen und die Reparatur defekter Gewebe. Sie spielen somit eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase (14, 15). Die Herkunft von Gewebemakrophagen lässt sich prinzipiell in zwei Arme gliedern. Größtenteils entstanden sie bereits pränatal aus dem Dottersack bzw. aus der fötalen Leber, deren Vorläufer sich dann im Knochenmark ansiedelten, welches im adulten Organismus Hauptquelle von zirkulierenden Monozyten darstellt (19). (**Abb. 1**).

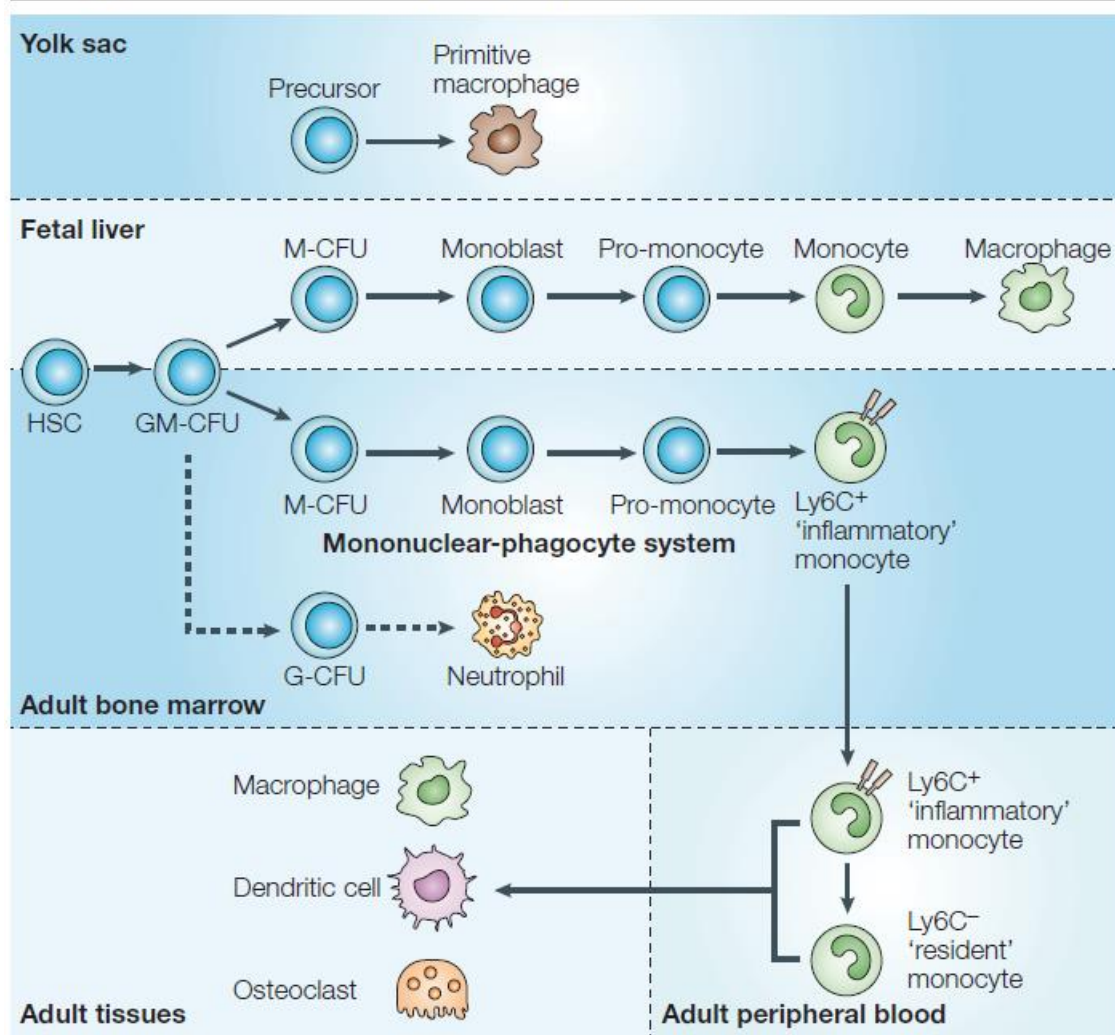
Box 1 | **The mononuclear-phagocyte system**

Abb. 1: Übersicht über die Herkunft monozytärer Zellen. Die ersten Makrophagen werden im Dottersack gebildet. Später stammt der größte Teil aus der fötalen Leber bzw. aus dem Knochenmark, welches im adulten Organismus die Hauptquelle zirkulierender Makrophagen darstellt. Grundsätzlich lassen sich dabei wiederum zwei Phänotypen unterscheiden: Inflammatorische Ly6C⁺ sowie residente Ly6C⁻-Makrophagen. HSC: haematopoietic stem cell, GM-CFU: granulocyte/macrophage colony-forming unit, M-CFU: macrophage colony-forming unit. Abbildung entnommen aus (15).

Das Kompartiment an Makrophagen in den verschiedenen Geweben, z. B. in der Lunge, im Knochen (Osteoklasten) oder in der Haut, wird prinzipiell vor der Geburt angelegt (19), kann aber durchaus via Infiltration von sich aus zirkulierenden Monozyten zu Makrophagen differenzierenden Zellen aufgefüllt werden (*engl.*: monocyte-derived macrophages) (19-21). Mikroglia im Gehirn stellen hierbei eine Ausnahme dar. Ihr Pool wird grundsätzlich nicht von peripher aufgefüllt (17, 22). Jedoch kann die Blut-Hirn-Schranke aufgrund von pathologischen Beeinträchtigungen des Gehirns durch beispielsweise neurodegenerative Erkrankungen oder Tumore in einem Maße gestört

werden, dass auch Makrophagen in der Lage sind, von peripher in das ZNS einzuwandern (21, 23, 24).

3.2.2 Mikroglia

Mikrogliazellen als residente Makrophagen des ZNS machen ca. 10 % aller Zellen des ZNS aus (25) und entstehen ausschließlich pränatal während der Embryogenese. Ihr Pool ist unabhängig von zirkulierenden Monozyten und zeichnet sich durch Langlebigkeit und Selbsterneuerung aus. Erhöhte Mikrogliazellzahlen entstehen nicht durch Einwanderung von Vorläuferzellen aus der Peripherie, wie es bei Gewebemakrophagen der Fall ist, sondern durch Proliferation bestehender Mikrogliapopulationen (17, 22). Neben den Mikrogliazellen unterscheidet man noch weitere myeloide Zellpopulationen im ZNS: perivaskuläre Makrophagen, meningeale Makrophagen, Makrophagen des Plexus choroideus sowie residente und inflammatorische Monozyten (23). Alle diese Zellen besitzen gemeinsame Zellmarker wie z. B. CD45, CD11b, CD68, F4/80, Ly6C und den Fraktalkin-Rezeptor CX3CR1 (21, 26). Im Folgenden soll auf die morphologischen Besonderheiten der Mikrogliazellen eingegangen werden. Mikrogliazellen wurden erstmals im Jahre 1919 von Pío del Río-Hortega beschrieben (27), wobei Ursprung und Funktion noch lange unentdeckt blieben (28). Man unterscheidet grundsätzlich die phänotypischen Erscheinungsbilder „ramified“ oder „resting“ von „amoeboid“ oder „activated“ im Gehirn voneinander. „Resting“ Mikroglia sind besonders gut an ihren langen Ausläufern zu erkennen. Ihr Soma hat einen Durchmesser von 5-10 µm, wobei die Ausläufer deutlich länger sein können (29). Erst um die Jahrtausendwende herum konnte man feststellen, dass „resting“ Mikroglia eine entscheidende Rolle in der Überwachung des ZNS spielen (30). Durch ihre langen Ausläufer sind diese Zellen in der Lage, ihre Umgebung abzutasten und auf geringe Schädigungen, beispielsweise des Gewebes oder von Gefäßen, zu reagieren. Dies bewirkt Änderungen in ihrem Aktivierungszustand, morphologisch sind jedoch zunächst keine Veränderungen zu beobachten. Erst bei größeren pathologischen Einflüssen auf das ZNS, z. B. durch Infektionen, kommt es zu amöboiden Mikrogliazellen (**Abb. 2**) (31, 32). Diese besitzen dann, je nach Pathologie, neuroprotektive oder neurotoxische Eigenschaften (28, 30).

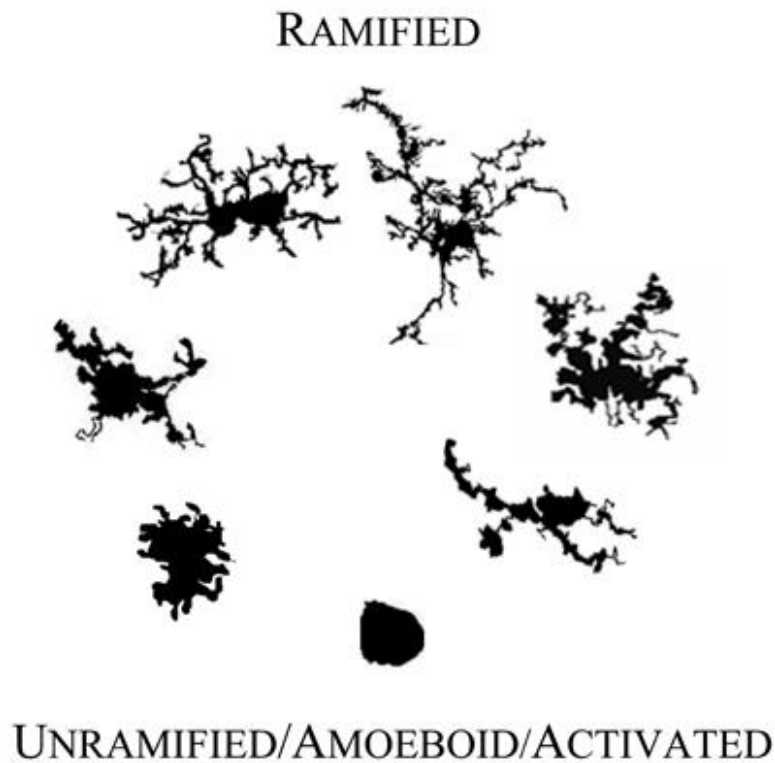


Abb. 2: Übersicht über die phänotypischen Erscheinungen von Mikrogliazellen. Im oberen Bereich des Bildes sind die typischen Ausläufer der Mikroglia zu erkennen, es handelt sich um „resting“ oder „ramified“ Mikroglia, die mittels ihrer Dendriten ihre Umgebung abtasten und überwachen können. Über Zwischenstufen erreichen sie den amöboiden Zustand (unten), der auf eine Aktivierung der Zellen hindeutet. Abbildung entnommen aus (29).

3.2.3 Die Rolle von Mikroglia und Makrophagen im GBM

Das Glioblastoma multiforme besteht nicht nur aus Tumorzellen, sondern auch zu einem nicht unerheblichen Teil aus Immunzellen. Von peripher eingewanderte Makrophagen und residente Mikroglia machen dabei bis zu 45 % der Zellen innerhalb des Tumorgewebes aus (33, 34). Dabei korreliert die Anzahl an Tumor assoziierten Mikroglia/Makrophagen (TAMs), wie diese Zellen im Kontext mit Tumoren noch genannt werden, positiv mit dem Tumorgrad respektive ihrer Malignität (35, 36). Welche exakte Rolle den TAMs im Zusammenspiel mit dem Gliom zugeschrieben wird, wird kontrovers diskutiert (37). Man unterscheidet prinzipiell klassisch aktivierte (M1) und alternativ (M2) aktivierte Mikroglia/Makrophagen. Letztere Aktivierung kann weiter in M2a (Th₂-Antwort, Typ-2-Entzündung, Allergie, Töten von Parasiten), M2b (Th2-Aktivierung, Immunregulation) und M2c (Immunregulation, Extrazellulärmatrixablagerung, Gewebeerneuerung) unterteilt werden (Abb. 3). M1 Makrophagen werden über IFN γ sowie LPS oder TNF α aktiviert, M2 (a) klassischerweise über IL-4 und IL-13. Kurz gesagt besitzen M1 aktivierte Zellen proinflammatorische bzw. antitumorale und M2

polarisierte Zellen immunsuppressive bzw. protumorale Eigenschaften (38-40). Dieses sehr vereinfachte Modell beruht jedoch auf *In-vitro*-Versuchen und ist nur schwer mit der Situation *in vivo* zu vergleichen, allein schon deshalb, weil sich das Tumormilieu aus vielen verschiedenen Zytokinen zusammensetzt. Szulzewsky *et al.* zeigten 2015, dass Gliom-assoziierte Mikroglia/Makrophagen Expressionsprofile aufweisen, die sich mit allen vier bekannten Polarisierungen (M1, M2a, b, c) überschneiden. Eine dezidierte Zuordnung zu einer M2-Polarisation, wie oft angenommen, war nicht möglich. Eine Genexpressionsanalyse von Einzelzellen könnte zeigen, ob es evtl. intratumorale Häufigkeitsverteilungen bzgl. der TAM-Polarisationen gibt. Grundsätzlich ist nun von einer Zellpopulation mit gemischt phänotypischer Erscheinung auszugehen (39, 41). Studien haben gezeigt, dass Mikrogliazellen die Invasivität von Gliomazellen deutlich erhöhen können (42). Ein Grund dafür besteht in den proangiogenen Eigenschaften von Mikrogliazellen. Brandenburg *et al.* konnten 2016 zeigen, dass isolierte tumorassoziierte Mikroglia/Makrophagen u. a. die für die Angiogenese wichtigen Moleküle VEGF und CXCL2 überexprimieren. Bei Depletion der myeloiden Zellen kam es folglich zur Verringerung der Gefäßdichte und veränderter -architektur. Bei selektiver Depletion von lediglich Mikroglia zeigte sich ein ähnliches Bild, welches vermuten lässt, dass vor allem Mikroglia proangiogene und damit protumorale Wirkungen entfalten (43). Sogar die morphologische Erscheinung von Mikrogliazellen ändert sich in unmittelbarer Nähe zu Tumorgefäßen, was eine Interaktion vermuten lässt (44). Demnach führt die pharmakologische Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen zu größerem Tumorwachstum, die Depletion zu einer Tumolvolumenreduktion um bis zu 87,5 % (45). Galarneau *et al.* jedoch stellten fest, dass eine Depletion von Mikroglia/Makrophagen zu einer Tumolvolumensteigerung von 33 % führte (46). Smyth *et al.* gehen davon aus, dass besonders bei Tumoren im Anfangsstadium von einem antitumoralen Effekt ausgegangen werden kann, der sich jedoch bei Tumorprogression ins Gegenteil verkehrt (47). Die Rolle von Mikroglia und Makrophagen im Tumor bleibt demnach weiterhin kontrovers diskutiert.

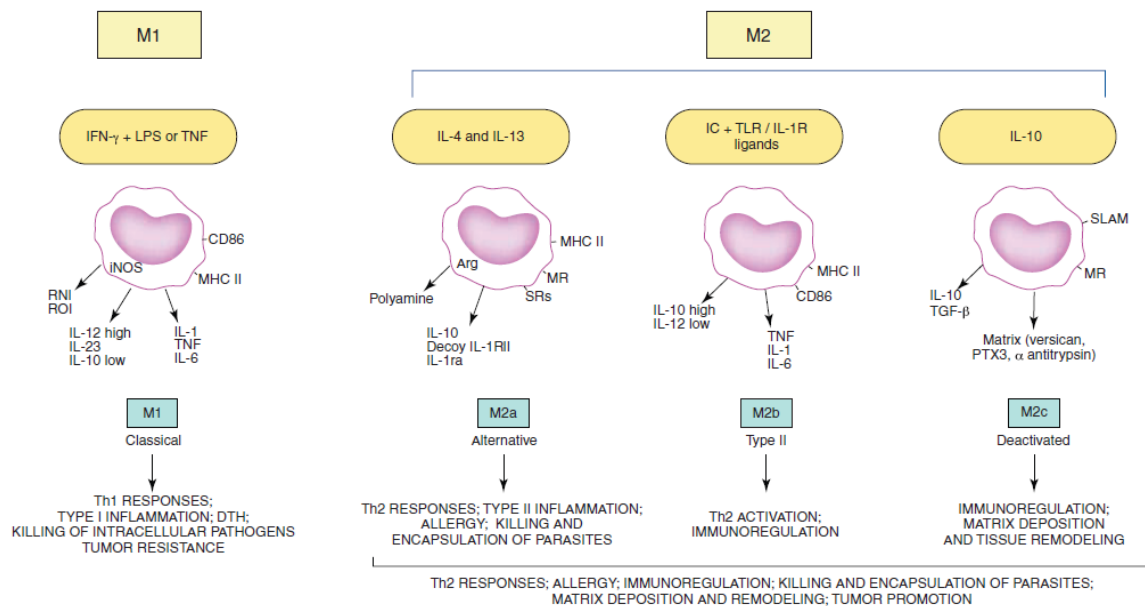


Abb. 3: In-vitro-Modell zur Einteilung des Aktivierungsstatus von Mikroglia/Makrophagen. Klassisch (M1) werden Mikroglia/Makrophagen über IFN γ und LPS oder TNF α aktiviert. Die alternative Aktivierung (M2a) geschieht über IL-4 und IL-13. M2b und M2c Mikroglia/Makrophagen werden über Immunkomplexe sowie Toll-like Rezeptor-(TLR)-Liganden bzw. IL-10 polarisiert. Abbildung entnommen aus (39).

3.2.3.1 Chimäregenerierung als Methode zur Unterscheidung von Mikroglia und Makrophagen im GBM

Prinzipiell lassen sich Mikroglia und Makrophagen nicht anhand von Oberflächenmolekülen voneinander unterscheiden. Beide exprimieren Marker wie CD45, CD11b, CD68, F4/80, Ly6C oder CX3CR1 (21, 26). Eine Unterscheidbarkeit ist jedoch insofern gewünscht, als Mikroglia und Makrophagen sich molekulargenetisch und funktionell voneinander unterscheiden und demnach potenziell unterschiedliche Aufgaben im Tumorkontext besitzen (48, 49). Daher wurden vielfältige Methoden entwickelt, um eine Differenzierung herzustellen. Sedgwick *et al.* beschrieben im Rahmen von Entzündungsprozessen des ZNS bereits 1991, die beiden Zellpopulationen über die CD45-Expression unterscheiden zu können, wobei CD45^{low} den Mikroglia und CD45^{high} den Makrophagen zugeschrieben wurde (50). Jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass Mikroglia durchaus in der Lage sind, die CD45-Expression hochzuregulieren (51). Sæderup *et al.* benutzten einen kombinierten Ansatz aus verschiedenen Oberflächenmolekülen wie CCR2 und Ly6C, wobei die CD45-Expression weiterhin als Basiskriterium zur Trennung von Mikroglia und Makrophagen galt (52). Weitere Methoden zur Unterscheidung der beiden Zellpopulationen sind u. a. das Parabiosis-

Modell (22), die Herstellung von Chimären mit (48) und ohne (53) Kopfschutzbestrahlung sowie ein nicht-myeloablativer Ansatz (54). Beim Parabiosis-Modell wird der Körper als auch die Blutzirkulation zweier Organismen chirurgisch miteinander verknüpft, sodass sich das Blut dieser Tiere miteinander vermischt. Bei Verwendung von z. B. GFP- und wt-Mäusen lassen sich dann periphere Makrophagen von zentralen Mikroglia über ein GFP-Signal voneinander unterscheiden. (22, 55). Hierbei muss beachtet werden, dass sich die Blutzellen beider Tiere quantitativ aneinander annähern und somit am Ende Mischpopulationen von GFP⁺- und GFP⁻-Zellen vorherrschend sind, deren Rekonstitution die 50%-Marke nicht übertreffen kann (54). Bei Chimärenbildung über einen Bestrahlungsansatz wird zunächst das Knochenmark der jeweiligen Tiere durch Gammastrahlung depletiert und anschließend eine Knochenmarktransplantation mit Zellen, die sich aufgrund eines Fluoreszenzsignals vom Rezipienten unterscheiden, durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass die Ganzkörperbestrahlung (*engl.* TBI: *total body irradiation*) die Blut-Hirn-Schranke dergestalt beeinträchtigt, dass es zu einer starken unspezifischen Akkumulation von Immunzellen im ZNS kommt. Im Unterschied dazu wird die Integrität der Blut-Hirn-Schranke durch eine Kopfschutzbestrahlung (*engl.* HPI: *head protected irradiation*) kaum beeinträchtigt, wobei die Rekonstitutionsraten für CD11b⁺-Zellen im Vergleich zur TBI konstant hoch bleiben (51). Kürzlich wurden Chimäre ohne Bestrahlung hergestellt, indem die Tiere vor Knochenmarktransfer mit Busulfan behandelt wurden. Die Autoren erhielten 12 Wochen nach Behandlung normalisierte Rekonstitutionsraten von durchschnittlich 70 % (54). In der folgenden Arbeit wird aufgrund der etablierten Methodik im Labor und nicht normalisierten Rekonstitutionsraten von z. T. mehr als 80 % auf Chimäre mittels Kopfschutzbestrahlung und anschließender Knochenmarktransplantation zurückgegriffen.

3.2.3.2 Der CCR2/CCL2-Signalweg

Der CC-Rezeptor 2 kommt in zwei verschiedenen Isoformen vor (CCR2A und CCR2B) (56) und wird auf diversen Immunzellen exprimiert, dazu gehören mononukleäre Phagozyten wie z. B. Monozyten und Mikroglia (57-59), basophile Lymphozyten, dendritische Zellen, glatte Muskelzellen, (regulatorische) T-Zellen sowie aktivierte NK-Zellen (58, 60). Es muss hierbei angemerkt werden, dass es bzgl. der Expression von CCR2 auf Mikroglia auch Autoren gibt, die diese bestreiten. Hauptkritikpunkt ist hierbei

der von vielen Studien durchgeführte Nachweis auf reiner RNA-Ebene (61). *Monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), auch CCL2 genannt, bindet an den G-Protein gekoppelten Rezeptor CCR2 sowie an den auf regulatorischen T-Zellen vorhandenen CC-Rezeptor 4 (CCR4). Andersherum binden einige Chemokine an CCR2, wie beispielsweise MCP-2, MCP-3, MCP-4 oder in der Maus MCP-5. CCL2 jedoch gehört zu den potentesten Chemokinen zur Rekrutierung und Initiierung der Chemotaxis von Monozyten. CCL2 wird unter bestimmten Bedingungen, z. B. unter oxidativem Stress, von einer Vielzahl von Zellen gebildet, u. a. von Mikroglia, Fibroblasten, Astrozyten usw. Monozyten/Makrophagen zählen hierbei zu seinen Hauptproduzenten (56, 58, 62). CCL2 dient einerseits als Rekrutierungsfaktor, andererseits wirkt er aber auch unterstützend hinsichtlich der Tumorangio-genese (63). Der Stellenwert dieses Signalweges wird besonders bei einer Störung desselben deutlich. So konnte gezeigt werden, dass im Rahmen eines murinen Chimärenexperimentes ein Knockout von CCR2 auf Monozyten (CCR2ko) zu einer signifikant geringeren Progression einer experimentell herbeigeführten Autoimmunencephalitis (EAE) geführt hat (64). Ein ähnliches Experiment mit einer künstlich herbeigeführten Peritonitis hat man bereits 1997 durchgeführt und konnte somit belegen, dass der CCR2/CCL2 Signalweg von sehr großer Bedeutung und die Makrophagenrekrutierung zum großen Teil auf diesem Weg beruht (65, 66).

3.2.3.3 Die Rolle des CCR2/CCL2-Signalweges im GBM

CCL2 ist sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im Vergleich zu gesundem Hirngewebe in Gliomen stark erhöht (67-69). Die Menge an CCL2 korreliert sowohl mit dem Tumorgrad (70) als auch mit der Anzahl einwandernder Mikroglia/Makrophagen (68, 71). Zudem ist bereits eine Korrelation zwischen der Anzahl an Mikroglia/Makrophagen und Tumorgrad *per se* beschrieben worden. Dabei kommen den TAMs eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression und -invasivität zu. Platten *et al.* fanden heraus, dass CCL2-transfizierte Gliome erhöhte Mengen an TAMs aufweisen und die Überlebenswahrscheinlichkeit drastisch reduziert wird. Eine direkte proliferative Wirkung von CCL2 auf die Tumorzellen *in vitro* konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (63). Der CCL2-Rezeptor CCR2 konnte, je nach verwendeter Methodik sowie Zelllinien, sowohl auf humanen Gliomzelllinien als auch auf

Gewebeproben von Glioblastompatienten nachgewiesen werden. Eine signifikante Korrelation zwischen CCL2- und CCR2-Expression bestand jedoch nicht (59, 72). Bei anderen, peripheren Tumoren, z. B. bei Brustkrebs oder einem Kolonkarzinom, konnte im Zusammenhang mit der CCL2-Expression auch eine verstärkte Bildung von pulmonalen bzw. Lebermetastasen festgestellt werden (73-75). Eine protumorale Wirkung im Gliom entsteht zusätzlich dadurch, dass Mikroglia/Makrophagen selbst CCL2 produzieren und weitere mononukleäre Zellen rekrutieren (47), die dann wiederum über beispielsweise das Interleukin-6 (IL-6) das Tumorstadium fördern (59). CCL2 scheint aber auch antitumorale Eigenschaften zu besitzen. Im Rahmen einer „*suicide gene therapy*“ konnte durch CCL2 die Effektivität der Behandlung gesteigert werden (76). Die Relevanz dieses Signalweges zeigt sich auch in der großen Anzahl an klinischen Studien, die zu diesem Thema existieren (www.ClinicalTrials.gov).

3.3 Metabolismus von Tumoren und ¹H-Magnetresonanztomographie (¹H-MRS)

Heute wird die Magnetresonanztomographie bereits klinisch präoperativ verwendet, um den WHO-Grad eines Hirntumors abzuschätzen. Im Verlauf einer Therapie kann diese Methode dann herangezogen werden, um strahleninduzierte Nekrose von einem Rezidiv abgrenzen zu können. Parameter, die sich im Rahmen eines Tumorgeschehens verändern können, sind: N-Acetylaspartat (NAA), Gesamt-Cholin (tCho), Gesamt-Kreatin (tCr), Laktat (Lac) und Lipide (Lip) (77). NAA ist ausschließlicher Metabolit von Neuronen und spielt eine Rolle im Lipid- bzw. neuronalen Stoffwechsel. Fällt er ab, deutet dies auf neuronales Sterben oder zumindest auf schwerwiegende Beeinträchtigungen hin. Zu erklären ist dies damit, dass die meisten ZNS-Tumore nicht neuronalen Ursprungs sind (78, 79). Cholin wird zur Synthese von Zellwandmembranen benötigt und ist bei gesteigerter Zellproliferation und somit bei malignen Geschehen erhöht. Kreatin ist ein Marker des internen Energiestoffwechsels der Zelle und bei Neoplasien deutlich erniedrigt. Erhöhte Konzentrationen von Laktat als Produkt der anaeroben Glykolyse sowie Lipide als Zeichen von Nekrose sind bei Tumoren, die oft auch hypoxische Bereiche aufweisen, regelmäßig festzustellen (80). 2012 wurde in einer Studie herausgefunden, dass im GL261-Modell entsprechende Unterschiede hinsichtlich der genannten Metabolite nachzuweisen sind (81).

Ein Nachteil von spektroskopischen Messungen ist jedoch deren relativ geringe Sensitivität. Das bedeutet, dass lediglich jene Metabolite gut detektiert werden können, die

sich im Mikro- bis Millimolarbereich bewegen (82). Ein weiterer Punkt ist die benutzerabhängige Positionierung des dreidimensionalen Voxels, in dessen Bereich die Metabolite bestimmt werden. Ist dieser in örtlicher Nähe zum Schädelknochen oder im Bereich des Ventrikels, sind die Messungen in ihrer Aussage deutlich eingeschränkt oder müssen gar verworfen werden.

3.4 Zielsetzung der Arbeit

CCR2 spielt eine wichtige Rolle sowohl in der Rekrutierung myeloider Zellen in das Glioblastom als auch im Rahmen der Tumorprogression und -angiogenese. In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob der Rekrutierungssignalweg CCR2/CCL2 sowohl für Mikroglia als auch für Makrophagen relevant ist und ob das spezifische Ausschalten des CC-Rezeptors 2 in einer oder beiden Populationen Auswirkungen auf die Rekrutierung bzw. Migration, die intratumorale Gesamtzahl, die CD45-Expression, die Expression bestimmter tumorrelevanter Moleküle und auf funktionelle Eigenschaften zeigt. Nicht zuletzt wurden auch die Auswirkungen des CCR2ko auf das Tumolvolumen und den -metabolismus ermittelt. Hierfür wurden Chimäre im syngenen GBM-Mausmodell hergestellt, die zum einen aufgrund eines Fluoreszenzmarkers eine klare Unterscheidbarkeit zwischen residenten Mikroglia und von peripher eingewanderten Makrophagen ermöglichen und zum anderen eine CCR2-Defizienz durch Verwendung von CCR2ko-Mäusen zulassen (66). Dadurch konnten insgesamt vier unterschiedliche Chimärengruppen generiert werden, die entweder keine (wt/wt), zwei (ko/ko) oder jeweils eine CCR2-Defizienz für Makrophagen (wt/ko) oder Mikroglia (ko/wt) aufwiesen (**Abb. 4**). Um die Fragen nach intratumoraler Akkumulation von Mikroglia oder Makrophagen zu beantworten, wurden sowohl durchflusszytometrische als auch immunfluoreszenzbasierte Analysen durchgeführt. Die CD45-Expression und die Expression bestimmter Moleküle wurden ebenfalls per Durchflusszytometrie erfasst. Tumorspezifische volumetrische sowie metabolische Untersuchungen wurden über MRT und Magnetresonanzspektroskopie bestimmt. *In-vitro*-Versuche wurden ergänzend durchgeführt, um funktionelle Eigenschaften mit und ohne CCR2ko an beiden Zellpopulationen ohne Einfluss anderer Zelltypen zu testen. Zusammenfassend wird eine genauere Charakterisierung und Differenzierung von Mikroglia und Makrophagen bezüglich pro- oder antitumorale Eigenschaften durchgeführt. Zusätzlich wird der

Einfluss eines CCR2ko auf Rekrutierungsverhalten und funktionelle Eigenschaften beleuchtet.

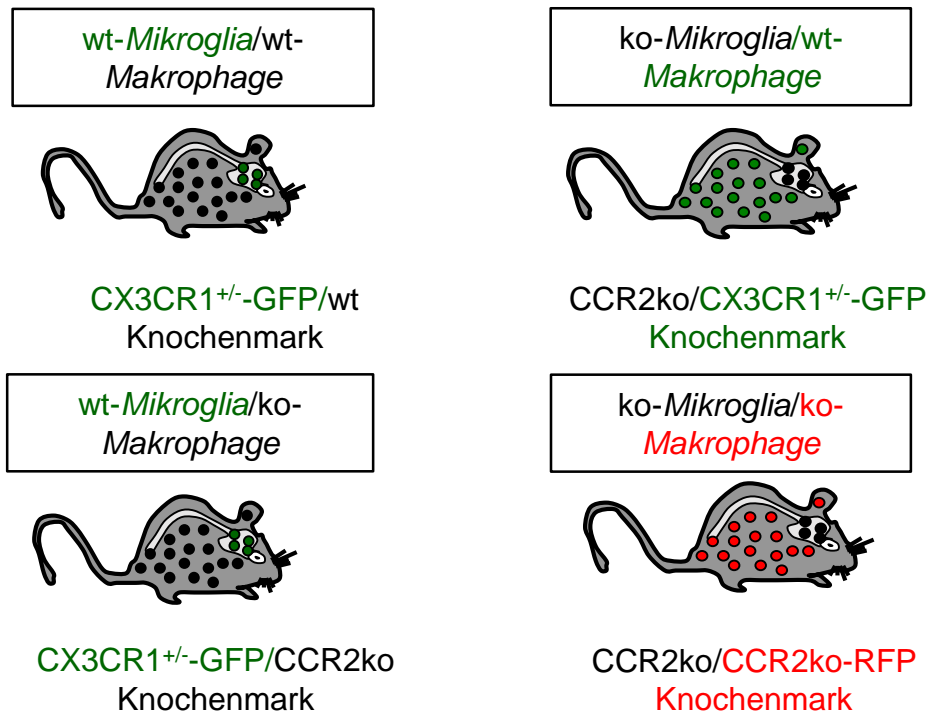


Abb. 4: Übersicht über die etablierten Gruppen im Rahmen der Chimäregenerierung. Die Unterscheidung von Mikroglia und Makrophagen geschieht über ein eGFP- bzw. RFP-Signal.

4 Material und Methoden

Die folgenden Tabellen (Tab. 1-6) geben Aufschluss über verwendete Materialien und Geräte (Tab. 1), Chemikalien und Kits (Tab. 3), Zellkulturmedien und deren Zusätze (Tab. 4), Puffer und Lösungen (Tab. 5) sowie die verwendete Software (Tab. 6) in dieser Arbeit.

4.1 Übersicht über verwendete Materialien

4.1.1 Geräte

Tab. 1: Übersicht über verwendete Geräte, deren Hersteller sowie Standort.

Gerät	Hersteller	Standort
1H MRT CryoProbe™	Bruker	NWFZ (Neurowissenschaftliches Forschungszentrum, Charité)
7T MRT BioSpec 70/20 USR	Bruker	NWFZ (Neurowissenschaftliches Forschungszentrum, Charité)
Bestrahlungseinheit (Gammacell® 40 Exactor)	MDS Nordion	DRFZ (Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin)
FACS Canto II	BD Pharmingen™	AZH (Aschheim-Zondek-Haus, Charité)
FACS Fortessa	BD Pharmingen™	DRFZ
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss)	AZH
Infrarotlampe	Sanitas	AZH
Inkubator Heraeus BBD620	Thermo Fisher Scientific	AZH
Kryostat MICROM HM 560	MICROM	AZH
Photometer Tecan Infinite® 200 PRO	TECAN	AZH
Realtime-PCR 7900 HT FAST	Applied Biosystems	AZH
Sicherheits-Sterilwerkbänke Hera Safe	Thermo Fisher Scientific	AZH
Stereotaktischer Rahmen	Stoelting	AZH
T-Gradient Thermocycler	Biometra	AZH
Thermomixer comfort	Eppendorf	AZH
Vortex Genie II	Scientific Industries	AZH
Wippe Shaker DRS-12	NeoLab®	AZH
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific	AZH
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific	AZH

4.1.2 Materialien

Tab. 2: Übersicht über verwendete Materialien sowie deren Hersteller.

Material	Hersteller
Applied Biosystems™ MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific
Applied Biosystems™ MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific
BD Falcon™ Tubes, 15 ml, 50 ml	BD Biosciences
Cell-Scraper	Corning Inc. Costar®
Chamber Slide™	Lab-Tek®, Thermo Fisher Scientific
Dako Pen	DAKO
Hamilton-Spritze, Serie7000, 1 µL	MICROLITER®, Carl Roth GmbH
MACS Säulen (LS, MS)	Miltenyi Biotec
MACS Separator	Miltenyi Biotec
Magnetrührer Yellowlin	MSH
Mikrotiterplatten, 96-Well, flat bottom	Cellstar®, greiner bio-one
Nahtmaterial	Ethicon, Prolene
Pipetten	Eppendorf
Pre-Separation filter (30 µm)	Miltenyi Biotec
Skalpelle, verschiedene Größen	B. Braun
SuperFrost Plus Objektträger	Langenbrick
Zellkulturflaschen (T25, 25 cm² Fläche; T75, 75 cm² Fläche)	BD Biosciences

4.1.3 Reagenzien und Kits

Tab. 3: Übersicht über verwendete Reagenzien/Kits und deren Hersteller.

Reagenz/Kit	Hersteller
Baytril® (2,5 %)	Bayer HealthCare
Bepanthen®	Bayer HealthCare
Brefeldin A	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich
Casein	Carl Roth
CD11b MicroBeads	Miltenyi Biotec
Cytochalasin D	Thermo Fisher Scientific
DAPI	Sigma-Aldrich
DMSO	Merck-Millipore
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck-Millipore
Finadyne (Flunixin)	Essex Tierarzney
Fluoresbrite™ Carboxylate1, 75 µm, beads, red	Polysciences, Inc.
Formaldehyd	Sigma-Aldrich

4 Material und Methoden

Reagenz/Kit	Hersteller
Gelatine von Kaltwasserfischhaut	Sigma Life Science
IS mounting medium DAPI	Dianova
Isofluran (Forene®)	Abbott Laboratories
Isopropanol	B. Braun
Ketavet® (100 mg/ml)	Pfizer
Magnevist® (Gadolinium)	Bayer HealthCare
Natriumchlorid	B. Braun
Natrium-Heparin	Ratiopharm
Papain Neuronal Tissue Dissociation Kit (P)	Miltenyi Biotec
Paracetamol (BEN-U-RON)	Bene Arzneimittel GmbH
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
PBS-Tabletten (Phosphate-buffered saline)	Invitrogen™ GmbH
PureLink™ RNA Mini Kit, RNA-Isolierung	ambion®, life technologies™
QuantiTect Reverse Transkription Kit	QIAGEN
Rompun® (2 %)	Bayer HealthCare
Roti®-Histokitt	Carl Roth
Saponin	Sigma
Sucrose	Roth
SYBR® Premium Ex Taq™, RTQ-PCR	Takara
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

4.1.4 Zellkulturmedien und -zusätze

Tab. 4: Übersicht über verwendete Zellkulturmedien und -zusätze und deren Hersteller.

Medien und Zusätze	Hersteller
DMEM (w/o), - High Glucose, - L-Glutamin, - Pyruvat, -Phenolrot)	Gibco®
DMEM (w), mit High Glucose, + L-Glutamin, + Pyruvat, + Phenolrot	Gibco®
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck Milipore
FCS (fötales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH
MACS Neuro Medium	Miltenyi Biotec
Mouse M-CSF	Miltenyi Biotec
Penicillin-Streptomycin (50 µg/ml)-Lösung	PAA Laboratories GmbH
RPMI-1640, + L-Glutamin, + Phenolrot	Gibco®
Trypsin 0,5 %/EDTA 1 %	PAA Laboratories GmbH

4.1.5 Verwendete Puffer und Lösungen

Tab. 5: Übersicht über verwendete Puffer/Lösungen sowie deren Zusammensetzung und Hersteller.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung und Hersteller
Casein 1 %	10 g/L in PBS
DMEM (w)/Brefeldin A (0,1 %)	1 µg Brefeldin A/1 ml DMEM (w)
Erythrozytenlyse-Puffer	10 mM KHCO ₃

	155 mM NH ₄ Cl 0,1 mM EDTA pH= 7,5
Hank Salt Solution HBSS(-) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG
Hank Salt Solution HBSS(+) Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG
PBS 1x	1 Tablette/500 ml Milipore® Wasser
PBS/0,5 % BSA	5 g BSA/1L 1x PBS
PBS/0,5 % BSA/0,5 % Saponin	5 g BSA + 5g Saponin/1L 1x PBS
PBS/0,5 % oder PBS/1 % Casein	5 g/10 g Casein/1L 1x PBS
PFA 4 %/2 %	40 g/20 g Paraformaldehyd in 1L PBS
Trypan Blau Lösung (0,4 %)	Gibco®

4.1.6 Verwendete Software

Tab. 6: Übersicht über verwendete Software und deren Hersteller/Entwickler.

Software	Hersteller/Entwickler
Analyze 10.0	AnalyzeDirect
Axio Vision 4	Carl Zeiss
EndNote X8	Thomson Reuters
Excel 2016	Microsoft
FACS Diva	BD Pharmingen™
FlowJo 7	Tree Star Inc.
ImageJ	Entwickler: Wayne Rasband (NIH), Open Source
ParaVision Version 6.0	Bruker
Prism 7	GraphPad Software

4.2 Tierexperimentelles Arbeiten

4.2.1 Tierstämme

Es wurden insgesamt vier verschiedene Mausstämme verwendet (**Tab. 7**).

Tab. 7: Überblick über verwendete Mauslinien und deren Herkunft bzw. Standort.

Mausstamm	Herkunft/Standort
C57BL/6J	Charles River (Sulzfeld, Germany)
CCR2ko.RFP: B6.129 (Cg)-Ccr2tm2.1lfc/J	Charles River (Sulzfeld, Germany) und eigene Züchtung im FEM (Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin, Charité)
CCR2ko: B6.129S4-Ccr2tm1lfc/J	Charles River (Sulzfeld, Germany) und eigene Züchtung im FEM sowie NWFZ (Neurowissenschaftliches Forschungszentrum, Charité)

Mausstamm	Herkunft/Standort
BL6/J.FracR.GFP	Eigene Züchtung im FEM

Die Tiere wurden in individuell belüfteten Käfigen (IVC-Racks) und bei 12 h/12 h-Hell-Dunkelrhythmus gehalten. Die Käfige wurden entsprechend der aktuellen Bestimmungen nur mit der maximal zulässigen Mauszahl bestückt. Außerdem wurde Anreicherungsmaterial und Haltungsfutter verwendet. Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt und wurden vonseiten des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) in Berlin im Tierversuchsantrag (TVA) G152/09 sowie G0281/14 genehmigt. C57BL/6J Mäuse gelten in der tierexperimentellen Forschung heutzutage als Standard. Der BL6-Stamm wurde bereits 1921 von C. C. Little entwickelt. Der definitive Subtyp C57BL/6J wurde von Jackson Laboratory, USA generiert (83, 84). CCR2ko sowie CCR2ko.RFP Mäuse beruhen auf dem gleichen genetischen Hintergrund, tragen jedoch im ersteren Falle einen Knockout für das CCR2-Gen, im letzteren Falle wird die Sequenz durch eine für das „red fluorescent protein“ (RFP) codierende Sequenz ersetzt. Statt des C-C-Chemokin-Rezeptors 2 wird nunmehr das RFP exprimiert und ermöglicht so weiterführende Untersuchungen dieser Zellen. Ein funktionelles CCR2 wird in diesem Falle nicht mehr exprimiert. Auch die CX3CR1-eGFP-Mäuse beruhen auf dem C57BL/6J-Hintergrund. Hierbei wurde eine codierende Sequenz für das „enhanced green fluorescent protein“ (eGFP) nur in einem Chromosomensatz insertiert, sodass der CX3C-Rezeptor 1 weiterhin, in Kombination mit eGFP exprimiert wird. Dieses Verfahren wurde bereits vor ca. 20 Jahren erfolgreich angewandt (85). Die Heterozygotie in Bezug auf den Rezeptor führt nicht zu einem diesbezüglichen Funktionsverlust im Rahmen des verwendeten Tumormodells (86, 87). Die Expression von fluoreszierenden Farbstoffen macht es letztlich möglich, zwischen residenten Mikroglia und peripher einwandernden Monozyten/Makrophagen zu unterscheiden.

Alle im Experiment verwendeten Mäuse waren im Alter zwischen 2 und 12 Monaten und wogen zwischen 20 g und 38 g.

4.2.2 Narkose und Vorbehandlung

Im Folgenden wird die Zusammensetzung der verwendeten Narkose dargestellt (**Tab. 8**).

Tab. 8: Zusammensetzung der Narkose.

Substanz	Menge
NaCl 0,9 %	1620 µl
Ketamin 10 %	340 µl
Rompun 2 %	120 µl

Im Regelfall belief sich die Konzentration der Narkose auf 60-80 µl/10 g Körpergewicht (KG). Die Narkosetiefe wurde mittels Reflextestung an den Hinterpfoten überprüft. Erst bei ausreichender Narkosetiefe wurde mit den Experimenten begonnen. Um ein Austrocknen der Augen zu vermeiden, wurde immer auf eine ausreichende Bedeckung dieser mit einer Pflegesalbe (Bepanthen, Bayer) geachtet.

4.2.3 Generierung von Knochenmarkchimären

4.2.3.1 Gruppenübersicht

Insgesamt wurden vier verschiedene Knochenmarkchimären mittels Kopfschutzbestrahlung etabliert (**Abb. 5**). Nachfolgende Abbildung beschreibt die jeweiligen Empfänger (Rezipienten) sowie Knochenmarkgeber (Donoren). So diente die erste Gruppe mit funktionierendem CCR2 sowohl auf Mikroglia als auch auf Makrophagen (wt/wt) als Kontrolle, in den anderen Gruppen waren jeweils die Mikroglia (ko/wt) oder Makrophagen (wt/ko) oder beide Zelltypen defizient für den C-C-Chemokin-Rezeptor 2 (ko/ko). Die Effizienz der Knochenmarkrestitution wurde nach 6-8 Wochen mittels Blutentnahme überprüft (4.2.4). Danach erfolgte die Tumorzellimplantation (TZI) (4.2.5).

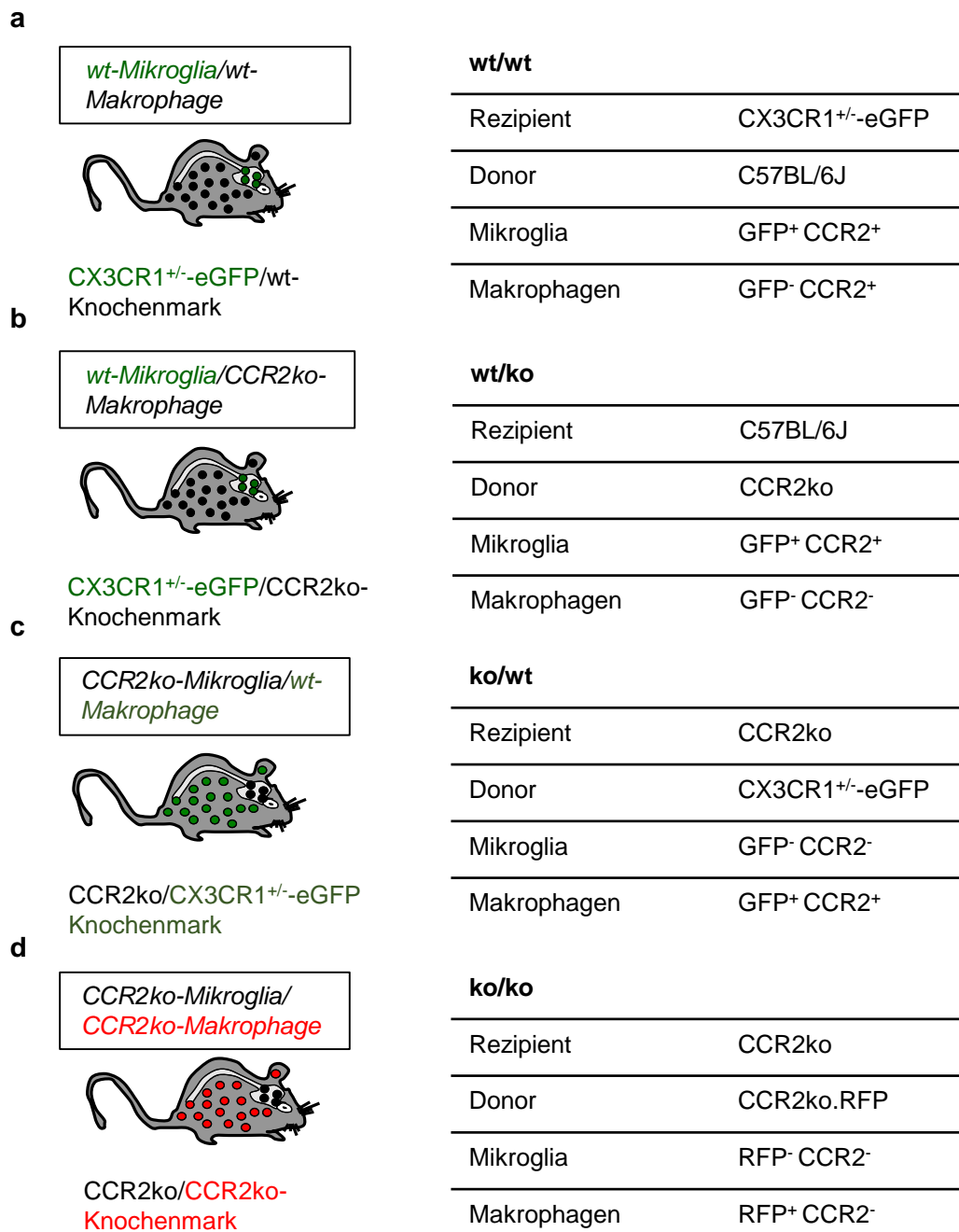


Abb. 5: Übersicht über alle generierten Chimärengruppen. Es wurden insgesamt vier verschiedene Gruppen (a-d) generiert, die mit wt/wt (a), wt/ko (b), ko/wt (c) und ko/ko (d) abgekürzt werden. Der erste Teil dieser Abkürzung bezieht sich auf die Mikroglia, der letzte auf die Makrophagen in Bezug auf den Wildtyp-(wt-) oder Knockout-(ko-)Status des CCR2. Die Unterscheidung zwischen residenten Mikroglia und einwandernden Makrophagen geschieht über die Fluoreszenzsignale eGFP (wt/wt, wt/ko, ko/wt) oder RFP im Falle der ko/ko-Gruppe.

4.2.3.2 Präparation der Hinterbeine zur Knochenmarkisolierung

Zur Gewinnung von Knochenmarkzellen der Donortiere wurden diese Tiere narkotisiert und mittels zervikaler Dislokation getötet. Danach erfolgte das Befestigen der Tiere auf

einem dafür vorgesehenen Brett mittels Nadeln und die Entfernung von Haut- und Muskelgewebe, um die Beine möglichst nah am Rumpf abschneiden zu können. Diese wurden dann in mit PBS bedeckte Petrischalen auf Eis überführt. Die Knochenmarkzellen wurden schließlich wie unter 4.3.1 beschrieben isoliert.

4.2.3.3 Kopfschutzbestrahlung

Im Vorfeld der Bestrahlung erhielten die Knochenmarkempfänger, die sog. Rezipienten, eine Woche vor sowie bis zu acht Wochen nach dem Eingriff ein mit Baytril® angereichertes Trinkwasser, um Infektionen zu vermeiden. Baytril® ist ein in der Veterinärmedizin häufig verwendetes Antibiotikum. Diese Behandlung ist erforderlich, da für eine erfolgreiche Knochenmarktransplantation eine myeloablative Bestrahlung der Knochenmarkempfänger notwendig ist, durch die das hämatopoetische System zerstört wird. Infolgedessen wird das Immunsystem stark geschwächt, was die Anfälligkeit für Infektionen erklärt. Zunächst wurden die Mäuse narkotisiert und dann in einer Bestrahlungseinheit mit einer subletalen Dosis von 11,5 Gy (1150 rad) in einer speziellen Einrichtung, bei der der Kopf durch einen Bleimantel geschützt bleibt (**Abb. 6**), bestrahlt. Diese ist notwendig, um unspezifisches Einwandern von Immunzellen durch Schädigung der Blut-Hirn-Schranke zu vermeiden (51). Im Anschluss wurde den Mäusen Flunixin 2,5 mg/kg KG s.c. verabreicht, um eventuell auftretende Schmerzen zu lindern. Über eine Wärmedecke wurde die Körperkerntemperatur möglichst konstant gehalten.

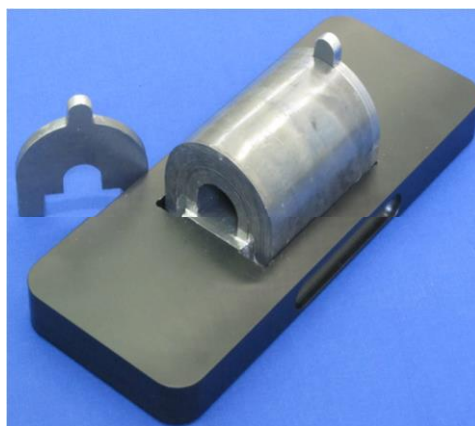


Abb. 6: Bleischutz zum Schutze des Kopfes bei Bestrahlung. Insgesamt können durch dieses System zwei Mäuse gleichzeitig bestrahlt werden. Dazu werden die narkotisierten Mäuse mit ihren Köpfen voran in ventraler Position in die Öffnungen geschoben und durch zwei Bleitore fixiert. Abbildung entnommen aus (88).

4.2.3.4 Transfer der gewonnenen Knochenmarkzellen

Nach maximal 12 h wurden Knochenmarkzellen von den Donortieren intravenös verabreicht. Diese wurden wie unter 4.3.1 beschrieben isoliert und danach kühl gelagert. Für die intravenöse Injektion wurde die unter **Abb. 7** zu sehende Box verwendet. Die Mäuse wurden darin in wachem Zustand platziert. Damit die Schwanzvenen hervortreten und so das einfache Kanülieren ermöglichen, wurden diese mit einer Infrarotlichtlampe ca. eine Minute lang erwärmt. Danach wurden 200 μ l der vorbereiteten Zellen in einem möglichst flachen Winkel mit einer 30-G-Kanüle in die entsprechende Schwanzvene gespritzt.



Abb. 7: Box zur intravenösen (i. v.) Injektion sowie zur Blutentnahme. Die Maus wird dergestalt in ventraler Position in die Box geführt, sodass der Schwanz durch die schlitzförmige Öffnung hinten nach außen geleitet werden kann. Nach Schluss des Deckels kann nun der Schwanz in die gewünschte Position gebracht werden, um die entsprechenden Prozeduren ausführen zu können. Abbildung entnommen aus (88).

4.2.4 Blutentnahme und weitere Aufbereitung

Nach ca. 6-8 Wochen war die Knochenmarkrekonstitution, d.h. die Etablierung eines neuen hämatopoetischen Systems, abgeschlossen und wurde durch eine Blutentnahme und anschließender durchflusszytometrischer Analyse überprüft. Vor der eigentlichen Blutentnahme wurden 1,5-ml-Tubes mit 1 ml DMEM (w/o) und 10 μ l Heparin (1:100) befüllt, gut gemischt und auf Eis gestellt. Der Mausschwanz wurde mit Rotlicht erwärmt und anschließend auf Höhe der Vene durch ein Einwegskalpell der Größe 15 angeritzt. Nun wurden 6-8 Tropfen Blut in die vorbereiteten Tubes überführt. Nach Beendigung der Blutentnahmen wurde der Inhalt der 1,5-ml-Tubes in 15-ml-Tubes überführt, wobei jedes Tube (1,5 ml) noch einmal mit DMEM (w/o) gespült wurde,

um eventuelle Rückstände zu vermeiden. Nach Hinzufügen von 8 ml Erythrozytenlysepuffer wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Als Abstoppmedium wurden jeweils 5 ml kaltes PBS/0,5 % BSA verwendet. Im letzten Schritt wurden die Tubes für 10 min bei 1400 Umdrehungen pro Minute (RPM) und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 1 ml PBS/0,5 % BSA resuspendiert und schließlich in 1,5-ml-Tubes überführt. Sofern das Zellpellet noch zu viele unlysierte Erythrozyten enthielt, was sich durch eine deutliche Rotfärbung bemerkbar machte, wurde der Schritt der Erythrozytenlyse wiederholt. Nun wurden die Proben wie in 4.3.8.1 beschrieben gefärbt.

4.2.5 Stereotaktische intrazerebrale Implantation von GL261-Tumorzellen

GL261-Tumorzellen wurden wie in 4.3.2.1 vorbereitet und auf Eis gestellt. Die Zellkonzentration für die Implantation lag bei 2×10^4 -Zellen/1 μ l 1x PBS. Zur stereotaktischen Implantation wurden die Mäuse zunächst narkotisiert und der Kopf großflächig rasiert. Dann wurden sie in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt und eine ca. 1 cm große Schädelhautinzision durchgeführt. Nach Aufsuchen des Bregmas wurde die Implantationsstelle mit den Koordinaten +1 mm anterior und +2 mm rechts-lateral mit Hilfe einer 23G-Nadel aufgebohrt. Die Injektion der Zellen mit einer 1 μ l Hamilton-Spritze erfolgte in einer Tiefe von 3 mm, wobei die Spritze zunächst auf 4 mm justiert wurde, um ein Zellreservoir zu schaffen. Über eine Zeitdauer von 5 min wurde die Spritze gleichmäßig entleert. Nach weiteren 5 min Wartezeit wurde die Spritze über einen Zeitraum von 5 min wieder aus dem Schädel herausgedreht. Die Haut wurde über eine fortlaufende Naht geschlossen. Bis zum vollständigen Erwachen wurden die Tiere auf eine Wärmeplatte gelegt und ihre Vitalparameter überwacht. Für eventuelle postoperative Schmerzen wurde dem Trinkwasser für 24-48h Paracetamol in einer Dosierung von 300 mg/kg KG zugesetzt.

4.2.6 Kardiale Gehirnperfusion und -entnahme

An Tag 21 (d21) des Tumorwachstums wurden die Tiere narkotisiert und anschließend durch kardiale Gehirnperfusion getötet. Dazu wurde eine Thorakotomie der Mäuse durchgeführt und anschließend die obere und untere Hohlvene im Bereich des rechten Herzens durchtrennt. Danach wurden langsam und gleichmäßig 10 ml kaltes PBS (für Mikroglia/Makrophagen-Isolierung mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse) oder PFA (4 %) (für Immunfluoreszenzanalysen) mittels einer 23-G-Kanüle in den

linken Ventrikel gedrückt. Mit einer Schere wurde daraufhin der Kopf vom Körper getrennt. Die Freilegung des Gehirns erfolgte dann durch behutsames Abtrennen der Haut bzw. des Schädelknochens vom Großhirn durch Verwendung von Pinzette und Skalpell. Das Gehirn wurde, je nach Verwendung (s. o.), auf mit kaltem HBSS (w/o) gefüllte Schälchen platziert oder in mit kaltem PFA (4 %) gefüllte Tubes gelegt.

4.2.7 Bildgebende Verfahren

4.2.7.1 Magnetresonanztomographie (MRT)

Um den Progress der Tumore und ihre Volumina zu bestimmen, wurden die Mäuse an Tag 7, 14 und 21 (d7, d14, d21) mit und ohne Kontrastmittel gescannt. Zunächst wurde den Mäusen das Kontrastmittel Magnevist® intravenös mittels 30-G-Kanüle verabreicht. Dabei wurde Magnevist® im Mastermix von 300 µl Magnevist® und 700 µl NaCl angemischt. Pro Tier wurden 100 µl dieser Mischung verwendet. Anschließend wurden die Mäuse in einem dafür vorgesehenen Behältnis mittels N₂O (ca. 70 %)-Sauerstoff (ca. 30 %)-Isofluran (1-2 %)-Mischung in Narkose versetzt und in einen MRT-Schlitten eingespannt. Während des Scanvorgangs wurde die Narkose über einen Schlauch aufrechterhalten. Die Vitalparameter Atemfrequenz und Körperkerntemperatur konnten im Kontrollraum überwacht werden. Die Narkosetiefe richtete sich nach der Atemfrequenz und lag zwischen 80 und 120 Atemzügen pro Minute. Der erste Scanvorgang war ein Scan mit T2-Gewichtung, welche vor allem Flüssigkeiten hyperintens darstellt. Im Anschluss wurde eine T1-gewichtete Aufnahme durchgeführt, die vor allem kontrastmittelaufnehmende Strukturen hell darstellt. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe des auf Linux basierten Programms Paravision 6.0 ausgeführt. Die anschließenden volumetrischen Messungen wurden in Analyze 10.0 vorgenommen. Im Anschluss der Aufnahmen wurden die Mäuse zurück in die Käfige gesetzt und bis zum Aufwachen überwacht.

4.2.7.2 ¹H-Magnetresonanzspektroskopie (¹H-MRS)

Die ¹H-Magnetresonanzspektroskopie tauchte Anfang der 80er Jahre erstmals in klinischer Anwendung auf und spielt insbesondere bei der Hirntumordiagnostik eine große Rolle (89). Sie ist ein *In-vivo*-Verfahren zur Bestimmung von Metabolitenkonzentrationen in Geweben. Das Prinzip beruht hierbei auf der Messung der Absorption von einstrahlenden elektromagnetischen Wellen (Radiofrequenzbereich) von ¹H-Atomen

bei angelegtem Magnetfeld. Diese ist, je nach chemischer Nachbarschaft bzw. magnetischer Abschirmung, unterschiedlich. Daher besitzt jedes Molekül eine für sich charakteristische Auflösung. Über die Höhe bzw. das Integral unter dem jeweiligen Molekül kann dann die Stoffkonzentration in einem vorgegebenen, dreidimensionalen Bereich (auch Voxel genannt) bestimmt werden (80, 90).

Die spektroskopischen Messungen wurden durchgeführt, um Unterschiede im Metabolismus der Mäuse festzustellen. Dabei wurden Mäuse in allen vier Chimärengruppen mit und ohne Tumor verglichen. Die Untersuchung wurde mit Hilfe des gleichen MRT-Gerätes durchgeführt wie die Aufnahmen unter 4.2.7. Narkoseart und Überwachung blieben identisch. Nach erfolgter Rekonstitution, d.h. ca. 6-8 Wochen nach Knochenmarktransplantation, fanden die Baseline-Messungen statt, um Unterschiede in Metabolitenkonzentrationen bereits prä-tumoral detektieren zu können. Die Messung fand im striatalen Bereich statt, in dem auch die spätere Tumorzellimplantation stattfand (Abb. 8). Hierfür wurde ein Voxel von $5,832 \text{ mm}^3$ Größe im entsprechenden Bereich positioniert. Eine weitere Messung fand dann am d21 im Zuge der MR-tomographischen Messungen vor Gabe des Kontrastmittels statt. Bei allen Messungen wurde stets darauf geachtet, dass sich im Voxel weder Ventrikel- noch Knochenanteile befanden, die die Messungen erheblich hätten beeinträchtigen können.

Es wurden insgesamt 35 Metabolite in ihrer absoluten Konzentration gemessen. Zur Auswertung zugelassen wurden letztlich 13 Metabolite. Eine Voranalyse und -auswertung wurde durch die Mitarbeiter der „Core Facility 7T Experimentelle MRTs“ mit Hilfe des Programms „LCModel“ durchgeführt. Die Zuordnung der Metabolite anhand ihrer chemischen Verschiebung wurde auf Grundlage bereits veröffentlichter Literatur vorgenommen (91, 92).

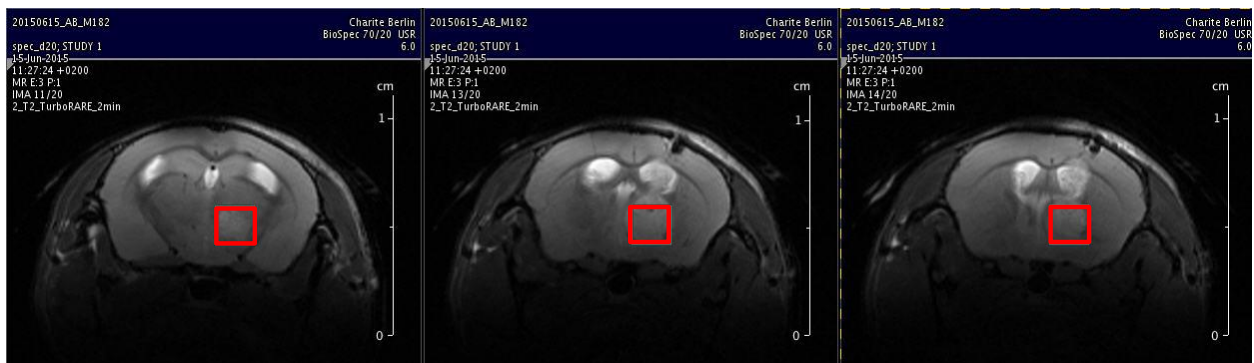


Abb. 8: Beispielhafte Darstellung eines Voxels über drei MRT-Schichten im Rahmen einer spektroskopischen Messung. Durch initiale MRT-Übersichtsaufnahmen wird der Voxel über dem Tumor

positioniert. Im Anschluss findet die Bestimmung der Metabolite in diesem dreidimensionalen Bereich statt.

4.3 Zellbiologische Methoden

Alle Experimente, in denen Zellen über mehrere Tage hinweg kultiviert wurden, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die eingesetzten Medien wurden hier, sofern nicht anders vermerkt, im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

4.3.1 Isolierung von Knochenmarkzellen zum Knochenmarktransfer und zur Makrophagendifferenzierung

Die nachfolgenden Schritte wurden alle unter sterilen Bedingungen an der Sterilwerkbank durchgeführt. Um die Knochenmarkzellen aus den präparierten Femurknochen (4.2.3.2) herauslösen zu können, wurden diese an beiden Enden mittels Schere eröffnet. Danach wurde das Knochenmark mit einer 10-ml-Spritze kaltem PBS und einer 23-G-Kanüle gespült und dessen Inhalt in eine neue Petrischale überführt. Der Inhalt von 4 Beinen wurde schließlich (insgesamt 40 ml) in ein 50-ml-Tube überführt und dann bei 1300 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet resuspendiert und zum Vereinzeln über einen Pre-Separation-Filter gegeben. Anschließend erfolgte nur noch die Zellzählung in einer Neubauer (improved) Zählkammer wie unter 4.3.4 beschrieben und das Verdünnen auf $1,5 \times 10^7$ Zellen/200 μ l PBS für den Transfer des Knochenmarks in die bestrahlten Tiere zur Chimärengenerierung. Alternativ wurden die Knochenmarkzellen zur weiteren Kultivierung wie unter 4.3.3 beschrieben verwendet.

4.3.2 Arbeiten mit der Zelllinie GL261

An der Zelllinie GL261 als syngenes Modell für das Glioblastom wird bereits seit Jahrzehnten intensiv geforscht (93). Sie entstand durch intrazerebrale Inokulation von Methylcholanthren, ein karzinogener Stoff, in C57BL/6-Mäuse und konsekutive Weiterverpflanzung von Teilen dieses Tumors (94, 95).

4.3.2.1 Kultur von GL261-Zellen

Nach Auftauen, Waschen und Zentrifugation der GL261-Zellen (4.3.2.3) wurden diese in eine mit 10-12 ml Medium befüllte Zellkulturflasche (T75) überführt. Nach 3 Tagen

im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95-98 % relativer Luftfeuchte (Standardbedingungen) wurde eine gewünschte Konfluenz von 80 % erreicht. Nachdem die Zellen mit 2×5 ml 1× PBS gewaschen wurden, erfolgte die Trypsinierung wie unter 4.3.2.2 beschrieben. Nach Abstoppen und Zentrifugation wurden die Zellen nochmals mit 20 ml 1× PBS gewaschen und schließlich in 1 ml 1× PBS aufgenommen. Die Zellzahl wurde bestimmt (4.3.4) und auf 2×10⁴ Zellen/μl 1× PBS eingestellt. Bis zur Tumorzellimplantation (4.2.5) wurden die Zellen auf Eis gestellt. Für GL261-Zellen wurde als Medium stets DMEM mit High Glucose, L-Glutamin, Pyruvat, Phenolrot (DMEM (w)) und als Zusätze 10 % fötales Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) verwendet.

4.3.2.2 Subkultivierung/Passagieren

Nach 3-4 Tagen Kultivierung von GL261-Zellen wurde eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht. Zunächst wurde das Medium abgesaugt, dann wurde die Flasche (T75) mit 5 ml 1× PBS (37 °C) gewaschen und ca. 2 ml Trypsin (0,5 % Trypsin/1 % EDTA) hinzugegeben, um eine Ablösung der Zellen vom Flaschenboden zu bewirken. Um die enzymatische Reaktion zu beschleunigen, wurde die Flasche für 1-2 min in den Brutschrank gestellt. Nach behutsamem Schlagen gegen die Flasche zum Ablösen der Zellen wurde die Reaktion durch Hinzufügen von ca. 20 ml DMEM ((w), +FCS/ P/S)) abgestoppt und der gesamte Inhalt in ein 50-ml-Tube überführt. Nach Zentrifugation (1300 RPM, 7 min, RT) und Absaugen wurde das Zellpellet zunächst in 1 ml Medium resuspendiert und entsprechend der Anzahl der Zellen auf 5-7 Zellkulturflaschen aufgeteilt.

4.3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Grundprinzip des Einfrierens und Auftauens von Zellen ist das schnelle Auftauen und das langsame Einfrieren. Das Lösen der Zellen mittels Trypsin erfolgte wie unter 4.3.2.2 beschrieben. Die Einfrierlösung bestand aus FCS (90 %) und DMSO (10 %). Das Zellpellet einer Zellkulturflasche (T75) mit 80%iger Konfluenz wurde in 5 ml kalter Einfrierlösung aufgenommen und in 5 Tubes à 1 ml aufgeteilt. Diese Tubes wurden dann in ein spezielles Einfrierbehältnis mit Propanolbefüllung gesteckt und für 24 Stunden bei -80 °C gelagert. Danach konnten die Tubes in den Stickstofftank überführt werden. Beim Auftauen wurden diese aus dem Stickstofftank entnommen und für 1-

2 min im Wasserbad (37 °C) geschwenkt, um ein schnelles Auftauen zu bewirken. Danach wurde die Lösung in ein mit 10 ml Medium (DMEM (w), +FCS/ P/S) befülltes 50-ml-Tube überführt und bei 1300 RPM sowie Raumtemperatur (RT) für 7 min zentrifugiert. Anschließend wurde weiter verfahren wie unter 4.3.2.1 beschrieben.

4.3.2.4 Herstellung von Tumor-konditioniertem Medium (TCM)

Für die durchgeführten *In-vitro*-Experimente wurde ein Medium benötigt, das den realen Bedingungen bzgl. vorhandener Tumorzytokine *in vivo* möglichst gut Rechnung trägt. Dazu eignet sich das Tumor-konditionierte Medium. Es wurde hergestellt, indem GL261-Zellen über drei Tage lang kultiviert wurden. In Abhängigkeit der Zielzellen wurde für die Mikroglia-stimulation DMEM ((w), +FCS/ P/S) und für die Makrophagen-stimulation RPMI (+FCS/ P/S) als Kulturmedium verwendet (4.3.6). Der Überstand wurde zunächst zwei Mal für 10 min bei 4000 RPM und RT zentrifugiert und diente dann als Nährmedium für die entsprechenden Experimente. Bei 4 °C wurde das TCM für maximal eine Woche aufbewahrt.

4.3.3 Kultur von murinen Monozyten/Makrophagen

Zur Kultivierung von Monozyten/Makrophagen bzw. deren Vorläuferzellen wurde das Knochenmark naiver Tiere, wie unter 4.3.1 beschrieben, aufbereitet. Statt der Zellzählung wurde das Knochenmark von drei CCR2ko bzw. drei CX3CR1-eGFP-Mäusen in jeweils eine Zellkulturflasche (T75) überführt. Das hierfür verwendete Medium war RPMI mit L-Glutamine mit den Zusätzen FCS (10 %) sowie P/S (1 %). Als Wachstumsfaktor wurde M-CSF in einer Konzentration von 20 ng/ml hinzugefügt. Ein Mediumwechsel fand alle zwei Tage statt.

4.3.4 Zellzahlbestimmung

Zellzahlen wurden mittels einer Neubauer improved-Zählkammer gezählt. Prinzip ist hierbei die mikroskopische Auszählung von Zellen, die sich in einem bestimmten Volumen befinden. Daraus kann dann die Zellkonzentration bestimmt werden.

In Vorbereitung der Auszählung wurden die entsprechenden Zellen in 1 ml Medium (1x PBS oder DMEM ((w) /FCS/ P/S) aufgenommen. Hiervon wurden 10 µl entnommen und in einem Well einer 96-Well-Platte 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Trypanblau färbt alle toten Zellen an, sodass diese bei der Zählung ausgeschlossen werden

konnten. Nach Hinzufügen von 10 µl der verdünnten Lösung unter das Deckplättchen in die Zählkammer wurde diese lichtmikroskopisch ausgewertet. Aus den Zellzahlen aller vier Quadranten erhielt man schließlich über folgende Formel die absoluten Zellzahlen:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \left(\frac{\text{Summe der Zellzahlen}}{4} \right) * 10^4 (KF) * 10 (VF) * 1 \text{ ml}$$

Dabei stellt KF den Kammerfaktor dar, der das gegebene Volumen der Zählkammer berücksichtigt und VF den individuellen Verdünnungsfaktor, der entweder 10 oder 20 betrug. Am Ende wird das Produkt noch mit dem Volumen der Gesamtlösung multipliziert; in den meisten Fällen war es 1 ml.

4.3.5 Phagozytose-Assay

Es wurden Phagozytose-Assays mit Makrophagen (MΦ) (4.3.3) sowie mit isolierten Mikrogliazellen (MG) aus naiven Mäusen durchgeführt. An Tag 8 der Makrophagenkultur wurden die Zellen mittels Cell-Scraper aus der Zellkulturflasche abgelöst, gezählt und in einer Konzentration von $1,2 \times 10^5$ Zellen/400 µl in Chamber Slides™ ausplattiert. Nach 3 Tagen wurde dann der Phagozytose-Assay durchgeführt. Mediumwechsel fand an Tag 2 statt. Die verwendeten Mikrogliazellen stammten aus der Isolierung, die unter 4.3.7.2 beschrieben wird. Der Assay fand nach acht Tagen statt, das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt.

Die Vorbereitung der Phagozytose-Beads gestaltete sich wie folgt: Im ersten Schritt erfolgte das sog. Coating, dazu fügte man 25 µl der Beads (Ø1,75 µm) zu 1 ml FCS und stellte sie für 30 min bei 1000 RPM und RT auf den Schüttler. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 3000 RPM wurden diese mit 1 ml RPMI (w/o FCS, P/S) gewaschen und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Im letzten Schritt wurden die beads in 5 ml RPMI (w/o FCS, P/S) resuspendiert. Von der hergestellten Lösung wurden 300 µl in jede Kammer der Chamber Slides™ hinzugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden diese mit 1× PBS zwei Mal gewaschen und mit 70 µl PFA (4 %) für 20 min fixiert. Nach drei weiteren Waschsritten (1× PBS à 100 µl) konnten die Objektträger in 1× PBS bei 4 °C für ihre weitere Verwendung gelagert werden. Der Assay wurde mit verschiedenen Zellen und Konditionen durchgeführt (Tab. 9).

Tab. 9: Übersicht des Phagozytose-Assays mit allen Konditionen.

	MG		MΦ	
	CX3CR1-eGFP	CCR2ko	CX3CR1-eGFP	CCR2ko
Kondition 1	DMEM (w/o FCS, P/S)		RPMI (w/o FCS, P/S)	
Kondition 2	TCM			

4.3.6 Stimulation von Mikroglia/Makrophagen *in vitro*

Ein weiterer Assay befasste sich mit der Stimulation von Mikroglia/Makrophagen *in vitro*, um bestimmen zu können, inwiefern und in welchem Ausmaß CD45 hochreguliert werden kann.

Nach Isolierung der naiven Mikroglia (4.3.7.2) bzw. Kultivierung und Ablösung der Makrophagen aus der Zellkulturflasche (4.3.3 und 4.3.5) wurden diese in 96-Well-Platten in einer Konzentration von $1 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$ im Falle der Mikroglia bzw. in einer Konzentration von $6 \times 10^4 / 200 \mu\text{l}$ im Falle der Makrophagen ausplattiert. Nach 3 und 6 Tagen erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zellen hinsichtlich ihrer CD45-Expression (4.3.8.2) und Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (*engl. mfi: mean fluorescence intensity*). Ein Mediumwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt, die Ablösung aus den Wells erfolgte mittels Trypsin.

Nachfolgend eine Übersicht über den Assay mit allen Konditionen (**Tab. 10**).

Tab. 10: Übersicht der CD45-Stimulierung *in vitro* mit allen Konditionen.

	MG		MΦ	
	CX3CR1-eGFP	CCR2ko	CX3CR1-eGFP	CCR2ko
Kondition 1	DMEM (+ 10 % FCS, + 1 % P/S)		RPMI (+10 % FCS, + 1 % P/S)	
Kondition 2	TCM			
Kondition 3	Neuromedium			

4.3.7 Zellseparation und Aufreinigung von Mikroglia/Makrophagen

4.3.7.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension

Nach der kardialen Hirnperfusion (4.2.6) wurden die Hirne einer Prozedur unterzogen, deren Ziel die Herstellung einer Einzelzellsuspension war, um danach gezielt Mikroglia/Makrophagen via CD11b-Sortierung isolieren zu können. Grundsätzlich beruhen die folgenden Schritte auf dem Protokoll des Herstellers (Neural Tissue Dissociation Kit (P), Miltenyi Biotec) und sind daher verkürzt dargestellt.

Im ersten Schritt wurden die auf mit HBSS (w/o) platzierten Hirne vom Kleinhirn getrennt. Dann wurden diese mittels Skalpell gründlich zerkleinert und in 15-ml-Tubes überführt und für 2 min bei 1300 RPM zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das resuspendierte Zellpellet für 15 min bei 37 °C enzymatisch verdaut. Nach Hinzufügen des zweiten Enzymmixes wurde die Zellsuspension über feuerpolierte Pasteurpipetten durch beständiges Herauf- und Herunterpipettieren mechanisch zerkleinert. Diese Prozedur wurde mit einer Pasteurpipette kleinerer Öffnung wiederholt. Die Suspension wurde dann mit einem Pre-Separation-Filter (30 µm) gefiltert und entsprechende Tubes mit HBSS (w) ausgespült, um den Zellverlust so gering wie möglich zu halten. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS/0,5 % BSA wurden die vereinzelt Zellen schließlich in PBS/0,5 % BSA aufgenommen und wurden nun entweder durchflusszytometrischen Messungen oder der MACS-Sortierung via CD11b-Markierung unterzogen.

4.3.7.2 Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) via CD11b-Markierung

Das Grundprinzip der auf magnetischen Beads basierten Zellsortierung beruht auf der Markierung entsprechender Zellen mit sog. MicroBeads. Durch diese Markierung werden die Zellen über einen starken Magneten in speziellen Säulen zurückgehalten und es kann eine Reinheit von nahezu 100 % erreicht werden (Positivselektion). Erstmals wurde es von Miltenyi *et al.* beschrieben (96), der Gründer der Miltenyi Biotec GmbH. Grundsätzlich beruhen die folgenden Schritte auf dem Protokoll des Herstellers (CD11b MicroBeads, Miltenyi Biotec) und werden daher verkürzt dargestellt.

Im ersten Schritt wurde die unter 4.3.7.1 hergestellte Einzelzellsuspension für 15 min bei 8 °C mit CD11b-MicroBeads inkubiert. Danach wurde die Suspension in eine LS-Säule überführt, die zuvor im Magnetfeld des MACS Separators platziert wurde. Nach drei Waschschritten mit PBS/0,5 % BSA wurden die Zellen mit 5 ml PBS/0,5 % BSA aus der Säule eluiert und eine zweite Aufreinigung mit kleineren, sog. MS-Säulen durchgeführt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen schließlich in 1 ml PBS/0,5 % BSA eluiert und für durchflusszytometrische Messungen (Reinheitsbestimmung), *In-vitro*-Versuche oder RNA-Isolierungen auf Eis gestellt.

4.3.8 Durchflusszytometrische Analysen

Im Zuge der Arbeit wurden vielfältige durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. Das Prinzip beruht hierbei auf der Verwendung von Lasern, die auf Zellen gerichtet sind. Je nach Ablenkung der Strahlen bzw. Emission von Strahlen bei durch Antikörper markierte Zellen können Aussagen über die Zellgröße, die Granularität sowie spezifische Antikörperbindungen getroffen werden. Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension werden die Zellen über einen Sog in laminarer Strömung an den Lasern unterschiedlicher Wellenlängen vorbeigeleitet und bestrahlt. Nach Ablenkung der Lichtstrahlen und Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe werden diese über ein komplexes System von Spiegeln und Filtern zu den Detektoren geleitet und schließlich digitalisiert über eine Software dargestellt. Das Prinzip der fluorochrombasierten Zytometrie beruht auf der Färbung von Zellen mittels bestimmter Antikörper, die beispielsweise gegen Epitope bestimmter Oberflächenmoleküle wie CD11b oder intrazellulärer Zytokine wie TNF α gerichtet sind. Diese Antikörper sind wiederum an Fluoreszenz-Farbstoffe gekoppelt, die durch Laser bestimmter Wellenlängen angeregt werden und deren Emissionen erfasst werden können (97). Wichtig ist hierbei zu wissen, dass bei diesen Analysen Messungen von einzelnen Zellen stattfinden. Somit ist es möglich, mittels eines FACS-Gerätes diverse qualitative und quantitative Auswertungen von Tausenden von Zellen durchzuführen (98).

4.3.8.1 Aufbereitung und Färbung von Blutproben

Nach Blutentnahme und Erythrozytenlyse wie unter 4.2.4 beschrieben, wurden die Proben mit 100 μ l PBS/0,5 % BSA und den entsprechenden Antikörpern (**Tab. 11**) für 20 min in Dunkelheit auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 2400 RPM für 7 min und 4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 300 μ l PBS/0,5 % BSA aufgenommen und konnten anschließend analysiert werden. Die Erfassung aller myeloider Zellen im Blut erfolgte über die Antikörper CD11b und CD45, wobei zu beachten war, dass nur für Blut aus den Gruppen wt/wt, wt/ko und ko/wt Phycoerythrin (PE)-konjugierte Antikörper für die CD11b-Färbung verwendet wurden. Die myeloiden Zellen der Donortiere in der ko/ko Gruppe exprimieren nämlich RFP, welches ähnliche Emissionscharakteristika wie PE aufweist. Hierbei käme es zu unerwünschten Interferenzen. Daher wurde in der letzten Gruppe der Fluorescein isothiocyanate(FITC)-konjugierte Antikörper CD11b verwendet, CD45 wurde in allen

Gruppen über Allophycocyanin(APC)-konjugierte Antikörper erfasst. Für die Färbung von T-Zellen wurden Alexa Fluor(AF)700 anti-CD4 und Peridinin-chlorophyll-protein complex(PerCP)-konjugierte anti-CD8 Antikörper verwendet. B-Zellen wurden mit APC anti-CD19 Antikörper markiert. Kurz vor der Messung wurde den Proben 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in einer Verdünnung von 1:100 hinzugefügt, um tote Zellen ausschließen zu können.

Tab. 11: Übersicht über verwendete Antikörper zur Färbung von Blutproben.

Antikörper	Verdünnung	Klon	Hersteller
PE anti-CD11b	1:100	M1/70	BioLegend®
FITC anti-CD11b	1:100	M1/70	BioLegend®
APC anti-CD45	1:100	30-F11	BD Pharmingen™
AF700 anti-CD4	1:100	RM4-5	BioLegend®
PerCP anti-CD8a	1:100	53-6.7	BioLegend®
APC anti-CD19	1:200	6D5	BioLegend®

4.3.8.2 Färbung von Knochenmarkzellen

Das Knochenmark der drei Mausstämme (C57BL/6J, CX3CR1-eGFP, CCR2ko) wurde hinsichtlich verschiedener Monozyten/Makrophagen-Progenitorzellen untersucht. Aufgrund der GFP-Expression der CX3CR1-eGFP-Tiere wurde hierbei zur Markierung von CD11b der V450-konjugierte Antikörper verwendet, für die beiden anderen Mausstämme der FITC anti-CD11b-konjugierte Antikörper. Vor sowie nach der Kultivierung von Monozyten/Makrophagen wurde ebenfalls der Ausreifungs- bzw. Reinheitsgrad der Kultur mittels CD11b, CD45 und F4/80-Kofärbung bestimmt (**Tab. 13**). Die Gating-Strategie der beiden Untersuchungen ist exemplarisch an **Abb. 9** zu sehen. Die Knochenmarkzellen wurden wie unter 4.3.1. beschrieben aufbereitet. 50 µl Zellsuspension wurden aus Proben (jeweils 1 ml) der drei Mausstämme gefärbt. Nach einem Waschriff mit 500 µl kaltem PBS/0,5 % BSA und anschließender Zentrifugation (2400 RPM, 6 min, 4 °C) wurden entsprechend der **Tab. 12** 50 µl Antikörperlösung hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei Dunkelheit für 10 min und 4 °C. Die Reaktion wurde mit 500 µl PBS/0,5 % BSA abgestoppt, zentrifugiert (2400 RPM, 6 min, 4 °C) und die Zellen nach Abnahme des Überstandes in 300 µl PBS/0,5 % BSA resuspendiert.

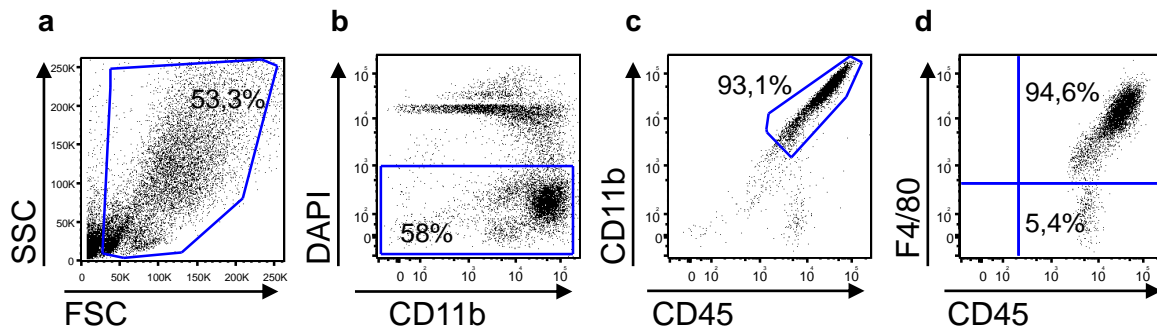


Abb. 9: Übersicht über die Gating-Strategie zur Erfassung der Reinheit an kultivierten Makrophagen. Exemplarisch wird die Reinheit einer CX3CR1-eGFP-Makrophagenkultur gezeigt. Nach Ausschluss von Zelldebris (a) und toten Zellen (b) wurde die Reinheit der Kultur über CD45, CD11b (c) und den Reifemarker F4/80 (d) bestimmt. Es konnten Reinheiten >80 % erreicht werden.

Tab. 12: Übersicht über verwendete Antikörper zur Bestimmung der Monozyten/Makrophagen-Progenitorzellen.

Antikörper	Verdünnung	Klon	Hersteller
APC anti-Ly6C	1:100	AL-21	BD Pharmingen™
FITC anti-CD11b	1:100	M1/70	BioLegend®
PE anti-CD115	1:100	T38-320	BD Pharmingen™
PerCP anti-CD45	1:100	30-F11	BioLegend®
V450 anti-CD11b	1:100	M1/70	BD Pharmingen™

Tab. 13: Übersicht über verwendete Antikörper zur Bestimmung des Ausreifungs- bzw. Reinheitsgrades der Makrophagenkultur.

Antikörper	Verdünnung	Klon	Hersteller
AF648 anti-F4/80	1:100	BM8	BioLegend®
PE anti-CD11b	1:100	M1/70	BioLegend®
PerCP anti-CD45	1:100	30-F11	BioLegend®

4.3.8.3 Aufbereitung und Färbung von primären Mikroglia/Makrophagen aus der Einzelzellsuspension

Nach Herstellung der Einzelzellsuspension (4.3.7.1) wurde den Proben (1 ml) jeweils 50 µl entnommen und gefärbt. Die CD11b⁺CD45⁺-Fraktion wurde mit den Antikörpern PE anti-CD11b für die wt/wt-, wt/ko- und ko/wt-Gruppe und FITC anti-CD11b für die ko/ko-Gruppe markiert. Für die Färbung von CD45 wurde das Fluorochrom APC verwendet. Nach Inkubation der Zellen in 100 µl PBS/0,5 % BSA für 20 min auf Eis mit den Antikörpern in entsprechender Verdünnung (Tab. 14) wurden diese mit 1 ml PBS/0,5 % BSA gewaschen und bei 2400 RPM und 4 °C für 6 min zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 300 µl PBS/0,5 % BSA resuspendiert. Kurz vor der

Messung wurde den Proben DAPI (1:100) hinzugefügt, um tote Zellen auszuschließen. Nachfolgend ist die Gating-Strategie zur Erfassung aller myeloiden Zellen ($CD11b^+CD45^+$) und der eingewanderten Makrophagen ($CD11b^+CD45^+GFP^+$) am Beispiel der wt/wt-Gruppe an d21 nach Tumorzellimplantation abgebildet (**Abb. 10**).

Außerdem wurde für CCR2 als einziges Oberflächenmolekül aufgrund seiner Relevanz in dieser Arbeit eine live-Färbung durchgeführt. Die entsprechenden Antikörper sind ebenfalls der **Tab. 14** ab Zeile 4 zu entnehmen.

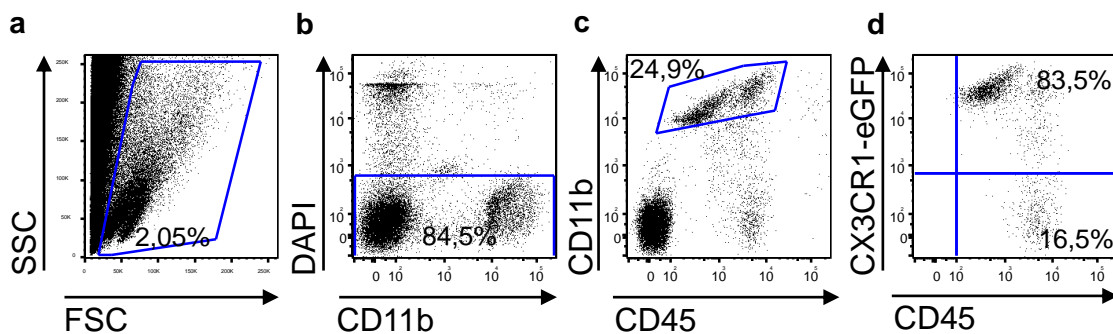


Abb. 10: Gating-Strategie zur Detektion myeloider Zellen. Gezeigt wird exemplarisch eine wt/wt Tumormaus. Nach Ausschluss von Zelldebris (a) und toten Zellen (b) wurde auf alle myeloiden Zellen ($CD11b^+CD45^+$) gateget (c). Mikroglia lassen sich dann als GFP^+CD45^+ von GFP^-CD45^+ einwandernden Makrophagen abgrenzen (d).

Tab. 14: Übersicht über verwendete Antikörper zur Färbung von unfixierten Hirnzellsuspensionen.

Antikörper	Verdünnung	Klon	Hersteller
PE rat anti-CD11b	1:100	M1/70	BioLegend®
FITC rat anti-CD11b	1:100	M1/70	BioLegend®
APC rat anti-CD45	1:100	30-F11	BD Pharmingen™
V450 anti-CD11b	1:100	M1/70	BD Pharmingen™
AF700 anti-CD45	1:100	30-F11	BD Pharmingen™
APC anti-CCR2	1:10	475301	R&D Systems®

4.3.8.4 Reinheitsbestimmung der isolierten Mikroglia/Makrophagen

Die unter 4.3.7.2 isolierten Mikroglia/Makrophagen wurden hinsichtlich ihrer Reinheit nach der 2. Positivselektion entsprechend der **Tab. 14** mit APC anti-CD45 und PE anti-CD11b und Protokoll unter 4.3.8.2. gefärbt. Nachfolgend dargestellt ist die Gating-Strategie zur Bestimmung der Reinheit an $CD11b^+$ -Zellen (**Abb. 11**).

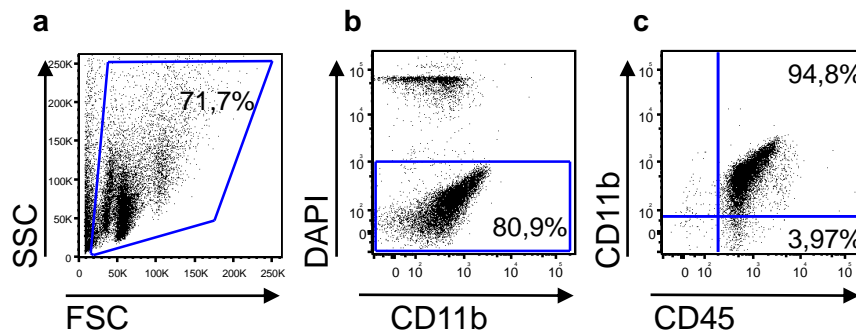


Abb. 11: Reinheitsbestimmung von isolierten Mikroglia/Makrophagen mittels MACS aus Hirnzell-suspensionen. Dargestellt ist exemplarisch die Reinheit der 2. Positivselektion einer naiven C57BL6/J Maus. Zelldebris (a) und tote Zellen (b) wurden ausgeschlossen. Die Reinheit der Zellen an CD11b⁺-Zellen betrug ca. 95% (c). Zu beachten ist hierbei die geringe Expression von CD11b aufgrund der noch gebundenen magnetischen Beads aus der Isolierung.

4.3.8.5 Weitere Aufbereitung der Zellen

4.3.8.5.1 Direkte Fixierung mittels PFA

Die Zellen wurden, um weitere Messungen und insbesondere intrazelluläre Messungen durchführen zu können, fixiert. Die Fixierung dient letztlich dazu, die phänotypische Erscheinung des Vitalzustandes der Zelle mit ihren Antigenstrukturen möglichst lange zu erhalten. Die Zellen werden dabei sofort abgetötet. Beim Fixierungsprozess mit PFA kommt es hauptsächlich zu Quervernetzungen der Proteinstruktur und damit zur Denaturierung. Die Sekundärstruktur bleibt zum größten Teil erhalten (99).

Nach Herstellung der Einzelzellsuspension wurden die Proben in 4 ml mit PBS/0,5 % BSA aufgenommen. Für die Fixierung wurde 1 ml entnommen. Dieser wurde mit 10 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und schließlich mit 2%igem PFA fixiert. Die Inkubation dauerte 20 min und fand bei RT statt. Nach Abstoppen der Reaktion mit 10 ml PBS/0,5 % BSA und Zentrifugation von 7 min bei 1300 RPM wurden die Zellen in 1 ml PBS/0,5 % BSA aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Vom restlichen Probenmaterial (3 ml) wurde 1 ml zur direkten Fixierung verwendet.

4.3.8.5.2 Aufbereitung der Zellen zur Messung von intrazellulären Zytokinen

Um intrazelluläre Zytokine messen zu können, müssen die Zellen zunächst vital bleiben und die entsprechenden Zytokine in ausreichender Menge produzieren. Damit diese Zytokine nicht über den Golgi-Apparat ausgeschleust werden, werden die Zellen

zeitgleich mit dem Sekretionsinhibitor Brefeldin A inkubiert. Dieser Stoff ist im eigentlichen Sinne ein Antibiotikum mit antiviralen Eigenschaften (100). Die Arbeitsgruppe um Takatsuki *et al.* entdeckte erstmals 1985, dass dieser die Sekretion von Proteinen inhibierte (101). Der Grund hierfür liegt in der Induktion des retrograden Proteintransports vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum (102).

Vom verbliebenden Probenmaterial (4.3.8.5.1) wurde zunächst 1 ml entnommen, mit 10 ml DMEM (w) gewaschen und in 1 ml DMEM und Brefeldin A (1:1000) resuspendiert. Danach wurden die Tubes für 4,5 h bei 37 °C inkubiert. Hierbei war darauf zu achten, dass die Lagerung der Tubes in einem 45°-Winkel erfolgte und die Verschlusskappen nur aufgesetzt und nicht zugezogen wurden. Durch diese Schräglage vergrößerte sich die Oberfläche der Probe innerhalb des Tubes und damit die Gasaustauschfläche erheblich. Dadurch wurde eine ausreichende Begasung sichergestellt. Im Anschluss wurden die Proben mit 10 ml PBS gewaschen und entsprechend den Angaben unter 4.3.8.5.1 fixiert.

4.3.8.5.3 Färbung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Zytokinen an fixierten Zellen

Im Folgenden wird die Färbung unter Verwendung von Saponin beschrieben. Saponin ist ein Detergenz, welches reversibel die Zellpermeabilität erhöht und daher für eine gute Penetration der Antikörper in die Zelle sorgt (103). Im Rahmen der Arbeit wurde jedoch festgestellt, dass sich auch Antigene, die sich eigentlich auf der Zelloberfläche befinden, unter Verwendung von Saponin besser detektieren lassen. Für Antikörper, die Saponin nicht benötigen, wurde stattdessen PBS/0,5 % BSA verwendet.

Nach der Fixierung, wie unter 4.3.8.5.1 beschrieben, wurden den Proben jeweils 100 µl entnommen, in 1,5-ml-Tubes überführt und nach Hinzugabe von 500 µl 0,5 % Saponin/PBS/0,5 % BSA (2600 RPM, 4 °C, 6 min) zentrifugiert. Die Antikörper wurden in der Zwischenzeit in 0,5 % Saponin/PBS/0,5 % BSA verdünnt (Tab. 15). Nach Abnahme des Überstandes und Resuspendieren der Zellen in 100 µl Antikörperlösung folgte eine Inkubationszeit von 20 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Die Reaktion wurde mit 1 ml 0,5 % Saponin/PBS/0,5 % BSA abgestoppt. Nach Zentrifugation (2600 RPM, 6 min) wurden die Zellen in 300 µl PBS/0,5 % BSA aufgenommen. Alle Zellen wurde mit CD11b- und CD45-Antikörpern gefärbt, um Mikroglia und Makrophagen zu bestimmen. Mit dem dritten Antikörper wurde dann die Expression der

unterschiedlichen Moleküle näher untersucht. Um hierbei eine genaue Abgrenzung zwischen Färbung und unspezifischer Antikörperbindung zu detektieren, wurden zu jedem Antikörper passende Isotypen ausgewählt und die Färbung unter gleichen Versuchsbedingungen zeitgleich durchgeführt (Tab. 16).

Nachfolgend die Tabelle mit allen verwendeten Antikörpern und entsprechenden Verdünnungen.

Tab. 15: Übersicht aller verwendeten Antikörper an fixierten Zellen.

Antikörper	Verdünnung	Saponin +/-	Klon	Hersteller
AF647 anti-CCR7	1:100	+	4B12	BioLegend®
AF647 anti-CD86	1:100	+	GL-1	BioLegend®
AF700 anti-CD45	1:100	+	30-F11	BD Pharmingen™
Alexa Fluor 647 anti-CD13	1:100	+	R3-242	BioLegend®
Alexa Fluor 647 anti-CD206	1:100	+	MR5D3	BD Pharmingen™
APC anti-CCR2	1:10	+	475301	R&D Systems®
APC anti-CD172a (SIRP α)	1:100	+	P84	BD Pharmingen™
APC anti-CD206	1:100	+	MR5D3	BD Pharmingen™
APC anti-IL-10	1:100	+	JES5-16E3	BioLegend®
APC anti-IL-12	1:100	+	C15.6	BD Pharmingen™
APC anti-IL-12	1:100	+	C15.6	BD Pharmingen™
APC anti-IL-6	1:100	+	MP5-20F3	BioLegend®
APC anti-Ly6C	1:100	+	AL-21	BD Pharmingen™
APC anti-MHCII	1:100	-	AF6-120.1	BD Pharmingen™
APC anti-TGF- β 1	1:100	+	TW7-16B4	BioLegend®
APC anti-TNF α	1:100	+	MP6-XT22	BD Pharmingen™
APC-Cy7 anti-CD45	1:200	+	30-F11	BioLegend®
BV711 anti-CD115	1:100	+	AFS98	BioLegend®
FITC anti-Ly6C	1:300	+	AL-21	BD Pharmingen™
PE anti-CD115	1:100	+	T38-320	BD Pharmingen™
V450 anti-CD11b	1:100	+	M1/70	BD Pharmingen™

Tab. 16: Übersicht über alle Isotypenkontrollen.

Antikörper	Isotyp-Kontrolle für...	Klon	Hersteller
AF647 IgG1, κ	CD13	R3-34	BD Pharmingen™
AF647 IgG2a, κ	CCR7, CD86	RTK2758	BioLegend®
AF647 IgG2a, κ	CD206	R35-95	BD Pharmingen™
APC IgG1, κ	IL-6	RTK2071	BioLegend®
APC IgG1, κ	TGF- β 1	MOPC-21	BioLegend®
APC IgG2a, κ	MHCII	G155-178	BD Pharmingen™
APC IgG2b, κ	IL-10	RTK4530	BioLegend®

APC IgG2b, κ	CCR2	141945	R&D Systems®
APC IgM, κ	Ly6C	R4-22	BD Pharmingen™
APC Rat IgG1, κ	TNFα, SIRPα, IL-12	R3-34	BD Pharmingen™
BV711 IgG2a, κ	CD115	RTK2758	BioLegend®
PE IgG2c, κ	Ly6C	RTK4174	BioLegend®

4.3.8.5.4 Färbung von kultivierten primären Mikroglia/Makrophagen

Wie bereits unter 4.3.6. beschrieben, wurden Mikroglia/Makrophagen 3 bzw. 6 Tage unter den angegebenen Konditionen kultiviert und dann einer Analyse der CD45-Expression zugeführt. Dazu wurde der Inhalt aller Wells in 1,5-ml-Tubes überführt, mit 100 µl PBS nachgespült und die 96-Well-Platte unter Hinzugabe von 50 µl Trypsin in die entsprechenden Wells für 30 min bei Mikroglia bzw. für 20 min bei Makrophagen im Brutschrank gelagert. Die Reaktion wurde mit 100 µl DMEM ((w), +FCS/ P/S) gestoppt. Durch behutsames Herauf- und Herunterpipettieren lösten sich die Zellen vom Boden der Wells ab und konnten in die Tubes überführt werden. Gefärbt wurden die Zellen mit jeweils 50 µl der entsprechenden Antikörperlösung (Tab. 17 und 18) für 10 min auf Eis. Danach wurden die Proben mit 500 µl PBS/BSA 0,5 % gewaschen, zentrifugiert (2400 RPM, 6 min, 4 °C), der Überstand abgesaugt und schließlich in 300 µl PBS/BSA 0,5 % aufgenommen. Tabelle 17 zeigt nachfolgend die Zusammenfassung aller Antikörper inklusive ihrer Verdünnungen für Mikroglia, Tab. 18 diejenigen für Makrophagen.

Tab. 17: Übersicht über verwendete Antikörper zur Färbung von kultivierten Mikroglia.

Antikörper	Verdünnung	Klon	Hersteller
APC anti-CD45	1:300	30-F11	BD Pharmingen™
PE anti-CD11b	1:300	M1/70	BioLegend®

Tab. 18: Übersicht über verwendete Antikörper zur Färbung von kultivierten Makrophagen.

Antikörper	Verdünnung	Klon	Hersteller
APC anti-CD45	1:300	30-F11	BD Pharmingen™
PE anti-CD11b	1:100	M1/70	BioLegend®

4.4 Histologische Methoden

4.4.1 Präparation des Gewebes

Nach Narkotisierung der Tiere wurde die kardiale Hirnperfusion mit kaltem PFA (4 %) durchgeführt wie unter 4.2.6 beschrieben. Die Perfusion dient dabei der Fixierung des

Gewebes (4.3.8.5.1). Nach Entnahme der Hirne wurden diese in mit 5-10 ml PFA (4 %) gefüllte Tubes platziert und dort für 24 h-48 h belassen. Danach folgten drei Entwässerungsschritte mit einer ansteigenden Sucrosereihe von 10 %, 20 % und 30 %. Die Lagerung der Hirne erfolgte dabei stets bei 8 °C. Sofern die Entwässerungsschritte vollständig abgelaufen waren, sank das Hirn ab und konnte in ein Tube nächsthöherer Sucrosekonzentration überführt werden. Am Ende dieses Prozesses wurden die Hirne auf Metallplättchen positioniert, welche wiederum in eine Schale mit flüssigem Stickstoff gelegt wurden. Dadurch konnten die Hirne ohne direkten gewebsschädigenden Stickstoffkontakt schockgefroren werden. Die anschließende Aufbewahrung fand bei 80°C statt. Um das Hirn für die weiteren Untersuchungen (4.4.3.1) verwenden zu können, mussten zunächst Schnitte angefertigt werden. Dazu wurden die entsprechenden Hirne in 2%iger Gelatine eingebettet und 10-µm-Mikrotomschnitte mit Hilfe eines Cryostaten angefertigt. Diese wurden auf Objektträger platziert und für die weitere Verwendung ebenfalls bei -80 °C gelagert.

4.4.2 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

In der Histologie stellt die Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung eine Standardfärbung dar, mit Hilfe derer man einen guten Überblick über die Struktur eines Gewebes gewinnen kann. So färbt Hämatoxylin oder besser gesagt das oxidierte Hämatoxylin, das Hämatein, saure Strukturen und damit insbesondere den Zellkern an, da es selbst basisch ist. Nach Anfärbung erscheinen diese Strukturen dann blau (104). Eosin hingegen ist sauer und färbt basische Strukturen wie das Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern rot. Durch das kurze Färbeprotokoll ist die HE-Färbung ein guter Kandidat für Übersichtsaufnahmen und die histologische Diagnostik von Tumoren (99). Bei der Herstellung der Gewebeschnitte (4.4.1) konnte es mitunter hilfreich sein, sich mittels HE-Färbung einen Überblick darüber zu verschaffen, in welchem Bereich des Tumors man sich gerade befindet. Dazu wurden die hergestellten Gefrierschnitte für 3 min in gereiftem (oxidiertes) Hämalan inkubiert und danach für 5 min unter fließendem Wasser gewaschen. Es folgte die Eosin-Färbung von 30 sec und ein 15-sekündiges Waschen in Leitungswasser. In einer ansteigenden Alkoholreihe von 70 %-100 % Ethanol wurde das Gewebe dehydriert. Inkubationszeiten waren im ersten Schritt 20 sec, danach jeweils 1-2 min. Durch zweimaliges Inkubieren in Xylol für 1 min wurde schließlich der

Alkohol herausgewaschen, das Gewebe geklärt und die Schnitte konnten mit einem Deckglas und dem entsprechendem Mounting Medium (Roth) gemountet werden.

4.4.3 Immunhistochemie/Immunfluoreszenzfärbung

Das Prinzip der Immunhistochemie ist die Bindung eines Antikörpers an ein spezifisches Antigen der Zielzelle, genauer gesagt an eine bestimmte Aminosäuresequenz des Antigens: das Epitop. Diese Antigen-Antikörperreaktion sollte möglichst spezifisch und stark sein. Durch Schritte wie z. B. der Gewebefixierung können sich Antigenstrukturen teilweise verändern, sodass Antigenstrukturen entweder sichtbar werden oder aber verschwinden. Dies sollte beim Versuch bestimmte Antigene nachzuweisen beachtet werden. Nach der Primärbindung der Antikörper kann man nun mittels eines konjugierten Sekundärantikörpers (z. B. fluorochrom- oder enzymmarkiert) den Primärantikörper markieren und erhält somit einen auf dem jeweiligen Sekundärantikörper basierten (sichtbaren) Nachweis bestimmter Epitope. Die Färbung über Primär- und Sekundärantikörper birgt den Vorteil, dass durch dieses Prinzip die Färbung sensitiver wird, da an einen Primärantikörper mehr als ein Sekundärantikörper binden kann (105). In dieser Arbeit wurden ausschließlich fluoreszenzbasierte Sekundärantikörper verwendet.

4.4.3.1 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten

Die Objektträger wurden zunächst an der Luft getrocknet. Die jeweiligen Schnitte wurden dann mit einem Dako-Pen umrandet sowie im Anschluss für 30 min mit PBS/1 % Casein geblockt. Dieser als Blocking bezeichnete Schritt diente der Reduktion von unspezifischer Hintergrundbindung der verwendeten Antikörper. Danach wurden die Objektträger mit den Antikörpern goat anti-IBA1 (1:100, Klon: MEC 13.3, Abcam) für die Markierung der Mikroglia/Makrophagen sowie mit rat anti-CD31 (1:50, ab5076, BD Pharmingen™) zur Anfärbung von Endothelzellen zur Kennzeichnung der Vaskularisierung in PBS/0,5 % Casein für 2 h bei Raumtemperatur und in Feuchtekammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min wurden die Schnitte mit den Sekundärantikörpern Cy5 anti-goat IgG für IBA1 sowie Cy3 anti-rat IgG für CD31 (beide von Dianova) in PBS/0,5 % Casein für 1,5 h bei Raumtemperatur und in der Feuchtekammer inkubiert. Es folgten insgesamt 4 Waschschrte à 5 min mit PBS (2x) und bidestilliertem Wasser (Milipore®) (2x). Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI

Mounting Medium (Dianova) gegengefärbt. Die Schnitte wurden mit Deckgläsern abgedeckt und bei 4 °C gelagert. Innerhalb von einer Woche wurden die Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Die Deckgläser wurden am nächsten Tag mit Nagellack umrandet, um die Schnitte vor Austrocknung zu schützen. Die finale Auswertung der CD31-Färbung wurde von einem nachfolgenden Mitarbeiter durchgeführt und taucht daher nicht in den Ergebnissen auf.

4.4.3.2 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Die Auswertung des Phagozytose-Assays (4.3.5) wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung vorgenommen. Dabei wurde das in den Kammern der Chamber Slides™ befindliche PBS behutsam abgesaugt. Zum Blocken wurde für 30 min 100 µl PBS/0,5 % Casein hinzugefügt. Der Primärantikörper rabbit anti-IBA1 (Wako) wurde in einer Verdünnung von 1:200 in PBS/0,5 % Casein verwendet. Die Inkubation fand in der Dunkelkammer für 2 h (RT) statt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,5 % Casein wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper Cy5 anti-rabbit IgG (Dianova, 1:200) wiederum für 2 h bei Raumtemperatur und in Dunkelkammer inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben jeweils zwei Mal mit PBS und bidestilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde der Begrenzungsaufsatz entfernt und die Objektträger mit DAPI Mounting Medium eingedeckelt. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser mit Nagellack umrandet.

4.4.3.3 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung

Alle Immunfluoreszenzfärbungen bedürfen letztlich der Auswertung über ein Fluoreszenzmikroskop. Im Prinzip wird dabei ein bestimmtes Photon mit dem Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und auf ein höheres Energieniveau gehoben. Dieser Zustand ist jedoch instabil. Beim Zurückfallen auf das Ausgangsniveau wird die freigesetzte Energie in Form eines Photons mit bestimmter Wellenlänge emittiert. Durch den stattfindenden Energieverlust zwischen Exzitation und Emission besitzen die emittierten Photonen immer eine größere, also energieärmere, Wellenlänge als die Photonen, mit denen sie angeregt werden. Die Anregungs- und Emissionsspektren sind für die verschiedenen Immunfluoreszenzfarbstoffe spezifisch. Am Mikroskop kann über verschiedene Filter die Wellenlänge des Anregungslichts eingestellt werden.

Sogenannte Sperrfilter verhindern das Zurückstrahlen des Anregungslichts in das Auge des Betrachters bzw. der Kamera (106).

Alle Auswertungen wurden mit dem Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) Fluoreszenzmikroskop in 20x-Vergrößerung und dem Programm Axio Vision 4 durchgeführt. Auszählungen fanden in ImageJ statt. Bei Hirnschnitten wurden mind. 10 Bilder pro Maus analysiert, bei Auswertungen der Phagozytose-Assays mind. 6 Bilder pro Kondition.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 RNA-Isolierung

Aus den unter 4.3.7.2 isolierten CD11b⁺-Zellen wurde die RNA mit Hilfe des Pure-Link™ RNA Mini Kit von ambion® nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Aufreinigung erfolgte über Kieselgelsäulen. Nach Auftragung der Proben und mehreren Waschschritten wurde die RNA mit 50 µl RNase freies Wasser mit Hilfe eines Zentrifugationsschritts mit 12000 g für 2 min eluiert. Die Lagerung erfolgte bei 80 °C. Zur Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 2 µl separat aliquotiert, um unnötiges Auftauen und Wiedereinfrieren zu vermeiden.

4.5.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe des Photometers Tecan Infinite® 200 PRO durchgeführt. Das Prinzip beruht dabei auf der Konzentrationsbestimmung über die Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Proben bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Mit Hilfe des Verdünnungsfaktors und eines für RNA spezifischen Faktors (40 µg/m) kann man die vorliegende Konzentration bestimmen:

$$c (\mu\text{g}/\text{ml}) = OD_{260\text{nm}} * 40 \mu\text{g}/\text{ml} * VF$$

Durch den Quotienten aus der OD bei 260 nm und bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, kann zusätzlich die Reinheit bestimmt werden. Reine RNA Proben weisen einen Wert von 1,8-2,0 auf. Liegt er darunter, ist der Anteil an Proteinen höher (107). Wilfinger *et al.* fanden jedoch 1997 heraus, dass dieser Quotient stark

abhängig vom pH-Wert und Salzgehalt des verwendeten Wassers ist (108), sodass stets auf konstante Versuchsbedingungen geachtet werden musste.

4.5.3 Reverse Transkription (RT)

Die reverse Transkription dient dazu, isolierte RNA in komplementäre cDNA (complementary DNA) umzuschreiben, mit Hilfe derer man schließlich ihre Quantifizierung im Rahmen einer quantitativen Real-Time PCR (RTQ-PCR) vornehmen kann. Die reverse Transkription wurde mit dem Kit QuantiTect Reverse Transcription Kit von QIAGEN durchgeführt. Es beinhaltet grundsätzlich zwei Schritte. Im ersten Schritt wird genomische DNA entfernt, die durch Verunreinigungen beim RNA-Isolierungsprozess noch enthalten sein könnte, im zweiten Schritt findet die eigentliche reverse Transkription statt. Um störende DNA zu entfernen, wurde zunächst ein Master-Mix wie in **Tab. 19** beschrieben hergestellt. Es wurden jeweils 500-1000 ng RNA pro Reaktionsansatz verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde im Thermocycler (Biometra) auf 42 °C für 2 min erhitzt und danach auf Eis gestellt. Nach Herstellung des Mastermixes für die cDNA-Synthese (**Tab. 20**) wurde dieser dem Reaktionsgemisch aus Schritt 1 hinzugefügt. Danach wurden diese Proben bei 42 °C für 30 min im Cyclyer inkubiert. Es folgte eine 2-minütige Inaktivierung des Enzyms Transkriptase, um ein Abstoppen der Reaktion herbeizuführen. Die Tubes mit 20 µl Gesamtvolumen konnten anschließend bei -20 °C gelagert werden.

Tab. 19: Bestandteile des Mastermixes aus Schritt 1 zur Eliminierung von DNA.

Substanz	Volumina	Inkubationsdauer
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 µl	2 min bei 42°C
Isolierte RNA (Probe)	500-1000 ng	
RNase-freies Wasser	ad 14 µl	

Tab. 20: Bestandteile des Mastermixes aus Schritt 2 zur Herstellung von cDNA.

Substanz	Volumina	Inkubationsdauer
Quantiscript® Reverse Transcriptase	1 µl	30 min bei 42°C 3 min bei 95°C
Quantiscript® RT Buffer, 5x	4 µl	
RT Primer Mix	1 µl	Lagerung bei -20 °C
RNA-Gemisch aus Schritt 1	14 µl	

4.5.4 Real Time quantitative PCR (RTQ-PCR)

Die Real Time quantitative PCR oder auch Real Time Detection PCR ist eine moderne Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren in Echtzeit. Dies bedeutet, dass, anders als bei einer herkömmlichen quantitativen PCR, bereits während des Amplifikationsvorgangs der eingesetzten Nukleinsäuren Messungen mittels eines Fluoreszenzsignals durchgeführt werden. Dies hat den großen Vorteil, dass die Quantifizierung wesentlich präziser ist. Benutzt wurde das TaKaRa SYBR®Premix Ex Taq™ Kit (TaKaRa). Der darin enthaltene Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green interkaliert zwischen doppelsträngiger DNA, lässt sich dann über charakteristische Wellenlänge anregen und führt zu entsprechender Lichtemission größerer Wellenlänge. Je höher dieses Fluoreszenzsignal zu einem bestimmten Zeitpunkt ist, desto größer ist auch die Menge an eingesetzter cDNA. Die Quantifizierung erfolgt über die Erfassung des Fluoreszenzsignals zu einem Zeitpunkt, an dem sich das Signal erstmals signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Dies ist dann genau der Bereich, in dem sich die cDNA erstmals in exponentieller Art und Weise vermehrt. Genannt wird dieser Wert C_T -Wert (cycle threshold) (109). Die Quantifizierung findet relativ statt. Die C_T -Werte der Zielgene werden jeweils mit einem internen Standard, in diesem Fall das 18S-Gen, das ubiquitär exprimiert wird, verglichen. Der C_T -Wert des Referenzgens wird in jeder Probe vom Zielgen substrahiert. Man erhält ΔC_T . Im nächsten Schritt werden die ΔC_T -Werte der zu untersuchenden Proben von den ΔC_T -Werten der Kontrollen abgezogen. Es ergibt sich $\Delta\Delta C_T$ (110). In einer Formel ausgedrückt lautet die relative Expression eines Zielgens im Verhältnis zum Referenzgen wie folgt:

$$n - \text{fache Expression (Zielgen vs. Referenzgen)} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Die verwendeten Primer der Zielgene wurden von der Firma TIB MolBiol synthetisiert (Tab. 22). Die Primer für Stat3 wurden mit Hilfe der Datenbank „Primer-BLAST“ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) des „National Center for Biotechnology Information“ entwickelt. Der Mastermix für die RTQ-PCR setzte sich wie in Tab. 21 beschrieben zusammen. Von diesem Mastermix wurden jeweils 20 μ l mit dem Multistepper in ein Well einer 96-Well-Platte (MicroAmp®) pipettiert. Danach wurden jeweils 5 μ l der cDNA hinzugegeben. Diese wurde vorher im Verhältnis 1:20 mit RNase freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurde die Platte mit Applied Biosystems™ MicroAmp™ Optical Adhesive Film verschlossen, an zentrifugiert und in das Messgerät

gestellt (Realtime-PCR 7900 HT FAST). Alle Proben wurden in Triplets ausplattiert. Die Analyse und Weiterverarbeitung erfolgte über das Programm SDS 2.4. bzw. Microsoft Excel.

Tab. 21: Übersicht über den bei der RTQ-PCR verwendeten Mastermix.

Substanz	Volumina	PCR-Programm
SYBR® Premix <i>ExTaq</i> ™	12,5 µl	95°C 30 sec
10 pmol/µl forward Primer	1,25 µl	95°C 5 sec
10 pmol/µl reverse Primer	1,25 µl	60°C 30 sec
ROX dye	0,5 µl	95°C 15 sec
H ₂ O	4,5 µl	60°C 1 min
cDNA (1:20)	5 µl	95 °C 15 sec

} 40x

Tab. 22: Übersicht über verwendete Primersequenzen.

Gen		Primersequenz	Ref.
18S	fw	AACCCGTTGAACCCATT	(43)
	rev	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	
Arg1	fw	AACACGGCAGTGGCTTTAACC	(111)
	rev	GGTTTTTCATGTGGCGCATTTC3	
c-Myc	fw	CACCAGCAGCGACTCTGAA	(112)
	rev	GCCCGACTCCGACCTCTTG	
Cox2	fw	AGTTGATAACCGAGTCGTTCTG	(113)
	rev	CTGTTGCTTGATTTAGTC	
Ifnβ	fw	CCAGCTCCAAGAAAGGACGA	(114)
	rev	CGCCCTGTAGGTGAGGTTGAT	
IL10	fw	CCCTGGGTGAGAAGCTGAAG	(115)
	rev	CACTGCCTTGCTCTTATTTTCACA	
IL12α	fw	AGAGAGACTTCTTCCACAACAAG	(115)
	rev	GTACATCTTCAAGTCCTCATAGA	
IL1α	fw	GGCTCACTTCATGAGACTTGC	(115)
	rev	AGGTGTAAGGTGCTGATCTGG	
IL1β	fw	ATCACTCATTGTGGCTGTGG	(115)
	rev	CATCTCGGAGCCTGTAGTGC	
IL6	fw	GACTGATGCTGGTGACAACC	(115)
	rev	TTCTGCAAGTGCATCATCG	
iNos	fw	CGAAACGCTTCACTTCAA	(111)
	rev	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT	
Irf7	fw	CACCCCATCTTCGACTTCA	(116)
	rev	CCAAAACCCAGGTAGATGGTGTA	
Smad7	fw	GACTCCAGGACGCTGTTGGT	(117)
	rev	CCATGGTTGCTGCATGAACT	
Stat1	fw	CTGAATATTTCCCTCCTGGG	(118)
	rev	TCCCGTACAGATGTCCATGAT	
Stat3	fw	GAAGGGAGGCAAAGGGGAACA	Eigener Entwurf
	rev	ACTTGTCTAACAACCAACCCCC	

Gen		Primersequenz	Ref.
TGFβ	fw	TTGCTTCAGCTCCACAGAGA	(115)
	rev	TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC	
TNFα	fw	CACAGCCTTCCTCACAGAGC	(115)
	rev	GGAGGCAACAAGGTAGAGAGG	
Ykl40	fw	ATGCACACCTCTACTGAAGCC	(119)
	rev	ACCAGCTTG TACGCAGAGC	

4.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism 7. Verwendet wurden, wie angegeben und je nach experimentellem Setup, der ungepaarte Student's *t*-test oder one- bzw. two-way ANOVA. Die Signifikanzangaben wurden im NEJM (New England Journal of Medicine) Stil wiedergegeben, d.h. P-Werte >0.05 werden mit ns, Werte >0.01 mit *, P <0.01 mit ** und P <0.001 mit *** gekennzeichnet. Sofern nicht anders angegeben, sind repräsentative Ergebnisse aus Messungen von mind. drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Resultaten hervorgegangen.

5 Ergebnisse

5.1 Mikroglia und Makrophagen im Chimärenmodell

5.1.1 Nachweis von CCR2 auf Mikroglia und Makrophagen

In der Literatur besteht Uneinigkeit darüber, ob lediglich Makrophagen (61) oder aber auch Mikroglia CCR2 exprimieren können (57-59). Diese Frage sollte zunächst mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen von generierten Chimären (wt/wt-Gruppe) nach TZI geklärt werden (**Abb. 12**). Hierbei kann aufgrund eines GFP-Fluoreszenzsignals zwischen peripheren Makrophagen (GFP⁻) und residenten Mikroglia (GFP⁺) unterschieden werden (**Abb. 12a**). Es wurden insgesamt drei unterschiedliche Färbeprotokolle angewandt, um ein methodisches Bias zu verringern. Die bereits publizierten Studien verwendeten jeweils unterschiedliche Färbemethoden oder Methoden, um Mikroglia von Makrophagen zu unterscheiden und eine CCR2-Expression direkt oder indirekt nachzuweisen (57-59, 61). In dieser Arbeit wurden die Zellen entweder direkt nach Herstellung der Hirnzellsuspension gefärbt (live und live+FcR-Block, **Abb. 12b, c, e**) oder aber erst nach Fixierung mit PFA (**Abb. 12d, e**). Die Fixierung bewirkt eine Denaturierung im Sinne einer Quervernetzung der vorhandenen Proteinstrukturen unter Erhalt der Sekundärstruktur. Die Zellen werden dabei getötet. Für alle Färbungen wurden jeweils CCR2-Isotypkontrollen durchgeführt, um eine unspezifische Färbung ausschließen zu können.

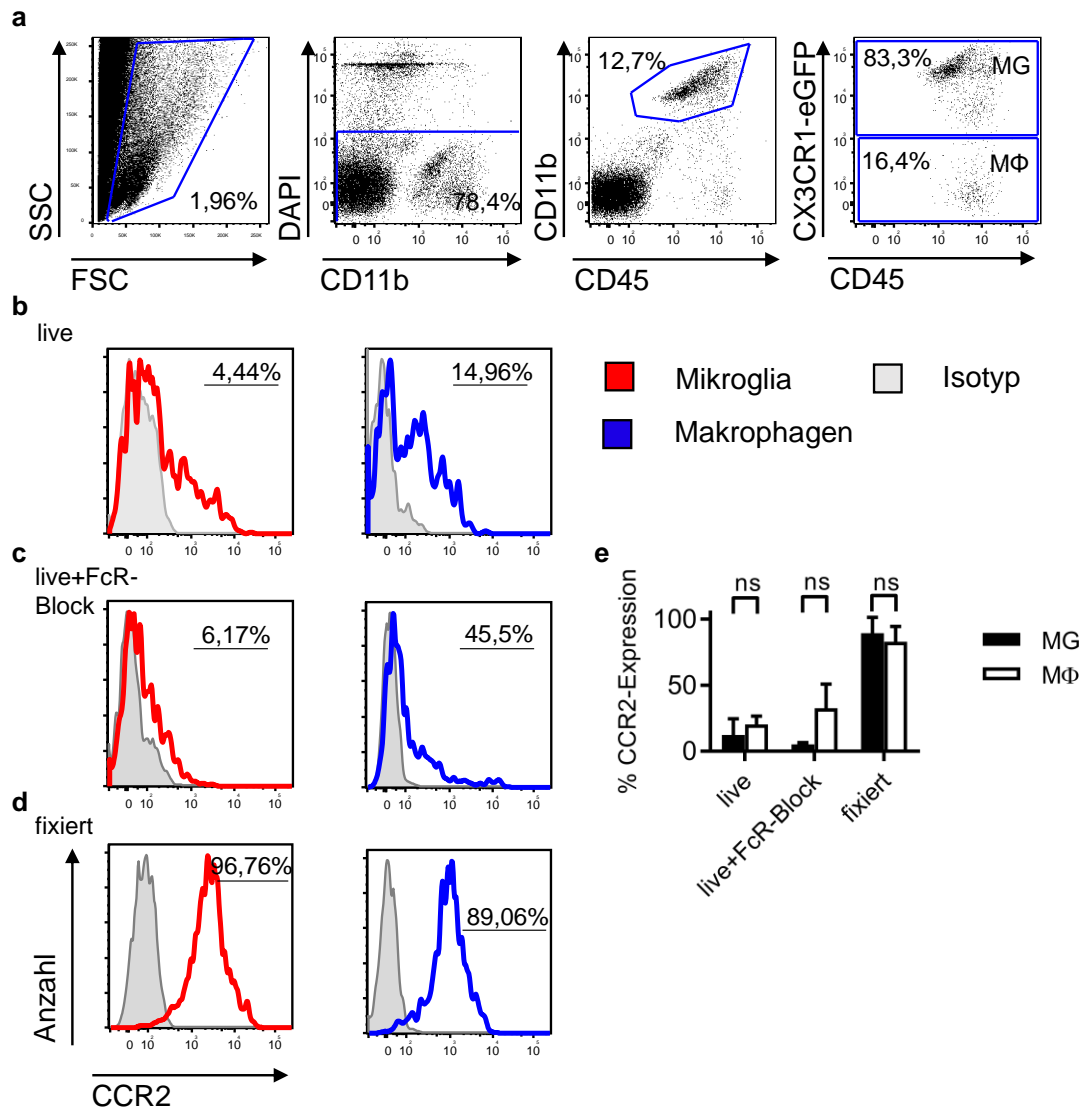


Abb. 12: CCR2-Expression von Mikroglia und Makrophagen. Die Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Analyse wird beispielhaft für die live-Färbungen gezeigt. Tote Zellen werden mittels DAPI-Färbung ausgeschlossen und anschließend auf alle CD11b⁺CD45⁺-Zellen gegatet. Mikroglia und Makrophagen werden über das GFP-Signal unterschieden (a). Es zeigte sich, dass zuvor fixierte Zellen eine deutlich höhere CCR2-Expression aufwiesen als lebende Zellen. Isotypkontrollen wurden stets mitgefärbt, um unspezifisches Anfärben detektieren zu können (a, b, c, e); n=2-6 pro Gruppe; ns= nicht signifikant, two-way ANOVA.

Für die fixierten Zellen ergab sich ein hohes Expressionslevel von CCR2 sowohl für Mikroglia (MG) als auch für die Makrophagen (MΦ) von 89,2 % bzw. 82,8 %. Eine grundsätzliche CCR2-Expression konnte auch für die direkt (live) gefärbten MG und MΦ nachgewiesen werden, die durch den Einsatz des FcR-Blocks im Falle der Mikroglia verringert, aber nicht aufgehoben wurde. Unterschiede zwischen den beiden Populationen konnten bei keiner der verwendeten Färbestrategien gemessen werden (Abb. 12e). Folglich wurde CCR2 sowohl von MG als auch von MΦ exprimiert.

5.1.2 Analyse der unterschiedlichen Mausstämme

5.1.2.1 Knochenmarkanalyse von C57BL/6J-, CX3CR1-eGFP- und CCR2ko-Mäusen

Da in der vorliegenden Arbeit u. a. die Einwanderung von Monozyten/Makrophagen ins Gehirn näher beleuchtet werden sollte, war es entscheidend, dass bei Verwendung der verschiedenen transgenen Mausstämme von einer ähnlichen Ausgangslage in Bezug auf die Knochenmarkzusammensetzung ausgegangen werden konnte. Für die Chimäregenerierung benötigt man Knochenmarkzellen aus Donorzellen, die in die jeweiligen Rezipienten infundiert werden. Dadurch konnten vier verschiedene Chimäregruppen generiert werden. Zur Analyse wurde das Knochenmark der drei verwendeten Mausstämme C57BL/6J, CX3CR1-eGFP und CCR2ko isoliert und nach Herstellung der Einzelzellsuspension mittels Antikörper (CD115, CD45, CD11b, Ly6C, F4/80) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (**Abb. 13a**). Prinzipiell entstehen Makrophagen aus den gemeinsamen Vorläuferzellen MDP (macrophage/ dendritic cell progenitor), aus dem sich dann die cMoP- (common monocyte progenitor) Zellen entwickeln (**Abb. 13b, c**). Aus diesen wiederum entstehen Ly6C⁺-Monozyten, die bereits in der Lage sind, das Knochenmark zu verlassen, um sich weiter auszudifferenzieren (**Abb. 13d**) (120). CD45⁺CD11b⁺- sowie CD45⁺F4/80⁺-Zellen beschreiben Monozyten/Makrophagen wobei F4/80 ein Marker für reife Makrophagen darstellt (**Abb. 13e, f**) (121). Anhand diverser Oberflächenmarker wurden die beschriebenen Zelltypen detektiert (**Tab. 23**).

Tab. 23: (Vorläufer-)Zellen des Knochenmarks und ihre verschiedenen Oberflächenmarker.

	CD115	CD45	CD11b	Ly6C	F4/80
MDP	+	+	-	-	n/a
cMoP	+	+	-	+++	n/a
Ly6C ^{high+low}	+	+	+	+ / +++	n/a
CD11b ⁺ CD45 ⁺	n/a	+	+	n/a	n/a
CD45 ⁺ F4/80 ⁺	n/a	+	n/a	n/a	+

n/a= nicht gemessen. Tabelle angelehnt an (120).

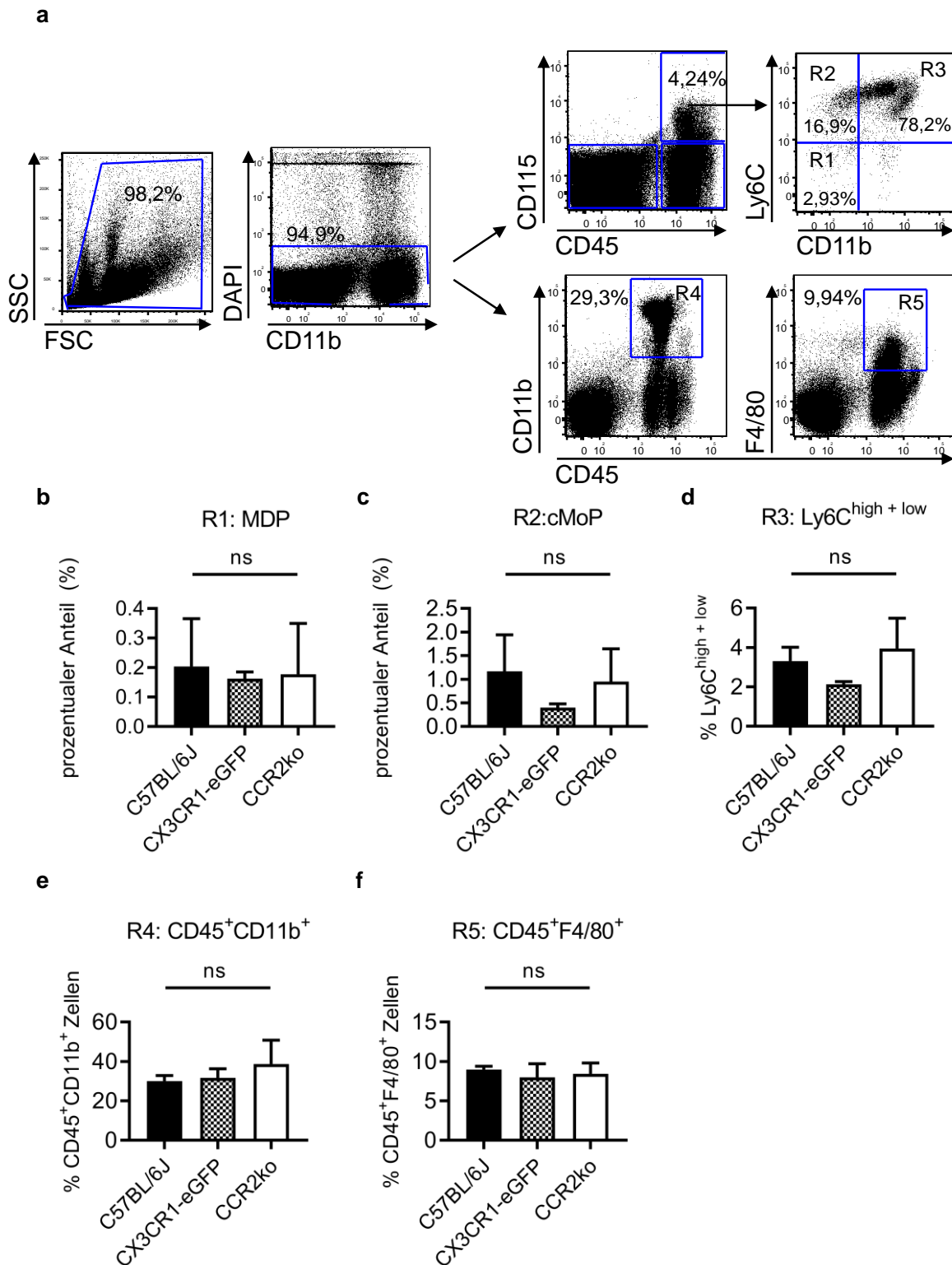


Abb. 13: Knochenmarkanalyse von naiven C57BL/6J-, CX3CR1-eGFP- und CCR2ko-Mäusen. Es wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Die Gating-Strategie wird exemplarisch an einer BL6J-Maus gezeigt (a). Nach Ausschluss toter Zellen wurden über diverse Oberflächenmarker verschiedene Populationen untersucht (R1-5), die ab einem bestimmten Stadium (R3-5) in der Lage sind, das Knochenmark zu verlassen. Zwischen den untersuchten Mausstämmen konnten keine

Unterschiede in Bezug auf den prozentualen Anteil der (Vorläufer-)Zellen festgestellt werden (b-f), n=4-6 pro Gruppe; ns= nicht signifikant; one-way ANOVA.

Alle Verteilungen waren ähnlich. Insgesamt konnten nur marginale Unterschiede in den getesteten Parametern festgestellt werden. CX3CR1-eGFP-Heterozygotie sowie CCR2-Defizienz schienen somit keinen Einfluss auf die Reifestadien von Monozyten im Knochenmark zu haben.

5.1.2.2 Blutanalyse hinsichtlich Rekonstitutionseffizienzen

Um die Rolle von CCR2 zu untersuchen, wurden vier Chimäregruppen generiert: wt/wt, wt/ko, ko/wt sowie ko/ko. Diese ermöglichen zum einen die Diskriminierung von MG und MΦ aufgrund des Fluoreszenzsignals und zum anderen die Untersuchung des spezifischen Einflusses der CCR2-Defizienz in beiden Populationen. Voraussetzung ist dabei eine gute Rekonstitution der Zellen im Blut nach Knochenmarktransplantation. Zur Überprüfung wurde den Tieren daher 6-8 Wochen nach dem Knochenmarktransfer Blut abgenommen und dieses hinsichtlich der CD11b⁺CD45⁺-Zellfraktion (Monozyten) untersucht (**Abb. 14**). In die Arbeit wurden lediglich Mäuse eingeschlossen, deren Rekonstitutionseffizienz $\geq 60\%$ betrug. Dies bedeutet, dass die Mehrheit der CD11b⁺CD45⁺-Zellen im Blut vom Donortier stammten und so die Knochenmarktransplantation erfolgreich war. Beispielhaft wird die Gating-Strategie gezeigt (**Abb. 14a, b**). Unter den verwendeten Mäusen lagen die durchschnittlichen Rekonstitutionseffizienzen in der wt/wt- und ko/wt-Gruppe mit $> 75\%$ sehr hoch, die Etablierung des neuen Immunsystems in der wt/ko- und ko/ko-Gruppe war mit 64,5 % bzw. 69 % etwas schwächer ausgeprägt (**Abb. 14c**).

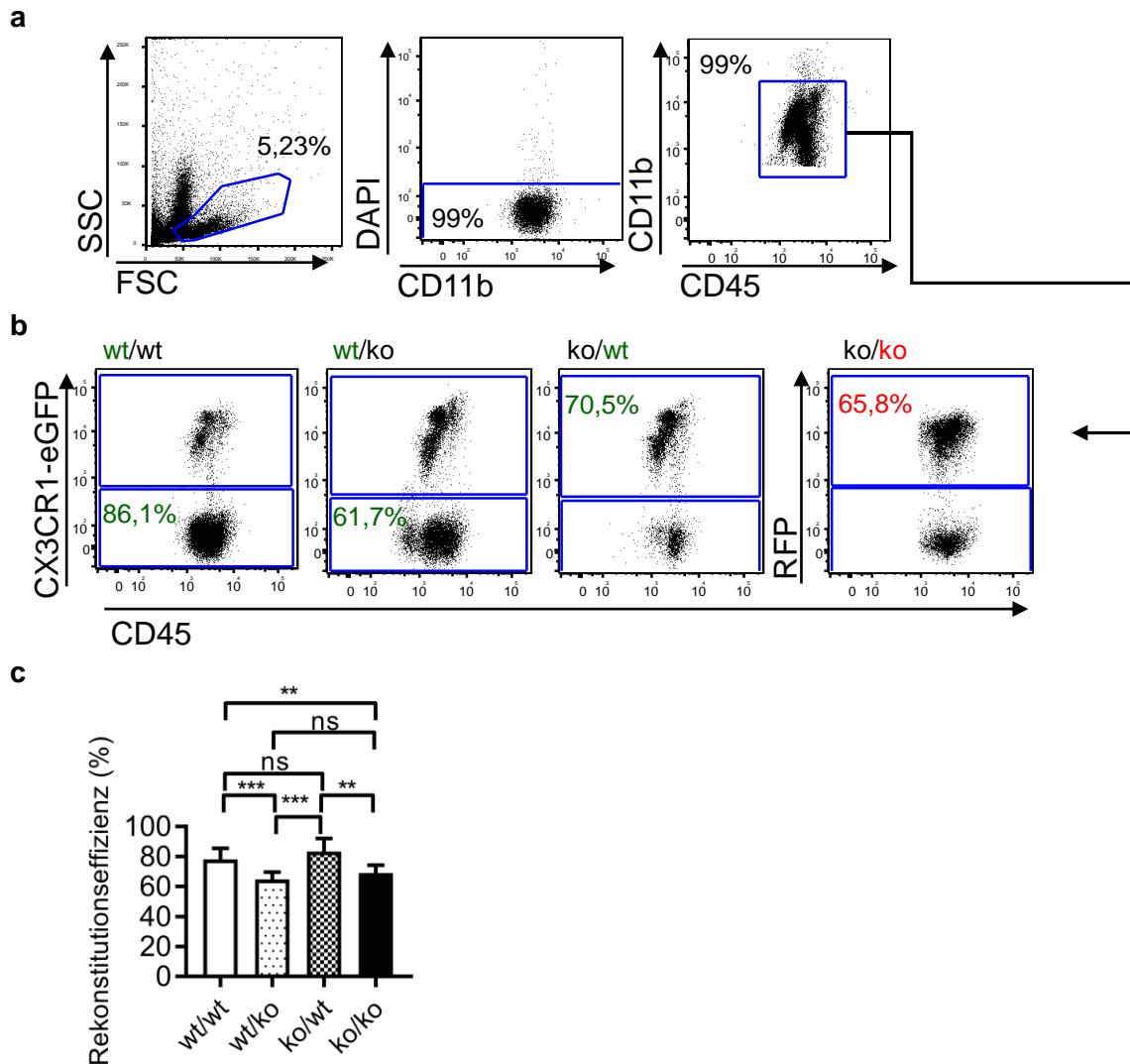


Abb. 14: Rekonstitutionseffizienzen aller Chimärenguppen nach 6-8 Wochen. Nach Blutentnahme aus der Schwanzvene und nachfolgender Aufbereitung konnte die Analyse durchflusszytometrisch mit den entsprechenden Antikörpern (CD11b, CD45) durchgeführt werden. Granulozyten wurden über SSC und FSC, tote Zellen über DAPI ausgegattet. Repräsentativ dargestellt ist die Gatingstrategie für eine wt/wt-Maus (a). Nach Gaten auf sämtliche CD11b⁺CD45⁺-Zellen konnten die Rekonstitutionseffizienzen der einzelnen Gruppen ausgewertet werden, dargestellt ist jeweils ein repräsentativer dot-plot einer Maus (b). Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse erzielten Rekonstitutionseffizienzen $\geq 60\%$, zum Teil unterschieden sich die Gruppen signifikant voneinander (c); $n=11-18$ pro Gruppe; ns= nicht signifikant, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; one-way ANOVA.

5.1.2.3 Blutanalyse hinsichtlich der lymphozytären Zusammensetzung

Des Weiteren wurde die T- und B-Zell-Zusammensetzung innerhalb der vier Gruppen untersucht, um bereits vor Durchführung der Experimente etwaige Unterschiede in der Zusammensetzung der Lymphozyten feststellen zu können, die sich später auf die Immunantwort der Tumormäuse auswirken könnten (Abb. 15). Es zeigte sich, dass sich

die Zusammensetzung der CD4⁺-T-Zellen über alle Gruppen hinweg nicht änderte und zwischen 10,4 % und 14,4 % lag (Abb. 15b). Jedoch erhöhte sich die Fraktion der CD8⁺-T-Zellen in der ko/ko-Gruppe signifikant auf fast 13 % im Vergleich zu allen anderen Gruppen (Abb. 15c). CD19⁺-B-Zellen waren in allen vier Gruppen zu etwa gleichen Teilen vorhanden (63,3 %-73,3 %) (Abb. 15d).

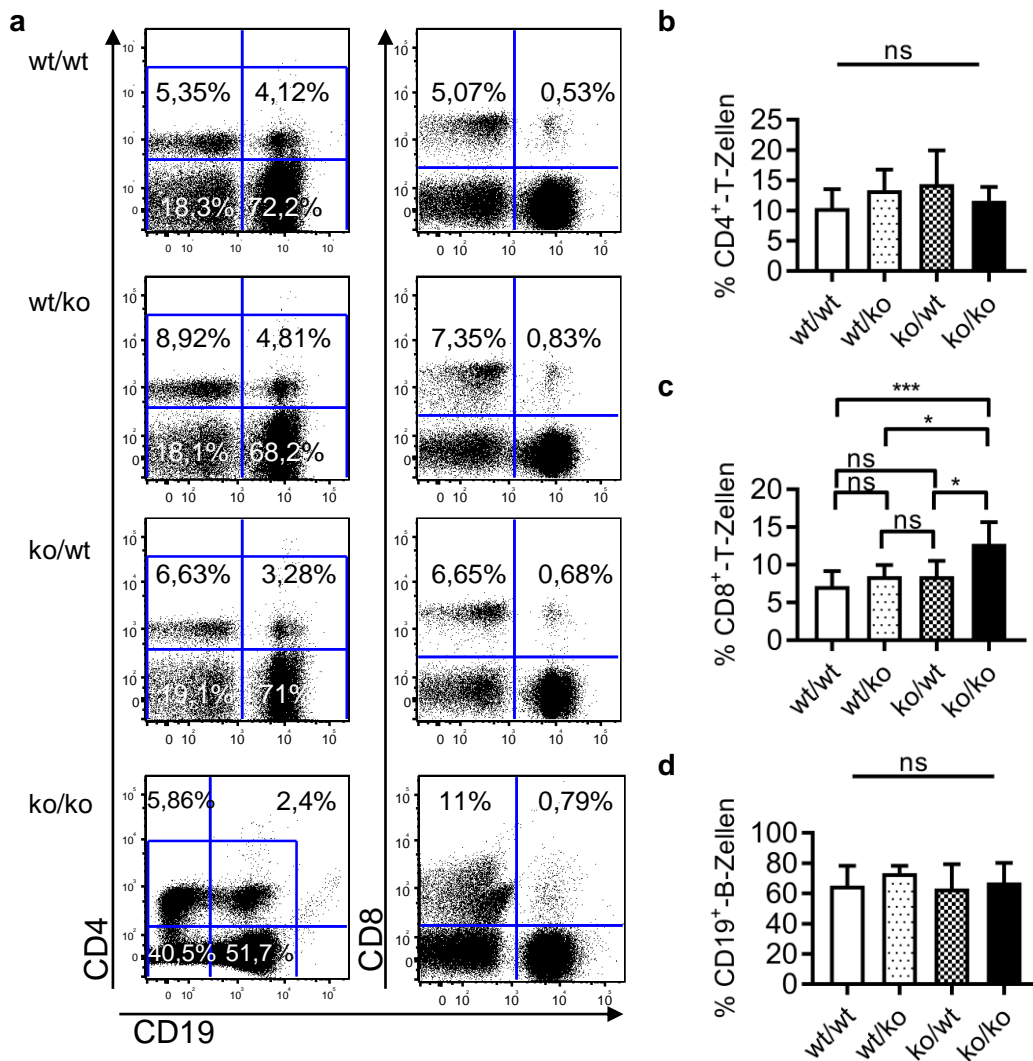


Abb. 15: Blutanalysen der Chimärengruppen hinsichtlich T- und B-Zell-Anteilen. Nach Blutentnahme und Aufbereitung wurden durchflusszytometrisch zunächst Granulozyten über SSC/FSC und tote Zellen über DAPI ausgegattet. Exemplarisch werden hier pro Chimärengruppe jeweils zwei Dotplots nach entsprechendem Gating gezeigt (a). Nach Analyse zeigten sich ähnliche Werte für CD4⁺-T-Zellen (b). Eine signifikante Erhöhung wies die ko/ko-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen für CD8⁺-T-Zellen auf (c). B-Zell-Fractionen blieben in allen Gruppen identisch (d); $n=6-7$ pro Gruppe; ns= nicht signifikant, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; one-way ANOVA.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Unterschiede in der Immunzellzusammensetzung zwischen allen Gruppen vergleichsweise gering ausgeprägt waren und somit eine grundsätzliche Vergleichbarkeit bestand.

5.1.3 Analyse der Einwanderung und Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen ins Gehirn mittels Durchflusszytometrie

Mikroglia sowie Makrophagen zeichnen sich durch die Expression von CD11b und CD45 aus. CD45 spielt eine große Rolle in Antigenrezeptorsignalwegen und wird für die Aktivierung von T-, B- und NK-Zellen benötigt (122). Auch im Tumorkontext spielt es eine große Rolle. So befindet sich beispielsweise in der CD45^{high}-Fraktion die tumoraktivierte Population von Mikroglia und Makrophagen. Diese exprimieren im Vergleich zur CD45^{low}-Fraktion deutlich größere Anteile an antigen- oder kostimulatorischen Molekülen (115). In der Literatur wird über die Höhe der CD45-Expression häufig eine Unterscheidung zwischen Makrophagen (CD45^{high}) und Mikroglia (CD45^{low}) vorgenommen (50, 123). Dies soll hier anhand der Chimären ebenso überprüft werden. Zunächst galt es daher, die generelle Zusammensetzung der CD11b⁺CD45⁺-Fraktion an Mikroglia und Makrophagen sowohl in der Tumor- als auch vergleichend in der kontralateralen Hemisphäre zu bestimmen. Danach wurde einerseits der Anteil der CD45^{high} Fraktion an der Gesamtpopulation sowie die Zusammensetzungen der CD45^{high}- und der CD45^{low}-Fraktion an d21 nach Tumorzellimplantation näher betrachtet. Unter 5.1.3.2 wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle und Zytokine der entsprechenden Fraktionen näher beleuchtet. Da es sich ausschließlich um durchflusszytometrische Analysen handelt, spiegeln die Ergebnisse keine absoluten, sondern relative Werte wider und bedürfen entsprechender Interpretation. Absolute Zellzahlen hinsichtlich der Zusammensetzung von Mikroglia und Makrophagen werden unter 5.1.4 dargestellt.

5.1.3.1 Infiltration von Mikroglia und Makrophagen in die tumortragende Hemisphäre an d21 nach GL261-Tumorzellimplantation

5.1.3.1.1 Zusammensetzung der CD11b⁺CD45⁺-Fraktion

Aus den Hirnen der Chimäre wurde an d21 nach Tumorzellimplantation eine Zellsuspension hergestellt und diese nach Färbung mit Antikörpern für CD11b und CD45 durchflusszytometrisch untersucht (**Abb. 16**). Mikroglia und Makrophagen wurden nach

entsprechendem Gating anhand des Fluoreszenzsignals (eGFP oder RFP) voneinander unterschieden und deren Anteile an der Gesamtpopulation (CD11b⁺CD45⁺) bestimmt (**Abb. 16a, b**). Dem C-C-Chemokin-Rezeptor 2 schien hier eine entscheidende Rolle zuzukommen. In der wt/ko-Gruppe ist die Einwanderung von Makrophagen, die defizient für CCR2 waren, im Vergleich zur wt/wt-Gruppe nahezu unterbunden worden (23,3 % bzw. 3 %). Einen ausgeprägten, wenn auch nicht ganz so starken Effekt zeigte der Knockout auch in der ko/wt-Gruppe. Es kam hier zur signifikant reduzierten Akkumulation von Mikroglia um nahezu 25 %. Makrophagen wanderten in der ko/ko-Gruppe in deutlich geringerem Ausmaß ein als in der ko/wt-Gruppe. Der Anteil an Makrophagen war zwischen der wt/ko- und der ko/ko-Gruppe fast identisch (3 % bzw. 6,4 %). Trugen beide Zellpopulationen den Knockout (ko/ko), war lediglich die Makrophagenakkumulation deutlich vermindert im Vergleich zur wt/wt-Gruppe (6,4 % bzw. 23,3 %). Konsekutiv folgte ein Anstieg des Mikrogliaanteils auf 93,61 % (**Abb. 16c**).

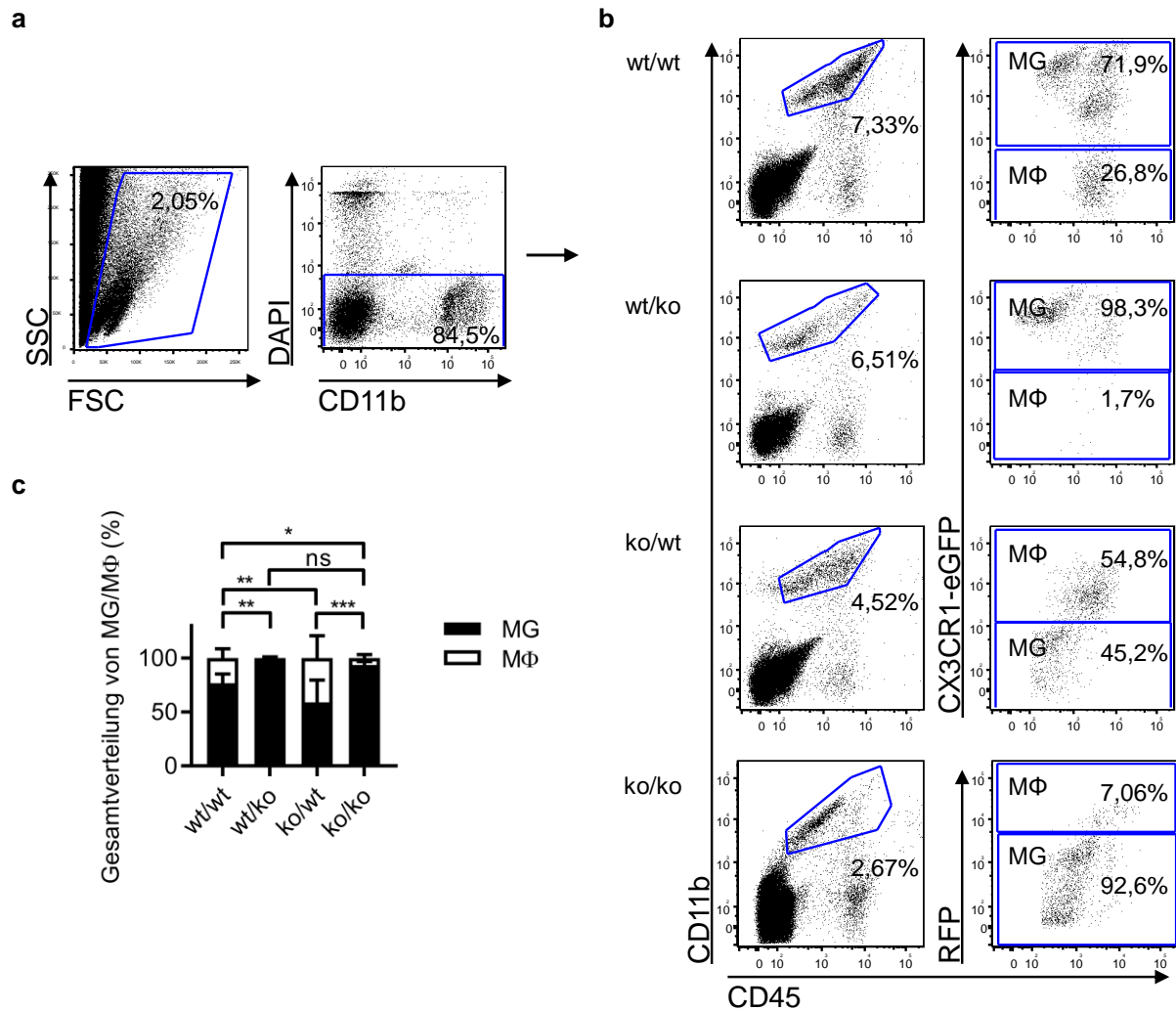


Abb. 16: Die CCR2-Defizienz hatte einen großen Einfluss auf die Infiltration von Mikroglia und Makrophagen in die tumortragende Hemisphäre. Das initiale Gating war für alle Gruppen gleich und wird anhand einer wt/wt-Tumormaus gezeigt. Nach Ausschluss von Zelldebris und toten Zellen über eine DAPI-Färbung (a) wurde auf die Gesamtfraction der myeloiden Zellen gegatet (CD11b⁺CD45⁺) und über das eGFP- bzw. RFP-Signal zwischen Mikroglia und Makrophagen unterschieden. Gezeigt werden exemplarische Dotplots der unterschiedlichen Gruppen (b). CCR2-defiziente Makrophagen waren nicht mehr in der Lage, in der tumortragenden Hirnhemisphäre zu akkumulieren (wt/ko). Der Einfluss des Knockouts auf die Mikroglia schien etwas geringer, war aber dennoch signifikant (ko/wt). Ein signifikanter Unterschied war sowohl zwischen der ko/wt- und der ko/ko-Gruppe als auch zwischen der wt/wt- und ko/ko-Gruppe erkennbar im Sinne einer deutlichen Reduktion des Makrophagenanteils (c); $n=7-12$ pro Gruppe; ns= nicht signifikant, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; two-way ANOVA.

Der CCR2ko schien folglich sowohl in der einen als auch in der anderen Zellpopulation zu einer reduzierten Einwanderung in die Tumorchemisphäre zu führen.

5.1.3.1.2 Zusammensetzung der kontralateralen CD11b⁺CD45⁺-Fraktion

In der kontralateralen Hirnhemisphäre (KL) zeigte sich, dass eine Einwanderung von peripheren Makrophagen nur in sehr geringem Maße stattfand. In der ko/wt-Gruppe kam es zu geringfügiger Einwanderung von peripheren Makrophagen in Höhe von 6,8 %. In den verbleibenden drei Gruppen bestand die CD11b⁺CD45⁺-Fraktion zu mind. 95 % aus Mikrogliazellen (**Abb. 17**).

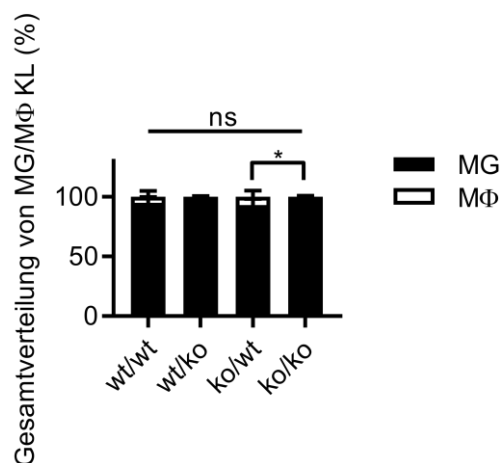


Abb. 17: Eine Einwanderung von Makrophagen in die kontralaterale Hirnhemisphäre fand kaum statt. Die Gating-Strategie entspricht der Gating-Strategie in Abb. 5. Durchflusszytometrische Analysen ergaben einen Mikrogliaanteil in den kontralateralen Hemisphären der Tumormäuse von mind. 93 %. Es fanden sich signifikante Unterschiede zwischen der ko/wt- und der ko/ko-Gruppe; $n=7-11$ pro Gruppe; ns= nicht signifikant, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; two-way ANOVA.

Insgesamt betrachtet blieb der Einfluss der CCR2-Defizienz auf der kontralateralen Seite der tumortragenden Mäuse marginal und änderte nur wenig an der dominierenden Mikrogliazellpopulation.

5.1.3.1.3 Prozentualer Anteil der CD11b⁺CD45^{high}-Fraktion an allen CD11b⁺CD45⁺-Zellen

Prinzipiell lassen sich zwei Zellpopulationen im Hirn von tumortragenden Mäusen unterscheiden: CD11b⁺CD45^{high} sowie CD11b⁺CD45^{low}. Der Anteil der CD45^{high} Zellen an der Gesamtpopulation CD11b⁺CD45⁺ steigt im Laufe der Tumorprogression stetig an (115). Dabei handelt es sich um durch den Tumor aktivierte Mikroglia und Makrophagen. Die CD45^{high}-Fraktion ist somit tumorspezifisch (51). Es wurde untersucht, ob zwischen den verschiedenen Chimäregruppen Unterschiede zwischen den Anteilen

der CD45^{high}-Fraktion an der Gesamtzellpopulation CD11b⁺CD45⁺ bestehen (Abb. 18). In der wt/wt-Gruppe betrug der Anteil der CD45^{high}-Fraktion an allen CD11b⁺CD45⁺-Zellen durchschnittlich 48,3 % und war somit ähnlich hoch wie der der ko/wt-Gruppe (47,3 %). Durch den Knockout von CCR2 auf Makrophagen kam es lediglich zu einem marginalen Abfall der CD45^{high}-Fraktion auf 38 % (wt/ko). Erst die duale CCR2-Defizienz auf Mikroglia und Makrophagen (ko/ko) führte zu einer starken Reduktion der CD45^{high}-Population (11,7 %) (Abb. 18a, b).

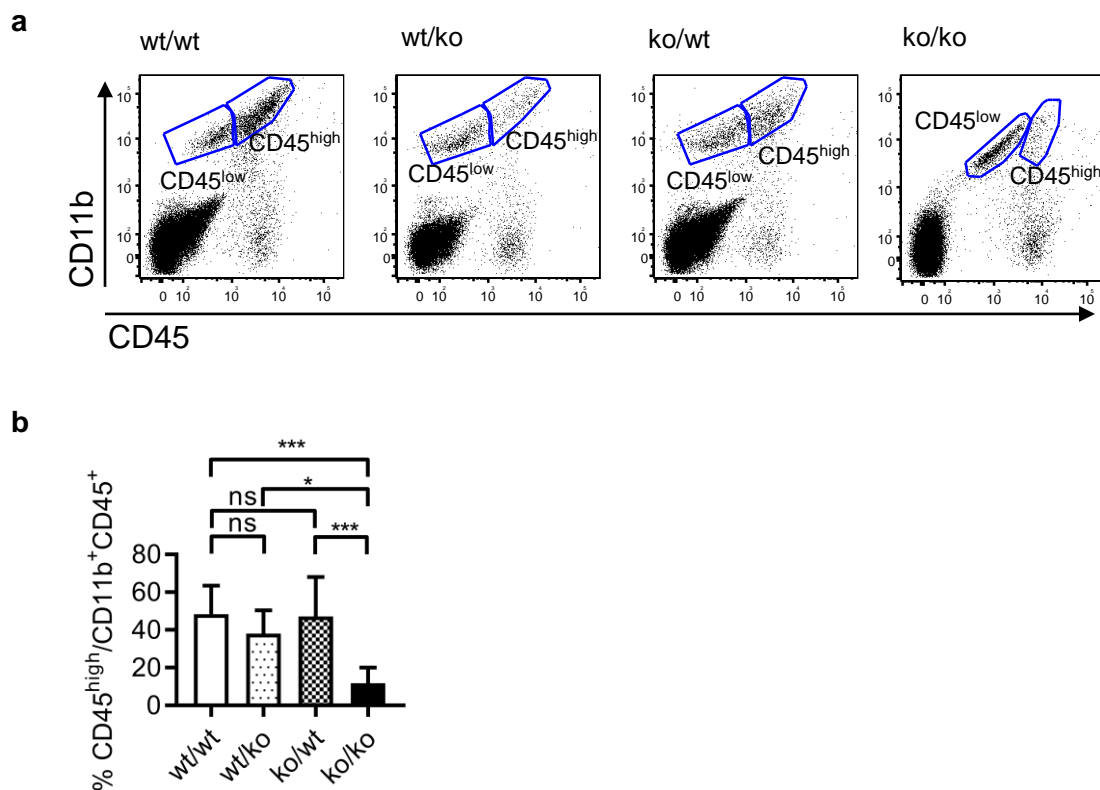


Abb. 18: Der Anteil der CD45^{high}-Fraktion sank durch den CCR2ko in Mikroglia und Makrophagen drastisch. Nach Herstellung der Einzelzellsuspension wurden die Zellen ohne Fixierung gefärbt. Tote Zellen wurden über eine DAPI-Färbung ausgegattet. Exemplarisch werden die CD11b⁺CD45⁺-Populationen von Tumormäusen der entsprechenden Gruppen gezeigt. Deutlich zu erkennen sind die CD45^{high}- und CD45^{low}-Fraktionen (a). Der CD45^{high}-Anteil an allen CD11b⁺CD45⁺-Zellen wurde ermittelt. Sofern ausschließlich Makrophagen (wt/ko) oder Mikroglia (ko/wt) defizient für CCR2 waren, ist es zu keinem signifikanten Abfall des CD45^{high}-Anteils gekommen. Dieser ist erst durch kompletten Knockout in beiden Zelltypen (ko/ko) entstanden (b); *n* = 7-12 pro Gruppe; ns= nicht signifikant, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001; one-way ANOVA.

Folglich wurde die CD45^{high}-Fraktion, gerade bei Vergleich der ko/ko-Gruppe mit allen anderen Gruppen, wesentlich durch die nicht betroffene Zellpopulation, also der wt-Fraktion, gestellt.

5.1.3.1.4 Zusammensetzung der CD45^{high}-Fraktion

Über die Zusammensetzung der CD45^{high}-Fraktion wird kontrovers diskutiert. Häufig wird angenommen, dass diese Population ausschließlich den einwandernden Makrophagen zugeordnet werden könne, die CD45^{low}-Zellen im Umkehrschluss ausschließlich den Mikrogliazellen (50, 123). Jedoch wurde diese Annahme durch Müller *et al.* widerlegt (51). In dieser Arbeit zeigte sich bestätigend, dass in der Kontrollgruppe (wt/wt) die CD45^{high}-Fraktion ungefähr paritätisch auf Mikroglia und Makrophagen aufgeteilt werden konnte (55,2 % bzw. 44,8 %). Der CCR2ko von Makrophagen führte zu deren 86%igen Reduktion (von 44,8 % auf 6,1 % in der wt/ko-Gruppe). Waren Mikrogliazellen defizient für CCR2 (ko/wt), führte dies ebenso zu einem deutlich verminderten Anteil dieser Zellen in der CD45^{high}-Fraktion (von 55,2 % auf 16,5 %). Besaßen beide Populationen einen CCR2ko (ko/ko-Gruppe), so glich sich das Verhältnis wieder an das der wt/wt-Gruppe an (Abb. 19).

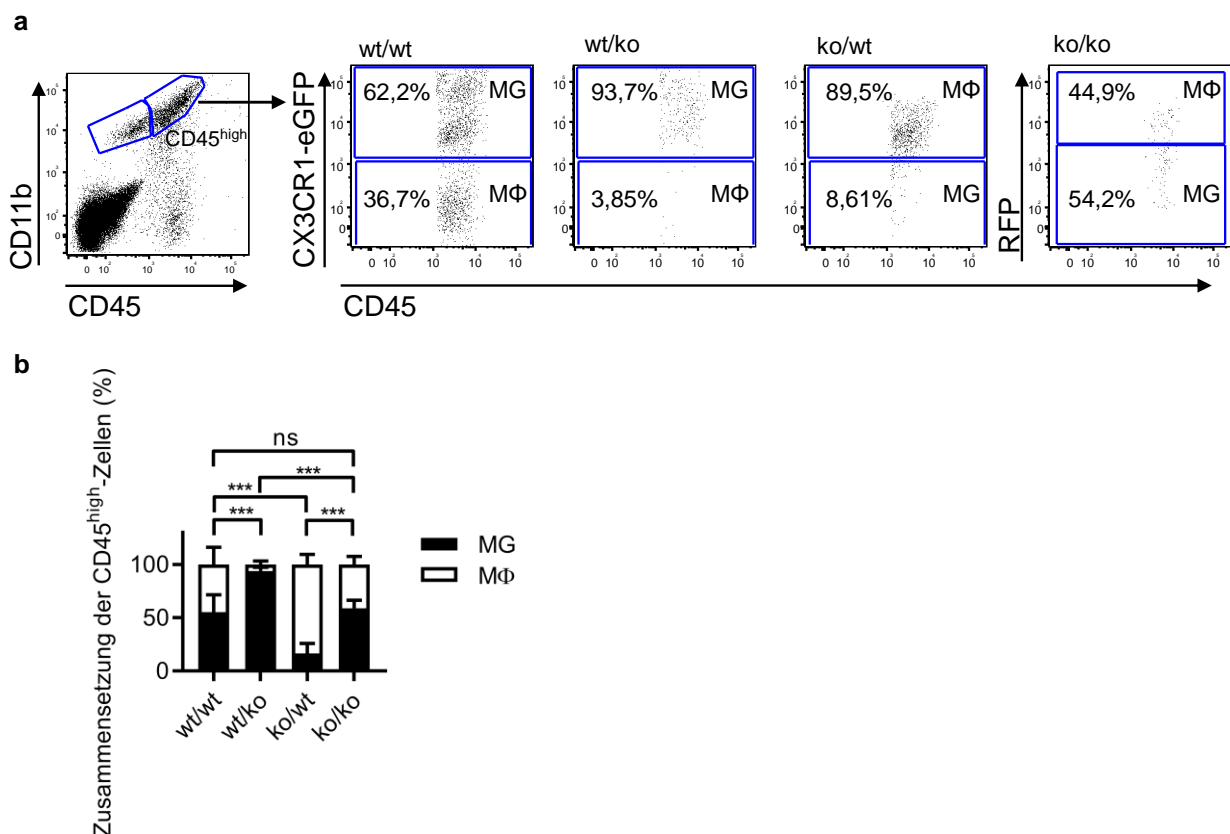


Abb. 19: CCR2ko führte zur signifikanten Reduktion von Mikroglia und Makrophagen in der CD45^{high}-Fraktion. Nach Ausgaten von toten Zellen über eine DAPI-Färbung wurden die CD45^{high}-Zellen bezüglich ihrer Zusammensetzung analysiert. Exemplarisch wird hier der Dotplot für eine wt/wt-Tumormaus und schließlich jeweils ein Dotplot der CD45^{high}-Fraktion der entsprechenden Gruppe

gezeigt. Durch das Fluoreszenzsignal eGFP bzw. RFP können residente Mikroglia (MG) von eingewanderten Makrophagen (MΦ) unterschieden werden (a). Waren Makrophagen oder Mikrogliazellen defizient für CCR2, führte dies zu einer signifikanten Reduktion der entsprechenden Zelltypen in der CD45^{high}-Fraktion. Relativ gesehen blieben die Anteile an Mikroglia und Makrophagen in der Kontrollgruppe (wt/wt) sowie in der ko/ko-Gruppe gleich (b); $n= 7-13$ pro Gruppe; ns= nicht signifikant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; two-way ANOVA.

Der CCR2ko führte also insgesamt zu einer deutlichen Verringerung von Mikroglia und Makrophagen in der CD45^{high}-Population und beruhte zum einen auf verringerte Einwanderung der entsprechenden Zellen insgesamt (5.1.3.1.1), zum anderen war jedoch auch eine verringerte Hochregulationsfähigkeit von CD45 nicht auszuschließen.

5.1.3.1.5 Zusammensetzung der CD45^{low}-Fraktion

Im Zuge der Untersuchung der CD45^{high}-Fraktion wurde auch die CD45^{low}-Fraktion analysiert. Es zeigte sich, dass sich nahezu ausschließlich Mikroglia in der CD45^{low}-Fraktion befanden. Es konnten Werte zwischen 96,3 % in der ko/wt-Gruppe und 99,2 % in der wt/ko-Gruppe bestimmt werden (Abb. 20).

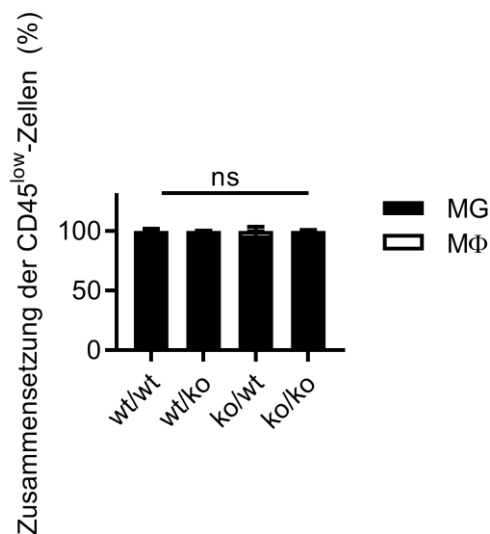


Abb. 20: Die CD45^{low}-Fraktion bestand nahezu ausschließlich aus Mikroglia. Die Gating-Strategie entspricht der Gating-Strategie in Abb. 19. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den entsprechenden Chimärengruppen in Bezug auf eine CCR2-Defizienz festgestellt werden; $n= 7-12$ pro Gruppe; ns= nicht signifikant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; two-way ANOVA.

Es kann davon ausgegangen werden, dass sich in der CD45^{low}-Fraktion unabhängig von einer CCR2-Defizienz nahezu ausschließlich Mikrogliazellen befanden.

5.1.3.2 Analyse von Mikroglia und Makrophagen hinsichtlich verschiedener Moleküle

Im Folgenden werden die untersuchten Moleküle, die den Aktivierungsstatus von Mikroglia und Makrophagen näher charakterisieren, mit ihrer Funktion und detaillierter Beschreibung tabellarisch zusammengefasst (Tab. 24). An d21 nach Tumorzellimplantation wurde aus der Tumorphemisphäre eine Einzelzellsuspension hergestellt. Anschließend wurden die Zellen, die für Oberflächenmolekülfärbungen vorgesehen waren, mit Hilfe von PFA fixiert. Für Zytokinmessungen wurden die Zellen zunächst unter Inkubation des Sekretionsinhibitors Brefeldin A restimuliert und erst im Anschluss fixiert. Die Zielzellpopulation wurde für alle Zellen durch Färbung mittels CD11b und CD45 ermittelt. Danach wurde entsprechend des Fluoreszenzsignals der Chimärengruppen zwischen Mikroglia und Makrophagen unterschieden. Gemessen wurde letztlich stets der Anteil an Zellen, die die entsprechenden Moleküle bzw. das entsprechende Zytokin exprimieren. Um unspezifische Antikörperbindungen detektieren zu können, wurde zu allen Molekülfärbungen Isotypenkontrollen durchgeführt. Diese waren stets negativ. CCR7 war auf keiner der überprüften Zelltypen (Mikroglia und Makrophagen) nachweisbar und wird daher nicht graphisch dargestellt.

Tab. 24: Übersicht über alle durchflusszytometrisch untersuchten Moleküle.

Name	Oberflächenmolekül/Zytokin	Funktion
MHCII	Oberflächenmolekül	Antigenpräsentation
CD86	Oberflächenmolekül	Kostimulatorische Funktion bei Antigenpräsentation
Ly6C	Oberflächenmolekül	Differenzierungsmarker; wird u. a. auf inflammatorischen Monozyten exprimiert
CD13	Oberflächenmolekül	fungiert als Enzym, Rezeptor und/oder Signalmolekül (124)
CD206	Oberflächenmolekül	Mannoserezeptor, der u. a. der Phagozytose von Pathogenen dient (125)
SIRP α	Oberflächenmolekül	Rezeptor für CD47; bei Bindung kommt es zur Inhibition der Phagozytose der entsprechenden Zelle (126)
CCR7	Oberflächenmolekül	Fungiert als Homing-Rezeptor für Lymphozyten und dendritische Zellen in sekundäre lymphatische Organe (127), Expression außerdem auf diversen Tumorzellen (128-130)
TNF α	Zytokin	proinflammatorisch

5.1.3.2.1 Vergleich der Expression verschiedener Moleküle zwischen der CD45^{high}- und CD45^{low}-Fraktion

In der CD45^{low}-Fraktion befanden sich fast ausschließlich Mikrogliazellen (5.1.3.1.5). Im Folgenden wird gezeigt, inwiefern sich die Gesamtpopulation der CD45^{high}-Zellen, also Mikroglia und Makrophagen zusammen, sich in den verschiedenen Gruppen im Hinblick auf die Expression der untersuchten Moleküle von der CD45^{low}-Fraktion unterscheiden (**Abb. 21**). In der CD45^{low}-Fraktion fand bis auf MHCII (**Abb. 21a**) nahezu keine Expression der untersuchten Moleküle statt (**Abb. 21e-g**). Der Unterschied zwischen der CD45^{high}- und CD45^{low}-Population war durch eine stark exprimierende CD45^{high}-Fraktion besonders hoch bei CD86 und Ly6C (**Abb. 21b, c**). Die TNF α -Produktion hingegen war durch die CCR2-Defizienz sowohl in Mikroglia als auch in Makrophagen eingeschränkt (**Abb. 23** und **22g**). Daher bestand in allen Gruppen bis auf die wt/wt-Gruppe zwischen der CD45^{high}- und der CD45^{low}-Fraktion kein signifikanter Unterschied (**Abb. 21g**). Bei den übrigen Molekülen SIRP α , CD13 und CD206 war die Molekülexpression prinzipiell eher niedrig. Daher sind nur vereinzelt signifikante Unterschiede festgestellt worden (**Abb. 21d-f**).

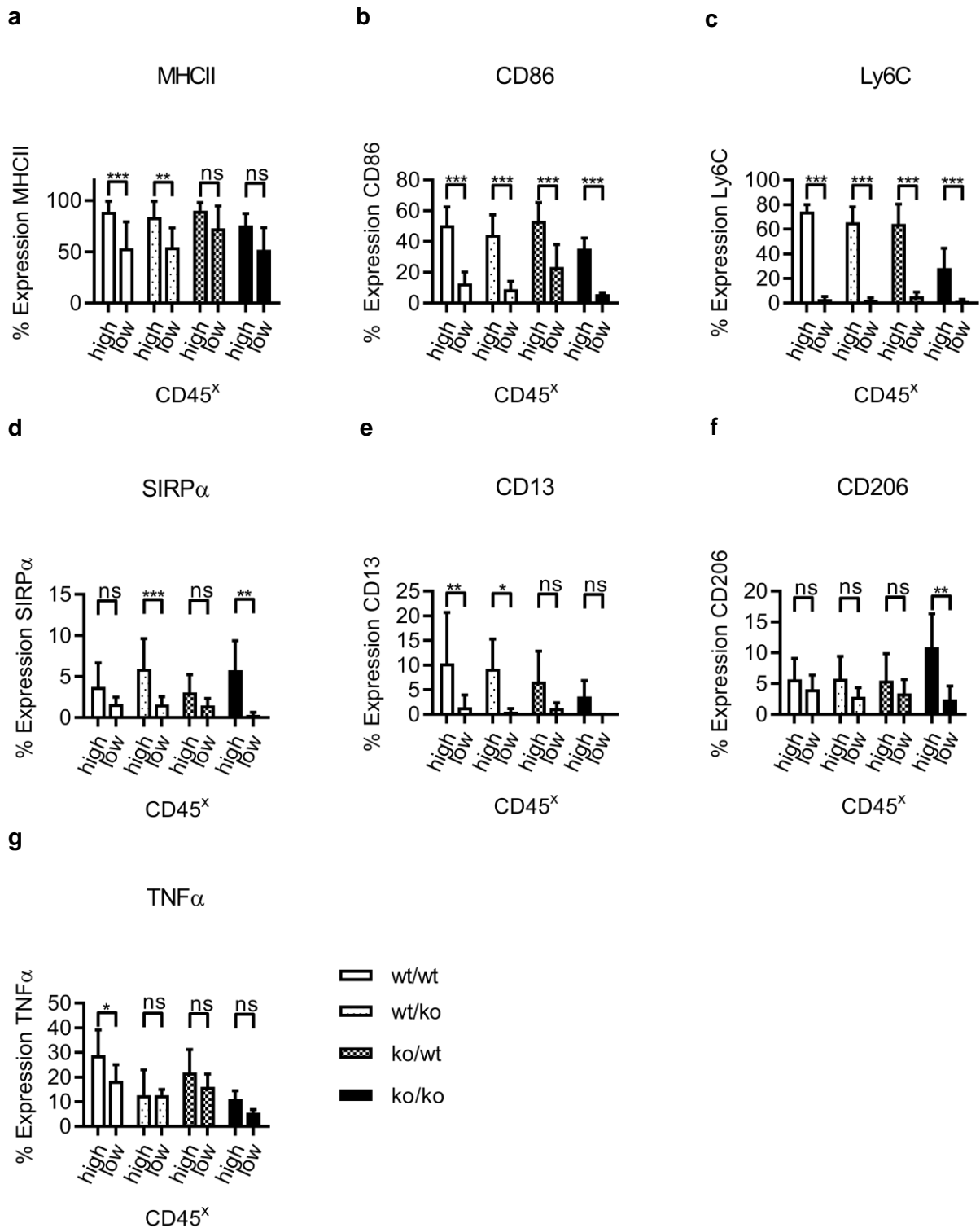


Abb. 21: Die CCR2-Defizienz zeigte einen heterogenen Einfluss auf die CD45^{high}- und CD45^{low}-Fraktionen. Die Analyse der CD45^{high}- und CD45^{low}-Fraktionen wurde durch entsprechendes Gating ermöglicht. Grundsätzlich ist die Expression der Moleküle in der CD45^{low}-Fraktion bis auf MHCII sehr gering. Hohe Molekül exprimierende Zellanteile findet man für CD86 und Ly6C in der CD45^{high}-Fraktion (**b, c**). Teilweise glichen sich CD45^{high} und CD45^{low} durch den Knockout auch an (**a, g**). In zwei Molekülen stieg der CD45^{high} exprimierende Anteil an, während sich der CD45^{low}-Anteil verringerte (im

Vergleich zur wt/wt-Gruppe), sodass die Unterschiede in der ko/ko-Gruppe signifikant wurden (**d, f**); $n= 5-12$ pro Gruppe; ns= nicht signifikant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; one-way ANOVA.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die CCR2-Defizienz der prinzipielle Unterschied zwischen der tumoraktivierten Zellfraktion (CD45^{high}) sowie der nicht aktivierten Fraktion (CD45^{low}) weiterhin bestehen blieb. In der CD45^{high}-Fraktion kam es zu deutlich höheren Expressionsanteilen der untersuchten Moleküle. Es bleibt jedoch anzumerken, dass sich durch einen CCR2ko die Anteile der CD45^{high}-Fraktionen deutlich ändern können (5.1.3.1.3).

5.1.3.2.2 Expression verschiedener Moleküle von CD45^{high}-Mikroglia

Bei den Mikrogliazellen in der CD45^{high}-Fraktion zeigte sich ein moderater Einfluss der CCR2-Defizienz auf die in **Tab. 24** beschriebenen Moleküle (**Abb. 22**). So gab es im Vergleich von wt/wt- und ko/wt-Gruppe einen signifikanten Unterschied im Anteil an Mikrogliazellen, die MHCII exprimieren. Es kam zu einem Abfall um 14,2 % (**Abb. 22a**). Beim kostimulatorischen Molekül CD86 fand sich zwischen wt/wt- und ko/ko-Gruppe eine Reduktion von 60,2 % auf 38,1 % (**Abb. 22b**). Ly6C war das Molekül, für das insgesamt die größten Unterschiede festgestellt wurden. Der Anteil an Ly6C exprimierenden Mikrogliazellen war in der ko/ko-Gruppe um 67,1 % reduziert im Vergleich zur wt/wt-Gruppe. Wt/wt- und ko/wt-Gruppe unterschieden sich nicht voneinander. Eine starke Absenkung fand sich zwischen der wt/ko- und ko/ko-Gruppe (64,4 %). Trugen die Mikroglia bereits den Knockout, führte ein weiterer Knockout der Makrophagen immer noch zu einer Reduktion des entsprechenden Anteils um 52,5 % (**Abb. 22c**). Auch hier schien der zusätzliche Knockout der Makrophagen indirekt Auswirkungen zu zeigen auf den Anteil Ly6C exprimierender Mikrogliazellen. Für die Moleküle SIRP α , CD13 und CD206 wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet (**Abb. 22d-f**). Bei TNF α hingegen wirkte sich der Knockout relativ stark aus, es kam zu einem Abfall der TNF α exprimierenden Mikroglia in der CD45^{high}-Fraktion von 35,6 % auf 14,2 % bei Vergleich der wt/wt- mit der ko/ko-Gruppe. Vergleicht man lediglich wt/wt- und ko/wt-Gruppe, also bei in wt-Form vorliegenden Makrophagen, kann kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Ein signifikanter Abfall war auch zwischen der wt/wt- und wt/ko-Gruppe feststellbar (35,6 % bzw. 15,5 %), obwohl in diesen beiden Gruppen die Mikroglia in ihrer wt-Form vorlagen (**Abb. 22g**).

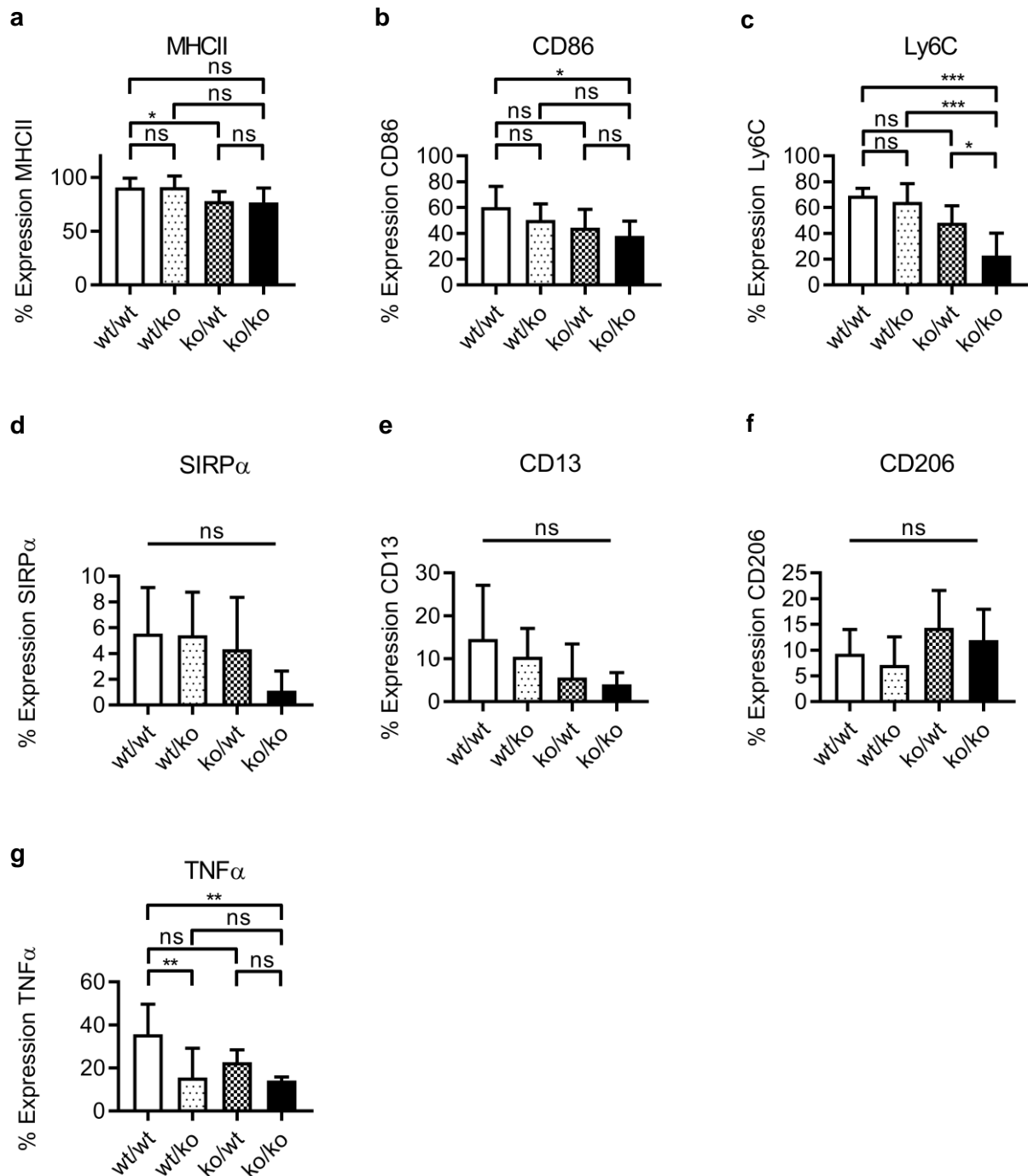


Abb. 22: Die CCR2-Defizienz zeigte insgesamt einen moderaten Einfluss auf die verbliebenen Mikroglia in der CD45^{high}-Fraktion. Nach Fixierung und Färbung der Zellen mittels CD11b und CD45 wurden nun die Mikrogliazellen der CD45^{high}-Fraktion näher betrachtet. Zu allen Molekülfärbungen wurden Isotypenkontrollen durchgeführt. Der Einfluss des CCR2ko auf die die entsprechenden Moleküle exprimierenden Zellanteile war zum Teil signifikant (**a**, **b**, **c**, **g**). Keinen Einfluss hatte der CCR2ko auf SIRP α , CD13 und CD206 (**d**, **e**, **f**); $n= 5-12$ pro Gruppe; ns= nicht signifikant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; one-way ANOVA.

Insgesamt gesehen zeigte der CCR2ko Auswirkungen auf MHCII, CD86, Ly6C und TNF α , wobei die Auswirkungen immer in einer Reduktion der Molekülexpression

resultierten und zumeist zwischen der wt/wt- und der ko/ko-Gruppe am größten waren. Ein Einfluss der Makrophagen auf die Mikrogliazellen ist anzunehmen, da sich eine CCR2-Defizienz der Makrophagen zum Teil auf die Expression der entsprechenden Moleküle von Mikrogliazellen auswirkte.

5.1.3.2.3 Expression verschiedener Moleküle von CD45^{high}-Makrophagen

Es wurden analog zu den Mikrogliazellen die Makrophagen der CD45^{high}-Fraktion näher analysiert (**Abb. 23**). Es kam bei MHCII und CD86 zu einem signifikanten Expressionsabfall um 47,8 % bzw. 60,9 % zwischen wt-Makrophagen und CCR2ko-Makrophagen (wt/wt- und wt/ko-Gruppe) (**Abb. 23a, b**). Waren bereits Mikroglia defizient für CCR2 (ko/wt-Gruppe), konnte ein Knockout der Makrophagen nur für CD86 noch zu einem signifikant verringerten Anteil an exprimierenden Makrophagen führen (ko/ko-Gruppe), woraus sich ein Einfluss der Mikroglia auf Makrophagen ableiten lässt. Die Anzahl Ly6C exprimierender Zellen wurde durch den Knockout ebenfalls signifikant reduziert. So kam es zu einem Abfall zwischen der wt/wt- und wt/ko-Gruppe sowie der ko/wt- und ko/ko-Gruppe. Die größte Reduktion fand jedoch zwischen der wt/wt-Gruppe und der ko/ko-Gruppe statt (von 76,3 % auf 38,7 %), sodass hier eine indirekte Verstärkerwirkung angenommen werden kann, da in der ko/ko-Gruppe auch Mikroglia defizient für CCR2 waren (**Abb. 23c**). Auf SIRP α , CD13 und CD206 schien der CCR2ko keine großen Auswirkungen zu haben, da keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden konnten (**Abb. 23e-f**). Anders sah es bei dem proinflammatorischen Zytokin TNF α aus, hier verschwanden die TNF α exprimierenden Makrophagen durch den Knockout fast gänzlich. In der wt/wt-Gruppe exprimierten durchschnittlich 25,2 % aller Makrophagen TNF α , in der wt/ko- und ko/ko-Gruppe waren es lediglich 5 % bzw. 3,5 % (**Abb. 23g**).

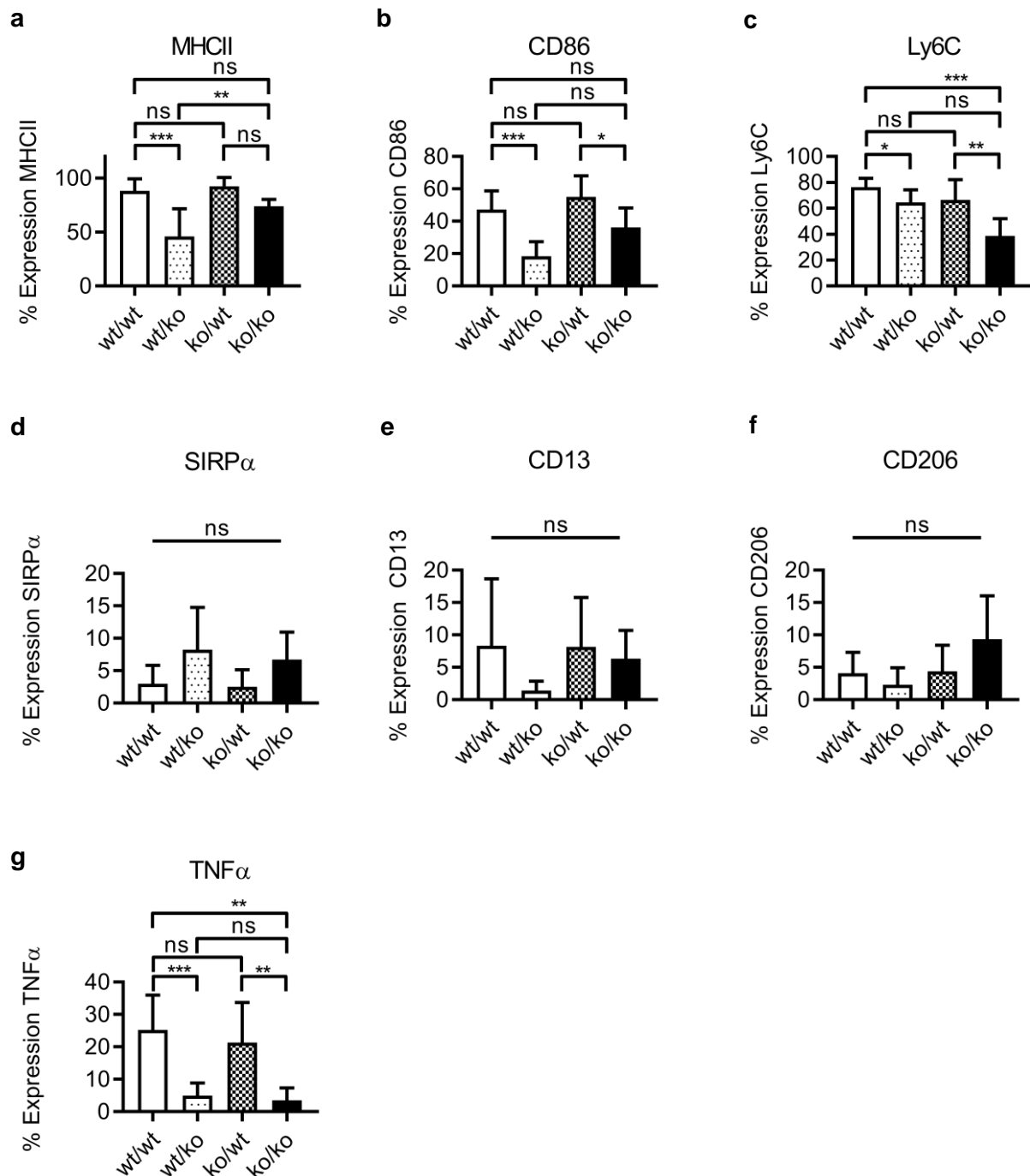


Abb. 23: Die CCR2-Defizienz zeigte große Auswirkungen auf die verbliebenen Makrophagen in der CD45^{high}-Fraktion. Nach Fixierung und Färbung der Zellen mittels CD11b und CD45 wurden die Makrophagen der CD45^{high}-Fraktion näher betrachtet. Zu allen Molekülfärbungen wurden Isotypenkontrollen durchgeführt. Bei MHCII und CD86 fanden durch die CCR2-Defizienz auf Makrophagen große Reduktionen der Molekül exprimierenden Zellen statt (**a** und **b**), bei Ly6C wurde diese Verminderung verstärkt durch einen CCR2ko der Mikroglia (vgl. wt/wt-, wt/ko- und ko/ko-Gruppe) (**c**). Bei SIRP α , CD13 und CD206 waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar (**d-f**). TNF α exprimierende Makrophagen wurden durch den CCR2ko ebenfalls stark reduziert (**g**); $n= 2-12$ pro Gruppe; ns= nicht signifikant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; one-way ANOVA.

Zusammenfassend zeigte der CCR2ko der Makrophagen in der CD45^{high}-Population also vorwiegend einen reduzierenden Einfluss auf die Expression von Molekülen, die im Rahmen von Antigenpräsentation oder Entzündungsgeschehen eine Rolle spielen. Außerdem muss angenommen werden, dass auch ein Knockout von CCR2 auf Mikrogliazellen einen Einfluss auf die Expressionsfähigkeit der entsprechenden Moleküle von Makrophagen besaß.

5.1.4 Analyse der Akkumulation von Mikroglia und Makrophagen mittels fluoreszenzbasierter Immunhistochemie

Unter 5.1.3.1.1 wurde bereits die relative Zusammensetzung von Mikroglia und Makrophagen in den verschiedenen Chimärengruppen untersucht. Aufgrund der angewandten Methode erhielt man relative Verhältnisse zwischen den beiden Zellpopulationen, absolute Zahlen wurden jedoch nicht erfasst. Um die Ergebnisse aus 5.1.3.1.1 näher zu validieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Tumorschnitten angefertigt und diese hinsichtlich residenter Mikroglia und eingewanderter Makrophagen ausgewertet (**Abb. 24**). Dazu wurden Gehirne von Mäusen an d21 nach Tumorzellimplantation entnommen, mit PFA fixiert und nach einigen Entwässerungsschritten schließlich schockgefroren. Nach Anfertigung von Mikrotomschnitten (10 µm) konnten diese mit IBA1 und DAPI gefärbt werden. IBA1 färbt alle Mikroglia und Makrophagen, DAPI diente als Kernfärbung. Gezählt wurden nur IBA1⁺-Zellen im Tumorkernbereich. Unterscheiden konnte man beide Zelltypen über das eGFP- (wt/wt, wt/ko, ko/wt) bzw. RFP-Signal (ko/ko-Gruppe) (**Abb. 24a**). Die Gesamtzellzahl an Mikroglia und Makrophagen, d.h. alle IBA1⁺-Zellen, unterschied sich zwischen der wt/wt- und ko/ko-Gruppe signifikant voneinander. In der ko/ko-Gruppe wurden deutlich weniger Zellen festgestellt als in der wt/wt-Gruppe (275 Zellen/mm² bzw. 425 Zellen/mm²) (**Abb. 24b**). Bei differenzierter Betrachtung beider Zellpopulationen (**Abb. 24c, d**) ergaben sich bei Betrachtung der Mikroglia (**Abb. 24c**) Zellzahlen zwischen 158-341 Mikroglia/mm², wobei der CCR2ko die Mikrogliaakkumulation deutlich einzuschränken schien (ko/wt-Gruppe: 158 Zellen/mm²). Gleiches trifft auch auf die Einwanderung von Makrophagen zu, diese reduzierte sich von 123 Makrophagen/mm² auf 41 Makrophagen/mm² um 66,7 % (vgl. wt/wt- und wt/ko-Gruppe). Zudem wandern Makrophagen in der ko/wt-Gruppe in signifikant höherer Anzahl (229 Zellen/mm²) ein als in der wt/wt-Gruppe (123 Zellen/mm²). Weiterhin waren in der ko/ko-Gruppe

Makrophagen kaum noch nachzuweisen (25 Makrophagen/mm²), was besonders im Vergleich zur ko/wt-Gruppe in einer hohen Signifikanz zum Ausdruck kommt (Abb. 24d).

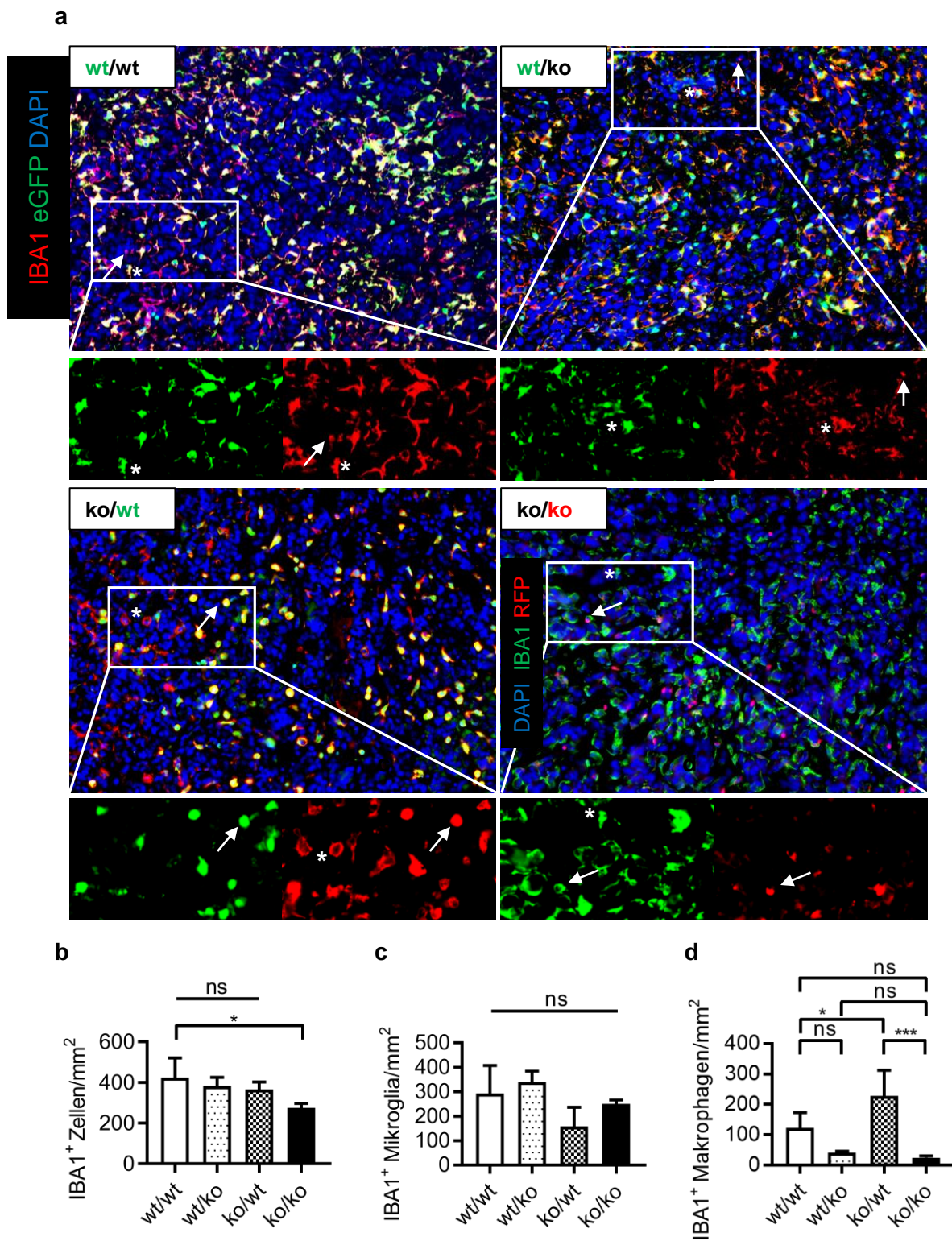


Abb. 24: CCR2ko führte zu einer Änderung der Akkumulation von Mikroglia und Makrophagen im Tumorgewebe. Unter (a) werden exemplarisch Immunfluoreszenzbilder aller Tumorchimären

gezeigt. Mit Hilfe der Fluoreszenzsignale eGFP und RFP ließen sich residente Mikroglia (Sternchen) von eingewanderten Makrophagen (Pfeil) unterscheiden. Unterhalb der jeweiligen Bilder befinden sich vergrößerte Einzelkanalaufnahmen für IBA und eGFP bzw. RFP. Es zeigte sich, dass die Gesamtzahl an IBA1⁺-Zellen über alle Gruppen hinweg sich nur zwischen der wt/wt- und ko/ko-Gruppe signifikant änderte (**b**). Betrachtet man Mikroglia und Makrophagen getrennt, erkennt man, dass sich die Mikrogliaanzahl in der ko/wt-Gruppe tendenziell verringert (**c**). Tragen Makrophagen den Knockout, wandern auch sie in geringerer Zahl ein. Zwischen ko/wt und der ko/ko-Gruppe ergeben sich hochsignifikante Unterschiede durch eine deutlich erhöhte Makrophagenanzahl in der ko/wt-Gruppe im Vergleich zur wt/wt-Gruppe und eine sichtbare Reduktion der Zellzahl in der ko/ko-Gruppe (**d**); n= 4-7 pro Gruppe; ns= nicht signifikant, *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001; one-way ANOVA.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass der CCR2ko die Rekrutierung von IBA1⁺-Zellen in das Tumorgewebe lediglich dann verminderte, wenn der Knockout beide Zellpopulationen betraf (ko/ko-Gruppe) (**Abb. 24a**). Betrachtet man Mikroglia sowie Makrophagen einzeln, so erkennt man deutlich, dass, hinsichtlich ihrer Akkumulation, Makrophagen wesentlich stärker von einem CCR2ko beeinträchtigt wurden als Mikroglia. Außerdem schienen die Makrophagen die partielle Reduktion der Mikroglia aufgrund der CCR2-Defizienz durch verstärkte Einwanderung auszugleichen (**Abb. 24c, d**).

5.1.5 *In-vitro*-Experimente

5.1.5.1 CD45-Hochregulation

Unter 5.1.3.1.4 wurde bereits gezeigt, dass der CCR2ko zu deutlichen Veränderungen von Mikroglia und Makrophagen führt. Der CCR2ko scheint dazu zu führen, dass Mikroglia und Makrophagen CD45 nicht mehr hochregulieren können und/oder die Rekrutierung in die betroffene Hirnhemisphäre eingeschränkt ist. Die Auszählung unter 5.1.4. deutet zumindest bei den Makrophagen tendenziell auf eine verminderte Rekrutierung hin (**Abb. 24d**). Inwiefern die Hochregulationsfähigkeit betroffen ist, sollte im folgenden Experiment näher untersucht werden (**Abb. 25**). Die Relevanz der CD45 Hochregulation ergibt sich aus deutlichen funktionellen Unterschieden zwischen der CD45^{high}- und CD45^{low}-Population. So weisen CD45^{high}-Zellen proinflammatorische sowie immunsuppressive Eigenschaften auf, wohingegen die CD45^{low}-Population nahezu keine Expression relevanter Marker zeigt (115). Im Experiment wurden Mikroglia und Makrophagen unter verschiedenen Bedingungen (nicht stimuliert und stimuliert) kultiviert und nach 3 bzw. 6 Tagen durchflusszytometrisch hinsichtlich der mittleren Fluoreszenzstärke (mfi) von CD45^{high} untersucht. Mikroglia wurden dabei aus naiven Hirnen durch MACS-Sortierung via CD11b-Markierung isoliert und

anschließend kultiviert. Makrophagenkulturen stammen aus der Gewinnung von Monozyten/Progenitorzellen aus murinem Knochenmark und anschließender Stimulation durch den Wachstumsfaktor M-CSF.

5.1.5.2 Analyse der CD45-Expression von Mikroglia und Makrophagen an d3 und d6

In diesem *In-vitro*-Experiment konnte bei Betrachtung der mittleren Fluoreszenzintensität der CD45^{high}-Fraktion festgestellt werden, dass sich grundsätzlich sowohl Mikroglia als auch Makrophagen durch stimulierende Medien zu höherer CD45-Expression anregen lassen. Als Stimulans wurde hierzu DMEM ((w), +FCS/ P/S)) für Mikroglia und Tumor-konditioniertes Medium (*engl.* TCM: *tumor conditioned medium*) für Makrophagen verwendet. Als Negativkontrolle diente Neuromedium, welches lediglich bei den Mikroglia zu leicht erhöhten mfi-Werten führte, die jedoch insgesamt vernachlässigbar blieben (**Abb. 25b, c, e, f**). Man erkennt den deutlichen Anstieg der CD45^{high}-Fraktion bei Hinzugabe der stimulierenden Medien, die sich dann deutlich von der CD45^{low}-Fraktion abgrenzen lässt (**Abb. 25a, d**). Unter der **Abb. 25g** wird exemplarisch eine Mikroglia- und Makrophagenkultur dargestellt.

Besonders auffällig war, dass CD45 auf Mikrogliazellen durch Stimulation unabhängig von einer CCR2-Defizienz hochreguliert wurde. In beiden Fällen (CX3CR1-eGFP und CCR2ko) kam es zu einer deutlichen Hochregulation zwischen d3 und d6 (**Abb. 25b, c**). Bei Makrophagen hingegen konnte eine geringere Hochregulation von CD45 beobachtet werden (**Abb. 25e, f**).

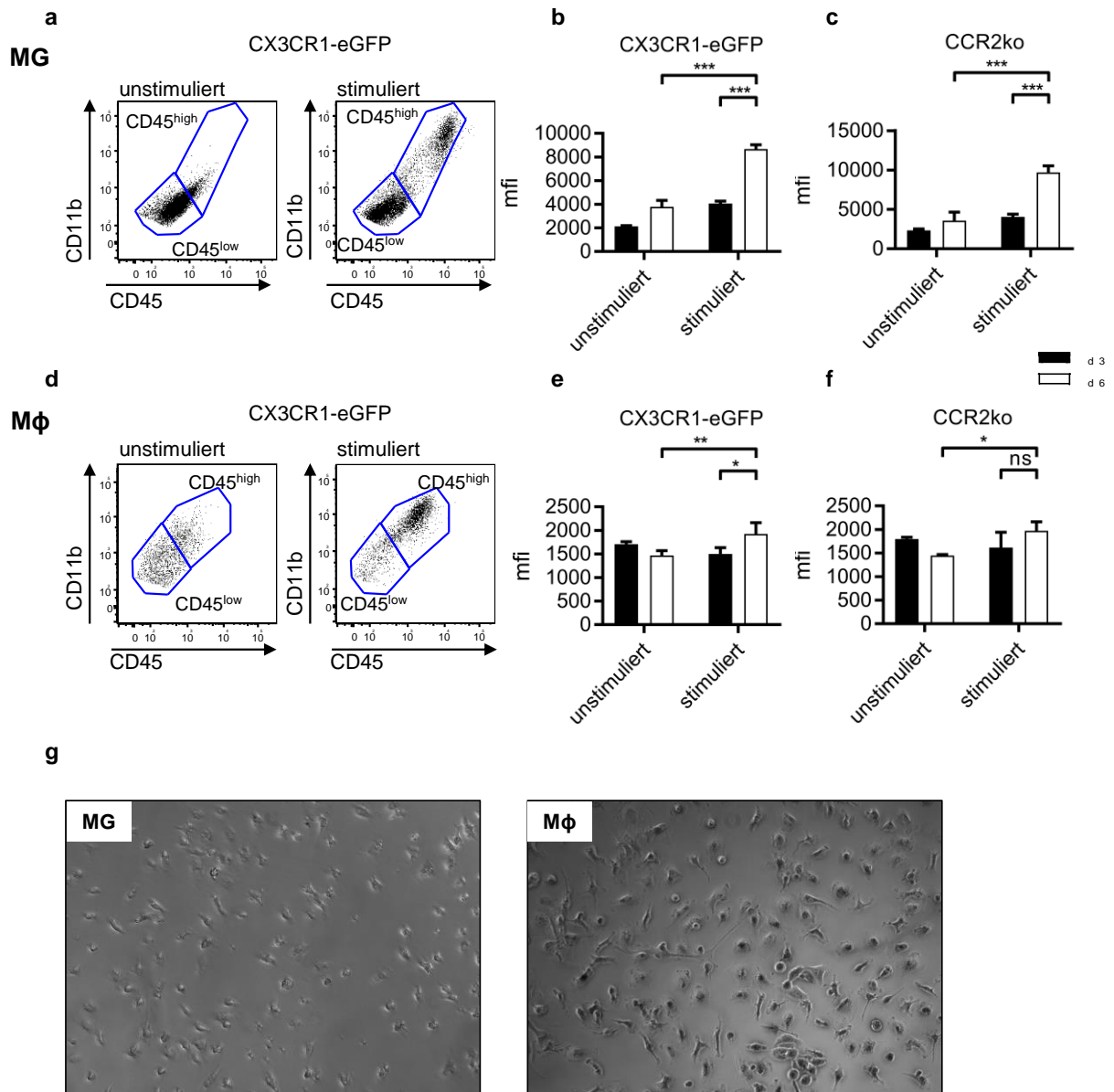


Abb. 25: Stimulation von Mikroglia und Makrophagen führte sowohl bei CX3CR1-eGFP als auch bei CCR2ko Zellen zum Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität. Die CD45^{high} Population lässt sich auf den exemplarischen Dotplots von CX3CR1-eGFP Mikroglia bzw. Makrophagen von Tag 6 deutlich von der CD45^{low} Population abgrenzen (**a, d**). Es zeigte sich zudem, dass sich Mikroglia unabhängig einer CCR2-Defizienz stark stimulieren lassen (**b, c**). Bei Makrophagen ist ein Anstieg der mfi bei Kultivierung mit stimulierendem Medium zu beobachten, dieser fällt jedoch im Vergleich deutlich geringer aus (**d, e**) und ist bei CCR2ko Makrophagen nicht signifikant (**f**). Die phänotypische Erscheinung von stimulierten Zellen drückt sich in der Vergrößerung der Zellkörper und Ausbildung von Zellfortsätzen aus. Dargestellt sind CX3CR1-eGFP Zellen an d6 (**g**); n=4 Wells pro Kondition, ein repräsentatives Ergebnis von mind. 3 unabhängigen Experimenten wird gezeigt, ns= nicht signifikant, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; two-way ANOVA.

Insgesamt gesehen waren beide Zellpopulationen, also sowohl Mikroglia als auch Makrophagen, hinsichtlich ihrer CD45-Expression durch die verwendeten Medien stimulierbar. Dabei spielte der C-C-Chemokin-Rezeptor 2 für Mikroglia offensichtlich

keine Rolle bei der Hochregulation von CD45. CCR2ko-Makrophagen hingegen zeigten zwar ebenfalls eine Stimulierbarkeit, diese war im Gegensatz zu den CX3CR1-eGFP-Makrophagen jedoch nicht signifikant.

5.1.5.3 Phagozytose-Assay

Der Einfluss der CCR2-Defizienz auf funktionelle Eigenschaften von Mikroglia bzw. Makrophagen sollte mittels Phagozytose-Assay überprüft werden. Dazu wurden Mikroglia aus naiven Mäusen isoliert und kultiviert. Nach acht Tagen wurde dann der Assay durchgeführt. Makrophagen wurden durch Kultivierung der Vorläuferzellen aus Knochenmark gewonnen und schließlich nach Reinheitsüberprüfung dem Assay zugeführt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch. Gezählt wurden diejenigen Zellen, die mind. zwei Phagozytose-Beads inkorporiert hatten. Getestet wurde normales Kulturmedium (DMEM bzw. RPMI) gegen TCM, welches den Überstand einer GL261-Kultur darstellt (**Abb. 26**). Innerhalb der Mikroglia-Gruppe konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die durchschnittliche Phagozytoserate lag zwischen 33,5 % (CX3CR1-eGFP-DMEM) und 49,5 % (CCR2ko-TCM) (**Abb. 26a**). Makrophagen hingegen phagozytierten signifikant häufiger, wenn sie nicht defizient für CCR2 waren (CX3CR1-eGFP-RPMI: 84,3 % bzw. CCR2ko-RPMI: 63,5 %). Ein Unterschied zwischen RPMI und TCM konnte nur für CCR2ko-Makrophagen festgestellt werden. Hier wurden CCR2ko-Makrophagen durch TCM hinsichtlich ihrer Phagozytoserate stimuliert (79,7 % bzw. 63,5 %) (**Abb. 26b**). Deutlich zu erkennen sind die phagozytierten Beads innerhalb der Zellkörper von MG und MΦ (**Abb. 26c**).

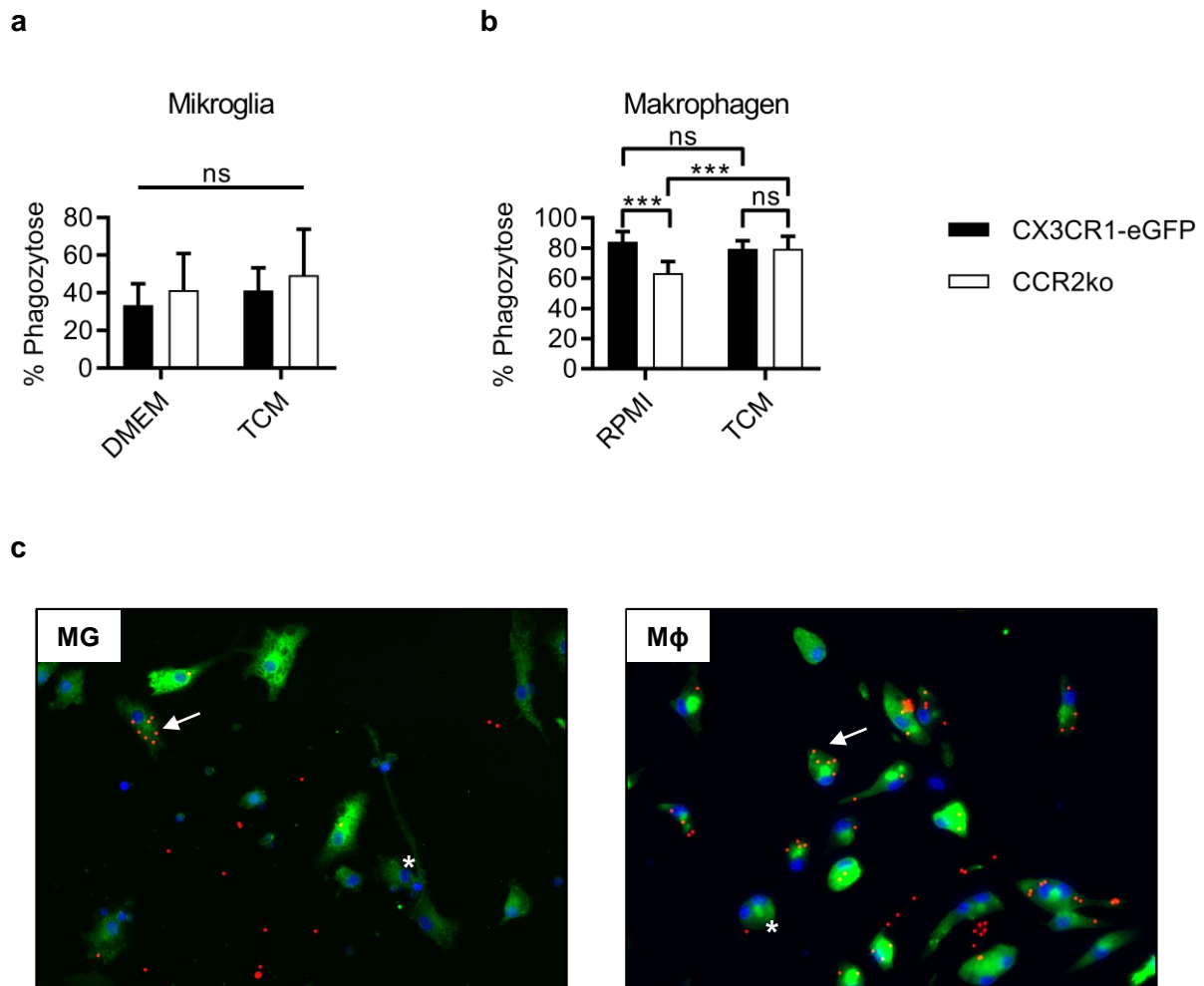


Abb. 26: Mikroglia und Makrophagen zeigten durch eine CCR2-Defizienz nur geringe Einschränkungen bezüglich ihrer Phagozytosefähigkeit. Es wird exemplarisch das Ergebnis eines Experiments präsentiert. Hierbei zeigte sich bei Mikroglia (MG) zwischen dem Kulturmedium DMEM und dem Stimulationsmedium TCM kein Unterschied (**a**). Bei Makrophagen (Mφ) zeigte sich bei RPMI eine signifikant höhere Phagozytoserate innerhalb der CCR2⁺-Makrophagen (CX3CR1-eGFP). Zudem stieg die Phagozytose bei TCM-stimulierten CCR2ko-Makrophagen signifikant an im Vergleich zum Kulturmedium (**b**). Exemplarische Bilder des Assays zeigen sowohl phagozytierende (Pfeil) als auch nicht phagozytierende Mikroglia (MG) bzw. Makrophagen (Mφ) (Sternchen) (**c**); n=2 wells pro Kondition, insgesamt wurden zwei Wiederholungen durchgeführt, ns= nicht signifikant, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; two-way ANOVA.

Die CCR2-Defizienz schien bezüglich der Phagozytoserate nur auf Makrophagen einen Einfluss zu haben. Tendenziell hatte auch TCM eher aktivierenden als inhibierenden Charakter. Jedoch ist zu beachten, dass bei diesem Experiment noch nicht ausreichend Wiederholungen durchgeführt worden sind, sodass eine endgültige Aussage noch nicht getroffen werden kann.

5.1.6 Tumorummetrie mittels 7T-Magnetresonanztomographie

Durch den Knockout kam es zu signifikanten Unterschieden in der Zusammensetzung der Immunzellpopulation (5.1.3.1) bei tumortragenden Mäusen sowie zu Expressionsveränderungen (5.1.3.2). Nun sollte untersucht werden, welche *In-vivo*-Effekte in den verschiedenen Gruppen auftreten. Hierzu wurde eine Tumorummetrie in T2- sowie in T1-Wichtung (mit Kontrastmittel) mittels 7T-MRT durchgeführt (Abb. 27). T2-gewichtete Aufnahmen stellen insbesondere Flüssigkeiten hyperintens dar, T1-gewichtete Aufnahmen vor allem Kontrastmittel aufnehmende Strukturen. Messungen fanden an Tag 7, 14 und 21 statt. Es zeigte sich in allen Gruppen der typisch exponentielle Wachstumsverlauf von Tumoren in der Frühphase (131). Exemplarisch ist dies an der wt/wt-Gruppe und einer dazugehörigen Maus dargestellt (Abb. 27a, b). Der Tumorprogress äußerte sich in einem kaum sichtbaren Tumor an d7, der jedoch in den zwei darauffolgenden Wochen deutlich anwuchs (Abb. 27b). Im Schnitt lagen die Tumorummetrien an d7 für die T2-Wichtung zwischen 0,67 mm³ (ko/wt) und 0,77 mm³ (wt/ko). Am letzten Messtag wurden in gleicher Wichtung durchschnittliche Volumina zwischen 7,56 mm³ (wt/ko) und 11,7 mm³ (ko/wt) erreicht (Abb. 27c). Für die T1-Wichtung mit Kontrastmittel wurden ähnliche Werte festgestellt (Abb. 27d).

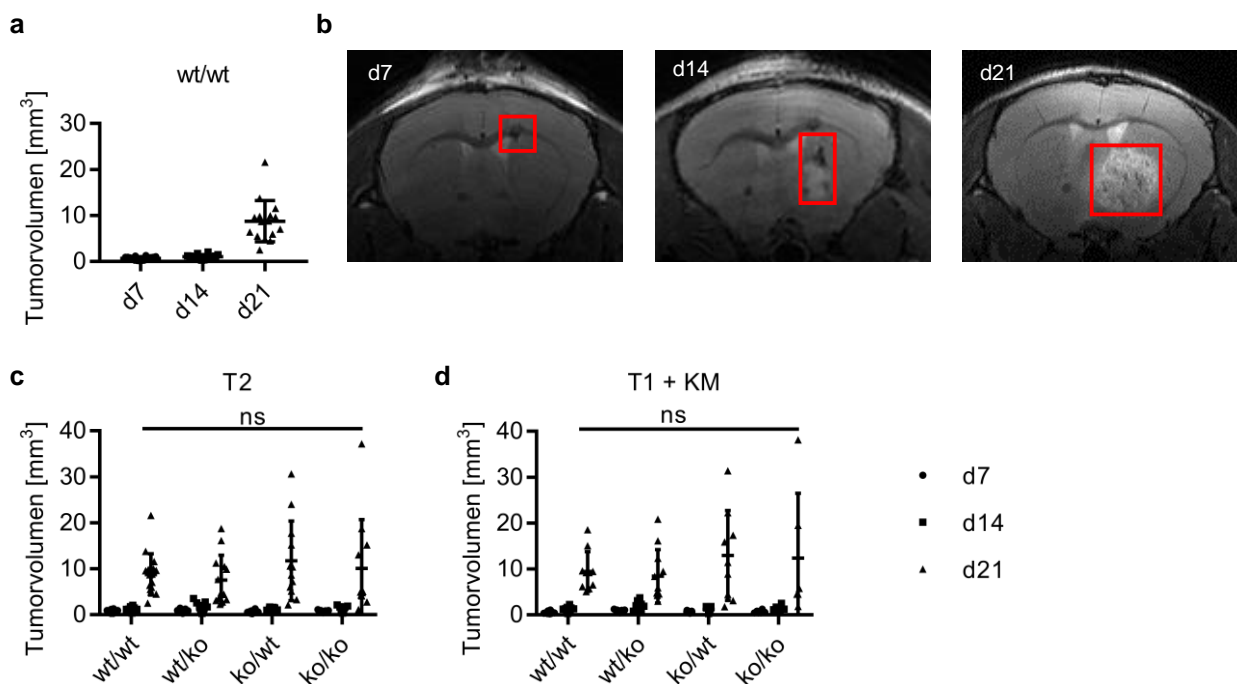


Abb. 27: Die CCR2-Defizienz zeigte keine Auswirkungen auf die Tumorummetrie. Das exponentielle Tumorumwachstum (T2-Wichtung) ist exemplarisch anhand der wt/wt-Gruppe dargestellt (a).

Exemplarische T2-gewichtete MRT Aufnahmen einer wt/wt Maus: Zu sehen war an d7 lediglich die Einstichstelle (siehe Markierung). An den zwei weiteren Messzeitpunkten war der Tumor bereits deutlich erkennbar (**b**). Zwischen den Gruppen gab es weder in der T2- noch in der T1-Wichtung signifikante Unterschiede an d7, d14 und d21 (**c, d**); $n=6-16$ pro Gruppe; ns= nicht signifikant, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; two-way ANOVA.

Insgesamt bestanden zwischen den Gruppen weder in der T2- noch in der T1-Wichtung signifikante Unterschiede zu allen Messzeitpunkten. Die CCR2-Defizienz für Mikroglia und Makrophagen schien somit keine sich im Tumolvolumen äußernden *In-vivo*-Effekte aufzuweisen.

5.1.7 Magnetresonanzspektroskopische Messungen

Mit Hilfe der Proton-Magnetresonanzspektroskopie (^1H -MRS) ist es möglich, Stoffkonzentrationen *in vivo* in einem vorgegebenen, dreidimensionalen Bereich zu bestimmen. Dieser sogenannte Voxel war $5,832\text{ cm}^3$ groß und wurde an d21 des Tumorstadiums durch initiale MRT-Übersichtsaufnahmen im Zentrum des Tumors positioniert. Durch nachfolgende spektroskopische Messung ergaben sich dann die Metabolitenkonzentrationen in diesem bestimmten Bereich (**Abb. 28**). Beispielhaft wird der Voxel sowie die spektroskopische Analyse einer wt-wt-Tumormaus gezeigt (**Abb. 28a**). Ausgewertet wurden nach einer Voranalyse durch die „Core Facility 7T Experimentelle MRTs“ 13 Metabolite, für die es bereits ähnliche Untersuchungen in verschiedenen Gliommodellen gibt (81) (**Abb. 28b**).

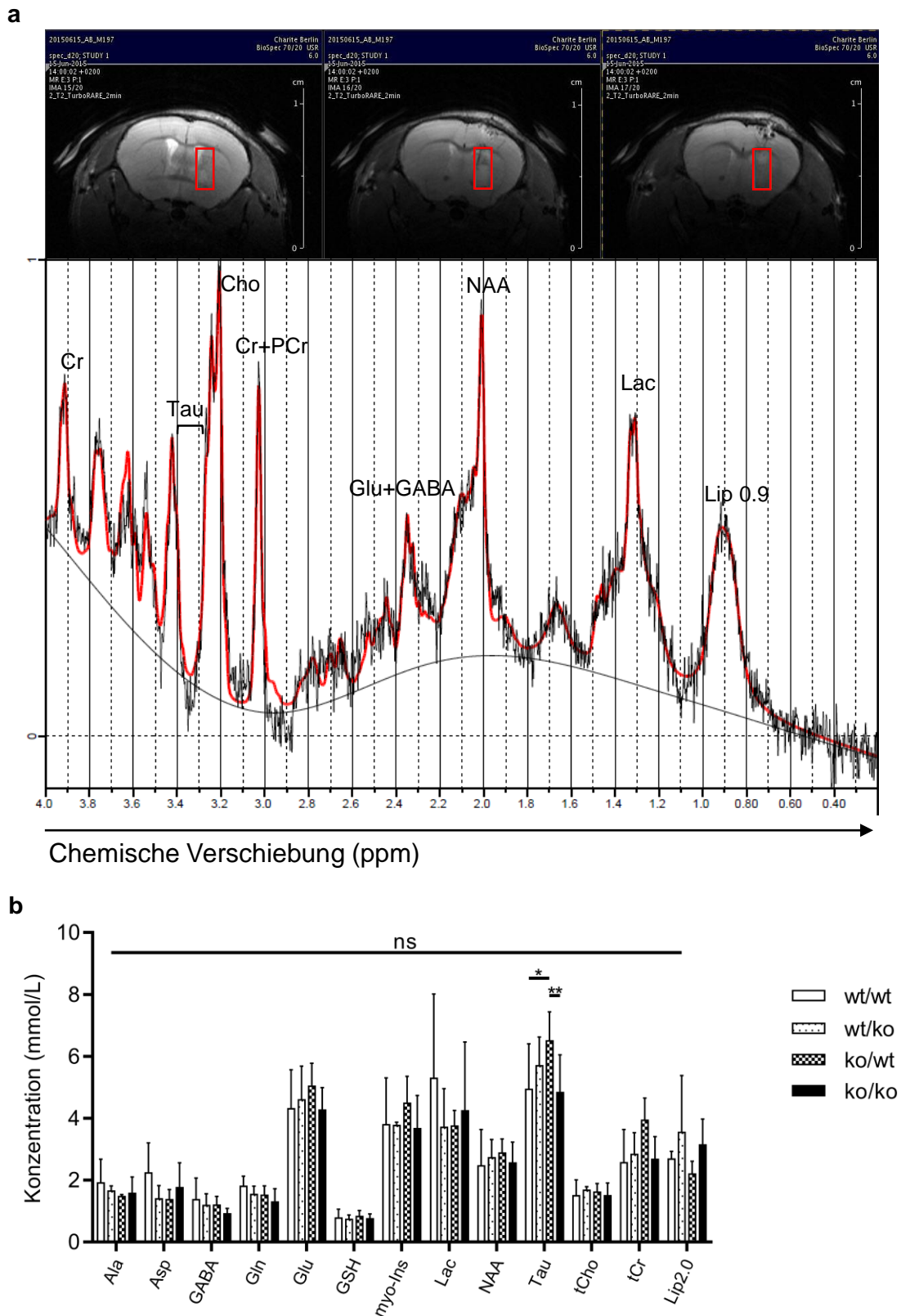


Abb. 28: Die spektroskopischen Messungen ergaben lediglich einen signifikanten Unterschied für den Metaboliten Taurin. Beispielhaft wird das gesamte Spektrum einer wt/wt-Tumormaus an d21 mit Markierung einiger Metabolite gezeigt. Das Integral unter der Kurve ergibt die Stoffkonzentration. Darüber sieht man die Positionierung des Voxels in Rot in gleicher Maus (a). Die Stoffkonzentrationen

sind in einem Diagramm aufgetragen. Nur für den Metaboliten Taurin ergibt sich eine signifikant höhere Konzentration für die ko/wt Gruppe im Vergleich zur wt/wt- sowie ko/ko-Gruppe (**b**). Spektrum wurde aus dem Programm LCModel entnommen (Version 6.3-1K, Copyright: S. W. Provencher (132)). Ala, Alanin, Asp, Aspartat, GABA, γ -Aminobuttersäure, Gln, Glutamin, Glu, Glutamat, GSH, Glutathion, myo-Ins, myo-Inositol, Lac, Laktat, NAA, N-Acetylaspartat, Tau, Taurin, tCho, Gesamtcholin, tCr, Gesamtkreatin, Lip2.0, Lipid mit peak bei 2.0 ppm; $n=4-10$ pro Gruppe; ns= nicht signifikant, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; two-way ANOVA. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Mitarbeiter Susanne Müller sowie Dr. Philipp Böhm-Sturm der Core Facility 7T Experimentelle MRTs.

Insgesamt konnten einige typische Veränderungen innerhalb des Tumors im Vergleich zu naiven Tieren beobachtet werden. So sanken beispielsweise die Konzentrationen von N-Acetylaspartat (NAA), ein Marker für die neuronale Zellintegrität, sowie das Gesamtkreatin (tCr), ein Marker für die Energiespeicher der Zelle, in den Tumormäusen ab (Daten nicht gezeigt) (80). Dieses Phänomen wurde bereits in der Literatur beschrieben und ist auch im humanen Kontext präsent (79). Innerhalb der Chimärengruppen konnte lediglich für das Molekül Taurin ein signifikanter Unterschied zwischen der ko/wt- (6,5 mmol/L) und der wt/wt- (5,0 mmol/L) sowie der ko/ko-Gruppe (4,9 mmol/L) festgestellt werden (**Abb. 28b**). Die exakte Funktion von Taurin im ZNS ist noch unklar. Es spielt jedoch eine Rolle in der Osmoregulation und als inhibitorischer Neurotransmitter (80, 133).

5.2 Genexpressionsanalyse anti- und proinflammatorischer Moleküle von wt- und CCR2ko-CD11b⁺-Zellen im Tumor

Unter 5.1.3.1.1 und 5.1.3.1.3 konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl der Makrophagenanteil als auch der CD45^{high}-Anteil an allen CD11b⁺CD45⁺-Zellen in der ko/ko-Gruppe signifikant geringer ist. Somit ist davon auszugehen, dass in der Tumorphemisphere weniger aktivierte myeloide Zellen vorhanden sind, da besonders die CD45^{high}-Fraktion anti- und pro-inflammatorische Charakteristika aufweist (115). Um dieses Phänomen gesamtheitlich auf RNA-Ebene zu überprüfen, wurde die quantitative real-time PCR durchgeführt. Hierfür wurde RNA aus Mikroglia/Makrophagen (CD11b⁺-Zellen) der tumortragenden Hirnhemisphären von C57BL/6J und CCR2ko Mäusen isoliert. Dabei wurden die C57BL/6J-Tumormäuse als Analogon zur wt/wt-Gruppe und die CCR2ko-Tumormäuse als Pendant zur ko/ko-Gruppe mit verringertem Makrophagen- und CD45^{high}-Anteil herangezogen (**Abb. 29**). Generell fand eine starke Expression proinflammatorischer Moleküle in beiden Mausstämmen statt. Durch den CCR2ko wurde

5 Ergebnisse

die Expression sowohl von anti- (Stat3) als auch von proinflammatorischen Molekülen (Irf7, Cox2, Ifn β , Il1 β , Il12 α) durch Herauf- oder Herunterregulation verändert.

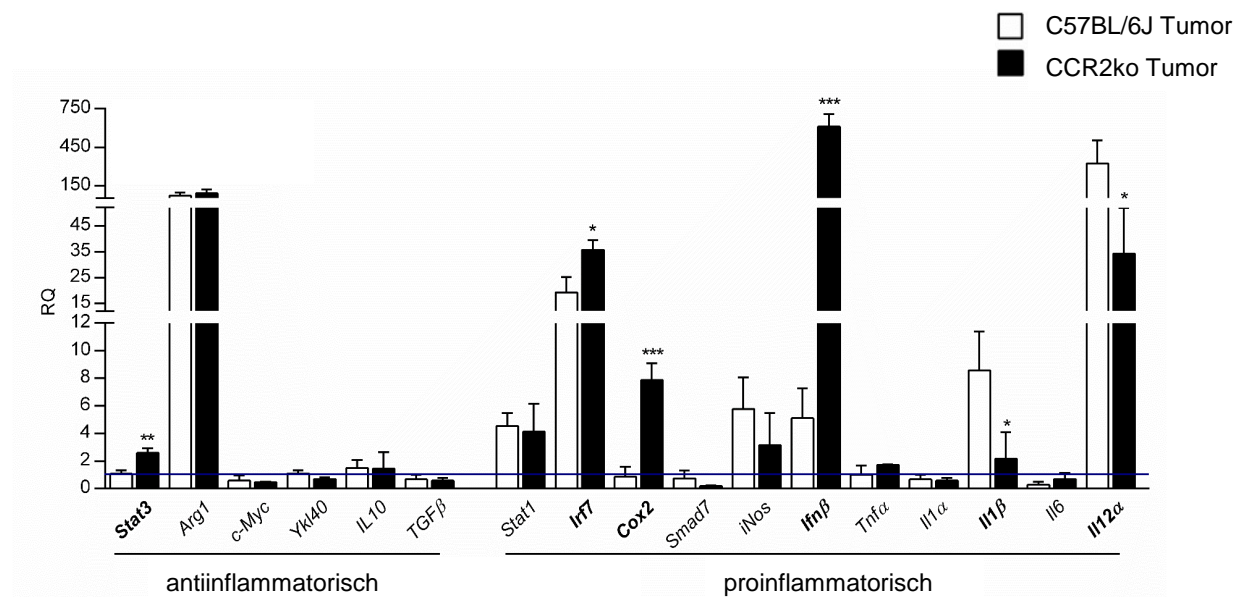


Abb. 29: Sowohl myeloide Zellen aus C57BL/6J- als auch aus CCR2ko-Tumormäusen exprimieren anti- und proinflammatorische Moleküle. In Blau wird die Expression von naiven C57BL/6J-Mäusen als Bezugspunkt dargestellt. Eine spezifische Polarisierung durch den CCR2ko zu einem anti- oder proinflammatorischen Phänotyp war anhand der untersuchten Marker nicht möglich; n=4-10 pro Gruppe; ns= nicht signifikant, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; one-way ANOVA.

Insgesamt bot sich ein heterogenes Bild auf RNA-Ebene. Eine spezifische Polarisierung der myeloiden Zellpopulationen zu eher anti- oder proinflammatorischen Eigenschaften konnte nicht festgestellt werden.

6 Diskussion

6.1 Kritische Betrachtung der Methodik: Das GL261-Mausmodell und seine Alternativen

Das größte Problem bei der Verwendung eines Tumormausmodells stellt sicherlich die Tatsache dar, dass ein Modell im Vergleich zur Wirklichkeit immer nur eine Annäherung an diese darstellt. Für Tiere im Allgemeinen gilt, dass diese prinzipiell keine spontanen ZNS-Tumore entwickeln (134). Daher musste in dieser Arbeit auf ein Tumormodell zurückgegriffen werden, welches der Wirklichkeit am ehesten entspricht. In diesem Fall wurde ein syngenes Tumormausmodell mit der Gliomzelllinie GL261 verwendet. Diese wurde durch ursprünglich intrazerebrale Injektion des Karzinogens Methylcholanthren induziert (94) und im Verlauf zu einer stabilen Zelllinie weiterentwickelt (135). Generell soll eine Tumorzelllinie ähnliche Eigenschaften wie der zu repräsentierende Tumor aufweisen und zugleich reproduzierbare Ergebnisse liefern. In diesem Falle bedeutete dies, dass die GL261-Tumore möglichst invasiv und infiltrativ wachsend, möglichst nicht metastasierend und wenig immunogen sein sollten (135). Mit der GL261-Zelllinie konnten viele dieser Eigenschaften erfüllt werden. Im Folgenden soll jedoch trotzdem kurz auf etwaige Alternativen eingegangen werden. Zum einen gibt es bereits erwähnte syngene Transplantationen (a) von Tumorzellen, d.h. die Implantation von Zellen, die aus dem gleichen Organismus stammen. Somit sind Abstoßungsreaktionen des Empfängerorganismus nahezu ausgeschlossen. Zum anderen gibt es die Implantation von humanen Tumorzellen (z. B. U87, U251) in immundefiziente Mäuse, sog. Xenografts (b) (136). Die dritte Möglichkeit besteht in der Implantation von Molekülen, die selbst Tumore induzieren (c), z. B. virusinduzierte Tumore (137, 138). Alle drei Möglichkeiten haben für ihren spezifischen Einsatzzweck ihre Berechtigung. So stellt die syngene Implantation von Tumoren eine hervorragende Möglichkeit dar, die wechselseitige Beziehung zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem näher zu betrachten (137). Hingegen können immunzellbasierte Therapien am besten im Rahmen von Xenograft-basierten Tumormodellen getestet werden (139). Der Nachteil von immunkompromittierten Mäusen liegt auf der Hand. Vor allem T-Zell-getriggerte Immunantworten (134) sind hier kaum zu untersuchen, wohingegen das angeborene Immunsystem oder Zytokin-induzierte NK-Zellen (140, 141) weiterhin gut untersucht werden können. Der Vorteil von virusinduzierten Tumoren liegt u. a. in der

geringeren Schädigung des Empfängerorganismus bei Inokulationen. Nachteilig wirkt sich sicher die geringe Reproduzier- und Planbarkeit aus (137, 138). Der größte Nachteil der hier verwendeten Gliomzelllinie GL261 besteht sicherlich in der (moderaten) Immunogenität, die diese Zelllinie besitzt. Szatmari *et al.* konnten zeigen, dass durch eine subkutane Injektion bestrahlter GL261-Zellen sieben Tage vor intrakranieller Implantation ca. 80-90 % der Tiere tumorfrei blieben. Zurückzuführen ist dies wahrscheinlich auf die Expression von MHC I Molekülen sowie der kostimulatorischen Moleküle B7. Dadurch wird eine T-Zell-vermittelte Immunantwort seitens der Tumormaus getriggert (93, 135). Humane Glioblastome zeichnen sich hingegen durch ihr Immunprivileg bzw. immunsuppressives Milieu aus (142). Gerade aber im Hinblick auf das aggressive und infiltrative Wachstum von Glioblastomen, welches als eines der Hauptgründe für die schlechte Therapierbarkeit dieser Tumorerkrankung gilt, bieten GL261-Zellen ein gutes Modell zur Erforschung dieses Tumors (136).

6.2 Einteilung der Mikroglia und Makrophagen in den M1/M2-Status

Bekanntermaßen machen tumorassoziierte Mikroglia/Makrophagen (TAM) einen großen Teil der Immunzellpopulation innerhalb eines GBM aus (143, 144). Eine Zuschreibung der Gesamtpopulation zu einer M2-Polarisierung (145) mit ausschließlich tumorfördernden Eigenschaften gemäß der M1/M2-Klassifikation scheint überholt und wurde durch Szulzewsky *et al.* eindeutig widerlegt. Es wird vielmehr eine Mischpopulation, die jeweils verschieden hohe Anteile an Genen exprimiert, die dem jeweiligen M1/M2-Status zugeordnet werden können, beschrieben. Der Großteil an TAMs lässt sich jedoch weder dem M1- noch dem M2-Status zuordnen (41). In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob sich durch Unterscheidung von Mikroglia und Makrophagen mittels Chimärenmodell, anstatt reiner CD45-Expression wie bei Szulzewsky *et al.*, sowie mit und ohne CCR2ko eine etwas genauere Abgrenzung in Bezug auf pro- oder antitumorale Eigenschaften beider Populationen herstellen lässt.

6.3 Einfluss des CCR2ko auf Mikroglia und Makrophagen

Um den Einfluss des CCR2ko auf die beiden untersuchten Zellpopulationen bestimmen zu können, ist es zunächst unabdingbar, den Nachweis zu erbringen, dass Mikroglia und Makrophagen den CC-Rezeptor 2 grundsätzlich exprimieren. In der

Literatur besteht Einigkeit darüber, dass Makrophagen CCR2 in unterschiedlichem Ausmaß exprimieren können (15). Gordon *et al.* unterscheiden u. a. inflammatorische CCR2⁺Ly6C⁺ von residenten CCR2⁻Ly6C⁻ Monozyten (146). Uneinigkeit hingegen besteht darüber, ob Mikroglia prinzipiell in der Lage sind, CCR2 zu exprimieren. Einige Autoren gehen davon aus, dass auch Mikroglia CCR2 besitzen (147), ihre CCR2-Expression hochregulieren können bzw. die Mikrogliaaktivierung von einer CCR2-Expression abhängig ist (148, 149), andere können generell keine CCR2-Expression nachweisen (61). Ein Nachweis von CCR2 mittels Western Blot der Mikrogliazelllinie BV2 existiert hingegen (150). In dieser Arbeit wurde eine durchflusszytometrische CCR2-Färbung durchgeführt (5.1.1), die gezeigt hat, dass die Expression der beiden Zellpopulationen in tumortragenden Gehirnen in erheblichem Maße von der Färbestrategie der Zellen abhängig war. Generell kann aber festgestellt werden, dass CCR2 sowohl auf Mikroglia als auch auf Makrophagen nachzuweisen ist.

6.3.1 Migration

6.3.1.1 Migratorischer Effekt des CCR2ko auf Mikroglia

Die Gesamtverteilung von Mikroglia ist abhängig vom CCR2-Status. Vergleicht man die Ergebnisse der Verteilungshäufigkeit der durchflusszytometrischen Analyse der wt/wt-Gruppe mit der ko/wt-Gruppe ergibt sich, dass durch die CCR2-Defizienz signifikant weniger Mikroglia in der tumortragenden Hirnhemisphäre akkumulieren (76,7 % bzw. 59 %). Sofern beide Zellpopulationen defizient für CCR2 waren (ko/ko-Gruppe) schien der Effekt auf Seiten der Makrophagen deutlich stärker ausgeprägt zu sein als bei den Mikrogliazellen. In der ko/ko-Gruppe befanden sich prozentual gesehen fast ausschließlich Mikroglia (93,6 %) (5.1.3.1.1). Bose *et al.* konnten zeigen, dass Mikroglia migration generell *in vitro* über CCL2 stimulierbar ist (150). Zum gleichen Ergebnis kamen bereits Cross *et al.* 1999, ebenfalls in einer *In-vitro*-Studie (151). Jedoch gibt es bisher wenige *In-vivo*-Studien, die einen Rekrutierungsmechanismus von Mikroglia über die CCR2/CCL2-Achse belegen. Die beeinträchtigte Akkumulation von Mikroglia wurde des Weiteren über Immunfluoreszenzanalysen quantitativ überprüft, da es sich bei durchflusszytometrischen Ergebnissen um relative Zahlenangaben handelt, die durch Veränderungen des jeweiligen Counterparts, in diesem Falle durch Makrophagen, beeinflusst werden können. Es zeigte sich eine tendenziell verringerte Ansammlung von Mikrogliazellen in der ko/wt-Gruppe (158 Zellen/mm² bzw.

293 Zellen/mm² in der wt/wt-Gruppe) und in gleicher Gruppe eine signifikant erhöhte Makrophagenanzahl im Vergleich zur wt/wt-Gruppe. In der wt/ko-Gruppe schien die Mikrogliaanzahl zwar erhöht, jedoch nicht signifikant, und in der ko/ko-Gruppe tendenziell erniedrigt (5.1.4). Diese Ergebnisse deuten auf einen prinzipiellen Einfluss der CCR2-Defizienz auf die Migration von Mikroglia hin, der sich eher in einer verminderten Migration äußert. Die CCR2/CCL2-Achse kann demnach nicht die Hauptrolle bei der Rekrutierung zentraler Mikroglia in das Tumorgewebe spielen. Gleichzeitig kommt es zum kompensatorisch erhöhten Migrationseffekt bei CCR2ko der Makrophagen (wt/ko-Gruppe).

6.3.1.2 Migratorischer Effekt des CCR2ko auf Makrophagen

Durch eine CCR2-Defizienz veränderte sich die Zusammensetzung der gesamten CD11b⁺CD45⁺-Zellpopulation hinsichtlich der Makrophagen in der tumortragenden Hirnhemisphäre in den untersuchten Chimärengruppen teilweise drastisch. Bei Betrachtung der durchflusszytometrischen Analysen der wt/ko-Gruppe, also der Gruppe, in der die Makrophagen defizient für CCR2 waren, kam es zu einer erheblichen Reduktion der Einwanderung von Makrophagen in die Tumorchemisphäre im Vergleich zur wt/wt-Gruppe (von 23,3 % auf 3 %). Betrachtet man die ko/ko-Gruppe, bei der sowohl Mikroglia als auch Makrophagen defizient für diesen Rezeptor sind, erkennt man, dass in dieser Gruppe nahezu ausschließlich Mikroglia vorzufinden sind (93,6 %) (5.1.3.1.1). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass CCR2ko-Makrophagen deutlich stärker in ihrer Akkumulation beeinträchtigt sind als Mikroglia. In einer Studie von Kuziel *et al.* wurde bereits 1997 gezeigt, dass eine CCR2-Defizienz zu verringerter Akkumulation von Makrophagen im Rahmen einer künstlich herbeigeführten Peritonitis führt (66). Auch eine andere Studie bestätigt die nonredundante Akkumulation über den CC-Rezeptor 2 bei einer bakteriellen Infektion (152). Ein Nachweis für die CCR2-abhängige Einwanderung peripherer Makrophagen in das ZNS im Zusammenhang mit einer Tumorerkrankung wurde bislang jedoch nicht erbracht. Um die relativen Zellzahlen der eben genannten FACS-Analysen zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzbilder quantitativ ausgewertet (5.1.4). Die Makrophagenanzahl in der wt/ko-Gruppe war im Vergleich zur wt/wt-Gruppe tendenziell verringert (122,9 Zellen/mm² bzw. 41 Zellen/mm²) und die Mikrogliaanzahl in gleicher Gruppe erhöht (292,8 Zellen/mm² bzw. 340,7 Zellen/mm²). Es zeigte sich, dass die Gesamtzahlen an

IBA1⁺-Zellen sich lediglich zwischen der wt/wt- und der ko/ko-Gruppe signifikant voneinander unterscheiden. Daraus lässt sich schließen, dass bei verringerter Einwanderung peripherer myeloider Zellen die Akkumulation von zentralen Mikroglia kompensatorisch erhöht und so ein Gleichgewicht erreicht wird. Dieser Mechanismus wird durch den Knockout von sowohl Mikroglia als auch Makrophagen (ko/ko-Gruppe) im Sinne einer insgesamt verringerten Akkumulation von IBA1⁺-Zellen gestört, da die normalerweise kompensierende Zellpopulation ebenfalls in ihrer Migration beeinträchtigt ist.

6.3.2 CD45-Expression

6.3.2.1 Veränderungen der CD45-Expression von Mikroglia

Die Zusammensetzung der CD45^{low}- sowie der CD45^{high}-Population wurde in Abhängigkeit der Chimärengruppen untersucht (5.1.3.1.4 und 5.1.3.1.5). In der Literatur werden Mikroglia sowie Makrophagen anhand ihrer CD45-Expression voneinander unterschieden. CD45^{low}-Zellen werden dabei den residenten Mikroglia zugeordnet, wohingegen CD45^{high}-Zellen den einwandernden Makrophagen zugeschrieben werden (50, 123). Mit unserem Modell haben wir bestätigt, dass die CD45^{low}-Population fast ausschließlich aus Mikroglia besteht. Konträr zur gegenwärtigen Literatur steht jedoch das Ergebnis dieser Arbeit bezüglich der durchflusszytometrischen Zusammensetzung der CD45^{high}-Fraktion. Hier zeigte sich, dass in der wt/wt-Gruppe Mikroglia und Makrophagen zu etwa gleichen Teilen vorhanden waren (55,2 % bzw. 44,8 %). Der Anteil an Mikroglia in der CD45^{high}-Fraktion war abhängig vom CCR2-Status. Betrug er in der wt/wt-Gruppe noch 55,2 %; so führte deren Knockout zu einem Abfall auf 16,5 % in der ko/wt-Gruppe. Bei dieser Betrachtungsweise müssen parallel jedoch auch immer die absoluten Zellzahlen berücksichtigt werden, um valide Aussagen treffen zu können. In diesem Fall kam es in der ko/wt-Gruppe auch tatsächlich zu einer insgesamt reduzierten Akkumulation von Mikrogliazellen, die jedoch nicht signifikant ist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Mikroglia grundsätzlich durch den CCR2ko in ihrer Fähigkeit, CD45 hoch zu regulieren, beeinträchtigt werden. In der ko/ko-Gruppe ähnelte die Zusammensetzung der CD45^{high}-Fraktion der wt/wt-Gruppe bei jedoch insgesamt deutlich reduziertem CD45^{high}-Anteil an allen CD11b⁺CD45⁺-Zellen sowie reduzierter Gesamtzellzahl an Iba1⁺-Zellen. Überprüft wurden die Ergebnisse zusätzlich in *In-vitro*-Studien mit primären Zellen (5.1.5.2).

Anhand der mfi wurde die CD45-Expression von CD45^{high}-CCR2⁻ und CCR2ko-Mikroglia an d3 und d6 mit und ohne Stimulation untersucht. Hier zeigte sich, dass sich Mikroglia *in vitro* unabhängig vom CCR2-Status stark stimulieren ließen und die mfi für CD45 zwischen beiden Testzeitpunkten unter Stimulation signifikant anstieg. Dies entspricht der aktuellen Literatur (51). Mit abschließender Sicherheit kann auf Grundlage dieser Ergebnisse nicht gesagt werden, ob die CD45-Expression von Mikroglia CCR2-abhängig ist.

6.3.2.2 Veränderungen der CD45-Expression von Makrophagen

Die Effekte des CCR2ko hinsichtlich der Hochregulationsfähigkeit auf Makrophagen sind geringer ausgeprägt als auf Mikrogliazellen. Bei analoger Betrachtung der durchflusszytometrischen Analysen fällt zunächst auf, dass in der wt/ko-Gruppe der Anteil an Makrophagen in der CD45^{high}-Fraktion sehr gering ist. Diese besteht zu ca. 94 % aus Mikroglia (5.1.3.1.4). Gründe hierfür sind entweder verminderte Einwanderung oder verminderte Hochregulationsfähigkeit von CD45. Bei Betrachtung der absoluten Makrophagenzahlen in der Tumorehemisphäre ergibt sich, dass insgesamt sehr wenige Makrophagen überhaupt in die Tumorehemisphäre einwanderten (5.1.4). Daher muss hier eher von verminderter Rekrutierung als von verminderter CD45-Hochregulationsfähigkeit gesprochen werden. Die CD45^{high}-Fraktion der ko/ko-Gruppe teilte sich, bei stark reduzierter CD45^{high}-Fraktion, ungefähr paritätisch auf Mikroglia und Makrophagen auf. Weiterhin wurde die CD45-Expression an primär kultivierten Makrophagen untersucht (5.1.5.2). Dazu wurden die mfi von CD45^{high}-CCR2⁺ und -CCR2ko-Makrophagen an d3 und d6 miteinander verglichen. Durch Stimulation stieg die mfi bei wt-Makrophagen sowie bei CCR2ko-Makrophagen leicht an. Für die CCR2ko-Makrophagen konnte jedoch keine Signifikanz gemessen werden. Abschließend sind die Ergebnisse jedoch, verglichen zu den Veränderungen nach Stimulation bei Mikroglia, eher als gering einzustufen. Dieses Ergebnis bestätigt *in vitro*, dass sowohl CCR2-tragende als auch -defiziente Makrophagen CD45 nur eingeschränkt hochregulieren können, jedoch, wie bereits zuvor erwähnt (6.3.1.2), deutlich in ihrer Migration eingeschränkt sind.

6.3.3 Expressionsprofile

6.3.3.1 Expression bestimmter Moleküle von CD11b⁺CD45^{high}-Mikroglia

Neben den Effekten auf die Akkumulation und Expressionsfähigkeit von CD45 von Mikroglia wurde die Expression bestimmter Moleküle von CD45^{high}-Mikroglia näher betrachtet, die besonders im immunologischen Kontext eine große Rolle spielen (6.3.3.1). Die Zellanteile von CD45^{high}-Mikroglia, die die untersuchten Moleküle exprimierten, unterschieden sich je nach Gruppenzugehörigkeit unterschiedlich stark. Dabei waren die größten prozentualen Rückgänge für CD86, ein kostimulatorisches Molekül, Ly6C, welches v. a. auf inflammatorischen Monozyten zu finden ist (15), und TNF α zwischen der wt/wt- und ko/ko-Gruppe festzustellen. Ein signifikanter Unterschied im Sinne einer Reduktion ergab sich zwischen der wt/wt- und ko/wt-Gruppe lediglich für MHCII. Für SIRP α , CD13 und CD206 unterschieden sich die Zellanteile, die die betreffenden Moleküle exprimierten, nicht signifikant voneinander. Insgesamt zeigte sich hier, dass der CCR2ko auch auf die durch den CCR2ko in der CD45^{high}-Fraktion schon reduziert vorhandenen Mikroglia einen zusätzlichen Einfluss besaß. Dies betraf vor allem proinflammatorische Moleküle. Besonders hervorzuheben ist hier sicherlich der Fakt, dass der Effekt, nämlich die Reduktion von Mikrogliazellen, die diese Moleküle exprimierten, vor allem auf einem CCR2ko der Makrophagen basierte, da zwischen den CD45^{high}-Mikroglia der wt/wt- und ko/ko-Gruppe die größten Unterschiede bestanden.

6.3.3.2 Expression bestimmter Moleküle von CD11b⁺CD45^{high}-Makrophagen

Auch bei CD45^{high}-Makrophagen konnten bezüglich der Expression der untersuchten Moleküle große Unterschiede gemessen werden (6.3.3.2). Es zeigte sich, dass die Anteile an Zellen, die die Moleküle MHCII und CD86 exprimieren, in der wt/ko-Gruppe im Vergleich zur wt/wt-Gruppe signifikant abfielen. Gleiches gilt für Ly6C. Auch TNF α als inflammatorisches Molekül wurde von weniger Makrophagen exprimiert, sofern diese CCR2-defizient waren.

Zusammenfassend wurde hier gezeigt, dass die CCR2-Defizienz auf verbliebenen CD45^{high}-Makrophagen eine Reduktion der Expression von proinflammatorischen Molekülen bewirkt, die, im Gegensatz zu den Analysen der CD45^{high}-Mikroglia, bei

vorhandenem CCR2 der Mikroglia am stärksten ausgeprägt ist, nämlich zwischen CD45^{high}-Makrophagen der wt/wt- und wt/ko-Gruppe.

6.3.4 Relevanz der CCR2-Defizienz im Tumorkontext

Der CCR2ko zeigt also Effekte auf Migration (6.3.1), CD45-Expressionsfähigkeit (6.3.2.) und Expression von bestimmten Molekülen von sowohl Mikroglia (6.3.3.1) als auch Makrophagen (6.3.3.2). Es kommt dabei immer zu einer Reduktion des untersuchten Merkmals. Insbesondere durch verminderte Expression von CD45 bzw. den reduzierten Anteil an CD45^{high}-Zellen kommt es zu einer deutlichen Modulation der Immunantwort. CD45 spielt eine entscheidende Rolle in den Antigenrezeptorsignalwegen und führt zur Aktivierung von T-, B- und NK-Zellen (122). So zeigten CD45-defiziente Menschen und Mäuse einen schweren kombinierten Immundefekt (*engl. SCID: severe combined immunodeficiency syndrome*) (153). Auch im Tumorkontext scheint CD45 eine große Rolle zu spielen (154). Im Vergleich der CD45^{high}-mit der CD45^{low}-Fraktion konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die untersuchten Moleküle in der CD45^{low}-Fraktion unabhängig der Gruppenzugehörigkeit prozentual nur von wenig Zellen exprimiert werden (5.1.3.2.1). In der Literatur bestätigt sich dieses Ergebnis. Brandenburg *et al.* konnten 2017 zeigen, dass die CD45^{high}-Fraktion die tumoraktivierte Fraktion darstellt und deutlich größere Zellanteile antigenpräsentierende bzw. kostimulatorische Moleküle exprimieren (115). Jedoch wurde von den gleichen Autoren auch immunsuppressive Eigenschaften dieser Zellen festgestellt, die auf das Vorhandensein von myeloiden Suppressorzellen (*engl. MDSC: myeloid-derived suppressor cells*) hindeuten. Es lässt sich schlussfolgern, dass einerseits Mikroglia sowohl in Migration als auch CD45-Expression durch eine CCR2-Defizienz beeinträchtigt sind, wohingegen Makrophagen CCR2 vor allem benötigen, um in das ZNS einwandern zu können (6.3.1.2). Durch die CCR2/CCL2-Achse lässt sich also der Anteil von Mikroglia/Makrophagen an der tumoraktivierten CD45^{high}-Fraktion modulieren. Mögliche Auswirkungen im Hinblick auf Mortalität waren nicht Gegenstand dieser Arbeit und sollten in weiteren Studien fortgeführt werden unter Beachtung der Tatsache, dass auch die CD45^{high}-Fraktion keine rein pro- oder antitumorale Fraktion darstellt (115). Auch temporäre Entwicklungen im Verlauf der Tumorprogression müssen beachtet werden.

6.3.5 Tumorumfängen im Chimärenmodell

Zu drei Zeitpunkten des Tumorumwachstums (d7, d14, d21) wurden jeweils Tumorumfängenbestimmungen mittels T1- und T2-Wichtung durchgeführt. Über alle Gruppen hinweg konnten zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede im Volumen festgestellt werden. Zwar konnte gezeigt werden, dass durch den CCR2ko deutliche Unterschiede im Migrationsverhalten von Mikroglia und Makrophagen zu beobachten waren. Änderungen im Tumorumfängen wurden laut aktueller Literatur jedoch stets dann beobachtet, sofern Änderungen in der Gesamtzahl von Mikroglia/Makrophagen herbeigeführt wurden (45, 46). Diese Änderungen wurden über transgene CD11b-*HSV-TK (+/-)* Mäuse und anschließender Depletion mittels Ganciclovirgabe erreicht und betrafen dann immer alle CD11b⁺-Zellen, also Mikroglia und Makrophagen. Die zu geringe Änderung der Gesamtzahl an myeloiden Zellen in der Tumorumhemisphäre in dieser Arbeit könnte ein Grund sein für die gleichbleibenden Tumorumfängen. Bei näherer Betrachtung der Zusammensetzung von Mikroglia und Makrophagen innerhalb der einzelnen Gruppen wird ersichtlich, dass, sofern ein CCR2ko von Mikroglia oder Makrophagen vorhanden ist, dieselbe Zellfraktion vermindert und die jeweils andere Zellpopulation, zwar nicht immer signifikant, aber doch merklich erhöht ist (5.1.4). Es scheint also einen Mechanismus der Homöostase zu geben, der dazu führt, dass der Gesamtpool an myeloiden Zellen im ZNS konstant bleibt. Ähnliches wurde von Varvel *et al.* bereits 2012 beobachtet. Durch Depletion der Mikroglia mit Hilfe von *HSV-TK-Mäusen* kam es zwei Wochen nach Stopp der Ganciclovirgabe zu einer Repopulation des Gehirns mit peripheren Makrophagen. Des Weiteren konnten nach Depletion der Mikroglia hohe Level an CCL2 gemessen werden, die dann, nach Migration der Makrophagen, wieder auf Normalniveau abfielen (155). Analog dazu zeigt sich bei peripheren Tumoren, in diesem Fall bei Zervixtumoren, eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bei eingeschränkter Makrophagenakkumulation durch Verwendung eines CCR2ko-Mausmodells (156). Bei dualer Defizienz des CCR2, d.h. in der ko/ko-Gruppe, würde man folgerichtig vermuten, dass die Gesamtzahl an Mikroglia und Makrophagen deutlich vermindert ist. Dies konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dennoch reduziert sich vor allem die Makrophagenanzahl. Es stellt sich daher unweigerlich die Frage, über welchen Mechanismus, unabhängig des CCR2/CCL2-Signalweges, es nun zur Akkumulation von Mikroglia kommt. Mikroglia reagieren bekanntermaßen auf jedwede Form von Hirnschädigungen

oder -krankheiten, bei denen es zum Untergang von Zellen kommt. Freigesetztes ADP/ATP wirkt dabei chemotaktisch auf Mikrogliazellen und führt zur lokalen Akkumulation (157-159). Makrophagen hingegen werden laut Literatur fast ausschließlich über die CCR2/CCL2-Achse rekrutiert (58, 65, 152). Aber auch hier scheint es weitere Rekrutierungsmechanismen zu geben. IL-6 beispielsweise spielt sowohl *in vitro* als auch beim hepatozellulärem Karzinom eine große Rolle im Rahmen der Rekrutierung von Makrophagen (160, 161). Außerdem korreliert die IL-6-Expression u. a. mit Wachstum und Migration von Gliomen (162). Eine CCL2/CCR2/IL-6 Achse wurde 2011 von Zhangs Arbeitsgruppe für Mikroglia beschrieben, bei der über CCL2 Mikroglia rekrutiert werden, die wiederum IL-6 ausschütten und somit das Tumorstadium fördern (59). Inwiefern IL-6 als eigenständiger Rekrutierungsfaktor dient, wurde nicht untersucht. IL-6 selbst wird jedoch auch von Gliomzellen produziert (163). Weitere Studien sollten diesbezüglich durchgeführt werden. Andere bereits bekannte Rekrutierungswege von Glioma-assoziierten Makrophagen/Mikroglia sind u. a. CCL7 (164), die CX3CR1/CX3L1-Achse (165) oder Ecrp4 (166).

6.4 Zukünftige Therapieansätze

Das bisherige Standardtherapieregime bei erstmalig diagnostiziertem Glioblastoma multiforme besteht aus maximal möglicher Tumoresektion, gefolgt von einer Radiochemotherapie (9). Seit der Entdeckung der klinischen Wirksamkeit von Temozolomid 2005 hat sich das Gesamtüberleben der Patienten durch Entdeckung neuer Therapien nicht wesentlich verändert (10, 13). Neuere Erkenntnisse auf molekularer Ebene haben das Verständnis des Tumorstadiums deutlich verbessert. So sind vermehrt tumorfördernde Signalwege in den Fokus der Forschung gerückt. Medikamente, die gegen mutierte Rezeptortyrosinkinasen eingesetzt werden und somit das unkontrollierte Tumorstadium unterbinden sollen, spielen dabei über alle Krebsarten hinweg die größte Rolle (167). Auch im Glioblastom zählen entsprechende Gene zu den am häufigsten mutierten (168). Die gezielte Krebstherapie, die sogenannte *targeted therapy*, zeigt beim Glioblastom insgesamt gesehen jedoch leider nicht den gewünschten Erfolg. Gründe hierfür sind sicherlich die Heterogenität des Tumors, die u. a. dazu führt, dass verschiedene Mutationen vorhanden sind und somit eingesetzte Medikamente konträre Effekte erzielen könnten. Nicht zuletzt ist aber auch die Tatsache, dass

potenzielle Medikamente die Blut-Hirn-Schranke überwinden müssen, nicht zu unterschätzen (13, 167, 168).

Eine andere vielversprechende Methode der Behandlung ist die Immuntherapie. Dabei versucht man das Immunsystem so zu modulieren, dass es zu einer starken antitumoralen Antwort kommt. Große Aufmerksamkeit erlangten dabei die Immun-Checkpoint-Inhibitoren. Dabei wird verhindert, dass Tumorzellen über Bindung an Immunzellen immunsupprimierende Signalkaskaden in Gang setzen. Durch Gabe von Antikörpern gegen sog. Checkpoints wird die Rezeptor-Liganden-Bindung zwischen Tumor- und Immunzelle unterbrochen und somit die gewünschte antitumorale Immunreaktion eingeleitet. Die Ergebnisse sind in Bezug auf das Glioblastom eher ernüchternd, jedoch in Kombination mit Strahlentherapie erfolgreicher (13, 169, 170). Darüber hinaus werden zurzeit T-Zell-basierte Therapien und Impfungen in Studien getestet (13).

Die Tatsache, dass tumorassoziierte Mikroglia und Makrophagen bis zu 50 % der Zellen innerhalb des Tumors ausmachen (24, 33, 171), macht diese zu einem attraktiven therapeutischen Ziel. Es gibt deutlich mehr Studien, die Mikroglia/Makrophagen einen tumorsupportiven Effekt unterstellen (42, 172-175) als umgekehrt (46). Die beiden Zellpopulationen werden jedoch selten getrennt betrachtet. Falls doch, dann entweder aufgrund ihrer CD45- (50) oder CCR2-Expression (52). Wie in dieser Arbeit jedoch gezeigt wurde, ist ein solches Vorgehen nicht korrekt, da sowohl Mikroglia CD45 hochregulieren als auch CCR2 exprimieren können (5.1.3.1.4. und 5.1.1.). Die Ergebnisse der entsprechenden Studien beziehen sich also möglicherweise immer auf gemischte Populationen. Die Notwendigkeit einer Unterscheidung besteht auch in der Tatsache, dass Mikroglia und Makrophagen sich trotz großer Ähnlichkeit auf molekularer und funktioneller Ebene voneinander unterscheiden (49, 176). In diesem Zusammenhang interessant ist sicherlich die Entdeckung des Mikroglia spezifischen Transkriptionsfaktors *Sall1* (177), über den zukünftig eine Unterscheidung residenter von einwandernden Makrophagen möglich sein könnte. Therapeutisch gesehen gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten, um das Tumorwachstum mit Hilfe von Mikroglia und Makrophagen zu beeinflussen. Die erste Möglichkeit besteht in der Manipulation der Mikroglia und Makrophagen hin zu einem antitumoralen Phänotyp, die zweite Möglichkeit besteht in der Depletion oder Blockierung einer oder beider Zellpopulationen. Sarkar *et al.* konnten 2014 zeigen, dass die Anwendung von Amphotericin B bei Mikroglia und Makrophagen zu höherer TNF α -Expression führt. *In vivo* zeigte sich ein

reduziertes Tumolvolumen bei intraperitonealer Anwendung (178). Eine andere Forschergruppe transferierte intrakraniell NK-Zellen in Kombination mit einem Antikörper im Rahmen eines Ratten-Gliommodells. Dieses Experiment zeigte eine tumorverkleinernde und lebensverlängernden Effekt, der bei singularer peripherer Makrophagendepletion allerdings ausblieb und sich der Kontrollgruppe anglich (179). Es ist hierbei also davon auszugehen, dass Mikroglia bzw. Makrophagen unterschiedlich stimuliert werden müssten oder *per se* unterschiedliche Effekte hinsichtlich pro- oder antitumoraler Eigenschaften aufweisen. Ein weiteres Beispiel hierfür zeigte sich im Rahmen der Forschung unserer Arbeitsgruppe bzgl. der Tumorangiogenese. Eine Depletion von ausschließlich Mikroglia führte zu einer drastischen Reduktion der intratumoralen Gefäßdichte. Bei Depletion aller myeloider Zellen, also auch von Makrophagen, blieb die Reduktion nahezu identisch. Die Tumorangiogenese ist also hauptsächlich Mikroglia abhängig (43). Dies zeigt noch einmal die Notwendigkeit einer separaten Betrachtung beider Zellfraktionen. Eine Verminderung der Anzahl von CD11b⁺CD45⁺-Zellen konnte durch einen anti-CCL2-Antikörper erreicht werden. Konsekutiv wurde ein moderater Überlebensvorteil festgestellt (180). In der vorliegenden Arbeit zeigten sich *in vivo* bei Betrachtung des Tumolvolumens über alle Gruppen hinweg keine Unterschiede. Allerdings bleibt anzumerken, dass es theoretisch Unterschiede im Langzeitüberleben geben könnte, die jedoch nicht untersucht wurden. Darüber hinaus ist vorstellbar, dass Mikroglia bzw. Makrophagen je nach exakter Lokalisation in Bezug auf den Tumor in ihren Eigenschaften variabel sind. Genauere Untersuchungen wären diesbezüglich nur durch single-cell-Analysen möglich, bei der das Expressionsprofil einzelner Zellen bestimmt werden könnte.

7 Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-20.
2. Webber C, Gospodarowicz M, Sobin LH, Wittekind C, Greene FL, Mason MD, Compton C, Brierley J, Groome PA. Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review. *Int J Cancer.* 2014;135(2):371-8.
3. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro Oncol.* 2017;19(suppl_5):v1-v88.
4. Arvold ND, Lee EQ, Mehta MP, Margolin K, Alexander BM, Lin NU, Anders CK, Soffietti R, Camidge DR, Vogelbaum MA, Dunn IF, Wen PY. Updates in the management of brain metastases. *Neuro Oncol.* 2016;18(8):1043-65.
5. Diwanji TP, Engelman A, Snider JW, Mohindra P. Epidemiology, diagnosis, and optimal management of glioma in adolescents and young adults. *Adolesc Health Med Ther.* 2017;8:99-113.
6. McFaline-Figueroa JR, Lee EQ. Brain Tumors. *Am J Med.* 2018.
7. Komori T, Muragaki Y, Chernov MF. Pathology and Genetics of Gliomas. *Prog Neurol Surg.* 2018;31:1-37.
8. Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg.* 2001;95(2):190-8.
9. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Leitlinien: Gliome 2014 [Available from: <https://www.dgn.org/leitlinien/2977-ll-76-gliome>].
10. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, European Organisation for R, Treatment of Cancer Brain T, Radiotherapy G, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials G. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-96.
11. Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi ME, Jaeckle KA, Armstrong TS, Wefel JS, Won M, Blumenthal DT, Mahajan A, Schultz CJ, Erridge S, Baumert B, Hopkins KI, Tzuk-Shina T, Brown PD, Chakravarti A, Curran WJ, Jr., Mehta MP. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol.* 2013;31(32):4085-91.
12. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, Jeraj R, Brown PD, Jaeckle KA, Schiff D, Stieber VW, Brachman DG, Werner-Wasik M, Tremont-Lukats IW, Sulman EP, Aldape KD, Curran WJ, Jr., Mehta MP. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014;370(8):699-708.
13. Puduvalli VK, Chaudhary R, McCluggage SG, Markert J. Beyond Alkylating Agents for Gliomas: Quo Vadimus? American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Annual Meeting. 2017;37:175-86.

14. Yin J, Valin KL, Dixon ML, Leavenworth JW. The Role of Microglia and Macrophages in CNS Homeostasis, Autoimmunity, and Cancer. *J Immunol Res.* 2017;2017:5150678.
15. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(12):953-64.
16. Volkman A, Gowans JL. The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat. *British Journal of Experimental Pathology.* 1965;46(1):62-70.
17. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 2010;330(6005):841-5.
18. Ginhoux F, Prinz M. Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2015;7(8):a020537.
19. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:643-75.
20. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007;204(5):1057-69.
21. Prinz M, Erny D, Hagemeyer N. Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat Immunol.* 2017;18(4):385-92.
22. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* 2007;10(12):1538-43.
23. Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2011;14(10):1227-35.
24. Rossi ML, Hughes JT, Esiri MM, Coakham HB, Brownell DB. Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. *Acta Neuropathol.* 1987;74(3):269-77.
25. Aguzzi A, Barres BA, Bennett ML. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science.* 2013;339(6116):156-61.
26. Matsumoto H, Kumon Y, Watanabe H, Ohnishi T, Shudou M, Ii C, Takahashi H, Imai Y, Tanaka J. Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label neutrophils rather than microglia in traumatic and ischemic brain lesions. *Journal of neuroscience research.* 2007;85(5):994-1009.
27. Del Rio-Hortega P. El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglia en estados normal. II. Intervencio de la microglia en los procesos patologicas. III. Naturaleza probable de la microglia. *Bol Soc Espanola Biol.* 1919;9:69-120.
28. Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:619-43.
29. Karperien A, Ahammer H, Jelinek H. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2013;7(3).
30. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005;308(5726):1314-8.
31. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1387-94.
32. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological reviews.* 2011;91(2):461-553.
33. Phillips JP, Eremin O, Anderson JR. Lymphoreticular cells in human brain tumours and in normal brain. *Br J Cancer.* 1982;45(1):61-9.
34. Morantz RA, Wood GW, Foster M, Clark M, Gollahon K. Macrophages in experimental and human brain tumors. Part 2: studies of the macrophage content of human brain tumors. *J Neurosurg.* 1979;50(3):305-11.

35. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol.* 2008;216(1):15-24.
36. Morimura T, Neuchrist C, Kitz K, Budka H, Scheiner O, Kraft D, Lassmann H. Monocyte subpopulations in human gliomas: expression of Fc and complement receptors and correlation with tumor proliferation. *Acta Neuropathol.* 1990;80(3):287-94.
37. Wei J, Gabrusiewicz K, Heimberger A. The controversial role of microglia in malignant gliomas. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:285246.
38. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol.* 2017;35:441-68.
39. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13.
40. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787-95.
41. Szulzewsky F, Pelz A, Feng X, Synowitz M, Markovic D, Langmann T, Holtman IR, Wang X, Eggen BJ, Boddeke HW, Hambardzumyan D, Wolf SA, Kettenmann H. Glioma-associated microglia/macrophages display an expression profile different from M1 and M2 polarization and highly express Gpnmb and Spp1. *PLoS One.* 2015;10(2):e0116644.
42. Bettinger I, Thanos S, Paulus W. Microglia promote glioma migration. *Acta Neuropathol.* 2002;103(4):351-5.
43. Brandenburg S, Muller A, Turkowski K, Radev YT, Rot S, Schmidt C, Bungert AD, Acker G, Schorr A, Hippe A, Miller K, Heppner FL, Homey B, Vajkoczy P. Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors. *Acta Neuropathol.* 2016;131(3):365-78.
44. Bayerl SH, Niesner R, Cseresnyes Z, Radbruch H, Pohlan J, Brandenburg S, Czabanka MA, Vajkoczy P. Time lapse in vivo microscopy reveals distinct dynamics of microglia-tumor environment interactions-a new role for the tumor perivascular space as highway for trafficking microglia. *Glia.* 2016;64(7):1210-26.
45. Zhai H, Heppner FL, Tsirka SE. Microglia/macrophages promote glioma progression. *Glia.* 2011;59(3):472-85.
46. Galarneau H, Villeneuve J, Gowing G, Julien JP, Vallieres L. Increased glioma growth in mice depleted of macrophages. *Cancer Res.* 2007;67(18):8874-81.
47. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Advances in immunology.* 2006;90:1-50.
48. London A, Benhar I, Mattapallil MJ, Mack M, Caspi RR, Schwartz M. Functional macrophage heterogeneity in a mouse model of autoimmune central nervous system pathology. *J Immunol.* 2013;190(7):3570-8.
49. Goldmann T, Wieghofer P, Jordao MJ, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, Amann L, Staszewski O, Kierdorf K, Krueger M, Locatelli G, Hochgerner H, Zeiser R, Epelman S, Geissmann F, Priller J, Rossi FM, Bechmann I, Kerschensteiner M, Linnarsson S, Jung S, Prinz M. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat Immunol.* 2016;17(7):797-805.
50. Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dorries R, Butcher GW, ter Meulen V. Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(16):7438-42.
51. Muller A, Brandenburg S, Turkowski K, Muller S, Vajkoczy P. Resident microglia, and not peripheral macrophages, are the main source of brain tumor mononuclear cells. *Int J Cancer.* 2015;137(2):278-88.
52. Saederup N, Cardona AE, Croft K, Mizutani M, Cotleur AC, Tsou CL, Ransohoff RM, Charo IF. Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS One.* 2010;5(10):e13693.

53. Priller J, Flugel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernandez-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med.* 2001;7(12):1356-61.
54. Yu K, Youshani AS, Wilkinson FL, O'Leary C, Cook P, Laaniste L, Liao A, Mosses D, Waugh C, Shorrocks H, Pathmanaban O, Macdonald A, Kamaly-Asl I, Roncaroli F, Bigger BW. A nonmyeloablative chimeric mouse model accurately defines microglia and macrophage contribution in glioma. *Neuropathology and Applied Neurobiology.* 0(0).
55. Kamran P, Sereti KI, Zhao P, Ali SR, Weissman IL, Ardehali R. Parabiosis in mice: a detailed protocol. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2013(80).
56. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(6):313-26.
57. El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, Luster AD. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med.* 2007;13(4):432-8.
58. Vakilian A, Khorramdelazad H, Heidari P, Sheikh Rezaei Z, Hassanshahi G. CCL2/CCR2 signaling pathway in glioblastoma multiforme. *Neurochem Int.* 2017;103:1-7.
59. Zhang J, Sarkar S, Cua R, Zhou Y, Hader W, Yong VW. A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis. *Carcinogenesis.* 2012;33(2):312-9.
60. Feria M, Díaz-González F. The CCR2 receptor as a therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 2006;16(1):49-57.
61. Mizutani M, Pino PA, Saederup N, Charo IF, Ransohoff RM, Cardona AE. The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood. *J Immunol.* 2012;188(1):29-36.
62. Gu L, Tseng SC, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1. *Chemical immunology.* 1999;72:7-29.
63. Platten M, Kretz A, Naumann U, Aulwurm S, Egashira K, Isenmann S, Weller M. Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. *Ann Neurol.* 2003;54(3):388-92.
64. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci.* 2011;14(9):1142-9.
65. Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV, Jr., Broxmeyer HE, Charo IF. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest.* 1997;100(10):2552-61.
66. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(22):12053-8.
67. Leung SY, Wong MP, Chung LP, Chan AS, Yuen ST. Monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in gliomas. *Acta Neuropathol.* 1997;93(5):518-27.
68. Takeshima H, Kuratsu J, Takeya M, Yoshimura T, Ushio Y. Expression and localization of messenger RNA and protein for monocyte chemoattractant protein-1 in human malignant glioma. *J Neurosurg.* 1994;80(6):1056-62.
69. Jordan JT, Sun W, Hussain SF, DeAngulo G, Prabhu SS, Heimberger AB. Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57(1):123-31.
70. Bowman RL, Joyce JA. Therapeutic targeting of tumor-associated macrophages and microglia in glioblastoma. *Immunotherapy.* 2014;6(6):663-6.

71. Valkovic T, Dobrila F, Melato M, Sasso F, Rizzardi C, Jonjic N. Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch.* 2002;440(6):583-8.
72. Liang Y, Bollen AW, Gupta N. CC chemokine receptor-2A is frequently overexpressed in glioblastoma. *J Neurooncol.* 2008;86(2):153-63.
73. Lu X, Kang Y. Chemokine (C-C motif) ligand 2 engages CCR2+ stromal cells of monocytic origin to promote breast cancer metastasis to lung and bone. *J Biol Chem.* 2009;284(42):29087-96.
74. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA, Pollard JW. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature.* 2011;475(7355):222-5.
75. Zhao L, Lim SY, Gordon-Weeks AN, Tapmeier TT, Im JH, Cao Y, Beech J, Allen D, Smart S, Muschel RJ. Recruitment of a myeloid cell subset (CD11b/Gr1 mid) via CCL2/CCR2 promotes the development of colorectal cancer liver metastasis. *Hepatology.* 2013;57(2):829-39.
76. Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Mukaida N, Kaneko S. Optimal amount of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy against hepatocellular carcinoma by M1 macrophage activation. *Cancer Sci.* 2008;99(10):2075-82.
77. Chiang GC, Kovanlikaya I, Choi C, Ramakrishna R, Magge R, Shungu DC. Magnetic Resonance Spectroscopy, Positron Emission Tomography and Radiogenomics-Relevance to Glioma. *Front Neurol.* 2018;9:33.
78. Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, Namboodiri AM. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol.* 2007;81(2):89-131.
79. Howe FA, Opstad KS. 1H MR spectroscopy of brain tumours and masses. *NMR Biomed.* 2003;16(3):123-31.
80. Verma A, Kumar I, Verma N, Aggarwal P, Ojha R. Magnetic resonance spectroscopy - Revisiting the biochemical and molecular milieu of brain tumors. *BBA Clin.* 2016;5:170-8.
81. Doblaz S, He T, Saunders D, Hoyle J, Smith N, Pye Q, Lerner M, Jensen RL, Towner RA. In vivo characterization of several rodent glioma models by 1H MRS. *NMR Biomed.* 2012;25(4):685-94.
82. Momcilovic M, Shackelford DB. Imaging Cancer Metabolism. *Biomol Ther (Seoul).* 2018;26(1):81-92.
83. Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata HM, 2009 #229}, Moriwaki K, Obata Y, Yoshiki A. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Experimental animals.* 2009;58(2):141-9.
84. Murray WS, Little CC. The Genetics of Mammary Tumor Incidence in Mice. *Genetics.* 1935;20(5):466-96.
85. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and cellular biology.* 2000;20(11):4106-14.
86. Feng X, Szulzewsky F, Yerevanian A, Chen Z, Heinzmann D, Rasmussen RD, Alvarez-Garcia V, Kim Y, Wang B, Tamagno I, Zhou H, Li X, Kettenmann H, Ransohoff RM, Hambardzumyan D. Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis. *Oncotarget.* 2015;6(17):15077-94.
87. Liu C, Luo D, Streit WJ, Harrison JK. CX3CL1 and CX3CR1 in the GL261 murine model of glioma: CX3CR1 deficiency does not impact tumor growth or infiltration of microglia and lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 2008;198(1-2):98-105.

88. Müller A. Discrimination between microglia and macrophages and their impact on glioma progression and vascularization [Dissertation]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2014.
89. Shah N, Sattar A, Benanti M, Hollander S, Cheuck L. Magnetic resonance spectroscopy as an imaging tool for cancer: a review of the literature. *The Journal of the American Osteopathic Association*. 2006;106(1):23-7.
90. Prost RW. Magnetic resonance spectroscopy. *Med Phys*. 2008;35(10):4530-44.
91. Tkáč I, Henry P-G, Andersen P, Keene CD, Low WC, Gruetter R. Highly resolved in vivo ¹H NMR spectroscopy of the mouse brain at 9.4 T. *Magnetic resonance in medicine*. 2004;52(3):478-84.
92. Jansen JFA, Backes WH, Nicolay K, Kooi ME. ¹H MR Spectroscopy of the Brain: Absolute Quantification of Metabolites. *Radiology*. 2006;240(2):318-32.
93. Maes W, Van Gool SW. Experimental immunotherapy for malignant glioma: lessons from two decades of research in the GL261 model. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(2):153-60.
94. Seligman AM, Shear MJ, Alexander L. Studies in Carcinogenesis: VIII. Experimental Production of Brain Tumors in Mice with Methylcholanthrene. *The American Journal of Cancer*. 1939;37(3):364-95.
95. Ausman JI, Shapiro WR, Rall DP. Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors: development of an experimental model. *Cancer Res*. 1970;30(9):2394-400.
96. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990;11(2):231-8.
97. Radcliff G, Jaroszeski MJ. Basics of flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 1998;91:1-24.
98. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. Springer-Verlag; 2014. p. 73-101.
99. Lang G. Hämatoxylin - Eosin - Färbung. *Histotechnik 2013 Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2., überarbeitete und aktualisierte Auflage ed. Wien: Springer-Verlag Wien; 2013. p. 197-204.
100. Tamura G, Ando K, Suzuki S, Takatsuki A, Arima K. Antiviral activity of brefeldin A and verrucarin A. *The Journal of antibiotics*. 1968;21(2):160-1.
101. Takatsuki A, Tamura G. Brefeldin A, a Specific Inhibitor of Intracellular Translocation of Vesicular Stomatitis Virus G Protein: Intracellular Accumulation of High-mannose Type G Protein and Inhibition of Its Cell Surface Expression. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1985;49(3):899-902.
102. Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *The Journal of cell biology*. 1992;116(5):1071-80.
103. Luttmann W. BK, Küpper M., Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. 4., vollst. überarb. und korrigierte Aufl. ed. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum; 2014. p. XVIII, 299.
104. Avwioro G. Histochemical uses of haematoxylin—a review. *Jpcs*. 2011;1:24-34.
105. Lang G. Immunhistochemie. *Histotechnik 2013 Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2., überarbeitete und aktualisierte Auflage ed. Wien: Springer-Verlag Wien; 2013. p. 270-303.
106. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor protocols*. 2014;2014(10):pdb.top071795.
107. Mülhardt C. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. 7., aktualisierte Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 41-2.

108. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*. 1997;22(3):474-6, 8-81.
109. PCR-Analytik. In: Kück U, editor. *Praktikum der Molekulargenetik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 221-45.
110. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001;25(4):402-8.
111. Nasser MW, Qamri Z, Deol YS, Ravi J, Powell CA, Trikha P, Schwendener RA, Bai XF, Shilo K, Zou X, Leone G, Wolf R, Yuspa SH, Ganju RK. S100A7 enhances mammary tumorigenesis through upregulation of inflammatory pathways. *Cancer Res*. 2012;72(3):604-15.
112. Lévy J, Cacheux W, Bara MA, L'Hermitte A, Lepage P, Fraudeau M, Trentesaux C, Lemarchand J, Durand A, Crain A-M, Marchiol C, Renault G, Dumont F, Letourneur F, Delacre M, Schmitt A, Terris B, Perret C, Chamailard M, Couty J-P, Romagnolo B. Intestinal inhibition of Atg7 prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth. *Nature Cell Biology*. 2015;17:1062.
113. Lv YJ, Yang Y, Sui BD, Hu CH, Zhao P, Liao L, Chen J, Zhang LQ, Yang TT, Zhang SF, Jin Y. Resveratrol counteracts bone loss via mitofilin-mediated osteogenic improvement of mesenchymal stem cells in senescence-accelerated mice. *Theranostics*. 2018;8(9):2387-406.
114. Watanabe A, Tatematsu M, Saeki K, Shibata S, Shime H, Yoshimura A, Obuse C, Seya T, Matsumoto M. Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J Biol Chem*. 2011;286(12):10702-11.
115. Brandenburg S, Turkowski K, Mueller A, Radev YT, Seidlitz S, Vajkoczy P. Myeloid cells expressing high level of CD45 are associated with a distinct activated phenotype in glioma. *Immunol Res*. 2017;65(3):757-68.
116. Wlodarczyk A, Cédile O, Jensen KN, Jasson A, Mony JT, Khorooshi R, Owens T. Pathologic and Protective Roles for Microglial Subsets and Bone Marrow- and Blood-Derived Myeloid Cells in Central Nervous System Inflammation. *Frontiers in immunology*. 2015;6:463-.
117. Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, Miyamoto T, Ohnishi Y, Sato M, Muragaki Y, Ooshima A, Nakajima Y, Kao WWY, Flanders KC, Roberts AB. Expression of Smad7 in Mouse Eyes Accelerates Healing of Corneal Tissue after Exposure to Alkali. *The American Journal of Pathology*. 2005;166(5):1405-18.
118. Shaul ME, Bennett G, Strissel KJ, Greenberg AS, Obin MS. Dynamic, M2-like Remodeling Phenotypes of CD11c+ Adipose Tissue Macrophages During High Fat Diet-Induced Obesity in Mice. *Diabetes*. 2010.
119. Chung C, Kim T, Kim M, Kim M, Song H, Kim T-S, Seo E, Lee S-H, Kim H, Kim SK, Yoo G, Lee D-H, Hwang D-S, Kinashi T, Kim J-M, Lim D-S. Hippo-Foxa2 signaling pathway plays a role in peripheral lung maturation and surfactant homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(19):7732-7.
120. Hettlinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko AC, Krijgsveld J, Feuerer M. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol*. 2013;14(8):821-30.
121. Opong-Nonterah GO, Lakhdari O, Yamamura A, Hoffman HM, Prince LS. TLR Activation Alters Bone Marrow-Derived Macrophage Differentiation. *Journal of innate immunity*. 2018:1-10.
122. Thiel N, Keyser KA, Lemmermann NA, Oduro JD, Wagner K, Elsner C, Halenius A, Lenac Rovis T, Brinkmann MM, Jonjic S, Cicin-Sain L, Messerle M. The Mouse Cytomegalovirus Gene m42 Targets Surface Expression of the Protein Tyrosine Phosphatase CD45 in Infected Macrophages. *PLoS pathogens*. 2016;12(12):e1006057.

123. Badie B, Schartner JM. Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. *Neurosurgery*. 2000;46(4):957-61; discussion 61-2.
124. Mina-Osorio P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends in molecular medicine*. 2008;14(8):361-71.
125. Gazi U, Martinez-Pomares L. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*. 2009;214(7):554-61.
126. Tsai RK, Discher DE. Inhibition of "self" engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *The Journal of cell biology*. 2008;180(5):989-1003.
127. Muller G, Lipp M. Shaping up adaptive immunity: the impact of CCR7 and CXCR5 on lymphocyte trafficking. *Microcirculation (New York, NY : 1994)*. 2003;10(3-4):325-34.
128. Takanami I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer*. 2003;105(2):186-9.
129. Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, Inoue H, Mori M. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res*. 2002;62(10):2937-41.
130. Ding Y, Shimada Y, Maeda M, Kawabe A, Kaganoi J, Komoto I, Hashimoto Y, Miyake M, Hashida H, Imamura M. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(9):3406-12.
131. Murphy H, Jaafari H, Dobrovolsky HM. Differences in predictions of ODE models of tumor growth: a cautionary example. *BMC Cancer*. 2016;16:163.
132. Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magnetic resonance in medicine*. 1993;30(6):672-9.
133. De Graaf RA. *In vivo NMR spectroscopy: principles and techniques*: Wiley; 2019.
134. Sughrue ME, Yang I, Kane AJ, Rutkowski MJ, Fang S, James CD, Parsa AT. Immunological considerations of modern animal models of malignant primary brain tumors. *Journal of translational medicine*. 2009;7:84.
135. Szatmari T, Lumniczky K, Desaknai S, Trajcevski S, Hidvegi EJ, Hamada H, Safrany G. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci*. 2006;97(6):546-53.
136. Jacobs VL, Valdes PA, Hickey WF, De Leo JA. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN neuro*. 2011;3(3):e00063.
137. Oh T, Fakurnejad S, Sayegh ET, Clark AJ, Ivan ME, Sun MZ, Safaee M, Bloch O, James CD, Parsa AT. Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. *Journal of translational medicine*. 2014;12:107.
138. Peterson DL, Sheridan PJ, Brown WE, Jr. Animal models for brain tumors: historical perspectives and future directions. *J Neurosurg*. 1994;80(5):865-76.
139. Ahmed N, Salsman VS, Kew Y, Shaffer D, Powell S, Zhang YJ, Grossman RG, Heslop HE, Gottschalk S. HER2-Specific T Cells Target Primary Glioblastoma Stem Cells and Induce Regression of Autologous Experimental Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2010.
140. Delgado C, Hoa N, Callahan LL, Schiltz PM, Jahroudi RA, Zhang JG, Wepsic HT, Jadus MR. Generation of human innate immune responses towards membrane macrophage colony stimulating factor (mM-CSF) expressing U251 glioma cells within immunodeficient (NIH-nu/beige/xid) mice. *Cytokine*. 2007;38(3):165-76.
141. Kim HM, Kang JS, Lim J, Kim JY, Kim YJ, Lee SJ, Song S, Hong JT, Kim Y, Han SB. Antitumor activity of cytokine-induced killer cells in nude mouse xenograft model. *Archives of pharmacal research*. 2009;32(5):781-7.
142. Razavi S-M, Lee KE, Jin BE, Aujla PS, Gholamin S, Li G. Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Frontiers in Surgery*. 2016;3:11.

143. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia*. 2011;59(8):1169-80.
144. Watters JJ, Schartner JM, Badie B. Microglia function in brain tumors. *Journal of neuroscience research*. 2005;81(3):447-55.
145. Gabrusiewicz K, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M, Sielska M, Frankowska M, Kaminska B. Characteristics of the Alternative Phenotype of Microglia/Macrophages and its Modulation in Experimental Gliomas. *PLOS ONE*. 2011;6(8):e23902.
146. Gordon S, Pluddemann A. Tissue macrophage heterogeneity: issues and prospects. *Seminars in immunopathology*. 2013;35(5):533-40.
147. van der Meer P, Ulrich AM, Gonzalez-Scarano F, Lavi E. Immunohistochemical analysis of CCR2, CCR3, CCR5, and CXCR4 in the human brain: potential mechanisms for HIV dementia. *Experimental and molecular pathology*. 2000;69(3):192-201.
148. Eltayeb S, Berg AL, Lassmann H, Wallstrom E, Nilsson M, Olsson T, Ericsson-Dahlstrand A, Sunnemark D. Temporal expression and cellular origin of CC chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR5 in the central nervous system: insight into mechanisms of MOG-induced EAE. *Journal of neuroinflammation*. 2007;4:14.
149. Zhang J, Shi XQ, Echeverry S, Mogil JS, De Koninck Y, Rivest S. Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(45):12396-406.
150. Bose S, Kim S, Oh Y, Moniruzzaman M, Lee G, Cho J. Effect of CCL2 on BV2 microglial cell migration: Involvement of probable signaling pathways. *Cytokine*. 2016;81:39-49.
151. Cross AK, Woodroffe MN. Chemokines induce migration and changes in actin polymerization in adult rat brain microglia and a human fetal microglial cell line in vitro. *Journal of neuroscience research*. 1999;55(1):17-23.
152. Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med*. 1997;186(10):1757-62.
153. Hermiston ML, Zikherman J, Zhu JW. CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells. *Immunological Reviews*. 2009;228(1):288-311.
154. Penninger JM, Irie-Sasaki J, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos AJ. CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol*. 2001;2(5):389-96.
155. Varvel NH, Grathwohl SA, Baumann F, Liebig C, Bosch A, Brawek B, Thal DR, Charo IF, Heppner FL, Aguzzi A, Garaschuk O, Ransohoff RM, Jucker M. Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(44):18150-5.
156. Pahler JC, Tazzyman S, Erez N, Chen YY, Murdoch C, Nozawa H, Lewis CE, Hanahan D. Plasticity in tumor-promoting inflammation: impairment of macrophage recruitment evokes a compensatory neutrophil response. *Neoplasia*. 2008;10(4):329-40.
157. Wu HJ, Liu YJ, Li HQ, Chen C, Dou Y, Lou HF, Ho MS, Li XM, Gao Z, Duan S. Analysis of microglial migration by a micropipette assay. *Nature protocols*. 2014;9(2):491-500.
158. Fan Y, Xie L, Chung CY. Signaling Pathways Controlling Microglia Chemotaxis. *Molecules and cells*. 2017;40(3):163-8.
159. Maeda T, Inagaki M, Fujita Y, Kimoto T, Tanabe-Fujimura C, Zou K, Liu J, Liu S, Komano H. ATP increases the migration of microglia across the brain endothelial cell monolayer. *Bioscience reports*. 2016;36(2).

160. Clahsen T, Schaper F. Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008;84(6):1521-9.
161. Zhou TY, Zhou YL, Qian MJ, Fang YZ, Ye S, Xin WX, Yang XC, Wu HH. Interleukin-6 induced by YAP in hepatocellular carcinoma cells recruits tumor-associated macrophages. *Journal of pharmacological sciences*. 2018.
162. Wang H, Lathia JD, Wu Q, Wang J, Li Z, Heddleston JM, Elyer CE, Elderbroom J, Gallagher J, Schuschu J, MacSwords J, Cao Y, McLendon RE, Wang XF, Hjelmeland AB, Rich JN. Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2009;27(10):2393-404.
163. Van Meir E, Sawamura Y, Diserens AC, Hamou MF, de Tribolet N. Human glioblastoma cells release interleukin 6 in vivo and in vitro. *Cancer Res*. 1990;50(20):6683-8.
164. Okada M, Saio M, Kito Y, Ohe N, Yano H, Yoshimura S, Iwama T, Takami T. Tumor-associated macrophage/microglia infiltration in human gliomas is correlated with MCP-3, but not MCP-1. *Int J Oncol*. 2009;34(6):1621-7.
165. Held-Feindt J, Hattermann K, Muerkoster SS, Wedderkopp H, Knerlich-Lukoschus F, Ungefroren H, Mehdorn HM, Mentlein R. CX3CR1 promotes recruitment of human glioma-infiltrating microglia/macrophages (GIMs). *Experimental cell research*. 2010;316(9):1553-66.
166. Lee J, Dang X, Borboa A, Coimbra R, Baird A, Eliceiri BP. Thrombin-processed Ecrq4 recruits myeloid cells and induces antitumorogenic inflammation. *Neuro Oncol*. 2015;17(5):685-96.
167. Touat M, Idbaih A, Sanson M, Ligon KL. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Annals of Oncology*. 2017;28(7):1457-72.
168. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhi R, Bernard B, Wu CJ, Genovese G, Shmulevich I, Barnholtz-Sloan J, Zou L, Vegesna R, Shukla SA, Ciriello G, Yung WK, Zhang W, Sougnez C, Mikkelsen T, Aldape K, Bigner DD, Van Meir EG, Prados M, Sloan A, Black KL, Eschbacher J, Finocchiaro G, Friedman W, Andrews DW, Guha A, Iacocca M, O'Neill BP, Foltz G, Myers J, Weisenberger DJ, Penny R, Kucherlapati R, Perou CM, Hayes DN, Gibbs R, Marra M, Mills GB, Lander E, Spellman P, Wilson R, Sander C, Weinstein J, Meyerson M, Gabriel S, Laird PW, Haussler D, Getz G, Chin L. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013;155(2):462-77.
169. Shih K, Arkenau H-T, Infante JR. Clinical Impact of Checkpoint Inhibitors as Novel Cancer Therapies. *Drugs*. 2014;74(17):1993-2013.
170. Patel MA, Pardoll DM. Concepts of immunotherapy for glioma. *Journal of neuro-oncology*. 2015;123(3):323-30.
171. Gutmann DH, McLellan MD, Hussain I, Wallis JW, Fulton LL, Fulton RS, Magrini V, Demeter R, Wylie T, Kandoth C, Leonard JR, Guha A, Miller CA, Ding L, Mardis ER. Somatic neurofibromatosis type 1 (NF1) inactivation characterizes NF1-associated pilocytic astrocytoma. *Genome Res*. 2013;23(3):431-9.
172. Badie B, Schartner J. Role of microglia in glioma biology. *Microscopy research and technique*. 2001;54(2):106-13.
173. Schartner JM, Hagar AR, Van Handel M, Zhang L, Nadkarni N, Badie B. Impaired capacity for upregulation of MHC class II in tumor-associated microglia. *Glia*. 2005;51(4):279-85.
174. Badie B, Schartner J, Prabakaran S, Paul J, Vorpahl J. Expression of Fas ligand by microglia: possible role in glioma immune evasion. *J Neuroimmunol*. 2001;120(1-2):19-24.
175. Kostianovsky AM, Maier LM, Anderson RC, Bruce JN, Anderson DE. Astrocytic regulation of human monocytic/microglial activation. *J Immunol*. 2008;181(8):5425-32.

176. London A, Benhar I, Mattapallil MJ, Mack M, Caspi RR, Schwartz M. Functional Macrophage Heterogeneity in a Mouse Model of Autoimmune Central Nervous System Pathology. *The Journal of Immunology*. 2013;190(7):3570-8.
177. Buttgereit A, Lelios I, Yu X, Vrohligs M, Krakoski NR, Gautier EL, Nishinakamura R, Becher B, Greter M. Sall1 is a transcriptional regulator defining microglia identity and function. *Nat Immunol*. 2016;17(12):1397-406.
178. Sarkar S, Doring A, Zemp FJ, Silva C, Lun X, Wang X, Kelly J, Hader W, Hamilton M, Mercier P, Dunn JF, Kinniburgh D, van Rooijen N, Robbins S, Forsyth P, Cairncross G, Weiss S, Yong VW. Therapeutic activation of macrophages and microglia to suppress brain tumor-initiating cells. *Nat Neurosci*. 2014;17(1):46-55.
179. Poli A, Wang J, Domingues O, Planagumà J, Yan T, Rygh CB, Skafnesmo KO, Thorsen F, McCormack E, Hentges F, Pedersen PH, Zimmer J, Enger PØ, Chekenya M. Targeting glioblastoma with NK cells and mAb against NG2/CSPG4 prolongs animal survival. *Oncotarget*. 2013;4(9):1527-46.
180. Zhu X, Fujita M, Snyder LA, Okada H. Systemic delivery of neutralizing antibody targeting CCL2 for glioma therapy. *Journal of Neuro-Oncology*. 2011;104(1):83-92.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

AF	Alexa Fluor
APC	Allophycocyanin
BSA	<i>engl.</i> bovine serum albumine: Rinderserum-albumin
CCL	C-C chemokine ligand
CCR	C-C chemokine receptor
CCR2ko	<i>engl.</i> : CCR2 knockout: CCR2-Knockout
CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
Cy	Cyanine
d	<i>engl.</i> day: Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAE	Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
eGFP	<i>engl.</i> enhanced green fluorescent protein
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HBSS ⁻	Hanks balanced salt solution w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺
HBSS ⁺	Hanks balanced salt solution w Ca ²⁺ /Mg ²⁺
i. p.	Intraperitoneal
IBA1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
IL	Interleukin
ko	<i>engl.</i> knockout: Knockout
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MCP-1=CCL2	Monocyte Chemoattractant Protein 1
mRNA	messenger RNA
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	phosphate-buffered Saline
PE	Phycoerythrin

PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein complex
PFA	Paraformaldehyd
RPM	engl. revolutions per minute: Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTQ-PCR	Real-Time quantitative PCR
TAM	Tumor assoziierte Mikroglia/Makrophagen
TZI	Tumorzellimplantation
WHO	World Health Organization
wt	engl. wildtype: Wildtyp

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über die Herkunft monozytärer Zellen.	14
Abb. 2: Übersicht über die phänotypischen Erscheinungen von Mikrogliazellen.	16
Abb. 3: <i>In-vitro</i> -Modell zur Einteilung des Aktivierungsstatus von Mikroglia/Makrophagen.	18
Abb. 4: Übersicht über die etablierten Gruppen im Rahmen der Chimärengenerierung.	23
Abb. 5: Übersicht über alle generierten Chimärengruppen.	30
Abb. 6: Bleischutz zum Schutze des Kopfes bei Bestrahlung.	31
Abb. 7: Box zur intravenösen (i. v.) Injektion sowie zur Blutentnahme.	32
Abb. 8: Beispielhafte Darstellung eines Voxels über drei MRT-Schichten im Rahmen einer spektroskopischen Messung.	35
Abb. 9: Übersicht über die Gating-Strategie zur Erfassung der Reinheit an kultivierten Makrophagen.	44
Abb. 10: Gating-Strategie zur Detektion myeloider Zellen.	45
Abb. 11: Reinheitsbestimmung von isolierten Mikroglia/Makrophagen mittels MACS aus Hirnzellsuspensionen.	46
Abb. 12: CCR2-Expression von Mikroglia und Makrophagen.	59
Abb. 13: Knochenmarkanalyse von naiven C57BL/6J-, CX3CR1-eGFP- und CCR2ko-Mäusen.	61
Abb. 14: Rekonstitutionseffizienzen aller Chimärengruppen nach 6-8 Wochen.	63
Abb. 15: Blutanalysen der Chimärengruppen hinsichtlich T- und B-Zell-Anteilen.	64

Abb. 16: Die CCR2-Defizienz hatte einen großen Einfluss auf die Infiltration von Mikroglia und Makrophagen in die tumortragende Hemisphäre.	67
Abb. 17: Eine Einwanderung von Makrophagen in die kontralaterale Hirnhemisphäre fand kaum statt.	68
Abb. 18: Der Anteil der CD45 ^{high} -Fraktion sank durch den CCR2ko in Mikroglia und Makrophagen drastisch.	69
Abb. 19: CCR2ko führte zur signifikanten Reduktion von Mikroglia und Makrophagen in der CD45 ^{high} -Fraktion.	70
Abb. 20: Die CD45 ^{low} -Fraktion bestand nahezu ausschließlich aus Mikroglia.	71
Abb. 21: Die CCR2-Defizienz zeigte einen heterogenen Einfluss auf die CD45 ^{high} - und CD45 ^{low} -Fraktionen.	74
Abb. 22: Die CCR2-Defizienz zeigte insgesamt einen moderaten Einfluss auf die verbliebenen Mikroglia in der CD45 ^{high} -Fraktion.	76
Abb. 23: Die CCR2-Defizienz zeigte große Auswirkungen auf die verbliebenen Makrophagen in der CD45 ^{high} -Fraktion.	78
Abb. 24: CCR2ko führte zu einer Änderung der Akkumulation von Mikroglia und Makrophagen im Tumorgewebe.	80
Abb. 25: Stimulation von Mikroglia und Makrophagen führte sowohl bei CX3CR1-eGFP als auch bei CCR2ko Zellen zum Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität.	83
Abb. 26: Mikroglia und Makrophagen zeigten durch eine CCR2-Defizienz nur geringe Einschränkungen bezüglich ihrer Phagozytosefähigkeit.	85
Abb. 27: Die CCR2-Defizienz zeigte keine Auswirkungen auf die Tumorumfänge. .	86
Abb. 28: Die spektroskopischen Messungen ergaben lediglich einen signifikanten Unterschied für den Metaboliten Taurin.	88
Abb. 29: Sowohl myeloide Zellen aus C57BL/6J- als auch aus CCR2ko-Tumormäusen exprimierten anti- und proinflammatorische Moleküle.	90

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über verwendete Geräte, deren Hersteller sowie Standort.	24
Tab. 2: Übersicht über verwendete Materialien sowie deren Hersteller.	25
Tab. 3: Übersicht über verwendete Reagenzien/Kits und deren Hersteller.	25
Tab. 4: Übersicht über verwendete Zellkulturmedien und -zusätze und deren Hersteller.	26

Tab. 5: Übersicht über verwendete Puffer/Lösungen sowie deren Zusammensetzung und Hersteller.	26
Tab. 6: Übersicht über verwendete Software und deren Hersteller/Entwickler.	27
Tab. 7: Überblick über verwendete Mauslinien und deren Herkunft bzw. Standort. .	27
Tab. 8: Zusammensetzung der Narkose.....	29
Tab. 9: Übersicht des Phagozytose-Assays mit allen Konditionen.	40
Tab. 10: Übersicht der CD45-Stimulierung <i>in vitro</i> mit allen Konditionen.	40
Tab. 11: Übersicht über verwendete Antikörper zur Färbung von Blutproben.	43
Tab. 12: Übersicht über verwendete Antikörper zur Bestimmung der Monozyten/Makrophagen-Progenitorzellen.	44
Tab. 13: Übersicht über verwendete Antikörper zur Bestimmung des Ausreifungs- bzw. Reinheitsgrades der Makrophagenkultur.	44
Tab. 14: Übersicht über verwendete Antikörper zur Färbung von unfixierten Hirnzellsuspensionen.....	45
Tab. 15: Übersicht aller verwendeten Antikörper an fixierten Zellen.....	48
Tab. 16: Übersicht über alle Isotypenkontrollen.....	48
Tab. 17: Übersicht über verwendete Antikörper zur Färbung von kultivierten Mikroglia.	49
Tab. 18: Übersicht über verwendete Antikörper zur Färbung von kultivierten Makrophagen.....	49
Tab. 19: Bestandteile des Mastermixes aus Schritt 1 zur Eliminierung von DNA.	54
Tab. 20: Bestandteile des Mastermixes aus Schritt 2 zur Herstellung von cDNA.	54
Tab. 21: Übersicht über den bei der RTQ-PCR verwendeten Mastermix.	56
Tab. 22: Übersicht über verwendete Primersequenzen.....	56
Tab. 23: (Vorläufer-)Zellen des Knochenmarks und ihre verschiedenen Oberflächenmarker.	60
Tab. 24: Übersicht über alle durchflusszytometrisch untersuchten Moleküle.	72

8 Anhang

8.1 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Alexander Bungert, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung CCR2-defizienter Mikroglia/Makrophagen im murinen Glioblastom“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

8.2 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8.3 Publikationsliste

Brandenburg S, Müller A, Turkowski K, Radev YT, Rot S, Schmidt C, Bungert AD, Acker G, Schorr A, Hippe A, Miller K, Heppner FL, Homey B, Vajkoczy P: Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors. *Acta Neuropathol.* 2016;131(3):365-78.

Turkowski K, Brandenburg S, Mueller A, Kremenetskaia I, Bungert AD, Blank A, Felsenstein M, Vajkoczy P: VEGF as a modulator of the innate immune response in glioblastoma. *Glia.* 2018 Jan;66(1):161-174.

8.4 Danksagung

Zunächst einmal gilt mein großer Dank Herrn Prof. Dr. Peter Vajkoczy, der mir diese Dissertation ermöglicht hat. Ich danke für den wissenschaftlichen Beistand und die Offenheit für neue Ideen.

Als nächstes möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Betreuerin Frau Dr. Susan Brandenburg bedanken, die mir über die letzten Jahre Tag und Nacht bei Seite stand und immer, so hoffe ich jedenfalls, an mich geglaubt hat. Ohne ihre Unterstützung, auch während unzähliger nächtlicher Sitzungen, wäre diese Dissertation noch lange nicht an ihrem Ende.

Für die Analyse der spektroskopischen Messungen und für die Unterstützung bei den MRTs bedanke ich mich vor allem bei Susanne Müller und Philipp Böhm-Sturm. Auch möchte ich mich bedanken bei Sabine Seidlitz für ihre administrative Unterstützung und die mir vor allem aufgrund ihrer Lebensfreude und ihres Humors wohl immer in Erinnerung bleiben wird. Ein großes Dankeschön geht auch an die restlichen Mitarbeiter und post-docs des AZH, die immer ein offenes Ohr für mich hatten. Gleiches gilt auch für die Doktoranden der AG Mikroglia, anderer Arbeitsgruppen und des Nachbarlabors der Neuropathologen, ohne die ich viele schöne Momente, die weit über das kollegiale Miteinander hinausgingen, nicht hätte erleben dürfen. Forschung war mit Euch mehr als nur harte Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden, die mir auch in schwierigen Situationen Mut gemacht haben und beistanden. Besonders danken möchte ich meinen Eltern, sowie meinem Bruder Oliver, der mich in jeder Lebenslage unterstützt hat und immer für mich da war.