

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

DISSERTATION

Einfluss der Zusammensetzung der myeloiden Zellpopulation  
auf die Expression alternativer proangiogener Faktoren durch  
Mikroglia/Makrophagen im humanen Glioblastom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Anne Blank  
aus Potsdam

Datum der Promotion: 03.12.2021

## **Vorwort**

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden unter meiner Erstautorenschaft bei *The Journal of Pathology* im April 2020 zur Veröffentlichung eingereicht. Das Manuskript befindet sich zurzeit in Revision (Stand 08.06.2020).

Zudem wurden im Rahmen dieser Dissertation angefertigte Immunfluoreszenzfärbungen von VEGF und Iba1 bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

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

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
<b>1 Zusammenfassung/Abstract</b>	<b>9</b>
1.1 Zusammenfassung	9
1.2 Abstract	10
<b>2 Einleitung</b>	<b>12</b>
2.1 Glioblastoma multiforme	12
2.1.1 Epidemiologie	12
2.1.2 Einteilung der Glioblastome	13
2.1.2.1 Einteilung nach Kriterien der WHO 2007	13
2.1.2.2 IDH-Mutation und MGMT-Methylierung	13
2.1.2.3 Primäre und sekundäre Glioblastome	14
2.1.2.4 Definition von Subgruppen	14
2.1.3 Charakteristika des Glioblastoms	15
2.1.3.1 Allgemeine Charakteristika	15
2.1.3.2 Angiogenese im Glioblastom	16
2.1.4 Immunzellen im Mikromilieu des Glioblastoms	17
2.2 Immunzellen in der Mikroumgebung des Glioblastoms	19
2.2.1 Mikroglia und Makrophagen	19
2.2.1.1 Allgemeine Übersicht	19
2.2.1.2 Differenzierungsmarker	19
2.2.1.3 Physiologische Funktion der Mikroglia	21
2.2.1.4 Funktion der Mikroglia/Makrophagen in Krankheitsmodellen	21
2.2.1.5 Tumor-assoziierte Mikroglia und Makrophagen (TAM)	23
2.2.2 Neutrophile Granulozyten	25
2.2.2.1 Allgemeine Übersicht	25
2.2.2.2 Tumor-assoziierte Neutrophile (TAN)	27
2.2.3 Fragestellung	30
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>32</b>
3.1 Aufstellung der verwendeten Geräte, Materialien und Software	32
3.2 Humane Gewebeproben	34
3.3 Prozessierung der Gewebeproben	35
3.4 Gewebdissoziation und Isolierung myeloider Zellen	36
3.4.1 Enzymatische Auftrennung des Gewebes	36
3.4.2 Isolierung myeloider Zellen	37

3.5 RNA-Isolation und quantitative Realtime-PCR	38
3.5.1 Gewebe-Aufarbeitung und RNA-Isolation	38
3.5.2 Synthese von cDNA	40
3.5.3 Quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion	41
3.6 FACS-Analysen	44
3.6.1 Grundlagen der Technik	44
3.6.2 Färbung vitaler Zellen	45
3.6.3 FACS-Färbung fixierter Zellen	47
3.6.4 FACS-Färbung nach Restimulation	48
3.7 Immunfluoreszenz-Färbungen	49
3.7.1 Vorbereitung des Gewebes und Färbeprotokoll ohne Zellpermeabilisierung	49
3.7.2 Immunfluoreszenzfärbung bei Permeabilisierung mittels Methanol	52
3.7.3 Immunfluoreszenzfärbung und Permeabilisierung bei Antigen Retrieval	53
3.7.4 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen	55
3.8 Kaplan-Meier Überlebenskurven	56
3.9 Statistik	56
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>58</b>
4.1 Differenzierung der myeloiden Zellen	58
4.1.1 Distinktion von Mikroglia/Makrophagen und Neutrophilen	58
4.1.2 Charakterisierung des immunmodulatorischen Phänotyps der Mikroglia/ Makrophagen und Neutrophilen	60
4.1.3 Differenzierung der Patientengruppen nach Neutrophilenfraktion	63
4.2 Analyse der Patientencharakteristika	64
4.3 Aktivierungsstatus der myeloiden Zellen	69
4.3.1 Expressionsmuster immunmodulatorischer Zytokine	69
4.3.2 Aktivierungsstatus der Mikroglia/Makrophagen	70
4.3.2.1 Betrachtung immunmodulatorischer Zytokine	70
4.3.2.2 Analyse der Oberflächenmarker der Mikroglia/Makrophagen	71
4.3.2.3 CD163 und TIE2 als M2-assoziierte Marker und Modulatoren der Angiogenese	75
4.4 Infiltration von Lymphozyten ins Tumorgewebe	77
4.5 Analyse von Morphologie und Verteilung der Mikroglia/Makrophagen	79
4.5.1 Akkumulation von Mikroglia/Makrophagen im humanen Glioblastom	79
4.5.2 Morphologie der Mikroglia/Makrophagen	80
4.6 Expression proangiogener Moleküle	81
4.6.1 Expressionsprofile in der quantitativen Realtime-PCR	81
4.6.2 Zuordnung der Expressionsprofile zu Mikroglia/Makrophagen und Granulozyten	85

4.7 Analyse der Gefäßstruktur	91
4.7.1 Gefäßarchitektur	91
4.7.2 Assoziation von Mikroglia/Makrophagen und Gefäßen	93
4.8 Rekrutierung von Granulozyten ins humane Glioblastom	96
4.9 Analyse der klinischen Relevanz von angiogenen Faktoren und Granulozytenfraktion anhand von Überlebenskurven	98
<b>5 Diskussion</b>	<b>102</b>
5.1 Distinktion von Zellpopulationen	102
5.2 Kritische Betrachtung des Studiendesigns	105
5.2.1 Prozessierung der Gewebeproben	105
5.2.2 Auswahl der Kontrollgruppe	106
5.2.3 Interventionsmöglichkeiten und zeitlicher Ablauf	109
5.2.4 Probengewinnung	110
5.3 Potentielle Rekrutierungsmechanismen der ins humane Glioblastom einwandernden neutrophilen Granulozyten	111
5.4 Der Einfluss der Granulozytenfraktion auf den Aktivierungsstatus der Mikroglia/Makrophagen	112
5.5 Angiogene Faktoren und Therapie-Escape	115
5.5.1 Möglicher Zusammenhang von Therapieresistenz und TIE2-Expression	115
5.5.2 Assoziation von Therapieresistenz und Akkumulation myeloider Zellen	115
5.5.3 Mögliche Umgehung klassischer antiangiogener Therapiekonzepte durch Expression alternativer proangiogener Moleküle durch myeloide Zellen	116
5.5.4 Änderung der Gefäßarchitektur in Abhängigkeit von der Granulozytenfraktion	117
5.5.5 Betrachtung der klassischen proangiogenen Moleküle	118
5.5.6 Kritische Betrachtung der Expression von IL-12	119
5.6 Abschätzung der klinischen Relevanz durch Überlebensanalysen	120
5.7 Fazit	121
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>143</b>
7.1 Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	143
7.2 Curriculum Vitae	145
7.3 Danksagung	148

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
A°III	Astrozytom WHO Grad III
Abb	Abbildung
Ang-2	Angiopoetin 2
APC	Allophycocyanin
Arg1	Arginase1
ARS	Antigen Retrieval Reagent
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> = basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
bidest	Bi-Destilliert
BSA	Rinderserumalbumin
BV8	Prokineticin 2
C5a	abgespaltenes Fragment des Komplementfaktors V
CCL	CC-Motiv Chemokin-Ligand
CCR	CC-Motiv Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i> = Differenzierungscluster
CEACAM1	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1</i>
Chi3I3	<i>Chitinase-like 3</i>
Ciita/CIITA	<i>class II major histocompatibility complex, transactivator gene</i> = Gen für die Expression der MHC II (HLA Klasse II) Moleküle des Menschen
CLEC2	<i>C-type-lectin-like-2</i> = C-Typ-Lectin-Domänenfamilie 2
CLEC7A	C-Typ-Lectin-Domänenfamilie 7, Dectin-1
CMV	Cytomegalie-Virus
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> = chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CSF	<i>Colony stimulating factor</i> = Kolonie-stimulierender Faktor
CSF1	(M-CSF) <i>Colony stimulating factor 1</i> = Kolonie-stimulierender Faktor 1 = Monozytenkolonie-stimulierender Faktor
CSF2	(MG-CSF) <i>Colony stimulating factor 2</i> = Kolonie-stimulierender Faktor 2 = Granulozyten-Monozyten-stimulierender Faktor
CSF3	(G-CSF) <i>Colony stimulating factor 3</i> = Kolonie-stimulierender Faktor 3 = Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor

CSF3R	<i>Colony stimulating factor 3 receptor</i> = Kolonie-stimulierender Faktor 3-Rezeptor
CTL	<i>cytotoxic t-lymphocyte</i> = zytotoxische T-Zelle
CX3CR1	CX3C Chemokin Rezeptor 1
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin-Ligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	<i>dendritic cells</i> = dendritische Zellen
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser = <i>Aqua Bidest</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
EBV	Ebstein-Barr-Virus
ED	Erstdiagnose
EGF	<i>epidermal growth factor</i> = epidermaler Wachstumsfaktor
ELR-Motiv	Aminosäuren-Sequenz Glutamin-Leucin-Arginin
EP	Epilepsie
FACS	<i>Fluorecence activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> = Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Fizz-1	<i>Resistin-like molecule alpha1</i>
fMLF	<i>N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine</i>
FPR1	<i>formyl peptide receptor 1</i> = Formylpeptidrezeptor 1
FSC	<i>forward scatter</i> = Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
G-CSF	Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor (=CSF3)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> = grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Monozytenkolonie-stimulierender Faktor (=CSF2)
GAM	glioma associated macrophages = Gliom assoziierte Makrophagen
GBM	Glioblastoma multiforme
GBM-/PMNL	Patientengruppe mit einer höheren (>17,2%) Neutrophilenfraktion
GBM-hPMNL	Patientengruppe mit einer niedrigeren (<17,2%) Neutrophilenfraktion
GoTaq	Hitzestabile Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> = Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> = humane Leukozyten-Antigene
Iba1	<i>Ionized calcium binding protein 1</i> = ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1
ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> = Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül1
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL10R1	Interleukin 10 Rezeptor 1
IL-1RA	Interleukin 1 Rezeptor-Antagonist
IFN	Interferon
l	Liter
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i> = Lymphozytenfunktion-assoziertes Antigen
M-CSF	Monozytenkolonie-stimulierender Faktor (=CSF1)
MACS	<i>magnetic cell sorting</i> = Magnetische Zellsortierung
MAFF	<i>v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i> = Monozyten chemotaktisches Protein1 = CCL2
MDA5	<i>melanoma differentiation antigen 5</i> = Melanom-Differenzierungsantigen5
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cells</i> = aus dem Knochenmark stammende suppressorische Zellen
mg	Milligramm
MGMT	O[6]-Methylguanine-DNA Methyltransferase
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> = Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i> = Matrixmetalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
Mrc1	Mannose-Rezeptor C-Typ 1
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
NET	<i>neutrophil extracellular traps</i> = neutrophile extrazelluläre Fallen
NK	natürliche Killerzellen



nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i> = Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne
non-TLR	<i>non-toll-like receptors</i> = nicht-Toll-like Rezeptoren
NOS2	induzierbare Stickstoffoxidsynthase
OSM	Onkostatin M
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> = Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> = Blutplättchen-Wachstumsfaktor
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
PMN	polymorphnukleär
PRR	<i>pattern recognition receptors</i> = Mustererkennungsrezeptoren
PRM	<i>pattern recognition molecules</i> = Mustererkennungsmoleküle
PTEN	Phosphatase- und Tensin-Homolog
qRT-PCR	<i>quantitative realtime polymerase chain reaction</i> = quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion
R	Rezidiv
REL	Protoonkogen c-Rel
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene 1</i> = Retinoinsäure induzierendes Gen I
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RQ	<i>relative quantification</i> = relative Quantifikation
SD	<i>Standarddeviation</i> = Standardabweichung
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i> = CXCL12
socs2	<i>Suppressor of cytokine signaling 2</i> = Suppressor des Cytokinsignals 2
SPARC	<i>Secreted protein acidic and rich in cysteine</i> = Osteonektin
SSC	<i>side scatter</i> = Seitenstreulicht
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i> = Signalwandler und Aktivator der Transkription 3
STI-1	<i>Stress-induced-phosphoprotein 1</i> = stressinduziertes Phosphoprotein 1

TADC	<i>tumor-associated dendritic cells</i> = Tumor-assoziierte dendritische Zellen
TAM	<i>tumor-associated macrophages</i> = Tumor-assoziierte Makrophagen
TAN	<i>tumor-associated neutrophils</i> = Tumor-assoziierte Neutrophile
Tc	<i>t cell</i> = T-Zelle
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TEM	= <i>TIE2 expressing macrophages</i> = TIE-exprimierende Makrophagen
TGF	<i>Transforming growth factor</i> = transformierender Wachstumsfaktor
TIE2	<i>tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2</i> = Angiopoietin-1-Rezeptor
TLR	<i>toll-like receptors</i> = Toll-like-Rezeptoren
TMEM119	Transmembranprotein 119
TNF	Tumornekrosefaktor
TP53	Tumorsuppressorprotein p53
TRALI	transfusionsassoziierte Lungeninsuffizienz
Tregs	regulatorische T-Zellen
TREM-2	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> = vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i> = vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 2-1 Charakteristika des Glioblastoms	16
Abb. 2-2 Immunzellen in der Mikroumgebung des Glioblastoms	18
Abb. 2-3 Übersicht über die physiologische Funktion der Mikroglia	21
Abb. 2-4 Übersicht tumorsupportiver Funktionen von TAMs am Beispiel des Glioblastoms	23
Abb. 2-5 Übersicht der Neutrophilen-Funktion in N1/N2-Polarisierung	28
Abb. 2-6 Ausschnitt der vielfältigen Interaktionen von TANs mit Tumorzellen und anderen Immunzellen	29
Abb. 3-1 Übersicht über die verwendeten Methoden	36
Abb. 4-1 Differenzierung der myeloiden Zellpopulationen	59
Abb. 4-2 Vergleich der Aktivierungsmarker der beiden CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> Zellpopulationen	61
Abb. 4-3 Analyse protumorale und antitumorale Zytokine	62
Abb. 4-4 Einteilung der GBM-Proben in eine GBM-/PMNL- und eine GBM-hPMNL-Gruppe	63
Abb. 4-5 Darstellung der FACS-Analysen von Patient 24	64
Abb. 4-6 Schematische Darstellung der Verteilung der Tumorlokalisierung	66
Abb. 4-7 Analyse der Patientencharakteristika	67
Abb. 4-8 Kontingenztabellen der Tumorcharakteristika	68
Abb. 4-9 Darstellung des immunmodulatorischen Zytokinexpressionsmusters in verschiedenen Hirngeweben	69
Abb. 4-10 FACS-Analyse der Expressionsmuster immunmodulatorischer Zytokine durch Mikroglia/Makrophagen	71
Abb. 4-11 Expression von HLA-Molekülen	72
Abb. 4-12 Expression von Aktivierungsmarkern der Mikroglia/Makrophagen	74
Abb. 4-13 Analyse der CD45 Expression	75
Abb. 4-14 Expression von CD163 und TIE2	76
Abb. 4-15 Analyse der Lymphozytenfraktion	78
Abb. 4-16 Akkumulation Iba1 <sup>+</sup> -Zellen im humanen Glioblastom	79
Abb. 4-17 Morphologie der Mikroglia/Makrophagen	80
Abb. 4-18 Relative Expression klassischer proangiogener Moleküle	82
Abb. 4-19 Relative Expression der Rezeptoren von VEGF	83

Abb. 4-20 Relative Expression der RNA alternativer proangiogener Faktoren	84
Abb. 4-21 Expressionsanalyse von CXCR2	85
Abb. 4-22 Expression von HIF-1 $\alpha$	86
Abb. 4-23 Expression von VEGF	87
Abb. 4-24 CXCL2 Expression in der GBM- <i>hPMNL</i> -Gruppe	87
Abb. 4-25 Expression von IL-8	88
Abb. 4-26 Expression von CD13 in der GBM- <i>hPMNL</i> -Gruppe	89
Abb. 4-27 Expression von proangiogenen Molekülen bei Epilepsiepatienten	90
Abb. 4-28 Analyse der Gefäßstruktur	92
Abb. 4-29 Beispielhafte Darstellung der Assoziation von Mikroglia/ Makrophagen und Gefäßen	93
Abb. 4-30 Analyse der Assoziation von Mikroglia/Makrophagen und Gefäßen	95
Abb. 4-31 Exemplarische Darstellung der CSF3R-Expression	96
Abb. 4-32 Expression von CSF3	97
Abb. 4-33 Analyse von Überlebensdaten	99
Abb. 4-34 Kaplan-Meier-Überlebenskurven mit Analyse der Zellpopulationen	101
Abb. 5-1 Zusammenfassung der Ergebnisse	123

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 3-1 Übersicht über die verwendeten Geräte	32
Tab. 3-2 Übersicht über die verwendeten Materialien	32
Tab. 3-3 Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien	32
Tab. 3-4 Übersicht über die verwendeten vorbereiteten Lösungen	33
Tab. 3-5 Übersicht über die verwendeten Hersteller-Kits	34
Tab. 3-6 Auflistung der verwendeten Software	34
Tab. 3-7 Übersicht der verwendeten Primer-Sequenzen	42
Tab. 3-8 Protokoll der quantitativen Realtime-PCR	44
Tab. 3-9 Übersicht der verwendeten FACS-Primärantikörper für vitale Zellen	46
Tab. 3-10 Übersicht verwendeter Isotypen-Kontrollen der FACS-Färbung vitaler Zellen	46
Tab. 3-11 Übersicht der verwendeten Primärantikörper für fixierte Zellen	48
Tab. 3-12 Übersicht über die verwendeten Antikörper für FACS-Färbungen mit Restimulation	48
Tab. 3-13 Übersicht der Isotypen-Kontrolle für die FACS-Färbung nach Restimulation	49
Tab. 3-14 Übersicht der verwendeten Primärantikörper für Immunfluoreszenz- färbungen nach Protokoll ohne Zellpermeabilisierung	51
Tab. 3-15 Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper für Immun- fluoreszenzfärbungen nach Protokoll ohne Zellpermeabilisierung	51
Tab. 3-16 Übersicht der verwendeten Primärantikörper für Immun- fluoreszenzfärbungen nach Protokoll mit Zellpermeabilisierung mittels Methanol	52
Tab. 3-17 Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper für Immun- fluoreszenzfärbungen nach Protokoll mit Zellpermeabilisierung mittels Methanol	53
Tab. 3-18 Übersicht der verwendeten Primärantikörper für das ARS-Protokoll	54
Tab. 3-19 Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper für das ARS-Protokoll	55
Tab. 3-20 Darstellung der Signifikanzniveaus	57
Tab. 4-1 Darstellung der Patientencharakteristika	65
Tab. 5-1 Humane Markerprofile Tumor-assoziiertes myeloider Zellen	104

## 1 Zusammenfassung/Abstract

### 1.1 Zusammenfassung

**Einleitung:** Die hochmalignen Glioblastome (GBM) zeichnen sich durch eine gesteigerte Vaskularisierung aus. Es gibt Hinweise darauf, dass myeloide Zellen als Teil der Mikroumgebung des Glioblastoms Anteil an der erhöhten proangiogenen Aktivität im Tumor und auch an der Entwicklung von Therapieresistenz gegen antiangiogene Wirkstoffe haben. In dieser Arbeit sollte eine vertiefende Charakterisierung der proangiogenen Eigenschaften der Mikroglia/Makrophagen und Granulozyten als Vertreter der myeloiden Zellen im humanen Glioblastom vorgenommen werden.

**Methoden:** Gewebeproben von GBM-, Astrozytom<sup>o</sup>III- und Epilepsiepatienten wurden direkt postoperativ prozessiert und für die Isolation von CD11b<sup>+</sup>-Zellen mittels MACS-Technologie, FACS-Färbungen oder Immunfluoreszenzfärbungen auf Gefrierschnitten verwendet. Im FACS wurden typische M1/M2-Aktivierungsmarker der Mikroglia/Makrophagen gruppenabhängig untersucht, während in den Immunfluoreszenzfärbungen proangiogene Moleküle in Kofärbung mit Iba1 und CD66b dargestellt wurden. Gefäßassoziationen und -struktur wurden mittels CD31-CD66b-Iba1-Kofärbung untersucht. Aus den isolierten Zellen wurde RNA gewonnen, umgeschrieben und für quantitative Realtime-PCRs sowohl von proangiogenen Faktoren als auch den Aktivierungsstatus beschreibenden Molekülen verwendet. Mithilfe der Online-Datenbank *Cbioportal* wurden Überlebenskurven anhand der Molekülexpression erstellt und die Überlebenszeit mittels CIBERSORT mit den vorhandenen myeloiden Zellpopulationen korreliert.

**Ergebnisse:** Anhand der FACS-Analyse erfolgte eine Unterteilung der GBM-Patienten in eine Gruppe mit höherem (GBM-*h*PMNL) und niedrigerem (GBM-*l*PMNL) Neutrophilenanteil an der myeloiden Zellpopulation. Eine eindeutige M1/M2-Polarisierung der Mikroglia/Makrophagen konnte nicht festgestellt werden, jedoch war eine Hochregulation von CD86, CD45, CD163, TIE2 und HLA-ABC in der GBM-*h*PMNL-Gruppe zu beobachten, was auf einen veränderten Aktivierungsstatus hinweist. Zudem konnte bei den Mikroglia/Makrophagen eine erhöhte Expression alternativer proangiogener Faktoren wie CXCL2 und CD13 im Vergleich zur Epilepsie-, Astrozytom- und GBM-*l*PMNL-Gruppe gefunden werden. Die Granulozyten der GBM-*h*PMNL-Gruppe partizipierten über Produktion von IL-8 und CD13 an der

Angiogenese. Zusätzlich zeigte sich in der GBM-hPMNL-Gruppe eine veränderte Gefäßstruktur mit erhöhtem mittleren Gefäßdurchmesser und vermehrter Assoziation der Gefäße mit Iba1<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen. Mit erhöhter Neutrophilenfraktion, CD45- und CSF3-Expression sowie IL-8-Produktion im gesamten GBM war ein Überlebensnachteil assoziiert.

**Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen den Einfluss der myeloiden Zellpopulation in der direkten Tumorumgebung. Die Neutrophilenfraktion scheint hierbei einen Einfluss auf den Aktivierungsstatus, Phänotyp und die proangiogenen Eigenschaften der Mikroglia/Makrophagen zu haben, wobei einige Moleküle, die zu potentiellen reziproken Interaktionen beitragen können, identifiziert werden konnten. Beide myeloide Zellpopulationen können durch Partizipation an der Produktion proangiogener Faktoren zur Angiogenese im humanen GBM beitragen und so die Entwicklung einer Resistenz gegen die bisherigen antiangiogenen Therapeutika unterstützen. Auf dieser Arbeit aufbauende Untersuchungen könnten somit dazu beitragen, die Immuntherapien im humanen GBM weiterzuentwickeln und sie unter Einbeziehung der myeloiden Zellpopulationen anzupassen.

## 1.2 Abstract

**Introduction:** The highly malignant glioblastoma (GBM) is characterized by increased vascularization. Myeloid cells as part of the GBM microenvironment may participate in the enhanced proangiogenic activity of the tumor and in development of therapy resistance to antiangiogenic agents. Therefore, the aim of this study was to deepen the characterization of proangiogenic features of myeloid cells like microglia/macrophages and neutrophils in human glioblastoma.

**Methods:** Tissue samples of patients with GBM, astrocytoma °III and epilepsy were directly processed postoperative and used for isolation of CD11b<sup>+</sup> cells by MACS technology, FACS-staining or immunofluorescence staining on frozen sections. During FACS-analyses, typical M1/M2 activation markers of microglia/macrophages were examined depending on groups. Furthermore, proangiogenic factors were analyzed by Iba1 and CD66b costain by immunofluorescence. The association of myeloid cells with tumor blood vessels as well as vasculature were analysed by CD31-CD66b-Iba1 co-staining. RNA was obtained from isolated cells and used for quantitative realtime-PCR of proangiogenic factors as well as activation markers. To evaluate clinical relevance,

survival data were extracted from online database Cbioportal, analyzed regarding molecule expression and correlated with present myeloid cell populations by CIBERSORT.

**Results:** Based on the neutrophil fraction by FACS-analyses, a classification of GBM patients into a group with high (GBM-*h*PMNL) and low (GBM-*l*PMNL) percentage of neutrophils was established. While microglia/macrophages could not be assigned to a specific M1/M2-polarization, upregulations of CD86, CD45, CD163, TIE2 and HLA-ABC in GBM-*h*PMNL group were detected, indicating a distinct activated phenotype. Additionally, microglia/macrophages in this group showed an increased expression of alternative proangiogenic factors like CXCL2 and CD13. Granulocytes of GBM-*h*PMNL-group participated in angiogenesis by expression of IL-8 and CD13. Moreover, a distinct vessel structure with increased mean diameter and association of vessels with Iba1<sup>+</sup> cells were observed in GBM-*h*PMNL tissues compared to the other groups. A survival disadvantage was related to higher neutrophil proportion, CD45, IL-8 and CSF3 expression.

**Conclusion:** The data of this study demonstrated the importance of myeloid cells in the tumor microenvironment. The neutrophil fraction seems to have an impact on activation status, phenotype and proangiogenic features of microglia/macrophages, Potential molecules responsible for reciprocal interaction between both myeloid cell populations were identified. Microglia/macrophages and granulocytes are able to promote angiogenesis in human GBM by expression of alternative proangiogenic factors and therefore might support the development of therapy resistance to antiangiogenic agents. Future studies based on this work could improve immunotherapies by involving the myeloid cells for therapeutic approaches in human GBM.



## 2 Einleitung

### 2.1 Glioblastoma multiforme

#### 2.1.1 Epidemiologie

Tumorerkrankungen des Zentralnervensystems (6700 Neuerkrankungen im Jahr 2014 [1]) machen im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen einen eher geringen Anteil der Krebserkrankungen in Deutschland aus. Dennoch entfallen etwa zwei Drittel der Fälle im Erwachsenenalter auf die hochmalignen Glioblastome (GBM) [1].

Die Namensgebung leitet sich dabei von den Gliazellen des Gehirns ab. Diese unterteilen sich in Astrozyten und Oligodendrozyten, wobei Glioblastome sowohl Eigenschaften der einen als auch der anderen Gruppe in unterschiedlicher Ausprägung aufweisen können [2]. Im Moment ist es dabei unklar, ob die GBM aus multipotenten neuronalen Vorläuferzellen, aus bereits Zelllinien-spezifischen Progenitorzellen oder aus umprogrammierten differenzierteren Zellen entstehen. Hierbei wurde gezeigt, dass bereits bestehende Tumorzellen auch bisher nicht neoplastische Progenitorzellen zu exzessiver Proliferation anregen können [2,3]. Der Ursprung der GBM stellt sich also genauso heterogen dar wie die Tumore an sich und trägt nach heutiger Auffassung wahrscheinlich zu dieser Heterogenität bei [2].

Mehrere Risikofaktoren für die Entstehung der Glioblastome wurden bereits diskutiert. Hierbei zeigten sich überwiegend heterogene Studienergebnisse oder lediglich schwache Assoziationen wie zum Beispiel mit dem sonst mit der Karzinogenese häufig vergesellschafteten Risikofaktor des Nikotinkonsums [4]. Die Exposition mit ionisierenden Strahlen und das Vorliegen hereditärer Krankheiten mit generell erhöhtem Neoplasie-Risiko wie dem Li-Fraumeni-Syndrom, der Neurofibromatose Typ 1 und 2 und dem Turcot-Syndrom stellen bisher die einzigen sicher identifizierten Risikofaktoren dar [4]. Die Assoziation mit bestimmten Virusinfektionen (z.B. CMV, EBV) und der überdurchschnittlich hohen Exposition mit Tetrachlormethan wird diskutiert [5–7].

Trotz multimodaler Therapieansätze mit maximal möglicher chirurgischer Resektion, adjuvanter Radiotherapie und Chemotherapie wird das 5-Jahres-Überleben meist mit unter 5% angegeben, auch wenn die Behandlung mit Temozolomid für die entsprechende Patientengruppe einen signifikanten Überlebensvorteil erbrachte [8,9]. In einigen Fällen sind für jüngere Altersgruppen auch höhere Überlebensraten mit bis

zu 20% 5-Jahres-Überleben berichtet worden [10]. Da die meisten Erkrankungen jedoch im fortgeschrittenen Lebensalter auftreten, geben die meisten Studien ein mittleres Überleben von 12-15 Monaten an [8].

## 2.1.2 Einteilung der Glioblastome

### 2.1.2.1 Einteilung nach Kriterien der WHO 2007

Ein Grund für die schwierige Behandlung der GBM ist die Heterogenität dieser Gruppe von Tumoren. Momentan erfolgt die Diagnose und Einteilung aufgrund histopathologischer Kriterien, die für den WHO Grad IV nekrotische Gewebeareale und mikrovaskuläre Proliferation vorsehen. Diese müssen aber nicht zwangsläufig mit molekularen Eigenschaften des Tumors sowie dem Therapieansprechen und der Überlebenszeit korrelieren [11]. Weitere histopathologische Unterschiede wie zum Beispiel kleinzellige Tumore oder Tumore mit oligodendroglialer Komponente können nach aktuellen Richtlinien der WHO zwar als solche beschrieben werden, die sich ergebenen detaillierten Unterschiede für Tumorbiologie, Therapieoptionen oder Überlebensvorteile müssen jedoch weiter erforscht werden [11,12].

### 2.1.2.2 IDH-Mutation und MGMT-Methylierung

Als Neuerung wurde in der WHO Klassifikation 2016 eine Differenzierung der diffusen Gliome nach IDH-Status eingeführt, da beispielsweise gezeigt werden konnte, dass eine IDH1-Mutationen sowohl mit einem besseren Gesamtüberleben als auch mit gesteigerter Sensitivität auf die Chemotherapie mit Temozolomid assoziiert ist, während eine bloße Überexpression des Gens zu einer Resistenz gegen die Chemotherapie führt [13–15]. Die Mutation führt über eine Fehlfunktion des Zitronensäurezyklus letztlich zu einer veränderten Methylierung der DNA und damit zu einer verminderten Zelldifferenzierung und über Aktivierung von Onkogenen zu gesteigerter Tumorbildung [16]. Ein weiterer Anhaltspunkt für die große Bedeutung der genaueren Klassifizierung der Glioblastome ist die MGMT-Promotor-Methylierung, die in einigen Tumoren auftritt und die ebenfalls ein besseres Ansprechen auf Temozolomid bedingt [17]. Eine Hoffnung für zukünftige Therapien liegt damit auf der genaueren Klassifikation des zugrunde liegenden Tumorgenoms und den damit potentiell möglich werdenden zielgerichteten Gentherapien, die als personalisierte „*targeted therapy*“ bezeichnet wird [11]. Zu diesem Zweck wurde in einigen aktuellen

Studien damit begonnen, die Gen-Landkarten der Tumore zu klassifizieren und in Datenbanken wie der der TCGA mit anderen Wissenschaftlern zu teilen und dadurch eine bessere Vernetzung zu schaffen [18–20].

### 2.1.2.3 Primäre und sekundäre Glioblastome

Bisher wurde aufgrund genetischer Unterschiede oft nur eine grobe Einteilung in sogenannte primäre und sekundäre GBM vorgenommen. Es wird davon ausgegangen, dass sich primäre Glioblastome neu aus den bereits beschriebenen Ausgangszellen entwickeln, während die sekundären Glioblastome einen Umwandlungsprozess aus niedrigmaligneren Astrozytomen und Oligodendrogliomen der WHO Stufe II oder III durchlaufen. Hierbei zeigen diese sekundären Glioblastome in etwa 80% der Fälle die beschriebene IDH1-Mutation. Sie ist jedoch in seltenen Fällen (<5%) auch bei als „primär“ klassifizierten GBM zu finden [16]. Hier steht zur Diskussion, ob es sich eventuell um besonders rasch fortschreitende Tumore handeln könnte, die sich zwar aus Astrozytomen oder Oligodendrogliomen entwickelt haben, jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht klinisch auffällig geworden sind und somit primär als Glioblastom identifiziert wurden.

Des Weiteren weisen sekundäre GBM häufig eine Mutation im *TP53*-Gen auf und zeigen einen kombinierten Verlust des kurzen Armes des Chromosoms 1 und des langen Arms von Chromosom 19 (*1p/19q loss*), während primäre GBM eher eine Überexpression von EGF-Rezeptor, eine *PTEN*-Mutation oder den Verlust des Chromosoms 10 zeigen. Etwa 1 von 49 untersuchten Glioblastomen zeigte jedoch eine Mutation im EGF-Rezeptor und im *TP53*-Gen, so dass auch hier noch keine vollkommene Klarheit in Bezug auf die Einteilung vorliegt [21]. Insgesamt treten sekundäre Glioblastome bei jüngeren Patienten auf und zeigen eine längere Überlebenszeit. Außerdem werden sie als homogenere Gruppe beschrieben, während primäre GBM als heterogen gelten [16].

### 2.1.2.4 Definition von Subgruppen

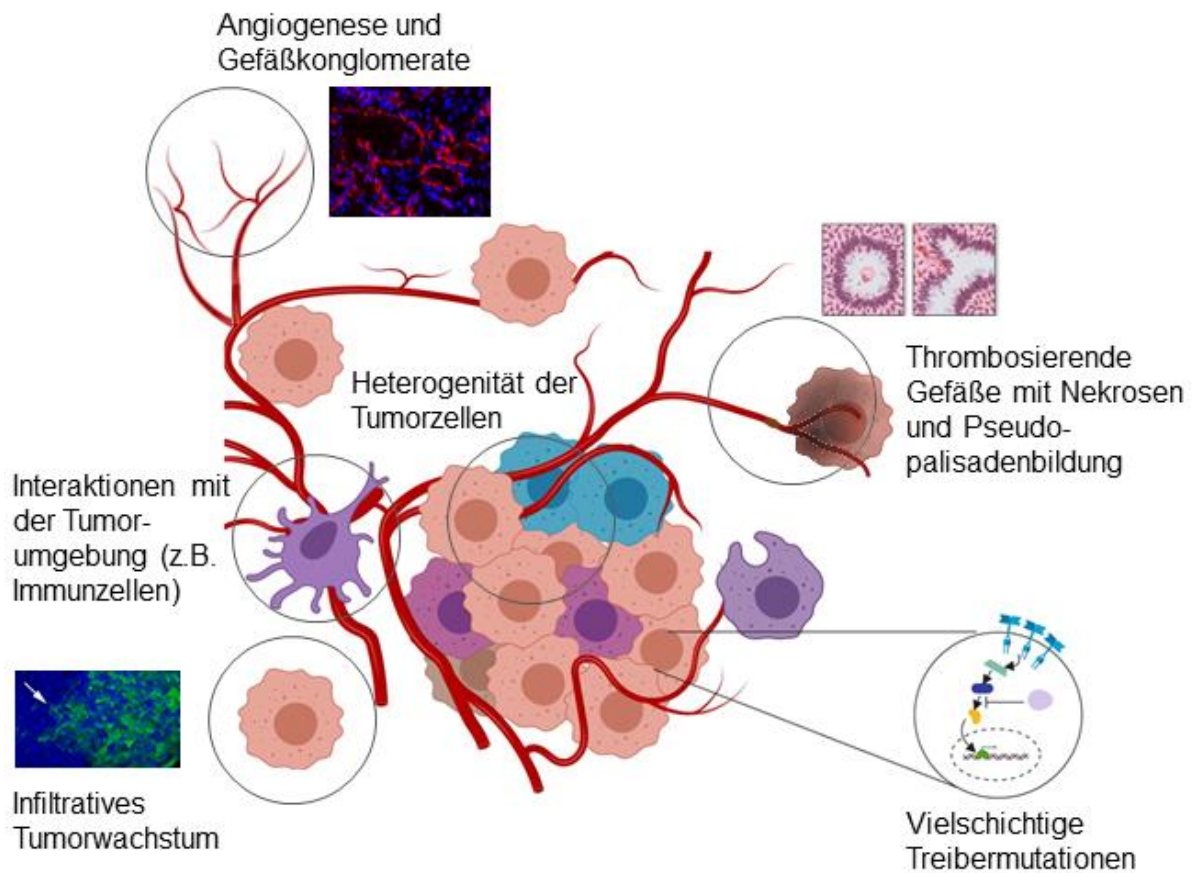
Rein vom histopathologischen Erscheinungsbild lassen sich primäre und sekundäre GBM jedoch nicht voneinander unterscheiden, so dass die molekulargenetische Untersuchung auch in Hinblick auf die Therapieoptionen an Bedeutung gewonnen hat. Zudem wird versucht, eine genauere Klassifizierung mit Hilfe mehrerer molekulargenetischer Marker und Clusterbildung vorzunehmen. Dabei gibt es bisher

unterschiedliche Bezeichnungen und Vorschläge für die Anzahl der so definierten Subgruppen [11]. Oft werden ein klassischer, mesenchymaler, neuraler und proneuraler Subtyp unterschieden [20]. Eine Studie von Sturm *et al.* schlägt zum Beispiel sechs verschiedene Subtypen vor und konnte nicht nur unterschiedliche Altersverteilungen, sondern auch ein differentes Verteilungsmuster der Tumorlokalisation zeigen. Obwohl die Datensätze für die einzelnen Subgruppen limitiert waren, ergaben sich Hinweise auf Unterschiede in der Überlebenszeit der Patienten [22].

### **2.1.3 Charakteristika des Glioblastoms**

#### 2.1.3.1 Allgemeine Charakteristika

Ein Grund für die hohe Malignität des GBM wird neben der Heterogenität in den Charakteristika des Tumors gesehen. Der Tumor wächst infiltrativ in das umliegende Hirngewebe ein, wobei er auch präformierte Strukturen wie Gefäße oder Nerven nutzt, um daran entlang zu wachsen [23]. Dies macht eine vollständige Resektion selbst bei kleineren oder noch nicht hoch malignen Gliomen unmöglich, ohne dem umliegenden Hirngewebe einen massiven Schaden zuzufügen. Zudem wird für das exzessive Wachstum eine gute Nährstoffversorgung benötigt, welche das für die histologische Diagnose vorgesehene Kriterium der mikrovaskulären Gefäßproliferation erklärt. Im Zusammenhang mit den im primären wie auch im sekundären GBM vorkommenden genetischen Alterationen stehen auch vielfältige Auswirkungen auf zelluläre Signalwege, die auf Hypoxie der Zellen reagieren, neue Gefäße bilden oder bereits vorhandene Gefäße zum Aussprossen anregen. In weniger gut mit Nährstoffen versorgten Regionen kommt es zur Nekrosenbildung und den ebenfalls typischen Pseudopalisaden (Abb. 2-1) [11,24].



**Abb. 2-1 Charakteristika des Glioblastoms** modifiziert mit Abbildung von Pseudopalisadenbildung aus [25] und infiltrativem Wachstum aus [26] nach Robertson *et al.* [27].

### 2.1.3.2 Angiogenese im Glioblastom

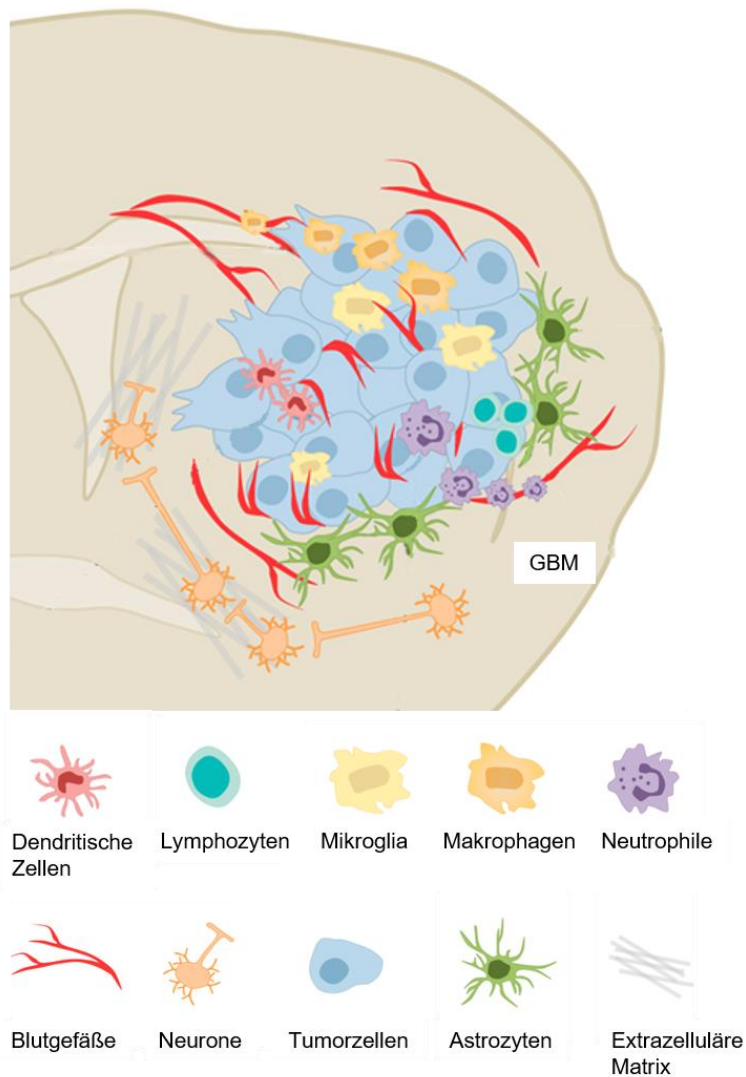
Mikrovaskuläre Gefäßproliferationen sind eines der histopathologischen Diagnosekriterien des Glioblastoms [12]. Es wurden mehrere Mechanismen identifiziert, durch die die Vaskularisierung im GBM gesteigert werden kann: Zunächst wurde postuliert, dass sich die Tumorzellen um bereits bestehende Gefäße herum gruppieren und diese für ihr Wachstum nutzen oder dass Tumorzellen an diesen Gefäßen entlangwandern [28,29]. Eine Induktion der Angiogenese erfolgt über die Hochregulation der proangiogenen Faktoren VEGF, FGF, PDGF und Angiopoietin 2 (Ang-2), die über ihre Rezeptoren zu einer Destabilisierung bestehender Gefäße mit Verlust der Zell-Zell-Verbindungen und einer Proliferation endothelialer Zellen mit

Aussprossung neuer Gefäße führen [29–31]. Zur Degeneration der bestehenden Strukturen tragen hierbei auch Matrixmetalloproteinasen bei [32,33]. Zudem wird eine Beteiligung von endothelialen Vorläuferzellen, die in den Tumor rekrutiert werden, und dort zur Vaskulogenese beitragen, diskutiert [31]. Auch Glioblastomzellen selbst können über die Imitation von Gefäßzellen zur Angiogenese beitragen. Hierbei können Tumorzellen in das Gefäßnetzwerk integriert werden und eine Art Mosaik bilden, wobei sie keine endothelialen Marker exprimieren oder aber eine endotheliale Transdifferenzierung durchlaufen, an deren Ende die Tumorzellen im Mausmodell GFP als Tumormarker zusammen mit endothelialen Zellmarkern exprimieren und Gefäße bilden [31]. Doch nicht nur die Glioblastomzellen, sondern auch Immunzellen der Mikroumgebung des Tumors können proangiogene Faktoren sezernieren und damit zur Vaskularisierung des Tumors beitragen. Gliom-assoziierte Mikroglia und Makrophagen wurden im Mausmodell, *in vitro* und in einigen humanen Studien bereits auf ihre proangiogenen Eigenschaften hin untersucht [34–36]. Für Tumor-assoziierte Neutrophile wurden in letzter Zeit ebenfalls Studien publiziert, die ihr proangiogenes Potenzial in anderen Tumormodellen und ihren möglichen Beitrag zur Angiogenese im Glioblastom untersuchen [37–40]. Eine genauere Beschreibung des Beitrags dieser myeloiden Zellen zur Angiogenese findet sich in den Abschnitten 2.2.1.5 und 2.2.2.2.

Da die starke Vaskularisierung als eine der Schlüsseleigenschaften für das rasante Wachstum und die Malignität des Glioblastoms identifiziert wurde, wurden in den letzten Jahren auch anti-angiogene Therapien zum Beispiel mit Bevacizumab oder Sunitinib erforscht, die jedoch nach initial vielversprechenden Ergebnissen mit einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens keinen signifikanten Gesamtüberlebensvorteil zeigen konnten [41,42].

#### **2.1.4 Immunzellen im Mikromilieu des Glioblastoms**

Neben den Tumorzellen reichern sich auch Immunzellen im intratumoralen Gewebe an (Abb. 2-2). Hierbei wurde gezeigt, dass Mikroglia und Makrophagen über 30% der Zellen im Tumor ausmachen können [43–45]. Zudem wurde eine Infiltration von Lymphozyten und Neutrophilen ins Tumorgewebe beschrieben [46–48]. Insgesamt wird den Zellen im sogenannten Mikromilieu des Tumors eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Tumorstwachstums und dem Ansprechen auf Therapien zugeschrieben [46,49,50].



**Abb. 2-2 Immunzellen in der Mikroumgebung des Glioblastoms** modifiziert nach [51]. Verschiedene Zellen des Immunsystems bilden ein komplexes Interaktionsnetzwerk im Tumor und kommunizieren nicht nur untereinander, sondern auch mit Tumorzellen, Neuronen, Astrozyten und Gefäßen.

## 2.2 Immunzellen in der Mikroumgebung des Glioblastoms

### 2.2.1 Mikroglia und Makrophagen

#### 2.2.1.1 Allgemeine Übersicht

Mikroglia werden häufig als die „Makrophagen des Gehirns“ bezeichnet und wurden somit als spezielle ortsansässige Gewebemakrophagen wie zum Beispiel auch die Kupffer-Sternzellen der Leber klassifiziert. In neueren Studien konnte jedoch im Mausmodell gezeigt werden, dass Mikroglia nicht wie andere Makrophagen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen entstehen, sondern eine eigene Zelllinie bilden. Es wurde gezeigt, dass am achten Tag der Embryonalentwicklung der Maus Progenitorzellen aus dem Dottersack auswandern und ins Neuralrohr gelangen. Auf dem Weg dorthin erfolgt eine weitere Differenzierung und sie bilden schließlich die Ausgangszellen für die sich im weiteren Lebensverlauf selbst erneuernde Mikroglia-Population [52,53]. Nur ein kleiner Anteil der Zellen wird später durch Makrophagen mit Ursprung im Knochenmark ergänzt [52,54]. Insgesamt machen Mikroglia etwa 10% der Zellen des Gehirns aus, wobei mehr Zellen in der weißen als grauen Substanz zu finden sind [55,56]. Mikroglia gehören wie auch die Makrophagen zu den Immunzellen, welche mithilfe spezieller Oberflächenmoleküle wie TLR (*toll-like receptors*), PRR (*pattern recognition receptors*), non-TLR (*non-toll-like receptors*) und NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) - Proteinen Pathogene identifizieren und Abwehrreaktionen gegen diese in die Wege leiten können [57].

#### 2.2.1.2 Differenzierungsmarker

Letztendlich haben Mikroglia, Monozyten und Makrophagen zwar alle eine spezifische Gensignatur, die auf ihre unterschiedliche Differenzierung zurückzuführen ist, es ist jedoch schwierig sie im Hirngewebe voneinander zu unterscheiden [53]. In den letzten Jahren wurden verschiedene Differenzierungsmöglichkeiten vorgeschlagen, jedoch auch stark diskutiert und für Tumormodelle zudem widerlegt. Eines dieser Unterscheidungskriterien ist die per FACS im Nagetiermodell etablierte Färbung von Oberflächenmolekülen wie CD11b und CD45.

Ein gemeinsamer Marker beider Zelltypen ist CD11b, welcher jedoch auch auf anderen Zellen der myeloiden Linie wie zum Beispiel neutrophilen Granulozyten exprimiert wird [58]. CD45 ist ein weiterer Oberflächenmarker, der sowohl auf Mikroglia als auch

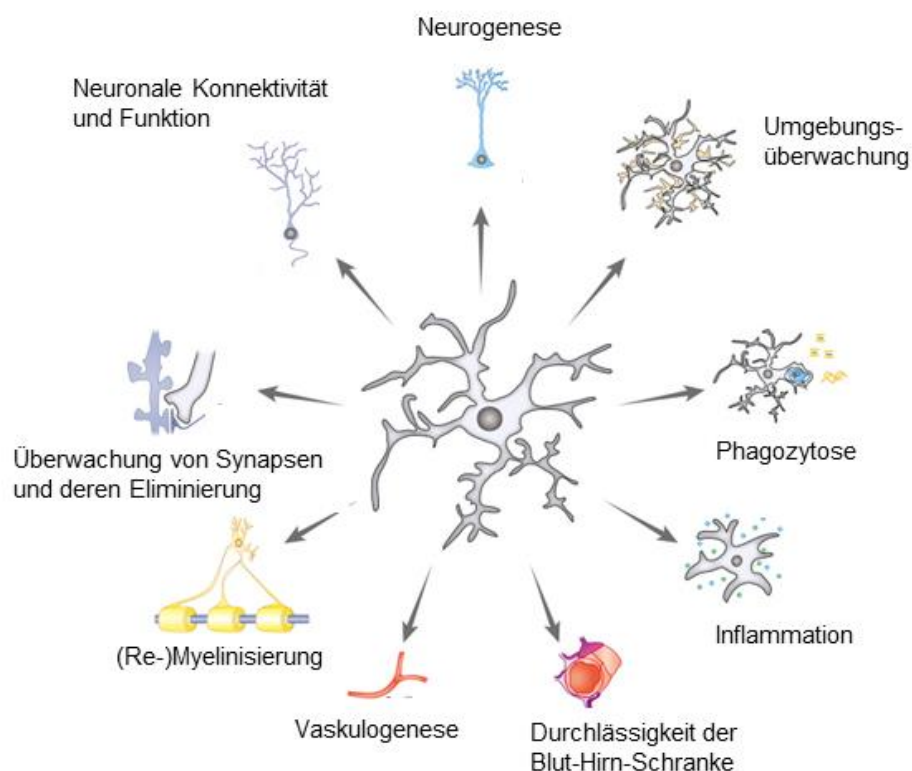


Makrophagen zu finden ist, da er als allgemeiner Leukozytenmarker gilt. CD45 vermittelt seine Funktion über die an den Oberflächenrezeptor gebundene Tyrosinphosphatase und spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellaktivierung [59,60]. Zwar sind diese beiden Moleküle sowohl auf Mikroglia als auch Makrophagen vorhanden, jedoch konnte im Nagetiermodell gezeigt werden, dass es zwei verschiedene Expressionsmuster gibt. Eine Zellpopulation weist hierbei eine stärkere Expression des Oberflächenmarkers CD45 (CD45<sup>high</sup>) auf, während die anderen Zellen zwar auch positiv gefärbt werden können, jedoch ein deutlich schwächeres Signal emittieren (CD45<sup>low</sup>). Hierbei wurde die CD45<sup>high</sup>-Population mit dem Expressionsmuster peripher eingewanderter Makrophagen verglichen und mit diesen gleichgesetzt, während die CD45<sup>low</sup>-Population als Mikroglia beschrieben wurde [61,62]. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass sich diese Expressionslevel unter bestimmten Umständen angleichen können, was dazu führt, dass die Unterscheidung der Zellen mittels CD45 gerade in Krankheitsmodellen mit möglicher oder wahrscheinlicher Destruktion der Blut-Hirn-Schranke - wie Tumoren - eine unsichere Unterscheidungsmethode darstellt [63]. Ähnliches wurde für das SPARC Glykoprotein und TREM-2 gezeigt, wobei hier auch auf Unterschiede der Mikroglia-Konstitution in verschiedenen Abschnitten des Gehirns hingewiesen wird [55,56,64]. In vielen Studien wurde versucht, ein molekulares, für Mikroglia typisches Expressionsmuster zu finden, was die Abgrenzung von eingewanderten Makrophagen zulässt. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass es weder einen einheitlichen aktivierten oder inaktiven Zustand der Zellen gibt, noch einen Zelltypen, dessen Expressionsmuster für sämtliche Regionen des gesunden Gehirns einheitlich ist, wohl aber Tendenzen zu Unterschieden von Mikroglia und Makrophagen in Molekülexpression und Aktivierungsstatus [65–67].

Als typisches Oberflächenmolekül wird außerdem Iba1 angegeben, wobei dieses spezifisch für Mikroglia und Makrophagen ist [68]. Zusammen mit Iba1 wurde eine Hochregulation des *scavenger* Rezeptors CD68 und des humanen Leukozytenantigenkomplexes (HLA-DR) auf aktivierten Mikroglia/Makrophagen beschrieben [69]. Über die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 werden T-Zell-Aktivierung und im Falle von Mikroglia auch eine Änderung des Phänotyps in Richtung Antiinflammation vermittelt [70].

### 2.2.1.3 Physiologische Funktion der Mikroglia

Im gesunden Gewebe weist der Phänotyp der Mikroglia lange Fortsätze auf, die die Zelle wie ein Netzwerk umgeben. Sie wurden lange Zeit als „ruhende“ Zellen beschrieben. In jüngerer Zeit wurde jedoch gezeigt, dass die Mikroglia in diesem „ruhenden“ Status überaus aktiv und agil sind. So bewegen sich die Zellfortsätze ständig, treten in Kontakt mit umliegenden Zellen und wirken am Signalaustausch mit, so dass unter anderem eine direkte Reaktion auf Parenchymverletzungen erfolgen kann [71,72]. Außerdem übernehmen Mikrogliazellen über Phagozytose eine Synapsen-modulierende Funktion (Abb. 2-3) [73].



**Abb. 2-3 Übersicht über die physiologische Funktion der Mikroglia** (modifiziert nach [74]).

### 2.2.1.4 Funktion der Mikroglia/Makrophagen in Krankheitsmodellen

Aber auch während verschiedener Erkrankungen spielt die Mikroglia eine entscheidende Rolle. Bereits der Erstbeschreiber der Mikroglia, Dr. Rio-Hortega, identifizierte eine drastische Veränderung des Phänotyps der Zellen in der Silbernitratfärbung, wenn Hirnpathologien vorlagen: Die vormals „ruhenden“ Mikrogliazellen mit ihren charakteristischen langen Fortsätzen machten eine Transformation durch, in deren Verlauf sich die Fortsätze zurückbildeten, die Zelleiber

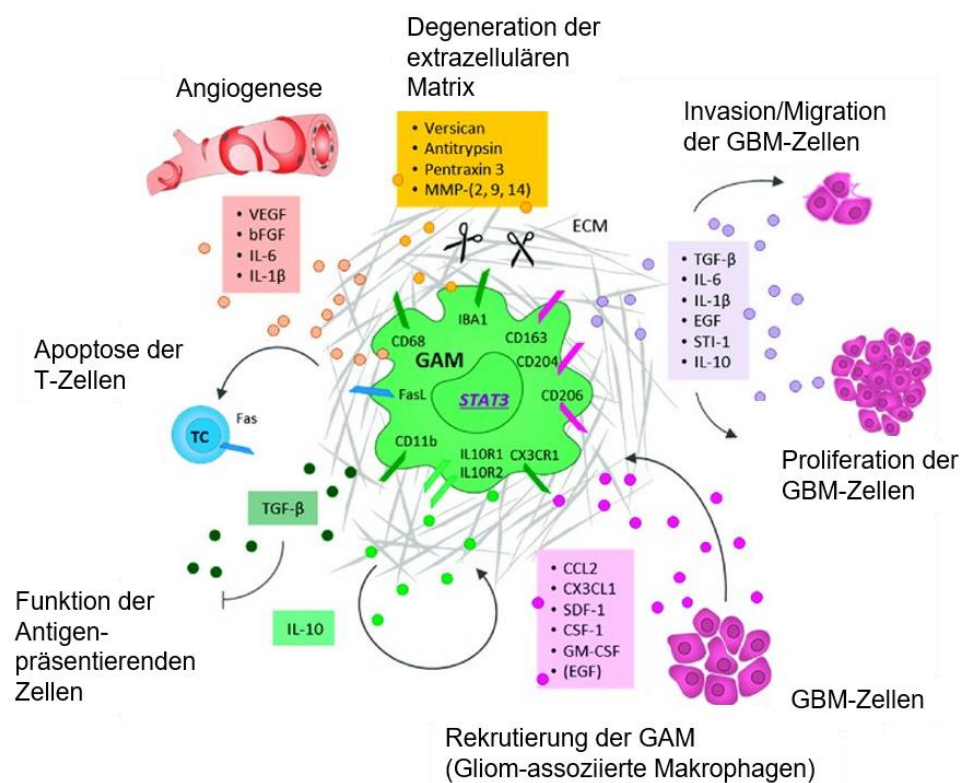
deutlich an Größe gewannen und somit von ihm auch als amöboid bezeichnet wurden. In diesem aktivierten Zustand sind die Zellen in der Lage, sich zu der jeweiligen Läsion – zum Beispiel Tumor, Trauma, Entzündung oder hypoxischem Areal – zu bewegen [75]. Außer den beschriebenen morphologischen Änderungen kommt es zu Veränderungen der Molekülexpression und der Funktion der Mikroglia, zum Beispiel mit Regulation von CD163, CD14 oder MHC II [76].

Über Adaptorproteine werden die Stimuli der Oberflächen-Rezeptoren weitervermittelt. Es wird ein Signalnetzwerk aus Kinasen aktiviert, welche wiederum Transkriptionsfaktoren beeinflussen und im Endeffekt zu einer proinflammatorischen Zellantwort führen können. In diesem Zuge werden typischerweise Moleküle wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukine (IL-1 $\beta$ , IL-12, etc.), Chemokine, Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Proteinasen sezerniert, die wiederum zur Immunreaktion beitragen und auch andere Abwehrzellen rekrutieren können [75,77]. Nach Abwehr der pathogenen Faktoren und Phagozytose untergegangener Zellen durch die Mikroglia, kann sich deren Aktivierungsstatus ändern. Es steht nicht mehr eine proinflammatorische Funktion im Vordergrund, sondern es werden vermehrt antiinflammatorische Zytokine produziert, welche zur Wiederherstellung des ursprünglichen Gewebes und dessen Gleichgewicht unabdingbar sind. Zu diesen Molekülen zählen unter anderem die Interleukine IL-4, IL-13 und IL-10 sowie Osteopontin und der sogenannte *transforming growth factor* TGF- $\beta$ , welche zum Beispiel von regulatorischen T- Zellen produziert werden und Mikroglia und Makrophagen in ihrem Aktivierungsstatus beeinflussen können [57,78,79]. Aufgrund der unterschiedlichen Funktionen und Expressionsprofile der Mikroglia und Makrophagen haben sich die Bezeichnung M1- oder klassischer Aktivierungsstatus - für einen proinflammatorischen und M2- oder alternativer Aktivierungsstatus - für einen antiinflammatorischen Phänotypen herausgebildet [80]. Dabei wird die RNA-Expression von *Socs2*, *Arg1*, *Mrc1*, *Chi3l3*, *CD163*, *TGF- $\beta$* , *IL-4*, *IL-10*, *Fizz-1*, und *Ccl2* dem M2-Typen zugeordnet, während *Nos2*, *IL-12 $\alpha$* , *IL-12 $\beta$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-23*, *TNF- $\alpha$*  und *Ciita* den M1-Phänotyp beschreiben [36,78,80]. Während M1-Mikroglia und Makrophagen also den als Th1 bezeichneten Signalweg über die Sekretion von Lymphozyten anlockenden Chemokinen wie CXCL9 und CXCL10 triggern, produzieren M2-aktivierte Zellen Botenstoffe wie CCL17, CCL22 und CCL24, die Eosinophile, Basophile und regulatorische T-Zellen anlocken können [36]. Jedoch wurde mehrfach darauf hingewiesen, dass dies eher eine vereinfachte Unterteilung ist

und das Bild der Mikroglia- und Makrophagen-Funktion sich vor allem in Krankheitsmodellen und in Interaktion mit anderen Zellen als wesentlich komplexer darstellt, so dass die kategorische Unterteilung in M1- und M2-Phänotyp teilweise diskutiert und von einigen Experten geraten wird, diese wieder zu verlassen [81,82].

### 2.2.1.5 Tumor-assoziierte Mikroglia und Makrophagen (TAM)

In mehreren Tumormodellen wurde das Zusammenwirken des Tumors und seiner unter anderem aus Immunzellen bestehenden Mikroumgebung bereits beschrieben und für viele Entitäten auch gezeigt, dass Makrophagen sich in der unmittelbaren Tumorumgebung anreichern. Dies korreliert bei Gliomen mit dem Grad der Malignität [35,83]. Da Immunzellen normalerweise dazu dienen, körperfremde oder zum Beispiel durch Virusinfektion oder Entartung veränderte Zellen zu erkennen und zu bekämpfen, wirkt die unter anderem durch Tumorzellen bedingte Anlockung von Makrophagen zunächst paradox. Es konnte jedoch bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass Tumor-assoziierte Makrophagen auch Funktionen wahrnehmen können, die das Tumorwachstum auf vielfältigem Wege unterstützen können, statt es einzudämmen (Abb. 2-4).



**Abb. 2-4 Übersicht tumorsupportiver Funktionen von TAMs am Beispiel des Glioblastoms (modifiziert nach [84]).**

Es konnte zudem gezeigt werden, dass unterschiedliche Tumore verschiedene Verteilungsmuster der prozentualen Differenzierung in M1- oder M2-Phänotypenrichtung aufweisen. So wird in kolorektalen Tumoren häufiger eine Differenzierung in M1 Richtung beobachtet, während zum Beispiel Brustkrebs oder Hirntumore aufgrund ihres weniger pathogenassoziierten Kompartiments eine Ausprägung des M2-Expressionsmusters zu begünstigen scheinen [85]. Jedoch zeigt sich auch hier keine Statik, sondern ein fließender Übergang zwischen beiden Extremausprägungen der Phänotypen und eine jederzeit mögliche Anpassung an geänderte Umwelteinflüsse [85].

Die Faktoren, die zur Anreicherung der Makrophagen im Tumor führen, sind vielfältig. So konnte in Studien zum Beispiel die chemotaktische Wirkung von MCP-1 (CCL2), M-CSF (CSF1), GM-CSF (CSF2), CXCL12 und EGF auf Mikroglia/Makrophagen in verschiedenen Gliommodellen identifiziert werden [86–88].

Zudem wurde gezeigt, dass TAMs verschiedene Faktoren sezernieren, die die Invasivität von Tumoren steigern können. Im Kontext der GBM zählen dazu unter anderem IL-6, IL-10, IL-18, SDF-1, TGF- $\beta$ , Fibronectin, Vitronectin, CXCL12 und Matrixmetalloproteinasen, von denen MMP-2 und MMP-9 am besten untersucht sind [87,89–93]. Zytokine wie CXCL12 können zudem die Überlebenszeit der Tumorzellen steigern [94]. In anderen Entitäten konnte nachgewiesen werden, dass TAMs einen Einfluss auf die Metastasierung eines Tumors haben können und eine Inhibition von Rezeptoren der Makrophagen im Tumormodell zu einer Reduktion von Metastasen, zu einer Verlängerung der Überlebenszeit und sogar zu einer Verbesserung des Ansprechens auf Chemotherapie führen können [95,96].

Immundepressive Mediatoren wie PGE<sub>2</sub> hemmen weitergehende proinflammatorische Reaktionen anderer Zellen und unterstützen so das Tumorwachstum [35]. Eine weitere tumorsupportive Eigenschaft der TAMs ist eine immunsuppressive Wirkung. In Gliomen konnte hier eine gesteigerte TGF- $\beta$  Sekretion bei Mikroglia/Makrophagen gezeigt werden, die über eine Herunterregulation von CD80, CD86 und MHC II zu einer Reduktion der phagozytischen Aktivität führt [91,97]. Auch das als M2-Marker geltende IL-10 wirkt über die Inhibition von Antigenpräsentierenden Zellen und der Proliferation von T-Lymphozyten sowie die Induktion regulatorischer T-Zellen immunsuppressiv und damit tumorsupportiv [98,99].

Zudem können proangiogene Faktoren wie FGF, VEGF, PDGF, TGF- $\beta$  oder IL-8 durch TAMs freigesetzt werden und die vorhandene Gefäßstruktur modulieren, aber auch

eine Neovaskularisierung anregen. In beiden Fällen profitiert der Tumor durch die verbesserte Nährstoffversorgung [35,36,100]. Die Hochregulation proangiogener Faktoren wie VEGF und CXCL2 wurde im Mausmodell bereits gezeigt [34]. Zudem konnte für IL-6 und IL-8 nachgewiesen werden, dass diese Interleukine im Gliommodell von Mikroglia/Makrophagen exprimiert werden und die Angiogenese und das Tumorstadium fördern [101,102]. Sowohl IL-1 und IL-6 als auch TNF können zum Beispiel über eine VEGF-Hochregulation die Angiogenese steigern [103]. Der Einfluss auf die Überlebenszeit scheint sich jedoch nicht pauschalisieren zu lassen, da in bestimmten Tumormodellen auch eine positive Korrelation des Überlebens mit dem Auftreten von TAMs oder bestimmten Subpopulationen beobachtet werden konnte [36].

Die Bedeutung der TAMs im Glioblastom wird dadurch verdeutlicht, dass in einer Studie mittels CSF-1R Behandlung sowie zugesetztem GM-CSF und IFN- $\gamma$  die Depletion der TAMs verhindert und das Expressionsmuster in Richtung des M2-Typs verschoben werden konnte, was bei proneuralen Gliompatienten mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert war [104].

## **2.2.2 Neutrophile Granulozyten**

### **2.2.2.1 Allgemeine Übersicht**

Neutrophile Granulozyten sind Zellen des nativen Immunsystems und machen bis zu 70% der Leukozyten des Menschen aus. Sie werden auch als polymorphnukleäre Zellen (PMN) bezeichnet. Neutrophile Granulozyten entwickeln sich im Knochenmark über mehrere Differenzierungsschritte aus hämatopoetische Stammzellen. Nach einem Reifungsprozess gelangen diese schließlich in die Blutbahn und zirkulieren dort für ein bis fünf Tage. Wenn sie in dieser Zeit keinen Stimulus zum Beispiel aufgrund einer Inflammation erfahren, verlassen sie die Blutbahn wieder und werden nach Apoptose durch Makrophagen abgebaut [105,106]. Charakteristisch für die reifen Neutrophilen sind ihre segmentierten Zellkerne. In der Blutbahn sind sie in der Lage, über Produktion verschiedener Zytokine, T-Zellen zu rekrutieren und auch ihre eigene Freisetzung aus dem Knochenmark und Granulopoese zu fördern [106].

Granulozyten besitzen mehrere Granula und sekretorische Vesikel, in denen antimikrobielle Enzyme wie Elastase, Myeloperoxidase, Defensine, Cathelicidine und Matrixmetalloproteinasen enthalten sind. Inzwischen wurden viele verschiedene

Subpopulationen von Neutrophilen unterschieden, die sich anhand spezifischer Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen unterscheiden. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass Neutrophile, die das Knochenmark gerade erst verlassen haben, eine andere Signatur aufweisen als solche, die sich bereits seit sechs Stunden in der Zirkulation befinden. Auch jene neutrophile Granulozyten, die sich im Gewebe befinden, zeigen eine andere Variation von Rezeptorexpressionen, wobei spezifische Gewebe wie Lymphknoten (CCR7, LFA-1, CXCR4) und Milz (CD62L<sup>low</sup>, CD11b<sup>high</sup>, ICAM-1<sup>high</sup>) wieder spezifische Expressionsmuster zu initiieren scheinen. Ein CD49d<sup>high</sup>, CXCR4<sup>high</sup>, VEGFR1-Subtyp konnte mit gesteigerter Angiogenese-Aktivität assoziiert werden. Diese Modifikationen können unter anderem aufgrund von Faktoren wie bakterielle Infektion oder HIF-1 $\alpha$  als Indikator für Hypoxie, denen die Neutrophilen ausgesetzt sind, hervorgerufen werden [105–108].

Insgesamt werden Neutrophile als CD14<sup>-</sup> CD15<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD66b<sup>+</sup> definiert [109]. Durch sogenannte *Chemoattractants* wie fMLF, Zytokine mit ELR-Motiv wie CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 und IL-8 oder C5a werden die Neutrophilen einem Gradienten folgend zu ihrem Wirkort rekrutiert. Die Aktivierung der Neutrophilen kann unter anderem über N-Formyl-Peptide erfolgen, die ihre Wirkung über PRRs (*pattern recognition receptor*) wie FPR1 (*formyl peptide receptor 1*) entfalten. Zusätzlich exprimieren Neutrophile auch Rezeptoren der TLR-Familie, CLEC7A, CLEC2, RIG-I und MDA5, welche ebenfalls als PRR klassifiziert werden [37,110]. Neben ihrer altbekannten Tätigkeit des Erkennens und Phagozytierung von körperfremden Zellen wie Bakterien, wurde in den letzten Jahren sukzessive auch die Fähigkeit der Neutrophilen selbst zur Produktion von Zytokinen erforscht. Hierbei können sie nicht nur selbst eine große Anzahl dieser Immunmodulatoren für die systemische Antwort freisetzen und somit auf diese einwirken, sondern auch durch autokrine Rückkopplungsschleifen ihre eigene Aktivität beeinflussen [111–113].

Zudem kann eine Kommunikation mit anderen Zellen und sogar eine Verlängerung des Überlebens von Makrophagen initiiert werden. Dies wird vor allem über IL-1 $\beta$ , IL-6, G-CSF, GM-CSF und IFN- $\beta$  vermittelt [37,114]. Auch mit dendritischen Zellen, Lymphozyten und natürlichen Killerzellen erfolgt eine Interaktion. So können regulatorische T-Zellen und T<sub>H</sub>17-Zellen durch Ausschüttung von IL-8 Neutrophile anlocken.  $\gamma\delta$ T-Zellen induzieren in Neutrophilen wiederum die IL-8-Produktion und damit möglicherweise ihre eigene Rekrutierung, aber auch eine Hochregulation von CD64 und HLA-DR, was einem erhöhten Aktivierungsstatus entspricht und auch für

eine verlängerte Überlebenszeit sorgt. Insgesamt ergibt sich ein Netzwerk intensiver bidirektionaler Kommunikation, gegenseitiger Stimulierung und Rekrutierung [37].

Neutrophile sind in der Lage über PRMs (*pattern recognition molecules*) eine humorale Antwort des nativen Immunsystems zu bewirken. Diese PRMs umfassen Collectine, Ficoline und Pentraxine, welche antikörperähnliche Moleküle darstellen und mit mikrobiellen Strukturen interagieren. Ihre Wirkung wird vor allem über die Aktivierung des Komplementsystems vermittelt. Einige dieser Moleküle wie zum Beispiel M-Ficolin können jedoch auch Bestandteil der sogenannten „Extrazellulären Fallen“ (*neutrophil extracellular traps*; NET) sein [37]. Diese wurden 2004 erstmals beschrieben und scheinen bei vielen pathologischen Prozessen wie dem Entstehen von Thrombosen, vaskulärer Inflammation, sowie Erkrankungen der Lunge (TRALI, COPD), Autoimmunität und Tumoren in Zusammenhang zu stehen [107,115–117].

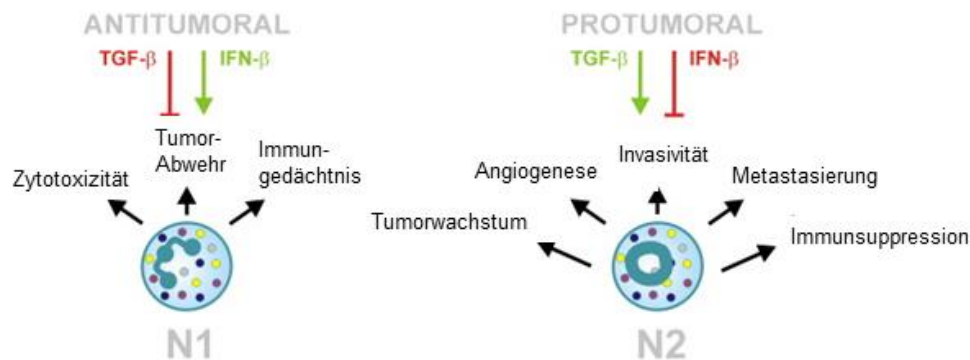
Inzwischen wurde die Funktion von neutrophilen Granulozyten in vielen weiteren Krankheitsbildern neben klassischen Entzündungsreaktionen untersucht. Auch in mehreren Tumormodellen wurde die Zugehörigkeit von Neutrophilen zum Tumorumfeld beschrieben und ihre Rolle in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren zunehmend diskutiert [37,118–120].

#### 2.2.2.2 Tumor-assoziierte Neutrophile (TAN)

Für viele Tumorentitäten wurde bereits beschrieben, dass bei Patienten eine Neutrophilie im Blut festgestellt werden konnte und dass diese auch bis auf wenige Ausnahmen mit einer eingeschränkten Prognose korreliert [36,121,122]. Dafür wird unter anderem eine Erhöhung von G-CSF verantwortlich gemacht [123]. In letzter Zeit sind jedoch auch die intratumoralen Neutrophilen in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt. Hier konnte für einige Mausmodelle die Beobachtung gemacht werden, dass Neutrophile sich in frühen Tumorstadien nur in dessen Peripherie anreichern und erst im Laufe des Tumorprogresses ins Zentrum des Tumors wandern [124].

Wie bereits für Makrophagen aufgrund unterschiedlicher Expressionsmuster von Molekülen, die eher einem pro- oder antiinflammatorischen Phänotyp zugeordnet werden können, beschrieben, wurde eine ähnliche Nomenklatur für Neutrophile eingeführt. Während der durch TGF- $\beta$ -Inhibition induzierbare N1-Typ eher proinflammatorisch und somit antitumoral wirksam ist, kann durch TGF- $\beta$ -Expression ein protumoraler N2-Typ induziert werden (Abb. 2-5).





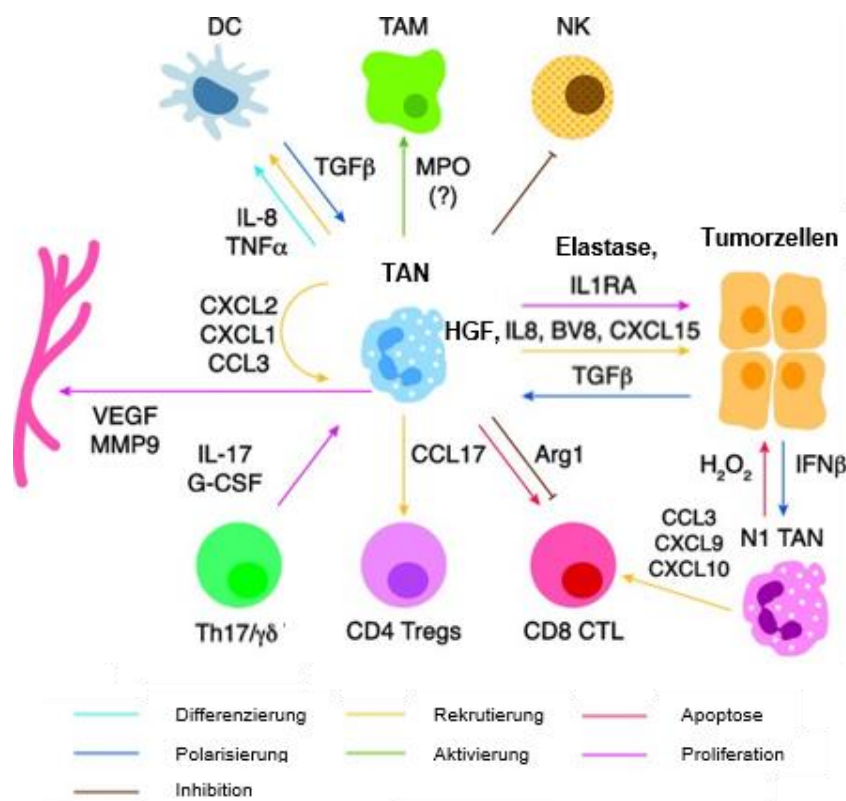
**Abb. 2-5 Übersicht der Neutrophilen-Funktion in N1/N2-Polarisierung** (modifiziert nach [38]). Ähnlich der M1/M2-Klassifikation von Makrophagen, weisen N1-Neutrophile antitumorale Charakteristika auf, während die N2-Polarisation tumorsupportive Eigenschaften zeigt.

Der N1-Typ erscheint dabei hypersegmentiert, durch höhere Level von TNF- $\alpha$ , CCL3, ICAM1, NO und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und niedrigere Expression von Arginase 1 mit gesteigerter Zytotoxizität assoziiert zu sein und vor allem in frühen Tumorstadien aufzutreten, was für eine Veränderung oder „Umprogrammierung“ während der Tumorprogression spricht [37,124]. Passend dazu konnte in Studien gezeigt werden, dass je nach Stadium des Tumors eine TGF- $\beta$ -Inhibition auch den gegenteiligen Effekt zeigen und die Tumorprogression fördern kann [125,126]. Eine eindeutige Differenzierung beider Phänotypen anhand eines Markerprofils ist zur Zeit jedoch noch nicht möglich [126,127].

Zudem konnte auch in Mausmodellen gezeigt werden, dass in bisher nicht durch Metastasen betroffenen Organen ein erhöhtes Aufkommen an Neutrophilen zu vermerken ist und diese zu einer gesteigerten Metastasierungsrate beitragen können [36].

Neben der direkten Interaktion von Tumorzellen und TANs können diese auch mit anderen Immunzellen kommunizieren. Hervorzuheben ist hierbei unter anderen die Sekretion von CCL17 aus TANs, die zur Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen in den Tumor führt und wiederum zu einem immunsuppressiven Tumormilieu beiträgt [36]. Im Glioma-Mausmodell konnte eine erhöhte Neutrophilenfraktion im Tumor mit einer gesteigerten Resistenz gegen anti-VEGF-Therapien korreliert werden. Dieser Mechanismus wurde auf Neutrophilen-induzierte S100A4-Überexpression der

Tumorzellen zurückgeführt [40]. Auch die direkte VEGF-A-Produktion durch neutrophile Granulozyten kann *in vivo* über eine Hochregulation von CXCL1 zur Angiogenese beitragen. In einem Xenograft-Modell der Maus konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Verfügbarkeit von G-CSF eine erhöhte Expression von BV8 (Prokineticin 2) bei Neutrophilen hervorruft und dies zu vermehrter angiogener Aktivität im Tumor beiträgt [37,128] (Abb. 2-6).



**Abb. 2-6** Ausschnitt der vielfältigen Interaktionen von TANs mit Tumorzellen und anderen Immunzellen (modifiziert nach [129]).

Die Neutrophilen-Depletion wurde dabei häufig als Kontrollmechanismus eingesetzt und zeigte eine Reduktion der zuvor beobachteten Effekte sowie eine Reduktion der Angiogenese, des Tumorwachstums und der Metastasierungsrate in verschiedenen Tumormodellen. Es wird jedoch gleichzeitig darauf hingewiesen, dass die meisten Erkenntnisse im Tiermodell gewonnen wurden und die Übertragung auf das humane System nur eingeschränkt erfolgen kann [36].

Bei all den verschiedenen Ansätzen, Tumorentitäten und Modellen zeichnet sich bereits jetzt ein hochkomplexes Interaktions-Netzwerk der TANs mit den Tumorzellen und anderen Zellen der Tumorumgebung ab.

### 2.2.3 Fragestellung

Trotz intensiver Bemühungen und vielen Fortschritten sowohl in der Tumorforschung als auch im Feld der Immunologie ist es bisher nicht gelungen, einen kurativen Therapieansatz für Glioblastom-Patienten zu finden. Neben den eigentlichen Tumorzellen rücken jedoch die Zellen im Umfeld des Tumors, das sogenannte *Microenvironment*, zunehmend in den Fokus und es wird klar, dass eine Bekämpfung der Tumorzellen allein, ohne die Kenntnis des komplexen Netzwerks von Signalwegen und gegenseitiger Zellinteraktion, kaum möglich ist. Initial vielversprechende Therapieansätze wie Blockaden von Angiogenese-Signalen oder Chemotherapie blieben ohne den erwünschten Erfolg oder hinter den Erwartungen zurück. Es konnten in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von möglichen Interaktionen und Signalkaskaden aufgedeckt werden, die zur Tumorprogression beitragen und diese sowie die Metastasierung beschleunigen. Jedoch sind viele Kenntnisse der Interaktion von Immunzellen und Tumor in verschiedenen Tumormodellen gewonnen worden, die sich nicht gänzlich kongruent auf das immunprivilegierte Gewebe des Zentralnervensystems übertragen lassen. Zum anderen entstammen viele Kenntnisse über Interaktionen *in vitro* Experimenten oder Tiermodellen, was zu berechtigter Vorsicht bei der direkten Übertragung der Ergebnisse ins humane System führt.

In unserer Arbeitsgruppe wurde in den letzten Jahren die Auswirkung der Interaktion von Mikrogliazellen auf die Angiogenese und der damit verbundenen Tumorprogression im Glioblastom-Mausmodell untersucht. Es konnten Moleküle wie CXCL2, IL-8 und CD13 identifiziert werden, die angiogenes Potenzial aufwiesen und alternative Signalwege darstellen, die von klassischen Angiogenese-Molekülen wie VEGF weitgehend unabhängig agieren können und somit auch einer VEGF-Blockade entgehen können [34]. Inwiefern Mikroglia/Makrophagen diese Moleküle auch im humanen Glioblastom exprimieren und welchen Einfluss dies auf die Gefäßstruktur im Tumorgewebe hat, war bisher unklar. Auch das angiogene Expressionsprofil von Tumor-assoziierten Neutrophilen im humanen Glioblastomgewebe war bisher kaum erforscht.

Ziel dieser Arbeit war es, über die Analyse von direkt postoperativ prozessierten Gewebeproben von Glioblastom-, Astrozytom<sup>o</sup>III- und Epilepsiepatienten weitere Einblicke in die Komposition der myeloiden Zellfraktion im humanen Glioblastom zu gewinnen. Durch die Charakterisierung dieser Zellen, ihres Aktivierungsstatus und der

proangiogenen Expressionsprofile sollte ein besseres Verständnis für die tumorsupportiven Eigenschaften der myeloiden Zellen der Tumormikroumgebung des Glioblastoms gewonnen werden. Zudem sollten die gefundenen Unterschiede in den proangiogenen Faktorexpressionsprofilen mit der Gefäßstruktur und der Assoziation mit den myeloiden Zellen korreliert werden, um weitere Hinweise auf die Bedeutung der myeloiden Zellpopulationen für die Tumorprogression zu gewinnen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Aufstellung der verwendeten Geräte, Materialien und Software

Tab. 3-1 Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
FACS Canto II	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axio Observer Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Inkubator Heraeus BBD620	Thermo Fisher Scientific
Kryostat HM 650	Microm International GmbH (Thermo Fisher Scientific)
Magnetrührer MSH basic mit Heizung (Yellow Line)	IKA (Janke & Kunkel)
Microplate Reader Tecan Infinite®200 PRO	Tecan Trading AG
Neubauer Zählkammer	LO Laboroptik GmbH
PCR-Cycler T-Gradient	Biometra GmbH
Sicherheitswerkbank HeraSafe	Thermo Fisher Scientific
ThermoMixer comfort	Eppendorf AG
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wippschüttler „Rocking Shaker“	NeoLab
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific

Tab. 3-2 Übersicht über die verwendeten Materialien

Materialien	Hersteller
Cryotube CryoPure (1,5 ml)	Sarstedt
DAKO Fettstift	DAKO
Kryostat Objektträger SuperFrost Plus	R. Langenbrinck GmbH
MACS® magnetische Säulen (LS, MS)	Miltenyi Biotec
MACS® Separator	Miltenyi Biotec
Pipetten (verschiedene Größen)	Eppendorf
Pre-Separation-Filter (30 µm)	Miltenyi Biotec
Sterile Pipetten-Filter (verschiedene Größen)	Merck Millipore

Tab. 3-3 Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Inhaltsstoff
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	2-Mercaptoethanol
CD11b MicroBeads	Miltenyi Biotec	An monoklonale Ratte anti-human CD11b-Antikörper gekoppelte MicroBeads, stabilisiert in 0,05% Natriumlösung
DAPI	Sigma-Aldrich	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Gibco®	Hoher Glukose-Anteil, L-Glutamin,

		Pyruvat, Phenolrot
DNA Ladder (QuickLoad 1kb)	NewEngland BioLabs GmbH	DNA
Ethanol	Merck Millipore	Ethanol
FcR Blocking reagent human	Miltenyi Biotec	Gelöst in Stabilisator und 0,05% Natriumazid
HBSS(+)	Biochrom AG	Hank Salt Solution mit Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>
HBSS(-)	Biochrom AG	Hank Salt Solution ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>
Matrigel™	BD Biosciences	Basis Membran Matrix
Methanol	Merck Millipore	Methanol
Proteinase K	Sigma-Aldrich	Proteinase, gewonnen aus dem Schlauchpilz Tritirachium album
RNAseZAP™	Invitrogen	Enthält Detergent 66
Triton X-100	Sigma-Aldrich	t-Oct-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>x</sub> OH

Tab. 3-4 Übersicht über die verwendeten vorbereiteten Lösungen

Bezeichnung	Hersteller	Inhaltsstoff	Zusammensetzung
Antigen Retrieval Solution Universal (ARS)	R&D Systems	Lt. Hersteller 3 verschiedene ARS Komponenten	Vor Nutzung: Verdünnung 1/10 in destilliertem Wasser
Brefeldin A	LIFE TECHNOLOGIES	Brefeldin A, Zusatzstoff Methanol	Vor Nutzung: Verdünnung 1/1000 in DMEM vor Verwendung
BSA 0,5%	Sigma-Aldrich	Albumin aus Rinderserum (BSA)	5 g BSA auf 1 l PBS
Casein 0,5%	Sigma-Aldrich	Casein (Protein aus Kuhmilch)	5 g Casein auf 1 l PBS
Casein 1%	Sigma-Aldrich	Casein (Protein aus Kuhmilch)	10 g Casein auf 1 l PBS
FCS 10%	PAA Laboratories GmbH	Fetales Kälberserum	10 g FCS auf 100 ml DMEM
Gelatine 2%	Sigma-Aldrich	Kaltwasser-Fischhaut	2 g Gelatine auf 1 l destilliertem Wasser
PBS	Gibco Invitrogen™	Phosphate buffered saline	2 Tabletten PBS auf 1 l Millipore®-Wasser
PFA 4%	Sigma-Aldrich	Paraformaldehyd	40 g PFA auf 1 l PBS
Saccharose (10%, 20%, 30%)	Roth	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	10 g/20 g/30 g Saccharose in 100 ml PBS
Saponin 0,5%	Sigma-Aldrich	Sapogenin	5 g Sapogenin auf 1 l BSA 0,5%

Tab. 3-5 Übersicht über die verwendeten Hersteller-Kits

Bezeichnung	Hersteller	Inhalt
Papain Neuronal Tissue Dissociation Kit (P)	Miltenyi Biotec	Enzym P, Puffer X (steril), Puffer Y (steril), Enzym A, Puffer A
PureLink™ RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific	Lyse-Puffer, Wasch-Puffer I, Wasch-Puffer II, RNase-freies Wasser, Spin Cartridge mit Collection Tube; Collection Tube, Recovery Tube
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen	gDNA Wipeout Puffer, Quantiscript Reverse Transkriptase, Quantiscript RT Puffer, RT Primer Mix
SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)	TAKARA BIO Inc	SYBRPremix Ex Taq (Tli RNaseH Plus), ROX Referenz Farbstoff, ROX Referenz Farbstoff II

Tab. 3-6 Auflistung der verwendeten Software

Programm	Hersteller	Verwendung
AxioVision 4	Carl Zeiss Microscopy	Aufnahme von Mehrkanal-Immunfluoreszenzbildern
Excel 2019	Microsoft	Vorbereitung zur Analyse der Daten
FACSDiva™	BD Biosciences	Aufnahme der FACS-Daten
FlowJo 7 und 10	Tree Star Inc., seit 2017 BD	Analyse der FACS-Daten
GraphPad Prism 8	GraphPad Software	Statistische Auswertung und Erstellung der Graphen
ImageJ	Open source Software	Auswertung und Bearbeitung der Immunfluoreszenzaufnahmen
Magellan™	TECAN Trading AG	Überprüfung von RNA- und DNA-Qualität
Mendeley Referenzmanager	Mendeley Ltd.	Management von Referenzen
SDS 2.3 RQ Manager	Thermo Fisher Scientific	Auswertung der Realtime-Daten
2100 Expert Software	Agilent	Qualitätskontrolle der RNA und DNA

### 3.2 Humane Gewebeproben

Für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente wurden Gewebeproben von 65 Patienten gewonnen, die sich in den Jahren 2013 bis 2014

einer neurochirurgischen Operation an der Charité - Universitätsmedizin Berlin unterzogen. Das Vorgehen der Operation und das Ausmaß des Resektionsvolumens wurden dabei nicht beeinflusst. Alle Patienten gaben vor der Operation ihr schriftliches Einverständnis, dass im Rahmen der Operation gewonnenes Tumorgewebe für wissenschaftliche Zwecke verwendet werden durfte. Das Einverständnis der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin liegt unter der Antragsnummer EA4/065/13 vor.

Für alle Patienten wurde unabhängig von dieser Arbeit ein histopathologisches Gutachten erstellt. Erst nach Vorlage der endgültigen Diagnose konnte die Eingruppierung des Patienten in eine der Tumorgruppen oder die Kontrollgruppe der Epilepsiepatienten erfolgen. Patienten, deren histopathologische Begutachtung stark verändertes Gewebe im Rahmen einer zuvor erfolgten Strahlentherapie oder Entzündungsreaktion, kein Tumorgewebe, keine eindeutige Klassifikation oder keine der betrachteten Tumorentitäten zeigte, wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. So konnten letztendlich 30 Patienten in die Analysen einbezogen werden. Hiervon gehörten sechs Patienten zur Epilepsiepatienten-Gruppe, 18 waren GBM Patienten und in sechs Fällen bestätigte das histopathologische Gutachten die Diagnose Astrozytom °III. In zwei Fällen wurde hierbei eine mögliche oligodendrozytische Komponente beobachtet. Weitere Patientencharakteristika sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Für alle Analysen und Datenverarbeitungen wurden die Patienten anonymisiert.

#### **3.3 Prozessierung der Gewebeproben**

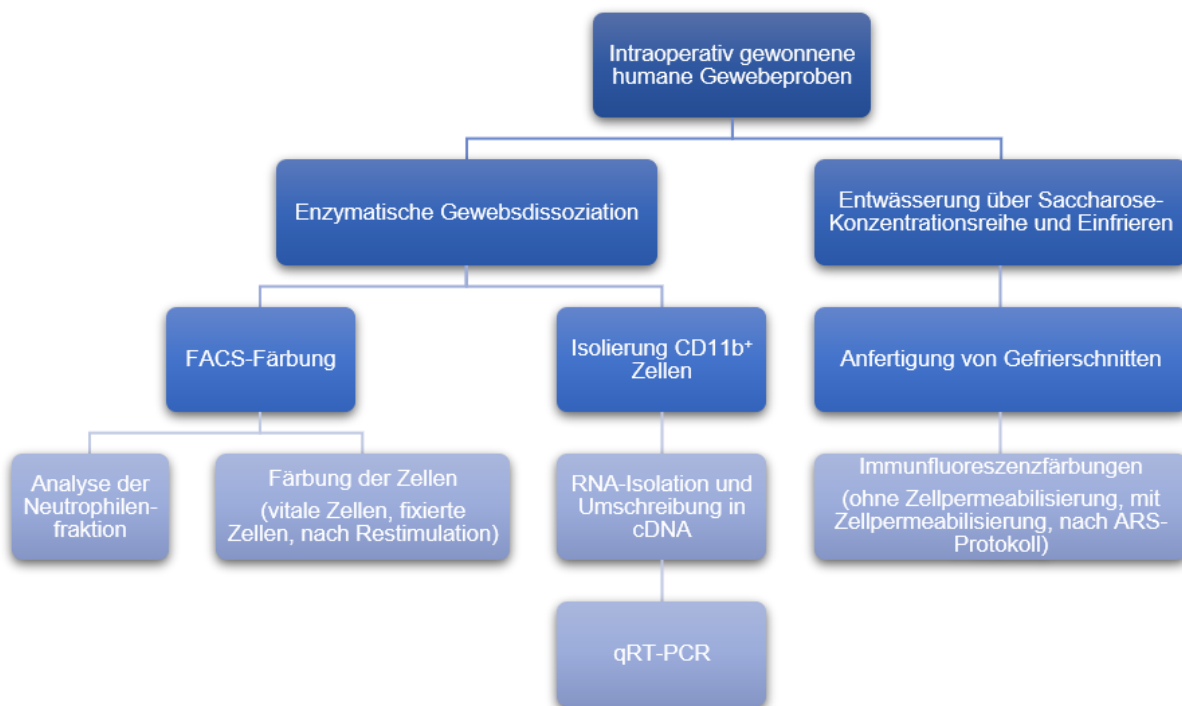
Die direkt im Operationssaal in Empfang genommenen Proben wurden in HBSS(-)-Puffer überführt. Um die Verunreinigung durch Blut in den frisch entnommenen Gewebestücken für die darauffolgenden Analysen so gering wie möglich zu halten, wurde eine Waschreihe mit Überführung der Probe in zwei weitere mit HBSS(-) gefüllte 50 ml Tubes durchgeführt. Es erfolgte der Transport in auf Eis gekühlter PBS-Lösung direkt ins Labor der Experimentellen Neurochirurgie.

Mit den ersten erhaltenen Gewebeproben wurde die Mikroglia-Isolierung für humanes Gewebe in unserem Labor etabliert. Anschließend wurden die erhaltenen Proben so aufgeteilt, dass die einzelnen Gewebestücke für die Mikroglia-Isolierung zwischen 250 und 400 mg wogen, da sich dies zuvor als ideale Menge für das Verfahren



herausgestellt hatte. Kleinere Gewebestücke wurden für die Immunfluoreszenzfärbungen weiter behandelt und eingefroren. Insgesamt wurden die Gewebeproben so aufgeteilt, dass die Mikroglia-Isolierung mit anschließender RNA-Isolierung sowie den Genexpressionsanalysen, die Prozessierung der Proben für die FACS-Analyse und die Aufarbeitung des Gewebes für Immunfluoreszenzfärbungen erfolgen konnte (Abb. 3-1).

Stand nicht genügend Gewebe für die Durchführung aller Analysemethoden zur Verfügung, wurde je nach Vorbehandlung des Patienten und klinischer Einschätzung des Operateurs für die Wahrscheinlichkeit eines vorliegenden Tumors der zu untersuchenden Entitäten zum sparsamen Umgang mit Ressourcen entweder die Mikroglia-Isolierung durchgeführt oder das Gewebe zur späteren Immunfluoreszenzfärbung, nach Bestätigung der Diagnose durch die Kollegen der Pathologie, eingefroren.



**Abb. 3-1 Übersicht über die verwendeten Methoden.**

### 3.4 Gewebsdissoziation und Isolierung myeloider Zellen

#### 3.4.1 Enzymatische Auftrennung des Gewebes

Zur Analyse des RNA-Expressionsprofils der myeloiden Zellen mussten diese zunächst aus dem Gewebeverbund gelöst werden. Dazu wurde im Rahmen dieser

Arbeit das *Neural Tissue Dissociation Kit P* (Miltenyi Biotec) benutzt, da es laut Herstellerinformation das für die Betrachtung von myeloiden Zellen notwendige Zelloberflächenmolekül CD11b bei der enzymatischen Gewebeaufspaltung konserviert. Die frisch aus der Operation gewonnenen Gewebeproben wurden wie bereits in Abschnitt 3.3 beschrieben aufgeteilt, abgewogen und für diesen Arbeitsprozess mithilfe eines Skalpellens so weit wie möglich mechanisch zerkleinert, um den folgenden Reagenzien eine möglichst große Angriffsfläche zu bieten. Anschließend wurde das zerkleinerte Gewebe mit HBSS(-)-Puffer gewaschen und in ein 15 ml Falcon®-Tube überführt. Es folgte die Zentrifugation (1300 rpm) für zwei Minuten und das Absaugen des Überstandes.

Nach Angaben des Herstellers erfolgte die Vorbereitung der Enzymmische 1 und 2. Enzymmix 1 wurde nach gründlicher Durchmischung für 10-15 Minuten bei 37°C im Wasserbad vorgewärmt. Nach Zugabe von 1950 µl des vorgewärmten Enzymmix 1 zu dem prozessierten Gewebe wurde eine Durchmischung von Gewebe und Enzymen durch Invertieren der Tubes durchgeführt. Während der darauffolgenden 15 Minuten Inkubationszeit bei 37°C im Wasserbad wurde das Invertieren alle fünf Minuten wiederholt. Anschließend wurde der zuvor vorbereitete Enzymmix 2 hinzugegeben. Es erfolgte erneut eine Durchmischung durch Invertieren des Tubes. Dann wurde das Gewebe über speziell vorbereitete, am Glasschliff abgerundete Pasteur-Pipetten in zwei Schritten erneut mechanisch zerkleinert. Nach zehnminütiger Inkubation bei 37°C und Invertierung alle fünf Minuten wurde die nun homogene Suspension über einen *Pre-Separation-Filter* (Miltenyi Biotec, 30 µm) erneut gefiltert und mit HBSS(+) und PBS/0,5% BSA gewaschen.

### 3.4.2 Isolierung myeloider Zellen

Nach erfolgter Dissoziation des Gewebes erfolgte die Zelltrennung mittels *Magnetic Cell Sorting* (MACS). Bei dieser Technik ist es möglich, Zielzellen mit spezifischen, gegen Oberflächenmarker der Zellen gerichtete Antikörper (*MicroBeads*) zu markieren. An diese Antikörper sind magnetische Mikropartikel gebunden, die weder die Proliferation noch die Lichtstreuung oder Fluoreszenz der Zellen beeinträchtigen [130]. Die so magnetisch markierten Zellen werden durch ebenfalls mit Magnetpartikeln beladene Säulen geleitet und im Magnetfeld gehalten, während Zellen ohne Markierung diese durchlaufen.

Pro Probe wurden der Suspension 450 µl PBS/0,5% BSA und 50 µl der CD11b *MicroBeads* zugesetzt und diese Lösung 15 Minuten bei 8°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Lauf über eine LS-Säule, die sich in einem zuvor gekühlten Magneten befand. Die durchgelaufene, nicht magnetisch markierte Negativ-Fraktion wurde verworfen und die Positiv-Fraktion mit den durch Oberflächenmarker magnetisch markierten Zellen nach Waschen ausgelöst, indem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und mittels PBS/0,5% BSA ausgespült wurde. Die so erhaltene Lösung wurde aufgefangen und das Prozedere mit einer kleineren MS-Säule wiederholt. War die Reinheit der erhaltenen Positivfraktion zufriedenstellend (>97%), konnte mit weiteren Verarbeitungsprozessen und Analysen fortgefahren werden. Andernfalls wurde die Sortierung wiederholt oder bei noch immer ungenügender Reinheit die Probe verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanblau (Verdünnung 1:10) gefärbt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt, um eine ausreichende Anzahl lebendiger Zellen sicherzustellen. Hierbei wurden die vier Großquadrate bei zehnfacher Vergrößerung im Lichtmikroskop ausgezählt, der Mittelwert gebildet und dann nachfolgender Formel die Zellzahl bestimmt:

Mittelwert<sub>ausgezählten Zellen</sub> x Verdünnungsfaktor x 10<sup>4</sup> = Zellen/ml der Zellsuspension.

### 3.5 RNA-Isolation und quantitative Realtime-PCR

#### 3.5.1 Gewebe-Aufarbeitung und RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wird eine hohe Reinheit der zu analysierenden Zellpopulation benötigt, andernfalls können Mischpopulationen das Analyseergebnis verfälschen. Diese Voraussetzung konnte nach Anwendung des MACS-Verfahrens erfüllt werden, da eine Reinheit der CD11b<sup>+</sup> Zellfraktion von >97% erreicht werden konnte. Die Isolation wurde mittels *PureLink RNA Mini Kit* (Invitrogen) nach entsprechendem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Proben wurden in Mikrozentrifugen-Tubes überführt und mit 0,2 ml des zuvor mit β-Mercaptoethanol vorbereiteten Lyse-Puffers versetzt. Nach ausgiebigem Vortexen wurde das Lysat für zwei Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (12000 x g). Der Überstand wurde dann in ein neues Tube überführt, 200 µl 100% Ethanol zugesetzt und erneut gevortext. Die Probe wurde dann in ein spezielles *Spin Cartridge* überführt und erneut zentrifugiert. Der durchgeflossene Probenanteil wurde entfernt. Im Folgenden wurden drei Waschschriffe unter Verwendung von Wasch-Puffer I und II durchgeführt, bei denen

jeweils nach Zentrifugation der Durchfluss verworfen wurde. Zuletzt wurde der *Spin Cartridge* zum Trocknen der Membran erneut zentrifugiert und in ein *Recovery Tube* überführt. Zur Elution der RNA wurden 100 µl RNase freies Wasser zugesetzt, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und die Proben erneut zentrifugiert. Im gesamten Arbeitsprozess musste auf zügiges Arbeiten ohne Verunreinigungen durch RNAsen geachtet werden, um die Qualität der erhaltenen RNA nicht zu gefährden. Deshalb wurde der Arbeitsplatz vor und während des Arbeitens auch mehrfach mittels RNaseZAP™ (Invitrogen) gereinigt.

Vor der Weiterverarbeitung wurde die RNA mittels TECAN auf ausreichende Konzentration hin kontrolliert und die Qualität mittels *Bioanalyzer* (Agilent) überprüft. Die Kontrolle mittels TECAN basiert auf Absorptions-Messungen und wird als Absorptions-Monochromator bezeichnet. Die Kalibrierung erfolgte auf eine Lösung ohne enthaltene RNA-Partikel (RNase freies Wasser). Die 2 µl Proben wurden in die auf der Platte vorgesehenen Vertiefungen pipettiert und anschließend die Absorption bei spezifischen Wellenlängen (260/280 nm) gemessen. Nach Verrechnung mit der Kalibrierungs-Probe kann so mit hoher Genauigkeit die Konzentration der RNA bestimmt werden.

Der *Bioanalyzer* zur Bestimmung der Reinheit der RNA verwendet die Methode der Kapillarelektrophorese: Über die Elektroden wird ein Strom angelegt und eine elektrophoretische Aufteilung der in den Vertiefungen enthaltenen RNA auf winzigstem Raum innerhalb einer Kapillare nach der Größe und Ladung der Teilchen vorgenommen. Die aufgenommenen Signale werden mit einem Standard - der *ladder* - verglichen und schließlich in Elektropherogrammen dargestellt. Die Fläche unter dem jeweiligen Graphen gibt dabei die Konzentration an.

Die Vorbereitung der vom Hersteller stammenden Stammlösungen von *ladder* und Gel Matrix wurden durch die Mitarbeiter der Neuropathologie vorgenommen und die fertig vorbehandelten Aliquots unter den jeweils vom Hersteller angegebenen Lagerungsbedingungen verwahrt und für die durchzuführende Analyse vorbereitet.

Nach ausführlicher Reinigung des Geräts wurden auf den Boden einer mit dunklem (G) gekennzeichnete Vertiefung eines RNA Nano Chips 9 µl des *Gel-Dye Mix* pipettiert. Unter langsamem, gleichmäßigem Druck wurde der Kolben der Spritze bis zum Einrasten abwärts bewegt und nach 30 Sekunden wieder entriegelt, so dass sich der Kolben der Spritze zurück bewegte.

In zwei markierte Vertiefungen wurden nun erneut 9 µl des *Gel-Dye Mix* pipettiert. Im

Folgenden wurden 5 µl des RNA 6000 Nano Marker in alle für Proben vorgesehene Vertiefungen und eine mit einem Leiter-Symbol markierte Vertiefung gegeben. Abschließend wurde 1µl der *ladder*-Lösung in das dafür vorgesehene *well* und jeweils 1 µl der zu untersuchenden RNA-Probe in jeweils eine der für Proben vorgesehenen Vertiefungen pipettiert.

Der so beladene Chip wurde nun für 60 Sekunden bei 2400 rpm geschüttelt. Anschließend wurde der Chip vorsichtig in den Bioanalyzer überführt und die Agilent 2100 Bioanalyzer Software gestartet.

#### 3.5.2 Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA aus der isolierten RNA erfolgte mithilfe der Reversen Transkriptase. Dieses Enzym wurde erstmals in Retroviren nachgewiesen, wozu auch das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) zählt. Anders als andere Polymerasen zählt die Reverse Transkriptase zu den RNA-abhängigen DNA-Polymerasen. Das bedeutet, sie ist dazu in der Lage, aus einem Einzelstrang RNA zunächst einen sogenannten Hybridstrang, bestehend aus einem RNA- und einem DNA-Strang, zu synthetisieren. Anschließend wird der RNA-Strang durch einen Teil des Enzyms abgebaut und der zweite DNA-Strang komplementär zum ersten synthetisiert.

Die Umschreibung der erhaltenen und in ihrer Qualität geprüften RNA erfolgte mithilfe des *QuantiTect® Reverse Transcription Kits* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Auch hierfür war die oben beschriebene Konzentrationsbestimmung der RNA mittels TECAN unabdingbar, da je nach Konzentration der RNA nach folgender Formel RNase freies Wasser hinzugefügt werden musste:

$$\text{RNase freies Wasser} = 12\mu\text{l} - (1000 \mu\text{l} / \text{gemessene Konzentration der RNA})$$

Die zu verwendende RNA, 2 µl gDNA Wipeout Puffer und RNase freies Wasser wurde zu einem Gesamtvolumen von 14 µl zusammen pipettiert. Dieses Gemisch wurde für zwei Minuten in einem Cycler bei 42°C inkubiert. Pro Probe wurden nun 4 µl eines RT Puffers, 1 µl des Primer Mixes und 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt. Es erfolgte eine erneute 30-minütige Inkubation im Cycler (42°C). Anschließend wurde die Probe für drei weitere Minuten auf 95°C erhitzt, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Anschließend wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt und die Quantität der

erhaltenen cDNA mittels TECAN gemessen.

### 3.5.3 Quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion

Bei der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ermöglicht der Zusatz von Fluoreszenzfarbstoffen über Messungen der Signale während der exponentiellen Phase der Vervielfältigung eine Quantifizierung der PCR-Produkte. Da die Messung der Fluoreszenzsignale während der nur einige Zyklen andauernden exponentiellen Phase der Reaktion - und nicht erst nach Abschluss der gesamten Reaktion - stattfindet, wird die Methode als *Realtime*-Verfahren bezeichnet. In dem in dieser Arbeit verwendeten *SYBR Premix Ex Taq Kit* (Takara Bio) ist als Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I enthalten. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet vorrangig an doppelsträngige DNA, absorbiert Licht der Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 494$  nm und emittiert Licht der Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 521$  nm. Ist SYBR Green I an RNA oder Einzelstrang-DNA gebunden, ist das ausgesendete Fluoreszenz-Signal deutlich schwächer.

Während der PCR werden in mehreren Zyklen unterschiedliche Phasen durchlaufen. Hierbei handelt es sich zunächst um eine Denaturierungs-Phase bei 95°C. Die doppelsträngige DNA wird voneinander gelöst, so dass die Bindungsstellen für Primer frei werden. Anschließend lagern sich diese an die nun einsträngige DNA an und die DNA-Polymerase beginnt mit der Neusynthese des komplementären Stranges. Die Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle werden dabei an die neu entstehende doppelsträngige DNA angelagert. Es folgt die Elongations-Phase, in der die Synthese des Komplementärstranges weiter fortschreitet.

Die für die verschiedenen zu analysierenden Gene benutzten Primer-Sequenzen (TIB MOLBIOL) sind in Tab. 3-7 dargestellt. Als interne Kontrolle wurde dabei das sogenannte *Housekeeping Gene 18S* verwendet, welches sich in Analysen humaner Immunzellen als stabilstes Vergleichsmolekül darstellte [131].

**Tab. 3-7 Übersicht der verwendeten Primer-Sequenzen** mit Quellenangabe. Der *VEGFR2*-Primer wurde von einer Mitarbeiterin unserer Arbeitsgruppe, Frau Dr. rer. nat. Kati Turkowski, mittels PrimerBlast designt.

<b>Primer</b>	<b>Sequenzen</b>	<b>Referenz</b>
<i>18S</i>	5'-GGCCCTGTAATTGGAATGAGTC-3' (forward) 5'-CCAAGATCCAACACTACGAGCTT-3' (reverse)	[132]
<i>CD13</i>	5'-CATCCATCAGAGATGGCAGAC-3' (forward) 5'-TGCTGAAGAGATCGTTCTGG-3' (reverse)	[133]
<i>CXCL2</i>	5'-CCCATGGTTAAGAAAATCATCG-3' (forward) 5'-CTTCAGGAACAGCCACCAAT-3' (reverse)	[134]
<i>CXCR2</i>	5'-CAAGACCCAAAAGGCAGAAG-3' (forward) 5'-TTTTCAAGGTTTCGTCCGTGT-3' (reverse)	[135]
<i>Hif-1<math>\alpha</math></i>	5'-CATCCATGTGACCATGAGG-3' (forward) 5'-TTCATATCCAGGCTGTGTCTG-3' (reverse)	[136]
<i>IL-10</i>	5'-CTTTAAGGGTTACCTGGGTTGC-3' (forward) 5'-CCTTGATGTCTGGGTCTTGGT-3' (reverse)	[137]
<i>IL-12a</i>	5'-CTCCTGGACCACCTCAGTTTG-3' (forward) 5'-GGTGAAGGCATGGGAACATT-3' (reverse)	[138]
<i>IL-12b</i>	5'-CGGTCATCTGCCGCAA-3' (forward) 5'-TGCCCATTCGCTCCAAGA-3' (reverse)	[138]
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	5'-AAACCTCTTCGAGGCACAAG-3' (forward) 5'-GTTTAGGGCCATCAGCTTCA-3' (reverse)	[139]
<i>IL-6</i>	5'-AGCCCTGAGAAAGGAGACATGTA-3' (forward) 5'-TCTGCCAGTGCCTCTTTGC-3' (reverse)	[140]
<i>IL-8</i>	5'-CTGAGAGTGATTGAGAGTGG-3' (forward) 5'-ACAACCCTCTGCACCCAGTT-3' (reverse)	[135]
<i>TGF-<math>\beta</math></i>	5'-TGGCGATACCTCAGCAACC-3' (forward) 5'-CTCGTGGATCCACTTCCA-3' (reverse)	[141]

<i>TNF<math>\alpha</math></i>	5'-GGAGAAGGGTGACCGACTCA-3' (forward) 5'-CTGCCCAGACTCGGCAA-3' (reverse)	[142]
<i>VEGF</i>	5'-TGCAGATTATGCGGATCAAACC-3' (forward) 5'-TGCATTCACATTTGTTGTGCTGTAG-3' (reverse)	[143]
<i>VEGFR1</i>	5'-CAGGCCCCAGTTTCTGCCATT-3' (forward) 5'-TTCCAGCTCAGCGTGGTCGTA-3' (reverse)	[144]
<i>VEGFR2</i>	5'-CATGTACGGTCTATGCCATTCCTC-3' (forward) 5'-TTGGCGCACTCTTCCTCCAAC-3' (reverse)	NM_002253.2

Die Primer wurden in RNase freiem Wasser gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur Durchführung der qRT-PCR wurden sie ebenso wie das *SYBR Premix Ex Taq Kit* zum Auftauen auf Eis gelagert, um eine zu schnelle Erwärmung zu verhindern. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I wurde dabei zu jeder Zeit vor Lichteinstrahlung geschützt. Anschließend wurde für jedes zu untersuchende Gen ein Mastermix hergestellt, der pro zu untersuchender Probe 12,5 µl SYBR Green I, 1,25 µl des vorwärts gerichteten Primers, 1,25 µl des rückwärts gerichteten Primers, 0,5 µl Rox *Reference Dye* und 4,5 µl ddH<sub>2</sub>O enthielt. Rox stellt hierbei einen Referenz-Farbstoff dar, der für Geräte benutzt wird, die Fluoreszenz-Signale zwischen den einzelnen Proben-Vertiefungen korrigieren.

20 µl dieses Mastermixes wurden nun in jede auf dieses Gen zu testende Proben-Vertiefung der 96-Well-Platte pipettiert, wobei für einen Patienten immer drei Analysen - sogenannte Triplets - durchgeführt wurden, um Messungenauigkeiten zu verringern und falsche Analysen, zum Beispiel aufgrund von Pipettierfehlern, zu erkennen. Anschließend wurden in jede Mastermix-enthaltende Vertiefung 5 µl der 1:20 verdünnten cDNA pipettiert. Die Platte wurde mit einem *Applied Biosystems® MicroAmp® Optical Adhesive Film* verschlossen und dieser an allen Seiten und zwischen den einzelnen Vertiefungen luftdicht angedrückt. Die Platte wurde für 60 Sekunden bei 1000 rpm zentrifugiert und anschließend in den vorbereiteten Thermocycler (PCR 7900 HAT FAST) gestellt. Auf jeder Platte wurde für jeden Patienten zusätzlich zu den zu analysierenden Genen auch das Referenzgen *18S* gemessen. Anschließend wurden die in Tabelle 3-8 dargestellten Phasen durchlaufen. Der Reaktionsverlauf wurde mit der SDS 2.4 Software aufgezeichnet, anschließend



exportiert und mittels Microsoft Excel ausgewertet.

**Tab. 3-8 Protokoll der quantitativen Realtime-PCR**

Ansatz	PCR-Ablauf
Initialisierung	95°C 30 Sekunden
Denaturierung	95°C 5 Sekunden
Hybridisierung und Elongation	60°C 30 Sekunden
Fluoreszenz-Analyse	95°C 15 Sekunden
Dissoziationskurvenanalyse	60°C 1 Minute
	95°C 15 Sekunden

Für die Analyse wurde die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode verwendet. Ct steht hierbei für *Crossing Point* und beschreibt die Anzahl an PCR-Zyklen, die benötigt werden, um mittels der Fluoreszenzmoleküle, die in die neu synthetisierten DNA-Doppelstränge eingearbeitet werden, ein bestimmtes, zuvor definiertes, Fluoreszenzniveau zu erreichen. Zur Quantifizierung wird der erhaltene Ct-Wert des Normalisierungsgens (18S) von dem Ct-Wert des zu analysierenden Gens abgezogen. Dies entspricht der  $\Delta\text{Ct}$ -Methode. Werden nun noch die so erhaltenen  $\Delta\text{Ct}$ -Werte einer Kontrollgruppe von den  $\Delta\text{Ct}$ -Werten einer Behandlungsgruppe abgezogen, spricht man von der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. In diesem Fall dienen die Tumorgruppen als „Behandlungsgruppe“ und die Epilepsiepatienten-Gruppe als „Kontrollgruppe“.

### 3.6 FACS-Analysen

#### 3.6.1 Grundlagen der Technik

Die Methode des *fluorescence activated cell sorting* (FACS) stellt eine spezifische Form der Durchflusszytometrie dar. Hierbei wird über eine Impedanzänderung beim Vorbeiströmen eines Teilchens dieses automatisch registriert und gezählt. Diese Technik wurde seit ihrer Erstbeschreibung vielseitig eingesetzt und weiterentwickelt, so dass heutzutage auch eine Markierung der zu charakterisierenden Zellen mit einem oder mehreren Antikörpern erfolgen kann, die wiederum an Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) gekoppelt sind. Diese Technik wurde zuerst von L.C. Herzenberg und

seinen Kollegen beschrieben [145]. Beim durch Unterdruck erzeugten Fluss der Zellsuspension durch das Messgerät werden die Zellen durch einen sich verengenden Trichter geleitet, so dass sie sich einzeln hintereinander reihen. In der Messkapillare kann die einzelne Zelle dann nicht nur anhand ihrer Impedanzänderung am Messpunkt gezählt, sondern auch von einer – je nach verwendetem Gerät – unterschiedlichen Anzahl und Art optischer Systeme wie Lasern analysiert werden. In Abhängigkeit der Zelleigenschaften wie Größe, Struktur der Zellmembran und intrazellulären Bestandteilen tritt der Effekt der Lichtstreuung auf, der durch Ablenkplatten aufgefangen, in ein elektrisches Signal umgewandelt und später rückgerechnet werden kann. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) gibt hierbei Aufschluss über die Zellgröße, während das Seitenstreulicht (SSC) Zellgranularität und -komplexität beschreibt. Die Fluoreszenz-Markierung wird durch Licht eines für sie typischen Wellenlängenbereichs angeregt und dabei Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Sinken diese wieder ab, werden Photonen emittiert, die ebenfalls detektiert werden können. Durch das Fehlen oder Vorhandensein verschiedener Oberflächenmoleküle werden unterschiedliche Zelltypen also an den fluoreszierenden Antikörper gekoppelt oder nicht. So ergibt sich eine spezifische Signatur für die in der Zellsuspension enthaltenen Zellen und eine genauere Klassifizierung der Zellen und ihrer Expressionsmuster ist möglich. Durch spezifische Vorbehandlungen können auch intrazelluläre Proteine durch eine vorübergehende Permeabilisierung der Zellmembran sichtbar gemacht werden.

#### **3.6.2 Färbung vitaler Zellen**

Ein Teil der nach enzymatischer Gewebdissoziation erhaltenen Zellsuspension (siehe Abschnitt 3.4.1) wurde verwendet, um eine Charakterisierung der noch vitalen Zellen durchzuführen. Dies erforderte im gesamten Prozess unverzügliches Arbeiten sowie eine unbedingte Kühlung der Zellen in allen und zwischen allen Arbeitsschritten, die dies erlaubten, um eine möglichst große Anzahl der Zellen vital zu erhalten. Vor der Färbung mit Antikörpern wurde zunächst bei 4°C über zehn Minuten eine Blockierung unspezifischer Reaktionen mittels 20 µl *FcR Blocking reagent* (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Nach erneutem Waschen mit PBS/0,5% BSA und Zentrifugation bei 4°C unter 2400 rpm für sieben Minuten wurde die Zellsuspension mit den entsprechenden Antikörpern (Tab. 3-9) und Isotypen (Tab. 3-10) für 20 Minuten im

Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach anschließendem erneutem Waschen mit PBS/0,5% BSA zur Vermeidung von Antikörper-Präzipitaten und Verunreinigung durch nicht gebundene Antikörper, Zentrifugation und Absaugen des Überstandes wurde die Probe in PBS/0,5% BSA aufgenommen und in die FACS-Tubes überführt. Direkt vor der Messung wurden 1 µl DAPI pro 100 µl Probenvolumen zugeführt, um eventuell vorkommende nicht mehr vitale Zellen aus den Analysen ausschließen zu können.

**Tab. 3-9 Übersicht der verwendeten FACS-Primärantikörper für vitale Zellen**

Primärantikörper	Donor-Spezies	Verdünnung	Hersteller	Isotypenkontrolle
CD11b-PE	Maus	1:5	BD	/
CD11b-FITC	Maus	1:10	Biolegend	/
CD45-APC	Maus	1:5	BD	/
HLA-ABC-PE	Maus	1:20	Biolegend	IgG2a
HLA-DR-PE	Maus	1:20	Biolegend	IgG2a
CD80-PE	Maus	1:20	Biolegend	IgG1
CD86-PE	Maus	1:20	Biolegend	IgG2b
CD14-FITC	Maus	1:5	Biolegend	IgG2a
CD14-PE	Maus	1:20	Biolegend	IgG1

**Tab. 3-10 Übersicht verwendeter Isotypen-Kontrollen der FACS-Färbung vitaler Zellen**

Isotyp-Kontrolle	Donor-Spezies	Kontrollierter Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
IgG1-PE	Maus	CD80	1:200	Biolegend
IgG1-PE	Maus	CD14	1:20	Biolegend
IgG2a-PE	Maus	HLA-ABC	1:200	Biolegend
IgG2a-PE	Maus	HLA-DR	1:200	Biolegend
IgG2a-FITC	Maus	CD14	1:25	Biolegend
IgG2b-PE	Maus	CD86	1:20	Biolegend

### 3.6.3 FACS-Färbung fixierter Zellen

Ein weiterer Teil der nach Behandlung mit dem *Neural Tissue Dissociation Kit P* (Miltenyi Biotec) erhaltenen Zellsuspension (siehe Punkt 3.4.1) wurde für Färbungen fixierter Zellen genutzt. Dies ist notwendig, um eine Quantifizierung der Expression zu einem bestimmten Zeitpunkt durchführen zu können oder aber intrazellulär liegende Zielstrukturen nach Permeabilisierung der Zellen zu analysieren. Dazu wurde die Zellsuspension zunächst mit PBS gewaschen um Proteine zu entfernen und eine gute Fixierung zu erreichen. Nach Zentrifugation (1200 rpm) wurde der Überstand entfernt. Die Fixierung erfolgte mittels 2 ml PFA (2%) je Probe über 20 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS/0,5% BSA und darauffolgender Zentrifugation (1200 rpm) wurden die Proben erneut in PBS/0,5% BSA suspendiert und konnten bis zur weiteren Verarbeitung einige Tage bei 8°C gelagert werden. Um teilweise oder ganz intrazellulär liegende Proteine messen zu können, musste zuvor die Zellmembran mittels Saponin für die fluoreszenzmarkierten Antikörper durchlässig gemacht werden, so dass alle folgenden Schritte in 0,5% Saponin als Träger- und Waschlösung durchgeführt wurden, da die Zellmembran sich nach Entfernung des Saponins sofort wieder schließt. Das Saponin wirkt hierbei über eine Löslichmachung des Cholesterols der Zellmembran, ohne die Zellstruktur gänzlich zu zerstören oder signifikante Auswirkungen auf die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen zu haben [146]. Es erfolgte ein neuer Waschschrift in 0,5% Saponin und die darauffolgende Zentrifugation für 7 Minuten bei 2400 rpm bei 4°C. Anschließend wurden die Überstände entfernt und die Zellpellets in 100 µl 0,5% Saponin mit entsprechendem Antikörper-Zusatz (Tab. 3-11) resuspendiert. Für VEGFR2 wurde *Mouse IgG1* (Biolegend; 1:20) als Isotypen-Kontrolle genutzt. Zur Differenzierung der zu betrachtenden Zellpopulation wurde auch hier die Färbung von CD11b und CD45 durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurde IgG-FITC (Kaninchen, 1:100, Dianova) für Iba1 verwendet. Nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur folgte ein erneutes Waschen und Zentrifugieren, bevor die Proben in 300 µl PBS/0,5% BSA aufgenommen und mittels FACS analysiert wurden.

**Tab. 3-11 Übersicht der verwendeten Primärantikörper für fixierte Zellen**

Primärantikörper	Donor-Spezies	Verdünnung	Hersteller
CD11b-PE	Maus	1:5	BD
CD11b-FITC	Maus	1:10	Biolegend
CD45-APC	Maus	1:5	BD
VEGFR2 (CD309) -Alexa Fluor® 647	Maus	1:20	Biolegend
Iba1	Kaninchen	1:100	Wako
CD66b-PE	Maus	1:20	Biolegend

### 3.6.4 FACS-Färbung nach Restimulation

Bei den Analysen von IL-10 und TNF- $\alpha$  wurde vor der Fixierung der Zellen eine Restimulation mittels Brefeldin A durchgeführt. Dieses Molekül wird von einigen Pilzarten hergestellt und hat eine toxische Wirkung auf viele Arten von Zellen: Der Golgi-Apparat, welcher für den Transport von zu sezernierenden Proteinen zuständig ist, zerfällt und es kommt somit zu einer Anreicherung der normalerweise zügig abgegebenen Proteine im Zellinneren [147]. Dieses Phänomen macht normalerweise schnell sezernierte Zytokine einer FACS-Analyse zugänglich, da sie in den Zellen verweilen und nicht sofort in die Umgebung der Zelle abgegeben werden, wo sie keinem spezifischen Zelltypen mehr zugeordnet werden können. Es wurden pro Probe 3 ml DMEM und 3  $\mu$ l Brefeldin A zugesetzt. Es erfolgte eine Inkubation über etwa fünf Stunden bei 37°C, bevor mit dem Protokoll für fixierte Zellen und dem Zusatz von Saponin fortgefahren wurde. Die verwendeten Antikörper, Isotypen und Konzentrationen können den Tabellen 3-12 und 3-13 entnommen werden.

**Tab. 3-12 Übersicht über die verwendeten Antikörper für FACS-Färbungen mit Restimulation**

Primärantikörper	Donor-Spezies	Verdünnung	Hersteller	Isotyp
CD11b-FITC	Maus	1:10	Biolegend	/

CD45-APC	Maus	1:5	BD	/
IL-10-PE	Ratte	1:5	BD	IgG2a
TNF-PE	Maus	1:5	BD	IgG1

**Tab. 3-13 Übersicht der Isotypen-Kontrolle für die FACS-Färbung nach Restimulation**

<b>Isotyp-Kontrolle</b>	<b>Donor-Spezies</b>	<b>Kontrollierter Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
IgG1-PE	Maus	TNF	1:5	BD
IgG2a-PE	Ratte	IL-10	1:5	BD

### 3.7 Immunfluoreszenz-Färbungen

#### 3.7.1 Vorbereitung des Gewebes und Färbeprotokoll ohne Zellpermeabilisierung

Nach initial durchgeführter Waschreihe der intraoperativ erhaltenen Gewebeproben (siehe Abschnitt 3.3) wurden diese aufgeteilt. Das Gewebe, das für Immunfluoreszenz-Färbungen genutzt werden sollte, wurde für 24 Stunden in 4% PFA-Lösung fixiert. PFA lagert sich hierbei in einem schnellen Prozess an die Proteine des Gewebes an. Es entstehen Imine, welche in der Lage sind, über Bindungen zu anderen reaktiven Gruppen der Peptide Brücken zu bilden. Dieser zweite Schritt verläuft langsamer und ist reversibel. Durch diese Vernetzung werden die Proteine in ihrer momentanen Struktur zwar verändert, jedoch auch in diesem Zustand stabilisiert. Änderungen des Umgebungsmilieus wie Änderung des pH-Wertes oder der Temperatur, die in der weiteren Prozessierung der Proben auftreten und zu einer Änderung der Sekundärstruktur der Proteine mit darauffolgender Denaturierung führen würden, werden so vorgebeugt [148].

Um die Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren zu minimieren, wurde das Gewebe anschließend mittels einer Saccharose-Reihe ansteigender Konzentration entwässert. Hierbei wurde die Probe zunächst bei 8°C in einer zehnpromzentigen Saccharose-Lösung belassen, bis sie als Zeichen einer Gewebesättigung in dem Tube abgesunken war. Das Prozedere wurde mit 20% und 30% Saccharose-Lösung wiederholt. Anschließend wurde das Gewebe mittels flüssigen Stickstoffs unter Einhaltung

entsprechender Sicherheitsstandards eingefroren. Hierbei wurde ein direkter Kontakt von flüssigem Stickstoff und Gewebe vermieden, indem die Probe auf ein dünnes Kunststoffschälchen gelegt wurde, das von dem flüssigen Stickstoff umspült wurde. Innerhalb von Sekunden wurde die Probe durch den  $-196^{\circ}\text{C}$  kalten Flüssigstickstoff gefroren und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Vorbereitung für Immunfluoreszenzfärbungen mussten zunächst  $10\ \mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte angefertigt werden. Hierzu wurden die entwässerten Proben aus dem Gefrierschrank entnommen und zunächst auf einem Mikrotom in 2% Gelatine eingebettet. Anschließend wurden an einem Kryostat (Microm HM 560) die Schnitte angefertigt und anschließend auf Objektträger (SuperFrost®Plus) aufgenommen. Die eingestellte Temperatur im Kryostat betrug zwischen  $-28^{\circ}\text{C}$  und  $-32^{\circ}\text{C}$ . Die erhaltenen  $10\ \mu\text{m}$  Schnitte wurden erneut bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Einige Phänomene, wie zum Beispiel die Akkumulation von Lipofuscin im humanen Hirngewebe, rufen unspezifische Autofluoreszenz hervor, die die Auswertung von Immunfluoreszenzbildern erschweren können. Aus diesem Grund wurden alle Gewebeschnitte vor Verwendung für Immunfluoreszenzfärbungen nach einem Autoimmunfluoreszenz-Inhibitions-Protokoll bearbeitet. Hierfür wurden die Schnitte über 30 Minuten langsam aufgetaut und zunächst fünf Minuten in 70% Ethanol getaucht. Anschließend wurden sie mit *Autofluorescence Eliminator Reagent* (Millipore) beträufelt bis die gesamte Oberfläche des Objektträgers gut bedeckt war und für weitere fünf Minuten in der Dunkelkammer inkubiert. Dann wurden die Objektträger drei Mal für jeweils eine Minute in 70% Ethanol gespült. Zur weiteren Vermeidung unspezifischer Reaktionen wurden die Objektträger für 30 Minuten in 1% Casein/PBS geblockt. Nach dem Trocknen wurde um die einzelnen Gewebeschnitte herum DAKO®-Fettstift aufgetragen, um zu verhindern, dass die im Folgenden aufgetragenen Antikörperlösungen verlaufen.

Anschließend wurde eine Primärantikörperlösung auf die einzelnen Schnitte gegeben. Die Antikörper und die zugehörigen verwendeten Sekundärantikörper sind in den Tabellen 3-14 und 3-15 dargestellt.

**Tab. 3-14 Übersicht der verwendeten Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen nach Protokoll ohne Zellpermeabilisierung**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Donor-Spezies</b>	<b>Dilution</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
Iba1	Kaninchen	1:250	Wako	DyLight488-gekoppeltes IgG
Iba1	Ziege	1:100	Abcam	Alexa Fluor®647-gekoppeltes IgG
CD31	Maus	1:50	R&D	Rhodamin-gekoppeltes IgG
TIE2	Kaninchen	1:100	Abcam	Fluorescein-gekoppeltes IgG

**Tab. 3-15 Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen nach Protokoll ohne Zellpermeabilisierung**

<b>Sekundär-antikörper</b>	<b>Donor-Spezies</b>	<b>Ziel-Spezies</b>	<b>Dilution</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ziel-Primär-antikörper</b>
DyLight488-gekoppeltes IgG	Esel	Kaninchen	1:200	Dianova	Iba1
Alexa Fluor®647-gekoppeltes IgG	Esel	Ziege	1:200	Dianova	Iba1
Rhodamin-gekoppeltes IgG	Esel	Maus	1:200	Dianova	CD31
Fluorescein-gekoppeltes IgG	Esel	Kaninchen	1:200	Dianova	TIE2

Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden unter Raumtemperatur und wurde in einer lichtundurchlässigen Feuchtkammer durchgeführt. Anschließend wurden die Antikörper abgeschüttelt und die Objektträger vier Mal über fünf Minuten in 0,5% Casein/PBS bei Raumtemperatur in einer Küvette unter ständiger Bewegung



gewaschen (Wippschüttler, 25 rpm). Es folgte eine eineinhalbstündige Inkubation der Sekundärantikörper, die ebenfalls im Dunkeln bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Auch hier wurden die Antikörper anschließend abgeschüttelt und es erfolgte das dreimalige Waschen mit PBS für jeweils fünf Minuten und erneutes dreimaliges Waschen mit *Aqua Bidest* für ebenfalls fünf Minuten. Zum Schutz der fluoreszierenden Antikörper wurde erneut unter Lichtausschluss gearbeitet. Vor Platzierung eines Deckplättchens wurden 1-2 Tropfen *DAPI Mounting medium* (DAKO®) auf jedem Schnitt verteilt, um die Zellkerne anzufärben.

### 3.7.2 Immunfluoreszenzfärbung bei Permeabilisierung mittels Methanol

Proangiogen wirkende Moleküle wie CXCL2, VEGF und HIF-1 $\alpha$  können sich intrazellulär befinden. Aus diesem Grund musste die Zellmembran der zu untersuchenden Zellen in diesen Fällen permeabilisiert werden, damit die fluoreszenzbeladenen Antikörper in diese eindringen und an die Ziel-Antigene binden konnten. Für die oben genannten Ziel-Moleküle erwies sich die Behandlung mit Methanol nach PFA-Fixierung am spezifischsten. Dafür wurden die entsprechenden Objektträger für 10 Minuten mit eiskaltem Methanol behandelt und für diese Zeit auch im Gefrierschrank bei -20°C gelagert. Anschließend wurden auch diese Schnitte für 30 Minuten in 1% Casein/PBS geblockt und nach dem oben beschriebenen Protokoll fortgefahren (Abschnitt 3.7.1). Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in den Tabellen 3-16 und 3-17 dargestellt.

**Tab. 3-16 Übersicht der verwendeten Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen nach Protokoll mit Zellpermeabilisierung mittels Methanol**

Primär-antikörper	Donor-Spezies	Dilution	Hersteller	Sekundärantikörper
Iba1	Ziege	1:100	Abcam	Alexa Fluor®647-gekoppeltes IgG
CD31	Maus	1:50	BD	Rhodamin-gekoppeltes IgG
CXCL2	Kaninchen	1:100	AbD Serotec	Fluorescein-gekoppeltes IgG

HIF-1 $\alpha$	Kaninchen	1:100	Abcam	Alexa Fluor®488-gekoppeltes IgG
VEGF	Kaninchen	1:100	Abcam	Fluorescein-gekoppeltes IgG
CD66b-PE	Maus	1:50	Biologend	/
CD13	Kaninchen	1:400	Abcam	Fluorescein-gekoppeltes IgG

**Tab. 3-17 Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen nach Protokoll mit Zellpermeabilisierung mittels Methanol**

<b>Sekundär-antikörper</b>	<b>Donor-Spezies</b>	<b>Ziel-Spezies</b>	<b>Dilution</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ziel-Primär-antikörper</b>
Alexa Fluor®647-gekoppeltes IgG	Esel	Ziege	1:200	Dianova	Iba1
Rhodamin-gekoppeltes IgG	Esel	Maus	1:200	Dianova	CD31
Fluorescein-gekoppeltes IgG	Esel	Kaninchen	1:200	Dianova	CD13, CXCL2, VEGF
Alexa Fluor®488-gekoppeltes IgG	Esel	Kaninchen	1:200	Dianova	HIF-1 $\alpha$

### 3.7.3 Immunfluoreszenzfärbung und Permeabilisierung bei *Antigen Retrieval*

Für andere Ziel-Moleküle wurde ebenfalls beschrieben, dass Färbungen durch vorangegangene Gewebepbehandlungen wie PFA-Fixierungen erschwert oder ohne weitere Prozessierung zu unspezifisch sein können. Aus diesem Grund wurde für die Färbung von IL8, CD13, CSF3 und CD163 ebenfalls eine zusätzliche Methode verwendet, um die Spezifität der durchgeführten Färbung zu erhöhen. Hierbei wurde eine Behandlung des Gewebes mittels *Antigen Retrieval Reagent (ARS) UNIVERSAL 10X* (R&D Systems) durchgeführt, um die Epitope der Ziel-Antigene freizulegen,

dadurch die Bindung der Antikörper zu erleichtern und unspezifische Reaktionen zu vermindern. Das ARS wurde hierbei mit ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:10 verdünnt und in eine Küvette gefüllt. Diese wurde in ein weiteres zu etwa einem Drittel mit Wasser gefülltes Zylinderglas gestellt, welches sich auf einer Heizplatte befand. Nun wurde das Wasserbad erhitzt und die Temperatur in der Küvette gemessen. Erreichte diese 94,5°C wurden die Objektträger jeweils für 15 Sekunden in die erhitzte ARS-Lösung getaucht und anschließend sofort mit der Blockung fortgefahren. Hierfür wurde zusätzlich Triton X-100 (Sigma-Aldrich) verwendet, um Proteine aus der Zellmembran herauszulösen und diese durchlässig zu machen. Zunächst wurden die Objektträger zweimalig über zehn Minuten in 0,5 %Casein/PBS mit 0,4% Triton X-100 gewaschen. Anschließend erfolgte das Blocken mittels 1% Casein/PBS mit 0,1% Triton X-100 über 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden mit den angegebenen Primärantikörper (Tab. 3-18) über Nacht bei 8°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden diese wieder entfernt, die Objektträger abgeklopft und vier Mal über fünf Minuten mit 0,5% Casein/PBS mit 0,1% Triton-X in Küvetten gewaschen. Die Fettstift-Umrandung wurde getrocknet und der entsprechende Sekundärantikörper (Tab. 3-19) aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug eineinhalb Stunden und wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt. Es folgte dreimaliges Waschen mittels 0,5% Casein/PBS mit 0,1% Triton-X unter Ausschluss von Licht. Anschließend wurden die Objektträger noch drei weitere Male in *Aqua Bidest* für jeweils fünf Minuten gewaschen. Auch dies geschah im Dunkeln. Vor Platzierung eines Deckplättchens wurden 1-2 Tropfen *DAPI Mounting medium* auf jeden Schnitt verteilt.

**Tab. 3-18 Übersicht der verwendeten Primärantikörper für das ARS-Protokoll**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Donor-Spezies</b>	<b>Dilution</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
Iba1	Kaninchen	1:250	Wako	DyLight488-gekoppeltes IgG
Iba1	Ziege	1:100	Abcam	Alexa Fluor®647-gekoppeltes IgG
IL-8	Ziege	1:50	Abcam	DyLight488-gekoppeltes IgG

CSF3	Kaninchen	1:100	Abcam	Fluorescin-gekoppeltes IgG
CSF3R	Kaninchen	1:100	GeneTex	Fluorescin-gekoppeltes IgG
CD163	Kaninchen	1:50	Abcam	Fluorescin-gekoppeltes IgG
CD66b-PE	Maus	1:50	Biolegend	/

**Tab. 3-19 Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper für das ARS-Protokoll**

<b>Sekundär-antikörper</b>	<b>Donor-Spezies</b>	<b>Ziel-Spezies</b>	<b>Dilution</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ziel-Primär-antikörper</b>
DyLight488-gekoppeltes IgG	Esel	Kaninchen	1:200	Dianova	Iba1
Alexa Fluor®647-gekoppeltes IgG	Esel	Ziege	1:200	Dianova	Iba1
Fluorescin-gekoppeltes IgG	Esel	Kaninchen	1:200	Dianova	CSF3, CSF3R, CD163
DyLight488-gekoppeltes IgG	Esel	Ziege	1:200	Dianova	IL-8

### 3.7.4 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen

Die Aufnahmen wurden mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (Zeiss Axio Observer Z1) durchgeführt. Die Fotos zum Auszählen von Zellen wurden in zwanzigfacher Vergrößerung aufgenommen, die Übersichtsaufnahmen bei zehnfacher Vergrößerung. Für die quantitativen Auswertungen wurden pro Schnitt mindestens neun Bilder in einem mäanderförmigen Muster aufgenommen, um Überlappungen zu vermeiden und den gesamten Schnitt in die Auswertung miteinzubeziehen. Für jeden Patienten wurden mindestens zwei Schnitte in die Auszahlungen eingeschlossen, wobei darauf geachtet wurde, auch diese aus nicht nebeneinander liegenden Anteilen

des ursprünglichen Gewebestücks auszuwählen, um den Einfluss möglicher regionaler Besonderheiten innerhalb des Tumors in der Auswertung zu verringern. Zur Analyse der aufgenommenen Bilder wurde die Software ImageJ verwendet.

### 3.8 Kaplan-Meier Überlebenskurven

Aus der frei verfügbaren Online-Datenbank *Cbioportal* (<http://www.cbioportal.org/>) des Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSK) in New York wurden Überlebensdaten der *TCGA Provisional* Studie über Glioblastoma multiforme extrahiert [149,150]. Der Schwellenwert der Über- und Unterexpression wurde dabei auf 0,5 gesetzt. Zudem wurden die extrahierten Daten der TCGA-Studie genutzt, um sie in das *Online-Tool* CIBERSORT (<https://cibersort.stanford.edu/>) der Stanford Universität einzupflegen [151]. Mithilfe des dort hinterlegten Datensatzes „LM22“, der ein Genexpressionsmuster für Immunzellen darstellt, ist es mittels dieses Online-Programms möglich, aus eigenen oder verfügbaren Datenbank-Datensätzen, die Genexpressionsanalysen im geforderten Dateiformat enthalten, Rückrechnungen durchzuführen und so Rückschlüsse auf den Anteil der zu untersuchenden Immunzellen im ganzen Tumorgewebe zu ziehen. Die im LM22-Datensatz geforderten Gene wurden also bei allen Patienten der TCGA-Provisional Studie gesucht. Bei 521 Patienten konnten genug Übereinstimmungen im U133 *microarray* gefunden werden, um sie in weitere Analysen einzuschließen. Der Datensatz wurde heruntergeladen und in Excel so formatiert, wie das Benutzerhandbuch der Website CIBERSORT es vorgibt. Anschließend wurden die Daten dort hochgeladen und die entstandenen Immunzell-Expressionsmuster über die Patientennummer der TCGA-Studie den zuvor ebenfalls heruntergeladenen Überlebensdaten zugeordnet. Mittels GraphPad Prism wurden dann die Kaplan-Meier-Kurven erstellt.

### 3.9 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mittels der Software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego) durchgeführt. Dabei wurden Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen der unterschiedlichen Patientengruppen errechnet und angegeben. Hierbei wurden zur statistischen Analyse je nach Indikation der einfaktorielles ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur, ein gepaarter oder ein ungepaarter *Student's t*-Test durchgeführt. Für die Auswertung nominaler Daten wurde

der exakte Fisher-Test mit Erweiterung auf Kontingenztabellen mit  $r \times c$  Spalten und Reihen genutzt. Hierzu wurde das Statistikprogramm *R* und die in ihm hinterlegten Formeln und Algorithmen [152] verwendet, da in GraphPad Prism 8 nur der Fisher-Test für 2x2-Tabellen hinterlegt ist. Der verwendete Code ist dabei an den im Beispiel des Benutzermanuals von *R* (Version 3.6.2; 2019-12-12) hinterlegten Code angelehnt und auf die entsprechenden zu analysierenden Daten angepasst worden.

Die entsprechenden verwendeten Tests sind in den Legenden der Abbildungen hinterlegt. Die Signifikanzniveaus sind wie in Tabelle 3-20 zu entnehmen angegeben.

**Tab. 3-20 Darstellung der Signifikanzniveaus**

<b><i>p</i>-Wert</b>	<b>Signifikanzniveau</b>
$p > 0,05$	nicht signifikant; <i>ns</i>
$p \leq 0,05$	signifikant; *
$p \leq 0,01$	sehr signifikant; **
$p \leq 0,001$	hoch signifikant; ***

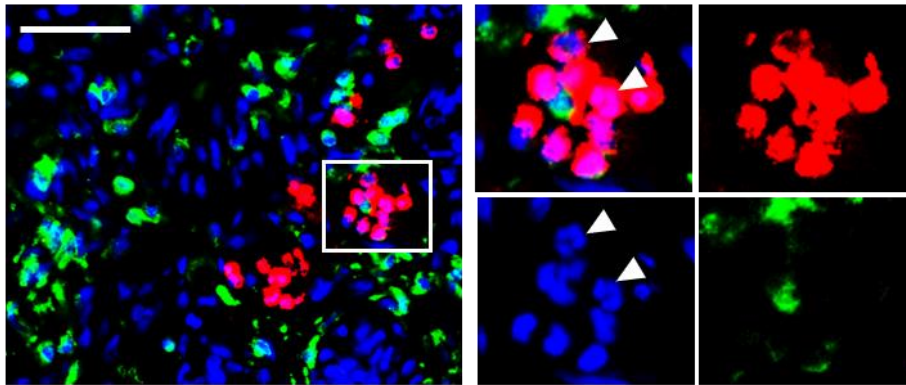
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Differenzierung der myeloiden Zellen

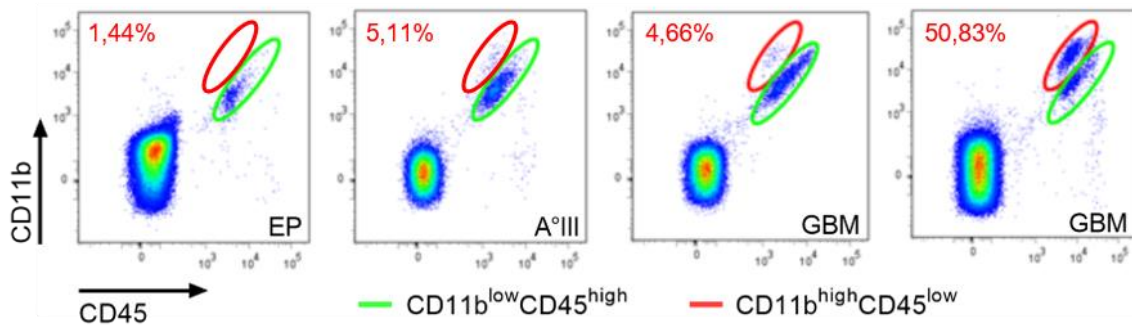
#### 4.1.1 Distinktion von Mikroglia/Makrophagen und Neutrophilen

Da neben Mikroglia/Makrophagen auch neutrophile Granulozyten im Glioblastom-Gewebe beschrieben worden waren und diese aufgrund ihrer gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle ebenfalls CD11b und CD45 exprimieren, wurde eine Färbung der vorbereiteten Gefrierschnitte mit Iba1 als gemeinsamer Marker für Mikroglia/Makrophagen, DAPI und CD66b als Neutrophilenmarker durchgeführt [48]. Hier zeigte sich eine Anfärbung von kleinen, runden Zellen mit CD66b, deren DAPI-Kernfärbung dem charakteristischen Bild eines segmentierten Zellkernes entsprach, wie sie in der Histologie beschrieben werden (Abb. 4-1 A). Mikroglia/Makrophagen zeigten eine deutliche Iba1-Färbung, waren CD66b negativ und wiesen deutlich differente Zellmorphologien auf. Da beide Zellpopulationen CD11b und CD45 exprimieren, erfolgte nach Homogenisierung der intraoperativ erhaltenen Gewebeproben eine Färbung auf diese beiden Oberflächenmoleküle mit anschließender Analyse der Proben im FACS. Hierbei zeigte sich, dass im Gewebe der GBM zwei voneinander abgrenzbare CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellfraktionen auftraten. Diese können, miteinander verglichen, als CD11b<sup>high</sup>CD45<sup>low</sup> und CD11b<sup>low</sup>CD45<sup>high</sup> bezeichnet werden. Die CD11b<sup>low</sup>CD45<sup>high</sup>-Population war auch im Epilepsiepatientengewebe und in den Astrozytom °III-Gewebeproben sichtbar, während die CD11b<sup>high</sup>CD45<sup>low</sup>-Fraktion in höherem Prozentsatz in den GBM-Proben auftrat und dort eine deutliche Diversität aufwies (Abb. 4-1 B). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzintensität von CD11b und CD45 zwischen beiden Zellpopulationen, so dass die Bezeichnung der Gruppen bestätigt werden konnte (Abb. 4-1 C, D). Zur Unterscheidung der beiden Populationen der myeloiden Zellen wurde im FACS eine Färbung von CD66b und Iba1 durchgeführt. Die CD11b<sup>high</sup>CD45<sup>low</sup>-Fraktion zeigte dabei eine Färbung für CD66b, während die CD11b<sup>low</sup>CD45<sup>high</sup>-Population durch CD66b nicht angefärbt wurde. Im Gegenzug zeigten die CD11b<sup>low</sup>CD45<sup>high</sup>-Zellen eine Färbung für Iba1, während die CD11b<sup>high</sup>CD45<sup>low</sup>-Population Iba1<sup>-</sup> war (Abb. 4-1 E). Die Mikroglia/Makrophagen entsprachen also der CD11b<sup>low</sup>CD45<sup>high</sup>-Fraktion, während die Granulozyten als CD11b<sup>high</sup>CD45<sup>low</sup> charakterisiert wurden.

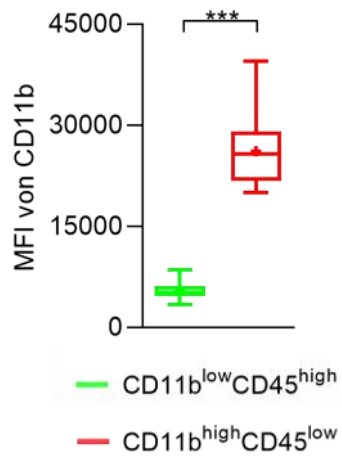
A



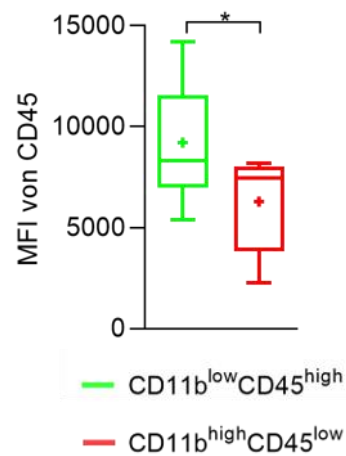
B



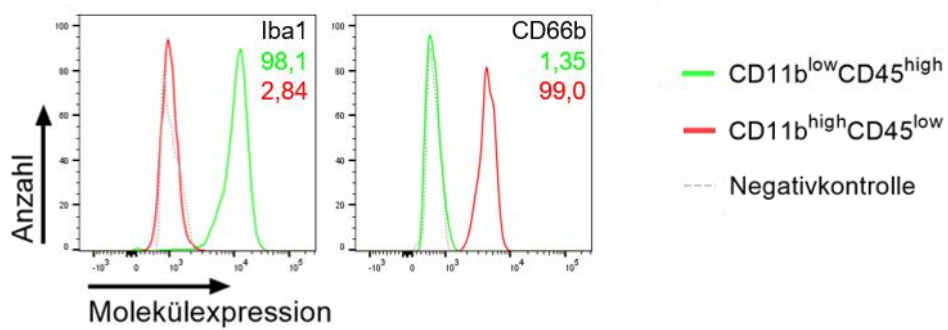
C



D



E

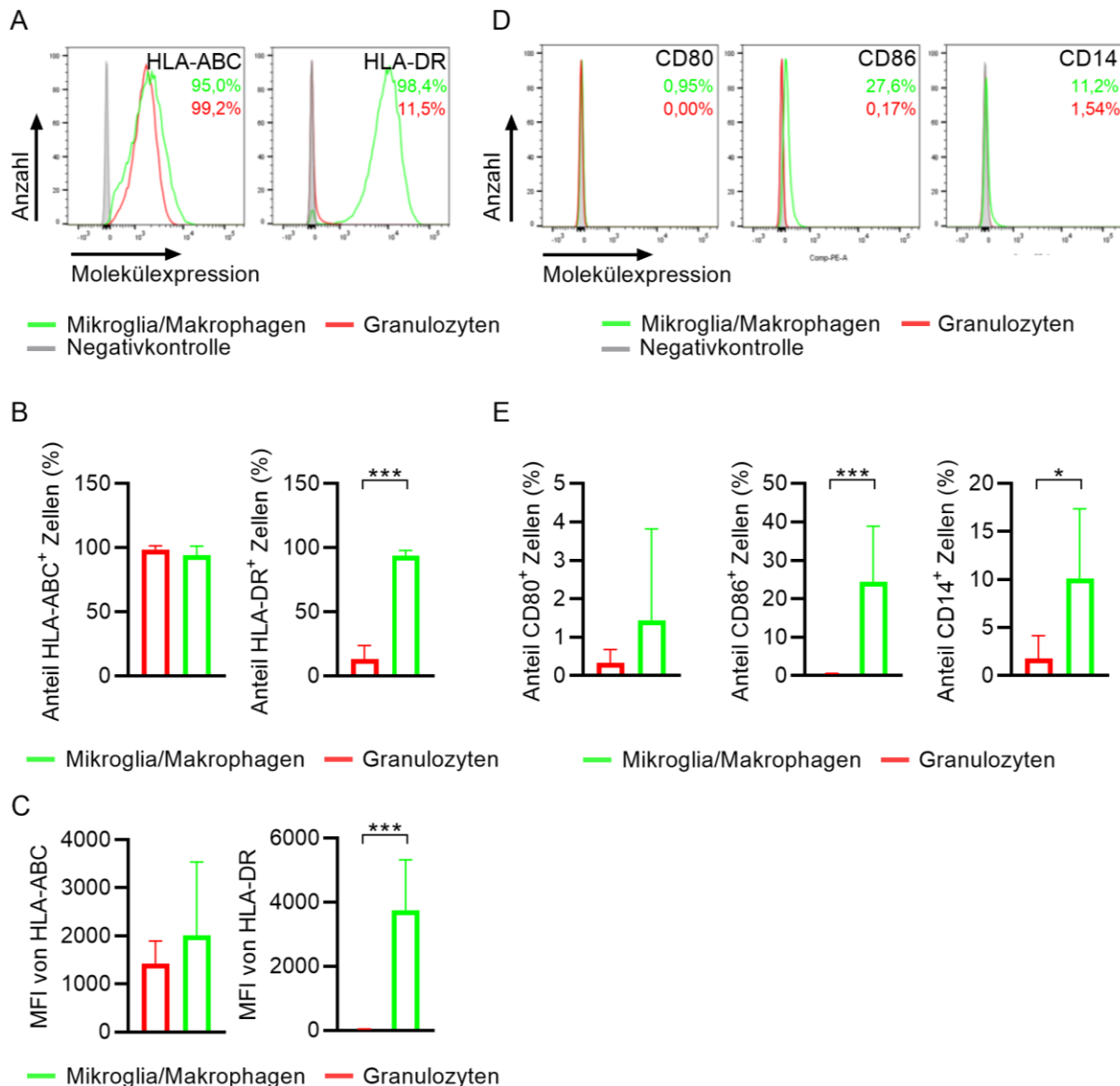




**Abb. 4-1 Differenzierung der myeloiden Zellpopulationen** (A) In der Immunfluoreszenzfärbung konnten Mikroglia/Makrophagen (Iba1<sup>+</sup>) und neutrophile Granulozyten (CD66b<sup>+</sup>) gut voneinander unterschieden werden, wie hier beispielhaft gezeigt wurde. Die Pfeilspitzen zeigen auf morphologisch typische segmentierte Zellkerne. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm. (B) Beispielhafte Darstellung der unterschiedlichen CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellfraktionen in den Patientengruppen. In der FACS-Analyse fielen in den GBM-Proben unterschiedlich stark ausgeprägte Zellfraktionen auf, die als CD11b<sup>high</sup>CD45<sup>low</sup> und CD11b<sup>low</sup>CD45<sup>high</sup> klassifiziert wurden. Die Prozentzahlen geben den Anteil der CD11b<sup>high</sup>CD45<sup>low</sup> Zellen an der Gesamtheit der CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen an. Dargestellt sind Patient 65 (rechter Dotplot) und Patient 35 (zweiter Dotplot von rechts) als Beispiele für GBM-Patienten. (C) Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von CD11b zwischen den beiden Zellpopulationen;  $p < 0,001$ ; Student's *t*-Test. (D) Auch für die Expression von CD45 konnte ein signifikanter Unterschied in der mittleren Fluoreszenzintensität gefunden werden;  $p = 0,0442$ ; Student's *t*-Test. (E) Während die CD11b<sup>low</sup>CD45<sup>high</sup>-Population Iba1 exprimiert, zeigen die CD11b<sup>high</sup>CD45<sup>low</sup>-Zellen eine Expression von CD66b. Die Zahlen geben den jeweiligen Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen für die Population der CD11b<sup>low</sup>CD45<sup>high</sup> (grün, Mikroglia/Makrophagen) und die CD11b<sup>high</sup>CD45<sup>low</sup> (rot, neutrophile Granulozyten) Zellen an.

#### 4.1.2 Charakterisierung des immunmodulatorischen Phänotyps der Mikroglia/Makrophagen und Neutrophilen

Zur weiteren Charakterisierung der myeloiden Zellpopulation wurden Oberflächenmarker und Zytokine untersucht, die immunmodulatorische Eigenschaften besitzen. Während die Mikroglia/Makrophagen nahezu vollständig HLA-ABC und HLA-DR exprimierten, zeigte nur ein geringer Prozentsatz von im Durchschnitt 13,16% der Granulozytenpopulation eine HLA-DR-Expression (Abb. 4-2 A, B). Die mittlere Fluoreszenzintensität von HLA-DR unterschied sich ebenfalls signifikant zwischen Mikroglia/Makrophagen und Granulozyten (Abb. 4-2 C). Zwar wurde von beiden Zellfraktionen kaum CD80 gebildet, jedoch zeigte sich ein deutlich höherer Prozentsatz der Mikroglia/Makrophagen positiv für CD86, wohingegen dieser Oberflächenmarker von den Neutrophilen nahezu gar nicht exprimiert wurde (Abb. 4-2 D,E). CD14 wurde von Mikroglia/Makrophagen zu einem geringen Anteil exprimiert, während Neutrophile kaum eine Expression zeigten (4-2 E).

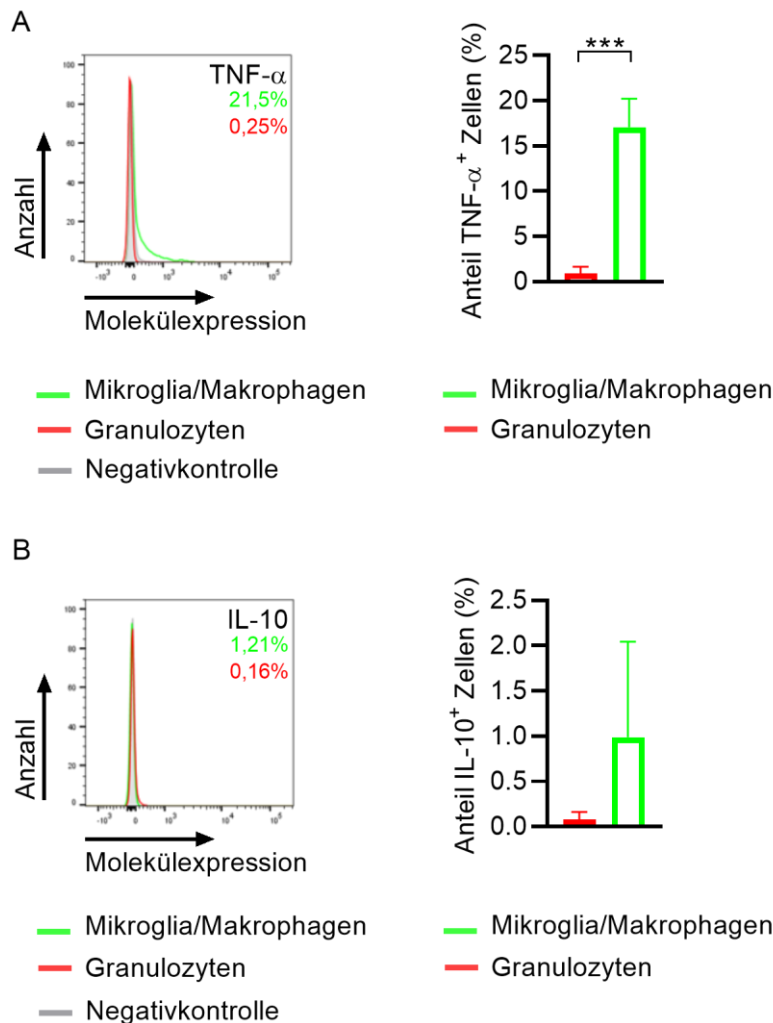


**Abb. 4-2 Vergleich der Aktivierungsmarker der beiden CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellpopulationen.**

(A) Analyse der Expression von Haupthistokompatibilitätskomplexen (HLA). Dargestellt sind die Histogramme, die die Expression auf Mikroglia/Makrophagen (grün) und neutrophilen Granulozyten (rot) zeigen. Die prozentualen Anteile sind in der jeweiligen Farbe der Zellpopulation dargestellt. (B) Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil an HLA exprimierenden Zellen. Hier zeigt sich bei HLA-DR ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ );  $n = 6-7$  je Gruppe, Student's  $t$ -Test. (C) Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der HLA-Moleküle. Mikroglia/Makrophagen haben eine signifikant höhere MFI von HLA-DR als Granulozyten ( $p < 0,0001$ );  $n = 6-7$  je Gruppe, Student's  $t$ -Test. (D) Analyse von *Cluster of Differentiation*-Markern. Dargestellt sind die Histogramme der jeweiligen Moleküle. Die prozentualen Werte der jeweiligen Probe sind in der entsprechenden Farbe der Zellpopulation dargestellt. (E) Expressionsanalyse der Oberflächenmarker. Für CD80 zeigt sich kein

signifikanter Unterschied. CD86 wird von Mikroglia/Makrophagen signifikant höher exprimiert als von neutrophilen Granulozyten ( $p = 0,0003$ ). CD14 zeigt eine dezent höhere Expression bei Mikroglia/Makrophagen ( $p = 0,0129$ );  $n = 7-8$  je Gruppe, Student's  $t$ -Test.

Das Zytokin TNF- $\alpha$ , welches für einen proinflammatorischen, antitumoralen Phänotyp steht, wurde nur von den Mikroglia/Makrophagen gebildet (Abb. 4-3 A), während das protumoral wirkende IL-10 von beiden Zelltypen kaum exprimiert wurde (Abb. 4-3 B).

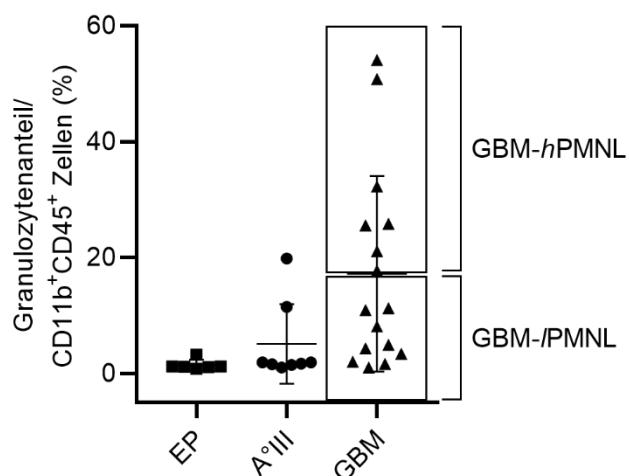


**Abb. 4-3 Analyse protumoraler und antitumoraler Zytokine.** (A) Analyse des der M1-Differenzierung zugeordneten Zytokins TNF- $\alpha$ . Die prozentualen Werte der jeweiligen Probe sind in der entsprechenden Farbe der Zellpopulation im Histogramm dargestellt. Die Analyse zeigt für TNF- $\alpha$  eine leicht erhöhte Expression in der Mikroglia/Makrophagen-Population, die sich auch als signifikant darstellte ( $p < 0,0001$ ),  $n = 5$  je Gruppe; Student's  $t$ -Test. (B) Analyse des der M2-Differenzierung zugeordneten Zytokins IL-10. Die im Histogramm dargestellten prozentualen Anteile entsprechen den IL-10<sup>+</sup> Zellen der jeweils farblich gekennzeichneten

Population. Es zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede;  $n = 5$  je Gruppe; Student's  $t$ -Test.

#### 4.1.3 Differenzierung der Patientengruppen nach Neutrophilenfraktion

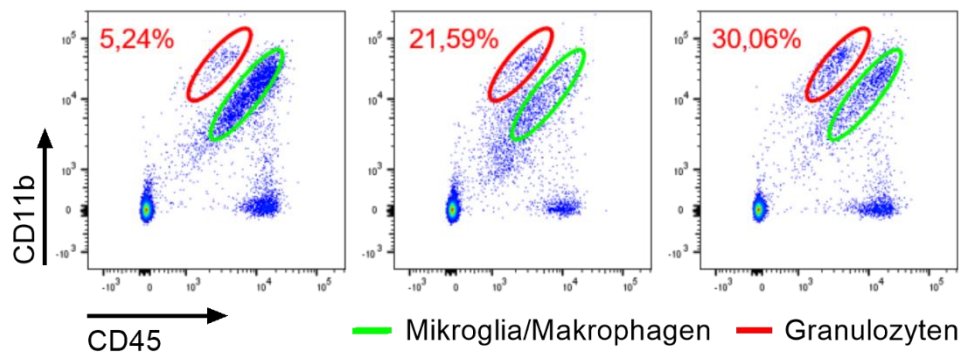
Aufgrund der deutlichen Unterschiede in der Zellzusammensetzung der myeloiden Zellpopulation wurde beschlossen, die GBM-Patienten in eine Gruppe mit hohem und eine mit niedrigem Anteil der neutrophilen Granulozyten an der CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>-Zellpopulation zu unterteilen, um mögliche Einflüsse auf das Expressionsmuster der zu untersuchenden immunmodulatorischen und proangiogenen Moleküle herausarbeiten zu können. Da es sich um Granulozyten handelte und diese in der Literatur auch als PMNL abgekürzt werden, entschieden wir uns für eine Bezeichnung der Gruppen als GBM-*h*PMNL für *high* und GBM-*l*PMNL für *low* in Bezug auf den Vergleich zum Mittelwert des Prozentsatzes der Granulozytenfraktion (17,2%) (Abb. 4-4).



**Abb. 4-4 Einteilung der GBM-Proben in eine GBM-*l*PMNL und GBM-*h*PMNL-Gruppe** basierend auf dem Anteil der Granulozyten (CD11b<sup>high</sup>CD45<sup>low</sup>) an der Gesamtpopulation der CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>Zellen. Der Mittelwert lag bei 17,2% und wurde somit als *cut-off*-Wert für die Einteilung der Proben benutzt.

Bei den meisten Patienten stand genug Material zur Verfügung, um ein oder zwei Gewebestücke in die FACS-Analysen aufzunehmen. Bei einigen Patienten wurden aber auch vier Gewebeprobe in der Durchflusszytometrie untersucht. Meistens

stellten sich die Granulozytenfraktionen dabei in ähnlicher Größenordnung dar. Nur bei zwei Patienten differierten die Granulozytenfraktionen der Gewebeproben so sehr, dass es zu einer unterschiedlichen Gruppierung der untersuchten Gewebeproben in die GBM-/PMNL und GBM-hPMNL-Gruppe geführt hätte (Abb. 4-5). Die für die RNA-Isolation verwendeten Gewebeproben wurden immer anhand der jeweiligen zugehörigen FACS-Analysen in die GBM-/PMNL- oder GBM-hPMNL-Gruppe eingeteilt.



**Abb. 4-5 Darstellung der FACS-Analysen von Patient 24.** Während im ersten analysierten Gewebestück ein Granulozytenanteil ( $CD11b^{high}CD45^{low}$ ) von 3,28% an der Gesamtpopulation der  $CD11b^{+}CD45^{+}$  Zellen gefunden werden konnte, war es in der zweiten analysierten Probe 21,59% und in der dritten 30,06%.

## 4.2 Analyse der Patientencharakteristika

Die ausführlichen Patientencharakteristika sind in Tabelle 4-1 aufgeführt. Aufgrund der nun geteilten Glioblastom-Patientengruppe wurde eine Analyse der Patientencharakteristika durchgeführt, um mögliche Einflüsse auf die Granulozytenfraktion ebenso zu erkennen wie eine mögliche Beeinflussung weiterer Analyseergebnisse.

Da beschrieben wurde, dass Mikroglia bereits im gesunden adulten Hirngewebe eine unterschiedliche lokale Verteilung aufweisen - wobei die größten Unterschiede jedoch zwischen grauer und weißer Substanz auftraten -, scheint es wichtig, entweder in allen Tumorguppen unterschiedliche Hirnregionen vertreten zu haben oder aber alle Tumoren in der gleichen Ursprungsregion lokalisiert zu haben [55]. Aufgrund der Kapazitäten der Durchführung dieser Studie war eine Homogenität der Patientengruppen in Hinsicht der Lokalisation leider nicht realisierbar.

Tab. 4-1 Darstellung der Patientencharakteristika

<b>Alter (Mittelwert <math>\pm</math> SD)</b>	<b>49,14 <math>\pm</math> 17,59</b>			
GBM	56,00 $\pm$ 17,88			
GBM- <i>h</i> PMNL	62,67 $\pm$ 13,52			
GBM- <i>l</i> PMNL	51,22 $\pm$ 20,43			
A°III	40,17 $\pm$ 9,09			
EP	38,67 $\pm$ 15,44			
<b>Geschlecht (f/m)</b>	<b>0,52</b>			
GBM	0,47			
GBM- <i>h</i> PMNL	0,33			
GBM- <i>l</i> PMNL	0,67			
A°III	0,67			
EP	0,50			
<b>Lokalisation des Tumors</b>	<b>A°III</b>	<b>GBM- lPMNL</b>	<b>GBM- hPMNL</b>	<b>Summe</b>
frontal	2	5	2	9
parietal	1	0	0	1
temporal	2	3	2	7
<i>davon insulär</i>	1	0	1	2
okzipital	0	0	1	1
periventrikulär	0	0	1	1
Mischlokalisierung	1	1	3	5
<i>davon temporo-parietal</i>	0	0	1	1
<i>temporo-frontal</i>	1	0	0	1
<i>parieto-okzipital</i>	0	0	1	1
<i>Operculum</i>	0	1	1	2
<i>Summe</i>	6	9	9	24

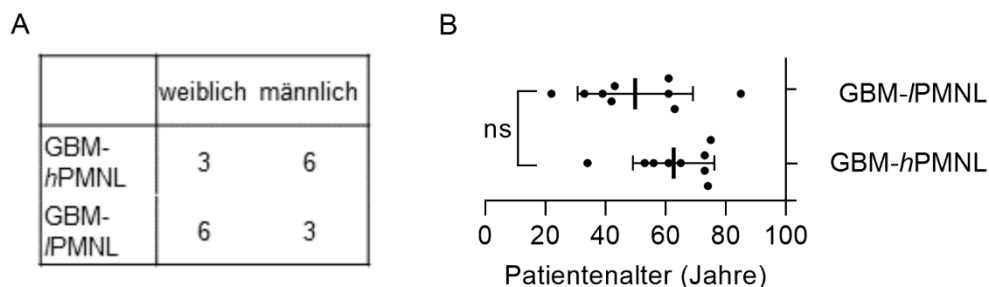
In allen Tumorpatientengruppen waren verschiedene Lokalisationen des Tumors vertreten. Nur bei Epilepsiepatienten konnten aufgrund der Operationsmethode bei zugrundeliegender Grunderkrankung (Temporallappenresektion) nur Gewebe des Temporallappens zur Untersuchung gewonnen werden. Der Temporallappen war auch in den drei Tumorgruppen eine der häufigsten vertretenen Lokalisationen. So befanden sich in der Astrozytom °III-Gruppe drei der sechs Tumore in dieser

Lokalisation. Sowohl in der GBM-/PMNL-Gruppe als auch in der GBM-*h*PMNL-Gruppe zeigten vier von neun Tumoren zumindest eine Beteiligung des Temporallappens. In der GBM-/PMNL-Gruppe war der Frontallappen mit 55,56% die am häufigsten betroffene Hirnregion. Fünf Tumore der gesamten GBM-Gruppe waren in ihrer Lokalisation nicht eindeutig einem Hirnareal zuzuordnen, wobei vier Fälle auf die GBM-*h*PMNL-Gruppe entfielen und in zwei von vier Fällen hier wieder eine Temporallappen-Beteiligung vorlag. Zum Vergleich der GBM-/PMNL und GBM-*h*PMNL-Gruppe wurde der exakte Fisher-Test in seiner Erweiterung für Kontingenztabellen mit  $r \times c$  Reihen und Spalten verwendet. Dazu wurde das Statistikprogramm R mit dem hinterlegten Code genutzt [152]. Aufgrund der aufgetretenen gemischten Tumorlokalisationen wurden mehrere Gruppierungsvarianten der Tumore in den GBM-Gruppen analysiert. So kann die Lokalisation „Operculum“ aufgrund der nicht genau möglichen Zuordnung zu einer Kortex-Region entweder als eigenständige Mischlokalisierung betrachtet werden oder aber jeweils dem einen oder anderen Operculum-bildenden Kortexareal zugerechnet werden. Die Insel-Region wurde, der klassischen Einteilung des Kortex in vier Lobi folgend, in allen Gruppen dem Temporallappen zugeordnet. Werden die Tumorlokalisationen so gruppiert betrachtet wie in Abbildung 4-6 dargestellt, ergibt sich ein  $p$ -Wert von 0,71 was keiner statistisch signifikanten Abweichung zwischen den beiden Gruppen entspricht. Werden die Mischlokalisationen entweder dem einen oder anderen Kortexareal zugeordnet ergeben sich  $p$ -Werte zwischen 0,1 und 0,26. Hierbei wurde die Umgruppierung in beiden GBM-Gruppen immer simultan durchgeführt. Es kann also resümiert werden, dass die Lokalisation der Tumoren trotz einiger Differenzen zwischen GBM-/PMNL und GBM-*h*PMNL-Gruppe als statistisch gesehen „gleich“ angenommen werden kann.



**Abb. 4-6 Schematische Darstellung der Verteilung der Tumorlokalisation.**

Aufgrund der Unterteilung der Glioblastom-Patienten in zwei Untergruppen wurden Patientencharakteristika wie Alter und Geschlechter-Verteilung verglichen, da auch für diese Faktoren bereits Relevanz für das Überleben gezeigt wurde [153–155]. In Hinblick auf die Geschlechter-Verteilung konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden, auch wenn die GBM-Gruppen entgegengesetzte Verhältnisse zeigten. Hinsichtlich der Altersverteilung konnte gezeigt werden, dass das durchschnittliche Alter in der GBM-*h*PMNL-Gruppe mit 62,67 Jahren zwar höher lag als in der GBM-*/*PMNL-Gruppe (49,89 Jahre), dieser Unterschied jedoch nicht signifikant war (Abb. 4-7).



**Abb. 4-7 Analyse der Patientencharakteristika.** (A) Darstellung der Verteilung von weiblichen und männlichen Patienten in den beiden GBM-Gruppen. Die Ermittlung des Signifikanzniveaus wurde mit dem exakten Fisher-Test durchgeführt.  $p = 0,3469$ . (B) Die Analyse der Altersverteilung der Glioblastom-Patienten erfolgte mittels  $t$ -Test.  $p = 0,1219$ .

Anhand der entstandenen Gruppeneinteilung der Glioblastom-Patienten wurden auch für den Tumor spezifische Merkmale wie MGMT-Methylierung und IDH-Mutation erhoben. Da für beide Faktoren ein Einfluss auf Therapieansprechen und Überleben der Patienten beschrieben wurde, erfolgte eine Analyse der beiden GBM-Gruppen in Hinblick auf unterschiedliche Verteilung beider Merkmale [13,17,156–159]. Auch hier wurde wegen der geringen Gruppengröße der exakte Fisher-Test gewählt. Aufgrund des zuletzt diskutierten *cut-off*-Wertes der MGMT-Methylierung wurde eine Analyse mit einem *cut-off*-Wert von 10% (Abb. 4-8 A) und eine weitere mit dem von Radke *et al.* vorgeschlagenen Wert von 20% (Abb. 4-8 B) durchgeführt [160]. Ein Patient der GBM-*/*PMNL-Gruppe wurde dadurch umgruppiert. In der GBM-*h*PMNL-Gruppe gab es keine Veränderungen. Für den MGMT-Status konnten für einen Patienten in der GBM-*h*PMNL-Gruppe und für zwei Patienten der GBM-*/*PMNL-Gruppe keine Angaben



gefunden werden. Für den IDH-Status fehlten die Angaben bei drei Patienten der GBM-*h*PMNL und für zwei Patienten der GBM-*/*PMNL-Gruppe. Die *p*-Werte für die MGMT-Methylierung ergaben jeweils keine statistische Signifikanz, so dass keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden konnten. Für den IDH-Status zeigte sich sogar eine statistische Übereinstimmung der Verteilung zwischen den Gruppen (Abb. 4-8 C).

Eine weitere möglicherweise wichtige Einflussgröße war der Rezidivstatus des Patienten. Hier zeigte sich zwar eine Tendenz, dass Rezidive häufiger der GBM-*/*PMNL-Gruppe angehörten, auch dieser Unterschied zeigte jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 4-8 D).

	MGMT positiv	MGMT negativ
GBM- <i>h</i> PMNL	5	3
GBM- <i>/</i> PMNL	3	4

	MGMT positiv	MGMT negativ
GBM- <i>h</i> PMNL	5	3
GBM- <i>/</i> PMNL	2	5

	IDH positiv	IDH negativ
GBM- <i>h</i> PMNL	1	5
GBM- <i>/</i> PMNL	2	5

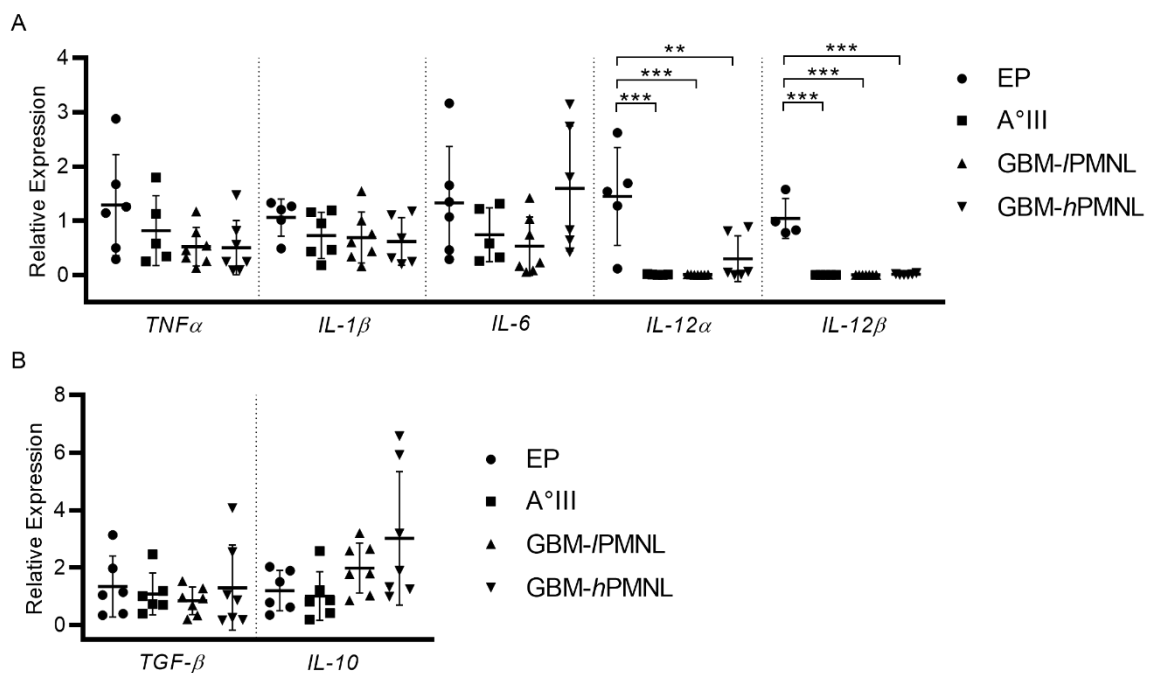
	ED	R
GBM- <i>h</i> PMNL	8	1
GBM- <i>/</i> PMNL	4	5

**Abb. 4-8 Kontingenztabelle der Tumorcharakteristika.** (A) Dargestellt ist die Verteilung der MGMT positiven und negativen Tumore in der GBM-*/*PMNL und GBM-*h*PMNL-Gruppe, wenn ein *cut-off*-Wert von 10% angenommen wird;  $p = 0,6193$ ; *ns* (B) Bei einem *cut-off*-Wert von 20% ändert sich die Zusammensetzung der GBM-*/*PMNL-Gruppe;  $p = 0,3147$ ; *ns*. (C) Die Verteilung der IDH-Mutation in den Tumoren ist für beide GBM-Gruppen dargestellt.  $p > 0,9999$ ; *ns*. (D) Darstellung der Verteilung von Erstdiagnose (ED) und Rezidiven (R) in den GBM-Gruppen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,1312$ ). Beide Gruppen umfassen jeweils neun Patienten. Für alle Analysen wurde der exakte Fisher-Test gewählt.

### 4.3 Aktivierungsstatus der myeloiden Zellen

#### 4.3.1 Expressionsmuster immunmodulatorischer Zytokine

Aufgrund der Unterteilung der GBM-Patientengruppe in die GBM-*hPMNL*- und GBM-*PMNL*-Gruppe nach dem Anteil der infiltrierenden Granulozyten, wurde eine Analyse des Aktivierungsstatus im Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen durchgeführt, um den Einfluss der unterschiedlichen Zellfraktionszusammensetzungen zu untersuchen. Verschiedene Zytokine sind mit der Ausprägung von einem eher protumoralen oder antitumoralen Phänotyp der Mikroglia/Makrophagen in Zusammenhang gebracht worden. Dabei wird die RNA-Expression von *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-12 $\alpha$*  und *IL-12 $\beta$*  eher einem proinflammatorischem M1-Typen zugeordnet, während die Expression von *TGF- $\beta$*  bei einem protumoralen M2-Phänotypen hochreguliert wird. Es erfolgte die Analyse der RNA-Expression der zuvor isolierten CD11b<sup>+</sup> Zellen. Hier konnte allerdings kein Unterschied im Expressionsmuster der myeloiden Zellen zwischen den beiden GBM-Gruppen oder im Vergleich der GBM-Gruppen zu Astrozytom <sup>o</sup>III gefunden werden (Abb. 4-9). Alle Tumorguppen wiesen jedoch eine signifikant niedrigere *IL-12 $\alpha$*  und *IL-12 $\beta$*  Expression auf als die Kontrollgruppe der Epilepsiepatienten (Abb. 4-9 A).



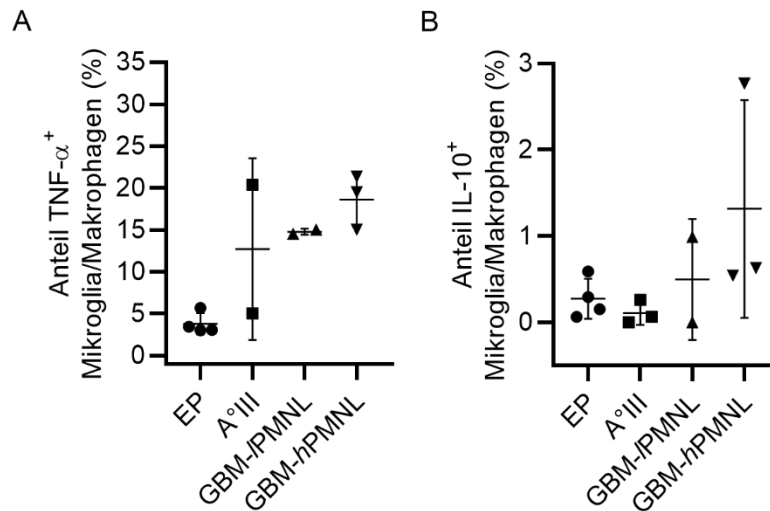
**Abb. 4-9 Darstellung des immunmodulatorischen Zytokinexpressionsmusters in verschiedenen Hirngeweben (A) Expressionsmuster von klassischen proinflammatorischen**

Zytokinen. In Bezug auf *IL-12 $\alpha$*  lässt sich eine Herunterregulation in der A°III, GBM-/PMNL- und GBM-*h*PMNL-Gruppe im Vergleich zu den Epilepsiepatienten nachweisen ( $p = 0,0006$  (A°III),  $p = 0,0003$  (GBM-/PMNL),  $p = 0,004$  (GBM-*h*PMNL)). Für *IL-12 $\beta$*  ist die Expression in den Tumorgruppen ebenfalls signifikant geringer (jeweils  $p < 0,0001$ ); one-way-ANOVA,  $n = 4-7$  pro Gruppe. (B) Darstellung der Expression von antiinflammatorischen Zytokinen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden, wobei jedoch eine Erhöhung des Mittelwertes der durchschnittlichen Expression von *IL-10* ermittelt werden konnte. Hier zeigte sich bei hoher Standardabweichung eine Tendenz und keine statistische Signifikanz ( $p = 0,1019$ ), one-way-ANOVA;  $n = 6-7$  je Gruppe.

### 4.3.2 Aktivierungsstatus der Mikroglia/Makrophagen

#### 4.3.2.1 Betrachtung immunmodulatorischer Zytokine

Bei der Analyse der qRT-PCR Daten ist zu beachten, dass diese RNA aus den CD11b<sup>+</sup> isolierten Zellen gewonnen wurde. Somit sind in der Zellfraktion nicht nur Mikroglia/Makrophagen inkludiert, sondern möglicherweise auch ein variierender Anteil von Neutrophilen. Zudem kann sich aufgrund verschiedener Regulationsmechanismen eine Hochregulation eines Moleküls teilweise nur auf Proteinebene manifestieren, während sich die RNA-Expression nicht verändert. Es wurde also exemplarisch die Expression von TNF- $\alpha$  und IL-10 mittels FACS untersucht, um die Zytokinexpression der Mikroglia/Makrophagen zu analysieren. Hier zeigte sich eine Tendenz zur Hochregulation von TNF- $\alpha$  durch Mikroglia/Makrophagen in der GBM-*h*PMNL-Gruppe im Vergleich zu den Epilepsiepatienten (Abb. 4-10 A). Aufgrund der geringen Gruppenstärke konnte keine statistische Auswertung erfolgen. Für IL-10 konnte ebenfalls keine signifikante Regulation ermittelt werden (Abb. 4-10 B).

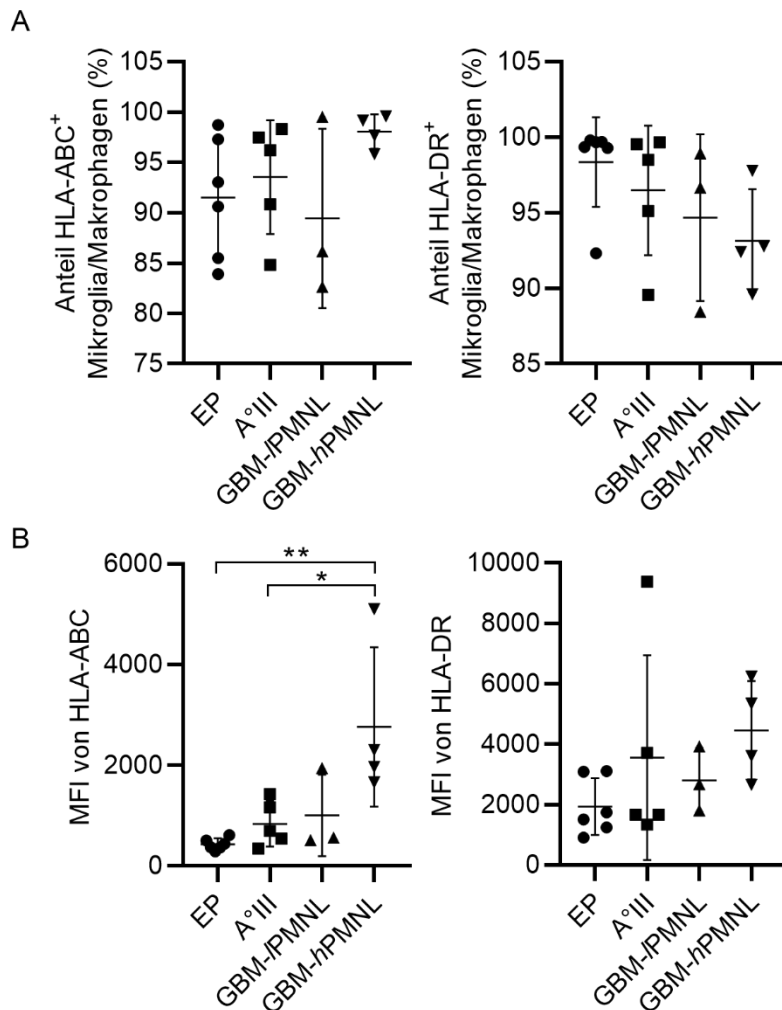


**Abb. 4-10 FACS-Analyse der Expressionsmuster immunmodulatorischer Zytokine durch Mikroglia/Makrophagen.** (A) Die Expression von TNF- $\alpha$  zeigte sich bei Mikroglia/Makrophagen der GBM-*hPMNL*-Gruppe im Vergleich zur EP-Gruppe erhöht;  $n = 2-4$ , keine statistische Auswertung erfolgt. (B) Die IL-10-Expression zeigte keine Differenz zwischen den Gruppen,  $n = 2-4$ ; keine statistische Auswertung möglich.

#### 4.3.2.2 Analyse der Oberflächenmarker der Mikroglia/Makrophagen

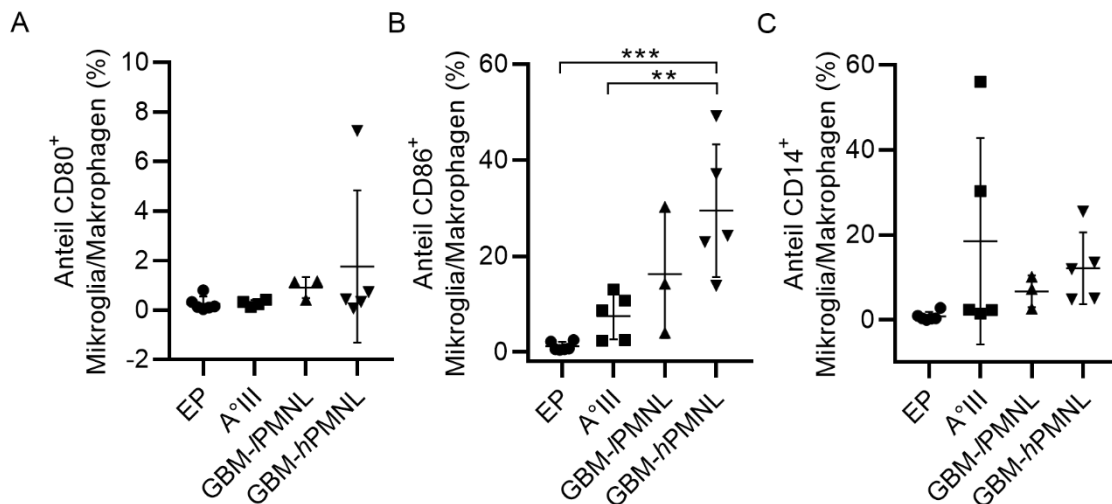
Die Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle (HLA-ABC, HLA-DR) dienen der Antigenpräsentation und damit der Aktivierung des Immunsystems. Sie finden sich unter anderem auf Antigenpräsentierenden Zellen, so auch Mikroglia und Makrophagen und können bei Aktivierung dieser Zellen hochreguliert werden [69]. Es zeigte sich zunächst kein Unterschied im Prozentsatz der Mikroglia/Makrophagen, welche HLA-ABC und HLA-DR exprimierten. Bei einer Analyse der mittleren Fluoreszenzintensitäts-Werte (*MFI*) konnte jedoch gezeigt werden, dass nur die GBM-*hPMNL*-Gruppe in Bezug auf HLA-ABC-Expression einen signifikanten Unterschied zur Epilepsie- und Astrozytom °III-Gruppe aufwies (Abb. 4-11 A). Der Mittelwert der Fluoreszenzintensität lag in dieser Gruppe höher als in der GBM-*IPMNL*-Gruppe, jedoch konnte hier keine Signifikanz erreicht werden (Abb. 4-11 B). Bei der Expression von HLA-DR konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 4-11 A, B). Zusammengefasst ist zu beobachten, dass in allen Gewebeproben zwar der gleiche Prozentsatz an Mikroglia/Makrophagen HLA-ABC exprimieren, die Intensität des Signals jedoch in der GBM-*hPMNL*-Gruppe

zunimmt, so dass von einer vermehrten Expression des Moleküls pro Zelle ausgegangen werden kann.



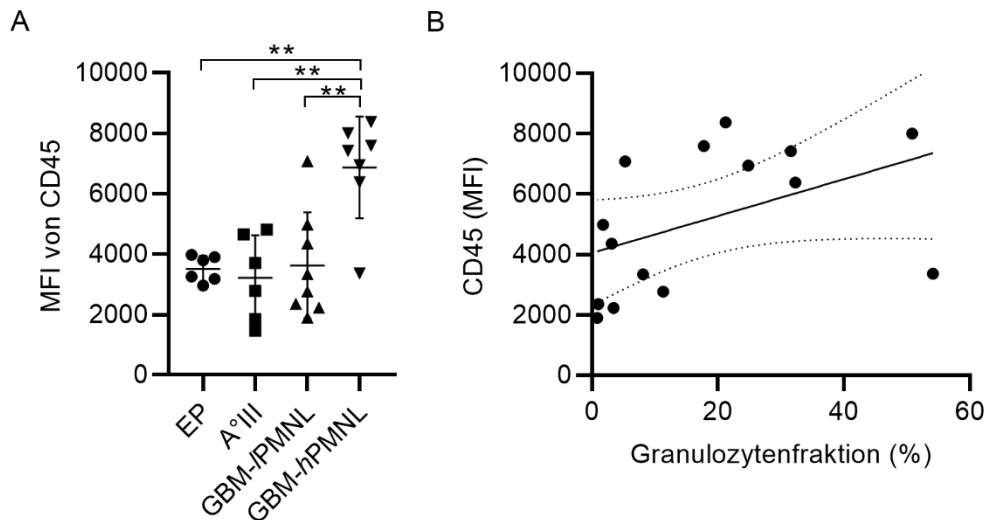
**Abb. 4-11 Expression von HLA-Molekülen.** (A) Prozentuale Expression von HLA-ABC und HLA-DR auf Mikroglia/Makrophagen. Fast alle Mikroglia/Makrophagen exprimieren die beiden HLA-Moleküle, unabhängig von der Patientengruppe. Der leichte Trend zur Herunterregulation von HLA-DR in der GBM-*h*PMNL-Gruppe im Vergleich zu EP ist nicht signifikant ( $p = 0,3447$ );  $n = 3-6$  je Gruppe, one-way-ANOVA. (B) Darstellung der Expression von HLA-ABC und HLA-DR auf Mikroglia/Makrophagen anhand von mittleren Fluoreszenzintensitätswerten (MFI). Die Analyse zeigt eine signifikante Erhöhung der Immunfluoreszenzintensität in der GBM-*h*PMNL-Gruppe für HLA-ABC gegenüber EP ( $p = 0,0041$ ) und A°III ( $p = 0,0238$ ). Der Vergleich der GBM-*h*PMNL-Gruppe zu der GBM-IPMNL-Gruppe zeigt keine Signifikanz ( $p = 0,0926$ ). Auch für HLA-DR konnte keine signifikante Abweichung zwischen GBM-*h*PMNL und EP-Gruppe gefunden werden ( $p = 0,4846$ );  $n = 3-6$  je Gruppe, one-way-ANOVA.

CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) werden von Antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und können als sogenannte kostimulatorische Moleküle sowohl mit CD28 als auch mit CD152 interagieren. Sie können dadurch zur Aktivierung von T-Zellen beitragen, diese jedoch auch regulieren. Besonders wichtig erscheinen sie bei der Aktivierung bis dahin naiver T-Zellen [161]. Beide Moleküle werden auf aktivierten monozytären Zellen exprimiert, wobei CD86 eine raschere Regulation als CD80 zeigt und auch ein stärkeres konstitutives Expressionsmuster beschrieben wurde [162]. CD80 und CD86 werden in der Literatur auf aktivierten Mikroglia mit M1-Differenzierung beschrieben [163,164]. In dieser Studie konnte in der Expression von CD80 kein Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden (Abb. 4-12 A). Die Expression von CD86 jedoch unterschied sich bei der GBM-*h*PMNL-Gruppe signifikant von der Epilepsie- und Astrozytom  $\alpha$ III-Gruppe (Abb. 4-12 B). Auch hier war der Mittelwert des Prozentsatzes der Zellen, welche den Oberflächenmarker exprimieren, in der GBM-*h*PMNL-Gruppe (29,46%) höher als in der GBM-*/*PMNL-Gruppe (16,2%). Eine Signifikanz wurde aufgrund der Standardabweichung aber nicht erreicht ( $p = 0,3689$ ). CD14 wird ebenfalls als Aktivierungsmarker beschrieben. So exprimieren ruhende Mikroglia/Makrophagen wenig CD14, sind jedoch dazu befähigt, dieses Oberflächenmolekül nach Stimulation hochzuregulieren. CD14 zählt zu den *pattern recognition receptors* (PRR), welche dazu dienen, charakteristische Muster von Pathogenen zu erkennen und daraufhin über Signalkaskaden das Immunsystem zu aktivieren [165]. Es konnte aufgrund hoher Streuung der Werte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden, auch wenn der Mittelwert der GBM-*h*PMNL-Gruppe (11,81%) höher lag als der Mittelwert der EP-Gruppe (0,78%) (Abb. 4-12 C).



**Abb. 4-12 Expression von Aktivierungsmarkern der Mikroglia/Makrophagen.** (A) Dargestellt ist die Expression von CD80. Es konnte keine Differenz zwischen den Patientengruppen gefunden werden,  $n = 3-6$  je Gruppe; one-way-ANOVA. (B) Für CD86 ergab die Analyse eine Hochregulation in der GBM-*hPMNL*-Gruppe im Vergleich zu EP ( $p = 0,0006$ ) und A°III ( $p = 0,009$ ),  $n = 3-6$  je Gruppe, one-way-ANOVA. (C) Für den Oberflächenmarker CD14 konnte keine signifikante Regulation gefunden werden,  $n = 3-6$ ; one-way-ANOVA.

Auch CD45 wurde in der Literatur als Aktivierungsmarker beschrieben, der Mikroglia/Makrophagen in ihrer Funktion beeinflussen kann [60,166–168]. Dieses Oberflächenmolekül ist eine rezeptorähnliche Protein-Tyrosin-Phosphatase, welche multiple Funktionen im Immunsystem vermittelt und unter anderem für B- und T-Zellaktivierung eine Rolle spielt. Neutrophile können in ihrer Funktion moduliert werden, wobei diskutiert wird, ob diese Modulation einer Aktivierung oder Suppression entspricht. Auch für die Makrophagen-vermittelte Adhäsion ist CD45 relevant [166]. Untersucht man die Mikroglia/Makrophagen der GBM-Patientengruppen auf die Expression dieses Moleküls hin, kann eine signifikante Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität zwischen GBM-*hPMNL* und allen anderen drei untersuchten Gruppen nachgewiesen werden (Abb. 4-13 A). In der Gesamtheit der GBM-Patienten besteht eine Korrelation zwischen CD45-Expression und Infiltration der Granulozyten (Abb. 4-13 B).

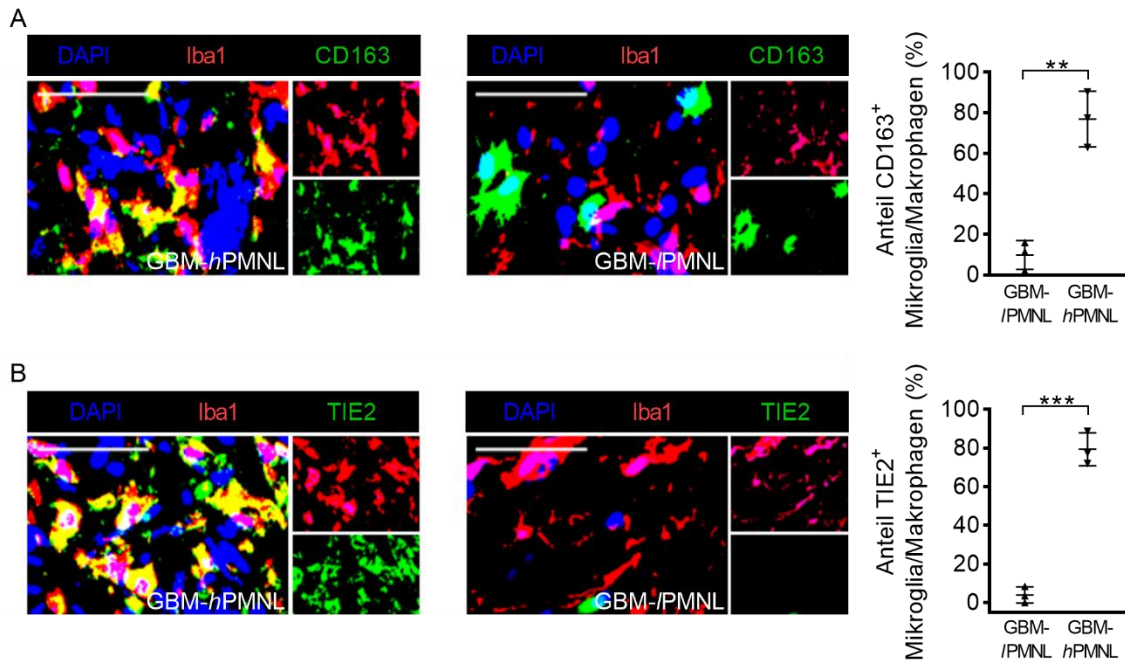


**Abb. 4-13 Analyse der CD45 Expression.** (A) Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität von CD45 bei Mikroglia/Makrophagen. Es zeigt sich eine signifikante Differenz zwischen GBM-*h*PMNL und EP ( $p = 0,0026$ ), A°III ( $p = 0,0010$ ) und GBM-*IP*MNL ( $p = 0,0017$ );  $n = 6-8$  je Gruppe; one-way-ANOVA. (B) Die Analyse ergibt eine signifikante Korrelation zwischen mittlerer Fluoreszenzintensität von CD45 und prozentuaalem Anteil der Granulozyten an der CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>-Zellpopulation ( $p = 0,0222$ ;  $r = 0,5929$ ); Spearman-Korrelation,  $n = 15$ .

#### 4.3.2.3 CD163 und TIE2 als M2-assoziierte Marker und Modulatoren der Angiogenese

Sowohl das Transmembranprotein CD163 als auch die transmembranäre Tyrosinkinase TIE2 wurden in der Literatur als immunmodulierende Oberflächenmoleküle beschrieben, die eher immunsuppressive Funktionen vermitteln [169–173]. Zudem sind sie mit verstärkter Angiogenese assoziiert und können damit das Tumorstadium fördern [174–177]. CD163 wird zudem als Marker einer M2-Polarisierung genannt [164]. Sowohl für CD163 als auch TIE2 konnte eine Expression in den Immunfluoreszenzfärbungen fast nur von Mikroglia/Makrophagen der GBM-*h*PMNL-Gruppe nachgewiesen werden, was für einen unterschiedlichen Aktivierungsstatus der Iba1 positiven Zellen spricht (Abb. 4-14).





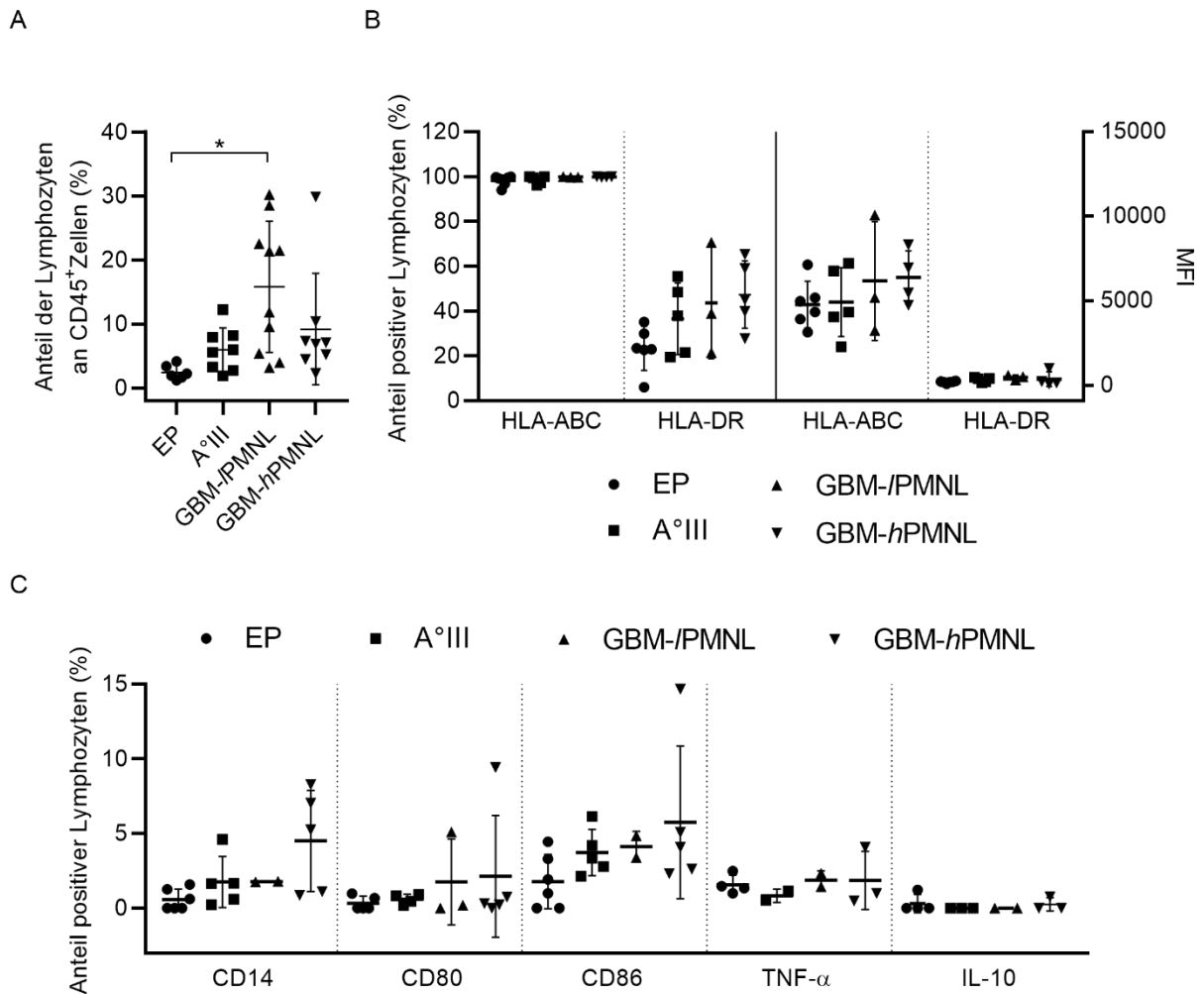
**Abb. 4-14 Expression von CD163 und TIE2.** (A) CD163 wird von Mikroglia/Makrophagen (Iba1<sup>+</sup>) in der GBM-*h*PMNL-Gruppe exprimiert, wohingegen die Mikroglia/Makrophagen in der GBM-/PMNL-Gruppe kaum eine Expression von CD163 zeigen. Im Diagramm ist die Verteilung der CD163<sup>+</sup> Mikroglia/Makrophagen in der GBM-/PMNL und GBM-*h*PMNL-Gruppe dargestellt. Hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ( $p = 0,0017$ ). (B) Viele Iba1<sup>+</sup> Zellen zeigten in der GBM-*h*PMNL-Gruppe eine Expression von TIE2. In der GBM-/PMNL-Gruppe war kaum Expression von TIE2 nachzuweisen. Der Unterschied der Expression war statistisch signifikant ( $p = 0,0002$ ). Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 50  $\mu\text{m}$ . Die statistische Auswertung erfolgte jeweils mit dem Student's *t*-Test,  $n = 3$  je Gruppe. Die Auszählung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. S. Brandenburg.

Insgesamt können zwar einige Unterschiede im Aktivierungsstatus von Mikroglia/Makrophagen in der GBM-Gruppe gegenüber den Epilepsie- und Astrozytom °III-Patienten gesehen werden, diese bestehen in signifikanter Ausprägung jedoch nur in der GBM-*h*PMNL-Gruppe. Die Analysen von CD86, CD45, CD163 und TIE2 implizieren zudem eine Differenz zwischen der GBM-/PMNL- und GBM-*h*PMNL-Gruppe. Dennoch können Unterschiede nicht in allen untersuchten Markern und Zytokinen nachgewiesen werden. Es ließ sich keines der klassischen M1/M2-Expressionsmuster beobachten, was für die These spricht, dass es sich eher um ein Kontinuum handelt.

#### 4.4 Infiltration von Lymphozyten ins Tumorgewebe

Lymphozyten sind ebenfalls CD45 positive Zellen, die jedoch kein CD11b exprimieren. Es wird davon ausgegangen, dass sie im normalen Hirngewebe nicht oder nur in geringer Anzahl über ihren momentanen Aufenthalt in Blutgefäßen vorkommen sollten. Bei fortschreitendem Glioblastom wird die Blut-Hirn-Schranke jedoch durchlässig und Lymphozyten können vermehrt ins Gewebe eindringen. Es ist somit mit einer Zunahme dieser Zellpopulation zu rechnen. Diese Beobachtung konnte in dieser Studie nachvollzogen werden, indem das perioperativ gewonnene Gewebe enzymatisch homogenisiert und die Zellsuspension mittels FACS untersucht wurde. Es zeigte sich eine Zunahme der Lymphozytenfraktion zwischen den Tumorgruppen (Mittelwert<sub>A°III</sub> = 5,99%, Mittelwert<sub>GBM-*i*PMNL</sub> = 15,82% und Mittelwert<sub>GBM-*h*PMNL</sub> = 9,20%) und Epilepsiepatienten (Mittelwert = 2,45%). Besonders in der GBM-*i*PMNL-Gruppe konnte eine deutliche Zunahme der Lymphozytenfraktion in einigen Patientenproben gefunden werden. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu den Epilepsiepatienten, während der Mittelwert in der GBM-*h*PMNL-Gruppe zwar auch höher lag, aber kein Signifikanzniveau erreicht wurde (Abb. 4-15 A).

Für die Lymphozytenpopulation wurde ebenfalls eine Analyse der immunmodulierenden, kostimulatorischen Moleküle und Zytokine durchgeführt. Hier zeigte nur CD14 einen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen (Abb. 4-15 B, C). Allerdings ist zu beachten, dass in die Population der CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> Lymphozyten wiederum verschiedene Untergruppen (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, etc.) eingehen. Diese Zellfraktion stellte allerdings nicht den Fokus der vorliegenden Arbeit dar, so dass keine weitere Analyse der Subpopulationen erfolgte und somit nur eine eingeschränkte Aussage in Hinblick auf mögliche Regulationen zu treffen ist. Zudem machte die Lymphozytenfraktion einen bedeutend kleineren Anteil der CD45<sup>+</sup> Zellen aus, so dass auch über die kleinere Anzahl der im FACS detektierten Zellen eine Limitation der Aussagekraft resultiert.

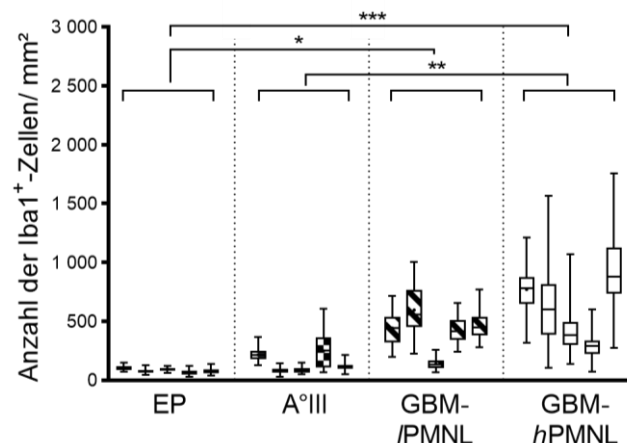


**Abb. 4-15 Analyse der Lymphozytenfraktion.** (A) Nur zwischen EP und GBM-IPMNL konnte ein signifikanter Unterschied im Anteil der Lymphozytenfraktion nachgewiesen werden ( $p = 0,0102$ ). Zwischen EP und A°III ließ sich eine Tendenz erkennen ( $p = 0,0578$ ). In der GBM-hPMNL-Gruppe konnte im Mittel ein geringerer Lymphozytenanteil gefunden werden als in der GBM-IPMNL-Gruppe. Dies war aber nicht signifikant ( $p = 0,4308$ );  $n = 6-10$  je Gruppe, one-way-ANOVA. (B) Weder der Anteil der HLA-ABC<sup>+</sup> Lymphozyten noch der Prozentsatz der HLA-DR<sup>+</sup> Lymphozyten differierte zwischen den verschiedenen Gruppen (Bezug auf linke y-Achse). Auch eine Untersuchung der MFI von HLA-ABC und HLA-DR erbrachte keine signifikanten Unterschiede (Bezug zur rechten y-Achse). (C) In Hinblick auf die Expression von CD14 konnte eine höhere Expression in der GBM-hPMNL-Gruppe im Vergleich zu EP gefunden werden ( $p = 0,0442$ ). Der Anteil der CD80<sup>+</sup> und CD86<sup>+</sup> Lymphozyten zeigte jeweils keine signifikanten Abweichungen. In Hinblick auf die proinflammatorischen (TNF- $\alpha$ ) und antiinflammatorischen (IL-10) Moleküle zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den Gruppen. Für (B) und (C) gilt  $n = 2-6$  je Gruppe, one-way-ANOVA (CD80, HLA-ABC, HLA-DR), für die Moleküle mit einer Gruppe mit  $n = 2$  wurde kein statistischer Test durchgeführt (CD86, CD14, TNF- $\alpha$ , IL-10).

## 4.5 Analyse von Morphologie und Verteilung der Mikroglia/Makrophagen

### 4.5.1 Akkumulation von Mikroglia/Makrophagen im humanen Glioblastom

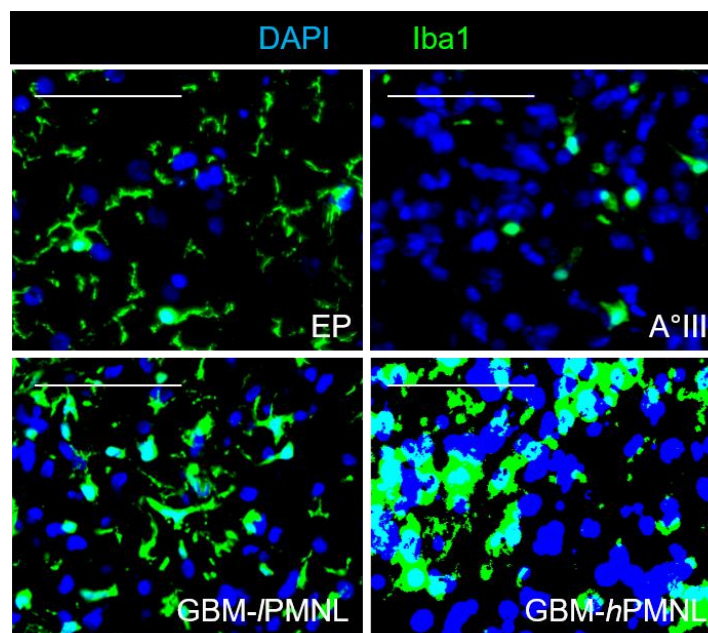
Es wurde bereits mehrfach eine Akkumulation von Mikroglia/Makrophagen im humanen Glioblastom beziehungsweise Makrophagen in anderen Tumoren beschrieben. Teilweise wurde gezeigt, dass Mikroglia/Makrophagen bis zu 30% der Tumormasse ausmachen können [43,44]. Aufgrund der in dieser Studie vorgenommenen Unterteilung der Glioblastom-Gruppe in eine Gruppe mit hoher Granulozytenanzahl und einer Gruppe mit niedriger Granulozytenanzahl wurde die Akkumulation der Mikroglia/Makrophagen in Abhängigkeit davon mittels Auswertung von Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Die Mikroglia/Makrophagen wurden hierbei mit Iba1 angefärbt. Beide GBM-Gruppen zeigten eine Akkumulation von Iba1 positiven Zellen im Vergleich zur EP-Gruppe. Eine signifikante Erhöhung der Zellzahl im Vergleich zur Astrozytom  $^{\circ}$ III-Gruppe konnte nur bei der GBM-*h*PMNL-Gruppe gefunden werden (Abb. 4-16).



**Abb. 4-16 Akkumulation von Iba1<sup>+</sup>-Zellen im humanen Glioblastom.** Dargestellt ist die Analyse von Immunfluoreszenzschnitten, auf denen Mikroglia/Makrophagen (Iba1<sup>+</sup>) angefärbt und ausgezählt wurden. Es kann eine signifikante Anreicherung von Mikroglia/Makrophagen in GBM-PMNL ( $p = 0,0309$ ) und GBM-*h*PMNL-Gruppe ( $p = 0,0006$ ) im Vergleich zu EP beobachtet werden. Auch gegenüber A<sup>°</sup>III wurde eine signifikante Erhöhung der Iba1<sup>+</sup> Zellen in der GBM-*h*PMNL-Gruppe gefunden ( $p = 0,0023$ ). Es wurden die einzelnen untersuchten Patientenproben in den verschiedenen Gruppen dargestellt, um die Streuung innerhalb einer Probe ebenso zu visualisieren wie die Abweichungen innerhalb einer Gruppe,  $n = 5$  je Gruppe, 2-5 Schnitte pro Patient, mindestens 29 Bilder pro Patient; one-way-ANOVA.

#### 4.5.2 Morphologie der Mikroglia/Makrophagen

Roggendorf *et al.* beschrieben 1996 verschiedene Morphologien bei Mikroglia/Makrophagen im Hirngewebe. Dabei wurden die Mikroglia/Makrophagen des normalen Hirngewebes als „verzweigt“ beschrieben, während im GBM aktivierte, amöboide Zellen beobachtet wurden [178,179]. Der Unterteilung der GBM-Gruppe folgend, wurden repräsentative Aufnahmen der verschiedenen Gewebe angefertigt. Zur Darstellung der Mikroglia/Makrophagen wurde erneut Iba1 verwendet. Im Epilepsiegewebe konnten die typischen, vormals als „ruhend“ beschriebenen, Zellen mit ihren stark verzweigten Ausläufern abgebildet werden. Beim Astrozytom °III herrschten kleine runde Phänotypen vor. In beiden GBM-Gruppen fanden sich die beschriebenen amöboiden Zellen, wobei in Abschnitten der GBM-/PMNL-Gewebe auch noch Mikroglia/Makrophagen mit Ausläufern beobachtet werden konnten, was als Anzeichen des zuvor beschriebenen distinkten Aktivierungsstatus der Zellen in den unterschiedlichen Geweben gewertet werden kann (Abb. 4-17).



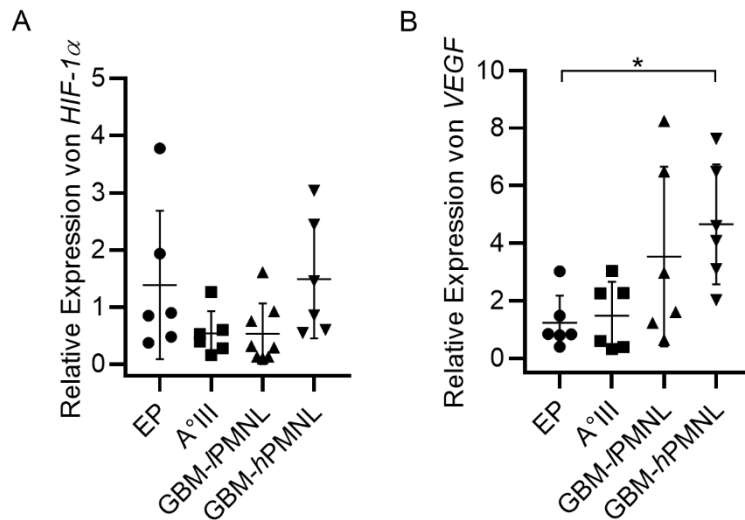
**Abb. 4-17 Morphologie der Mikroglia/Makrophagen.** Exemplarische Darstellung der unterschiedlichen Mikroglia/Makrophagen-Morphologie in den Patientengruppen. Die Mikroglia/Makrophagen wurden mit Iba1 (grün) angefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

## 4.6 Expression proangiogener Moleküle

### 4.6.1 Expressionsprofile in der quantitativen Realtime-PCR

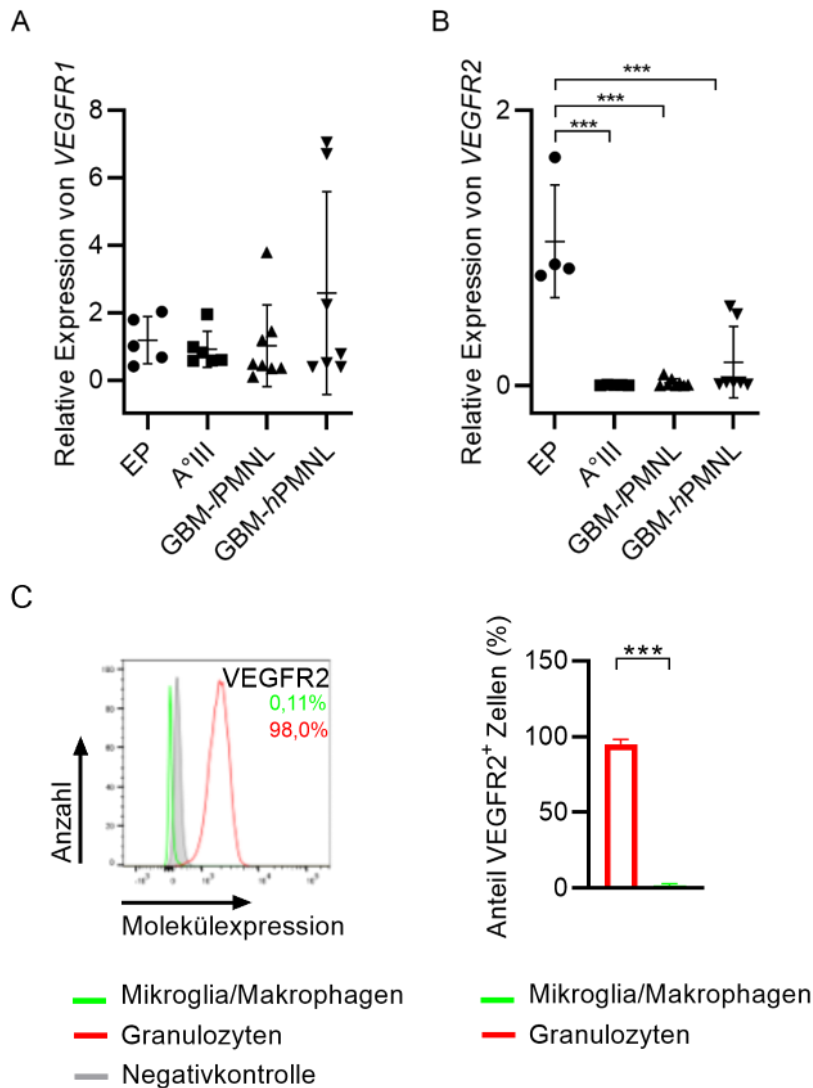
Angiogenese ist ein wichtiger Faktor der Tumorprogression und gilt als ein Charakteristikum des GBM. Um die angiogene Funktion der myeloiden Zellen zu untersuchen, wurden diese zunächst aus dem Patientengewebe isoliert. Hierzu wurden CD11b *Microbeads* verwendet. Nach Isolation der RNA der myeloiden Zellen erfolgte mittels quantitativer Realtime-PCR deren Analyse auf fünf proangiogene Moleküle (*HIF-1 $\alpha$* , *VEGF*, *CXCL2*, *IL-8* und *CD13*), da diese von unserer Arbeitsgruppe bereits im Mausmodell als heraufreguliert beschrieben worden waren [34]. Zu beachten ist, dass die isolierten Zellen sowohl Mikroglia/Makrophagen als auch neutrophile Granulozyten enthalten und die RNA-Expressionsprofile somit diese Mischpopulation wiedergeben. Der Einteilung der Gruppen nach Granulozytenfraktion folgend, wurden diese beiden GBM-Gruppen mit Epilepsiepatienten und Astrozytom °III-Patienten verglichen.

Ein typischer Gefäßwachstum induzierender Faktor ist Hypoxie. Als Antwort auf vermindertes Sauerstoffangebot wird HIF beziehungsweise dessen Untereinheit HIF-1 $\alpha$  reguliert, welche wiederum in der Lage ist, über seine Expression VEGF zu beeinflussen und somit die Gefäßneubildung und das Gefäßwachstum anzuregen [180,181]. In dieser Studie zeigte *HIF-1 $\alpha$*  auf RNA-Ebene keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen, was unter anderem an den zahlreichen Regulationsmechanismen in Transkription, Translation und Degradierung liegen könnte [180] (Abb. 4-18 A). *VEGF* hingegen war in der GBM-*hPMNL*-Gruppe signifikant im Vergleich zu der Kontrollgruppe der Epilepsiepatienten erhöht (Abb. 4-18 B).



**Abb. 4-18 Relative Expression klassischer proangiogener Moleküle** (A) Darstellung der relativen RNA-Expression von *HIF-1α*. Die Analyse erfolgte mittels one-way-ANOVA,  $p = 0,3$  bis  $0,99$ ; ns,  $n = 6$  pro Gruppe (B) Relative RNA-Expression von *VEGF*. Die Differenz zwischen EP und GBM-*hPMNL*-Gruppe ist statistisch signifikant;  $p = 0,0497$ ; one-way-ANOVA;  $n = 6-8$  pro Gruppe.

Um ein umfassenderes Bild über die Regulationsmechanismen zu erhalten, wurden außerdem die beiden Rezeptoren von VEGF, VEGFR1 und VEGFR2 untersucht. Hier zeigte sich auf RNA-Level, also für die gesamte myeloide Zellpopulation, für *VEGFR1* keinerlei signifikante Regulation (Abb. 4-19 A). Für *VEGFR2* war eine Herunterregulation in den Tumorgruppen im Vergleich zu EP zu sehen (Abb. 4-19 B). Es zeigte sich jedoch eine Expression in einigen GBM-Proben. Eine Analyse der myeloiden Zellen im FACS identifizierte die Granulozyten als Quelle der VEGFR2-Expression, während die Mikroglia/Makrophagen VEGFR2<sup>-</sup> waren (Abb. 4-19 C).



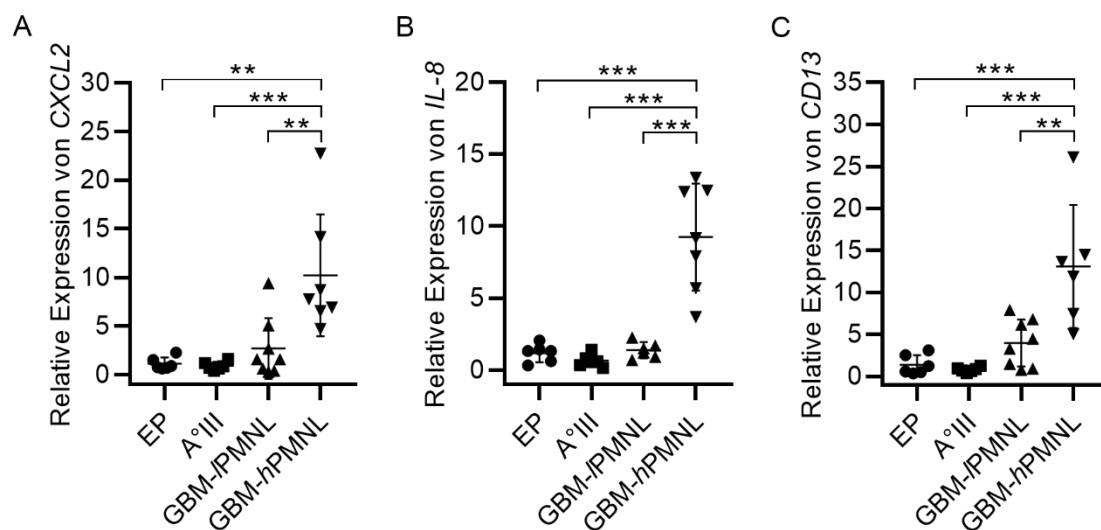
**Abb. 4-19 Relative Expression der Rezeptoren von VEGF.** (A) Für die RNA-Expression von *VEGFR1* konnte keine signifikante Regulation gefunden werden. Gerade in der GBM-*hPMNL*-Gruppe zeigt sich jedoch eine große Varianz der Expression. (B) *VEGFR2* wird im Vergleich zur EP-Gruppe auf RNA-Ebene in allen Tumorgruppen herunterreguliert (jeweils  $p < 0,0001$ ). Für beide Analysen gilt:  $n = 4-8$  je Gruppe; one-way-ANOVA. (C) Expression von VEGF-Rezeptor 2 (*VEGFR2*) im FACS. Im Histogramm erfolgt eine beispielhafte Darstellung des Expressionsprofils von *VEGFR2*. Der prozentuale Wert gibt den Anteil der *VEGFR2*<sup>+</sup> Zellen an der jeweiligen Zellpopulation (Mikroglia/Makrophagen = grün; Neutrophile = rot) in der dargestellten Probe an. Es ließ sich nur bei neutrophilen Granulozyten eine Expression nachweisen ( $p < 0,0001$ );  $n = 5$  je Gruppe, Student's *t*-Test.

Neben den klassischen proangiogenen Faktoren wurden in den letzten Jahren einige Moleküle identifiziert, die ebenfalls proangiogene Eigenschaften besitzen, weil sie selbst über Rezeptorbindung die Formation von Gefäßzellen anregen können und



somit andere Signalwege als VEGF nutzen. Zu diesen Molekülen gehören CXCL2, IL-8 und CD13 [182–185]. CXCL2 und IL-8 binden dabei an ihren gemeinsamen Rezeptor, CXCR2. Dieser steuert über mehrere Signalkaskaden (Jak2/STAT3, NF- $\kappa$ B, mTOR) letztendlich auch die Angiogenese [186,187]. Der exakte Wirkmechanismus von CD13 wird zur Zeit diskutiert, jedoch konnte die Beteiligung des Oberflächenmoleküls an der Angiogenese über *tubeformation-assays* und Inhibitions-Experimente gezeigt werden [182]. Für CXCL2 zeigte die GBM-*hPMNL*-Gruppe eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu EP und A°III-Patienten (Abb. 4-20 A). Interessanterweise zeigte sich hier auch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden GBM-Gruppen.

Für IL-8, welches ebenfalls über den CXCR2-Rezeptor bindet, zeigte sich sogar ein hochsignifikanter Unterschied zwischen GBM-*hPMNL* und GBM-*PMNL*-Gruppe, wobei die relative Expression von IL-8 in der Gruppe mit vermehrter Granulozytenfraktion gegenüber der anderen GBM-Patientengruppe mehr als sechsfach erhöht war. Der Unterschied zu den beiden anderen Gruppen war ebenfalls hochsignifikant (Abb. 4-20 B).



**Abb. 4-20 Relative Expression der RNA alternativer proangiogener Faktoren.**

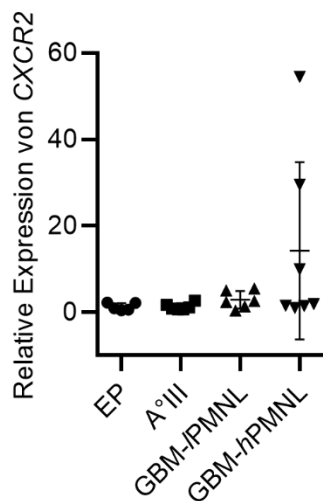
(A) Darstellung der Expression von CXCL2. Der Unterschied der GBM-*hPMNL*-Gruppe zu EP ( $p = 0,001$ ), A°III ( $p = 0,0008$ ) und GBM-*PMNL*-Gruppe ( $p = 0,0036$ ) ist jeweils statistisch signifikant, one-way-ANOVA,  $n = 6-8$  je Gruppe. (B) Dargestellt ist die relative Expression von IL-8. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von IL-8 in der GBM-*hPMNL*-Gruppe im Vergleich zu EP, A°III und GBM-*PMNL* (jeweils  $p < 0,0001$ ), one-way-ANOVA;  $n = 6-7$  je Gruppe. (C) Es zeigte sich eine relative Überexpression von CD13 in der GBM-*hPMNL*-

Gruppe gegenüber EP ( $p = 0,0002$ ), A°III ( $p < 0,0001$ ) und GBM-*h*PMNL ( $p = 0,0015$ ), one-way-ANOVA;  $n = 6-8$  je Gruppe.

Ähnliches konnte für *CD13* beobachtet werden: Auch hier war ein signifikanter Unterschied in der Expression des alternativen proangiogenen Moleküls zu verzeichnen: Die GBM-*h*PMNL-Gruppe zeigte eine deutliche Hochregulierung im Vergleich zu den anderen drei Gruppen (Abb. 4-20 C).

Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster lässt sich schlussfolgern, dass die *CD11b*<sup>+</sup> Zellen der GBM-*h*PMNL-Gruppe vermehrt proangiogene Aktivität aufweisen und dass sich dieser Unterschied auch in der Summe oder Struktur der Gefäße des Tumors äußern könnte.

Der gemeinsame Rezeptor von CXCL2 und IL-8, CXCR2, wurde ebenfalls analysiert. Hier zeigte sich zumindest in Bezug auf die RNA keine signifikante Regulation zwischen den Gruppen (Abb. 4-21).



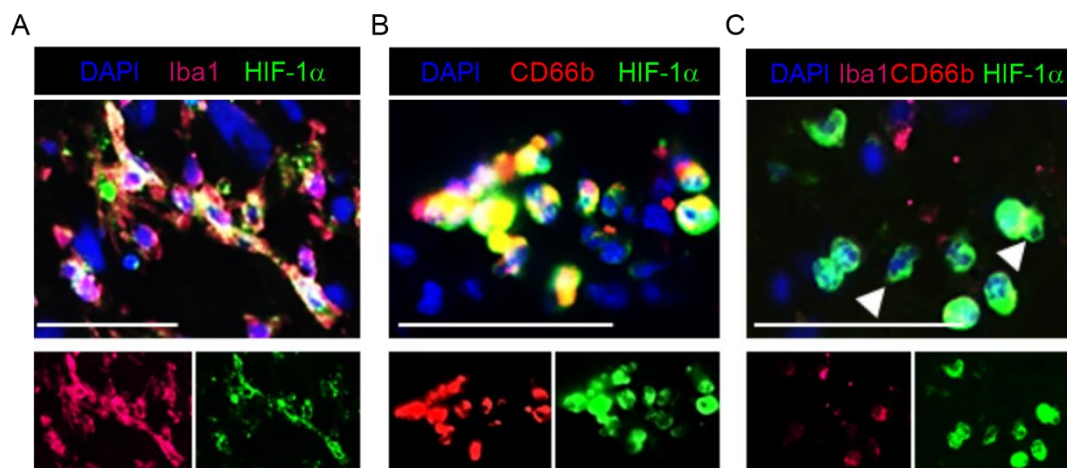
**Abb. 4-21 Expressionsanalyse von CXCR2.** Es zeigte sich kein Unterschied zwischen Kontroll- und Tumorguppen, jedoch ist eine hohe Variabilität in der GBM-*h*PMNL-Gruppe zu beobachten;  $n = 5-7$  pro Gruppe; one-way-ANOVA.

#### 4.6.2 Zuordnung der Expressionsprofile zu Mikroglia/Makrophagen und Granulozyten

Da bei der mRNA-Isolation alle *CD11b*<sup>+</sup> Zellen durch die *Mikrobeads* markiert werden und somit sowohl Granulozyten-mRNA als auch mRNA der Mikroglia/Makrophagen in die Analyse einfließen, wurde die Expression in einem nächsten Schritt über

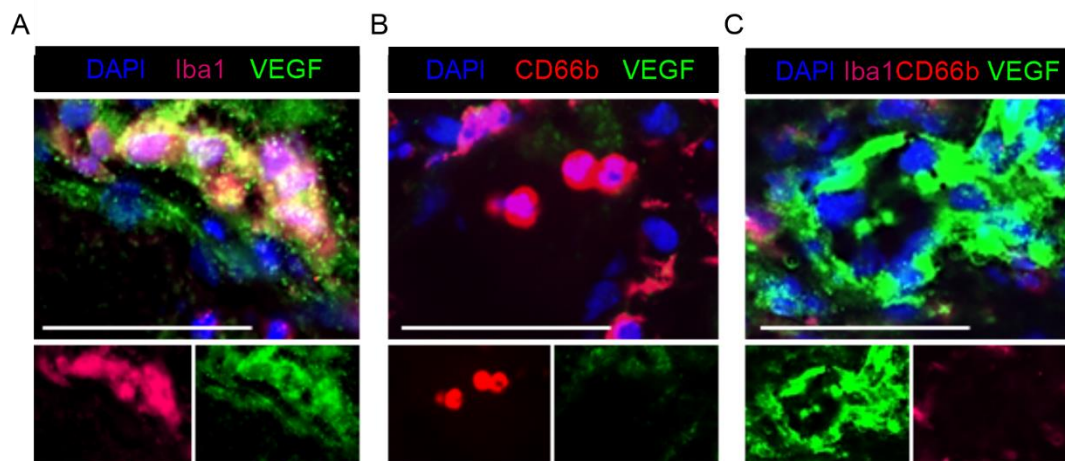
Immunfluoreszenzfärbungen dem jeweiligen Zelltypen zugeordnet. Verwendet wurden dazu Gefrierschnitte der GBM-*hPMNL*-Gruppe. Hierbei wurden auf allen Schnitten Iba1 als Mikroglia/Makrophagen-Marker, CD66b als Granulozyten-Marker, DAPI für Zellkernfärbung und das jeweilige zu untersuchende Molekül (HIF-1 $\alpha$ , VEGF, CXCL2, IL-8 und CD13) gefärbt. Die jeweiligen Antikörper können den Tabellen 3-14 bis 3-19 im Material und Methoden-Teil entnommen werden.

Es zeigte sich, dass HIF-1 $\alpha$  sowohl von Mikroglia/Makrophagen (Abb. 4-22 A) als auch von Granulozyten (Abb. 4-22 B) exprimiert wird. Sowohl Iba1 als auch CD66b negative Zellen zeigten eine Expression dieses Moleküls (Abb. 4-22 C). Hierbei könnte es sich um Tumorzellen handeln, von denen eine HIF1 $\alpha$ -Produktion bereits nachgewiesen wurde [188].



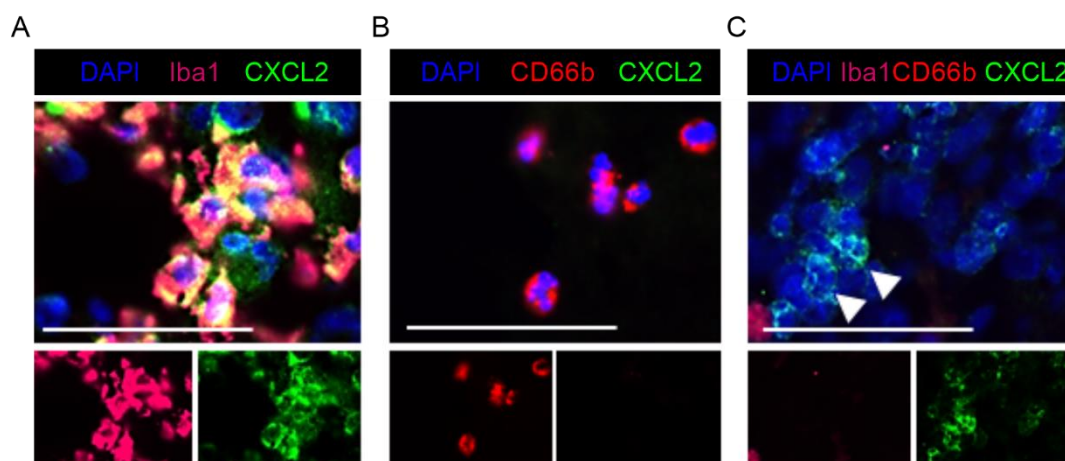
**Abb. 4-22 Expression von HIF-1 $\alpha$ .** (A) Mikroglia/Makrophagen (Iba1<sup>+</sup>) exprimierten HIF-1 $\alpha$  in der GBM-*hPMNL*-Gruppe. (B) Auch bei CD66b<sup>+</sup> Granulozyten konnte eine HIF-1 $\alpha$ -Expression nachgewiesen werden. (C) Einige CD66b<sup>-</sup>Iba1<sup>-</sup> Zellen (weiße Pfeilspitzen) zeigten HIF-1 $\alpha$ -Produktion. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 50  $\mu$ m.

Die Expression von VEGF erfolgte durch Mikroglia/Makrophagen (Abb. 4-23 A), nicht aber durch Granulozyten (Abb. 4-23 B). Im Tumorgewebe zeigten viele Zellen eine Expression, auch wenn sie kein Iba1 oder CD66b exprimierten (Abb. 4-23 C), was vermuten lässt, dass es sich um Tumorzellen handelt [189,190].



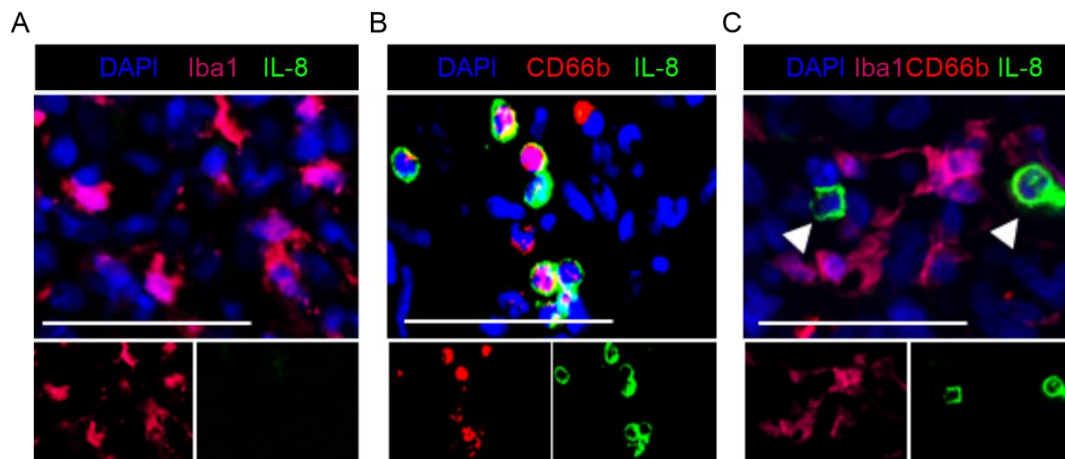
**Abb. 4-23 Expression von VEGF.** (A) Mikroglia/Makrophagen (Iba1<sup>+</sup>) produzierten VEGF in der GBM-*hPMNL*-Gruppe. (B) Granulozyten (CD66b<sup>+</sup>) zeigten keine VEGF-Expression. (C) Auf vielen CD66b<sup>-</sup>Iba1<sup>-</sup> Zellen konnte eine VEGF-Expression nachgewiesen werden. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 50  $\mu$ m.

CXCL2 wurde von Mikroglia/Makrophagen (Abb. 4-24 A) und nur in sehr geringem Umfang von Granulozyten (Abb. 4-24 B) exprimiert. Auch hier zeigten sich einige Zellen, die weder Iba1 noch CD66b positiv waren, aber eine Färbung für CXCL2 aufwiesen (Abb. 4-24 C). Diese Zellen könnten ebenfalls Tumorzellen sein, da eine mögliche CXCL2-Expression auf diesen *in vitro* nachgewiesen wurde [190].



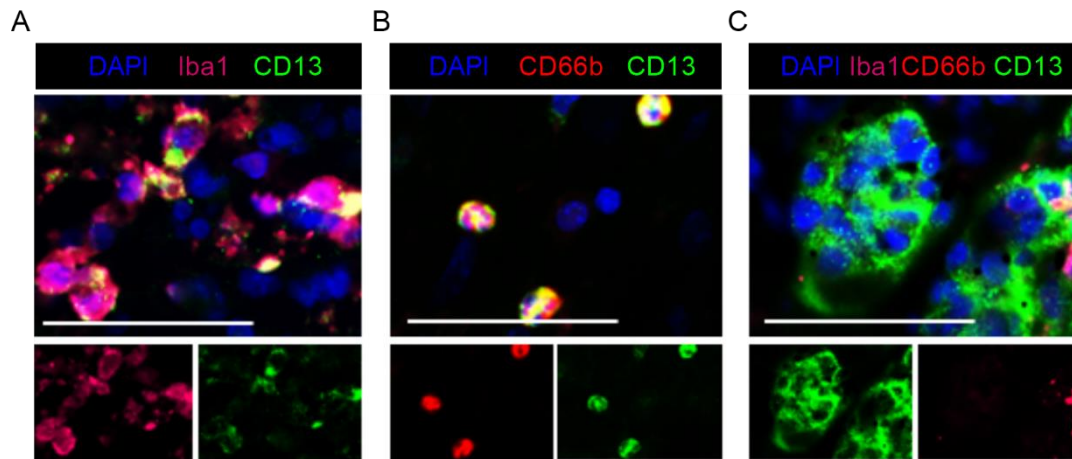
**Abb. 4-24 CXCL2 Expression in der GBM-*hPMNL*-Gruppe.** (A) Iba1<sup>+</sup> Zellen (Mikroglia/Makrophagen) exprimierten CXCL2. (B) CD66b<sup>+</sup> Granulozyten hingegen zeigten meist keine CXCL2-Produktion. (C) Einige CD66b<sup>-</sup>Iba1<sup>-</sup> Zellen (weiße Pfeilspitzen) zeigten eine CXCL2-Expression. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 50 $\mu$ m.

Während Iba1<sup>+</sup> Mikroglia/Makrophagen keine Expression von IL-8 zeigten (Abb. 4-25 A), konnten Granulozyten positiv für das Molekül gefärbt werden (Abb. 4-25 B). IL-8 produzierende Tumorzellen wurden in der Literatur *in vitro* beschrieben und könnten den CD66b<sup>-</sup>Iba1<sup>-</sup>IL-8<sup>+</sup> Zellen (Abb. 4-25 C) entsprechen [191].



**Abb. 4-25 Expression von IL-8.** (A) Mikroglia/Makrophagen (Iba1<sup>+</sup>) exprimieren kein IL-8. (B) Bei CD66b<sup>+</sup> Granulozyten wurde hingegen eine IL-8-Expression beobachtet. (C) Vereinzelt zeigten auch CD66b<sup>-</sup>Iba1<sup>-</sup> Zellen (weiße Pfeilspitzen) die Expression von IL-8. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m.

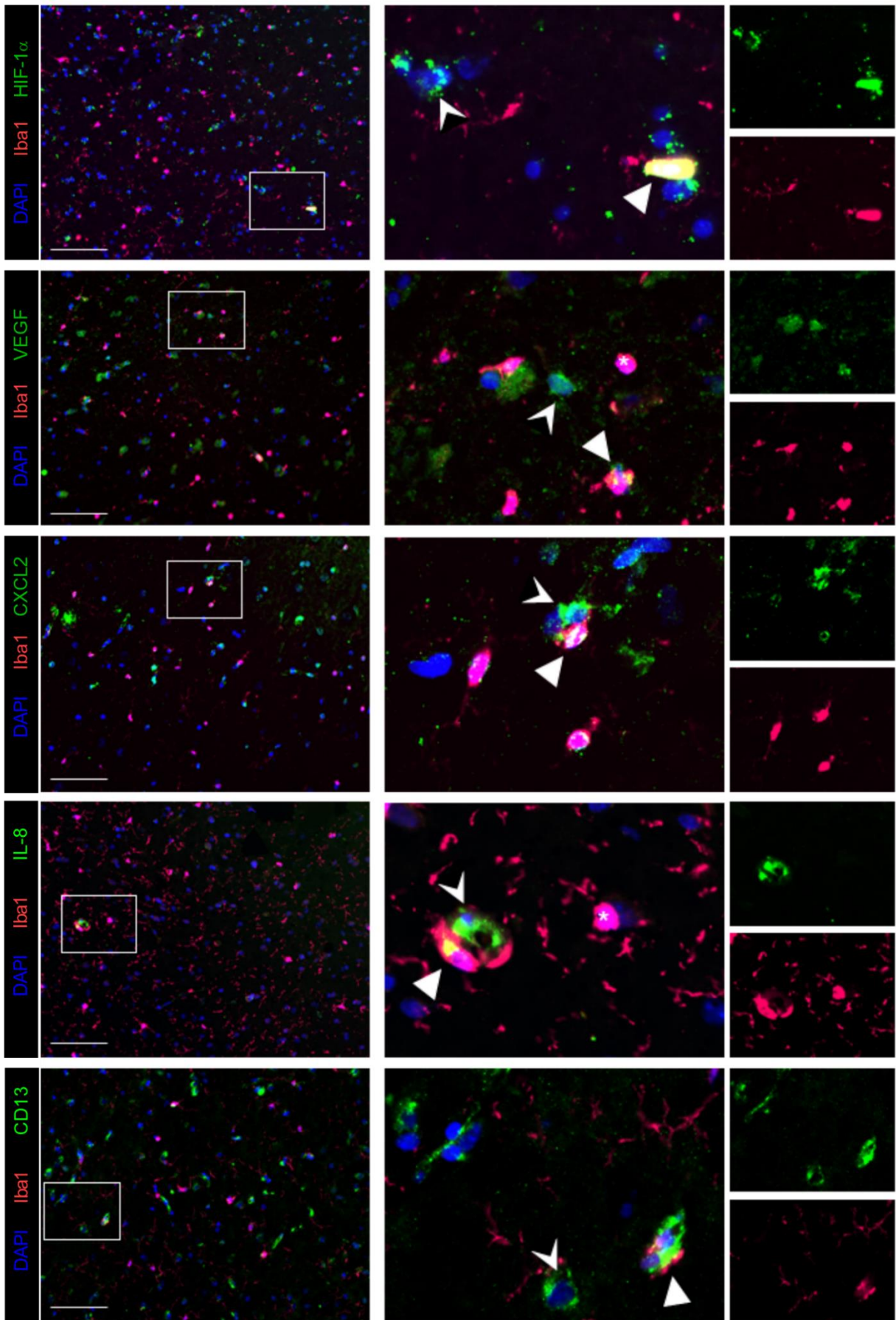
Für CD13 konnte eine Expression sowohl von Mikroglia/Makrophagen (Abb. 4-26 A) als auch von Granulozyten (Abb. 4-26 B) nachgewiesen werden. Es fand sich zudem eine starke Produktion von CD13 in anderen Zellen, die weder CD66b noch Iba1 positiv gefärbt wurden (Abb. 4-26 C). Auch hier könnte es sich um Tumorzellen handeln, da zumindest Tumorstammzellen in anderen Studien die Expression von CD13 zeigten [192].



**Abb. 4-26 Expression von CD13 in der GBM-hPMNL-Gruppe.** (A) Iba1<sup>+</sup>- Zellen (Mikroglia/Makrophagen) exprimieren CD13. (B) Granulozyten (CD66b<sup>+</sup>) zeigten ebenfalls CD13-Expression. (C) Auch CD66b<sup>+</sup>Iba1<sup>-</sup> Zellen zeigten sich positiv für CD13. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 50 µm.

Eine genaue Auszählung des Prozentsatzes der für die proangiogenen Moleküle positiv gefärbten Mikroglia/Makrophagen und Granulozyten in den verschiedenen Gruppen ist im Rahmen der Vorbereitung der Daten zur Veröffentlichung in einem Journal durch Frau Dr. rer. nat. S. Brandenburg erfolgt, wird hier jedoch nicht dargestellt. Hier zeigten sich auch eine Expression der proangiogenen Moleküle in der GBM-/PMNL und A<sup>o</sup>III- Gruppe (Daten hier nicht gezeigt). Auch in der Kontrollgruppe der Epilepsiepatienten konnten einzelne Zellen nachgewiesen werden, die positiv für die proangiogenen Moleküle gefärbt werden konnten. Sehr vereinzelt zeigten auch Mikroglia/Makrophagen eine positive Färbung, meist zeigten die Iba1<sup>+</sup> Zellen jedoch keine Co-Expression (Abb. 4-27). Die Darstellung erfolgte hier zur Diskussion der Kontrollgruppe der Epilepsiepatienten (Abschnitt 5.2.2).





**Abb. 4-27 Expression von proangiogenen Molekülen bei Epilepsiepatienten.** Die meisten Iba1<sup>+</sup> Mikroglia/Makrophagen zeigten keine Co-Expression mit den proangiogenen Molekülen (Übersichtsbilder, links). In der Vergrößerung sind einzelne Zellen dargestellt, die das entsprechende Molekül (grün) exprimieren. Pfeilspitzen zeigen dabei Mikroglia/Makrophagen (Iba1<sup>+</sup>) mit Co-Expression. Es konnten jedoch auch Iba1<sup>-</sup> Zellen nachgewiesen werden, die für das jeweilige proangiogene Molekül gefärbt werden konnten (►). In der Vergrößerung dargestellte Mikroglia/Makrophagen ohne Molekülexpression sind mit (\*) gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

## 4.7 Analyse der Gefäßstruktur

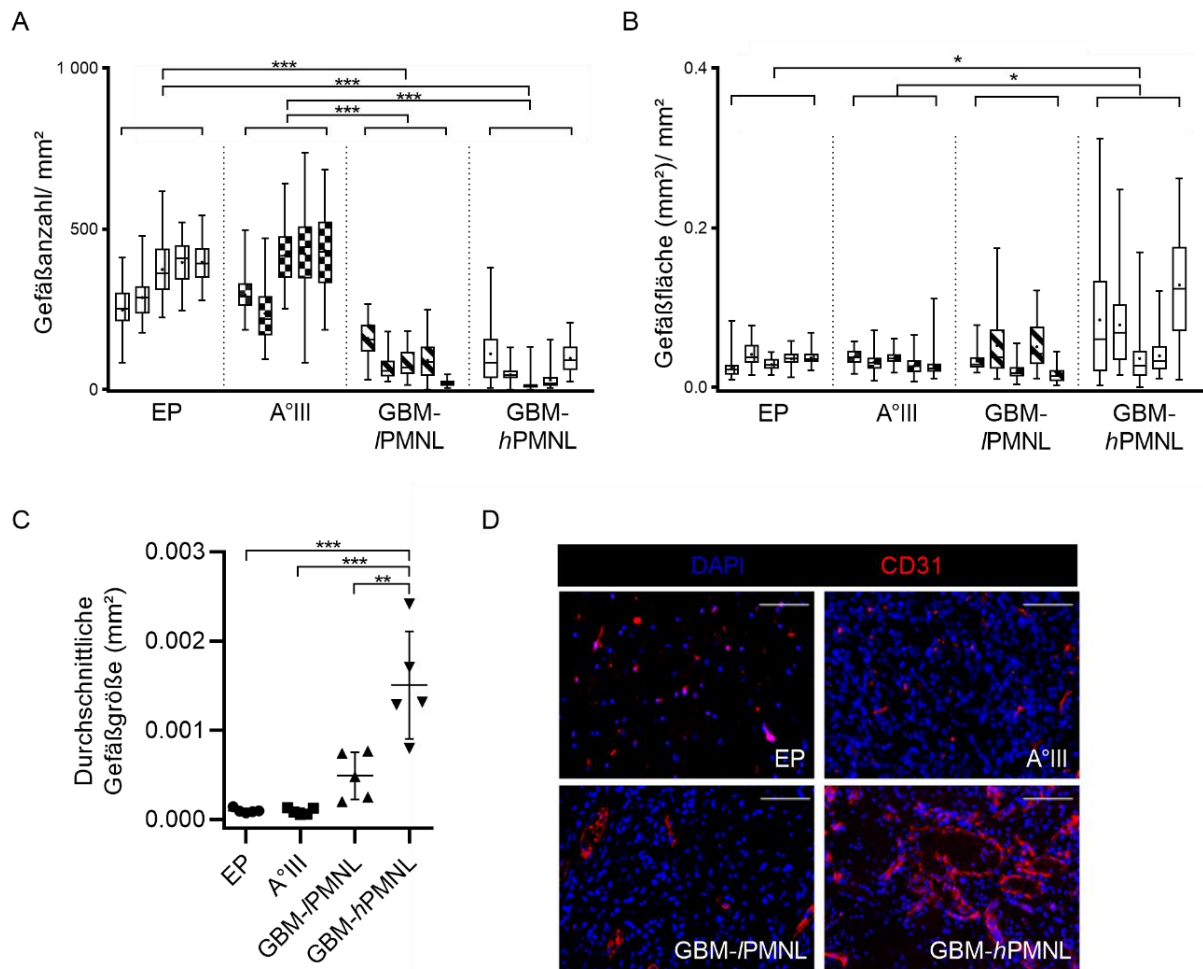
### 4.7.1 Gefäßarchitektur

Glioblastome sind als Tumore mit hoher Gefäßproliferation charakterisiert [12]. Dabei wird häufig von einer Mikrogefäßproliferation gesprochen, teilweise werden jedoch auch Tumormakrogefäße mit Thrombosen beschrieben [25,193–196]. Die Bedeutung der Gefäßarchitektur für das Glioblastom wird dadurch deutlich, dass die WHO-Klassifikation als ein Kriterium für die Diagnose eines <sup>o</sup>IV Astrozytoms die mikrovaskulären Proliferate nennt.

Zur Evaluation des Einflusses des mit dem Granulozyten-Prozentsatz assoziierten unterschiedlichen Aktivierungsstatus und der differenter Expression von angiogenen Molekülen, die von den myeloiden Zellen sezerniert werden, wurden Immunfluoreszenzschnitte von Patienten der GBM-*h*PMNL und GBM-*/*PMNL-Gruppe mit Epilepsie- und Astrozytom <sup>o</sup>III-Patientenproben verglichen. Hier zeigte sich, dass die Gefäßanzahl pro Quadratmillimeter insgesamt in den beiden Glioblastom-Gruppen im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen reduziert war (Abb. 4-28 A). Die Gefäßfläche pro Quadratmillimeter zeigte sich hingegen erhöht (Abb. 4-28 B). Allerdings konnte nur im Vergleich zwischen GBM-*h*PMNL-Gruppe und Epilepsie- und Astrozytom <sup>o</sup>III-Patienten ein signifikanter Unterschied gefunden werden. Bei der Berechnung der mittleren Gefäßfläche pro Quadratmillimeter ergab sich ein deutlich signifikanter Unterschied zwischen GBM-*h*PMNL-Gruppe und allen anderen untersuchten Patientenproben (Abb. 4-28 C). Bei geringerer Gefäßanzahl und leicht erhöhter Gefäßfläche ergeben sich im Mittel größere Gefäße in den GBM-Gruppen. Während in den EP und A<sup>o</sup>III-Proben viele, kleine Gefäße vorherrschen, beginnen sich bei GBM-*/*PMNL-Patienten größere Gefäße zu zeigen, deren Lumen bereits erkennbar



ist. Bei der GBM-*hPMNL*-Gruppe finden sich häufig riesenhafte Tumorgefäße, die teilweise als Konglomerat auftreten (Abb. 4-28 D).

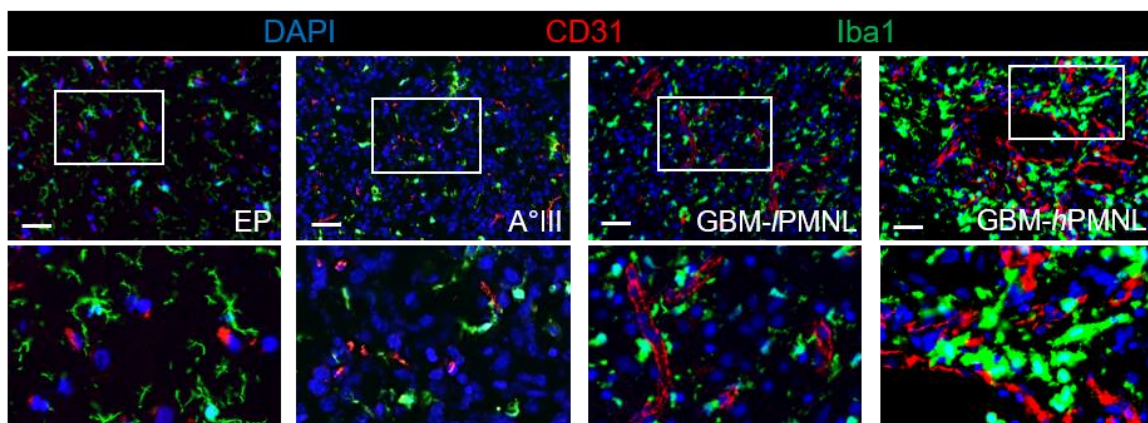


**Abb. 4-28 Analyse der Gefäßstruktur.** (A) Es wird die Verteilung der Gefäßanzahl in Kontroll- und Tumorguppen dargestellt. In beiden GBM-Gruppen konnten weniger Gefäße pro Quadratmillimeter beobachtet werden als in der Epilepsie- und in der Astrozytom <sup>o</sup>III-Gruppe ( $p < 0,0001$  für alle vier Analysen). (B) Die Gefäßfläche war in der GBM-*hPMNL*-Gruppe im Vergleich zu EP ( $p = 0,0483$ ) und A<sup>o</sup>III ( $p = 0,037$ ) vergrößert, wobei zwischen GBM-*IPMNL* und GBM-*hPMNL* kein signifikanter Unterschied bestand ( $p = 0,0568$ ). (C) Wird die durchschnittliche Gefäßgröße bestimmt, wird jedoch ein Unterschied deutlich: Die GBM-*hPMNL*-Proben weisen zwar weniger, dafür aber größere Gefäße auf als EP ( $p < 0,0001$ ), A<sup>o</sup>III ( $p < 0,0001$ ) und GBM-*IPMNL* ( $p = 0,001$ ). Für die dargestellten Analysen (A-C) wurden pro Gruppe jeweils 5 Proben verwendet, 2-5 Schnitte pro Patient und mindestens 29 Bilder ausgezählt; one-way-ANOVA. (D) Beispielhafte Darstellung der typischen Gefäßarchitektur in den untersuchten Gruppen in DAPI/CD31-Färbung, der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m.

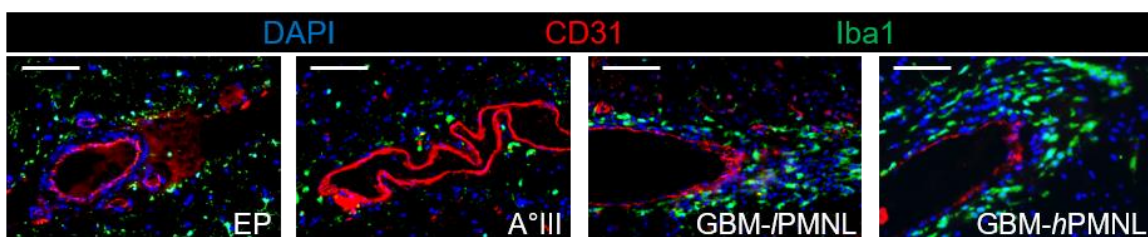
#### 4.7.2 Assoziation von Mikroglia/Makrophagen und Gefäßen

Bereits in mehreren Studien wurde der Einfluss von Mikroglia/Makrophagen auf die Angiogenese im Glioblastom untersucht. Zuletzt wurde im Mausmodell beschrieben, dass sich auch die Verteilung der im Tumor angereicherten Mikroglia/Makrophagen im Verlauf der Tumorprogression ändert. Hier konnte gezeigt werden, dass sich nach fünf Wochen eine Assoziation der Zellen zu den Gefäßen abzeichnet [194]. Eine solche Untersuchung ist beim Menschen per se nicht möglich. Dennoch sollte die Assoziation zwischen Iba1<sup>+</sup> Zellen und Gefäßen auch in dieser Studie untersucht werden, um die Korrelation der Zellen zur Angiogenese zu analysieren. Die Gefäße wurden auf Gefrierschnitten mittels CD31 angefärbt und jene Gefäße gezählt, die mit mindestens zwei Mikroglia/Makrophagen (Iba1<sup>+</sup> Zellen) direkten Kontakt hatten. Hierbei zeigte sich schon bei der Betrachtung, dass Mikroglia/Makrophagen in den verschiedenen Patientengruppen unterschiedlich in Kontakt zu den Gefäßen treten (Abb. 4-29 A).

A



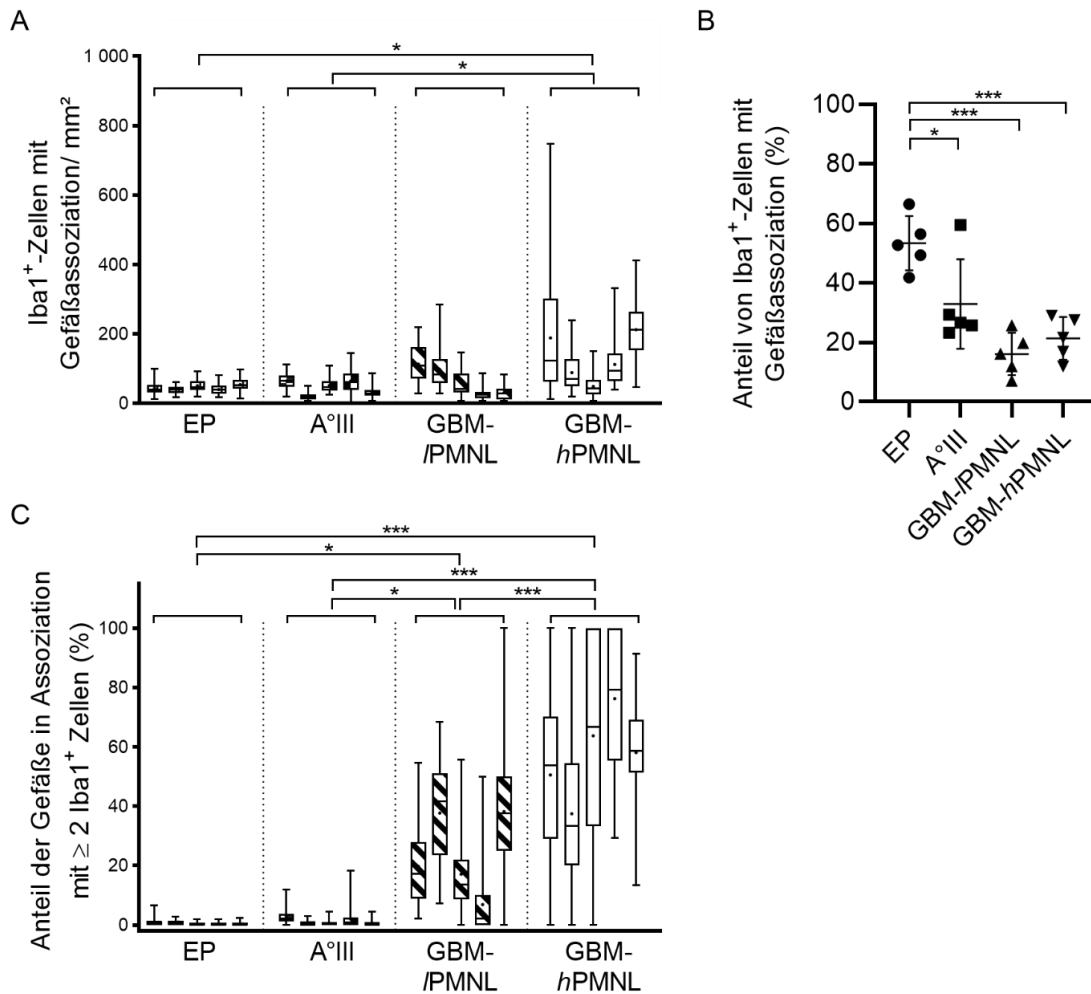
B



**Abb. 4-29 Beispielhafte Darstellung der Assoziation von Mikroglia/Makrophagen und Gefäßen.** (A) Exemplarische Darstellung der Mikroglia/Makrophagen-Gefäßinteraktion in Übersicht (oben) und in Vergrößerung relevanter Bereiche (unten). Die Gefäße wurden mit CD31 (rot) dargestellt, die Mikroglia/Makrophagen mittels Iba1 (grün); der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (B) Mikroglia/Makrophagen (Iba1<sup>+</sup>) in GBM-Proben akkumulieren um die Gefäße herum, während diese Assoziation bei EP und A°III nicht zu beobachten ist. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Dabei fiel gerade in der GBM-*h*PMNL-Gruppe auf, dass sie oftmals charakteristische ringförmige Strukturen um die Tumorgefäße bilden (Abb. 4-29 B). Diese Strukturen konnten in der GBM-/PMNL-Gruppe nicht in dieser Intensität beobachtet werden. Auch bei vergleichbar großen Gefäßen in der Epilepsiegruppe oder in Astrozytom °III-Proben konnte diese spezifische Anordnung der Iba<sup>+</sup> Zellen nicht beobachtet werden.

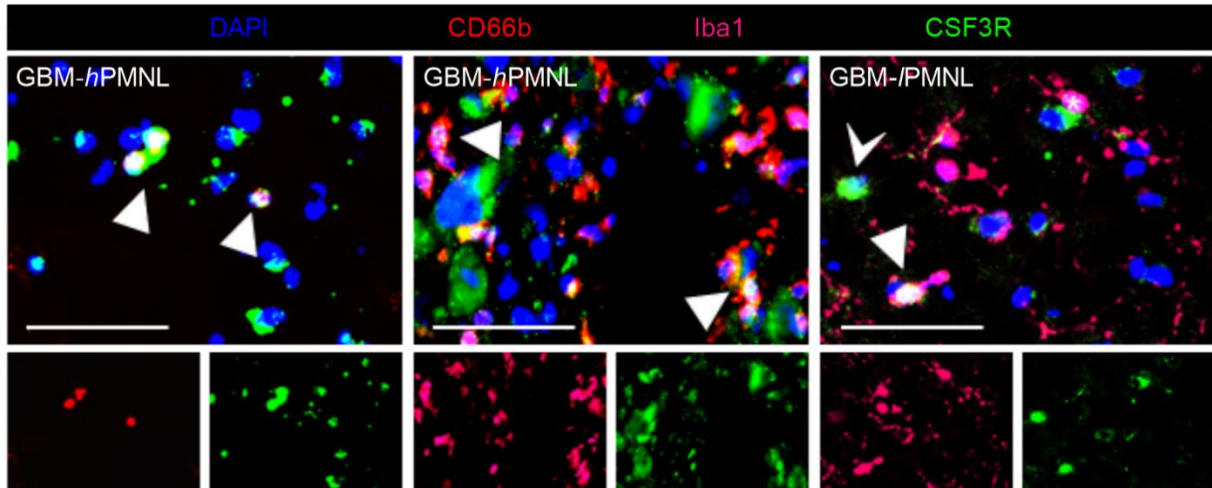
Die genauere Analyse ergab einen signifikanten Unterschied in Hinblick auf die Anzahl der Iba1<sup>+</sup> Zellen mit Gefäßkontakt der GBM-*h*PMNL-Gruppe im Vergleich zu Epilepsie- und Astrozytom °III-Patienten. Bei großer intratumoraler Varianz zeigte sich hier dennoch eine weitaus größere Zahl an Mikroglia/Makrophagen in Kontakt mit den Gefäßen (Abb. 4-30 A). Aufgrund des zuvor beschriebenen Anstieges der Mikroglia/Makrophagen-Anzahl im GBM-*h*PMNL-Gewebe ist zu beobachten, dass der prozentuale Anteil von Mikroglia/Makrophagen, die in Kontakt mit den Gefäßen treten, allerdings erniedrigt ist (Abb. 4-30 B). Dies lässt sich auch an dem gezeigten Beispielbild (Abb. 4-29 B) gut visualisieren, da die Mikroglia/Makrophagen sich zwar um das Gefäß gruppieren, ein Großteil von ihnen jedoch im untersuchten Schnitt des Gewebes keinen direkten Kontakt zur mit CD31 gefärbten Gefäßstruktur aufnehmen kann. Andersherum betrachtet zeigte sich aber auch ein gesteigerter Anteil der Gefäße, die Kontakt mit Mikroglia/Makrophagen aufwiesen (Abb. 4-30 C). Hier zeigte sich nicht nur eine Zunahme innerhalb der GBM-Gruppen im Vergleich zu Kontrollgruppe und Astrozytom °III-Gruppe, sondern auch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Glioblastompatientengruppen. Insgesamt deuten die erhobenen Daten erneut auf eine mit Malignität des Tumors zunehmende Gefäßinteraktion der Iba1<sup>+</sup> Zellen sowie auf eine unterschiedliche angiogene Aktivität der Mikroglia/Makrophagen in Abhängigkeit vom Anteil der infiltrierenden Granulozyten hin.



**Abb. 4-30 Analyse der Assoziation von Mikroglia/Makrophagen und Gefäßen.** (A) Es kommt in der GBM-*h*PMNL-Gruppe zu einer Zunahme der absoluten Zahl von Mikroglia/Makrophagen, die mit Gefäßen interagieren. Der Unterschied zeigt sich im Vergleich zu EP ( $p = 0,0288$ ) und A°III ( $p = 0,0306$ ) signifikant. (B) Betrachtet man den prozentualen Anteil der Iba1<sup>+</sup> Zellen mit Gefäßkontakt, sinkt dieser in allen Tumorgruppen im Vergleich zu EP (A°III  $p = 0,0342$ ; GBM-*l*PMNL  $p = 0,0002$ ; GBM-*h*PMNL  $p = 0,0008$ ). (C) Der Anteil der Gefäße mit Kontakt zu  $\geq 2$  Iba1<sup>+</sup> Zellen steigt in beiden GBM-Gruppen im Vergleich zu EP ( $p_{\text{GBM-}l\text{PMNL}} = 0,0188$  und  $p_{\text{GBM-}h\text{PMNL}} < 0,0001$ ) sowie A°III ( $p_{\text{GBM-}l\text{PMNL}} = 0,0149$  und  $p_{\text{GBM-}h\text{PMNL}} < 0,0001$ ) an und ist auch zwischen GBM-*h*PMNL und GBM-*l*PMNL signifikant unterschiedlich ( $p = 0,0005$ ). Für alle statistischen Auswertungen dieser Abbildung gilt:  $n = 5$  je Gruppe, mindestens 29 Bilder je Patientenprobe; one-way-ANOVA.

#### 4.8 Rekrutierung von Granulozyten ins humane Glioblastom

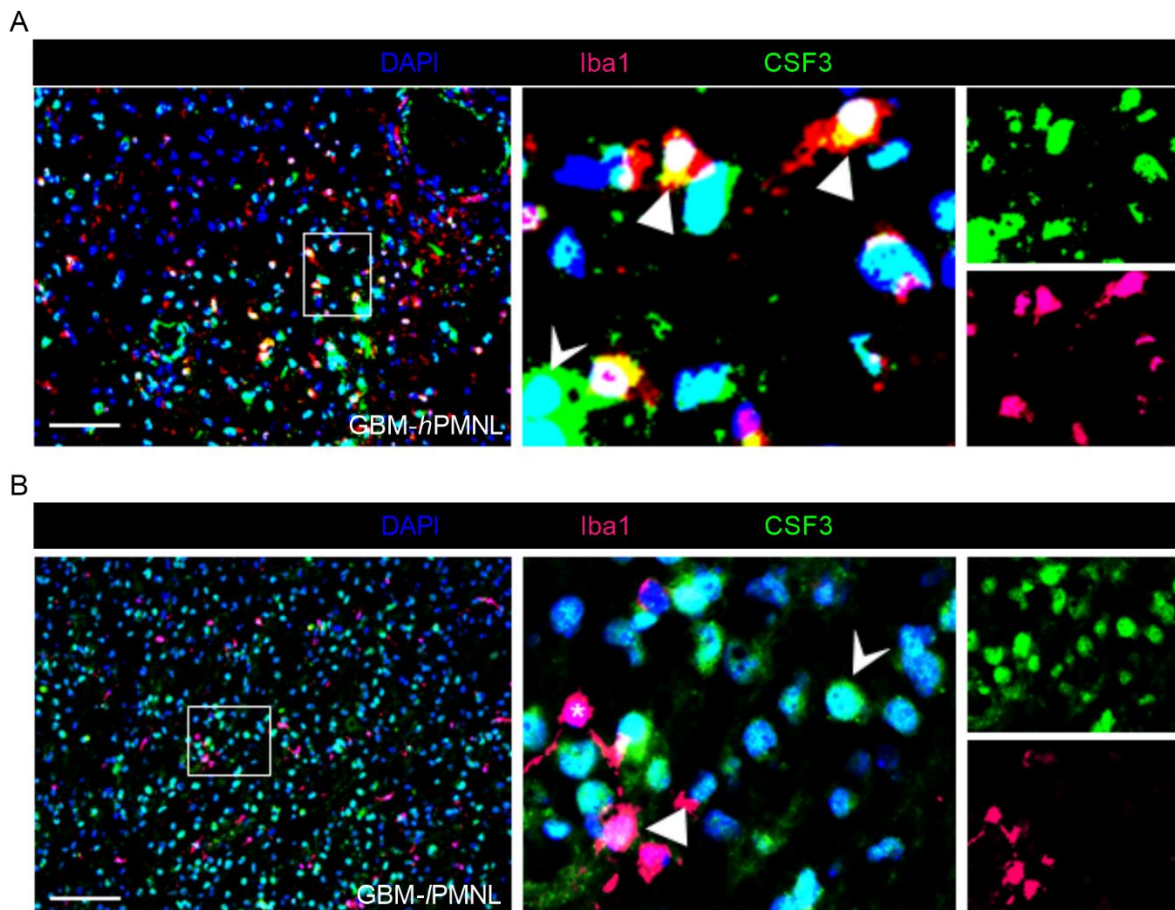
Neben Zytokinen mit ELR-Motiv, zu denen auch das in dieser Studie untersuchte CXCL2 und IL-8 zählen, werden G-CSF und GM-CSF für die Rekrutierung von Granulozyten verantwortlich gemacht [110]. Die erhöhte Expression von CXCL2 und IL-8 durch Mikroglia/Makrophagen beziehungsweise Granulozyten wurde bereits unter Abschnitt 4.6.2 beschrieben. Mikroglia/Makrophagen können damit ebenso wie Tumorzellen zur Rekrutierung von Granulozyten beitragen, wie diese über IL-8-Produktion auch ihre eigene Chemotaxis steuern können. Die Expression von GM-CSF ist in Glioblastomen bereits ausführlich beschrieben worden und es handelt sich zudem um ein Molekül, welches sowohl auf Mikroglia/Makrophagen als auch Granulozyten wirken kann [197,198]. Somit beschränkten wir uns im Rahmen dieser Studie auf CSF3, welches vorwiegend auf Granulozyten einwirkt. Es wurden Immunfluoreszenzschnitte angefertigt, auf denen der Rezeptor von CSF3, CSF3R, gefärbt wurde. Wie angenommen exprimierten die Granulozyten CSF3R (Abb. 4-31). Jedoch konnte auch eine Expression des Rezeptors auf Mikroglia/Makrophagen nachgewiesen werden. Diese Expression trat vor allem in GBM-*h*PMNL-Proben auf.



**Abb. 4-31 Exemplarische Darstellung der CSF3R-Expression.** In der GBM-*h*PMNL-Gruppe konnte die Expression von CSF3R sowohl für Granulozyten (CD66b<sup>+</sup>; links) als auch für Mikroglia/Makrophagen (Iba1<sup>+</sup>; Mitte) nachgewiesen werden (Pfeilspitzen). Auch in der GBM-/PMNL-Gruppe (rechts) konnte CSF3R detektiert werden. Hier zeigten sich sowohl einige Mikroglia/Makrophagen (Pfeilspitze) als auch andere, Iba1<sup>-</sup> Zellen (▶) gefärbt. Es wurden jedoch auch Iba1<sup>+</sup>CSF3R<sup>-</sup> Zellen detektiert (\*). Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.



Zudem konnte gezeigt werden, dass Mikroglia/Makrophagen ebenfalls in der Lage sind CSF3 zu exprimieren (Abb. 4-32). Hier konnte eine Expression sowohl in der GBM-*h*PMNL- (Abb. 4-32 A), als auch in der GBM-*/*PMNL-Gruppe (Abb. 4-32 B) gefunden werden. Da es zunächst so schien, als könnte ein Unterschied zwischen der GBM-*/*PMNL- und GBM-*h*PMNL-Gruppe bezüglich der CSF3-Expression bestehen und dies somit einer der Faktoren sein, die zu einem vermehrten Influx von Granulozyten führen könnten, wurde in Vorbereitung der Veröffentlichung der Daten in einem Journal von anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe zusätzliche Experimente mittels Westernblot auch in Hinblick auf die CSF3-Expression durchgeführt. Da sich dort jedoch keine Unterschiede zwischen GBM-*/*PMNL und GBM-*h*PMNL detektieren ließen (Daten hier nicht gezeigt), wurde auch im Rahmen dieser Arbeit auf eine Auszählung und genauere Analyse der CSF3 exprimierenden Zellen verzichtet.



**Abb. 4-32 Expression von CSF3.** (A) Exemplarische Darstellung der Expression von CSF3 in der GBM-*h*PMNL-Gruppe als Übersicht (links) und in Vergrößerung. Iba1<sup>+</sup> Mikroglia/Makrophagen exprimierten CSF3 (Pfeilspitzen). Zudem konnten Iba1<sup>-</sup> Zellen detektiert werden, die CSF3 exprimierten (▶). (B) In der GBM-*/*PMNL-Gruppe konnten in der Übersicht (links) ebenfalls CSF3<sup>+</sup> Zellen gefunden werden. Diese ließen sich in der

Vergrößerung (Mitte) ebenfalls als Iba1<sup>+</sup> Mikroglia/Makrophagen (Pfeilspitzen) als auch andere Zellen (Iba1<sup>-</sup>) identifizieren. Zusätzlich erschienen einige Iba1<sup>+</sup> Zellen CSF3<sup>-</sup> (\*). Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

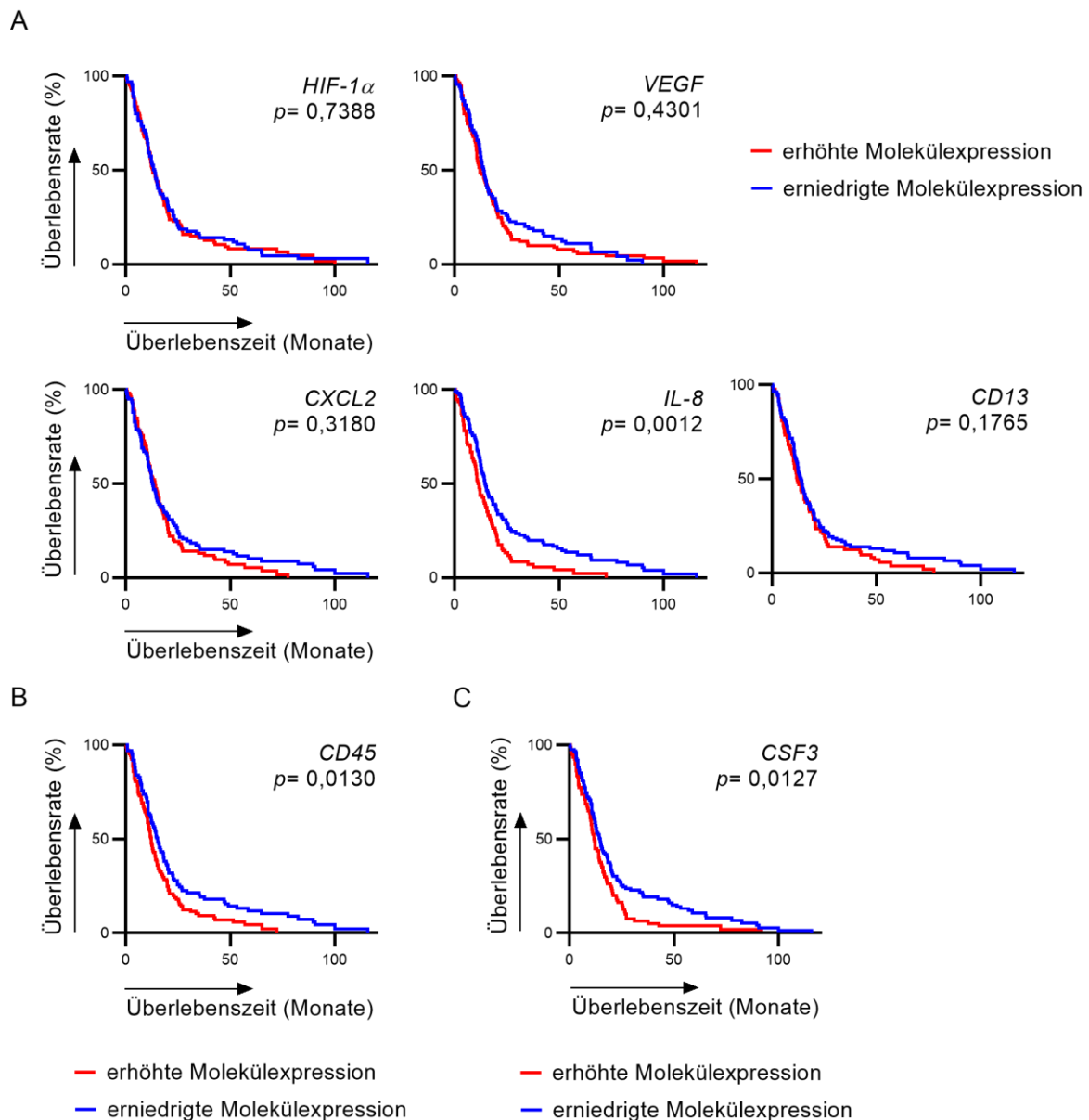
#### 4.9 Analyse der klinischen Relevanz von angiogenen Faktoren und Granulozytenfraktion anhand von Überlebenskurven

Da die Patientenkohorte in dieser Studie relativ klein war, wurden online verfügbare Analyseportale genutzt, um eine mögliche Relevanz der Ergebnisse dieser Studie für das Überleben von Glioblastom-Patienten abzuschätzen. Für die Einordnung der klinischen Relevanz der Expression der proangiogenen Faktoren wurde dafür das online verfügbare Analysetool *Cbioportal* herangezogen. Dort sind mehrere Studien und deren Ergebnisse hinterlegt und können für eigene zielgerichtete Analysen genutzt werden. Für die folgenden Analysen wurde die TCGA Datenbank mit der *TCGA Provisional* Glioblastom Studie genutzt. Zu beachten ist jedoch bei allen Analysen mithilfe dieser Datenbank, dass dort das gesamte Zellgemisch des Tumors auf seine RNA-Expression hin untersucht wurde, während in dieser Arbeit CD11b<sup>+</sup> Zellen isoliert, die RNA dieser Zellen isoliert und dann die Regulation der Moleküle untersucht wurde.

Es wurden sowohl die Kaplan-Meier-Überlebenskurven für die klassischen proangiogenen Moleküle *HIF-1α* und *VEGF*, als auch die alternativen proangiogenen Faktoren *CXCL2*, *IL-8* und *CD13* generiert (Abb. 4-33 A). Es zeigte sich nur für *IL-8* eine statistisch signifikante Abweichung zwischen höherer und niedriger Expression von *IL-8* im Tumor, wobei jene Patienten mit einer niedrigeren *IL-8*-Expression einen Überlebensvorteil hatten. Dies würde am ehesten jenen Patienten der GBM-/PMNL-Gruppe entsprechen.

*CD45* wird nicht von Glioblastomzellen exprimiert. Die Analyse hatte zum Ziel zu untersuchen, ob die Akkumulation CD45<sup>+</sup> Zellen im Tumor eine Auswirkung auf das Überleben der Patienten zeigt (Abb. 4-33 B). Hier konnte ein signifikant kürzeres Überleben bei jenen Patienten festgestellt werden, in deren Proben überdurchschnittlich viel *CD45* – und damit auch Mikroglia/Makrophagen und Neutrophile – nachweisbar war. Jedoch zählen auch Lymphozyten zu den CD45<sup>+</sup> Zellen und konnten auf diesem Wege nicht klar von den anderen Immunzellen differenziert werden.

Zur Vervollständigung der Untersuchung wurde auch der Einfluss von *CSF3* als Rekrutierungsfaktor für Granulozyten auf das Überleben der Patienten analysiert. Auch hier fand sich ein signifikanter Unterschied, der mit einem Überlebensvorteil für Patienten mit niedrigerer *CSF3*-Expression einherging (Abb. 4-33 C).



**Abb. 4-33 Analyse von Überlebensdaten.** (A) Darstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven für die untersuchten proangiogenen Moleküle. Hier konnte nur für *IL-8* ein signifikanter Überlebensvorteil bei niedriger Expression gezeigt werden. (B) Analyse der Überlebensdaten für *CD45*. Es zeigte sich ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben der Patienten bei höherer Expression. (C) Analyse von *CSF3* als Rekrutierungsfaktor für Granulozyten. Patienten mit niedrigerer Molekülexpression hatten einen signifikanten Überlebensvorteil. Für alle Analysen wurden die Datensätze der TCGA-Databse mit 206

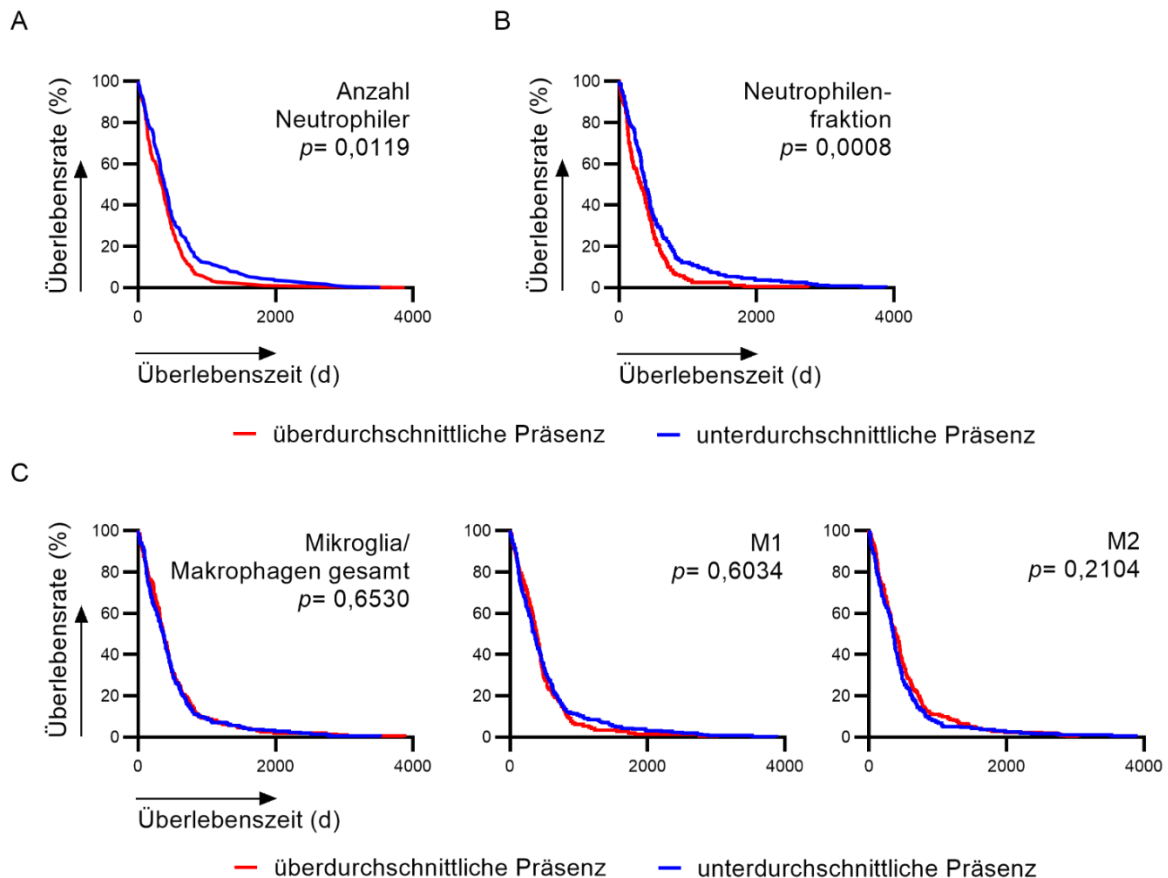


verfügbaren Patientendatensätzen für mRNA aus dem *Cbioportal* verwendet [149,150]. Dabei konnten unterschiedlich viele Patienten in die Gruppe mit erhöhter und erniedrigter Molekülexpression einbezogen werden (Molekül( $n_{\text{erhöht}}/n_{\text{erniedrigt}}$ )): *HIF-1 $\alpha$*  (105/101); *VEGF* (115/91); *CXCL2* (100/106); *IL-8* (96/110); *CD13* (79/127); *CD45* (99/107); *CSF3* (80/126). Mantel-Cox-Test. Die Gruppeneinteilung in erhöhte und erniedrigte Molekülexpression erfolgte anhand des Mittelwertes (*HIF-1 $\alpha$*  = 0,0073; *VEGF* = -0,0225; *CXCL2* = -0,0111; *IL-8* = 0,0085; *CD13* = -0,0163; *CD45* = -0,00997; *CSF3* = -0,0099) der gesamten Expressionsdaten des jeweiligen untersuchten Moleküls.

Zudem konnte über das *online-tool* CIBERSORT aufgrund der Genexpression ein Rückschluss auf die prozentuale Verteilung der Immunzellfraktionen in den TCGA-Tumoren erfolgen [151]. Hier zeigte sich, dass für Patienten mit niedrigerer absoluter Anzahl von neutrophilen Granulozyten in der Probe ein signifikanter Überlebensvorteil besteht (Abb. 4-34 A). Um eine Vergleichbarkeit zu den zuvor in dieser Studie erhobenen Daten zu schaffen, in der die Granulozyten nicht als Anteil der gesamten Zellen in der Probe, sondern als Anteil der CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellfraktion betrachtet werden, wurde eine zweite Analyse durchgeführt, in der zunächst der Anteil der Granulozyten an der Gesamtpopulation von CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen ermittelt wurde (Abb. 4-34 B). Es zeigte sich eine noch ausgeprägtere statistische Signifikanz zwischen erhöhter Granulozytenfraktion und kürzerer Überlebenszeit. Die Einteilung in die Gruppe mit höherer und niedrigerer Fraktion erfolgte dabei simultan zur Einteilung der Patientenproben zur Differenzierung nach GBM-/PMNL und GBM-*h*PMNL anhand des Mittelwertes (9,44%) aller Proben.

Neben der Granulozytenfraktion erlaubte der Datensatz von CIBERSORT auch eine Differenzierung der Mikroglia/Makrophagen und auch der M1 und M2-Polarisation. Diese wurden ebenfalls auf ihre Relevanz für das Überleben der Patienten analysiert (Abb. 4-34 C). Es zeigten sich jedoch keine relevanten Unterschiede zwischen erhöhtem oder erniedrigtem Vorkommen der Zellpopulation und dem Überleben der Patienten.

Zusammenfassend konnte also ein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit niedrigerer Granulozytenfraktion und verminderter Expression des vorwiegend von Granulozyten produzierten IL-8 gezeigt werden, was den Ergebnissen dieser Studie klinische Relevanz verleiht.



#### Abb. 4-34 Kaplan-Meier-Überlebenskurven mit Analyse der Zellpopulationen.

(A) Darstellung der Überlebenskurve in Abhängigkeit von der absoluten Zahl der neutrophilen Granulozyten im Gewebe. Es ergab sich ein Überlebensvorteil für Patienten, in deren Tumorgewebe weniger Granulozyten vorhanden waren. (B) Auch mit dem Anteil der Neutrophilen an der Gesamtheit der CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen konnte ein Überlebensvorteil korreliert werden. (C) Für die Anzahl der Mikroglia/Makrophagen und die Verteilung der M1/M2-Polarisation konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Die Unterteilung der Patienten in eine Gruppe mit höherer oder niedrigerer Präsenz der Zellpopulationen erfolgte jeweils nach dem Mittelwert der zu betrachtenden Zellfraktion (Mittelwert<sub>Neutrophile</sub> = 0,044; Mittelwert<sub>Neutrophilenfraktion</sub> = 9,44%; Mittelwert<sub>Mikroglia/Makrophagen</sub> = 0,466; Mittelwert<sub>M1</sub> = 0,03; Mittelwert<sub>M2</sub> = 0,35. Für die Analyse wurden jeweils 521 Patientendatensätze einbezogen. Dabei konnten unterschiedlich viele Patienten in die Gruppe mit über- und unterdurchschnittlicher Präsenz der jeweiligen Zellpopulation einbezogen werden (Zellpopulation (n<sub>überdurchschnittlich</sub>/n<sub>unterdurchschnittlich</sub>)): Anzahl Neutrophiler (231/290); Neutrophilenfraktion (207/313); Mikroglia/Makrophagen gesamt (267/254); M1 (184/337); M2 (282/239).

## 5 Diskussion

### 5.1 Distinktion von Zellpopulationen

Im Glioblastom akkumulieren myeloide Zellen, zu denen auch Mikroglia, Makrophagen und Neutrophile zählen. Da die Gesamtheit der myeloiden Zellen durch eine Expression von CD11b und CD45 gekennzeichnet ist, gestaltet sich eine Differenzierung mitunter schwierig. So wurde versucht, Marker zu definieren, die eine eindeutige Unterscheidung der Zellpopulationen ermöglichen. Die Unterteilung von Mikroglia und Makrophagen wurde beispielsweise durch ein Experiment im Rattenmodell von Sedgwick *et al.* 1991 anhand der unterschiedlich stark ausgeprägten Expression von CD11b und CD45 vorgenommen. Dort zeigten sich zwei Zellfraktionen (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup> und CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup>), welche im Tiermodell als Mikroglia (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>) und infiltrierenden Makrophagen aus dem Blut (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup>) gedeutet wurden [43,199]. Teilweise wurde auch eine dritte Zellpopulation eingeführt, die ein intermediäres Expressionsmuster zeigt [200]. Es wurde versucht, dies vom Nagetiermodell auf das humane System zu übertragen, jedoch auch mehrfach diskutiert, da unter anderem das Auftreten von Inflammation die Unterscheidung der Fraktionen erschweren könnte und in einem Maus-Chimären-Tumormodell zudem gezeigt werden konnte, dass Mikroglia selbst in der Lage sind, CD45 in verschiedenen Intensitäten zu exprimieren [75,201]. In dieser Arbeit wurde eine CD11b<sup>high</sup>CD45<sup>low</sup>- und eine CD11b<sup>low</sup>CD45<sup>high</sup>-Zellpopulation identifiziert (Abb. 4-1 B). Jedoch konnte über den Nachweis der Expression von CD66b in der CD11b<sup>high</sup>CD45<sup>low</sup> und Iba1 in der CD11b<sup>low</sup>CD45<sup>high</sup>-Fraktion gezeigt werden, dass es sich hierbei nicht um die im Rattenmodell beschriebenen Populationen handeln kann, sondern die CD66b<sup>+</sup> Zellen Neutrophilen entsprechen, während die CD11b<sup>low</sup>CD45<sup>high</sup>Iba1<sup>+</sup> Zellen als Mikroglia/Makrophagen zusammengefasst werden können (Abb. 4-1 E).

Es wurde in anderen Studien nach weiteren Markern gesucht, die eine eindeutige Differenzierung der myeloiden Zellen ermöglichen. Iba1 färbt Zellen monozytärer Linien wie Makrophagen, Mikroglia aber auch TEMs (*TIE2 expressing monocytes*) an [202]. Ein neu postulierter spezifischer Mikroglia-Marker, TMEM119, soll zwar nur Mikroglia anfärben, jedoch auch nur einen Teil von diesen, so dass im Anschluss wieder nicht klar wäre, ob die nicht gefärbten Zellen Makrophagen entsprechen oder der nicht anfärbbaren Mikroglia-Restpopulation [164]. Eine Unterscheidung der Mikroglia und Makrophagen im humanen GBM erscheint zum jetzigen Zeitpunkt nicht

zweifelsfrei möglich [63,203].

Im Rahmen dieser Studie wurde deswegen auf eine Trennung von Mikroglia und Makrophagen verzichtet, da beide Zellpopulationen eine ähnliche Funktion wahrnehmen können und letzten Endes zunächst eine Partizipation der myeloiden Zellpopulation an der Expression alternativer proangiogener Faktoren im humanen Glioblastom an sich nachgewiesen und untersucht werden sollte. Weitere Studien können anhand validierter Distinktionsmarker, sofern in Zukunft vorhanden, genutzt werden, um eine genauere Differenzierung vorzunehmen.

Zudem konnte noch eine Zellart identifiziert werden, die einen protumoralen Einfluss über Angiogenese ausübt: TEMs [204]. TEMs werden teilweise auch als TIE2 exprimierende Makrophagen bezeichnet und stellen eine eigene Zellpopulation dar, die jedoch ebenso aus noch undifferenzierten myeloiden Vorläuferzellen hervorgeht [205,206]. Sie können über Genexpression von anderen Zellen unterschieden werden [207]. Auch TIE2 exprimierende Zellen konnten in dieser Arbeit - vor allem in der GBM-*hPMNL*-Gruppe - nachgewiesen werden (Abb. 4-14 B). Dies könnte auf einen vermehrten Influx von TEMs zurückzuführen sein. Auffällig ist, dass sie in der Literatur als CD14<sup>+</sup> bezeichnet werden (Tab. 5-1), wohingegen in dieser Arbeit nur ein geringer Anteil von 11,81% der CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen in der GBM-*hPMNL*-Gruppe CD14 exprimierte (Abb. 4-12 C). Aufgrund der hohen TIE2-Expression von etwa 80% der Iba1<sup>+</sup> Mikroglia/Makrophagen in der GBM-*hPMNL*-Gruppe scheint es unwahrscheinlich, dass alle TIE2 exprimierenden Zellen CD14<sup>+</sup> TEMs entsprechen. Hier könnte eine zweite, CD14-TIE2<sup>+</sup> Population vorliegen, die in zukünftigen Studien genauer charakterisiert werden müsste oder residente Mikroglia könnten aufgrund spezifischer Stimuli zur Expression von TIE2 angeregt worden sein. Unterschiede der Zusammensetzung der TEMs in GBM-*PMNL*- und GBM-*hPMNL*-Gruppe könnten ebenfalls vorliegen und Gegenstand weiterführender Studien sein, in denen zum Beispiel anhand von Genexpressionspanels Subpopulationen definiert werden könnten.

Neben den Mikroglia/Makrophagen wurden CD66b<sup>+</sup> Neutrophile in dieser Studie als in ihrem Vorkommen variierender Bestandteil der myeloiden Zellpopulation im humanen Glioblastom identifiziert (Abb. 4-1 A, 4-1 B und 4-4). Granulozyten als Bestandteil der myeloiden Zellpopulation wurden im GBM zwar bereits beschrieben [48], jedoch nicht in die Diskussion um die CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellpopulationen einbezogen. Neben Neutrophilen existieren auch sogenannte MDSC (*myeloid-derived suppressor cells*),

die teilweise wiederum noch in PMN-MDSC (*polymorphnukleär*) und M-MDSC (*monozytisch*) aufgeteilt werden, die sich in ihrem Phänotyp leicht unterscheiden. PMN-MDSC sind ebenfalls in der Lage CD66b zu exprimieren (Tab. 5-1). Somit kann im humanen System zurzeit nicht klar zwischen PMN-MDSC und Neutrophilen unterschieden werden [208,209]. Zunächst wurden sie anhand ihrer Dichte in der Zentrifugation voneinander unterschieden. Zuletzt wurde LOX-1 als Unterscheidungsmarker eingeführt, wobei jedoch auch ein niedriger Prozentsatz von Neutrophilen LOX-1 heraufregulieren kann und in dieser Studie dann als PMN-MDSC klassifiziert wird. Inwiefern pathologische Prozesse die Umwandlung in anderen Situationen bedingen, wurde nicht aufgegriffen und muss weiter untersucht werden. Ansonsten verbleibt nur ein Gen-Panel zur Unterscheidung der myeloiden Zelltypen [210]. Somit könnte die CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>-Fraktion auch PMN-MDSC beinhalten. Jedoch gilt hier ähnliches wie für die Mikroglia/Makrophagen: Ziel dieser Studie war es, die unterschiedliche Zusammensetzung der myeloiden Zellfraktionen mit einem proangiogenen Expressionsmuster zu korrelieren. Eine genauere Unterscheidung der CD66b<sup>+</sup>-Population sollte in zukünftigen Studien durchgeführt werden, wenn valide Differenzierungsmarker vorhanden sind.

**Tab. 5-1 Humane Markerprofile Tumor-assoziiertes myeloide Zellen**

(modifiziert nach [208])

Tumor-assoziierte Zellpopulation	Markerexpression (human)
TAM	CD11b <sup>+</sup> ; CD206 <sup>+</sup> ; CD163 <sup>+</sup> ; HLA-DR <sup>low</sup> ; Iba1 <sup>+</sup>
TEM	CD11b <sup>+</sup> ; CD14 <sup>+</sup> ; CD15 <sup>-</sup> ; HLA-DR <sup>+</sup> ; TIE2 <sup>+</sup> ; Iba1 <sup>+</sup>
M-MDSC	CD11b <sup>+</sup> ; CD14 <sup>+</sup> ; CD15 <sup>-</sup> ; HLA-DR <sup>low</sup>
PMN-MDSC	CD11b <sup>+</sup> ; CD14 <sup>-</sup> ; CD15 <sup>+</sup> ; CD66b <sup>+</sup> ; LOX-1 <sup>+</sup>
TAN	CD11b <sup>+</sup> ; CD14 <sup>-</sup> ; CD15 <sup>+</sup> ; CD66b <sup>+</sup> ; LOX-1 <sup>-</sup>
TADC	CD11b <sup>low</sup> ; CD11c <sup>+</sup> ; HLA-DR <sup>+</sup>

Insgesamt gestaltet sich die Identifikation der Zelltypen mittels Markern und Immunfluoreszenzen sehr schwierig und eine genaue Zuordnung zum Beispiel einer

Expression proangiogener Moleküle zu einer Subpopulation ist in dieser Studie nicht möglich gewesen. Zudem wurde gerade in der Tumorumgebung eine hohe Plastizität der Zellen mit entsprechender Umprogrammierung und Regulation von Faktoren nachgewiesen, die auch wieder rückgängig gemacht werden kann [208,211]. Alle betrachteten Zellgruppen entspringen letztendlich myeloiden Vorläuferzellen und das Ziel der Arbeit war vor allem die Evaluation des proangiogenen Expressionspotenzials der myeloiden Zellen im humanen Glioblastom. Hier konnte eine deutliche Expression der proangiogenen Faktoren in verschiedenen Zellpopulationen nachgewiesen und somit ihre tumorsupportiven Eigenschaften gezeigt werden. Welche Subgruppen letztendlich dazu beitragen und ob diese Diskriminierung weitere therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen würde, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

## **5.2 Kritische Betrachtung des Studiendesigns**

### **5.2.1 Prozessierung der Gewebeproben**

Ein großer Vorteil der vorliegenden Studie zeigt sich sicherlich in der engen Kooperation zur neurochirurgischen Klinik der Charité. Durch die direkt intraoperative Probenentgegennahme und die unverzügliche weitere Prozessierung der Proben im Labor, konnten noch lebende humane Zellen aus dem erhaltenen Hirngewebe gewonnen und diese auf ihre Eigenschaften hin untersucht werden. Dadurch konnten FACS-Analysen in kurzem zeitlichem Abstand zur Probenentnahme durchgeführt werden und die Zellen in ihrem Aktivierungszustand fixiert oder nach Restimulation analysiert werden. Auch die CD11b<sup>+</sup> Zellen, die zur RNA-Isolation genutzt wurden, wiesen so noch ein möglichst unverändertes Expressionsprofil im Vergleich zum intraparenchymatösen Zustand auf. In der Literatur sind nur wenige humane Studien beschrieben, die so zeitnahe Untersuchungen der Mikroglia/Makrophagen im humanen Glioblastom ausführen. Auch die Wahl der Kontrollgruppe und das gleiche, prompte Vorgehen bei der Aufarbeitung des Epilepsiegewebes sind als Stärken der vorliegenden Arbeit zu sehen, da wenige humane Studien zu Glioblastomen über diese Möglichkeiten verfügen. Durch diesen optimierten Prozessablauf war es nicht nur möglich humane myeloide Zellen in hoher Reinheit zu isolieren, sondern auch mittels FACS eine Einteilung der CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellpopulationen vorzunehmen, die neutrophilen Granulozyten im humanen Gewebe zu beschreiben und sie ebenso wie

die Mikroglia/Makrophagen zu charakterisieren und ihre proangiogenen Eigenschaften zu analysieren.

### 5.2.2 Auswahl der Kontrollgruppe

Ein kritisch zu betrachtender Punkt des Studiendesigns ist sicher die Auswahl der Kontrollgruppe. Gesunde Kontrollprobanden zu operieren und ihnen einen Teil Hirngewebe zu entfernen verbieten die medizinische Ethik und der Menschenverstand. Eine mögliche Kontrollgruppe stellen deswegen Gewebeproben aus pathologischen Sektionen dar, wie es in einigen Studien praktiziert wird [212]. Es bleibt jedoch unklar, inwiefern die Zeit, die zwischen diagnostiziertem Tod des Patienten bis hin zur Entnahme des Hirngewebes in der durchgeführten Autopsie und folgender Aufarbeitung des Gewebes, einen Einfluss auf die Zellaktivität und Expression verschiedener zu untersuchender Moleküle hat. In einer Studie von Mizze *et al.* wurde zwar beschrieben, dass die Zeit bis zur Prozessierung des Gewebes keinen Unterschied auf die Menge der isolierten Zellen hat, es wurde jedoch eine Änderung der Expression von CD11b in Zellen der grauen Substanz beobachtet [213]. Da CD11b einen der Marker darstellt, der zur Differenzierung zwischen Granulozyten und Mikroglia/Makrophagen-Population herangezogen wurde, könnte eine Änderung der Expression die Distinktion der beiden Zellfraktionen mittels FACS erschweren oder sogar unmöglich machen. Unterschiedliche Studiendesigns und Zeitabläufe könnten hier unter anderem zu den Beobachtungen von den zwei oder drei anhand von CD11b-Expression zu unterscheidenden Zellpopulationen führen, die in früheren Studien beschrieben und teilweise unterschiedlich gedeutet wurden [43,75,199–201]. Zudem wurde zwar kein Einfluss der postmortalen Zeit auf die Zahl der isolierten Mikrogliazellen gefunden, es gilt aber zu bedenken, dass möglicherweise ein kritisches Zeitfenster direkt nach dem Tod existiert, in welchem die Mikroglia/Makrophagen möglicherweise ihren Aktivierungsstatus ändern und dieses aufgrund des Studiendesigns bei allen Autopsie-Studien überschritten wird. So konnte in einer Studie mit isolierten Zellen aus Epilepsiepatienten-Gewebe gezeigt werden, dass Mikroglia bereits nach 15 Minuten auf Stimulation durch ADP reagieren und einen anderen morphologischen Phänotyp zeigen [214]. Studien zur Alteration der anderen untersuchten Moleküle *post mortem* konnten bisher nicht gefunden werden (Stand 08.04.2020). Zudem würde dies bedeuten, dass das Gewebe der operierten

Tumorpatienten anders prozessiert wird als das Kontrollgewebe, da das intraoperativ gewonnene Gewebe sofort weiter analysiert wurde. Die Chance, Analysen möglichst bald nach Entnahme des Gewebes durchzuführen aufgrund der Vergleichbarkeit mit Autopsiegewebe verrinnen zu lassen und einen gleich langen Wartezeitraum einzuräumen, erschien ebenfalls nicht ideal.

Eine weitere mögliche Kontrollgruppe stellen, wie in unserer Studie verwendet, Epilepsiepatienten dar. Auch diese Möglichkeit wird in vielen Studien genutzt, muss jedoch auch kritisch betrachtet werden. Es wurde zum Beispiel beschrieben, dass der auch in dieser Arbeit bei Mikroglia/Makrophagen im Epilepsiegewebe beobachtete typische Phänotyp der weit verzweigten Ausläufer der Mikroglia/Makrophagen in Regionen mit niedrigerer Neuronen-Dichte seltener auftritt. Mit der Anfallsfrequenz konnte wiederum keine Korrelation nachgewiesen werden [214]. Allerdings wurden auch Unterschiede in Expressionsmustern von Zytokinen gefunden. So konnte allein schon innerhalb einer Gruppe von Epilepsiepatienten in Arealen mit geringerer Neuronen-Dichte eine höhere Expression von IL-10 und CD163 gefunden werden als in anderen Arealen [214]. Ob eines der beiden Expressionslevel jeweils den Zustand in gesundem Hirngewebe darstellt, oder ob dieser dazwischen liegt, ist derzeit nicht geklärt. Dies führte jedoch dazu, dass diesen Arealen im Epilepsiegewebe eine gewisse angiogene Aktivität zugesprochen wird, die zur Neuroprotektion beitragen und weiteren Verlust von Neuronen verhindern soll. Zudem wurde beobachtet, dass im Gewebe von Epilepsiepatienten eine höhere Gefäßdichte herrscht als in dem Gewebe, das aus Autopsien gewonnen wurde [215]. Zusätzlich wurde auch der Einfluss von epileptischen Anfällen auf die Expression von Molekülen untersucht. Hierbei zeigten sich kurzzeitige, lokale Erhöhungen von IL-8, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 sowie anderer Moleküle, die aber in dieser Arbeit nicht betrachtet wurden (CCL13, OSM, REL, MAFF, etc.). Da die Expression mit zunehmendem Abstand zum letzten Anfall vor der Geweberesektion wieder abnahm und auch nur lokal nachweisbar war, könnte dies dafür sprechen, dass das basale Level tatsächlich niedriger liegt. Der Beweis bleibt aber ausstehend. Auch für HLA-DR und TLR4 wurde in einer Studie eine positive Korrelation mit der präoperativen Anfallsfrequenz gefunden, während dort eine Abnahme von IL-8 und ATF-3 Expression bei höherer Anfallsfrequenz beobachtet wurde [216–218].

Die Expression proangiogener Moleküle konnte vereinzelt im Gewebe der Epilepsiepatienten nachgewiesen werden (Abb. 4-27). Dabei waren



Mikroglia/Makrophagen größtenteils negativ für die untersuchten Moleküle, konnten teilweise jedoch auch positiv gefärbt werden. Wenngleich die Aufschlüsselung, inwiefern Mikroglia/Makrophagen an der Expression beteiligt waren, in dieser Arbeit nicht dargestellt ist, so erfolgte sie dennoch in Vorbereitung des Manuskripts zur Veröffentlichung dieser Daten in einem Journal durch Frau Dr. rer. nat. S. Brandenburg. Hier zeigt sich auch ein Teil der Mikroglia/Makrophagen aus Epilepsiegewebe positiv für den Großteil der proangiogenen Moleküle, wenngleich ein deutlicher Unterschied zu den Mikroglia/Makrophagen der Tumorgruppen, insbesondere der GBM-*h*PMNL-Gruppe, bestand. Dies kann auch anhand anderer Studien, zum Beispiel für IL-8 nachgewiesen werden, wo die Expression jedoch von der Anfallsfrequenz präoperativ abhängig war und auch nur lokal erhöht schien. Auch der Vergleich von Epilepsiegewebe mit einem GBM-Patienten zeigte eine höhere Expression von VEGF im Tumorgewebe in einer anderen Studie [215]. Zudem konnte auch die VEGF-Expression auf Mikroglia/Makrophagen aus nicht tumorösem Gewebe bereits nachgewiesen werden [219].

Insgesamt kann also festgestellt werden, dass nicht sicher davon auszugehen ist, dass Epilepsiegewebe eine in allen Punkten angemessene Kontrollgruppe darstellt, da die Expression proangiogener Moleküle bei Epilepsiepatienten möglicherweise im Vergleich zu physiologischem Hirngewebe etwas erhöht ist. Sollte dies der Fall sein und es kann trotzdem eine signifikante Erhöhung der Molekülexpression in den Tumorgruppen nachgewiesen werden, würde die Hochregulation im Vergleich zu einer niedrigeren Basalexpression aus Autopsie-Proben nur umso höher ausfallen. Auch aus diesem Grund wurden Astrozytome des WHO-Grad III ebenfalls in die Analysen mit einbezogen. Möglicherweise kann eine erhöhte Expression von proangiogenen Molekülen im Epilepsiegewebe eine im Vergleich zur GBM-*h*PMNL geringere Überexpression von angiogenen Faktoren in A°III oder GBM-*h*PMNL-Proben kaschieren. Jedoch stellt die Kontrollgruppe der Epilepsiepatienten insofern einen großen Vorteil dar, da so die bereits zuvor beschriebene direkt postoperative Gewebeprozessierung mit minimalem zeitlichen Verzögerungsintervall stattfinden konnte und die Proben der Kontrollgruppe somit genauso behandelt werden konnten wie die Tumorproben - ohne eine zeitliche Verzögerung bis zur Analyse zu haben. Auch der möglicherweise bestehende Reiz einer Operation ist somit in allen Gruppen identisch und kann nicht zu einer Verzerrung der Ergebnisse einer der Gruppen führen.

### 5.2.3 Interventionsmöglichkeiten und zeitlicher Ablauf

Eine Limitation des Studiendesigns stellt die fehlende Interventionsmöglichkeit und damit auch mögliche Betrachtung eines zeitlichen Verlaufs dar. So können zum Beispiel Änderungen des Phänotyps von Mikroglia/Makrophagen im Mausmodell einem bestimmten Zeitpunkt nach Tumorzellimplantation zugeordnet werden, wie es auch mit der lokalen Umverteilung der Neutrophilen geschehen ist [124]. Dies war in der vorliegenden Studie nicht möglich. Weder kann der Zeitpunkt der Entstehung des Tumors zurückverfolgt werden, noch kann bei ein und dem gleichen Patienten mehrfach Gewebe entnommen und mit der vorigen Probe verglichen werden. Selbst wenn dies der Fall gewesen wäre – beispielsweise eine Probenentnahme bei einer Biopsie und eine weitere bei endgültiger Tumorresektion – hätte nicht ausgeschlossen werden können, dass eine erste Operation mit dem konsekutiv folgenden Entzündungsreiz einen Einfluss auf die Mikroglia/Makrophagen gehabt hätte.

Genauso wenig kann mit Sicherheit gesagt werden, ob der Neutrophileninflux nach Stimulation durch die aktivierten Mikroglia/Makrophagen einsetzt oder die neutrophilen Granulozyten für die Aktivierung verantwortlich oder zumindest mitverantwortlich sind. Es kann sich jedoch auch um einen sich gegenseitig bedingenden Prozess handeln. In einem Mausmodell könnten verschiedene Zeitpunkte untersucht werden, was Klarheit bringen würde. So können jedoch nur deskriptive Aussagen zu einem bestimmten Zeitpunkt getroffen werden. Der Zeit-Faktor dürfte bei dem Vergleich der beiden Glioblastom-Gruppen untereinander jedoch zumindest in dieser Studie eine eher untergeordnete Rolle spielen, da sich in den Patientencharakteristika keine signifikanten Unterschiede zeigten. Gänzlich auszuschließen ist dies bei dem vorliegenden Studiendesign jedoch nicht. Um weitere Einsicht in die zugrunde liegenden Prozesse zu bekommen, müssen die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in anderen Experimenten, zum Beispiel *in vitro* oder aber erneut am Tiermodell nachvollzogen und weiter untersucht werden. Das Mausmodell könnte sich hierbei als ungünstig erweisen, da Nagetiere wie zuvor erwähnt kein IL-8 exprimieren, was jedoch entscheidenden Einfluss auf die Granulozyten haben könnte. Da gezeigt werden konnte, dass IL-8 ein *Chemoattractant* für Neutrophile darstellt [37], könnte der Einstrom der Granulozyten über diesen Weg im Mausmodell erheblich beeinträchtigt sein und dazu führen, dass eine deutlich geringere Granulozytenfraktion im Tumor des Mausmodells nachweisbar ist.

### 5.2.4 Probengewinnung

Eine weitere Einschränkung ergab sich daraus, dass nicht bei allen gesammelten Patientenproben genug Material zur Verfügung stand, um sowohl FACS-Analysen als auch Immunfluoreszenzfärbungen durchzuführen. Da die Einteilung der Patienten nach Granulozytenfraktion in der FACS-Analyse durchgeführt wurde, konnten somit einige der erhaltenen Patientenproben nicht für weitere Analysen verwendet werden, obwohl Gefrierschnitte zur Verfügung gestanden hätten. Auf der anderen Seite gab es einen einzelnen Patienten, bei dem genug Material zur Verfügung stand, so dass auch mehrere Gewebestücke für FACS-Analysen zur Verfügung standen. Hier zeigten sich unterschiedliche Granulozytenfraktionen, so dass dieser eine Patient mit einem Teil der Gewebeproben in die GBM-/PMNL-Gruppe und mit einer anderen Probe in die GBM-*h*PMNL-Gruppe eingeordnet wurde (Abb. 4-5). Bei anderen Patienten konnte dieses Phänomen nicht so ausgeprägt festgestellt werden. Hier lagen zwar auch leicht unterschiedliche prozentuale Anteile von Granulozyten vor, es kam aber nicht vor, dass auch genügend Material für mehrere RNA-Analysen vorlag, so dass sich nicht noch einmal die Frage der Einordnung in verschiedene Gruppen stellte und somit auch nicht weiter verfolgt werden konnte, ob die unterschiedlichen Proben sich trotz unterschiedlicher Granulozytenfraktion in den weiteren Analysen ähnlich gruppenkonform verhalten würden oder ob die Tatsache, dass irgendwo im Tumor eine höhere Granulozytenfraktion vorlag, bereits eine Änderung des Expressionsmusters auch in denjenigen Anteilen mit niedrigerem Granulozytenanteil bedingte. Der eine untersuchte Patient schien in der Expression der RNA jeweils mit dem jeweiligen Gewebestück anhand seines Granulozytenanteils in die Gruppe zu passen. Diese Aussage kann aber aufgrund des einen exemplarisch beobachteten Patienten nicht verallgemeinert werden. Eine größere Fallzahl wäre notwendig, um sowohl die Gruppeneinteilung zu bestätigen als auch zu untersuchen, ob sich weitere Patienten finden, bei denen sich die Infiltrationsrate der Granulozyten in verschiedenen Gewebestücken unterscheidet. Zudem gibt es nicht allzu viele Studien, in denen genug Gewebe einer Probe vorlag, um mehrere Analysen parallel durchführen zu können und diese auch noch miteinander zu korrelieren, was sicher eine Stärke der vorliegenden Arbeit darstellt.

Generell stellt die Fallzahl eine Limitation dieser Arbeit dar. Zwar wurde insgesamt von 65 Patienten Gewebe gewonnen, jedoch mussten 35 Patienten exkludiert werden, da

entweder keine eindeutige histologische Zuordnung möglich war, die Entität nicht zu den zu untersuchenden Gruppen passte, das Gewebe durch therapeutische Vorbehandlung stark verändert war oder nicht genügend Gewebe zur Verfügung stand, um die Granulozytenfraktion zu bestimmen und anschließend noch weitere Analysen durchzuführen. Zudem muss beachtet werden, dass ein Patientenkollektiv eben keinem geplanten Versuchsaufbau mit klaren Zeitmarken und einer einheitlichen Studienpopulation entspricht, so dass generell in Patientenstudien mit einer höheren Standardabweichung der gemessenen Ergebnisse gerechnet werden muss. Dies zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit bei verschiedenen Analysen, in denen sich zwar Tendenzen im Vergleich der einzelnen Gruppen erkennen lassen, es jedoch aufgrund einer geringen Fallzahl und einer hohen Standardabweichung nicht zu einem signifikanten Unterschied kommen kann (z. B. Abb. 4-9 B, 4-10 A, 4-11).

Insgesamt lässt sich jedoch sagen, dass trotz geringer Fallzahl hohe Signifikanzniveaus vor allem bei der Betrachtung der Expression der proangiogenen Faktoren erreicht werden konnten, was für das Ausmaß der Differenzen zwischen den Gruppen und auch für eine klinische Relevanz spricht.

### **5.3 Potentielle Rekrutierungsmechanismen der ins humane Glioblastom einwandernden neutrophilen Granulozyten**

Ein wichtiger Punkt ist die Klärung, wie es zu der vermehrten Granulozytenfraktion in einigen Glioblastom-Proben kommt. In dieser Arbeit konnte die Expression von CXCL2 von Mikroglia/Makrophagen und anderen Zellen im Tumorgewebe nachgewiesen werden. CXCL2 wurde zumindest in Mausexperimenten bereits als Rekrutierungsfaktor von Granulozyten beschrieben [220]. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Neutrophile im GBM selbst IL-8 exprimieren. Bisher war IL-8 auf Tumorzellen nachgewiesen und seine Wirkung zur Rekrutierung von Neutrophilen analysiert worden [221]. Mit den Erkenntnissen dieser Arbeit ist jedoch auch eine Eigenrekrutierung der Neutrophilen im humanen Glioblastom über das von ihnen sezernierte IL-8 denkbar. Zudem kann IL-8 Makrophagen zumindest *in vitro* anlocken, was sowohl die beobachtete Mikroglia/Makrophagen-Akkumulation mit verstärken, als auch über das von Mikroglia/Makrophagen sezernierte CXCL2 wiederum zu einer positiven Rekrutierungsschleife führen könnte [222]. Andere Faktoren wie CSF2 und CSF3 könnten ebenfalls eine Rolle in der Chemotaxis der

Neutrophilen spielen. Hier wurden für die Vorbereitung eines Manuskripts zur Veröffentlichung eines Papers Westernblot-Analysen der für diese Arbeit gesammelten Tumorproben durchgeführt, in denen sich keine Expressionsunterschiede zwischen GBM-/PMNL und GBM-*h*PMNL-Proben zeigten (Daten nicht gezeigt, Manuskript in Vorbereitung). Somit stellt sich die Frage, ob CSF2 und CSF3 in diesem Kontext keinen Einfluss haben, oder ob das schon diskutierte Problem des zeitlichen Ablaufs hier eine Rolle spielt. Theoretisch könnte eine Tumorprobe der GBM-/PMNL-Gruppe ein paar Tage oder Wochen später entnommen zur GBM-*h*PMNL-Gruppe gehören – oder anders herum. Im Mausmodell wurde eine positive Korrelation zwischen zeitlichem Progress und Neutrophilen-Invasion gefunden [40]. Dieser Zusammenhang müsste in zukünftigen Studien weiter untersucht werden, auch um ihn ins humane System zu übertragen.

Die Einteilung der GBM-Proben in eine GBM-*h*PMNL-Gruppe und eine GBM-/PMNL-Gruppe erfolgte anhand des Mittelwertes, um einen Überblick über mögliche Veränderungen zwischen den Gruppen zu bekommen. Hier wären weitere Studien mit größerer Fallzahl notwendig, um einen möglichen *cut-off*-Wert zu definieren oder nachzuweisen, dass es sich um ein Kontinuum handelt. Dieses Vorgehen überstieg jedoch leider die Möglichkeiten dieser Arbeit.

Zudem ist nicht auszuschließen, dass es sich bei der vermehrten Granulozytenfraktion den Ausdruck eines anderen Unterschiedes zwischen den untersuchten Patientengruppen handelt. Zwar wurden Patientenalter, Tumorlokalisierung, MGMT-Status, IDH-Mutation und Rezidivstatus der Patienten erhoben (Abb. 4-6, 4-7, 4-8, Tab.4-1), zwischen den beiden Gruppen verglichen und kein signifikanter Unterschied zwischen GBM-*h*PMNL und GBM-/PMNL gefunden, jedoch müsste zur abschließenden Sicherung der Erkenntnisse erneut eine Studie mit höherer Fallzahl durchgeführt und dort ebenfalls die Patientencharakteristika untersucht werden, um die Möglichkeit einer Beeinflussung durch bisher unbekannt Variablen zu minimieren.

#### **5.4 Der Einfluss der Granulozytenfraktion auf den Aktivierungsstatus der Mikroglia/Makrophagen**

Basierend auf der Einteilung der GBM-Proben nach Granulozytenanteil an den CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen wurde zunächst eine Charakterisierung der Mikroglia/Makrophagen anhand ihrer Aktivierungs- und Polarisationsmarker

vorgenommen und mit der Epilepsie- und Astrozytom °III-Gruppe, als auch innerhalb der Glioblastom-Gruppen verglichen.

Zunächst erfolgte die Analyse von bisher beschriebenen M1/M2-Polarisationsmarkern wie *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TGF- $\beta$*  und *IL-10* auf RNA-Ebene. Hier zeigten sich allerdings keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 4-9). In der FACS-Analyse zeigte sich für *TNF- $\alpha$*  eine Tendenz zur leichten Hochregulation in der GBM-*hPMNL*-Gruppe, wobei hier eine niedrige Fallzahl zu beachten ist. Es könnte sich hierbei um eine Regulation auf Proteinebene handeln, was erklären könnte, warum in der RNA-Expression keine Hochregulation erfolgte. Ein anderer Punkt, der zu beachten ist, ist dass alle CD11b<sup>+</sup> Zellen in die RNA-Isolation einfließen. Sollten also in einer Probe viele Granulozyten enthalten sein, die kein *TNF- $\alpha$*  produzieren, könnte darüber eine erhöhte Expression der Mikroglia/Makrophagen verschleiert werden. Eine Überexpression von *TNF- $\alpha$*  würde hierbei für eine proinflammatorische, tumorsuppressive Differenzierung sprechen. Dazu passend zeigte sich ein Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität von HLA-ABC in der GBM-*hPMNL*-Gruppe, wenngleich nur eine Tendenz und kein signifikanter Unterschied zur GBM-*PMNL*-Gruppe gefunden werden konnte (Abb. 4-11 B). Auch hier ist eine niedrige Fallzahl und eine hohe Standardabweichung zu beachten. Ebenfalls für eine proinflammatorische Polarisierung spricht die Überexpression von CD86 in der GBM-*hPMNL*-Gruppe (Abb. 4-12 B). Allerdings zeigen CD80, CD14 und auch die anderen Analysen der HLA-Moleküle keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4-11 und 4-12), so dass insgesamt nur wenige Anhaltspunkte für eine proinflammatorische M1-Polarisierung der Mikroglia/Makrophagen gefunden werden konnten.

Es ergaben sich jedoch durchaus Hinweise für einen unterschiedlichen Aktivierungsstatus der Mikroglia/Makrophagen in den beiden GBM-Gruppen. So konnte ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenzaktivität von CD45 gefunden werden (Abb. 4-13 A). Hier war eine signifikant höhere Expression in der GBM-*hPMNL*-Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen zu beobachten und es konnte auch eine positive Korrelation mit dem Prozentsatz der infiltrierenden Neutrophilen gefunden werden (Abb. 4-13 B). Da CD45 in der Literatur als Aktivierungsmarker beschrieben wurde, der auch die Funktion der Mikroglia/Makrophagen modulieren kann, spricht eine Hochregulation für einen distinkten Aktivierungsstatus, auch wenn dieser nicht dem klassischen postulierten M1/M2-Muster zugeordnet werden kann [60,167,168]. Zudem zeigten sich einige morphologische Unterschiede zwischen den

Mikroglia/Makrophagen der untersuchten Gruppen mit vermehrt auftretenden amöboiden Zellleibern der Mikroglia/Makrophagen in der GBM-*h*PMNL-Gruppe (Abb. 4-17). Diese Zellmorphologie wurde früher bereits einem aktivierten Phänotypen zugesprochen, wobei beachtet werden muss, dass damals auch von einem „ruhenden“ Phänotypen mit weit verzweigten Ausläufern gesprochen wurde, was in dieser Form heutzutage widerlegt wurde [75,178].

Obwohl in den RNA-Expressionsmustern auch keine typische Regulation der M2-Marker gefunden werden konnte, zeigten CD163 und TIE2 in den Immunfluoreszenzbildern beinahe ausschließlich eine Expression auf Mikroglia/Makrophagen der GBM-*h*PMNL-Gruppe mit deutlich signifikantem Unterschied zur GBM-/PMNL-Gruppe (Abb. 4-14). CD163 wird hierbei der M2-Differenzierung der Mikroglia/Makrophagen zugeordnet und ist mit einem schlechteren Patientenüberleben bei Glioblastomen mit hohem IDH-Mutationsanteil assoziiert [164,179]. Beide Moleküle verfügen zudem über proangiogene Eigenschaften, so dass TIE2 zwar nicht dem klassischen M2-Profil zugeordnet wird, jedoch dadurch auch als tumorsupportiv angesehen werden kann [174–177].

Zusammenfassend konnte kein eindeutiger M1 oder M2 Polarisationstyp in den GBM-Proben nachgewiesen werden. Diese Beobachtung ist mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen konform, die ebenfalls versuchten, im Glioblastom eine Differenzierung der Mikroglia/Makrophagen-Polarisation vorzunehmen und zu dem Schluss kamen, dass keine klare Abgrenzung der beiden Maximalausprägungen möglich ist, sondern es sich um einen fließenden Übergang handelt [85]. Es lassen sich aber dennoch Unterschiede im Aktivierungsstatus der Mikroglia/Makrophagen abhängig von der Granulozytenfraktion ausmachen, so dass hier ein Hinweis auf die Beeinflussung der Mikroglia/Makrophagen durch den vermehrten Influx von Neutrophilen gesehen werden kann. Auffällig ist, dass Regulationen vor allem die GBM-*h*PMNL-Gruppe betreffen und teilweise sogar signifikante Unterschiede zwischen GBM-/PMNL- und GBM-*h*PMNL-Gruppe gefunden werden konnten.

Wie bereits beschrieben,

ist es im vorliegenden Studiendesign nicht möglich zu differenzieren, ob der differente Aktivierungsstatus der Mikroglia/Makrophagen den Influx der Granulozyten bedingt oder ob die einströmenden Granulozyten durch Sekretion von Botenstoffen oder Zell-Zell-Interaktion erst die Veränderungen der Mikroglia/Makrophagen hervorrufen, da es sich um eine Momentaufnahme handelt.

## 5.5 Angiogene Faktoren und Therapie-Escape

### 5.5.1 Möglicher Zusammenhang von Therapieresistenz und TIE2-Expression

Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass Mikroglia/Makrophagen von Tumorzellen beeinflusst und dazu veranlasst werden können, protumoral zu wirken. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass Mikroglia/Makrophagen im Glioblastom VEGF produzieren können, was zumindest im Mausmodell zu einem gesteigerten Tumorwachstum führt [223,224]. Daraufhin wurden anti-VEGF-Therapien entwickelt, die entweder VEGF direkt blockieren (Bevacizumab) oder aber dessen Rezeptoren (z.B. Sunitinib, Cediranib, Pazopanib). Trotz initial vielversprechender Daten mit verlängertem progressionsfreiem Intervall konnten kaum signifikante Vorteile im Gesamtüberleben beobachtet werden [41,42].

Als Erklärung hierfür wurden entweder tumorzellspezifische Mechanismen oder die Beeinflussung der Tumor-assoziierten Zellen vorgeschlagen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass nach antiangiogener Therapie eine Steigerung des PDGF-Signalwegs über eine erhöhte Bedeckung der Gefäße mit Perizyten und somit erhöhte Ang1/TIE2- Interaktion zu einer Stabilisierung der Gefäße beitragen und somit einen Teil der antiangiogenen Therapiewirkung blockieren [225]. TIE2 wiederum kann - wie bereits beschrieben und auch in dieser Arbeit nachgewiesen (Abb. 4-14 B) - auch von Mikroglia/Makrophagen vor allem der GBM-*hPMNL*-Gruppe exprimiert werden. Somit kann die Stabilisierung von Gefäßen theoretisch auch ohne die vorherige Rekrutierung von Perizyten über PDGF ablaufen, was potentiell zu einer Umgehung des zusätzlichen Effekts der PDGFR-Blockade von Substanzen wie Sunitinib und Pazopanib führen könnte.

### 5.5.2 Assoziation von Therapieresistenz und Akkumulation myeloider Zellen

Im Mausmodell konnte der Zeitpunkt der einsetzenden Therapieresistenz mit dem vermehrten Einstrom myeloider Zellen, darunter auch Granulozyten, assoziiert werden [39]. In anderen Tumormodellen wurde bereits ein Einfluss von Granulozyten auf die Tumorprogression sowie den Makrophageneinstrom und die Therapieresistenz gezeigt [226,227]. Auch Glioma-Zelllinien zeigten *in vitro* eine erhöhte Proliferation in Ko-Kultur mit Neutrophilen [40]. Hier wurde allerdings die mögliche Interaktion mit anderen Zelltypen wie Mikroglia/Makrophagen *in vivo* nicht abgebildet. In dieser Arbeit konnte im humanen Glioblastomgewebe gezeigt werden, dass beide myeloiden



Zellpopulationen Moleküle sezernieren, die nicht nur protumoral wirken, sondern auch in der Lage sind, Rückkopplungsschleifen mit den myeloiden Zellen selbst zu bilden: Während das vorwiegend von Mikroglia/Makrophagen gebildete CXCL2 ebenso wie CSF3 zur Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten beitragen kann, wirkt das von den Neutrophilen sezernierte IL-8 sowohl als *Chemoattractant* für Neutrophile, als auch für Mikroglia/Makrophagen [37,220–222]. Dies könnte über die potentiellen reziproken Beeinflussungen zu einer Vervielfältigung der protumoralen Wirkung beitragen. Theoretisch wäre über einen antitumoralen Phänotyp der Mikroglia/Makrophagen auch eine hemmende Wirkung auf die positiv für das Tumorstadium wirkende Neutrophilen-Tumorzell-Interaktionen möglich. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen jedoch eher auf eine proangiogene, tumorsupportive Wirkung beider Zellfraktionen hin. Eine Depletion von Neutrophilen führte in anderen Tumormodellen zu einem verringerten Tumorstadium, dezimierter Angiogenese und weniger Metastasierung [220].

### **5.5.3 Mögliche Umgehung klassischer antiangiogener Therapiekonzepte durch Expression alternativer proangiogener Moleküle durch myeloide Zellen**

Insgesamt konnte über den Nachweis der Expression von angiogen wirkenden Faktoren von Mikroglia/Makrophagen (CXCL2, CD13, CD163, TIE2) und Neutrophilen (IL-8, CD13), die nicht über den VEGF-Signalweg wirken, gezeigt werden, dass diese Zellen des Tumormikromilieus zur Angiogenese und damit dem Tumorstadium beitragen können. Besonders hervorzuheben ist hierbei, dass die Expressionsprofile aller alternativer proangiogener Faktoren der Mikroglia/Makrophagen sich dabei signifikant zwischen GBM-/PMNL- und GBM-*h*PMNL-Gruppe unterscheiden. Die Expression von CXCL2 und CD13 auf murinen Mikroglia/Makrophagen im GBM-Modell wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits beschrieben [34]. Auch der Beitrag der Faktoren zur Angiogenese in anderen Tumormodellen wurde nachgewiesen [182,183,191], die Expression auf humanen Mikroglia/Makrophagen im GBM unseres Wissens nach jedoch nicht. Ergänzend dazu konnte in einer aktuellen Studie mit lokaler anti-CXCR2-Therapie, der Blockade des gemeinsamen Rezeptors von CXCL2 und IL-8, eine Reduktion des Tumorstadiums im murinen System gezeigt werden [228]. Eine Studie konnte *in vitro* eine Hochregulation der CXCL2/IL-8-Achse nach Gabe von Angiogenese-Blockern feststellen [229]. Somit besteht für die Tumore die

Möglichkeit die Hemmung der Angiogenese über VEGF/VEGFR-Blockade in antiangiogenen Therapien zu umgehen – entweder durch eigene Produktion anderer Faktoren oder durch die Nutzung der Immunzellen in der Tumorumgebung. Zu dieser Annahme würde die Beobachtung einer weiteren Studie passen, in welcher nach antiangiogener Therapie eine Anreicherung von CD11b<sup>+</sup> Zellen im GBM beobachtet wurde [230]. Diese CD11b<sup>+</sup> Zellen wurden dort als TAMs definiert, könnten jedoch gleichwohl auch Neutrophile mit beinhalten, da diese ebenso CD11b exprimieren und in der veröffentlichten Studie keine weitere Differenzierung gezeigt wurde.

#### **5.5.4 Änderung der Gefäßarchitektur in Abhängigkeit von der Granulozytenfraktion**

Dass Mikroglia/Makrophagen sich im Glioblastom-Mikromilieu anreichern, wurde bereits gezeigt und auch in dieser Arbeit erneut nachgewiesen ([178], Abb. 4-16). In anderen Tumormodellen konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass Makrophagen in hypoxischen Arealen akkumulieren und dort zur Angiogenese beitragen, so dass sich mehr Gefäße in der direkten Umgebung in *in vitro* Experimenten ausbilden [231]. In dieser Arbeit konnten *in vivo* in den GBM-Gruppen zwar nicht mehr Gefäße gefunden werden, dafür aber eine deutliche Assoziation von Gefäßen und Iba1<sup>+</sup> Zellen (Abb. 4-29, 4-30 A). Auch größere Tumorgefäße und insgesamt eine deutlich erhöhte durchschnittliche Gefäßfläche (Abb. 4-28 C) konnte in GBM-*hPMNL*-Proben nachgewiesen werden. Neben der, vor allem in den GBM-*hPMNL*-Gewebe erhöhten, Expression von proangiogenen Faktoren durch Mikroglia/Makrophagen und Granulozyten fällt auch auf, dass die Unterschiede in der Gefäßarchitektur vor allem in dieser Gruppe zu finden sind. Es erfolgte zwar kein direkter Nachweis, dass die Gefäßumstrukturierung erst durch den vermehrten Einstrom der myeloiden Zellen oder die von ihnen ausgeschütteten proangiogenen Moleküle erfolgte, die Korrelation lässt diesen Zusammenhang jedoch vermuten. Auch hier wären weitere Experimente notwendig, um die zugrundeliegenden Abläufe aufzuklären und gegebenenfalls einen zeitlichen Ablauf der Veränderungen der Zellfraktionszusammensetzung im humanen Glioblastom aufzudecken.

Es gibt multiple Studien, die sich um eine Einordnung und strukturierte Analyse der Gefäßstruktur des GBM ebenso wie um eine Korrelation zum Patientenüberleben bemühen. Eine große Einschränkung dabei ist, dass eine vollständige Abbildung der

Gefäßarchitektur beim lebenden Patienten nur mit nichtinvasiven Maßnahmen wie der MRT möglich ist. Dies weist jedoch Limitationen auf und kann Gefäße erst ab einer gewissen Größe des Durchmessers darstellen. Hier können die charakteristischen Mikrogefäße nicht abgebildet werden, so dass eine gewisse Diskrepanz in der Beschreibung der Gefäßstruktur entsteht [195]. Allerdings werden Tumormakrogefäße beschrieben, die auch in dieser Arbeit vor allem in der GBM-*hPMNL*-Gruppe deutlich nachweisbar waren [195] (Abb. 4-28 B, C, D).

### 5.5.5 Betrachtung der klassischen proangiogenen Moleküle

Auffällig ist, dass die meisten signifikanten Unterschiede zwischen den GBM-Gruppen tatsächlich im Zusammenhang mit angiogen wirksamen Molekülen stehen. Während nur wenige Aktivierungsmarker der Mikroglia/Makrophagen signifikante Unterschiede aufweisen, konnte sowohl bei CXCL2, IL-8, CD13, TIE2 als auch dem mit Angiogenese in Verbindung stehendem M2-Marker CD163 eine signifikante Erhöhung in der GBM-*hPMNL*-Gruppe gezeigt werden [175]. Interessanterweise zeigen die klassischen Angiogenese-Marker HIF-1 $\alpha$  und VEGF keine oder kaum signifikante Regulation. Zum einen könnte hier ein erhöhtes *Turnover* vorliegen, so dass neu gebildete RNA gleich zur Translation genutzt wird und demzufolge selbst in den Tumorgruppen wenig RNA detektiert werden kann. Dafür würde die deutlich sichtbare Expression von VEGF und HIF-1 $\alpha$  auf den Immunfluoreszenzbildern sprechen. Eine genauere Analyse der prozentualen Expression dieser Moleküle durch Mikroglia/Makrophagen und Granulozyten erfolgte durch Frau Dr. S. Brandenburg im Rahmen der Vorbereitung der Daten für die Veröffentlichung in einem Journal und zeigt ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den GBM-Gruppen in Abhängigkeit von der Granulozytenfraktion.

Zum anderen könnte auch die Wahl der Kontrollgruppe einen Einfluss haben, da auch bei Epilepsiepatienten aufgrund der durch die hohe Stoffwechselaktivität bei Anfällen resultierende Hypoxie angiogene Aktivität mit Expression von HIF-1 $\alpha$  und VEGF nachgewiesen werden konnte (Abb. 4-27) [215]. Damit im Zusammenhang stehen könnte die fehlende Regulation des entsprechenden Rezeptors für VEGF, *VEGFR1* und die scheinbare Herunterregulation von *VEGFR2* auf RNA-Ebene (Abb. 4-19). Ähnlich wie bei VEGF könnte es hier zu einer raschen Translation kommen, die die Proteinexpression ansteigen lässt, die RNA-Expression jedoch absinkt, da diese erst

wieder synthetisiert werden muss. Dafür sprechen würde auch der Nachweis von VEGFR2 zumindest auf Granulozyten im FACS (Abb. 4-19 C), da es unlogisch erscheint in der GBM-*hPMNL*-Gruppe mit vielen VEGFR2 exprimierenden Granulozyten in der isolierten CD11b<sup>+</sup> Zellgruppe eine ähnlich niedrige Expression von VEGFR2 zu detektieren wie in der Astrozytom oder GBM-*PMNL*-Gruppe. Auch hier könnten zusätzliche Immunfluoreszenzfärbungen in zukünftigen Studien helfen, zwischen Regulationen der Protein- und RNA-Ebene zu differenzieren und die exprimierenden Zellen genauer zu klassifizieren.

### **5.5.6 Kritische Betrachtung der Expression von *IL-12***

Ein weiteres Molekül, das durch eine Herunterregulation in den Tumorgruppen auffiel, war IL-12. Hier zeigten beide Untereinheiten eine verminderte RNA-Expression im Vergleich zur Epilepsiegruppe (Abb. 4-9 A). Während IL-12 als Marker des M1-Aktivierungsstatus genutzt wird, hat dieses Interleukin jedoch auch antiangiogene Eigenschaften, die über CXCL10 vermittelt werden [232,233]. Auch soll es einen Einfluss auf Lymphozyten haben. In dieser Studie konnte bei einer ersten Betrachtung der Lymphozytenpopulation in den verschiedenen Gruppen jedoch kaum ein signifikanter Unterschied gefunden werden (Abb. 4-15). Weitere Untersuchungen und eine genauere Charakterisierung der Lymphozytenfraktion wären hier sicherlich auch möglich, um dies zu untermauern. Im Rahmen dieser Studie wurde jedoch aufgrund der Fokussierung auf die myeloiden Zellen darauf verzichtet. In Anbetracht der Tatsache, dass Regulationsunterschiede zwischen GBM-*hPMNL* und GBM-*PMNL*-Gruppe, wie in dieser Arbeit gezeigt, vorwiegend angiogene Faktoren zu betreffen scheinen, könnte die isolierte Regulation von IL-12 als M1-Marker mit der angiogenen Aktivität in Verbindung stehen. Hierzu sollte in einer künftigen Analyse CXCL10 zusammen mit IL-12 betrachtet und - wenn möglich - auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Im Mausmodell konnte unsere Arbeitsgruppe bereits eine signifikante Erhöhung von CXCL10 bei Tumor-assoziierten Mikroglia/Makrophagen nachweisen [34]. Eine andere Möglichkeit, die zu einer scheinbaren Herunterregulation von IL-12 beitragen könnte, ist, dass erhöhte IL-12-Expression bei Epilepsiepatienten in bestimmten Gewebearealen nachweisbar ist [234].

## 5.6 Abschätzung der klinischen Relevanz durch Überlebensanalysen

Insgesamt lässt sich feststellen, dass vor allem in der GBM-*h*PMNL-Gruppe eine ausgeprägte Hochregulation proangiogener Faktoren zu beobachten ist, wobei die Regulation bei jenen Molekülen, die nicht über den klassischen VEGF-Signalweg wirken, sogar - zumindest auf RNA-Ebene - ausgeprägter erscheint. Dabei tragen nicht nur Mikroglia/Makrophagen, sondern auch neutrophile Granulozyten zu dem proangiogenen Expressionsprofil bei (Abb. 4-22 bis 4-26). In den Analysen von den untersuchten angiogen wirksamen Faktoren zeigte jedoch nur die Überexpression von IL-8, welches auch für die Neutrophilen-Rekrutierung wichtig ist, einen signifikanten Überlebensnachteil für die entsprechende Patientengruppe (Abb. 4-33 A). Hierbei ist zu beachten, dass es für die proangiogenen Faktoren keinen *cut-off*-Wert gibt, der eine Hochregulation definiert. Demzufolge hängen die Analysen der Überlebenskuren auch von der Definition der beiden Gruppen ab. Im Rahmen dieser Arbeit wurde analog zur Festlegung der GBM-*l*PMNL- und GBM-*h*PMNL-Gruppe der Mittelwert der jeweiligen Regulation als *cut-off*-Wert für eine Einteilung gewählt. Ist ein direkter Wert für die Gruppeneinteilung nicht bekannt, können auch Quartilen, der Median oder im Falle von Expressionsanalysen der *z*-score als definierter Grenzwert genutzt werden. Werden andere *cut-off*-Werte gesetzt, können die Ergebnisse der Überlebensanalysen also variieren. So konnte bei Zugrundelegen des *z*-scores als Unterteilungskriterium beispielsweise auch für VEGF ein signifikanter Überlebensnachteil für Patienten mit höherer VEGF-Expression im Glioblastom gefunden werden, während dieser Unterschied bei Begutachtung der Analyse nach Mittelwert nicht signifikant war ( $p = 0,0179$  vs.  $p = 0,4301$ ). Bei IL-8 blieb das Signifikanzniveau bei beiden Untersuchungen erhalten. Für die anderen proangiogenen Faktoren zeigten sich bei beiden Methoden keine signifikanten Unterschiede.

Dem Gedanken nachgehend, dass IL-8 nicht nur proangiogen, sondern auch chemotaktisch wirkt und dass Neutrophile in anderen Tumormodellen mit Therapieresistenz und erhöhter Metastasierungsrate korreliert werden konnten, wurden weitere Analysen in diese Richtung durchgeführt. Zunächst konnte in den FACS-Analysen eine Korrelation zwischen ansteigender Neutrophilenfraktion und Fluoreszenzintensität von CD45 gefunden werden, so dass auch die Expression von CD45 auf ihren Einfluss des Patientenüberlebens untersucht wurde. Hier zeigte sich ebenso eine signifikante Regulation wie auch für die Hochregulation von CSF3, was

als *Chemoattractant* für Neutrophile gilt (Abb. 4-33 B und C). Nachdem dadurch also erneut Hinweise gefunden wurden, dass der vermehrte Influx von neutrophilen Granulozyten ins Glioblastomgewebe Überlebensnachteile für die entsprechende Patientengruppe bedeutet, wurde mittels CIBERSORT versucht, den Zusammenhang zwischen Überleben und Zellpopulationen im GBM darzustellen. Hier zeigte sich der größte statistische Zusammenhang zwischen Neutrophilenanteil an der Population der myeloiden Zellen und dem Überleben der Patienten (Abb. 4-34 B). Zu Bedenken ist hierbei, dass der Mittelwert der Proben aus der Datenbank nicht mit dem der frisch nach der Operation verarbeiteten Gewebeproben übereinstimmt, was sich aber unter anderem durch unterschiedliche zeitliche Abläufe und Methoden erklären lässt.

Insgesamt ist bei den Analysen der Daten von *Cbioportal* und CIBERSORT zu beachten, dass die Untersuchung der proangiogenen Moleküle in GBM-*PMNL*- und GBM-*hPMNL*-Gruppe anhand der aus den isolierten CD11b<sup>+</sup> Zellen erfolgte, während in *Cbioportal* alle in der homogenisierten Tumorprobe vorhandenen Zellen in die Analyse eingehen. Sollten in einer Probe also viele Tumorzellen ein Molekül exprimieren, CD11b<sup>+</sup> Immunzellen jedoch nicht, würde ein Unterschied zwischen der Gruppeneinteilung in dieser Studie und der Analyse der Daten von *Cbioportal* entstehen. Diese Analysen liefern also einen Anhaltspunkt für die klinische Relevanz der gewonnenen Daten, diese müssen jedoch in weiteren Studien mit größerer Fallzahl und - wenn möglich - einer Korrelation zwischen den Befunden der isolierten CD11b<sup>+</sup> Zellen und dem Überleben der Patienten der Studie überprüft werden.

## 5.7 Fazit

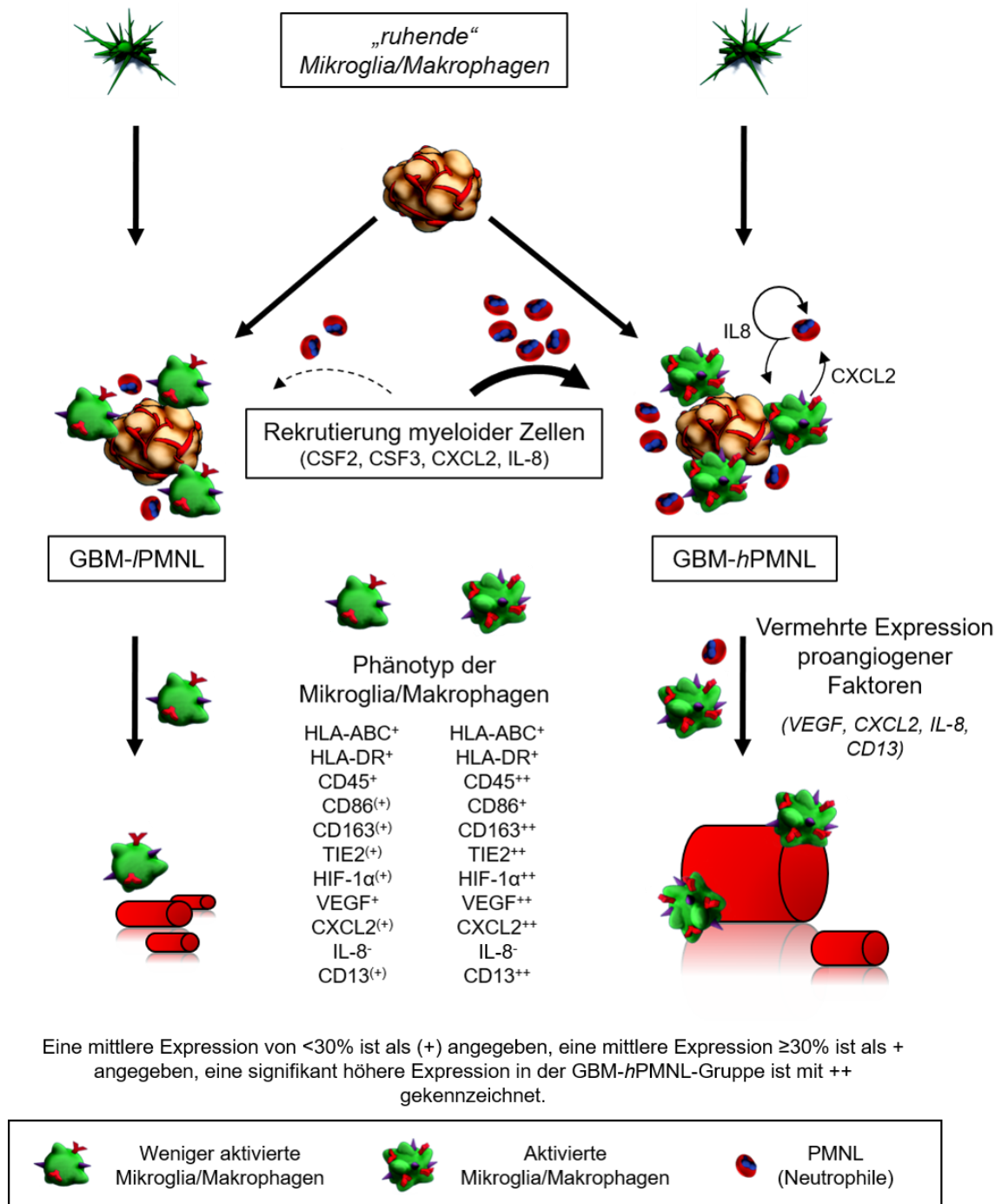
Es konnten in dieser Arbeit anhand des Prozentsatzes der den Tumor infiltrierenden neutrophilen Granulozyten zwei Gruppen von GBM unterteilt werden (Abb. 4-1 B, 4-4). In Abhängigkeit von den Neutrophilen konnte ein unterschiedlicher Aktivierungsstatus der Mikroglia/Makrophagen mit Hochregulation von CD86, CD45, CD163 und TIE2 in der GBM-*hPMNL*-Gruppe identifiziert werden (Abb. 4-12 B, 4-13, 4-14). Auch in Hinblick auf die untersuchten proangiogenen Moleküle fand sich eine höhere Expression von CXCL2, IL-8 und CD13 in der GBM-*hPMNL*-Gruppe (Abb. 4-20). Dabei trugen sowohl Mikroglia/Makrophagen (CXCL2, CD13) als auch neutrophile Granulozyten (IL-8, CD13) zu dieser Expression bei (Abb. 4-24, 4-25, 4-26). Passend zu einer erhöhten proangiogenen Aktivität bei vermehrtem Neutrophilenanteil konnte

eine Korrelation zu einer veränderten Gefäßstruktur mit deutlich höherem mittleren Gefäßdurchmesser und einer vermehrten Assoziation von Gefäßen mit Mikroglia/Makrophagen beobachtet werden (Abb. 4-29, 4-30).

In der Gesamtschau der Ergebnisse konnte zwar aufgrund des Studiendesigns keine experimentelle Kausalkette der Interaktionen zwischen den verschiedenen myeloiden Zellen im humanen Glioblastom erstellt werden, es ergeben sich jedoch vielfältige Hinweise auf die Partizipation von Neutrophilen und Mikroglia/Makrophagen am Tumorprogress durch Unterstützung der Angiogenese, sowie mögliche gegenseitige Interaktion mit der Möglichkeit reziproker Rekrutierung und Aktivierung (Abb. 5-1). In den Gewebeproben mit hoher angiogener Aktivität der myeloiden Zellpopulationen konnte auch eine signifikante Veränderung der Gefäßarchitektur nachgewiesen werden. Die klinische Relevanz wird über die implizierten Möglichkeiten zum Beitragen zur Therapieresistenz und über die analysierten Überlebenskurven deutlich. Um eine klare Differenzierung zwischen direktem und indirektem Einfluss der Komposition der myeloiden Zellen und den beobachteten Unterschieden zu treffen, sind weitere Studien mit größerer Fallzahl oder eine Übertragung ins Tiermodell notwendig, wobei die IL-8-Defizienz der Nagetiere oder eine gegebenenfalls vorhandene Auswirkung der Immunmodulation beim IL-8 exprimierenden Mausmodell beachtet werden müsste. Denkbar wären retrospektive Studien an Paraffinschnitten der Tumorbanken zur Erhöhung der Fallzahl mit Färbung von Iba1 und CD66b und eine Analyse der Expression proangiogener Faktoren. Ebenfalls wäre eine Untersuchung der myeloiden Zellpopulationen sowie deren proangiogene Expressionsprofile nach verschiedenen antiangiogenen Therapien interessant, um den Beitrag der myeloiden Zellen zum Therapieversagen genauer zu charakterisieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Erkenntnisse aus der Arbeit einen interessanten Einblick in das Zusammenspiel der verschiedenen myeloiden Zellpopulationen im humanen Glioblastom ermöglichen. Die multiplen Interaktionsmöglichkeiten machen deutlich, dass ein unimodaler Therapieansatz bei heterogenen Tumoren mit so vielfältiger, immunologisch aktiver und verknüpfter Zellumgebung wie beim Glioblastom kaum längerfristige Ergebnisse erbringen kann und ein weitergehendes Verständnis der Interaktion zwischen Tumorzellen und Immunzellen der Tumorumgebung unbedingt vonnöten ist, um suffiziente Therapiekonzepte für die Patienten zu entwickeln. Es wird in Zukunft jedoch noch weitere Studien benötigen, sowohl in Tiermodellen als auch im humanen System, um

die gewonnenen Erkenntnisse zu übertragen, zu validieren, zu vertiefen und somit spezifischere Therapiekonzepte zu erarbeiten.



**Abb. 5-1 Zusammenfassung der Ergebnisse.** In dieser Studie wurde anhand der Unterschiede in der Zusammensetzung der myeloiden Zellfraktion eine Unterteilung in eine GBM-PMNL (*low*, <17,2% Neutrophilenanteil) - und eine GBM-hPMNL-Gruppe (*high*,  $\geq$  17,2% Neutrophilenanteil) vorgenommen. In der GBM-hPMNL-Gruppe fiel ein veränderter Aktivierungsstatus der Mikroglia/Makrophagen sowie ein differentes Expressionsprofil der



proangiogenen Faktoren durch Mikroglia/Makrophagen auf. Bei vermehrter Expression proangiogener Moleküle in der GBM-*hPMNL*-Gruppe konnten in dieser Gruppe im Mittel zwar weniger, aber größere Gefäße mit mehr Assoziation zu Mikroglia/Makrophagen gefunden werden. Ebenso sind mögliche Rekrutierungsfaktoren und reziproke Wechselwirkungen der myeloiden Zellfraktionen durch die in dieser Arbeit untersuchten Moleküle dargestellt (CSF3, CXCL2, IL-8).

## 6 Literaturverzeichnis

1. Kraywinkel K, Spix C. Epidemiologie primärer Hirntumoren bei Kindern und Erwachsenen in Deutschland. *Der Onkol.* 2019;25(1):5–9. <https://doi.org/10.1007/s00761-018-0501-1>
2. Zong H, Verhaak RGW, Canoll P. The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. *Expert Rev Mol Diagn.* 2012;12(4):383–94. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22616703>
3. Assanah M, Lochhead R, Ogden A, Bruce J, Goldman J, Canoll P. Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses. *J Neurosci.* 2006;26(25):6781–90.
4. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol.* 2004;4(4):278–99.
5. Strojnik T, Duh D, Lah TT. Prevalence of neurotropic viruses in malignant glioma and their onco-modulatory potential. *In Vivo.* 2017;31(2):221–9.
6. Akhtar S, Vranic S, Cyprian FS, Al Moustafa A-E. Epstein–Barr Virus in Gliomas: Cause, Association, or Artifact? *Frontiers in Oncology.* 2018;8:123 [doi:10.3389/fonc.2018.00123](https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00123)
7. Nelson JS, Burchfiel CM, Fekedulegn D, Andrew ME. Potential risk factors for incident glioblastoma multiforme: the Honolulu Heart Program and Honolulu-Asia Aging Study. *J Neurooncol.* 2012;109(2):315–21.
8. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):459–66.
9. de Souza RM, Shaweis H, Han C, Sivasubramiam V, Brazil L, Beaney R, Sadler G, Al-Sarraj S, Hampton T, Logan J, Hurwitz V, Bhangoo R, Gullan R, Ashkan K. Has the survival of patients with glioblastoma changed over the years? *Br J Cancer.* 2016;114(2):146–50.
10. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol.* 2012;14 Suppl 5(Suppl 5):v1-49, korrigiert in: *Neurol Oncol.* 2013;15(5):646-7
11. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):829–48.
12. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the

- central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97–109.
13. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu I-M, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SKN, Shinjo SMO, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321(5897):1807–12.
  14. Wang JB, Dong DF, Wang M D, Gao K. IDH1 overexpression induced chemotherapy resistance and IDH1 mutation enhanced chemotherapy sensitivity in glioma cells in vitro and in vivo. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2014;15(1):427–32.
  15. Wesseling P, Capper D. WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2018;44(2):139–50.
  16. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):764–72.
  17. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, De Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):997–1003.
  18. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhir 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, TCGA Research Network. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell.* 2013;155(2):462.
  19. Hoadley KA, Yau C, Wolf DM, Cherniack AD, Tamborero D, Ng S, Leiserson MDM, Niu B, McLellan MD, Uzunangelov V, Zhang J, Kandoth C, Akbani R, Shen H, Omberg L, Chu A, Margolin AA, Van't Veer LJ, Lopez-Bigas N, Laird PW, Raphael BJ, Ding L, Robertson AG, Byers LA, Mills GB, Weinstein JN, Van Waes C, Chen Z, Collisson EA, The Cancer Genome Atlas Research Network, Benz CC, Perou CM, Stuart JM. Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. *Cell.* 2014;158(4):929–44.
  20. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN, Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010;17(1):98–110.

21. Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF Receptor and p53 Mutations are Mutually Exclusive in the Evolution of Primary and Secondary Glioblastomas. *Brain Pathol.* 1996;6(3):217–23. doi:10.1111/j.1750-3639.1996.tb00848.x
22. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DTW, Konermann C, Pfaff E, Tönjes M, Sill M, Bender S, Kool M, Zapatka M, Becker N, Zucknick M, Hielscher T, Liu XY, Fontebasso AM, Ryzhova M, Albrecht S, Jacob K, Wolter M, Ebinger M, Schuhmann MU, van Meter T, Frühwald MC, Hauch H, Pekrun A, Radlwimmer B, Niehues T, Von Komorowski G, Dürken M, Kulozik AE, Madden J, Donson A, Foreman NK, Drissi R, Fouladi M, Scheurlen W, von Deimling A, Monoranu C, Roggendorf W, Herold-Mende C, Unterberg A, Kramm CM, Felsberg J, Hartmann C, Wiestler B, Wick W, Milde T, Witt O, Lindroth AM, Schwartzentruber J, Faury D, Fleming A, Zakrzewska M, Liberski PP, Zakrzewski K, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Morrissy S, Cavalli F, Taylor MD, van Sluis P, Koster J, Versteeg R, Volckmann R, Mikkelsen T, Aldape K, Reifenberger G, Collins VP, Majewski J, Korshunov A, Lichter P, Plass C, Jabado N, Pfister SM. Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. *Cancer Cell.* 2012;22(4):425–37.
23. Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: A guerilla war. *Acta Neuropathol.* 2007;114(5):443–58.
24. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, Devi SN, Kaur B, Van Meir EG. Pseudopalisades in Glioblastoma Are Hypoxic, Express Extracellular Matrix Proteases, and Are Formed by an Actively Migrating Cell Population. *Cancer Res.* 2004;64(3):920–7.
25. Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. “Pseudopalisading” necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65(6):529–39.
26. da Silva B, Mathew RK, Polson ES, Williams J, Wurdak H. Spontaneous Glioblastoma Spheroid Infiltration of Early-Stage Cerebral Organoids Models Brain Tumor Invasion. *SLAS Discov Adv life Sci R D.* 2018;23(8):862–8.
27. Robertson FL, Marqués-Torrejón M-A, Morrison GM, Pollard SM. Experimental models and tools to tackle glioblastoma. *Dis Model Mech.* 2019;12(9):dmm040386. doi:10.1242/dimm040386
28. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF. *Science.* 1999;284(5422):1994–8.
29. Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, Heidenreich R, Erber R, Wunder A, Tonn JC, Menger MD, Breier G. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J Clin Invest.* 2002;109(6):777–85.
30. Reiss Y, Machein MR, Plate KH. The Role of Angiopoietins During Angiogenesis in Gliomas. *Brain Pathol.* 2005;15(4):311–7.
31. Soda Y, Myskiw C, Rommel A, Verma IM. Mechanisms of neovascularization and resistance to anti-angiogenic therapies in glioblastoma multiforme. *J Mol*

- Med (Berl).2013;91(4):439–48.
32. Wang M, Wang T, Liu S, Yoshida D, Teramoto A. The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades. *Brain Tumor Pathol.* 2003;20(2):65–72.
  33. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2000;2(10):737–44.
  34. 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.
  35. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today.* 1992;13(7):265–70.
  36. Mantovani A. Macrophages, Neutrophils, and Cancer: A Double Edged Sword. *New J Sci.* 2014;2014:1–14.
  37. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(8):519–31.
  38. Piccard H, Muschel RJ, Opdenakker G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;82(3):296–309.
  39. Piao Y, Liang J, Holmes L, Zurita AJ, Henry V, Heymach J V, de Groot JF. Glioblastoma resistance to anti-VEGF therapy is associated with myeloid cell infiltration, stem cell accumulation, and a mesenchymal phenotype. *Neuro Oncol.* 2012;14(11):1379–92.
  40. Liang J, Piao Y, Holmes L, Fuller GN, Henry V, Tiao N, De Groot JF. Neutrophils promote the malignant glioma phenotype through S100A4. *Clin Cancer Res.* 2014;20(7):187–98.
  41. Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Antiangiogenic therapy in malignant gliomas. *Curr Opin Oncol.* 2008;20(6):652–61.
  42. Soffiatti R, Trevisan E, Bertero L, Bosa C, Ruda R. Anti-Angiogenic Approaches to Malignant Gliomas. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012;12(3):279–88.
  43. Badie B, Schartner JM. Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. *Neurosurgery.* 2000;46(4):957–62.
  44. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci.* 2016;19(1):20–7.
  45. Morantz RA, Wood GW, Foster M, Clark M, Gollahon K. Macrophages in experimental and human brain tumors. *J Neurosurg.* 1979;50(3):305–11.
  46. Chen Z, Hambardzumyan D. Immune microenvironment in glioblastoma subtypes. *Front Immunol.* 2018;9:1004, doi: 10.3389/fimmu.2018.01004
  47. 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.
48. Fossati G, Ricevuti G, Edwards SW, Walker C, Dalton A, Rossi ML. Neutrophil infiltration into human gliomas. *Acta Neuropathol.* 1999;98(4):349–54.
  49. Lakshmi Narendra B, Eshvendar Reddy K, Shantikumar S, Ramakrishna S. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm Res.* 2013; 62(9):823–34.
  50. Achyut BR, Shankar A, Iskander ASM, Ara R, Angara K, Zeng P, Knight RA, Scicli AG, Arbab AS. Bone marrow derived myeloid cells orchestrate antiangiogenic resistance in glioblastoma through coordinated molecular networks. *Cancer Lett.* 2015;369(2):416–26.
  51. Quail DF, Joyce JA. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell.* 2017;31(3):326–41.
  52. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FMV. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* 2007;10(12):1538–43.
  53. Salter MW, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell.* 2014;158(1):15–24.
  54. Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M, Heikenwalder M, Brück W, Priller J, Prinz M. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci.* 2007;10(12):1544–53.
  55. Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol.* 2001;101(3):249–55.
  56. Carson MJ, Bilousova TV, Puntambekar SS, Melchior B, Doose JM, Ethell IM. A rose by any other name? The potential consequences of microglial heterogeneity during CNS health and disease. *Neurotherapeutics.* 2007;4(4):571–9.
  57. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009;4(4):399–418.
  58. Springer T, Galfre G, Secher DS, Milstein C. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol.* 1979;9(4):301–6.
  59. Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol.* 1997;75(5):430–45.
  60. 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.
  61. Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J Immunol.* 1995;154(9):4309–21.
  62. Parney IF, Waldron JS, Parsa AT. Flow cytometry and in vitro analysis of human

- glioma-associated macrophages. Laboratory investigation. *J Neurosurg.* 2009;110(3):572–82.
63. Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D. Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia.* 1998;22(1):72–85.
  64. Schmid CD, Sautkulis LN, Danielson PE, Cooper J, Hasel KW, Hilbush BS, Sutcliffe JG, Carson MJ. Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *J Neurochem.* 2002;83(6):1309–20.
  65. Bedard A, Tremblay P, Chernomoretz A, Vallieres L. Identification of genes preferentially expressed by microglia and upregulated during cuprizone-induced inflammation. *Glia.* 2007;55(8):777–89.
  66. Carson MJ, Thrash JC, Lo D. Analysis of microglial gene expression: identifying targets for CNS neurodegenerative and autoimmune disease. *Am J Pharmacogenomics.* 2004;4(5):321–30.
  67. Durafourt BA, Moore CS, Zammit DA, Johnson TA, Zaguia F, Guiot M-C, Bar-Or A, Antel JP. Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia.* 2012;60(5):717–27.
  68. Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;224(3):855–62.
  69. Hendrickx DAE, van Eden CG, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I. Staining of HLA-DR, *Iba1* and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *J Neuroimmunol.* 2017;309:12–22.
  70. Louveau A, Nerriere-Daguin V, Vanhove B, Naveilhan P, Neunlist M, Nicot A, Boudin H. Targeting the CD80/CD86 costimulatory pathway with CTLA4-Ig directs microglia toward a repair phenotype and promotes axonal outgrowth. *Glia.* 2015;63(12):2298–312.
  71. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005;308(5726):1314–8.
  72. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 2005;8(6):752–8.
  73. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron.* 2013;77(1):10–8.
  74. Sierra A, Paolicelli RC, Kettenmann H. Cien Anos de Microglia: Milestones in a Century of Microglial Research. *Trends Neurosci.* 2019;42(11):778–92.
  75. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011;91(2):461–553.
  76. Davoust N, Vuillat C, Androdias G, Nataf S. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol.* 2008;29(5):227–34.
  77. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells

- in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1387–94.
78. Gieryng A, Pszczolkowska D, Walentynowicz KA, Rajan WD, Kaminska B. Immune microenvironment of gliomas. *Lab Investig.* 2017;97(5):498–518.
  79. Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, Van Herwijnen MJC, John S, Taams LS. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(49):19446–51.
  80. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol.* 2016;173(4):649–65.
  81. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci.* 2016;19(8):987–91.
  82. Morganti JM, Riparip LK, Rosi S. Call off the dog(ma): M1/M2 polarization is concurrent following traumatic brain injury. *PLoS One.* 2016;11(1):e0148001
  83. Yi L, Xiao H, Xu M, Ye X, Hu J, Li F, Li M, Luo C, Yu S, Bian X, Feng H. Glioma-initiating cells: A predominant role in microglia/macrophages tropism to glioma. *J Neuroimmunol.* 2011;232(1):75–82.
  84. Roesch S, Rapp C, Dettling S, Herold-Mende C. When Immune Cells Turn Bad-Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
  85. Kratochvill F, Neale G, Haverkamp JM, Van de Velde L-A, Smith AM, Kawauchi D, McEvoy J, Roussel MF, Dyer MA, Qualls JE, Murray PJ. TNF Counterbalances the Emergence of M2 Tumor Macrophages. *Cell Rep.* 2015;12(11):1902–14.
  86. Nolte C, Kirchhoff F, Kettenmann H. Epidermal growth factor is a motility factor for microglial cells in vitro: evidence for EGF receptor expression. *Eur J Neurosci.* 1997;9(8):1690–8.
  87. 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.
  88. Sielska M, Przanowski P, Wylot B, Gabrusiewicz K, Maleszewska M, Kijewska M, Zawadzka M, Kucharska J, Vinnakota K, Kettenmann H, Kotulska K, Grajkowska W, Kaminska B. Distinct roles of CSF family cytokines in macrophage infiltration and activation in glioma progression and injury response. *J Pathol.* 2013;230(3):310–21.
  89. Zhang J, Sarkar S, Yong VW. The chemokine stromal cell derived factor-1 (CXCL12) promotes glioma invasiveness through MT2-matrix metalloproteinase. *Carcinogenesis.* 2005;26(12):2069–77.
  90. Wang S-C, Hong J-H, Hsueh C, Chiang C-S. Tumor-secreted SDF-1 promotes glioma invasiveness and TAM tropism toward hypoxia in a murine astrocytoma model. *Lab Invest.* 2012;92(1):151–62.
  91. Wesolowska A, Kwiatkowska A, Slomnicki L, Dembinski M, Master A, Sliwa M, Franciszkiewicz K, Chouaib S, Kaminska B. Microglia-derived TGF- $\beta$  as an important regulator of glioblastoma invasion—an inhibition of TGF- $\beta$ -dependent effects by shRNA against human TGF- $\beta$  type II receptor. *Oncogene.* 2008;27(7):918–30.
  92. Yeh W-L, Lu D-Y, Liou H-C, Fu W-M. A forward loop between glioma and



- microglia: glioma-derived extracellular matrix-activated microglia secrete IL-18 to enhance the migration of glioma cells. *J Cell Physiol.* 2012;227(2):558–68.
93. Wagner S, Czub S, Greif M, Vince GH, Süss N, Kerkau S, Rieckmann P, Roggendorf W, Roosen K, Tonn J-C. Microglial/macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas. *Int J Cancer.* 1999;82(1):12–6.
  94. Zhou Y, Larsen PH, Hao C, Yong VW. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49481–7.
  95. Mahoney KH, Heppner GH. FACS analysis of tumor-associated macrophage replication: differences between metastatic and nonmetastatic murine mammary tumors. *J Leukoc Biol.* 1987;41(3):205–11.
  96. Mitchem JB, Brennan DJ, Knolhoff BL, Belt BA, Zhu Y, Sanford DE, Belaygorod L, Carpenter D, Collins L, Piwnica-Worms D, Hewitt S, Udupi GM, Gallagher WM, Wegner C, West BL, Wang-Gillam A, Goedegebuure P, Linehan DC, DeNardo DG. Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res.* 2013;73(3):1128–41.
  97. Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T. Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J Immunol.* 1993;151(4):2150–8.
  98. Zhang L, Alizadeh D, Van Handel M, Kortylewski M, Yu H, Badie B. Stat3 inhibition activates tumor macrophages and abrogates glioma growth in mice. *Glia.* 2009;57(13):1458–67.
  99. Sato T, Terai M, Tamura Y, Alexeev V, Mastrangelo MJ, Selvan SR. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res.* 2011;51(2–3):170–82.
  100. Polverini PJ, Leibovich SJ. Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages. *Lab Invest.* 1984;51(6):635–42.
  101. Piperi C, Samaras V, Levidou G, Kavantzias N, Boviatsis E, Petraki K, Grivas A, Barbatis C, Varsos V, Patsouris E, Korkolopoulou P. Prognostic significance of IL-8-STAT-3 pathway in astrocytomas: correlation with IL-6, VEGF and microvessel morphometry. *Cytokine.* 2011;55(3):387–95.
  102. Samaras V, Piperi C, Levidou G, Zisakis A, Kavantzias N, Themistocleous MS, Boviatsis EI, Barbatis C, Lea RW, Kalofoutis A, Korkolopoulou P. Analysis of interleukin (IL)-8 expression in human astrocytomas: Associations with IL-6, cyclooxygenase-2, vascular endothelial growth factor, and microvessel morphometry. *Hum Immunol.* 2009;70(6):391–7.
  103. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001;357(9255):539–45.
  104. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, Olson OC, Quick ML, Huse JT, Teijeiro V, Setty M, Leslie CS, Oei Y, Pedraza A, Zhang J, Brennan CW, Sutton JC, Holland EC, Daniel D, Joyce JA. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med.* 2013;19(10):1264–72.

105. Mori Y, Iwasaki H, Kohno K, Yoshimoto G, Kikushige Y, Okeda A, Uike N, Niiro H, Takenaka K, Nagafuji K, Miyamoto T, Harada M, Takatsu K, Akashi K. Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: Revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J Exp Med.* 2009;206(1):183–93.
106. Rosales C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front Physiol.* 2018;9:113, doi:10.3389/fphys.2018.00113.
107. Dabrowska D, Jablonska E, Garley M, Ratajczak-Wrona W, Iwaniuk A. New Aspects of the Biology of Neutrophil Extracellular Traps. *Scand J Immunol.* 2016;84(6):317–22.
108. Silvestre-Roig C, Hidalgo A, Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: Implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood.* 2016;127(18):2173–81.
109. Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, Lang S, Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(8):1155–67.
110. Tecchio C, Cassatella MA. Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. *Semin Immunol.* 2016;28(2):119–28.
111. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev.* 2000;177:195–203.
112. Wittamer V, Bondue B, Guillabert A, Vassart G, Parmentier M, Communi D. Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity. *J Immunol.* 2005;175(1):487–93.
113. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 2011;32(10):452–60.
114. Chen F, Wu W, Millman A, Craft JF, Chen E, Patel N, Boucher JL, Urban JFJ, Kim CC, Gause WC. Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nat Immunol.* 2014;15(10):938–46.
115. Noubouossie DF, Reeves BN, Strahl BD, Key NS. Neutrophils: Back in the thrombosis spotlight. *Blood.* 2019;133(20):2186–97.
116. Demers M, Wagner DD. NETosis: a new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(3):277–83.
117. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532–5.
118. Wu L, Saxena S, Awaji M, Singh RK. Tumor-Associated Neutrophils in Cancer: Going Pro. *Cancers (Basel).* 2019;11(4):564.
119. Gifford AM, Chalmers JD. The role of neutrophils in cystic fibrosis. *Curr Opin Hematol.* 2014;21(1):16–22.
120. Sônego F, Castanheira FVES, Ferreira RG, Kanashiro A, Leite CAVG, Nascimento DC, Colón DF, Borges V de F, Alves-Filho JC, Cunha FQ. Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. *Front*

- Immunol. 2016;7:155.doi: 10.3389/fimmu.2016.00155.
121. Schmidt H, Bastholt L, Geertsen P, Christensen IJ, Larsen S, Gehl J, Von Der Maase H. Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: A prognostic model. *Br J Cancer*. 2005;93(3):273–8.
  122. Faria SS, Fernandes PC, Silva MJB, Lima VC, Fontes W, Freitas R, Eterovic AK, Forget P. The neutrophil-to-lymphocyte ratio: A narrative review. *Ecancermedicalscience*. 2016;10:702. doi:10.3332/ecancer.2016.702
  123. McGary CT, Miele ME, Welch DR. Highly metastatic 13762NF rat mammary adenocarcinoma cell clones stimulate bone marrow by secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3 activity. *Am J Pathol*. 1995;147(6):1668–81.
  124. Mishalian I, Bayuh R, Levy L, Zolotarov L, Michaeli J, Fridlender ZG. Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(11):1745–56.
  125. Cedervall J, Zhang Y, Huang H, Zhang L, Femel J, Dimberg A, Olsson A-K. Neutrophil Extracellular Traps Accumulate in Peripheral Blood Vessels and Compromise Organ Function in Tumor-Bearing Animals. *Cancer Res*. 2015;75(13):2653–62.
  126. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*. 2009;16(3):183–94.
  127. Shaul ME, Levy L, Sun J, Mishalian I, Singhal S, Kapoor V, Horng W, Fridlender G, Albelda SM, Fridlender ZG. Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGFβ modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. *Oncoimmunology*. 2016;5(11):e1232221. doi: 10.1080/2162402X.2016.1232221
  128. Shojaei F, Singh M, Thompson JD, Ferrara N. Role of Bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(7):2640–5.
  129. Shaul ME, Fridlender ZG. Neutrophils as active regulators of the immune system in the tumor microenvironment. *J Leukoc Biol*. 2017;102(2):343–9.
  130. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990;11(2):231–8.
  131. Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom M-L. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2004;59(6):566–73.
  132. Kiselak EA, Shen X, Song J, Gude DR, Wang J, Brody SL, Strauss JF 3rd, Zhang Z. Transcriptional regulation of an axonemal central apparatus gene, sperm-associated antigen 6, by a SRY-related high mobility group transcription factor, S-SOX5. *J Biol Chem*. 2010;285(40):30496–505.
  133. Natoli M, Leoni BD, D’Agnano I, D’Onofrio M, Brandi R, Arisi I, Zucco F, Felsani A. Cell growing density affects the structural and functional properties of Caco-2

- differentiated monolayer. *J Cell Physiol.* 2011;226(6):1531–43.
134. O'Callaghan J, Butto LF, MacSharry J, Nally K, O'Toole PW. Influence of adhesion and bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* on the intestinal epithelial cell transcriptional response. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(15):5196–203.
  135. Feuser K, Thon K-P, Bischoff SC, Lorentz A. Human intestinal mast cells are a potent source of multiple chemokines. *Cytokine.* 2012;58(2):178–85.
  136. Bhaskar A, Gupta R, Sreenivas V, Rani L, Kumar L, Sharma A, Sharma OD, Sharma MC, Thakur SC. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 on progression free survival in multiple myeloma. *Leuk Res.* 2013;37(4):410–5.
  137. Sarkar S, Sinsimer KS, Foster RL, Brewer G, Pestka S. AUF1 isoform-specific regulation of anti-inflammatory IL10 expression in monocytes. *J Interferon Cytokine Res.* 2008;28(11):679–91.
  138. Goriely S, Vincart B, Stordeur P, Vekemans J, Willems F, Goldman M, De Wit D. Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. *J Immunol.* 2001;166(3):2141–6.
  139. Brown GT, Narayanan P, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM. Lipopolysaccharide stimulates platelets through an IL-1beta autocrine loop. *J Immunol.* 2013;191(10):5196–203.
  140. Adi Harel S, Bossel Ben-Moshe N, Aylon Y, Bublik DR, Moskovits N, Toperoff G, Azaiza D, Biagoni F, Fuchs G, Wilder S, Hellman A, Blandino G, Domany E, Oren M. Reactivation of epigenetically silenced miR-512 and miR-373 sensitizes lung cancer cells to cisplatin and restricts tumor growth. *Cell Death Differ.* 2015;22(8):1328–40.
  141. Li L, Chen D, Wang C, Liu G, Ran X. The Effect of Autologous Platelet-Rich Gel on the Dynamic Changes of the Matrix Metalloproteinase-2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Expression in the Diabetic Chronic Refractory Cutaneous Ulcers. *J Diabetes Res.* 2015;2015:954701. doi: 10.1155/2015/954701
  142. Kumar S, Wang J, Rani R, Gandhi CR. Hepatic Deficiency of Augmenter of Liver Regeneration Exacerbates Alcohol-Induced Liver Injury and Promotes Fibrosis in Mice. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147864. doi: 10.1371/journal.pone.0147864
  143. Chung J-Y, Song Y, Wang Y, Magness RR, Zheng J. Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(5):2484–90.
  144. Subramani M, Ponnalagu M, Krishna L, Jeyabalan N, Chevour P, Sharma A, Jayadev C, Shetty R, Begum N, Archunan G, Das D. Resveratrol reverses the adverse effects of bevacizumab on cultured ARPE-19 cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):12242.doi:10.1038/s41598-017-12496-z
  145. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clinical chemistry.* 2002;48(10):1819–27.
  146. Jacob MC, Favre M, Bensa J -C. Membrane cell permeabilisation with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. *Cytometry.* 1991;12(6):550–8.

147. Chardin P, McCormick F, Brefeldin A: The Advantage of Being Uncompetitive. *Cell*. 1999;97(2):153–5.
148. Mason JT, O’Leary TJ. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J Histochem Cytochem*. 1991;39(2):225–9.
149. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012;2(5):401–4.
150. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013;6(269):pl1.doi:10.1126/scisignal.2004088
151. Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y, Hoang CD, Diehn M, Alizadeh AA. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods*. 2015;12(5):453–7.
152. Clarkson DB, Fan Y-A, Joe H. A remark on algorithm-643 - FEXACT - An algorithm for performing fisher’s exact test in  $r \times c$  contingency-tables. *ACM Trans Math Softw*. 1993;19(4):484–8.
153. Tian M, Ma W, Chen Y, Yu Y, Zhu D, Shi J, Zhang Y. Impact of gender on the survival of patients with glioblastoma. *Biosci Rep*. 2018;38(6):1–9.
154. Ostrom QT, Rubin JB, Lathia JD, Berens ME, Barnholtz-Sloan JS. Females have the survival advantage in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2018;20(4):576–7.
155. Gately L, Collins A, Murphy M, Dowling A. Age alone is not a predictor for survival in glioblastoma. *J Neurooncol*. 2016;129(3):479–85.
156. Dunn J, Baborie A, Alam F, Joyce K, Moxham M, Sibson R, Crooks D, Husband D, Shenoy A, Brodbelt A, Wong H, Liloglou T, Haylock B, Walker C. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *Br J Cancer*. 2009;101(1):124–31.
157. Weller M, Tabatabai G, Kästner B, Felsberg J, Steinbach JP, Wick A, Schnell O, Hau P, Herrlinger U, Sabel MC, Wirsching HG, Ketter R, Bähr O, Platten M, Tonn JC, Schlegel U, Marosi C, Goldbrunner R, Stupp R, Homicsko K, Pichler J, Nikkhah G, Meixensberger J, Vajkoczy P, Kollias S, Hüsing J, Reifenberger G. MGMT promoter methylation is a strong prognostic biomarker for benefit from dose-intensified temozolomide rechallenge in progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clin Cancer Res*. 2015;21(9):2057–64.
158. Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, Cohen-Jonathan-Moyal E, Frappaz D, Henriksson R, Balana C, Chinot O, Ram Z, Reifenberger G, Soffietti R, Wick W. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol*. 2014;15(9):395–403.
159. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, Hegi ME. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol*. 2010;6(1):39–51.
160. Radke J, Koch A, Pritsch F, Schumann E, Misch M, Hempt C, Lenz K, Lobel F,

- Paschereit F, Heppner FL, Vajkoczy P, Koll R, Onken J. Predictive MGMT status in a homogeneous cohort of IDH wildtype glioblastoma patients. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):89.
161. Zhang P, Martin M, Yang Q-B, Michalek SM, Katz J. Role of B7 costimulatory molecules in immune responses and T-helper cell differentiation in response to recombinant HagB from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 2004;72(2):637–44.
  162. Harris NL, Ronchese F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol Cell Biol.* 1999;77(4):304–11.
  163. Zhou T, Huang Z, Sun X, Zhu X, Zhou L, Li M, Cheng B, Liu X, He C. Microglia polarization with M1/M2 phenotype changes in rd1 mouse model of retinal degeneration. *Front Neuroanat.* 2017;11:77.doi:10.3389/fnana.2017.00077
  164. Satoh J, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, Saito Y. TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology.* 2016;36(1):39–49.
  165. Beschorner R, Nguyen TD, Gözalan F, Pedal I, Mattern R, Schluesener HJ, Meyermann R, Schwab JM. CD14 expression by activated parenchymal microglia/macrophages and infiltrating monocytes following human traumatic brain injury. *Acta Neuropathol.* 2002;103(6):541–9.
  166. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21(1):107–37.
  167. Rheinlander A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol Lett.* 2018;196:22–32. doi:10.1016/j.imlet.2018.01.009
  168. 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.
  169. Kovaleva OV, SamoiloVA DV, Shitova MS, Gratchev A. Tumor Associated Macrophages in Kidney Cancer. *Anal Cell Pathol.* 2016;2016.doi: 10.1155/2016/9307549
  170. Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, Pucci F, Scielzo C, Zonari E, Mazzieri R, Doglioni C, Naldini L. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood.* 2007;109(12):5276–85.
  171. García S, Krausz S, Ambarus CA, Fernández BM, Hartkamp LM, Van Es IE, Hamann J, Baeten DL, Tak PP, Reedquist KA. Tie2 signaling cooperates with TNF to promote the pro-inflammatory activation of human macrophages independently of macrophage functional phenotype. *PLoS One.* 2014;9(1): e82088. doi:10.1371/journal.pone.0082088
  172. Parikh SM. Angiopoietins and Tie2 in vascular inflammation. *Curr Opin Hematol.* 2017;24(5):432–8.
  173. Kowal K, Silver R, Slawinska E, Bielecki M, Chyczewski L, Kowal-Bielecka O. CD163 and its role in inflammation. *Folia Histochem Cytobiol.* 2011;49(3):365–74.
  174. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi LS, Politi LS, Sampaolesi M, Naldini L. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for

- tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell*. 2005;8(3):211–26.
175. Koh YW, Park CS, Yoon DH, Suh C, Huh J. CD163 Expression was associated with angiogenesis and shortened survival in patients with uniformly treated classical Hodgkin lymphoma. *PLoS One*. 2014;9(1): e87066.doi: 10.1371/journal.pone.0087066
  176. Pucci F, Venneri MA, Biziato D, Nonis A, Moi D, Sica A, Di Serio C, Naldini L, De Palma M. A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes, blood “resident” monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships. *Blood*. 2009;114(4):901–14.
  177. Guo L, Akahori H, Harari E, Smith SL, Polavarapu R, Karmali V, Otsuka F, Gannon RL, Braumann RE, Dickinson MH, Gupta A, Jenkins AL, Lipinski MJ, Kim J, Chhour P, de Vries PS, Jinnouchi H, Kutys R, Mori H, Kutyna MD, Torii S, Sakamoto A, Choi CU, Cheng Q, Grove ML, Sawan MA, Zhang Y, Cao Y, Kolodgie FD, Cormode DP, Arking DE, Boerwinkle E, Morrison AC, Erdmann J, Sotoodehnia N, Virmani R, Finn A V. CD163+ macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by inflammation in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2018;128(3):1106–24.
  178. Roggendorf W, Strupp S, Paulus W. Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. *Acta Neuropathol*. 1996;92(3):288–93.
  179. Annovazzi L, Mellai M, Bovio E, Mazzetti S, Pollo B, Schiffer D. Microglia immunophenotyping in gliomas. *Oncol Lett*. 2018;15(1):998–1006.
  180. Lin C, McGough R, Aswad B, Block JA, Terek R. Hypoxia induces HIF-1alpha and VEGF expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes. *J Orthop Res*. 2004;22(6):1175–81.
  181. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996;16(9):4604–13.
  182. Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, Ruoslahti E. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res*. 2000;60(3):722–7.
  183. Duckworth C, Zhang L, Carroll SL, Ethier SP, Cheung HW. Overexpression of GAB2 in ovarian cancer cells promotes tumor growth and angiogenesis by upregulating chemokine expression. *Oncogene*. 2016;35(31):4036–47.
  184. Hashida H, Takabayashi A, Kanai M, Adachi M, Kondo K, Kohno N, Yamaoka Y, Miyake M. Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology*. 2002;122(2):376–86.
  185. Gacche RN. Compensatory angiogenesis and tumor refractoriness. *Oncogenesis*. 2015;4:e153.doi: 10.1038/oncsis.2015.14
  186. Waugh DJJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(21):6735–41.

187. Cheng Y, Ma X, Wei Y, Wei X-W. Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2019;1871(2):289–312.
188. Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer*. 2000;88(11):2606–18.
189. Treps L, Perret R, Edmond S, Ricard D, Gavard J. Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *J Extracell vesicles*. 2017;6(1):1359479.doi:10.1080/20013078.2017.1359479
190. Bruyere C, Mijatovic T, Lonez C, Spiegl-Kreinecker S, Berger W, Kast RE, Ruyschaert J-M, Kiss R, Lefranc F. Temozolomide-induced modification of the CXC chemokine network in experimental gliomas. *Int J Oncol*. 2011;38(5):1453–64.
191. Sharma I, Singh A, Siraj F, Saxena S. IL-8/CXCR1/2 signalling promotes tumor cell proliferation, invasion and vascular mimicry in glioblastoma. *J Biomed Sci*. 2018;25(1):62.
192. Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, Fang X, Sloan AE, Mao Y, Lathia JD, Min W, McLendon RE, Rich JN, Bao S. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*. 2013;153(1):139–52.
193. Birner P, Piribauer M, Fischer I, Gatterbauer B, Marosi C, Ambros PF, Ambros IM, Bredel M, Oberhuber G, Rossler K, Budka H, Harris AL, Hainfellner JA. Vascular patterns in glioblastoma influence clinical outcome and associate with variable expression of angiogenic proteins: evidence for distinct angiogenic subtypes. *Brain Pathol*. 2003;13(2):133–43.
194. Mathivet T, Bouleti C, Van Woensel M, Stanchi F, Verschuere T, Phng L-K, Dejaegher J, Balcer M, Matsumoto K, Georgieva PB, Belmans J, Sciot R, Stockmann C, Mazzone M, De Vleeschouwer S, Gerhardt H. Dynamic stroma reorganization drives blood vessel dysmorphia during glioma growth. *EMBO Mol Med*. 2017;9(12):1629–45.
195. Radbruch A, Eidel O, Wiestler B, Paech D, Burth S, Kickingeder P, Nowosielski M, Bäumer P, Wick W, Schlemmer H-P, Bendszus M, Ladd M, Nagel AM, Heiland S. Quantification of tumor vessels in glioblastoma patients using time-of-flight angiography at 7 Tesla: a feasibility study. *PLoS One*. 2014;9(11):e110727.doi:10.1371/journal.pone.0110727
196. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(8):610–22.
197. Kast RE, Hill QA, Wion D, Mellstedt H, Focosi D, Karpel-Massler G, Heiland T, Halatsch ME. Glioblastoma-synthesized G-CSF and GM-CSF contribute to growth and immunosuppression: Potential therapeutic benefit from dapsone, fenofibrate, and ribavirin. *Tumor Biol*. 2017;39(5).1010428317699797. doi:10.1177/1010428317699797.
198. Kohanbash G, McKaveney K, Sakaki M, Ueda R, Mintz AH, Amankulor N, Fujita M, Ohlfest JR, Okada H. GM-CSF promotes the immunosuppressive activity of glioma-infiltrating myeloid cells through interleukin-4 receptor-alpha. *Cancer*



- Res. 2013;73(21):6413–23.
199. 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.
  200. Zhang G-X, Li J, Ventura E, Rostami A. Parenchymal Microglia of Naïve Adult C57BL/6J Mice Express High Levels of B7.1, B7.2, and MHC Class II. *Exp Mol Pathol*. 2002;73(1):35–45.
  201. Müller A, Brandenburg S, Turkowski K, Müller 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.
  202. Gabrusiewicz K, Liu D, Cortes-Santiago N, Hossain MB, Conrad CA, Aldape KD, Fuller GN, Marini FC, Alonso MM, Idoate MA, Gilbert MR, Fueyo J, Gomez-Manzano C. Anti-vascular endothelial growth factor therapy-induced glioma invasion is associated with accumulation of Tie2-expressing monocytes. *Oncotarget*. 2014;5(8):2208–20.
  203. 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.
  204. De Palma M, Murdoch C, Venneri MA, Naldini L, Lewis CE. Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends Immunol*. 2007;28(12):519–24.
  205. Turrini R, Pabois A, Xenarios I, Coukos G, Delaloye J-F, Doucey M-A. TIE-2 expressing monocytes in human cancers. *Oncoimmunology*. 2017;6(4):e1303585.doi: 10.1080/2162402X.2017.1303585.
  206. Ehrentraut H, Weisheit C, Scheck M, Frede S, Hilbert T. Experimental murine acute lung injury induces increase of pulmonary TIE2-expressing macrophages. *J Inflamm*. 2018;15(1):12.doi:10.1186/s12950-018-0188-5.
  207. De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 2003;9(6):789–95.
  208. Awad RM, De Vlaeminck Y, Maebe J, Goyvaerts C, Breckpot K. Turn Back the TIME: Targeting Tumor Infiltrating Myeloid Cells to Revert Cancer Progression. *Front Immunol*. 2018;9:1977.doi: 10.3389/fimmu.2018.01977
  209. Bronte V, Brandau S, Chen S-H, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, Mandruzzato S, Murray PJ, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Rodriguez PC, Sica A, Umansky V, Vonderheide RH, Gabrilovich DI. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*. 2016;7(1):12150. doi: 10.1038/ncomms12150
  210. Condamine T, Dominguez GA, Youn J-I, Kossenkov AV, Mony S, Alicea-Torres K, Tcyganov E, Hashimoto A, Nefedova Y, Lin C, Partlova S, Garfall A, Vogl DT, Xu X, Knight SC, Malietzis G, Lee GH, Eruslanov E, Albelda SM, Wang X, Mehta JL, Bewtra M, Rustgi A, Hockstein N, Witt R, Masters G, Nam B, Smirnov D, Sepulveda MA, Gabrilovich DI. Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived

- suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol.* 2016;1(2). aaf8943. doi:10.1126/sciimmunol.aaf8943
211. Kim J, Bae J-S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:6058147. doi:10.1155/2016/6058147
212. Guo P, Imanishi Y, Cackowski FC, Jarzynka MJ, Tao H-Q, Nishikawa R, Hirose T, Hu B, Cheng S-Y. Up-regulation of angiopoietin-2, matrix metalloprotease-2, membrane type 1 metalloprotease, and laminin 5 gamma 2 correlates with the invasiveness of human glioma. *Am J Pathol.* 2005;166(3):877–90.
213. Mizee MR, Miedema SSM, van der Poel M, Adelia, Schuurman KG, van Strien ME, Melief J, Smolders J, Hendrickx DA, Heutinck KM, Hamann J, Huitinga I. Isolation of primary microglia from the human post-mortem brain: effects of ante- and post-mortem variables. *Acta Neuropathol Commun.* 2017;5(1):16.
214. Morin-Brureau M, Milior G, Royer J, Chali F, LeDuigou C, Savary E, Blugeon C, Jourden L, Akbar D, Dupont S, Navarro V, Baulac M, Bielle F, Mathon B, Clemenceau S, Miles R. Microglial phenotypes in the human epileptic temporal lobe. *Brain.* 2018;141(12):3343–60.
215. Rigau V, Morin M, Rousset M-C, de Bock F, Lebrun A, Coubes P, Picot M-C, Baldy-Moulinier M, Bockaert J, Crespel A, Lerner-Natoli M. Angiogenesis is associated with blood–brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain.* 2007;130(7):1942–56.
216. Pernhorst K, Herms S, Hoffmann P, Cichon S, Schulz H, Sander T, Schoch S, Becker AJ, Grote A. TLR4, ATF-3 and IL8 inflammation mediator expression correlates with seizure frequency in human epileptic brain tissue. *Seizure.* 2013;22(8):675–8.
217. Boer K, Spliet WGM, van Rijen PC, Redeker S, Troost D, Aronica E. Evidence of activated microglia in focal cortical dysplasia. *J Neuroimmunol.* 2006;173(1):188–95.
218. Feast A, Martinian L, Liu J, Catarino CB, Thom M, Sisodiya SM. Investigation of hypoxia-inducible factor-1alpha in hippocampal sclerosis: a postmortem study. *Epilepsia.* 2012;53(8):1349–59.
219. Boer K, Troost D, Spliet WGM, Van Rijen PC, Gorter JA, Aronica E. Cellular distribution of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and B (VEGFB) and VEGF receptors 1 and 2 in focal cortical dysplasia type IIB. *Acta Neuropathol.* 2008;115(6):683–96.
220. Jablonska J, Leschner S, Westphal K, Lienenklaus S, Weiss S. Neutrophils responsive to endogenous IFN- $\beta$  regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J Clin Invest.* 2010;120(4):1151–64.
221. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol.* 2005;7(2):122–33.
222. Xuan W, Qu Q, Zheng B, Xiong S, Fan G-H. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. *J Leukoc Biol.* 2015;97(1):61–9.
223. 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;66(1):161–74.
224. Osterberg N, Ferrara N, Vacher J, Gaedicke S, Niedermann G, Weyerbrock A, Doostkam S, Schaefer HE, Plate KH, Machein MR. Decrease of VEGF-A in myeloid cells attenuates glioma progression and prolongs survival in an experimental glioma model. *Neuro Oncol*. 2016;18(7):939–49.
  225. Erber R, Thurnher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes H-P, Menger MD, Ullrich A, Vajkoczy P. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2004;18(2):338–40.
  226. Zhou S-L, Zhou Z-J, Hu Z-Q, Huang X-W, Wang Z, Chen E-B, Fan J, Cao Y, Dai Z, Zhou J. Tumor-Associated Neutrophils Recruit Macrophages and T-Regulatory Cells to Promote Progression of Hepatocellular Carcinoma and Resistance to Sorafenib. *Gastroenterology*. 2016;150(7):1646-1658.e17.doi:10.1053/j.gastro.2016.02.040
  227. Moses K, Brandau S. Human neutrophils: Their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells. *Semin Immunol*. 2016;28(2):187–96. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532316300045>
  228. Acker G, Zollfrank J, Jelgersma C, Nieminen-Kelha M, Kremenetskaia I, Mueller S, Ghori A, Vajkoczy P, Brandenburg S. The CXCR2/CXCL2 signalling pathway - An alternative therapeutic approach in high-grade glioma. *Eur J Cancer*. 2020;126:106–15. doi:10.1016/j.ejca.2019.12.005.
  229. Angara K, Borin TF, Rashid MH, Lebedyeva I, Ara R, Lin P-C, Iskander ASM, Bollag RJ, Achyut BR, Arbab AS. CXCR2-Expressing Tumor Cells Drive Vascular Mimicry in Antiangiogenic Therapy-Resistant Glioblastoma. *Neoplasia*. 2018;20(10):1070–82. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.08.011>
  230. Lu-Emerson C, Snuderl M, Kirkpatrick ND, Goveia J, Davidson C, Huang Y, Riedemann L, Taylor J, Ivy P, Duda G, Ancukiewicz M, Plotkin SR, Chi AS, Gerstner ER, Eichler AF, Dietrich J, Stemmer-Rachamimov AO, Batchelor TT, Jain RK. After Antiangiogenic Therapy Is Associated With Poor Survival Among Patients With Recurrent Glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2013;15(8):1079–87.
  231. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, Van den Bossche J, Mack M, Pipeleers D, In't Veld P, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res*. 2010;70(14):5728–39.
  232. Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G. Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood*. 1996;87(9):3877–82.
  233. Strasly M, Cavallo F, Geuna M, Mitola S, Colombo MP, Forni G, Bussolino F. IL-12 inhibition of endothelial cell functions and angiogenesis depends on lymphocyte-endothelial cell cross-talk. *J Immunol*. 2001;166(6):3890–9.
  234. Strauss KI, Elisevich K V. Brain region and epilepsy-associated differences in inflammatory mediator levels in medically refractory mesial temporal lobe epilepsy. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):270.

## 7 Anhang

### 7.1 Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

„Ich, Anne Blank, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Einfluss der Zusammensetzung der myeloiden Zellpopulation auf die Expression alternativer proangiogener Faktoren durch Mikroglia/Makrophagen im humanen Glioblastom“/“Influence of composition of myeloid cell population to expression of alternative proangiogenic factors in microglia/macrophages in human glioblastoma“ 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/innen 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.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

**Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Anne Blank hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: 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

Beitrag im Einzelnen: Zur Verfügung stellen der humanen Glioblastomproben und Färbung von VEGF zusammen mit DAPI und Iba1 (Suppl. Figure 4).

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **7.2 Curriculum Vitae**

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







### 7.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. P. Vajkoczy, für die Möglichkeit der Durchführung dieser Doktorarbeit in seinem Institut, seine wissenschaftliche Expertise sowie die dadurch entstandene Forderung und Förderung durch die Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen, Präsentationen und Meetings. Auch für die kontinuierliche Hilfestellung beim Lösen organisatorischer und wissenschaftlicher Problemstellungen gilt ihm mein Dank.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Susan Brandenburg bedanken, die nach einem Vorstellungsgespräch zu einer anderen Thematik extra das Thema dieser Promotion für unsere Zusammenarbeit formuliert hat. Ihr großes Fachwissen, ihre Akribie und ihr engagiertes Mentoring waren mir jeder Zeit eine große Unterstützung und Vorbild. Ihr ist es zu verdanken, dass diese Promotion in dem vorhandenen Umfang überhaupt möglich wurde und ich vielfältige experimentelle Methoden erlernen und meinerseits eigene Ideen in diese Arbeit einbringen konnte.

Zudem danke ich allen beteiligten Kollegen der Neurochirurgie, die durch ihre Kooperation die intraoperative Probengewinnung und den aufwändigen organisatorischen Ablauf ermöglicht haben.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen anderen Kollegen der „AG Mikroglia“ bedanken, die mich so herzlich in ihrer Mitte aufgenommen haben und ihr breites fachliches und methodisches Wissen mit mir geteilt haben. Ohne Kati Turkowski und Annett Müller wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen und ich möchte mich an dieser Stelle für die fachliche und mentale Unterstützung bedanken. Auch dem gesamten Labor-Team gilt mein Dank für die kooperative Zusammenarbeit, wobei ich Alexandra Gieffers und Sabine Seidlitz für ihre freundschaftliche Hilfe bei vielen organisatorischen Problemen besonders hervorheben möchte.

Außerdem danke ich meinen Freunden, die mich immer unterstützt und motiviert haben, wenn es mit der Arbeit etwas schleppender voran ging, als es mir lieb war.

Zu guter Letzt möchte ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben danken: Meiner Mutter, Ines Blank, und meinem Freund René Golinske. Ich danke ihnen dafür, dass sie immer für mich da waren, mich unterstützt haben, an mich geglaubt haben, mir bei meinem „Fachchinesisch“ zugehört und sich allergrößte Mühe gegeben haben, es

nicht nur zu verstehen, sondern auch Lösungsvorschläge zu unterbreiten. Vielen Dank, Mama, dass du so viel für mich getan hast und es mir ermöglichst hast, meinen Weg zu gehen und diese Arbeit und Worte hier überhaupt zu schreiben. Auch meinen Großeltern gilt mein Dank dafür, auch wenn sie dies leider nicht mehr lesen können.