

Aus dem Max-Delbrück-Centrum  
für molekulare Medizin Berlin-Buch

---

## **Dissertation**

# **Etablierung eines in-situ Phagozytose-Modells für gliom-assoziierte Mikroglia/Makrophagen in humanen Glioblastom-Schnittkulturen**

---

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Jan-Frederik Fischer**  
aus Nürnberg

Datum der Promotion: 03.12.2021



## Inhalt

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>0.1. Kurzzusammenfassung (Deutsch) .....</b>	<b>10</b>
<b>0.2. Abstract (English) .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>13</b>
1.1. Das Glioblastom (GBM) .....	13
1.1.1. Definition .....	13
1.1.2. Epidemiologie und Ätiologie .....	13
1.1.3. Tumorgenese, Molekulargenetik und tumorale Heterogenität .....	14
1.1.4. Klinik, Diagnose und aktuelle Therapie .....	18
1.1.5. Mikroumgebung des Glioblastoma multiforme.....	20
1.2. Mikroglia und Makrophagen .....	21
1.2.1. Ursprung, Morphologie und funktionelle Eigenschaften.....	21
1.2.2. Eigenschaften und Heterogenität gliom-assoziiertes Mikroglia und Makrophagen (GAMs).....	23
1.3. Phagozytose im ZNS.....	24
1.3.1. Definition, Funktionen und physiologische Grundlagen .....	24
1.3.2. Modulation der Phagozytose-Aktivität von Mikroglia/Makrophagen .....	29
1.3.2.1. Nucleotide ATP, UDP .....	29
1.3.2.2. Cytochalasin D.....	30
1.3.3. Phagozytose von GAMs unter dem Einfluss von Gliomzellen .....	26
1.3.4. Einfluss von Temozolomid auf GAMs.....	30
1.4. Ziele der Forschungsarbeit.....	31
<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>32</b>
2.1. Materialien .....	32
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien .....	32

2.1.2. Puffer und Lösungen.....	33
2.1.3. Antikörper und fluoreszierende Reagenzien.....	34
2.1.4. Ausrüstung und Geräte .....	34
2.1.5. Software.....	36
<b>2.2. Methoden .....</b>	<b>36</b>
2.2.1. Humane GBM-Proben.....	36
2.2.2. Patienteninformation .....	37
2.2.3. Präparation humaner organotypischer Glioblastomschnitte.....	38
2.2.4. Methodische Durchführung der Phagozytose-Experimente.....	39
2.2.4.1: Experiment 1 und Experiment 1* .....	39
2.2.4.2: Experiment 2.....	41
2.2.4.3: Inkubation mit Polystyren-Mikrosphären .....	42
2.2.5. Färbung der Glioblastomschnitte.....	44
2.2.6. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von z-Stapeln.....	45
2.2.7. 3D-Rekonstruktion der z-Stapel mittels Imaris.....	47
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
3.1. Patientencharakteristika .....	51
3.2. Penetrationstiefe der Polystyren-Partikel im Glioblastomschnitt .....	51
3.3. Ebenenbezogene Heterogenitätsstratifizierung der GBM-Proben .....	53
3.4. Analyse der Phagozytose-Aktivität.....	57
3.4.1. Einfluss von ATP, UDP und Cytochalasin D auf die Phagozytose-Aktivität von GAMs.....	57
3.4.2. Phagozytose von GAMs nach Temozolomid-Inkubation .....	63
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>67</b>
4.1. Zusammenfassung.....	67
4.2. Methodik und Limitationen .....	68
4.3. Experiment 1: Kein Effekt von ATP, UDP und Cytochalasin D auf die Phagozytose-Aktivität von GAMs .....	71
4.3.1. Cytochalasin D-Wirkung auf GAMs im GBM-Tumormilieu.....	73

4.4. Temozolomid und die Phagozytose von GAMs .....	74
4.5. Limitation und Ausblick.....	77
4.6. Zusammenfassung.....	79
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>94</b>
<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>96</b>
<b>Publikationsliste: .....</b>	<b>98</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>99</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

Abb.: Abbildung

ATP: Adenosintriphosphat

ACSF: artifizielle cerebro-spinale Flüssigkeit

BB: Bright blue

BHS: Blut-Hirn-Schranke

CD: Cluster of differentiation

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit/Liquor

CSF-1: Colony stimulating factor 1

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimethylsulfoxid

DPBS: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

*EGFR: Epidermal growth factor receptor*

FKS: fötales Kälberserum

GAMs: Gliom-assoziierte Mikroglia/Makrophagen

GBM: Glioblastom

GCM: Glioma-conditioned medium/Gliom-konditioniertes Medium

Gy: Gray

HBSS: Hank's balanced salt solution

IBA1: ionisiertes calcium-bindendes Adaptermolekül 1

*IDH1: Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1*

IgE: Immunglobulin E

k. A.: keine Angabe

LSM: Laser-Scanning-Mikroskop

MCP-1: Monocyte-chemoattractant protein-1

*MGMT: O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase-Gen*

MEM: Minimal essential medium

MRT: Magnetresonanztomografie

MTIC: Monomethyltriazenylimidazolcarboxamid

n: Anzahl der Stichproben

n. e.: nicht erhöht

*NF1: Neurofibromin 1*

PB: Phosphatpuffer

*PDGFRA: Platelet derived growth factor receptor alpha*

PFA: Paraformaldehyd

Ph-I: Phagozytose-Index

PI: Propidiumiodid

PS: Penicillin, Streptomycin

PSG: Penicillin, Streptomycin, Glutamin

*PTEN: Phosphatase and Tensin homolog*

*RB1: RB transcriptional corepressor 1*

rpm: revolutions per minute/Umdrehungen pro Minute

SD: Standardabweichung

Sv: Sievert

TMZ: Temozolomid

*TP53: Tumorprotein p53 Gen*

UDP: Uridindiphosphat

v/v: Volumenmäßiger Anteil bezogen auf das Gesamtvolumen

wt: Wildtyp

ZNS: Zentrales Nervensystem

## **Tabellenverzeichnis**

TABELLE 1: REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN.....	33
TABELLE 2: PUFFER UND LÖSUNGEN .....	33
TABELLE 3: ANTIKÖRPER UND FLUORESZIERENDE REAGENZIEN .....	34
TABELLE 4: AUSRÜSTUNG UND GERÄTE.....	35
TABELLE 5: SOFTWARE .....	36
TABELLE 6: CHARAKTERISTIKA DER GBM-PATIENTEN .....	38
TABELLE 7: EXPERIMENTELLE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN EXPERIMENT 1 UND 2.....	44
TABELLE 8: BILDEINSTELLUNGEN DER KONFOKALMIKROSKOPIE (LSM 710).....	46

## **Abbildungsverzeichnis**

ABBILDUNG 1: DARSTELLUNG RÄUMLICHER INTERTUMORALER UND INTRATUMORALER HETEROGENITÄT. ....	17
ABBILDUNG 2: ZEITLICHE UND RÄUMLICHE HETEROGENITÄT VON GLIOBLASTOMEN.....	18
ABBILDUNG 3: ÜBERBLICK ÜBER DEN PRINZIPIELLEN ABLAUF DER PHAGOZYTOSE EINER MIKROGLIAZELLE .....	26
ABBILDUNG 4: ÜBERSICHT ZU METHODOLOGISCHEN VERFAHREN ZUR PHAGOZYTOSEBESTIMMUNG .....	29
ABBILDUNG 5: CHRONOLOGISCHER ÜBERBLICK ZU EXPERIMENT 1 UND EXPERIMENT 1* .....	39
ABBILDUNG 6: CHRONOLOGISCHER ÜBERBLICK ZU EXPERIMENT 2 .....	41
ABBILDUNG 7: IMARIS-BASIERTE SCHRITTE DER 3D-REKONSTRUKTION KONFOKALMIKROSKOPISCH AUFGENOMMENER GBM-SCHNITTE .....	48
ABBILDUNG 8: HIERARCHISCHE STRUKTUR DES DATENSATZES MIT N-ANZAHL/EBENE .....	50
ABBILDUNG 9: DARSTELLUNG DER PENETRATIONSTIEFE DER FLUORESZIERENDEN POLYSTYREN-MIKROSPHÄREN IN $\mu\text{M}$ GEMESSEN VOM SCHNITTRAND. ....	51
ABBILDUNG 10: REPRÄSENTATIVE DARSTELLUNG DER INTRATUMORALEN IBA1- OBERFLÄCHENHETEROGENITÄT NACH 3D-REKONSTRUKTION.....	53
ABBILDUNG 11: INTRATUMORALE HISTOPATHOLOGISCHE HETEROGENITÄT. ....	54



ABBILDUNG 12: SCHÄTZUNG DER LEVELABHÄNGIGEN KOVARIANZPARAMETER BEZÜGLICH DES STANDARDISIERTEN UND TESTSUBSTANZSTRATIFIZIERTEN Z-FAKTORWERT DES PHAGOZYTOSE-INDEX MIT DARSTELLUNG DER BERECHNETEN INTRAKLASSENKORRELATION FÜR EXPERIMENT 1 (INKLUSIVE 1*).....	55
ABBILDUNG 13: SCHÄTZUNG DER LEVELABHÄNGIGEN KOVARIANZPARAMETER BEZÜGLICH DES STANDARDISIERTEN UND TESTSUBSTANZSTRATIFIZIERTEN Z-FAKTORWERT DES PHAGOZYTOSE-INDEX MIT DARSTELLUNG DER BERECHNETEN INTRAKLASSENKORRELATION FÜR EXPERIMENT 2. ....	57
ABBILDUNG 14: ABBILDUNG DES PHAGOZYTOSE-INDEX GLIOM-ASSOZIIERTER MIKROGLIAZELLEN/MAKROPHAGEN NACH 1H INKUBATION MIT ATP, UDP, DMSO UND CYTOCHALASIN D (1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M).....	58
ABBILDUNG 15: DARSTELLUNG DER INTERTUMORALEN HETEROGENITÄT DER PHAGOZYTOSE-AKTIVITÄT IN EXPERIMENT 1 BEI BETRACHTUNG DER BILDEBENE FÜR DIE EINZELNEN TUMORPROBEN. ....	60
ABBILDUNG 16: DARSTELLUNG DES PHAGOZYTOSE-INDEX BEI MODIFIZIERTEN NEGATIVKONTROLLEN IN EXPERIMENT 1*.....	62
ABBILDUNG 17: DARSTELLUNG DES PHAGOZYTOSE-INDEX GEMITTELTER BILDWERTE PRO TUMOR NACH 72-STÜNDIGER INKUBATIONSZEIT VON TEMOZOLOMID IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN. ....	63
ABBILDUNG 18: FUNKTIONELLE INTERTUMORALE HETEROGENITÄT DER PHAGOZYTOSE-AKTIVITÄT VON GAMS NACH 72H INKUBATION MIT TMZ 5-200 $\mu$ M.....	65
ABBILDUNG 19: REPRÄSENTATIVES BEISPIELBILD EINER IBA1-POSITIVEN ZELLE NACH EINSTÜNDIGER INKUBATION MIT CYTOCHALASIN D 10 $\mu$ M VOR (A) UND NACH (B) 3D-REKONSTRUKTION. ....	74

## **0.1. Kurzzusammenfassung (Deutsch)**

### ***Hintergrund und Zielsetzung:***

Ein wesentlicher Bestandteil des Glioblastoms (GBM) sind sogenannte gliom-assoziierte Makrophagen und Mikrogliazellen (GAMs). Da diese die Progression und Invasivität des GBMs fördern, besitzen GAMs eine zentrale Rolle im Verständnis der Tumorbiologie. Eine der Schlüsselfunktionen von Mikroglia und Makrophagen ist die Phagozytose, deren Rolle im humanen GBM jedoch weitestgehend unklar ist. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Phagozytose-Assays unter Benutzung humaner organotypischer GBM-Schnittkulturen, anhand derer eine systematische Analyse dieser zentralen Funktion von Mikroglia und Makrophagen im Gliomkontext erfolgen sollte. Zudem wurde der Einfluss der in der Literatur beschriebenen phagozytose-relevanten Nukleotide ATP, UDP (Experiment 1) sowie des klinisch eingesetzten Chemotherapeutikums Temozolomid (Experiment 2) auf die Phagozytose von GAMs getestet.

### ***Methoden:***

Nach Anfertigung der Schnittkulturen wurden diese zusammen mit Polystyren-Partikeln als Phagozytose-Marker inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach immunhistochemischer Anfärbung, konfokalmikroskopischer Aufnahme und 3D-Rekonstruktion der GAMs. Im Anschluss erfolgte eine computergestützte standardisierte quantitative Auswertung.

### ***Ergebnisse:***

In den humanen, organotypischen GBM-Schnittkulturen wurde die Phagozytose, bedingt durch eine geringe Eindringtiefe der Polystyren-Partikel, randständig untersucht. Dabei hatte weder 100µM ATP noch 100µM UDP einen signifikanten Einfluss auf die Phagozytose von GAMs. Überraschenderweise inhibierte Cytochalasin D ebenfalls die Phagozytose-Rate nicht signifikant. In Experiment 2 wurde gezeigt, dass Temozolomid in einer Konzentration bis 200µM die Phagozytose-Rate von GAMs nicht signifikant beeinflusste. In beiden Experimenten fiel eine ausgeprägte intertumorale Heterogenität der Phagozytose-Aktivität auf.

### ***Schlussfolgerungen:***

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl 100µM ATP und UDP als auch Temozolomid (bis zu einer Konzentration von 200µM) die Phagozytose von GAMs nicht relevant beeinflussen. Aufgrund einer potenziell enukleierenden Wirkung von Cytochalasin D auf

GAMs, könnte möglicherweise die Kühlung mit Eis eine alternative Negativkontrolle für Phagozytose-Experimente an GAMs darstellen (Experiment 1 mit modifizierter Negativkontrolle). Für künftige Phagozytose-Experimente dürfte eine vorherige molekulargenetische Stratifizierung in GBM-Subtypen kombiniert mit einer höheren Tumorfallzahl und der vorherigen Bestimmung des intratumoralen Entnahmeorts wichtige Erkenntnisse zu tumorindividuellem Phagozytose-Verhalten von GAMs liefern.

## **0.2. Abstract (English)**

### ***Background and objective:***

Glioma-associated microglia and macrophages (GAMs) constitute an important cell population of glioblastoma multiforme (GBM). Promoting the progression and invasion of GBMs, GAMs play a pivotal role in tumour biology. Though phagocytosis represents one of the key functions in microglia and macrophages, the exact role of it in human glioblastoma remains almost unknown. This study pursued to establish a phagocytosis assay using human organotypic GBM slice cultures. Based on this experimental platform two experiments were performed: The effect on phagocytosis was analysed for a) UDP and ATP, two nucleotides which were reported previously in literature as relevant in the process of phagocytosis (experiment 1), and b) the chemotherapeutical Temozolomide, part of the current standard of care (experiment 2).

### ***Methods:***

Following to the preparation of organotypic GBM-slice cultures, slices were incubated with polystyrene particles as markers for phagocytosis. GAMs were stained immuno-histochemically, recorded by confocal microscopy and reconstructed digitally in 3D. Analysis was performed in a standardized way with an imaging software.

### ***Results:***

Phagocytosis was analysed in both experiments close to the surface, due to a low penetration depth of polystyrene particles into the organotypic slice cultures. Neither 100µM ATP nor 100µM UDP influenced phagocytosis of GAMs significantly. In the second experiment it was shown that temozolomide (up to a concentration of 200µM) had no significant effect on phagocytosis of GAMs. In both experiments intertumoral heterogeneity was remarkable.

### ***Conclusion:***

The results suggest that 100 $\mu$ M ATP as well as UDP and Temozolomid (up to 200 $\mu$ M) do not influence phagocytosis of GAMs substantially. Surprisingly, cytochalasin D did also not inhibit phagocytosis significantly. Ice cooled medium could serve as effective negative control, as cytochalasin D potentially enucleated many GAMs. Previous selection of intratumoral region, genetic determination of GBM subtypes and a higher n number of tumours could provide interesting more differential insights of GAM phagocytosis dependent on the individual tumour probe.

## 1. Einleitung

### 1.1. Das Glioblastom (GBM)

#### 1.1.1. Definition

Das Glioblastom (GBM), ein hochinvasives Gliom, stellt die häufigste maligne hirneigene Tumorentität des erwachsenen Menschen dar (Omuro und DeAngelis 2013; Ostrom et al. 2018). Molekular und histopathologisch wird das Glioblastom nach der WHO-Klassifikation von Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) eingeteilt und zählt zu den diffusen astrozytären und oligodendrogialen Tumoren Grad IV (Louis et al. 2016). Kennzeichnend für den vierten Grad ist das Zusammentreffen zytologischer Atypien (Grad 2), Anaplasie und hoher mitotischer Aktivität (Grad 3) sowie von mikrovaskulärer und/oder Nekrosearealen (Louis et al. 2007). Seit der WHO-Klassifikation von 2016 werden zur diagnostischen Einteilung der Glioblastome immer stärker molekulargenetische Parameter wie z.B. der Mutationsstatus im *Isocitratdehydrogenase*-Gen oder der *1p/19q*-Status hinzugezogen (Wesseling und Capper 2018). Die detaillierte Beschreibung der molekulargenetischen Aberrationen, Subtypen und deren Bedeutung findet sich im nachfolgenden Abschnitt 1.1.3.

#### 1.1.2. Epidemiologie und Ätiologie

Etwa 3% der global auftretenden Malignome sind Hirn- und ZNS-Tumoren (Miranda-Filho et al. 2017). Gliome stellen dabei mit 81% aller malignen Hirntumore die häufigste Entität dar, wovon ein wesentlicher Anteil mit etwa 45% auf das Glioblastom fällt. Die altersstandardisierten Inzidenzraten des GBMs variieren im weltweiten Vergleich zum Teil erheblich zwischen 0,59 (Korea) und 3,69 (Griechenland) pro 100.000 Menschen (Ostrom et al. 2014). Diese beiden Beispiele sind insofern repräsentativ, da die altersstandardisierten Neuerkrankungsraten für astrozytäre Tumoren mit den höchsten Raten in den westlichen Gesellschaften wie Europa und den USA zu finden sind, wohingegen Asien deutlich niedrigere Inzidenzen aufweist (Leece et al. 2017). Das Glioblastom tritt mit zunehmendem Alter häufiger auf und hat zwischen 75 und 84 Jahren die höchste Inzidenzrate und wird im Mittel mit 55 Jahren diagnostiziert (Tamimi und Juweid 2017). Weitere positive Korrelationen finden sich in Bezug auf Geschlecht, wobei die Inzidenzrate bei Männern im Vergleich zu Frauen 1,6 mal höher liegt, sowie für weiße Hautfarbe (Thakkar et al. 2014).

Die Diagnose „Glioblastom“ steht trotz großer wissenschaftlicher Anstrengungen und Fortschritte im therapeutischen Bereich für einen tödlichen Ausgang. Trotz kombinierter Radiochemotherapie liegt das mediane Überleben bei etwa 15 Monaten bei einer 5-Jahresüberlebensrate von 9,8% (Stupp et al. 2009). In Abhängigkeit des GBM-Subtyps sowie des Alters der PatientInnen variieren die Überlebensraten zum Teil deutlich. So liegt bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen mit 22,7% die 5-Jahresüberlebensrate deutlich über den 5,6 % von älteren Menschen über 40 Jahren (Ostrom et al. 2018). Auf Ursachen und Prädiktoren der geringen Überlebensraten wird detaillierter in den Abschnitten 1.1.3 und 1.1.4 eingegangen.

Gliome entstehen schrittweise mit der Akkumulation genetischer Aberrationen, deren Ursache von intrinsischen und umweltabhängigen Faktoren abhängen (Omuro und DeAngelis 2013). Zu den positiv assoziierten, umweltabhängigen Risikofaktoren zählt z.B. ionisierende Strahlung, insbesondere bei früher Exposition in der Lebenszeit (Braganza et al. 2012). Eine Risikoreduktion für Gliome hingegen wurde in Zusammenhang mit der Vorgeschichte einer atopischen Diathese und Allergien beschrieben (Ostrom et al. 2014). Passend dazu ist eine Erhöhung des Mediators und prädiagnostischen Biomarkers von Erkrankungen aus dem allergischen Formenkreis, Immunglobulin E, gemessen als Gesamt-IgE mit einem reduzierten Gliom- und Glioblastomrisiko berichtet. Bemerkenswerterweise wurde diese inverse Assoziation auch 20 Jahre vor der Tumordiagnose festgestellt (Schwartzbaum et al. 2012). Die Vorgeschichte einer Allergie bei Gliom-PatientInnen geht nach jüngeren Erkenntnissen auch mit einem längeren Überleben einher (Lehrer et al. 2019).

Bei weiteren denkbaren Risikofaktoren wie nichtionisierender Strahlung in Form von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern bei der Nutzung von Mobilfunkgeräten, extrem niedrigfrequenten Magnetfeldern oder Pestiziden konnte kein eindeutiger Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Gliome hergestellt werden (Ostrom et al. 2014).

### 1.1.3. Tumorgenese, Molekulargenetik und tumorale Heterogenität

Bereits 1926 beschrieben Percival Bailey und Harvey Cushing aufgrund der auffälligen histologischen Heterogenität äußerst maligne Gliome als „Spongioblastoma multiforme“ in Anbetracht der „multiformen“ Erscheinungsform innerhalb der Gewebeproben. Die polymorphen, atypischen Zellen führten sie zum Postulat eines differentiellen zellulären

Ursprungs im Vergleich zu anderen Gliomen (Stoyanov und Dzhakov 2018). Dabei sind kennzeichnende, histopathologische Merkmale des Glioblastoms neben einer generellen Hyperzellularität, eine hohe mitotische Aktivität, nukleäre Atypien, mikrovaskuläre Proliferationen und/oder Nekroseareale (Aldape et al. 2015).

Makroskopisch gesehen findet sich das Glioblastom, ausgehend von der weißen Substanz, hauptsächlich supratentoriell im Frontal-, Parietal, Temporal und Okzipitallappen und metastasiert in der Regel nicht (Thakkar et al. 2014; Lun et al. 2011). Örtlich zeigt sich ein enger Bezug zwischen hochgradigen Gliomen und der peri- sowie subventrikulären Zone (Sanai et al. 2005). Dies führt zur Frage der lange ungeklärten Gliomgenese. In letzter Zeit deuten immer mehr Ergebnisse darauf hin, dass neuronale und oligodendrogliale Vorläuferzellen aus der subventrikulären und subgranulären Zone von Mäusen die höchste Suszeptibilität für gliomevozierende Mutationen besitzen. Als Schlüsselgene hierfür gelten die Tumorsuppressorgene *NF1* (*Neurofibromin Gen 1*), *TP53* und *PTEN* (Alcantara Llaguno et al. 2015). Obwohl einige Studien nahelegen, dass auch differenzierte Neurone und Astrozyten Ursprung maligner Gliome sein können und im Verlauf der Tumorgenese Eigenschaften neuronaler Stammzellen reaktivieren, ist der Ursprung aus den genannten Vorläuferzellen, den sog. Gliomstammzellen, aufgrund der abnehmenden Suszeptibilität maligner Transformation mit sukzessiver Zellreifung wahrscheinlicher (Friedmann-Morvinski et al. 2012; Alcantara Llaguno et al. 2019). Die Ursprungszelle der Gliomgenese dürfte zudem eine wesentliche Determinante des molekularen GBM-Subtyps sein (Alcantara Llaguno et al. 2015).

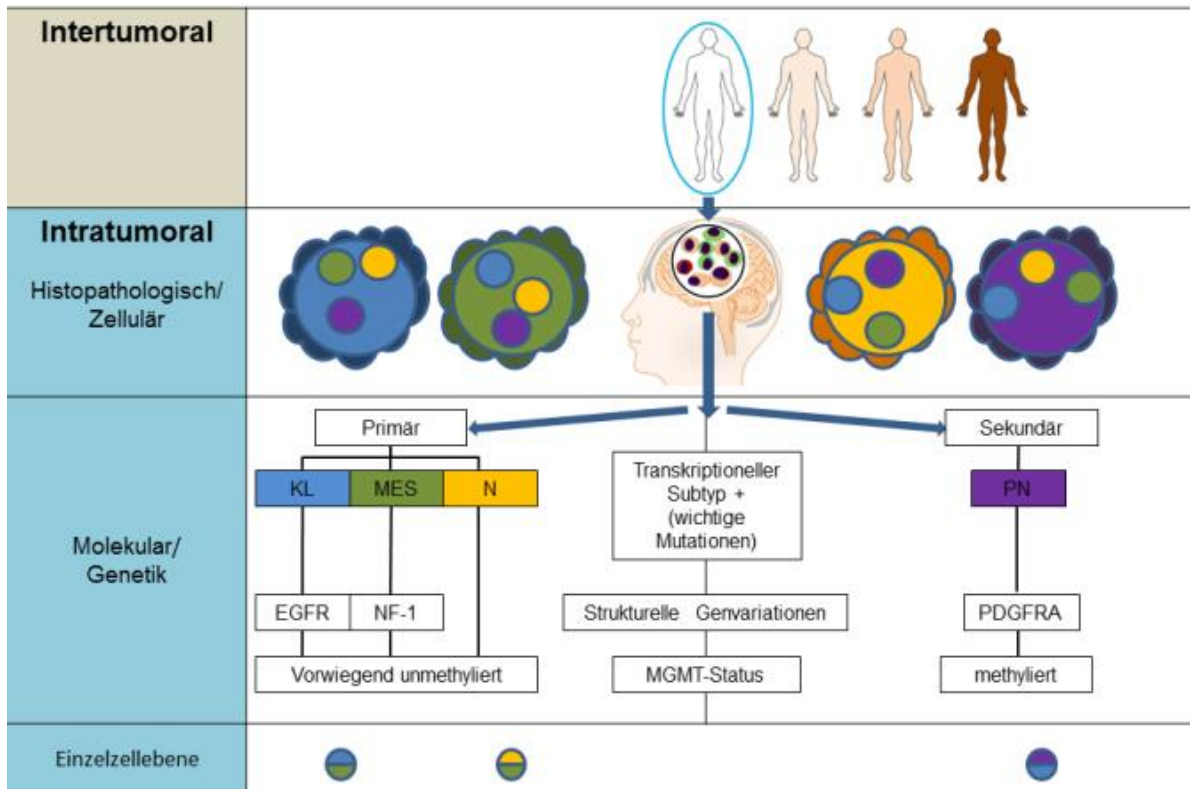
Die vier GBM-Subtypen werden seit 2010 anhand von Clusterbildungen der häufigsten molekulargenetisch auftretenden Aberrationen in die vier Subtypen klassisch, mesenchymal, neural und proneural stratifiziert (Verhaak et al. 2010). Grundlage hierfür war die Bestimmung von Schlüsselmutationen in der Pathogenese des Glioblastoms, wie z.B. der Gene *TP53*, *NF1*, *RB1* oder der *EGFR*-Familie sowie der resultierenden häufigsten aberranten Signalwege (The Cancer Genome Atlas Research Network 2008). Für den klassischen Subtyp sind z.B. *EGFR*-Mutationen charakteristisch, die Expression neuronaler Marker ist typisch für den neuralen Typ, mesenchymale Subtypen besitzen oftmals Deletionen an *NF1* mit häufigen Komutationen in *PTEN*, wohingegen der proneurale Subtyp *PDGFRA*-Alterationen und *IDH1*-Mutationen aufweist. Letztgenannter tritt häufiger atypisch im jüngeren Alter auf und besitzt eine hohe Überlappung mit sekundären Glioblastomen (Verhaak et al. 2010). Diese weitere

Einteilung in primäre und sekundäre Glioblastome rekuriert auf der Erkenntnis, dass einige Glioblastome (sekundäre Form) bei jüngeren Menschen häufiger auftreten und sich aus niedrig gradigen Gliomen entwickeln, wohingegen mit etwa 90% der Großteil de-novo ohne klinischen oder histologischen Hinweis als primäre Glioblastome entsteht. Das wesentliche Kennzeichen der Differenzierung dieser beiden Formen ist das Auftreten der *IDH1*-Mutation, welche bei etwa 80% der sekundären und weniger als 5% der primären Glioblastome vorzufinden ist. Klinisch resultiert ein mutiertes IDH1-Gen in einer längeren durchschnittlichen Überlebenszeit (Ohgaki und Kleihues 2013).

Die beschriebene histopathologische und molekulargenetische Diversität führt sowohl zu einer hohen inter- wie auch intratumoralen Heterogenität (siehe Abbildung 1). Zum Zeitpunkt der Gewebsentnahme kann bei einem Individuum der dominante Subtyp bestimmt werden, welcher auch die Histopathologie beeinflusst. So weisen beispielsweise IDH1-mutierte, sekundäre Glioblastome mit vornehmlich proneuralem Profil seltener ausgedehnte Nekroseareale im Vergleich zu primären Glioblastomen auf (Ohgaki und Kleihues 2013). Komplexer wird das multiforme Bild des Tumors durch die Erkenntnis, dass auch innerhalb eines Tumors mehrere zum dominanten Tumorsubtyp alternierende Subtypen vorliegen können und sogar auf Einzelzellebene hybride Zellen mit Charakteristika mehrerer Subtypen vorkommen (Sottoriva et al. 2013; Patel et al. 2014). Eine weitere Achse der Heterogenität des Glioblastoms wird zeitlich durch die klonale Evolution von Tumorzellen beschrieben. In einer intraindividuellen, longitudinalen Analyse von Ursprungstumor und Rezidiv waren 54% der somatischen kodierenden Mutationen geteilte Mutationen zwischen Ursprung und Rezidiv als Hinweis auf eine frühe Genese in der Tumorevolution, wohingegen die restlichen Mutationen als private Mutationen entweder in der Initialmalignität oder dem rekurrenten Abkömmling vorzufinden waren. Trotz der räumlichen Nähe zwischen Initialläsion und Rezidivgliom durchlaufen Gliomzellen eine klonale Evolution und beherbergen nicht mehr alle Ursprungsmutationen. Die Aufzweigungen in der Mutationsabfolge treten dabei zu verschiedenen Zeitpunkten der klonalen Evolution eines/r PatientIn auf (siehe Abb. 2). Interessanterweise dürfte auch die Therapie mittels Temozolomid, als potenziell mutagenes Agens, zur intratumoralen longitudinal-temporalen Diversität beitragen (Johnson et al. 2014).



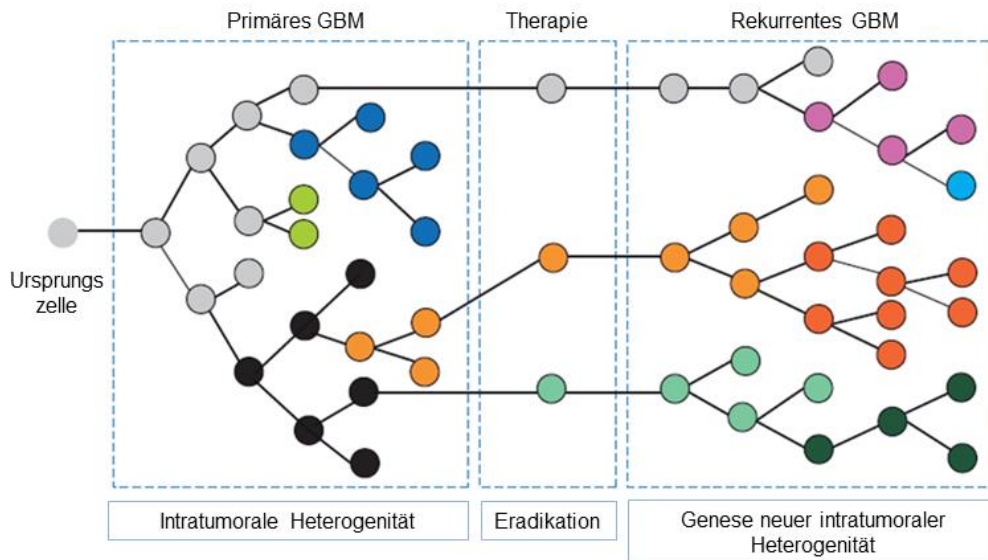
## Ebenen räumlicher Heterogenität



**Abbildung 1:** Darstellung räumlicher intertumoraler und intratumoraler Heterogenität.

Nach biotischer Probeentnahme lässt sich ein interindividuell dominanter GBM-Subtyp ausmachen (intertumorale Heterogenität, grau hinterlegtes Feld der 1. Spalte). Dieses Tumorprofil determiniert histopathologische Charakteristika (Zeile 2) und eine charakteristische Mikroumgebung (unregelmäßige farbige Kreisumrandung). Innerhalb des Tumors können Areale anderer Subtypen vorliegen (Zeile 2, kleine farbige Kreise). Molekulargenetisch (3. Zeile) kann anhand des IDH-Mutationsstatus eine Unterteilung in primäre und sekundäre GBMs vorgenommen werden, welche wiederum anhand von Schlüsselmutationen in klassische (blau markiert), mesenchymale (grün markiert), neurale (gelb markiert) und vornehmlich sekundäre, proneurale (violett markiert) Subtypen klassifiziert werden können. Die Heterogenität des GBMs manifestiert sich bis auf Einzelzellebene (Zeile 4) in hybriden Zellen, mit dargestellten Subtypkombinationen. Histopathologische, zelluläre und molekulargenetische Heterogenität kann als intratumorale Heterogenität zusammengefasst werden (blau markierte Felder der 1. Spalte) (Patel et al. 2014). Abbildung adaptiert aus: (Parker et al. 2015)

## Zeitliche Heterogenität im therapeutischen Kontext



**Abbildung 2:** Zeitliche und räumliche Heterogenität von Glioblastomen

Schon die Ursprungszelle gilt als wesentliche Determinante der intratumoralen Heterogenität des GBMs (Alcantara Llaguno et al. 2015). Schon zu einem frühen Stadium der Tumorevolution können Zellklone Mutationen akkumulieren, Subklone bilden und Resistenzmechanismen erwerben (bunt markierte Punkte). Sogar die Eradikationstherapie mittels Chemotherapeutika wie Temozolomid selbst dürfte den Selektionsdruck in der klonalen Evolution von Glioblastomen erhöhen, sowohl durch resistenzbedingte unzureichende Eradikation als auch durch die Mutagenität des Chemotherapeutikums selbst, sodass Rezidive in der Folge oftmals distinkte Mutationen im Vergleich zur Ursprungszelle aufweisen (Johnson et al. 2014; Qazi et al. 2017). Quelle: (Qazi et al. 2017). Abbildung modifiziert und Beschriftungen übersetzt.

Die außerordentliche Heterogenität des Glioblastoms stellt eine große Herausforderung erfolgreicher Therapiestrategien dar, was exemplarisch anhand der sehr unterschiedlichen Ansprechraten gemessen in Form der Zellviabilität von zellulären Glioblastomsubklonen auf insgesamt 20 verschiedene Substanzen und medikamentöse Therapeutika erahnt werden kann (Reinartz et al. 2017).

### 1.1.4. Klinik, Diagnose und aktuelle Therapie

PatientInnen mit Erstmanifestation eines Glioblastoms können sich unter anderem mit Kopfschmerzen, kognitiven Defiziten, epileptischen Anfällen (häufig mit fokaler Einleitung), Persönlichkeitsveränderungen, Gangunsicherheit, Inkontinenzbeschwerden, fokalneurologischen Symptomen oder Veränderungen der Sprache präsentieren. Der bildgebend diagnostische Standard zur Detektion und

Therapieevaluation ist dabei das MRT. Da histopathologischer Befund und molekulare Diagnose des Glioblastoms das weitere Behandlungsprozedere bestimmen, wird zumeist eine Gewebeprobe im Rahmen der operativen Therapie gewonnen (Weller et al. 2017). Seit der wegweisenden Studie von Stupp et al. besteht die Therapie des Glioblastoms im Wesentlichen aus der operativen Tumorresektion und einer fraktionierten Radiotherapie in Begleitung einer Chemotherapie mit dem Alkylans Temozolomid (Stupp et al. 2005). Die operative Therapie dient dabei in erster Linie der Prävention neuer neurologischer Defizite und einer Verlängerung der Überlebenszeit (Suchorska et al. 2016), eine Heilung durch die operative Intervention kann aufgrund der weiten Streuung der Tumorzellen und des netzwerkartigen Wachstums nicht erwartet werden. Eine deutliche Verbesserung der mittleren Überlebenszeit kann durch die Radiochemotherapie erreicht werden, welche die Kombination einer fraktionierten Radiotherapie mit 60Gy in Kombination mit der oralen Einnahme des gut liquorgängigen Chemotherapeutikums Temozolomid ( $75\text{mg}/\text{m}^2$  Körperoberfläche) während der Zeit der Radiotherapie beinhaltet (Stupp et al. 2005; Weller et al. 2017). Der Methylierungsstatus des *MGMT*-Promotors ist dabei ein wesentlicher Prädiktor für den Therapieerfolg mit Temozolomid (Hegi et al. 2005). Die Wirkungsweise von TMZ verdeutlicht diesen Zusammenhang.

Temozolomid vereint mit einer guten Liquorgängigkeit, einer annähernd 100% Bioverfügbarkeit bei oraler Applikation, relativ geringer Knochenmarkssuppression und einer spontanen, pH-abhängigen Konversion zum aktiven Metaboliten MTIC in der Reaktion mit Wasser günstige Eigenschaften für die Behandlung von Hirntumoren. In der Folge der Konversion verursacht MTIC in abnehmender Häufigkeit die Methylierung dreier Positionen des Guanins, der N<sup>7</sup>-Position, der O<sup>3</sup>-Position oder der O<sup>6</sup>-Position. Letztgenannte scheint die kritische Rolle des antitumoralen Effekts innezuhaben (Friedman et al. 2000). An eben dieser Position setzt die Funktion der O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase an, welches als DNA-Reparaturenzym durch das *MGMT-Gen* kodiert wird, die Alkylierung von Temozolomid an der O<sup>6</sup>-Position revidiert und so einen wichtigen Resistenzmechanismus gegen die Chemotherapie darstellt (Wick et al. 2014). Im Falle der epigenetischen Stilllegung des *MGMT*-Promotors resultiert somit ein signifikant längeres Überleben im Vergleich der Radiochemotherapie mit Temozolomid zur alleinigen Bestrahlungstherapie (Hegi et al. 2005). Insgesamt gesehen liegt jedoch das mediane Gesamtüberleben trotz multimodaler Therapie bei nur 14,6 Monaten (Stupp et al. 2005). Mögliche Gründe hierfür sind zahlreich wie z.B. die Evasion

einzelner Tumorzellen bei chirurgischer Therapie oder die angesprochene MGMT-bedingte Temozolomidresistenz, wobei ein übergeordneter Schlüsselmechanismus für das Therapieversagen die intratumorale Heterogenität zu sein scheint (Weller et al. 2017; Wick et al. 2014; Qazi et al. 2017). So ist es möglich, dass schon vor Behandlung der Tumoren temozolomidresistente Klone vorliegen (Meyer et al. 2015). Zusätzlich besitzen insbesondere CD133-positive Tumorstammzellen, welche ein intrinsisches Potenzial zur Generierung neuer Tumoren in sich tragen, eine Chemo- und Radioresistenz (Qazi et al. 2017). Diese Stammzellen finden sich häufig in sogenannten Tumornischen, mikroanatomischen Teilbereichen des Tumors und entgehen so dem immunologischen und therapeutischem Zugriff. In diesen Nischen stehen Tumorstammzellen in enger Interaktion mit der Mikroumgebung, deren Bedeutung und Zusammensetzung nachfolgend erläutert wird (Hambardzumyan und Bergers 2015).

#### 1.1.5. Mikroumgebung des Glioblastoma multiforme

Bereits in der 18. Vorlesung im Jahr 1863 der Reihe „Die krankhaften Geschwülste“ beschreibt Rudolf Virchow das Hervorgehen der Gliome aus der Interzellulärsubstanz, den Neuroglia und bemerkt die Diversität der Substanz zwischen den Zellen, die schwere Abgrenzbarkeit des Tumors gegenüber dem umliegenden Gewebe und den Gefäßreichtum der Gliome (Virchow 1865). Heutzutage ist bekannt, dass sowohl bei der Gliomgenese, wie auch der Propagierung von Wachstum und Infiltration die Tumormikroumgebung, also das spezifisch gebildete Milieu aus rekrutierten und residenten Zellen, mit denen die Tumorzellen über die Ausschüttung von Chemokinen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Enzymen interagieren, entscheidend ist (Feng et al. 2015; Charles et al. 2012). In der Wirkung trägt dabei die spezifische Tumormikroumgebung wesentlich zum hochgradig immunosuppressiven Phänotyp im Glioblastom bei und macht das Glioblastom als „immunologisch kalten“ Tumor zudem schwer für Immunotherapien zugänglich (Tomaszewski et al. 2019). Zu den Zelltypen, welche die Mikroumgebung des Glioblastoms formen, zählen unter anderem Astrozyten, Perizyten, Endothelzellen, neuronale Vorläuferzellen, Tumorstammzellen, Fibroblasten, vaskuläre glatte Muskelzellen und Immunzellen wie T-Zellen, Makrophagen und Mikroglia (Charles et al. 2012). Mit einer variablen Anzahl, aber ungefähr 30% der Gesamttumormasse, machen gliom-assoziierte Mikroglia und Makrophagen (GAMs) den dominanten Zellanteil der Mikroumgebung in Gliomen aus,

auf deren Bedeutung und besondere Rolle in der Umgebung von Gliomen im Weiteren eingegangen wird (siehe Abschnitt 1.2.2) (Morantz et al. 1979; Morimura et al. 1990; Badie und Schartner 2000). Dabei ist es wahrscheinlich, dass die Schlüsselmutationen des Glioblastoms die Zusammensetzung des Tumormikromilieus mit Mikroglia und Makrophagen beeinflusst (siehe auch Abbildung1) (Herting et al. 2017). So finden sich im mesenchymalen GBM-Subtyp durchschnittlich die meisten GAMs (Engler et al. 2012).

## **1.2. Mikroglia und Makrophagen**

### **1.2.1. Ursprung, Morphologie und funktionelle Eigenschaften**

Abhängig von der Hirnregion machen Mikrogliazellen, die residenten Makrophagen des zentralen Nervensystems, zwischen 0,5% und 16,6% aller Zellen des gesunden, humanen Gehirns aus (Mittelbronn et al. 2001). Abstammend von Vorläuferzellen aus dem Dottersack kolonisieren Mikrogliazellen das Hirnparenchym in frühen Stadien der Embryonalentwicklung. Sie besitzen das Potenzial sich selbst zu erneuern, werden nicht wesentlich durch hämatopoetische Stammzellen regeneriert und bilden einen konstanten, eigenen Zellpool, welcher im Krankheitsfall aus knochenmarks-deszendierenden Monozyten/Makrophagen unterstützt wird (Alliot et al. 1999; Ajami et al. 2007; Ajami et al. 2011; Ginhoux et al. 2010). Obwohl Mikroglia mit peripheren Monozyten und Makrophagen viele Eigenschaften gemein haben, sind sie eine eigenständig differenzierbare Zellpopulation und stellen die primären Immunzellen des gesunden Gehirns dar (Haage et al. 2019).

Mikrogliazellen, als Teil des angeborenen Immunsystems und professionelle Phagozyten überwachen das Gehirnparenchym konstant mit ihren Ausläufern und interagieren vielseitig mit dem neuronalen Netzwerk, indem sie beispielsweise synaptische Verbindungen phagozytieren, Zell- und Myelindebris phagozytotisch eliminieren und Antigene präsentieren. Sie tragen somit wesentlich zur Neuroprotektion und Homöostase des Gehirns beim Gesunden bei. Bei jeder Form pathologischer Störungen werden sie über eine Vielzahl von löslichen Mediatoren aktiviert, proliferieren und migrieren zum Ort der Gewebsverletzung, namentlich beispielsweise im Prozess von Infektionen, Schlaganfällen, Multipler Sklerose, Alzheimer-Erkrankungen, Autismus, Schizophrenie, amyotropher Lateralsklerose, Morbus Parkinson und Hirntumoren wie

Gliomen. Phänotypisch durchlaufen Mikrogliazellen mit der Aktivierung eine morphologische Transformation von einer hochverzweigten zu einer amöboiden Zellform (Wolf et al. 2017; Kreutzberg 1996).

Dies wurde klassischerweise als der Übergang der „ruhenden“ zur „aktivierten“ Mikroglia beschrieben, was allerdings die ständige überwachende Funktion - einhergehend mit hoher Zellfortsatzmotilität – in der Attribution „ruhend“ negiert (Nimmerjahn et al. 2005; Ransohoff 2016). Der Aktivierungsstatus von Makrophagen wurde lange Zeit in den klassischen, proinflammatorischen, antimikrobiellen M1-Status, sowie den mit Reparaturmechanismen und humoraler Immunität assoziierten M2-Status unterteilt (Gordon und Taylor 2005). M1-aktivierte Makrophagen zeigen zum Beispiel eine hohe Antigenpräsentationsfähigkeit, produzieren toxische Metabolite wie reaktive Sauerstoffspezies. Die M2-Polarisation kann noch weiter in M2a, M2b und M2c unterteilt werden. Diese M2-Subphänotypen sind mit Typ-2 Immunantworten (M2a), immunoregulativen (M2b) oder mit der Umstrukturierung der Extrazellulärmatrix (M2c) vergesellschaftet (Mantovani et al. 2004). Allerdings wird dieses insbesondere in-vitro an knochenmarksstämmigen Monozyten/Makrophagen etablierte M1/M2-Postulat in jüngerer Vergangenheit mehr und mehr verlassen, um der transkriptionellen Unterschiede zwischen Makrophagen und Mikroglia und der Heterogenität von Makrophagen und Mikroglia in-vivo besser gerecht zu werden (Ransohoff 2016). In Abhängigkeit von unterschiedlichen Pathologien besitzen Mikroglia und Makrophagen auch differente Aktivierungsformen, die sich auch im Verlauf einer Erkrankung dynamisch verändern können, wie beim M2-geprägten Erkrankungsbeginn von Morbus Alzheimer, welcher im Verlauf in Richtung M1-Phänotyp tendiert (Du et al. 2017). Im Fall von Gliomen besitzen Gliom-assoziierte Mikroglia und Makrophagen nur eine teilweise Übereinstimmung mit dem M1/M2-Polarisationskonzept und nehmen eine Sonderform ein (Szulzewsky et al. 2015).

### 1.2.2. Eigenschaften und Heterogenität gliom-assoziiierter Mikroglia und Makrophagen (GAMs)

Mikrogliazellen überwachen das Hirnparenchym und besitzen intrinsische tumorzytotoxische Kapazitäten (Kreutzberg 1996; Rosales und Roque 1997). Nach der Gliometablierung sezernieren die Tumorzellen eine Reihe löslicher Mediatoren wie z.B. MCP-3, CSF-1 oder ATP, um einige exemplarisch aufzugreifen, welche Mikroglia und Makrophagen anlocken (Charles et al. 2012; Hambardzumyan et al. 2016). Kontrovers ist der Anteil residenter Mikrogliazellen und eingewanderter Makrophagen aus dem Blutstrom. Mittels der CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> Marker für Mikrogliazellen und der CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>- Unterscheidung für Makrophagen zeigten sich in einer Studie die eingewanderten Makrophagen als vorherrschend (Parney et al. 2009). Allerdings können Mikroglia in der Umgebung der Gliome das CD45-Antigen hochregulieren und waren in der Untersuchung die dominante Makrophagenpopulation in den Mausgliomen, sodass die Unterscheidung anhand dieser Proteine im Tumorkontext nicht weiterhilft (Müller et al. 2015). Die Diskrepanz zwischen unterschiedlichen Ergebnissen und dem Beitrag der eingewanderten und residenten Makrophagen ist aktuell nicht weiter aufzulösen. Die kürzliche Validierung von spezifischen Mikroglia und peripheren Monozyten/Makrophagen-Markern im Gesunden und im Tumorkontext dürfte jedoch hier weitere Erkenntnisse liefern (Haage et al. 2019).

Aus morphologischer Perspektive ist nicht von einer homogenen Zellpopulation auszugehen, da je nach Position im Tumor mehrere phänotypische Populationen differenziert werden können. In infiltrativen Tumorbereichen präsentierten sich GAMs mit feinen Ausläufern, in soliden Tumorarealen war deren Präsenz reduziert, wohingegen an Tumornekrosen runde, makrophagenartige GAMs vorherrschend waren (Annovazzi et al. 2018). In dieser Arbeit wird einschließlich die Terminologie „gliom-assoziierte Mikroglia und Makrophagen (GAM)“ verwendet und für die Immunmarkierung der zytosolische Marker IBA1 für myeloide Zellen verwendet (Imai et al. 1996; Annovazzi et al. 2018).

In der Nähe des Glioblastoms präsentieren sich Mikroglia und Makrophagen in immunsupprimierter Funktion als gliom-assoziierte Mikroglia/Makrophagen, unterstützen das Tumorwachstum, beschleunigen die Migration von Tumorzellen, fördern die Vaskularisation des Tumors und sorgen für eine höhere Invasivität der Glioblastomzellen in das umliegende Gewebe (Wu et al. 2010; Zhai et al. 2011;

Bettinger et al. 2002; Brandenburg et al. 2016; Markovic et al. 2009). Das Tumormilieu verändert also die Zellen zu pro-tumorigenen „Helferzellen“ und reguliert die anti-tumoralen Fähigkeiten der Mikroglia und Makrophagen herunter. Diese Transformation könnte innerhalb der ersten Stunden nach Rekrutierung der Immunzellen geschehen, worauf ein Experiment mit der CHME5-Mikrogliazelllinie in der Co-Kultur mit C6-Gliomzellen hinweist. Innerhalb der ersten 3h in der Nähe der Gliomzellen zeigten sich die Mikroglia aktiviert mit einer höheren Phagozytose-Rate, wohingegen die Phagozytose-Aktivität nach 24h bereits stark reduziert war (Voisin et al. 2010). Die Glioblastom-Stammzellen scheinen dabei einen wesentlichen Einfluss auf die verminderte Funktionsfähigkeit der GAMs zu spielen, da gerade das Medium von humanen Gliom-Stammzellen die Phagozytose von Mikrogliazellen herunterreguliert (Wu et al. 2010). Welche funktionelle Bedeutung der Phagozytose allgemein und insbesondere im Tumorkontext zukommt wird im Folgenden besprochen.

### **1.3. Phagozytose im ZNS**

#### **1.3.1. Definition, Funktionen und physiologische Grundlagen**

Phagozytose bezeichnet den rezeptorabhängigen, dreiteiligen Prozess, bestehend aus dem chemotaktischem Auffinden (in der Literatur auch als „Find-Me“ bezeichnet), der Internalisierung von  $>0,5\mu\text{m}$  großen Partikeln ins Zellinnere („Eat-Me“) und der Degradierung im Phagolysosom („Digest-Me“) mit anschließender Reaktion der phagozytierende Zelle in Abhängigkeit zum aufgenommenen Material. Hauptsächlich sind Makrophagen, Neutrophile und dendritische Zellen, die sogenannten professionellen Phagozyten, für Phagozytoseprozesse zuständig. Im ZNS nehmen Mikroglia diese Rolle ein, mit geringeren Fressraten sind aber auch beispielsweise Astrozyten zur Phagozytose befähigt. Im gesunden Gewebe phagozytieren Mikroglia apoptotische Zellen, myelinergen und axonalen Debris und synaptische Verbindungen insbesondere während der postnatalen neuronalen Entwicklung und tragen so zur Homöostase des Gehirns bei. Im Krankheitsfall können Infektionserreger, lebende Neurone, A $\beta$ -Ablagerungen bei Alzheimer-Erkrankungen oder auch maligne Zellen detektiert und eliminiert werden (Sierra et al. 2013). Das breite Spektrum an Zielstrukturen legt einen hochkomplexen Prozess nahe, welcher einer starken rezeptorgesteuerten Regulierung bedarf. Für die drei Schritte der Phagozytose wird nachfolgend der Grundprozess exemplarisch an in der Arbeit verwendeten Nukleotiden

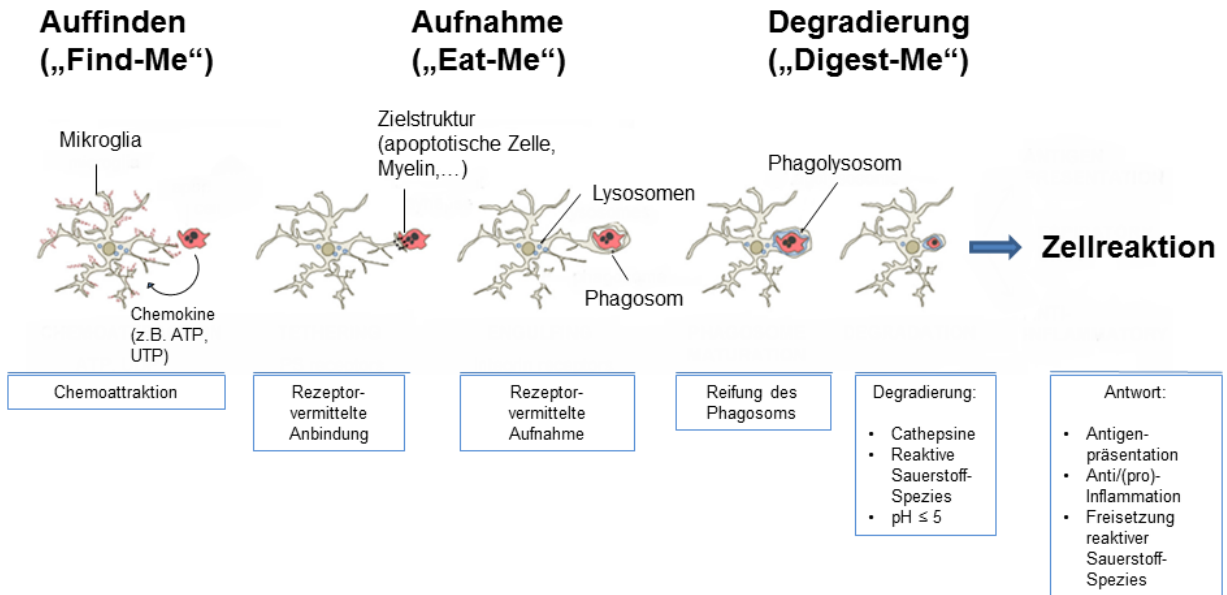


dargestellt. Allerdings sind eine Vielzahl weiterer Rezeptor-Antigen-Bindungen und Signalmoleküle beteiligt.

Angelockt werden Phagozyten durch Chemokine („Find-me“-Signale). Von apoptotischen Zellen freigesetztes ATP und UTP kann beispielsweise von peripheren Makrophagen über P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren detektiert werden und positiv chemotaktisch wirken (Elliott et al. 2009). Der Besatz an purinergen Rezeptoren von Mikrogliazellen umfasst ionotrope P2X-Rezeptoren (P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>) und die metabotropen P2Y-Rezeptoren (P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>14</sub>). ATP scheint besonders über P2Y<sub>12</sub>, moduliert durch die P2X<sub>4</sub>-Rezeptoraktivität, chemotaktisch auf Mikrogliazellen zu wirken (Koizumi et al. 2013).

Ausgeschüttete lokal-hohe Konzentrationen der Nukleotide, ATP und UTP, werden rasch extrazellulär abgebaut. UTP kann über Ekto-Nukleotidasen zu UDP und UMP abgebaut werden. ATP wird unter anderem direkt von Mikrogliazellen über CD39, eine Ekto-Nukleotidase zu ADP hydrolysiert (Koizumi et al. 2007; Bulavina et al. 2013). Eine komplexe Mischung aus der Detektion der Ursprungsmetabolite ATP, UTP, deren Abbauprodukten und der Modulation der entsprechenden Rezeptoren ist bei der Chemotaxis zu diesen „Find-me“-Signalen wahrscheinlich.

So bewirkt zum Beispiel 100µM UDP über den P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor auf Mikrogliazellen eine erhöhte Phagozytose-Rate in-vitro und in-vivo. Nukleotide dürften somit sowohl chemoattraktiv („Find-Me“), als auch signalgebend zur Phagozytose („Eat-Me“) wirken (Koizumi et al. 2007). Nach Rezeptorstimulation durch entsprechend aktivierende Signale („Eat-Me-Signal“) findet in Mikroglia und Makrophagenzellen ein Umbau des Aktin-Zytoskeletts zur Aufnahme der Zielstruktur statt, eine Voraussetzung für alle morphogenetischen Zellveränderungen (Koizumi et al. 2007; Greenberg 1995). Aufgenommenes Material wird im Anschluss in der aus Endosom und Lysosom gebildeten Fusionstruktur des Phagolysosoms durch den sauren pH ≤ 5, reaktive Sauerstoffspezies und Hydrolasen zerlegt (siehe Abbildung 3). Degradierete Produkte können im Anschluss entweder als Antigen präsentiert werden, eine pro- oder antiinflammatorische Antwort auslösen oder zu einer Freisetzung toxisch wirkender, reaktiver Sauerstoffspezies führen (Sierra et al. 2013).



**Abbildung 3:** Überblick über den prinzipiellen Ablauf der Phagozytose einer Mikrogliazelle

Während des ersten Schritts wird der Phagozyt durch Signalmoleküle zur Zielstruktur geführt (Chemoattraktion), welche er mittels einer Vielzahl von Rezeptoren detektiert und bei entsprechender Rezeptoraktivierung ins Phagosom aufnimmt (Anbindung und Aufnahme). Mit der Fusion von Phagosom und Lysosomen entsteht das Phagolysosom, welches den Ort der Degradierung des phagozytierten Materials darstellt. Die Zellantwort kann in einer Antigenpräsentation, der Freisetzung von proinflammatorisch wirkenden, reaktiven Sauerstoffspezies oder im Falle der Phagozytose von apoptotischem Material auch in der Freisetzung antiinflammatorischer Chemokine bestehen (Sierra et al. 2013). Quelle: (Sierra et al. 2013). Abbildung übersetzt und modifiziert.

Diese im gesunden ZNS ablaufenden Prozesse können im Kontext von Tumoren, allerdings über phagozytoseinhibierende Signale („Don't eat me“-Signale) blockiert werden, sodass humane Tumorzellen der inkorporierenden Degradierung durch GAMs entgehen können (Willingham et al. 2012).

### 1.3.3. Phagozytose von GAMs unter dem Einfluss von Gliomzellen

Bereits 1925 beschrieb Wilder Penfield die Phagozytose degenerierender Neurogliafasern durch Mikrogliazellen innerhalb von Gliomen (Penfield 1925). Generell scheinen humane GAMs zu Phagozytose prinzipiell befähigt. Allerdings ist diese Kernfunktion der Phagozyten in der Umgebung von Glioblastom-Stammzellen reduziert (Hussain et al. 2006; Wu et al. 2010). Eine weitere Studie mit gliom-konditioniertem

Medium (GCM) einer humanen, primären Gliomzellkultur konnte eine Erhöhung der Phagozytose-Rate ko-kultivierter Mikrogliazellen feststellen (Walentynowicz et al. 2018). Anscheinend ist somit die Phagozytose im Gliom differenzierter zu betrachten. So könnte es sein, dass in direkter Umgebung zu GBM-Stammzellen die Phagozytose supprimiert wird, jedoch ansonsten GAMs anfallenden Zelldebris intratumoral rasch aufnehmen. Die Vergleichbarkeit beider Studien ist jedoch aufgrund methodischer Differenzen begrenzt, da einmal direkt isolierte humane CD11b+-Zellen verwendet werden, während im anderen Experiment ein speziesübergreifender Ansatz mit primären, murinen Mikrogliazellen und humanem GCM zum Einsatz kommt (Wu et al. 2010; Walentynowicz et al. 2018). Ebenfalls in einer speziesübergreifenden Kokultur der Rattengliomlinie C6 und der humanen Mikroglialinie CHME-5 erhöhte sich die Phagozytosaktivität der Mikrogliazellen transient und fiel anschließend in länger andauernder Nachbarschaft zu den C6-Zellen ab (Voisin et al. 2010).

In organotypischen Schnittkulturen des Hippocampus von Ratten, in welche C6-Gliomzellen injiziert wurden, zeigte sich im Vergleich zu nicht tumorbefallenen Hippocampi, ein generell deutlich erhöhter Anteil CD68+-Mikrogliazellen in der Tumorgruppe (Billingham et al. 2013). Dabei wird CD68, ein Antigen auf der Membran des Phagolysosoms und der Zellmembran als Marker von Phagozytose-Aktivität verwendet (Damoiseaux et al. 1994).

Mögliche Erklärungen für die divergenten Ergebnisse der Studien bestehen in den Speziesunterschieden, den unterschiedlichen experimentellen Modellen und den verwendeten Methoden zur Erfassung der Phagozytose-Aktivität. Inwieweit die Phagozytose von humanen GAMs modulierbar ist, soll in dieser Arbeit beleuchtet werden.

#### 1.3.4. Experimentelle Modelle zur Untersuchung von Phagozytose

Kritisch für die Datenlage der recht unerforschten Phagozytose von Mikrogliazellen sind die zur Verfügung stehenden Modelle zu ihrer Untersuchung (Sierra et al. 2013). Prinzipiell kann Phagozytose entweder indirekt (in-vitro oder in-vivo) oder direkt (in-vivo) bestimmt werden.

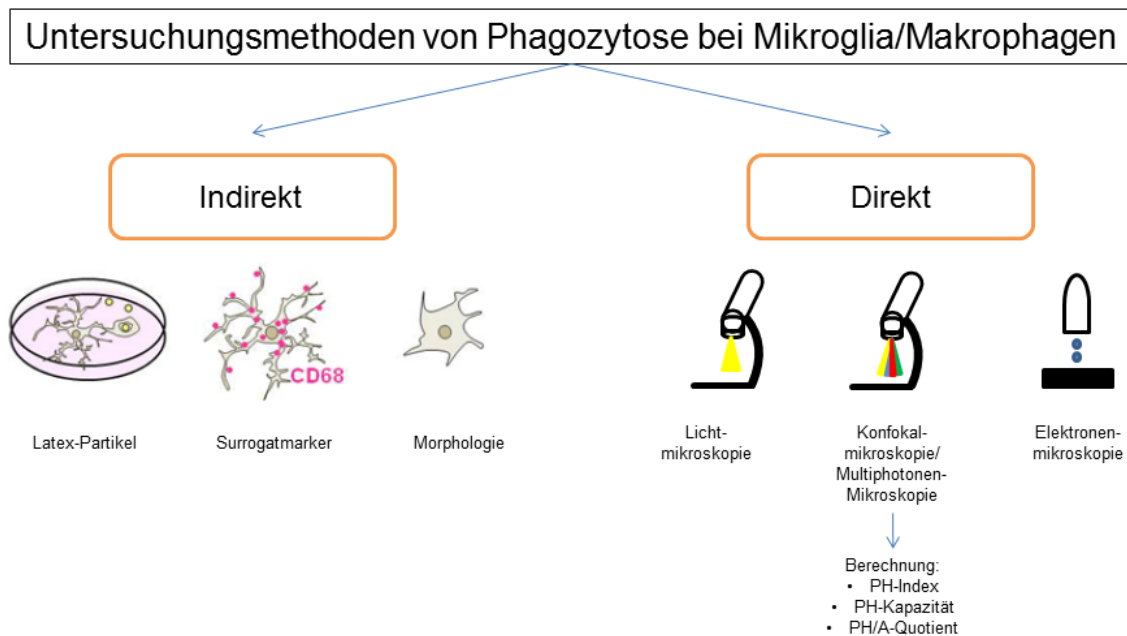
Da über indirekte Methoden Phagozytose oft nicht in-vivo untersucht wird, erlangt die Wahl der jeweiligen zellulären Grundlage eine wichtige Rolle. So kann beispielsweise Phagozytose in-vitro z. B. an immortalisierten Zellen oder in-situ im Gewebsverband

untersucht werden (Diaz-Aparicio et al. 2016; Voisin et al. 2010). Bei erstgenannten besteht jedoch das Problem in der artifiziell erzeugten Unreife der Mikroglia, die frühzeitig aus dem sich entwickelnden Hirnparenchym entnommen werden sowie im Fall der häufig zur Anwendung kommenden Nagerkulturen in der speziebedingten evolutionären Divergenz im Vergleich zu humanen Kulturen (Diaz-Aparicio et al. 2016; Timmerman et al. 2018). Zudem sind immortalisierte Zelllinien genetisch und funktionell distinkt zu primären Kulturen (Timmerman et al. 2018). Als Alternative zu Einzelzellkulturen kann Phagozytose auch innerhalb von organotypischen Schnittkulturen untersucht werden, welche den Vorteil innehaben, Phagozytose innerhalb einer erhaltenen Gewebsarchitektur zu bestimmen und zeitgleich auch für potenzielle pharmakologische Manipulationen gut zugänglich zu sein (Merz et al. 2013). Während im Tiermodell bereits Phagozytose in organotypischen Schnittkulturen untersucht wurde, wird hier erstmals eine Methode als Grundlage für künftige in-vivo Validierungen etabliert, welche die Phagozytose-Aktivität von GAMs innerhalb der humanen Glioblastomgewebematrix zu evaluieren vermag (Billingham et al. 2013). Da Mikroglia humanen und murinen Ursprungs jedoch deutliche funktionelle Unterschiede aufweisen, wie z. B. die auf inflammatorisch Reize unterschiedlich stark ausfallende Stickstoffmonoxid-Ausschüttung, bietet das in dieser Arbeit verwendete Modell große Vorteile in der Translation gewonnener Erkenntnisse (Wolf et al. 2017). Die indirekte Bestimmung von Phagozytose erfolgt oft über fluoreszierende Mikrosphären (Latexpartikel), Surrogat-Antigenmarker wie CD68 oder über morphologische Assoziation der Mikroglia (siehe Abb. 4). Allerdings weisen alle drei Methoden in ihrem „Surrogat-Charakter“ Schwierigkeiten auf. So können zum Beispiel Latexpartikel nicht vollständig lysosomal degradiert werden. Die genaue Funktion von CD68 ist bisher nicht bekannt und sowohl amöboide wie auch ramifizierte Mikroglia können phagozytierend sein (Sierra et al. 2013; Diaz-Aparicio et al. 2016).

Direktere Methoden zur Quantifizierung erlauben die Visualisierung des Inkorporationsprozesses in-vivo und kommen aus dem Bereich der Mikroskopie, wie z. B. die Konfokalmikroskopie oder Elektronenmikroskopie. Aufgrund der in-vivo Erhebung dürften diese Methoden weniger anfällig für mögliche Biasfaktoren sein (Diaz-Aparicio et al. 2016).

Die Auswertung der Phagozytose bei bildgebender Phagozytosebestimmung kann etwa über Phagozytose-Index-Bildung (Anzahl phagozytierter Partikel pro Gesamtzahl IBA1-

positiven Zellen), Bestimmung der Phagozytose-Kapazität (Anteil der Mikroglia /Makrophagen mit einem oder mehreren Partikeln pro Zelle oder dem Anteil aufgenommenen Volumens/ Zellvolumen) oder der gekoppelten Phagozytose/ Apoptose-Ratio [PH/A-Quotient = (Phagozytose-Kapazität x Mikrogliazahl)/ Anzahl apoptotischer Zellen)] erfolgen (Bulavina et al. 2013; Beccari et al. 2018; Schafer et al. 2012) (siehe auch Abbildung 4).



**Abbildung 4: Übersicht zu methodologischen Verfahren zur Phagozytose-Bestimmung**

Quelle: (Diaz-Aparicio et al. 2016) Inhalt und Bildelemente übernommen, übersetzt und teilweise adaptiert.

### 1.3.2. Modulation der Phagozytose-Aktivität von Mikroglia/Makrophagen

#### 1.3.2.1. Nucleotide ATP, UDP

Die Nucleotide ATP und UDP können auf Phagozyten potenziell als „Find-Me“-Signal bzw. „Eat-Me“-Signal wirken (siehe auch Abschnitt 1.3.1 dieser Arbeit); (Elliott et al. 2009; Koizumi et al. 2007). Im gesunden Gewebsverband liegt die extrazelluläre ATP-Konzentration im kaum nachweisbaren Bereich, wohingegen diese in der Tumormikroumgebung - mitverursacht durch vermehrten Zelltod - deutlich erhöht im  $\mu$ -Molarbereich liegt (Di Virgilio 2012). Dazu beitragen könnte auch die aktive Freisetzung der Nucleotide ATP durch Tumorzellen, worauf Zellkulturexperimente mit der humanen

Astrozytomzelllinie 1321N1 hindeuten (Harden und Lazarowski 1999). Eine Verletzung von Neuronen kann ebenfalls UDP freisetzen. Über dessen extrazelluläre Konzentration und Signalwirkung im Tumormilieu ist weniger als zu ATP bekannt (Koizumi et al. 2013; Di Virgilio und Adinolfi 2017). Für ATP z. B. ist bekannt, dass die Phagozytose-Rate unter 100µM ATP nicht-tumorassoziierter Makrophagen erhöht ist, wohingegen Mikroglia unter 1mM ATP mit einer Reduktion der phagozytierten Fluoreszenzpartikel reagierten (Marques-da-Silva et al. 2011; Fang et al. 2009). Wie GAMs auf eine Zugabe von ATP reagieren, ist nicht gut erforscht und soll in dieser Arbeit zur Betrachtung kommen. Ob UDP als ein typisches „Eat-Me“-Signal für Mikroglia im gesunden Gewebe auch im Tumorkontext die Phagozytose beeinflusst, soll ebenfalls nachfolgend untersucht werden.

#### 1.3.2.2. Cytochalasin D

Um die für die Phagozytose benötigten zytoskelettalen Umstrukturierungen zu blockieren, kann der Aktinpolymerisationsinhibitor Cytochalasin D als Negativkontrolle für Phagozytoseprozesse verwendet werden, welcher auch in dieser Arbeit zur Anwendung kam (Brown und Spudich 1979; Marques-da-Silva et al. 2011).

#### 1.3.4. Einfluss von Temozolomid auf GAMs

Das oben beschriebene Alkylans TMZ sorgt für das apoptotische Absterben von Tumorzellen (Friedman et al. 2000). In einem dieser Arbeit analogen Versuchsaufbau, konnte die Gruppe um Merz et al. zeigen, dass nach 72h-Inkubation mit Temozolomid in humanen Glioblastom-Schnittkulturen ein signifikanter Anstieg des Zelltods resultiert (Merz et al. 2013). Aufbauend auf diese Ergebnisse wurde die vorliegende Studie durchgeführt. Jüngste Ergebnisse aus der Zellkultur legen einen phagozytosesteigernden Effekt von GBM-Zellen durch Makrophagen für Temozolomid nahe, wobei dies nur für hohe Konzentrationen (>500 µM) galt (Gholamin et al. 2020). Allerdings ist es bisher nicht bekannt, ob Temozolomid die Phagozytose-Rate von GAMs in der Gewebematrix organotypischer Schnittkulturen beeinflusst. Die Auswirkungen des Chemotherapeutikums auf die Funktion der GAMs dürfte einen weiteren Baustein im klinischen Therapieverständnis darstellen.

#### **1.4. Ziele der Forschungsarbeit**

Diese Forschungsarbeit zielt darauf ab, die Phagozytoseaktivität humaner gliomassoziiierter Mikroglia/Makrophagen in situ zu untersuchen, um erstmalig in humanen, organotypischen Glioblastomschnitten einen Phagozytose-Assay zu etablieren und somit eine Grundlage für die in vivo Untersuchung der Ergebnisse zu schaffen. Diese Plattform soll dabei folgende Fragen beantworten:

1. Wirkt sich die Heterogenität des Tumors auf die Phagozytose-Aktivität von GAMs aus?
2. Lässt sich die Phagozytose-Rate von GAMs, gemessen am Phagozytose-Index, - innerhalb des etablierten Modells - über in-vitro ermittelte Signalmoleküle auf Phagozytoseprozesse wie ATP und UDP bzw. Inhibitoren wie Cytochalasin D modulieren?
3. Welchen Einfluss auf die Phagozytose von GAMs hat das in der Klinik eingesetzte Chemotherapeutikum Temozolomid in-situ?

Die Etablierung eines solchen Modells bietet die Möglichkeit, klinisch eingesetzte Therapeutika sowie bisher unbekannte Modulatoren der Phagozytose-Aktivität von GAMs nahe an der in-vivo Situation zu erforschen.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Reagenzien	Im Text genannt:	Hersteller
Aqua Poly/Mount	Poly-Mount	Polysciences, Inc. (Eppelheim, Deutschland)
Adenosintriphosphat	ATP	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Albumin Fraktion V, biotinfrei	Albumin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Calciumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Cytochalasin D	Cytochalasin D	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
D-(+)-Glucose-Monohydrat (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> x H <sub>2</sub> O)	Glucose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Di-kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat (K <sub>2</sub> HO <sub>4</sub> P x 3H <sub>2</sub> O)	Di-kaliumhydrogenphosphat Trihydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
Dulbecco´s Modified Eagle Medium; high glucose	DMEM	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
Dulbecco´s Phosphate buffered saline (DPBS); no calcium, no magnesium	PBS	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
Fetales Kälberserum	FKS	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
Hank´s balanced salt solution; no calcium, no magnesium, no phenol red	HBSS-	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
Hank´s balanced salt solution calcium, magnesium, no phenol red	HBSS+	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
Kaliumchlorid (KCl)	Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
L-Glutamin; 100x	Glumatin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
Minimal essential medium; no glutamine	MEM	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O)	Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)



Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Normal Donkey Serum	Normales Eselserum	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Normal Horse Serum, heat inactivated	Normales Pferdeserum	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
Penicillin, Streptomycin, Glutamin; 100x	PSG	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
Penicillin, Streptomycin; 100x	PS	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Paraformaldehyd	PFA	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
Temozolomid	Temozolomid, TMZ	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
Triton X 100	Triton	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Uridine 5'-diphosphate sodium salt	UDP	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland)

**Tabelle 1:** Reagenzien und Chemikalien

### 2.1.2. Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
ACSF	Destilliertes Wasser supplementiert mit 134mM NaCl; 2,5mM KCl; 2mM CaCl <sub>2</sub> ; 1,3mM MgCl <sub>2</sub> ; 1,26mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 10mM Glucose; 26mM NaHCO <sub>3</sub> ; pH 7,4
Preparationsmedium: Medium 1	MEM supplementiert mit 100 U/ml Penicillin; 100µg/ml Streptomycin; 292µg/ml Glutamin; 4,5mg/ml Glucose
Kultivierungsmedium: Medium 2	MEM supplementiert mit 25% normalem Pferdeserum; 25% HBSS+; 2 mM Glutamin; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 4,5 mg/ml Glucose
Phosphatpuffer	100mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 100mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; pH 7,4
Blockierungs- und Permeabilisationspuffer: Puffer A	0,1M Phosphatpuffer supplementiert mit 10 % normalem Eselserum; 2% (v/v) Triton X-100; 2% BSA; pH 7,4
Färbepuffer: Puffer B	1:10 (v/v) Verdünnung von Puffer A

**Tabelle 2:** Puffer und Lösungen

### 2.1.3. Antikörper und fluoreszierende Reagenzien

Produktname und Spezifikationen	Verdünnung	Hersteller
Anti-IBA1 Antikörper; polyklonales IgG (Ziege); 0,5mg/ml	1:150	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich Großbritannien)
Esel IgG anti-Ziege IgG (H+L) - Alexa Fluor 488	1:200	Dianova (Hamburg; Deutschland)
Fluoresbrite Bright Blue (BB) Carboxylate Microspheres; Diameter 1.75µm; ~ 8.49 x 10 <sup>9</sup> Partikel/ml; 5% Variabilität des Durchmesserkoefizienten	1:100	Polysciences, Inc. (Eppelheim, Deutschland)
Propidiumiodid (PI); 1mg/ml gelöst in Wasser	1:500	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)

**Tabelle 3:** Antikörper und fluoreszierende Reagenzien

### 2.1.4. Ausrüstung und Geräte

Produktname	Im Text genannt	Hersteller
Stereomikroskop Olympus SZ40	Stereomikroskop	Olympus (Tokio, Japan)
Becherglas mit Netzeinsätzen	Becherglas	selbst konstruiert
Deckgläser 24x40mm	Deckgläser	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sartorius Analysenwaage Competence CPA224S-0CE	Feinwaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Rundes Filterpapier MN615; 150mm	Filterpapier	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Menzel-Gläser; Superfrost Plus	Objektträger	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
Minisart Spritzenfilter 0,2µm	Spritzenfilter	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Rotmarderpinsel Größe 0, 1	Pinsel	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen; Deutschland)
Orion Star A211 pH-Tischmessgerät	pH-Meter	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
Zellkulturschale 35/10mm	Petrischale	Greiner Bio-One (Kremsmünster,

Doppelseitige Rasierklingen	Rasierklingen	Österreich)
Millicell Zellkultureinsatz, 30 mm; 0,4µm	Zellkultureinsatz	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
Einmalskalpelle CUTFIX; Fig. 21	Skalpelle	Merck (Darmstadt, Deutschland)
3D Rocking Platform STR9	Schüttelplatte	B. Braun Melsungen (Melsungen, Deutschland)
Mcllwain tissue chopper TC752	Gewebeschnaider	Cole-Parmer (Stone, Vereinigtes Königreich Großbritannien)
Standard-Glasthermometer	Thermometer	Cavey Laboratory Engineering Co. Ltd. (Gomshall, Vereinigtes Königreich Großbritannien)
Eppendorf Thermomixer compact 5350	Thermomixer	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PV-1 Vortex Mixer	Vortexmischgerät	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Wasserbad WBT 22	Wasserbad	Grant Instruments Ltd (Shepreth, Vereinigtes Königreich Großbritannien)
TC-Platte 6 well, standard; TC-Platte 24 well, standard	6- und 24- Wellplatten	GK Sondermaschinenbau (Arnsdorf, Deutschland)
Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Mikroreaktionsgefäß	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
Forma Steri-Cult CO <sub>2</sub> -Inkubator	Inkubator	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf 5417R Zentrifuge und 5810R	Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
ZEISS Beleuchtungseinrichtung HXP 120 C	HXP-Lampe	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zeiss LSM 710 NLO inverted	Konfokalmikroskop	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)

**Tabelle 4:** Ausrüstung und Geräte

## 2.1.5. Software

Name	Hersteller
Adobe Illustrator CC	Adobe Systems Inc. (San Jose; Vereinigte Staaten von Amerika)
Graph Pad Prism 6	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, Vereinigte Staaten von Amerika)
Matlab Runtime Compiler x64 (Windows)	The MathWorks, Inc. (Natick, Vereinigte Staaten von Amerika)
IBM SPSS Statistics 25	IBM Coop. (Armonk, Vereinigte Staaten von Amerika)
Microsoft Office 2010	Microsoft (Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika)
Imaris Software; Version 8.3.	Bitplane (Zürich; Schweiz)
Zen Software; Version 2.1	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)

**Tabelle 5:** Software

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Humane GBM-Proben

Für die Etablierung eines Phagozytose-Assays humaner, gliom-assoziiertes Mikroglia und Makrophagen wurde Glioblastomgewebe aus neurochirurgischen Operationen des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel, Deutschland) und des Helios-Klinikums Berlin-Buch (Helios-Klinikum Berlin-Buch, Berlin, Deutschland) genutzt (siehe auch Tabelle 6). Die Verwendung des Resektionsmaterials geschah nur nach ausdrücklicher Einwilligung durch die Patienten und konnte jederzeit widerrufen werden. Alle Experimente mit humanen Gewebeproben wurden durch die Ethikkommissionen der Charité Universitätsmedizin Berlin und des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel im Rahmen des Projekts "Investigating the interaction of high-grade gliomas and microglia cells" genehmigt (Antragsnummern der Charité Universitätsmedizin Berlin: EA112/2001; EA3/023/06; EA2/101/08; Ethikvotum für Proben aus Kiel : Ethikvotum D477/18). Die Studie wurde in Einklang mit der Deklaration von Helsinki 1964 durchgeführt. Im Zuge der neurochirurgischen Operation zur Entfernung des Glioms wurde Tumorgewebe entnommen, sofort in

eisgekühltem DMEM (Thermo Fisher Scientific) ohne weitere Zusätze überführt und stoßsicher verschickt. Die experimentelle Arbeit mit den Proben begann spätestens 24h nach Gewebeentnahme. Ein Überblick über den chronologischen Ablauf der Experimente ist der Abbildung 1 und Abbildung 2 zu entnehmen.

## 2.2.2. Patienteninformation

Kodierter Name	Diagnose (WHO Grad), Primärtumor/ Rezidiv	Geschlecht	Alter	Histologische Merkmale	Lokalisation	Experiment (1 oder 2)
<b>MSY20042016</b>	GBM (IV), primär	m	62	<i>MGMT</i> -Methylierung: 17,6%, <i>IDH</i> n.v.	Links frontal/callosal	2
<b>DM02052016</b>	GBM (IV), primär	m	60	<i>MGMT</i> -Methylierung: 21,6%; <i>IDH</i> Wt	Links temporal	1,2
<b>DM19052016</b>	GBM (IV), Rezidiv	m	46	<i>MGMT</i> -Methylierung: nicht erhöht; <i>IDH</i> Wt	Rechts frontal	1,2
<b>MSY21052016</b>	GBM (IV), primär	m	65	<i>MGMT</i> -Methylierung: n.e.; <i>IDH</i> Wt	Links temporal	1
<b>MSY21062016</b>	GBM (IV), primär	m	66	<i>MGMT</i> -Methylierung n.e.; <i>IDH</i> Wt	Rechts frontal	1
<b>DM05072016</b>	GBM (IV), Rezidiv	m	60	<i>MGMT</i> -Methylierung 11,2%, <i>IDH</i> Wt	Rechts temporal	1,2
<b>MSY05082016</b>	GBM (IV), primär	m	74	<i>MGMT</i> -Methylierung 77,4%, <i>IDH</i> Wt	Rechts parieto-okzipital	2

<b>MSY09082016</b>	GBM (IV), Rezidiv	m	77	<i>MGMT</i> - Methylierung 19,6%; <i>IDH</i> Wt	Rechts frontal	1
<b>MSY20092016</b>	GBM (IV), primär	m	64	<i>MGMT</i> - Methylierung n.e., <i>IDH</i> Wt	Rechts temporo- parietal	1* (Kontrolle modifiziert)

**Tabelle 6:** Charakteristika der GBM-Patienten

Legende: (IV): Grad 4, GBM: Glioblastom, *IDH* Wt: *Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1*-Wildtyp, m: männlich, *MGMT*: *O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase-Gen*, n.e.: nicht erhöht, n.v.: nicht verfügbar

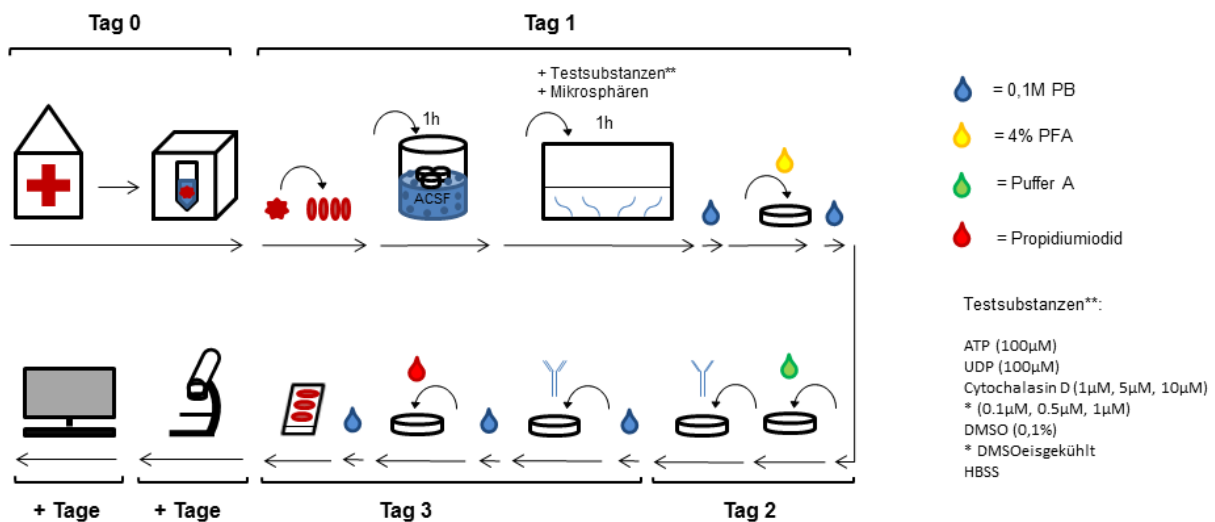
### 2.2.3. Präparation humaner organotypischer Glioblastomschnitte

Nach Erhalt der Gewebeprobe wurde das Tumorresektionsmaterial in eine Petrischale mit eisgekühltem Medium 1 überführt, makroskopisch begutachtet und sichtbar schwarz-verfärbte, nekrotische Bereiche des Tumors mit einem Skalpell entfernt. Im Anschluss wurden vier, makroskopisch möglichst heterogene, sich nicht berührende Tumorbereiche ausgewählt, mit einem Skalpell ca. 5mm x 5mm große Stücke abgetrennt und in vier Petrischalen mit eisgekühltem und gefiltertem Medium 1 überführt. Die methodischen Grundlagen zur Anfertigung und Kultivierung der Schnittkulturen wurden zuvor etabliert und für den Assay modifiziert (Stoppini et al. 1991; Merz et al. 2013). Die vereinzelt, vier selektierten Tumorfraktionen wurden auf den Probenhalter eines Gewebsschneiders (McIlwain tissue chopper; Gomshall, Großbritannien) auf steriles - mit Medium 1 befeuchtetes - Filterpapier aufgebracht, sukzessive in 350µm dicke Schnitte zerkleinert und rasch in die - mit eisgekühltem Medium gefüllten - Petrischalen zurückgeführt. Zusammenhängende Schnitte wurden im Anschluss unter dem Stereomikroskop mittels eines Pinsels und Skalpells getrennt (Olympus SZ40; Olympus, Japan).

Das bisher geschilderte Vorgehen haben beide durchgeführten Experimente gemeinsam, prozedurale Unterschiede werden nachfolgend beschrieben und im Anschluss die methodisch analoge Endstrecke beider Experimente erläutert.

## 2.2.4. Methodische Durchführung der Phagozytose-Experimente

### 2.2.4.1: Experiment 1 und Experiment 1\*



**Abbildung 5:** Chronologischer Überblick zu Experiment 1 und Experiment 1\*

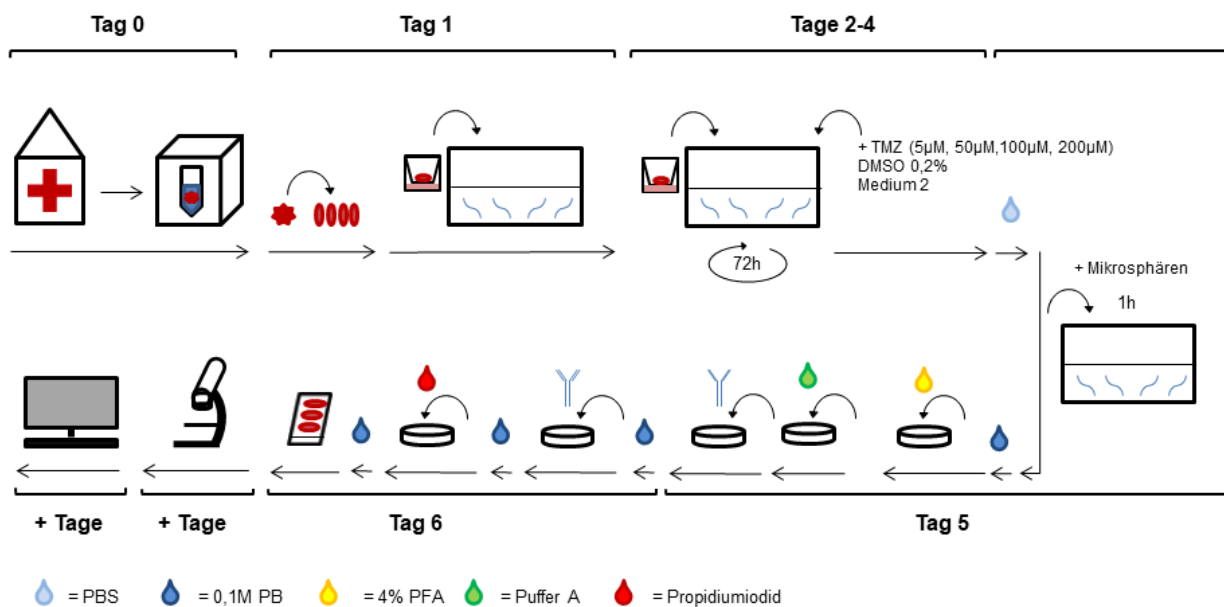
Nach der Operation wurde das GBM-Gewebe direkt eisgekühlt in DMEM überführt und verschickt. Am darauffolgenden Tag begann Experiment 1 mit der Anfertigung der Tumorschnitte, der Begasung in ACSF, Inkubation im Inkubator zusammen mit den Testsubstanzen und Mikrosphären (rechteckiges Symbol) und endete nach der Fixierung der Tumorschnitte mit 4% PFA-Lösung. Die zweischrittige Färbung (antikörperbasierte Färbeschritte sind mit dem Symbol eines Antikörpers dargestellt) erfolgte in den darauffolgenden beiden Tagen, sodass die am Ende von Tag 3 auf Objektträgern übertragenen und gefärbten Gewebsschnitte in den anschließenden Tagen mittels Konfokalmikroskopie aufgenommen (Imaris-basiert (Computer-Icon) werden konnten.

Nach Anfertigung der Tumorschnitte wurden je zwei der Schnitffractionen mit der Glaspipette in eines der beiden nylonbespannten Auffangkörbchen transferiert und in ACSF (Zusammensetzung: 134mM NaCl; 2,5mM KCl; 2mM CaCl<sub>2</sub>; 1,3mM MgCl<sub>2</sub>; 1,26mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10mM Glucose; 26mM NaHCO<sub>3</sub>; pH 7,4) bei Raumtemperatur für 2h mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>) begast. Im genannten Vorgehen wurde auf das in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Vorgehen für die Begasung von Schnittkulturen zurückgegriffen (Bulavina et al. 2013). Zwischenzeitlich wurden die bei -20°C gelagerten Testsubstanzen vorbereitet und mit destilliertem Wasser in die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Alle Konzentrationen wurden für 500µl HBSS pro Well berechnet. ATP und UDP wurde zu den Zielkonzentrationen von 100µM verdünnt und mit DMSO versetzt, um die gleiche Lösungsmittelkonzentration von 0,1% DMSO zu

erreichen, welche die Negativkontrolle der Cytochalasin D Testreihe aufwies. Cytochalasin D als bekannter Aktin-Polymerisationsinhibitor wurde als Negativkontrolle in den Konzentrationen 10 $\mu$ M, 5 $\mu$ M und 1 $\mu$ M verwendet (Mimura und Asano 1976; Ribes et al. 2010; Brown und Spudich 1979; Ribes et al. 2010). Die Kontrollen des Experiments bestanden in einer Testgruppe mit 0,1% DMSO und einer Testgruppe mit HBSS (bezeichnet als Medium in Experiment 1), um potenzielle Effekte des Lösungsmittels zu bestimmen. Pro Tumor durchliefen 2-3 Testschnitte ohne Testsubstanzen und ohne die Polystyren-Mikrosphären alle experimentellen Schritte, um die Eigenfluoreszenz des Gewebes in der Auswertung subtrahieren zu können. Zur modifizierten Testung der Negativkontrollen (Experiment 1\*) durchlief das Gewebe einer Tumorprobe den experimentellen Ablauf wie in Experiment 1, wurde allerdings mit geringeren Cytochalasin D-Konzentrationen von 0,1 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M und 1 $\mu$ M behandelt, sowie Testgruppe mit DMSOeisgekühlt (DMSOe) eingeführt.



## 2.2.4.2: Experiment 2



**Abbildung 6:** Chronologischer Überblick zu Experiment 2

Tag 0 entspricht derselben prozeduralen Chronologie wie bei Experiment 1/1\* (siehe auch Abbildung 5). Am Tag 1 wurden die Schnitte auf Kulturplatteneinsätzen (kleine schwarze Quadrate, z.B. an Tag 1) platziert und für weitere 72h mit intermittierenden Medienwechseln und Austausch der Testsubstanzen inkubiert (Inkubationsschritte im Inkubator sind symbolisiert durch das schwarze Rechteck). Am Tag 5 wurde der Phagozytose-Assay durchgeführt und nach der Fixierung mit 4% PFA direkt der erste Schritt der Färbung angeschlossen, welche mit Ende des 6. Tages beendet war (antikörperbasierte Färbeschritte sind mit dem Symbol eines Antikörpers dargestellt). Konfokalmikroskopische Aufnahme- und Analyseschritte (symbolisiert durch Mikroskop- und Computer- Abbildungen) wurden in den darauffolgenden Tagen angeschlossen.

Je nach Größe des Tumorsektionsmaterials und resultierender Menge an Glioblastomschnitten wurden vorsichtig drei bis vier Tumorschnitte auf Zellkultureinsätze in gleichem Abstand voneinander platziert. Die Wells einer 6-well-Platte wurden jeweils mit 1ml gefiltertem Medium 2 befüllt und ein Zellkultureinsatz pro Well in diese positioniert. Die Tumorschnitte hatten im Anschluss eine Ruhezeit im Inkubator von 24h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Am nächsten Tag wurde das bei -20°C gelagerte, aliquotierte und in DMSO gelöste Temozolomid in Mikroreaktionsgefäßen mittels einer Verdünnungsreihe in die gewünschten Konzentrationen pro Testgruppe von 200µM, 100µM, 50µM und 5µM verdünnt. Der Bereich dieser TMZ-Konzentrationen beeinflusst im in-vitro-Experiment nicht die Viabilität von Mikrogliazellen (Vairano et al. 2004). Die

Konzentrationen wurden so berechnet, dass pro Well 2µl DMSO und 998µl Medium 2 pro Well die erwünschte Konzentration ergab. Aufgrund des DMSO als Lösungsmittel wurden als Kontrollgruppe pro Tumor jeweils 3 Schnitte (entsprechend einer Testgruppe) mit einer DMSO-Konzentration von 0,2% behandelt. Ein möglicher Effekt von DMSO auf die Phagozytose wurde mit der Kontrollgruppe, in dem sich nur Medium 2 befand, überprüft. Die verdünnten Testsubstanzen wurden für 15min bei 37°C im Wasserbad aufgewärmt und nachfolgend in eine neue 6-Wellplatte gegeben. Zum Wechsel der bereits 24h inkubierten Glioblastomschnitte wurden die Zellkultureinsätze mit einer Pinzette vorsichtig unter der Arbeitsbank aus der Wellplatte in die vorgewärmten Medien der neuen Zellkulturplatte überführt und diese wieder zurück in den Inkubator gebracht. Es wurde darauf Wert gelegt, die Zeit unter der Arbeitsbank während des Mediumwechsels kurz zu halten. Nach jeweils weiteren 24h wurden erneut in oben beschriebener Weise ein Mediumwechsel mit Austausch aller Testsubstanzen und Kontrollen durchgeführt. Insgesamt wurden die Glioblastom-Schnittkulturen für 72h mit dem Zytostatikum inkubiert (Merz et al. 2013).

#### 2.2.4.3: Inkubation mit Polystyren-Mikrosphären

Die berechnete Gesamtmenge der monodispersen, blau-fluoreszierenden Polystyren-Mikrosphären (Fluoresbrite BB Carboxylate Microspheres, Durchmesser 1.75µm; Polysciences, Inc. Eppelheim, Deutschland) wurde mit fetalem Kälberserum (Thermo Fisher Scientific) beschichtet. Dafür wurde die Suspension aus Mikropartikeln und 1ml fetalem Kälberserum für 30min bei 1000rpm in Raumtemperatur in einem Thermomixer gemischt und im Anschluss 2 Minuten lang bei 3000rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Mikrosphären mit 1ml PBS gewaschen und der Zentrifugationsschritt und das anschließende Verwerfen des Überstands wiederholt. Für die Resuspension der gewaschenen Mikrosphären wurde mit 500µl HBSS pro Tumorschnitt gerechnet. Je nach Größe des Resektionsmaterials wurden für die Behandlung mit den jeweiligen Testsubstanzen für Experiment 1 und 2 pro Testkondition zwischen 2 und 6 Tumorschnitte verwendet.

Im Rahmen von Experiment 1 wurden die vorbereiteten, verdünnten Testsubstanzen in die Suspension aus Mikrosphären und HBSS zugegeben, welche für 500µl HBSS pro Well berechnet wurde. Anschließend wurden die Tumorschnitte mithilfe einer Pipette

mit abgeschnittener, großer Pipettenspitzenöffnung und eines Pinsels vorsichtig in eine 24-Wellplatte transferiert.

Im Falle des Experiments 1 wurden die Glioblastomschnitte aus der ACSF-Lösung in die beschriftete 24-Wellplatte überführt, das transportierte ACSF aus den Welleinsätzen entfernt und mit der mit den Testsubstanzen versehenen 500µl HBSS-Mikrosphärensuspension pro Well versehen.

Die zuvor für 72h inkubierten Tumorschnittkulturen in Experiment 2 wurden vorsichtig mit 37°C warmen PBS von den Zellkultureinsätzen gelöst und gewaschen, in die 24-Wellplatte gesetzt, transportiertes Medium aus den Wells entfernt und 500µl der vorbereiteten HBSS-Mikrosphärensuspension in jedes Well pipettiert.

Analog für beide Experimente wurden die Tumorschnitte in den 24-Wellplatten im Anschluss für 1h bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> inkubiert (s. Tabelle 7). Nach der Inkubation wurde die HBSS-Mikrosphärensuspension mittels einer Pasteurpipette mit aufgesetzter Pipettenspitze entfernt und die Schnitte mit 500µl 0,1M Phosphatpuffer pro Well für zweimal 30 Minuten auf einer Schüttelplatte lichtgeschützt gewaschen. Anschließend wurde der Phosphatpuffer entfernt und die Tumorschnitte 1h in 4% PFA-Lösung fixiert. Die PFA-Lösung wurde aus den Wells beseitigt und dreimal für 10min mit 1ml pro Well 0,1M Phosphatpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift konnten die Tumorschnitte in 0,1PB bei 4°C lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert oder direkt im Anschluss mit den Färbeschriften begonnen werden.

Charakteristika der beiden Experimente in Überblick:

Merkmale der Testreihen	Experiment 1/1*	Experiment 2
Beginn des Phagozytose-Assays (nach Probenankunft)	ca. 2,5h	96h
Inkubationsdauer mit Medium 2	keine	24h
Inkubationsdauer mit Testsubstanz	1h	72h
Inkubationsdauer mit Mikrosphären	1h	1h
Zeitpunkt der Behandlung mit Testsubstanzen	Zusammen mit Polystyren- Mikrosphären	Vor Zugabe der Polystyren- Mikrosphären
Testsubstanzen (Konzentration)	ATP (100µM) UDP (100µM) Cytochalasin D (1µM, 5µM, 10µM) <b>E1*</b> : Cytochalasin D (0.1µM, 0.5µM, 1µM)	Temozolomid (5µM, 50µM, 100µM, 200µM)
Kontrollen (Konzentration)	DMSO (0,1%) HBSS (Medium) <b>E1*</b> : DMSO eisgekühlt	DMSO (0,2%) Medium 2

**Tabelle 7:** Experimentelle Unterschiede zwischen Experiment 1 und 2

Legende: E1\*, Experiment 1\*

### 2.2.5. Färbung der Glioblastomschnitte

Am nächsten Tag wurden alle Tumorschnitte mit den gleichen Testkonditionen unter Verwendung einer Pipette mit abgeschnittener, vergrößerter Pipettenspitzenöffnung und einem Pinsel vorsichtig in einem Well gesammelt, um für die Färbeschritte den Verbrauch an Antikörpern zu reduzieren. Der Phosphatpuffer wurde abpipettiert, mit 1ml Puffer A pro Well ersetzt und die Tumorschnitte auf der Schüttelplatte für 4h bei Raumtemperatur inkubiert. Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurde der primäre Anti-IBA1-Antikörper 1/150 in Puffer B verdünnt und nach Austausch von Puffer A durch 300µl der Antikörper-Puffer B-Lösung pro Well für eine Nacht bei 4°C auf einer langsam, rotierenden Schüttelplatte inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der nichtgebundene, primäre Antikörper über dreimaliges Auswaschen mit je 1ml 0,1M

Phosphatpuffer pro Well für 20min auf einer Schüttelplatte bei Raumtemperatur entfernt. Während des letzten Waschvorgangs wurde der sekundäre, mit Alexa488 gekoppelte Antikörper in Eis zwischengelagert, die berechnete Menge in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und dieses bei 4°C für 15 Minuten bei 12.000rpm zentrifugiert, um lagerungsbedingte Antikörperaggregationen zu reduzieren. Alle Arbeitsschritte ab der Verwendung der Fluorophore wurden UV-lichtgeschützt durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurde ein weiterer Färbeschritt mit 200µl pro Well des sekundären Antikörpers, welcher zuvor 1/200 in Puffer B verdünnt wurde, für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter langsamer Rotation auf der Schüttelplatte vorgenommen. Ungebundene, sekundäre Antikörper wurden - analog zu den Waschschritten nach der Inkubation mit dem primären Antikörper - nach zweimal 20 Minuten durch 0,1M Phosphatpuffer ausgewaschen. Zellnuklei wurden mit 2µg/ml Propidiumiodid, gelöst in Puffer B, in zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur angefärbt. Die Glioblastomschnitte wurden nach insgesamt drei jeweils 10-minütigen Waschschritten mit 0,1M PB bei Raumtemperatur mithilfe eines Pinsels und einer Pipette mit einer abgeschnittenen, großlumigen Pipettenspitze auf Objektträger aufgezogen. Transportiertes, überschüssiges Medium wurde entfernt und die Schnitte in der Raumluft kurz angetrocknet. Zunächst aufgebracht Aqua Polymount und abschließende Deckgläser fixierten und schützten die Tumorschnitte, sodass diese für einige Zeit bei 4°C kühl gelagert werden konnten.

### **2.2.6. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von z-Stapeln**

Die konfokalmikroskopischen Bilder wurden unter Benutzung eines LSM 710 NLO (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einem 40x-Immersionsobjektiv aufgenommen. Dazu wurden mit Hilfe der HXP-Lampe pro Tumorschnitt zwei Regionen aufgesucht, welche eine gleichmäßige Verteilung der fluoreszierenden Polystyren-Mikrosphären sowie das Vorhandensein von Mikrogliazellen aufwiesen. Pro Tumorschnitt wurden aufgrund einer erwarteten intratumoralen Heterogenität mindestens zwei Bilder aufgenommen. Die Auswahl der Zielregion geschah unter Beachtung der beiden genannten Kriterien zufällig. Nekrotische Areale erfüllten die genannten Kriterien nicht, sodass diese nicht für Aufnahmen selektiert wurden. Eine Aufnahme erfolgte als z-Stapel von insgesamt 20µm in Intervallen von 1µm sowie in x- und y-Achse bei gegebenen Einstellungen als Bild von 213,3µm x 213,3µm (siehe Tabelle 8). Weitere

Aufnahmeeinstellungen sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Anzumerken ist, dass aufgrund der sehr unterschiedlichen Färbeintensitäten in jedem Schnitt zum Erreichen einer maximalen Pixelsaturierung der „Gain“ von 500µm +/- 25% angepasst werden musste, um weder zelluläre Strukturen auszulassen noch Überbelichtung zu erzeugen (siehe auch Tabelle 8). Die Anpassung des Gains erfolgte unter Zuhilfenahme des „Range Indicator“ der Zen Software; Version 2.1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Ansonsten wurden alle Einstellungen beibehalten. Die Bildnamen und die darin enthaltenen Testkonditionen wurden zur Auswertung von testunabhängigen Personen verblindet und erst nach kompletter Auswertung des Tumors wieder entblindet.

Konfokalmikroskopische Einstellungen am LSM 710 NLO (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland):

Parameter:			
Objektiv:	Plan-Apochromat 40x/1,3 Oil DIC		
Scan Mode	Frame		
Frame Size	1024 x 1024		
Image Size	213,3µm x 213,3µm		
Speed	7 (entspricht Pixel Dwell Time von 1,58µs)		
Averaging	2		
Bit Depth	16		
Pixel Size	0,21µm		
Zoom	1		
Laser:	Argon	Diode 405-30	DPSS 561-30
Filter:	<b>A488</b>	<b>A405</b>	<b>PI</b>
Wellenlänge:	503-547nm	410-484nm	597-725nm
Laserintensität:	2%	2%	2%
Pinhole:	3 AU =2,3µm	3 AU =2,3µm	3 AU =2,3µm
Gain:	375-625	375-625	375-625
Digital Gain:	1,2	1,0	1,0
Digital Offset:	0	0	0
z-Stack:			
Intervall	1µm		
Slices	21		
Range	20µm		
Speicherformat	Czi.		

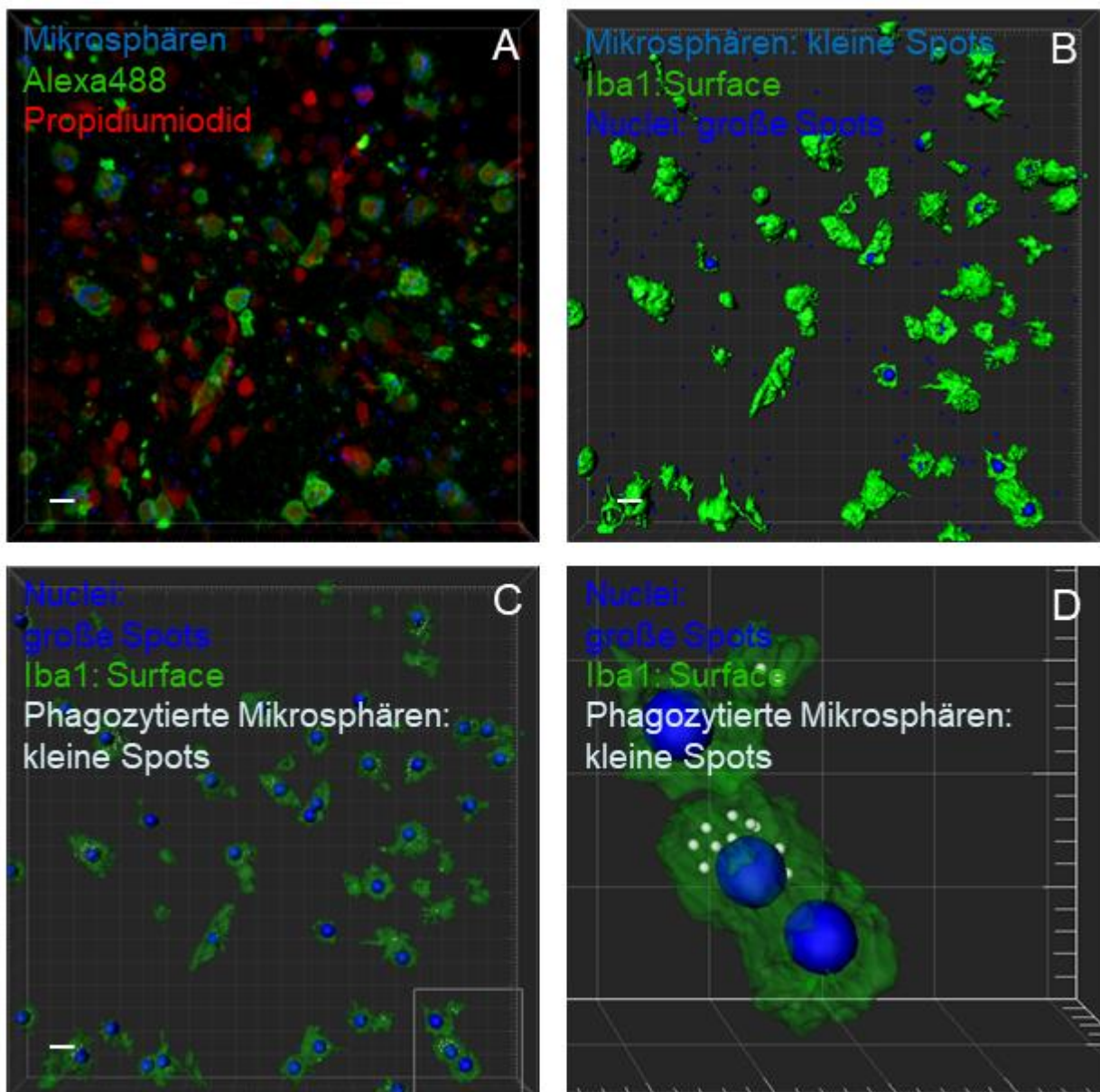
**Tabelle 8:** Bildeinstellungen der Konfokalmikroskopie (LSM 710)

Legende: AU, Airy unit, DIC, Differential interference contrast

### 2.2.7. 3D-Rekonstruktion der z-Stapel mittels Imaris

Die dreidimensionale Rekonstruktion der IBA1-positiven Zellen und der fluoreszierenden Mikrosphären erfolgte mithilfe der Imaris Software (Bitplane; Zürich, Schweiz). Zur Minimierung sowohl der Autofluoreszenz des humanen Tumorgewebes als auch der färbebedingten Hintergrundfluoreszenz wurde für jede Tumorprobe eine Referenzwertbestimmung durchgeführt, indem anhand eines ungefärbten und nur eines mit sekundären Antikörpern gefärbten Tumorschnittes für jeden Kanal ein Basiswert definiert wurde. Dieser Referenzwert wurde vor der weiteren Analyse von allen gefärbten Tumorschnitten subtrahiert. Zur Oberflächenglättung der zu rekonstruierenden Formen wurde ein zuvor definierter Gauß-Filterwert von 0,15 für jedes auszuwertende Bild angewendet. Beginnend mit der Rekonstruktion der Polystyren-Mikrosphären wurde im Menü der Imaris-Software die „Spot-Erkennung“ aktiviert und alle Kanäle außer dem aktuell zu bearbeitenden ausgeschaltet. Ausgehend von einem geschätzten Durchmesser von  $1\mu\text{m}$  in der Spoterkennung wurden die meisten Mikrosphären detektiert und die markierten Spots anschließend auf die Ursprungsgröße von  $1,75\mu\text{m}$  vergrößert, um Signal und sphärische Spotrekonstruktion in Überlappung zu bringen. Indem die ursprüngliche blaue Kanalfarbe zur Kontrastierung der ebenfalls blau markierten Spots zu Gelb verändert wurde, konnte manuell das Ergebnis der Rekonstruktion überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert werden. Das Alexa488-Signal der IBA1-positiven Zellen wurde mittels einer Oberflächenrekonstruktion dreidimensional übersetzt, indem in einem zweischrittigem Verfahren mittels der „Surface“-Funktion in Imaris bei einem „Detaillevel“ von  $0,01\mu\text{m}$  zunächst über einen Intensitäts-, nachfolgend über einen Voxelfilter eine möglichst umfassende Deckungsgleichheit zwischen Signal und „Surface“ hergestellt wurde. Die Zellnuklei wurden in Imaris unter der Prämisse, dass diese innerhalb der Zelle liegen, als Teilmenge der rekonstruierten IBA1-positiven „Surface“ als Spots dargestellt. Alle zuvor definierten, einzelnen IBA1-Oberflächenstrukturen wurden hierzu als ein Objekt vereint, um mittels der „Mask Channel“-Funktion einen weiteren Kanal zu generieren, welcher die Teilmenge des Propidiumiodid- und des IBA1-Kanals abbildete. Die „Spot“-Funktion von Imaris erkannte bei einem angenommenen Durchmesser von  $6\mu\text{m}$  und eines Filtergrenzwerts für die Signalqualität den überwiegenden Anteil der Zellkerne. Die Zahl der IBA1-positiven Zellen wurde über die Zellkernanzahl innerhalb der IBA1-Surface bestimmt, manuelle Korrekturen wurden für offensichtliche Fehlmarkierungen,

z.B. bedingt durch partielle Signalüberlappung offensichtlich nah an die Zellmembran angrenzender, außerhalb der Zelle liegender Zellkerne vorgenommen. Die phagozytierten Mikrosphären wurden mittels der Funktion „split spots into surface objects“ als Teile der IBA1-Oberflächenstruktur unter Nutzung eines Matlab Runtime Compilers (The MathWorks, Inc. Natick, Vereinigte Staaten von Amerika) ermittelt, wobei die Kongruenz des Spotmittelpunkts mit der rekonstruierten Oberflächenstruktur des IBA1-Kanals für die Definition „phagozytiert“ bestimmend ist.



**Abbildung 7:** Imaris-basierte Schritte der 3D-Rekonstruktion konfokalmikroskopisch aufgenommener GBM-Schnitte



Eigenfluoreszierende „Fluoresbrite Bright Blue“ Mikrosphären mit einem Durchmesser von 1.75 µm (blau) dienen als Phagozytosemarker, Zellkerne sind mit Propidiumiodid markiert (rot), das Zytosol von Mikroglia/Makrophagen wurde immunzytochemisch mittels Anti-IBA1-Antikörpern angefärbt (grün) [A]. Darstellung der Polystyren-Mikrosphären als kleine Spots (blau), der IBA1-positiven Zellen mittels der „Surface“-Funktion (grün) sowie der Zellkerne als große Spots (blau) [B]. Phagozytierte Mikrosphären, definiert als Teil der IBA1<sup>+</sup>-Oberflächenstruktur, sind als kleine helle Spots visualisiert [C]. Zur besseren Sichtbarkeit wurde der in Bild [C] rechts unten markierte Ausschnitt vergrößert [D]. Weiße Skalierungsmarkierung in Bild [A-C]: 10µm; Z-Stapel: 20µm

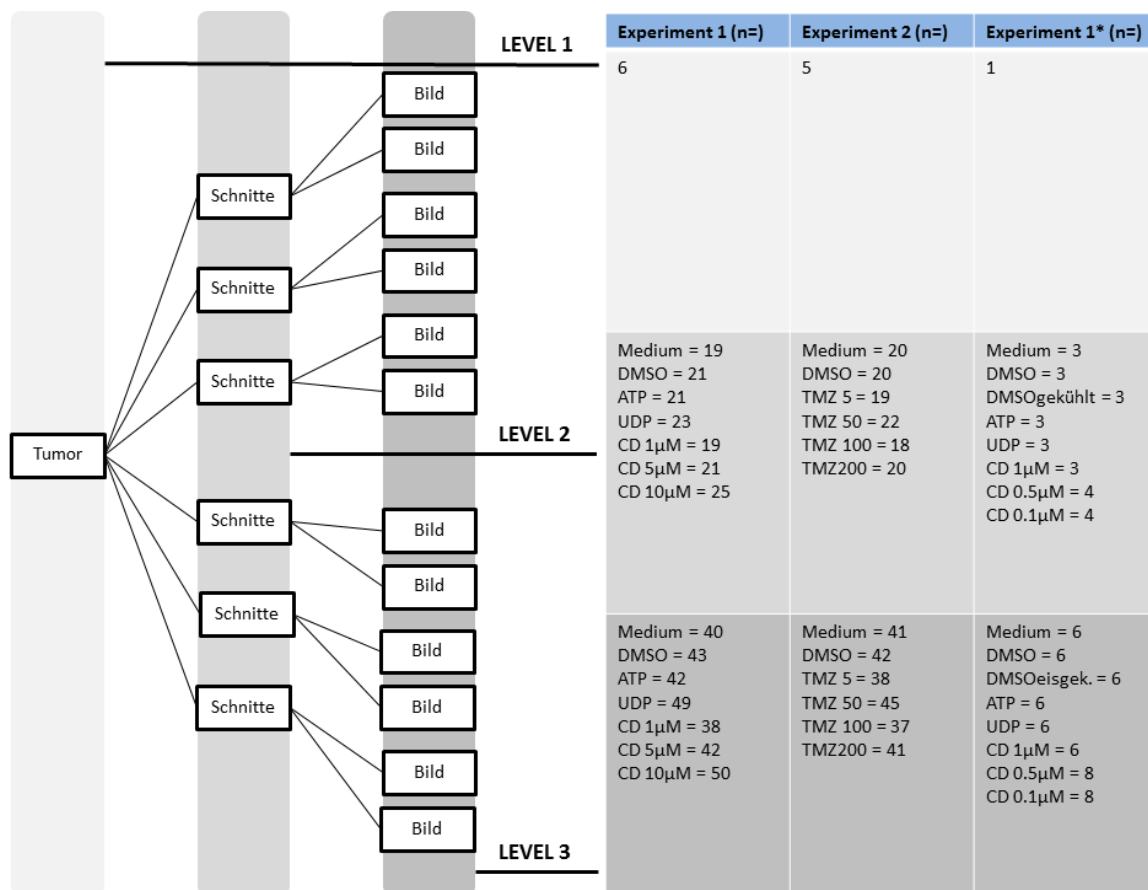
### 2.2.8. statistische Analyse

Die Auswertung der Experimente erfolgte mittels Microsoft Excel 2010 (Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika), IBM SPSS Vers. 25 (IBM Coop.; Armonk, Vereinigte Staaten von Amerika) und Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Vereinigte Staaten von Amerika). Die Phagozytose-Aktivität wurde mittels des zuvor etablierten folgenden Index bestimmt (Bulavina et al. 2013):

$$\text{Phagozytose – Index} = \frac{\text{phagozytierte Polystyrene – Partikel}}{\text{Iba}^+ \text{ – Zellen pro konfokaler Stapelaufnahme}}$$

In beiden Experimenten wurden für jede Tumorprobe je Testgruppe mindestens zwei Schnitte angefertigt, von denen wiederum mindestens zwei konfokale Stapelaufnahmen aufgenommen wurden. Aufgrund der sich daraus ergebenden hierarchischen Datenstruktur bestehend aus drei Ebenen (Tumor-Schnitt-Bild) und gegebener Abhängigkeit der Daten vom jeweils nächst höheren Level wurde eine Mehrebenenanalyse zur differenzierten Varianzanalyse und zur Berechnung der Intra-Klassenkorrelation (ICC) vorgenommen (Aarts et al. 2015). Eine vollständige Auswertung der Daten innerhalb der Mehrebenenanalyse war jedoch aufgrund der Datenstruktur nicht möglich, sodass die Auswertung des Effekts der Testsubstanzen nach Mittelwertbildung der Phagozytose-Indices der Einzelbildobservationen vorgenommen wurde, obwohl damit ein Informationsverlust resultierte. Die n-Anzahl pro Experiment und Level ist der Abbildung 9 zu entnehmen. Experimente mit nicht-normalverteilten Testgruppen wurden mittels Kruskal-Wallis mit post-hoc Dunn’s Test miteinander verglichen, ebenso wie die Analyse der Penetrationstiefe der Latexpartikel in die Gewebsschnitte. Ein Signifikanzniveau  $\alpha \leq .05$  wurde als signifikant definiert,

dessen Erreichen folgendermaßen gekennzeichnet ist: p-Wert  $\leq .05$  (\*),  $\leq .01$  (\*\*),  $\leq .001$  (\*\*\*)). Angegebene Werte sind auf zwei Nachkommastellen gerundet. Um die Daten möglichst unverändert darzustellen und die breite Streuung der Werte abzubilden, wurde auf Outlier-Verfahren weitestgehend verzichtet. Ausnahme bildet ein extremer Bildwert aus Experiment 1 (DM02052016; ATP-Kondition, Schnitt 3, Bild 1), dessen Grundlage eine alleinige Zelle im gesamten z-Bildstapel bildete und deren Phagozytose-Index (Indexwert = 21)  $> 15x$  des Interquartilenabstands bestand. Ergebnisse wurden auf zwei Nachkommastellen gerundet.



**Abbildung 8:** Hierarchische Struktur des Datensatzes mit n-Anzahl/Ebene

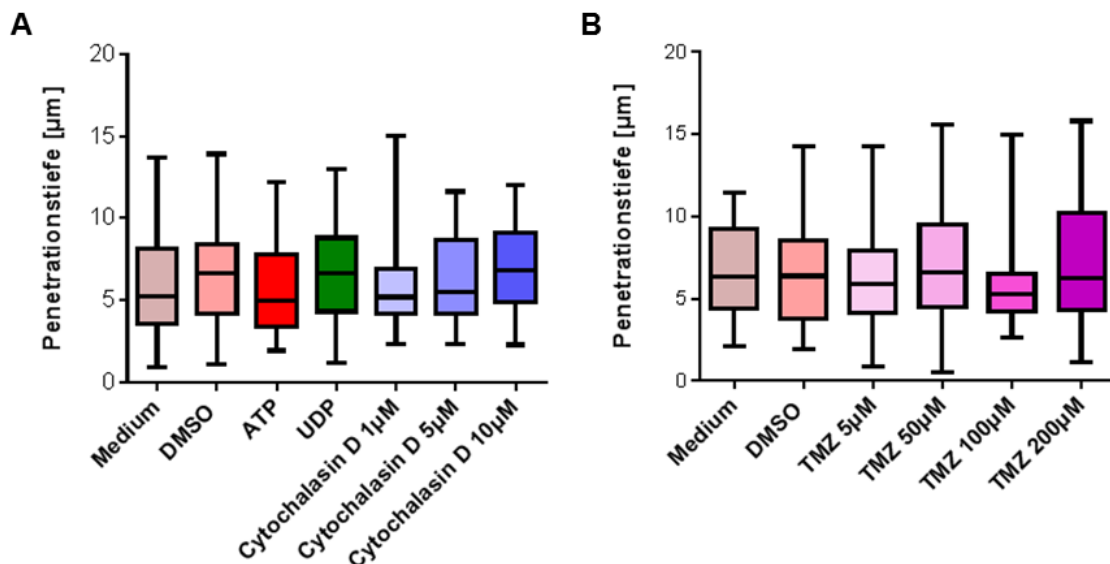
Pro Glioblastomprobe (Level 1) wurden mehrere Schnitte (Level 2) angefertigt, welche mit Testsubstanzen behandelt wurden. Pro Tumorschnitt wurden mindestens zwei Bilder angefertigt, ein Bild entspricht einer konfokaler Stapelaufnahme (z-Stack) (Level 3). Die unterschiedlichen Grautöne (Spalte auf linker Abbildungshälfte, Zeilen in rechter tabellarischer Darstellung) sind korrespondierend zur Levelzugehörigkeit. n-Zahlen sind abhängig des jeweiligen Levels notiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Patientencharakteristika

Das durchschnittliche Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Gewebentnahme betrug 63,7 Jahre (Bereich zwischen 46-77 Jahren). Alle Gewebeproben sind als Glioblastom (WHO Grad IV) diagnostiziert worden und stammten von männlichen Patienten (s. Tab. 6). Bis auf drei GBM-Rezidive (DM19052016, DM05072016, MSY09082016) waren alle Proben primäre Glioblastome. Bis auf einen Tumor, dessen IDH Status nicht ermittelt werden konnte, wiesen alle Gliome einen IDH-Wildtyp auf.

#### 3.2. Penetrationstiefe der Polystyren-Partikel im Glioblastomschnitt



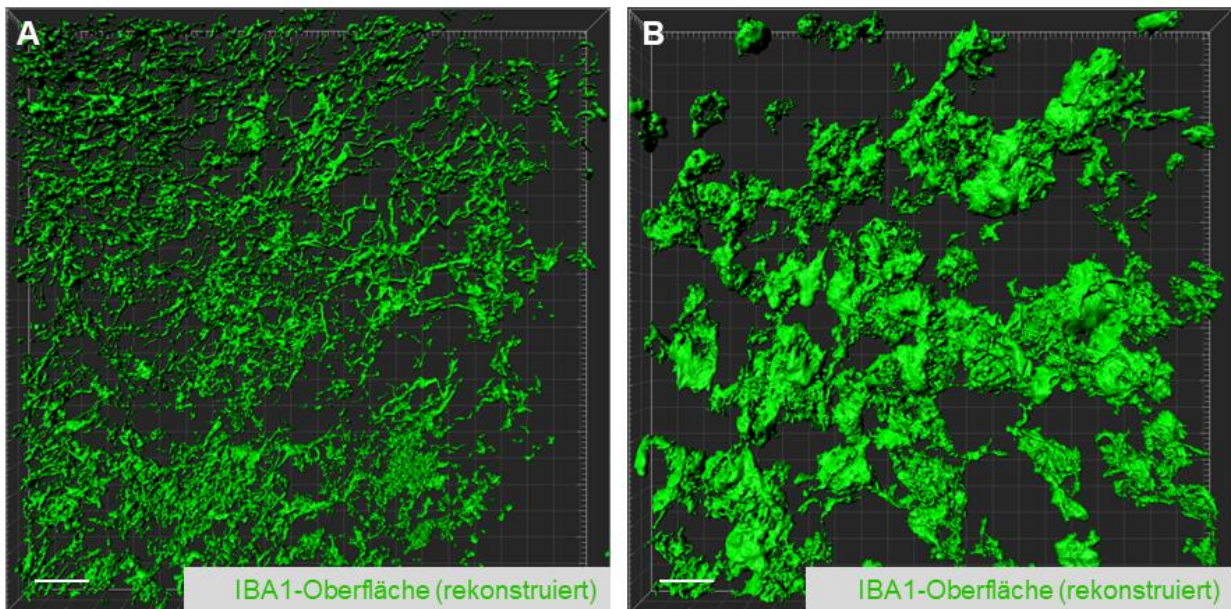
**Abbildung 9:** Darstellung der Penetrationstiefe der fluoreszierenden Polystyren-Mikrosphären in  $\mu\text{M}$  gemessen vom Schnitttrand.

Die unterschiedlichen Testsubstanzen sowohl in Experiment 1 (ohne Experiment 1\*) [A], als auch in Experiment 2 [B] haben keinen signifikanten Einfluss auf die Penetrationstiefe (z-Achse) der  $1,75\mu\text{m}$  großen Partikel. Darstellung der Daten als Box-Plot mit maximaler Spannweite der Datenwerte (Whisker) und Median. Zur Signifikanzanalyse wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit post-hoc Dunn's-Testung durchgeführt. Ein n entspricht den gepoolten Bildwerten (Level 3) des jeweiligen Experiments, wie in Abbildung 8 beschrieben.

Um die Frage zu beantworten in welcher Tiefe der Glioblastomschnittkulturen die Phagozytose-Aktivität von GAMs beobachtet wird sowie um einen Einfluss der Testsubstanzen auf die Gewebspermeabilität der Polystyren-Partikel zu detektieren, wurde mittels der Imaris-Software (Bitplane; Zürich; Schweiz) die z-Position der fluoreszierenden Phagozytose-Partikel innerhalb der konfokalen Stapelaufnahme bestimmt. Durchschnittlich drangen die Partikel gemittelt über alle Testgruppen in Experiment 1 (ohne Experiment 1\*)  $6,34\mu\text{m}$  (SD= 2.86) und in Experiment 2  $6,68\mu\text{m}$  (SD= 3.11) in das Gewebe ein. Die Betrachtung der Phagozytose-Aktivität liegt damit innerhalb des  $350\mu\text{m}$  dicken Schnittes randständig. Innerhalb der DMSO-Kontrollgruppe von Experiment 1 drangen die Mikrosphären im Mittel  $6,63\mu\text{m}$  (SD= 3.19) ein. Dies war damit nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen Testsubstanzen (Medium:  $5,82\mu\text{m}$  [SD= 2.94]; ATP:  $5,71\mu\text{m}$  [SD= 2.92]; UDP:  $6,82\mu\text{m}$  [SD= 3,02]; Cytochalasin D  $1\mu\text{M}$ :  $5,83\mu\text{m}$  [SD= 2.62]; Cytochalasin D  $5\mu\text{M}$ :  $6,33\mu\text{m}$  [SD= 2.68]; Cytochalasin D  $10\mu\text{M}$ :  $6,96\mu\text{m}$ ; [SD= 2.59]). In Experiment 2 hatte das Zytostatikum Temozolomid in steigender Konzentration ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Eindringtiefe der Fluoreszenzmarker im Vergleich zur Kontrollgruppe DMSO (DMSO:  $6,77\mu\text{m}$  [SD= 3.3], Medium:  $6,63\mu\text{m}$  [SD= 2.76]; TMZ  $5\mu\text{M}$   $6,22\mu\text{m}$  [SD= 3.01], TMZ  $50\mu\text{M}$   $6,93\mu\text{m}$  [SD= 3.07], TMZ  $100\mu\text{M}$   $5,95\mu\text{m}$  [SD= 2.46], TMZ  $200\mu\text{M}$   $7,39\mu\text{m}$  [SD= 3.79]). Damit wurde die Gewebspermeabilität der Polystyren-Partikel in den durchgeführten Experimenten nicht durch die Testsubstanzen beeinflusst.

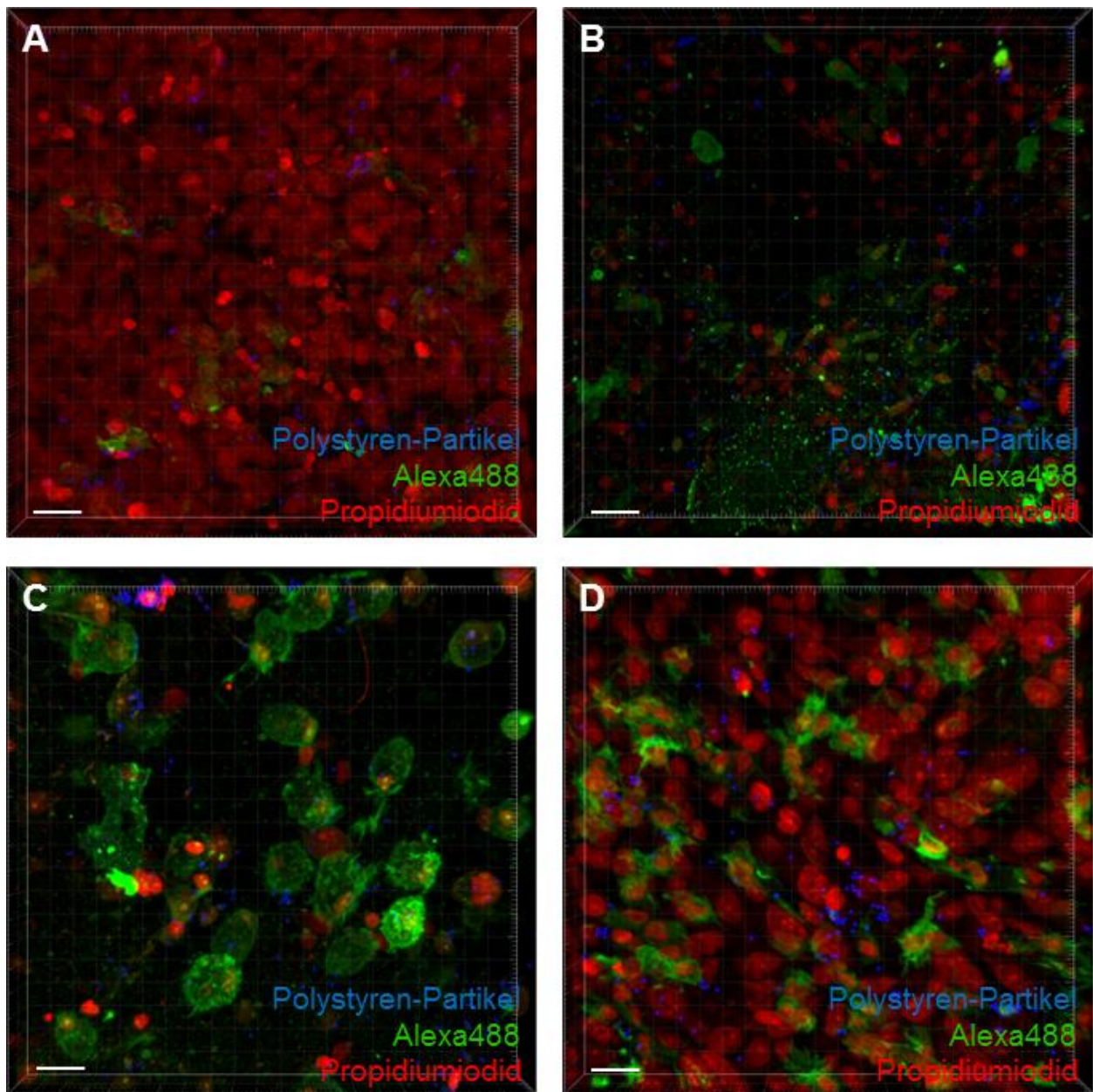
### 3.3. Ebenenbezogene Heterogenitätsstratifizierung der GBM-Proben

Die vorbeschriebene intratumorale Heterogenität des Glioblastoms war in beiden Experimenten sowohl mikroskopisch in Bezug auf die Glioblastomschnitte, als auch nach Rekonstruktion - wie vorbeschrieben – in Bezug auf die IBA1-positiven GAMs visuell nach Rekonstruktion auffallend (siehe Abbildung 10 und 11).



**Abbildung 10:** Repräsentative Darstellung der intratumoralen IBA1-Oberflächenheterogenität nach 3D-Rekonstruktion.

Beide Bilder (A, B) des Experiments 2 stammen aus unterschiedlichen Schnitten derselben Tumorprobe DM02052016 und wurden zuvor mit TMZ50 $\mu$ M behandelt. Während die GAMs in Bild A ein netzwerkartiges Geflecht dünner Zellausläufer bilden, formen die gliom-assoziierten Phagozyten in B phänotypisch makrophagenartige, amöboide Zellcluster. Weiße Skalierungsmarkierung: 20 $\mu$ m; Z-Stapel: 20 $\mu$ m



**Abbildung 11:** Intratumorale histopathologische Heterogenität.

Bild [A] und [B] stellen konfokale Stapelaufnahmen von Bildern zweier unterschiedlicher, jeweils mit Medium inkubierter Schnitte der Tumorseite DM02052016 des Experiments 2 dar. Bild [C] und [D] sind entsprechend zusammengehörige Aufnahmen ebenfalls nur mit Medium behandelte Schnitte der Tumorseite MSY20042016. Sowohl die Zellzahl, gemessen an den mit Propidiumiodid markierten Nuklei (rot), als auch die Anzahl der IBA1-positiven Zellen (Alexa488, grün markiert) und deren Morphologie divergieren zwischen den Schnitten sichtbar. Blau markiert sind die Polystyren-Partikel. Weiße Skalierungsmarkierung: 20µm; Z-Stapel: 20µm

Um auch statistisch der hierarchischen Datenstruktur gerecht zu werden und eine Einschätzung der Varianzabhängigkeit in Bezug zur Levelzugehörigkeit zu erlangen,

wurde für beide Experimente eine Mehrebenenanalyse über die Bestimmung der Intraklassenkorrelation (inter class correlation, ICC) durchgeführt. Die Einzelschritte beziehen sich dabei auf das vorbeschriebene Vorgehen von Aarts et al. und umfassten für beide Experimente eine Transformierung der Datenstruktur, die Standardisierung des Phagozytose-Index (z-Faktorenwert) vorbereitend zur Abschätzung der ICC (Aarts et al. 2015). Aufgrund der Datenstruktur mit zu geringer Cluster- und Bildwertanzahl war jedoch eine vollständige Mehrebenenanalyse nicht durchführbar, sodass nur die Berechnung eines limitierten Nullmodells erfolgen konnte.

### 3.3.1. Intraklassenkorrelation in Experiment 1

Experiment 1: SPSS-Schätzungen der Kovarianzparameter bezüglich der abhängigen Variable (z-Faktorwert des Phagozytose-Index)

Parameter	Schätzung	Standardfehler	Wald-Z	Berechnete ICC:
Residuum	.738617	.077992	9.470***	.727932408
Slice-ID (Level 2)	.205100	.073618	2.786**	.20213309
Sample-ID (Level 1)	.0700961	.054777	1.295	.069934501

**Abbildung 12:** Schätzung der levelabhängigen Kovarianzparameter bezüglich des standardisierten und testsubstanzstratifizierten z-Faktorwert des Phagozytose-Index mit Darstellung der berechneten Intraklassenkorrelation für Experiment 1 (inklusive 1\*).

Die Tumorebene, Level 1, ist hier als „sampleID“ beschriftet, wohingegen die Schnittebene, Level 2, mit „sliceID“ gekennzeichnet ist. Aus der berechneten SPSS-Schätzung der Kovarianzparameter wurde in die levelabhängige Intraklassenkorrelation (ICC) in Excel berechnet. Unter Residuum ist der Anteil der Varianz enthalten, welcher auf die Zugehörigkeit zur Bildebene sowie auf den Effekt der Testsubstanzen rekurriert.

Die Berechnung des Nullmodells für Experiment 1 (inklusive Experiment 1\*) basierte auf der Schätzung der Kovarianzparameter durch die SPSS-Software (siehe Abbildung 12). Dabei war der Anteil der Varianz der abhängigen Variable (z-Faktorwert des Phagozytose-Index), welcher auf Level 1 (Tumorebene) aufgeklärt wird, laut Wald-Z Statistik nicht signifikant verschieden von Null (s. Abb. 12). So konnte kein Effekt auf die abhängige Variable festgestellt werden. Die manuell in Excel berechnete Intraklassenkorrelation (ICC) wies für die Tumorebene (entspricht „sample ID“ in Abbildung 12) nur einen geringen Varianzanteil von etwa 7% (0.069) auf. Die Interpretation dieses Werts kann allerdings nur unter Beachtung der Schnitt- und

Bildebene betrachtet werden, deren Varianzsumme korrespondierend bei annähernd 93% liegt. Sowohl die anteilige Varianz, aufgeklärt auf Schnittebene („slice-ID“ in Abbildung 12) als auch auf der Ebene der Residuen, erwiesen sich dabei laut Wald-Z Statistik der SPSS-Schätzung als signifikant unterschiedlich von Null, sodass auf diesen beiden Ebenen ein großer Anteil der Varianz der abhängigen Variable erklärt wird (siehe Abbildung 12).

Der Großteil der Varianz ist auf Ebene der Schnitte („slice-ID in Abbildung 12) und der Residuen zu finden. Etwa 20 % (0.2021) der Gesamtvarianz fand sich auf Schnittebene (Level 2), wobei sich der größte Teil mit etwa 72.8% (0.7279) aus der Zugehörigkeit zu den Residuen ergab. Im Falle der Residuen bestehen diese aus der Kombination der Bildebene (Level 3), der durch die Testsubstanz entstandenen Varianz. Die Berechnung eines Nullmodells mit Differenzierung der Residuen in die Zugehörigkeit zu Level 3 (Bildebene) und dem residualen, stratifizierten Anteil bedingt durch die Testsubstanzbehandlung war aufgrund der Datenstruktur mit zu geringer n-Anzahl auf Bildebene pro Behandlungskondition nicht möglich.

### **3.3.2. Intraklassenkorrelation in Experiment 2**

Für Experiment 2 wurde analog zu Experiment 1 ein limitiertes Nullmodell berechnet. Aus der SPSS-Schätzung der Kovarianzparameter wurde für die abhängige Variable, dem standardisierten Phagozytose-Index, die Intraklassenkorrelation in Excel berechnet.

Für die SPSS-Schätzung der Kovarianzparameter war - im Gegensatz zu den anderen beiden Ebenen („Slice-ID“ und „Residuum“) – der Anteil der Varianz für die Tumorebene („Sample-ID“) laut Wald-Z Statistik nicht signifikant verschieden von Null und damit ohne wesentlichen Effekt auf die abhängige Variable (siehe auch Abbildung 13). Im Hinblick auf die berechnete Intraklassenkorrelation (ICC) teilte sich wie in Experiment 1 der geringste Anteil der Gesamtvarianz auf Level 1 auf, wohingegen mit ungefähr 28% (0.2844) Level 2 und mit 62.5% (0.6245) für Level 3 das Gros der Varianzvariabilität in der Schnittebene und den Residuen zu finden war (siehe Abbildung 13). Letztere bestehen wiederum - wie in Experiment 1 - aus einer Kombination von Bild- und Testsubstanzgruppenzugehörigkeit. Die Datenstruktur ermöglichte auch hier keine weitere Differenzierung des Effekts von Temozolomid in den verschiedenen Konzentrationen und den Effekt intratumoraler Heterogenität.



Experiment 2: SPSS-Schätzungen der Kovarianzparameter bezüglich der abhängigen Variable (z-Faktorwert des Phagozytose-Index)

Parameter	Schätzung	Standardfehler	Wald-Z	Berechnete ICC:
Residuum	.639556	.081604	7.837***	.624563357
Slice-ID (Level 2)	.291282	.090902	3.204**	.284453689
Sample-ID (Level 1)	.093167	.083958	1.110	.090982954

**Abbildung 13:** Schätzung der levelabhängigen Kovarianzparameter bezüglich des standardisierten und testsubstanzstratifizierten z-Faktorwert des Phagozytose-Index mit Darstellung der berechneten Intraklassenkorrelation für Experiment 2.

Die Kennzeichnung erfolgte analog zu Experiment 1, sodass die Tumorebene der Kennzeichnung „sampleID“ entspricht, die Schnittebene mit „sliceID“ gekennzeichnet und unter „Residuum“ die Bildebene und der Effekt der Testsubstanzen enthalten ist. Aus der berechneten SPSS-Schätzung der Kovarianzparameter wurde auch hier die levelabhängige Intraklassenkorrelation (ICC) in Excel berechnet.

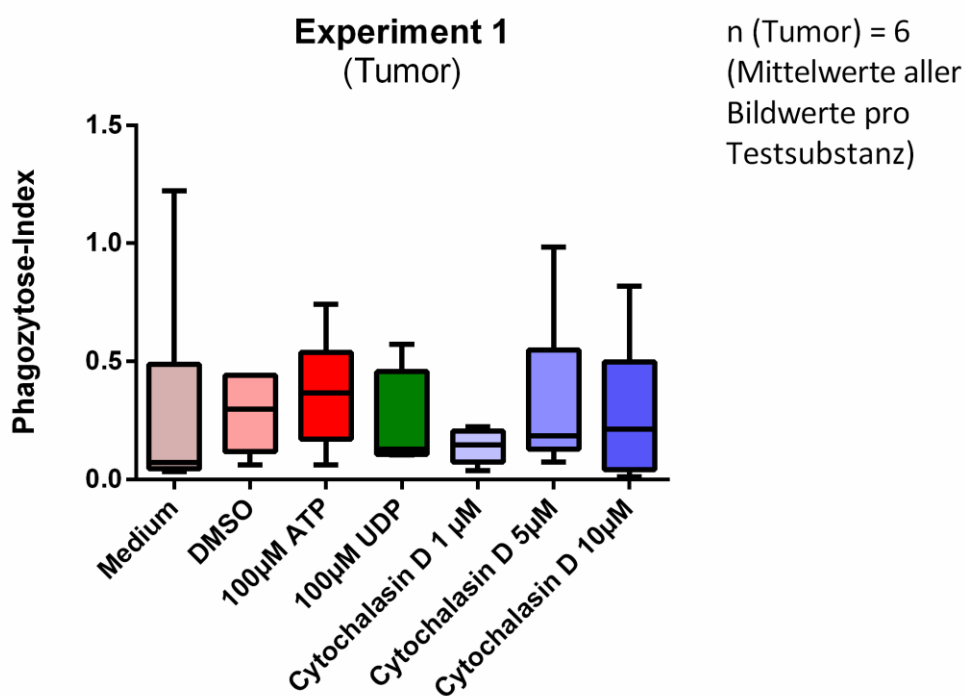
Aufgrund der großen ICC-Anteile innerhalb der Residuen, welche nicht weiter über das Modell differenziert werden können, sollte bei künftigen Experimenten dieser Art auf eine höhere Anzahl sowohl an Observationen auf Level-3 als auch an Tumorclustern geachtet werden (Aarts et al. 2015).

### 3.4. Analyse der Phagozytose-Aktivität

#### 3.4.1. Einfluss von ATP, UDP und Cytochalasin D auf die Phagozytose-Aktivität von GAMs

Um den Einfluss von 100µM ATP, 100µM UDP wie auch des vorbekannten Aktinpolymerisationsinhibitors Cytochalasin D auf die Phagozytose gliom-assoziiierter Mikroglia und Makrophagen im Glioblastomschnitt zu analysieren, wurden die Bildeinzelwerte der Phagozytose-Indices als Mittelwert pro Tumor und Testsubstanz zusammengefasst und mittels Kruskal-Wallis-Test und post-hoc Dunn's Test miteinander verglichen. Als Kontrollgruppe fungiert DMSO, wohingegen der Effekt von DMSO auf die Phagozytose im Vergleich zur Mediumkondition (HBSS) überprüft werden kann. Interessanterweise war mit einem mittleren Phagozytose-Index (Ph-I) von 0.24 (SD= 0.2) kein signifikanter Anstieg der Phagozytose nach Zugabe von 100µM UDP im Vergleich zu DMSO festzustellen, deren mittlerer Phagozytose-Index sich auf 0.28 (SD= 0.16) belief (siehe Abbildung 14). 100µM ATP beeinflusste ebenso die

Phagozytose-Rate der GAMs nicht signifikant (mittlerer Ph-I= 0.37; SD= 0.23), wie auch Cytochalasin D in den drei Konzentrationen keine signifikante Reduktion im Phagozytose-Index erkennen lässt (Cytochalasin 1 $\mu$ M: mittlerer Ph-I= 0.14, SD= 0.07; Cytochalasin D 5 $\mu$ M: mittlerer Ph-I= 0.33, SD= 0.34; Cytochalasin D 10 $\mu$ M: mittlerer Ph-I= 0.28, SD= 0.3). DMSO als Lösungsmittel zeigt den die Phagozytose verändernden Einfluss im Vergleich der mit HBSS behandelten Schnitte (mittlerer Ph-I= 0.28; SD= 0.47). Relativ gesehen wies Cytochalasin D 1 $\mu$ M die geringste Streubreite auf.

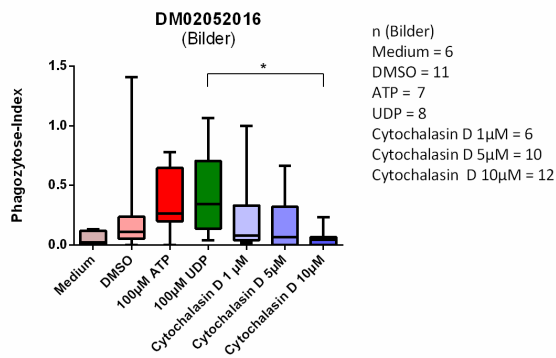
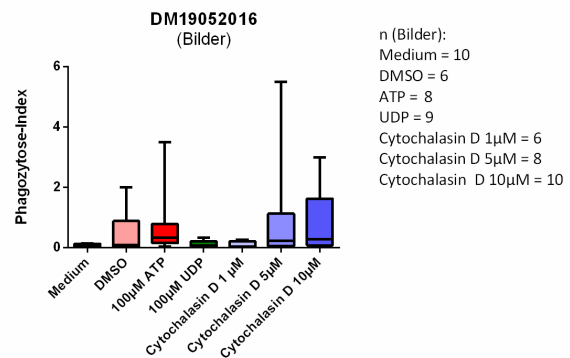
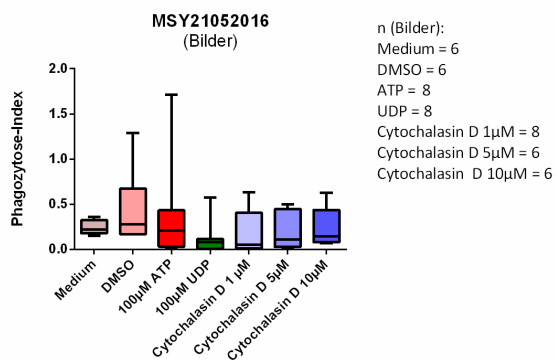
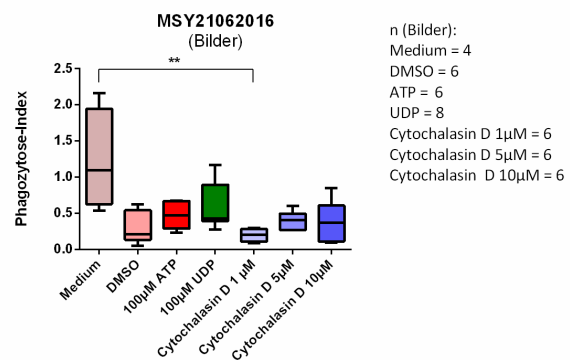
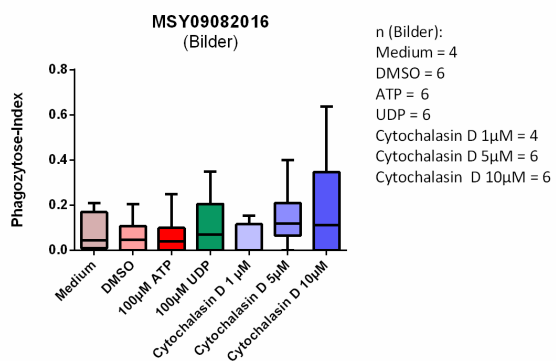
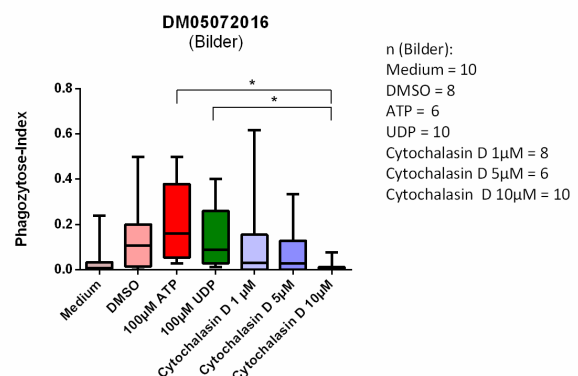


**Abbildung 14:** Abbildung des Phagozytose-Index gliom-assoziiierter Mikrogliazellen/Makrophagen nach 1h Inkubation mit ATP, UDP, DMSO und Cytochalasin D (1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M).

Nach Zugabe von DMSO, 100 $\mu$ M ATP, 100 $\mu$ M UDP, den Cytochalasin D-Konzentrationen 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M und 10 $\mu$ M zu den Glioblastomschnittkulturen lässt sich nach 3D-Rekonstruktion kein signifikanter Unterschied der Phagozytose-Aktivität im Vergleich zur Kontrollkondition DMSO feststellen. DMSO selbst beeinflusst die Phagozytose nicht signifikant im Vergleich zu HBSS (= Medium). Die Mittelwerte der Bilder pro Kondition und untersuchtem Tumor wurden mittels Kruskal-Wallis-Test mit post-hoc Dunn's Test bei einem Signifikanzniveau  $\alpha \leq .05$  verglichen. Darstellung als Boxplot-Diagramm mit Whisker von Minimum bis Maximum und Kennzeichnung des Medians.

In der Mittelwertbildung der Bilddaten zu einem unabhängigen Phagozytose-Index-Wert pro Tumor zur Berechnung der Effekte von ATP, UDP und Cytochalasin D auf die Phagozytose-Rate von GAMs findet auch gleichzeitig eine Reduktion der intertumoralen Heterogenität statt. Zur Visualisierung derselbigen sind nachfolgend in Abbildung 15 die Phagozytose-Indices von Level 3 (Bilder) des 1. Experiments aufgetragen. Obwohl die Prämisse der Unabhängigkeit innerhalb eines Tumors nicht gegeben ist, wurde dennoch die Darstellung und Auswertung in dieser Form in Abwägung des Informationsgewinnes der differenziellen Betrachtung intertumoraler Heterogenität der Phagozytose-Aktivität gewählt. Wie oben beschrieben war eine Berechnung mittels Mehrebenenanalyse durch die Bildanzahl limitiert. Mittels Kruskal-Wallis-Test und post-hoc Dunn's Test sind die Effekte auf Bildebene miteinander verglichen, jedoch aufgrund der Independenzverletzung beinhalten die Signifikanzen nur eingeschränkte Aussagekraft und es wird in der Beschreibung der Daten stärker auf die unterschiedlichen Reaktion der Phagozyten zwischen den Tumorproben eingegangen. Nähere Erwähnung finden bei erhöhtem Fehler 1. Art nur p-Werte  $\leq 0.01$ .

Innerhalb des ersten Tumors DM02052016 (A in Abbildung 15) reagierten Mikroglia/Makrophagen mit leicht erhöhter Phagozytose-Aktivität unter 100 $\mu$ M ATP (mittlerer Ph-I= 0.36; SD= 0.27) und 100 $\mu$ M UDP (mittlerer Ph-I= 0.42, SD= 0.35) im Vergleich zu DMSO (mittlerer Ph-I= 0.3, SD= 0.46), wohingegen Cytochalasin D (Cytochalasin D 1 $\mu$ M: mittlerer Ph-I= 0.22, SD= 0.38; Cytochalasin D 5 $\mu$ M: mittlerer Ph-I= 0.17, SD = 0.23; Cytochalasin D 10 $\mu$ M: mittlerer Ph-I= 0.05, SD= 0.07) eine geringfügig dosisabhängige, aber nicht signifikante Hemmung der Phagozytose-Raten zur Folge hatte. Ein annähernd inverses Bild von DM02052016 bietet die Tumorprobe DM19052016 (B in Abb. 15), in welcher Cytochalasin D 5 $\mu$ M (mittlerer Ph-I= 0.98, SD= 1.88) und 10 $\mu$ M (mittlerer Ph-I= 0.82, SD= 1.09) die höchsten mittleren Phagozytose-Indices aufweist und UDP 100 $\mu$ M deutlich darunter liegt (mittlerer Ph-I= 0.1, SD= 0.12).

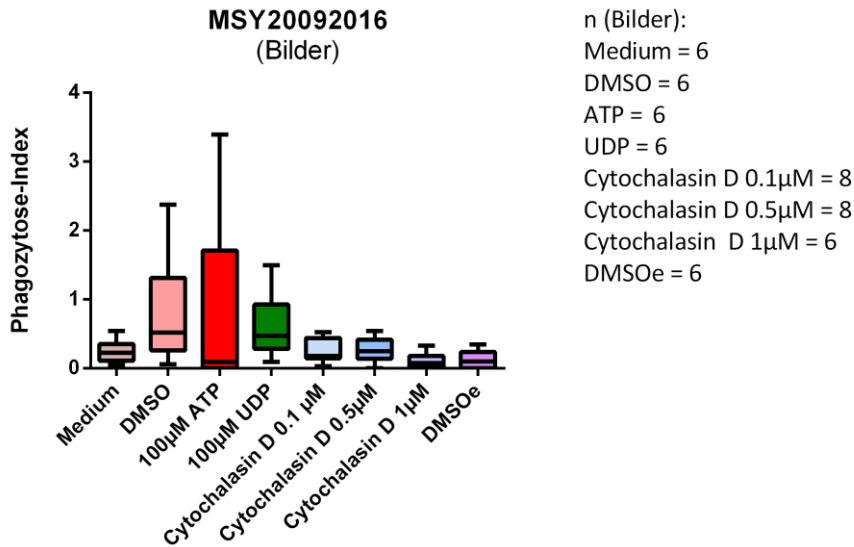
**A****B****C****D****E****F**

**Abbildung 15:** Darstellung der intertumoralen Heterogenität der Phagozytose-Aktivität in Experiment 1 bei Betrachtung der Bildebene für die einzelnen Tumorproben.

Mangels passender Datenstruktur zur Multilevel-Analyse und zur Abbildung der unterschiedlichen intertumoralen Phagozytose-Raten erfolgte die Auswertung der Einzelbildwerte der Phagozytose-Indices pro Tumor trotz verletzter Abhängigkeitsvoraussetzung mittels Kruskal-Wallis-Test mit post-hoc Dunn's Test. Die Signifikanzen sind aus diesem Grund aufgrund des höheren Fehlers 1. Art eingeschränkt zu

beurteilen (Aarts et al. 2015). Die n-Anzahl ist nebenstehend notiert. p-Werte finden nachfolgende Kennzeichnung:  $p \leq .05$  (\*),  $p \leq .01$  (\*\*). Darstellung der Werte mittels Boxplots mit Umfang der Whisker von Minimum bis Maximum und Markierung des Median.

Vergleichbar zu Tumor DM19052016 verhielt sich die Phagozytose-Rate innerhalb von Tumor MSY2105216 (C in Abb. 15) mit sehr niedrigen Indices von UDP 100 $\mu$ M (mittlerer Ph-I= 0.12, SD= 0.19), bei nicht wesentlich abweichenden mittleren Phagozytose-Indices der anderen Testkondition im Vergleich zu DMSO (mittlerer PI= 0.44, SD= 0.43). Unter dem Einfluss aller Testsubstanzen in Experiment 1 zeigte sich die Phagozytose-Aktivität in Tumor MSY21062106 (D in Abbildung 15) - allerdings bei geringer Bildzahl - niedriger als in der HBSS (Medium)- Kondition (mittlerer Ph-I= 1.22, SD= 0.7), sodass im Vergleich zu Cytochalasin D 1 $\mu$ M (mittlerer Ph-I= 0.2, SD= 0.09) ein signifikanter Unterschied  $p \leq 0.01$  besteht. Zwischen den anderen Konditionen bestanden keine signifikanten Unterschiede. Bei Tumor MSY09082016 hingegen reagierten GAMs bis auf eine Tendenz zu leicht höheren Phagozytose-Indices unter Cytochalasin D 5 $\mu$ M (mittlerer Ph-I= 0.15, SD= 0.13) und 10 $\mu$ M (mittlerer Ph-I= 0.19, SD= 0.25) bei annähernd blockierter Phagozytose durch 1 $\mu$ M Cytochalasin (mittlerer Ph-I= 0.04, SD = 0.08) nicht wesentlich unterschiedlich auf die verschiedenen, experimentellen Additive. 100 $\mu$ M ATP (mittlerer Ph-I= 0.21, SD= 0.18) erhöhte die Phagozytose-Raten tendenziell bei Tumor DM05072016, allerdings ohne Signifikanz zur Kontrolle zu erreichen, wohingegen die höchste Cytochalasin-Konzentration (mittlerer Ph-I= 0.01, SD= 0.03) die stärkste Inhibition der Phagozytose in dieser Tumorprobe erreichte. Bemerkenswert ist das differentielle phagozytierende Antwortverhalten über alle Tumorproben hinweg.

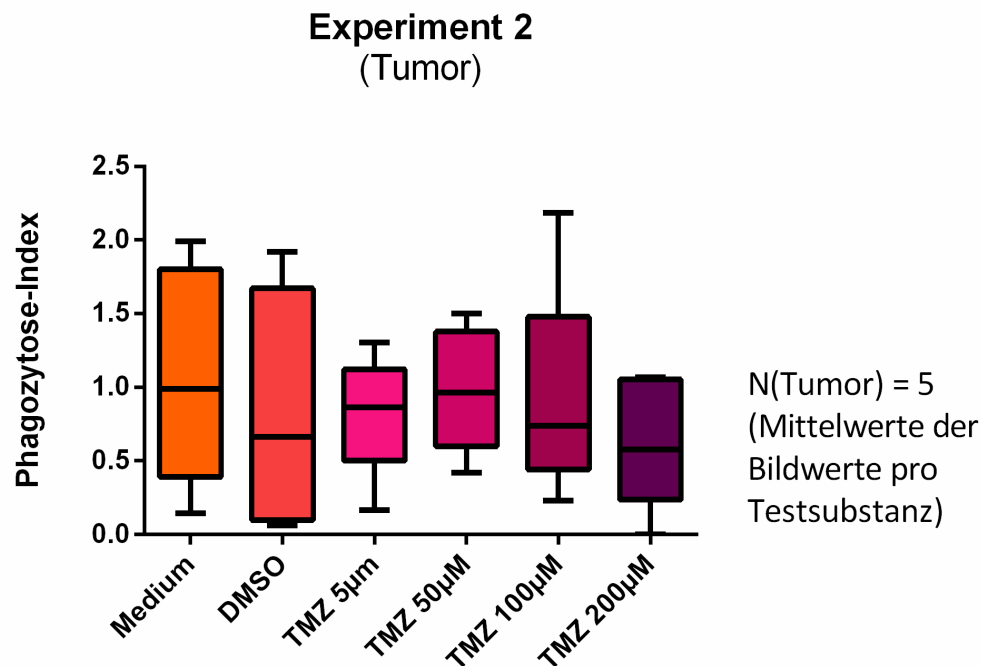


**Abbildung 16: Darstellung des Phagozytose-Index bei modifizierten Negativkontrollen in Experiment 1\*.**

Test des Einflusses modifizierter Negativkontrollen in Form geringerer Cytochalasin D-Konzentrationen (0.1µM, 0.5µM) sowie eisgekühlter DMSO-Schnitte auf die Phagozytose-Rate (Bildebene, Level 3). Innerhalb der Tumorprobe sind keine signifikanten Veränderungen in der Phagozytose-Aktivität im Vergleich zu DMSO festzustellen, unter Cytochalasin D 1µM und eisgekühltem DMSO sind in der Tendenz die Phagozyten am stärksten inhibiert. Darstellung der Werte mittels Boxplots mit Umfang der Whisker von Minimum bis Maximum und Markierung des Median, n-Werte nebenstehend.

Aufgrund der nur teilweisen Wirksamkeit von Cytochalasin D als Negativkontrolle wurde für Experiment 1\* diese modifiziert, indem geringere Konzentrationen von Cytochalasin D (0.1µM, 0.5µM) und eisgekühltes DMSO probatorisch verwendet wurde (siehe Abbildung 16). Die niedrigsten, aber nicht signifikanten, mittleren Phagozytose-Werte fanden sich dabei mit 1µM Cytochalasin D (mittlerer Ph-I= 0.11, SD= 0.12) und eisgekühltem DMSO (mittlerer Ph-I=0.13, SD= 0.13). Weder die Zugabe von ATP 100µM (mittlerer Ph-I= 0.79, SD= 1.35) noch UDP 100µM (mittlerer Ph-I= 0.6, SD= 0.49) veränderte die Phagozytose-Aktivität der GAMs innerhalb dieses Tumors signifikant.

### 3.4.2. Phagozytose von GAMs nach Temozolomid-Inkubation



**Abbildung 17:** Darstellung des Phagozytose-Index gemittelter Bildwerte pro Tumor nach 72-stündiger Inkubationszeit von Temozolomid in verschiedenen Konzentrationen.

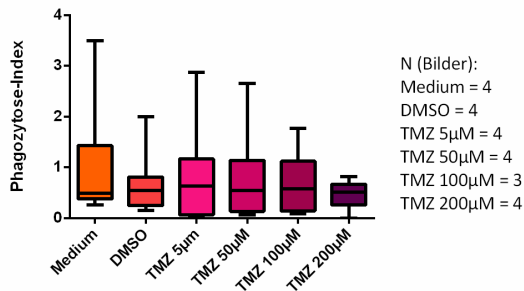
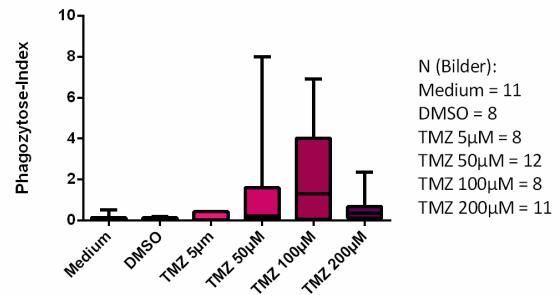
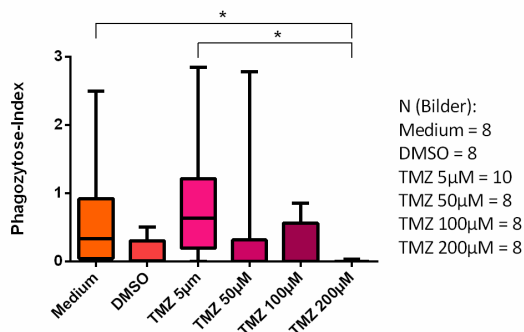
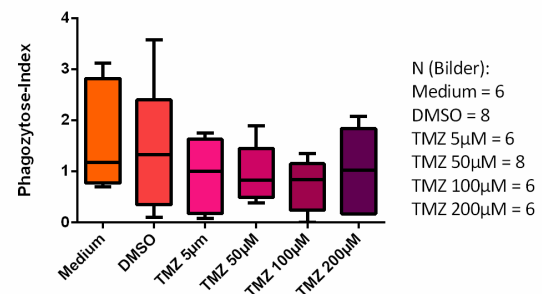
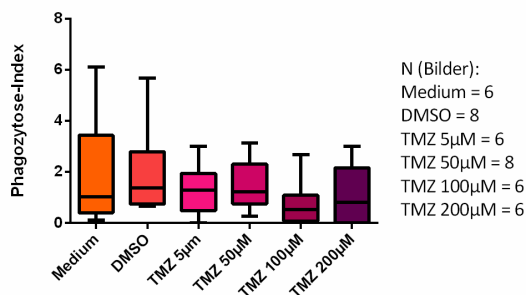
Nach Färbung der Schnitte wurden mittels Konfokalmikroskopie mindestens zwei Bilder pro Tumorschnitt aufgenommen, der Phagozytose-Index pro Bild nach dreidimensionaler Rekonstruktion berechnet, für jede Kondition und Tumor ein Mittelwert der Level-3-Bilddaten gebildet und diese mittels Kruskal-Wallis und post-hoc Dunn's Test miteinander verglichen. Temozolomid hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Phagozytose-Rate von gliom-assoziierten Mikroglia und Makrophagen in den Konzentrationen 5-200µM. DMSO selbst veränderte im Vergleich zu Medium 2 (Medium) den Phagozytose-Index ebenfalls nicht signifikant. Visualisierung mittels Box-Plot, deren Whisker eine Abdeckung der Maximalwerte beschreibt. n-Werte sind nebenstehend, Signifikanzniveau  $\alpha \leq .05$ .

Zur Überprüfung der Hypothese einer gesteigerten Phagozytose-Rate, bedingt durch einen chemotherapeutisch evozierten, verstärkten Zelltod der Tumorzellen im Glioblastomschnitt durch das klinisch eingesetzte Alkylans Temozolomid, wurde nach 72-stündiger Inkubation mit dem Chemotherapeutikum der Assay begonnen. Die erfassten Bildwerte wurden gemittelt und zu einem Wert pro Tumor zusammengefasst, sodass Unabhängigkeit im Vergleich zwischen den Tumorproben für die Auswertung

mittels Kruskal-Wallis-Test und post-hoc Dunn's Testung gegeben war. In Zusammenschau der Ergebnisse beeinflusste Temozolomid in den Konzentrationen zwischen 5-200 $\mu$ M die Phagozytose der assoziierten IBA1-positiven Zellen nicht signifikant (siehe Abbildung 17). Durch DMSO (mittlerer Ph-I= 0.84, SD = 0.81) wiesen GAMs eine geringfügig geringere phagozytierende Aktivität auf, als unter Medium 2 (Medium: mittlerer Ph-I= 1.08, SD = 0.74). Ein geringfügig angestiegenen Phagozytose-Quotient im Vergleich zu DMSO verzeichnete TMZ 50 $\mu$ M (mittlerer Ph-I= 0.98, SD= 0.42), wohingegen TMZ 200 $\mu$ M (mittlerer Ph-I= 0.63, SD= 0.44) die geringste mittlere Partikelaufnahme bedingte. Alle Ergebnisse bleiben allerdings unter Signifikanzniveau, sodass zusammenfassend Temozolomid die Phagozytose von GAMs innerhalb der untersuchten Gewebematrix nicht zu beeinflussen schien.

Wie in Experiment 1 maskiert die Mittelwertbildung zu einem gemitteltem Phagozytose-Index-Wert pro Tumor und Kondition jedoch die darunterliegende Bildebene, deren Betrachtung die intertumorale, funktionelle Heterogenität der Partikelaufnahme von GAMs nach Behandlung mit dem Chemotherapeutikum aufzeigt. Aus diesem Grund sind in Abbildung 18 die Bildwerte der jeweiligen Konzentration von Temozolomid für jeden Tumor einzeln aufgelistet. Im Vergleich der Einzeltumoren für die Kontrollgruppe DMSO, war die mittlere Phagozytose-Aktivität nicht konstant. So war in MSY20042016 (A in Abbildung 18; DMSO: mittlerer Ph-I= 0.66, SD = 0.59), aber auch in MSY05082016 (D in Abbildung 18; DMSO: mittlerer Ph-I= 1.42, SD = 1.2) diese nachweisbar, jedoch z.B. in DM02052016 (B in Abbildung 18; DMSO: mittlerer Ph-I= 0.06, SD = 0.07) fast nicht vorhanden. Während im erstgenanntem GBM unter allen Konzentrationen des Alkylans ähnlich hohe mittlere Phagozytose-Indices vorlagen (A in Abb. 18; TMZ 5 $\mu$ M: mittlerer Ph-I= 0.84, SD = 0.94; TMZ 50 $\mu$ M: mittlerer Ph-I= 0.78, SD = 0.82; TMZ 100 $\mu$ M: mittlerer Ph-I= 0.65, SD = 0.62; TMZ 200 $\mu$ M: mittlerer Ph-I= 0.47, SD = 0.27), bewirkte TMZ 100 $\mu$ M in DM02052016 einen relativen, wenn auch nicht signifikanten Anstieg der mittleren Phagozytoserate der GAMs im Vergleich zur Kontrolle (B in Abbildung 18; TMZ 100 $\mu$ M: mittlerer Ph-I= 2.18, SD = 2.54 vs. DMSO: mittlerer Ph-I= 0.06, SD = 0.07;  $p= 0.15$ ).



**A****MSY20042016**  
(Bilder)**B****DM02052016**  
(Bilder)**C****DM19052016**  
(Bilder)**D****MSY05082016**  
(Bilder)**E****DM05072016**  
(Bilder)

**Abbildung 18:** Funktionelle intertumorale Heterogenität der Phagozytose-Aktivität von GAMs nach 72h Inkubation mit TMZ 5-200µM.

In der Betrachtung von Level-3 des Experiments 2 (Bildebene) ist - analog zu Experiment 1- aufgrund der zu geringen Bilddatenzahl pro Cluster keine Analyse durch ein hierarchisch lineares Modell möglich, sodass wiederum auf eine Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test zurückgegriffen worden ist. In der

Nichtbeachtung der Abhängigkeit der Bilddaten ergibt sich ein steigender Fehler 1. Art, der für den Informationsgewinn im Vergleich zur Mittelwertbildung in Kauf genommen wurde. Die n-Anzahl ist rechtsseitig angefügt, p-Werte unterhalb des Signifikanzniveaus  $\alpha \leq .05$  sind nachfolgend markiert:  $p \leq .05$  (\*). Graphische Abbildung der Daten als Boxplot mit min-to-max. Umfang der jeweiligen Whisker. Für keinen der Tumoren [A-E] ergab sich ein signifikanter Einfluss auf die Phagozytose-Rate der GAMs durch Temozolomid im Vergleich zur Kontrolle DMSO. Allerdings erschien das phagozytäre Antwortverhalten auf das Chemotherapeutikum von der individuellen Tumorzugehörigkeit unterschiedlich. So war ein Anstieg der Phagozytose unter TMZ 100 $\mu$ M in [B] nachweisbar, wohingegen in [A] keine der Konditionen durch TMZ verändert schien.

Eine weitere Konzentrationserhöhung auf TMZ 200 $\mu$ M zu den Schnitten in DM02052016 führte zu keiner weiteren Erhöhung der durchschnittlichen Partikelaufnahme pro Zelle (B in Abb. 18; TMZ 200 $\mu$ M: mittlerer Ph-I= 0.58, SD= 0.69). Innerhalb von DM19052016 wiederum fand sich der höchste relative Phagozytose-Index nach 72h-Einwirkzeit von Temozolomid 5 $\mu$ M (C in Abbildung 18; mittlerer Ph-I= 0.87, SD =0.95) bei kaum detektierbarer mittlerer Partikelaufnahme unter TMZ 200 $\mu$ M (mittlerer Ph-I= 0, SD =0.01). Innerhalb von MSY05082016 und DM05072016 ließen sich, wie in D und E in Abbildung 18 zu sehen, keine bemerkenswerten relativen Veränderungen der Phagozytose-Rate durch das Chemotherapeutikum ausmachen. Weder in DM19052016 noch in allen anderen Tumoren hatte Temozolomid einen signifikanten Einfluss auf die Phagozytose-Rate von GAMs in Relation zu DMSO (niedrigster p-Wert im Vergleich von Kontrolle zu verschiedenen TMZ-Konzentrationen (B in Abb. 18; DM02052016 TMZ200 $\mu$ M vs DMSO  $p= 0.11$ )).

Die funktionelle Heterogenität in Bezug auf die Phagozytose von GAMs war somit auch in Experiment 2 wesentlich.

## 4. Diskussion

### 4.1. Zusammenfassung

Trotz vieler Erkenntnisse über die zentrale Rolle von GAMs für die Tumorbilogie des Glioblastoms bleibt die genaue Bedeutung einer der Schlüsselfunktionen der Mikrogliazelle, der Phagozytose, innerhalb des Tumors bis heute ungeklärt. Jedoch zeigt sich im Tiermodell eine wesentliche Bedeutung der Phagozytose sowohl für Tumorwachstum als auch für die Metastasierung und damit für das Überleben, wie am Beispiel des auf Tumorzellen überexprimierten „don't eat me“-Signals CD47 gezeigt werden konnte (Willingham et al. 2012). Während für Tier- und Zellkulturmodelle einige Daten vorliegen, existieren nur wenige Studien mit menschlichem Tumorgewebe zur Erforschung intratumoraler Phagozytoseprozesse.

In dieser Arbeit wurde erstmalig ein funktionelles Modell etabliert, welches erlaubt, die Phagozytose-Aktivität von GAMs mittels humaner, organotypischer Schnittkulturen des Tumors und anschließender 3D-Rekonstruktion zu untersuchen. Wie auch in histopathologischen Studien humaner Glioblastom-assoziiierter IBA1-positiver Zellen wurden innerhalb einer Tumorprobe sowohl amöboide als auch ramifizierte, netzwerkartige Zellmorphologien der GAMs in den Schnittkulturen aufgefunden und analysiert (siehe auch Abbildung 10) (Kvisten et al. 2019).

Neben dem Effekt der Nukleotide ATP, UDP und des Aktinpolymerisationsinhibitors Cytochalasin D, wurde auch die Wirkung des klinisch eingesetzten Chemotherapeutikums Temozolomid auf die Phagozytose von Mikrogliazellen und Makrophagen bestimmt.

Dabei wurden innerhalb der 350µM dicken Tumorschnitte vornehmlich oberflächliche Phagozytose-Ereignisse (von Experiment 1 und Experiment 2) analysiert, bedingt über die mittlere Eindringtiefe der Mikrosphären von etwa 6µm in das Gewebe. Keine der überprüften Substanzgruppen hatte einen signifikanten Effekt auf die Permeabilität der Polystyren-Mikrosphären (siehe Abb. 9). In Experiment 1 wies weder 100µM ATP noch 100µM UDP einen signifikanten Effekt auf die mittlere Phagozytose-Rate von GAMs auf. Überraschenderweise hatte selbst Cytochalasin D keine signifikant inhibitorische Wirkung.

Aus diesem Grund wurden probatorisch innerhalb einer Tumorprobe niedrigere Cytochalasin D-Konzentrationen 0.1µM, 0.5µM sowie die Kühlung mit Eis als mögliche Negativkontrolle gewählt (Experiment 1\*). 1µM Cytochalasin D und eisgekühltes DMSO

wies dabei die stärkste Hemmung auf die Phagozytose auf. Eine weiterführende statistische Aussage über die Wirkung der geringeren Konzentrationen und der Eiskühlung innerhalb nur einer Tumorprobe ist nicht möglich.

Die 72-stündige Inkubation des Chemotherapeutikums Temozolomid in den Konzentrationen zwischen 5-200 $\mu$ M beeinflusste die Phagozytose-Aktivität gliom-assoziiierter Mikroglia/Makrophagen nicht signifikant.

Für beide Experimente (Experiment 1 und 2) fiel eine bemerkenswerte intertumorale Heterogenität der Phagozytose-Aktivität als Reaktion auf verschiedene Testsubstanzen auf. Zusammenfassend empfiehlt sich für zukünftige Phagozytose-Assays dieser Methodik aufgrund der stark variablen inter- und intratumoralen Heterogenität sowie der hierarchischen Datenstruktur in Tumor-, Schnitt- und Bildebene eine höhere n-Anzahl insbesondere der erst- und letztgenannten Ebene. In dieser Arbeit war dies aufgrund operationaler Faktoren, wie z.B. der Abhängigkeit von der Operationszahl und der Menge an genügend Tumorgewebe pro Tumorprobe leider nicht weiter möglich.

#### **4.2. Methodik und Limitationen**

Die experimentelle Phagozytosebestimmung von GAMs wird oft mittels 2D-Zell-Kokulturen durchgeführt, welche zwar die zu untersuchenden Zellen homogen nutritiv versorgen lassen, aber beispielsweise den funktionellen Effekt abgestorbener Zellen im Zellverband auf die zu untersuchende Zellentität außer Acht lassen (Edmondson et al. 2014). Im Hinblick auf eine in-vitro herbeigeführte Kokultur zwischen Gliomzellen und Immunzellen scheint die Bestimmung der Kokulturzeit von Mikroglia/Makrophagen mit Gliomzellen ebenfalls einen kritischen Punkt für die Bestimmung der Phagozytoserate darzustellen, wie sich in Studien mit diesem Ansatz andeutet (Voisin et al. 2010; Zhai et al. 2011). Ein konstanter Einfluss der Gliomzellen auf die phagozytierenden Immunzellen innerhalb von Schnittkulturen dürfte somit andere Ergebnisse liefern als Zellkulturexperimente, in denen die Dauer der Interaktion zwischen maligner Zelle und Phagozyt dem experimentellen Protokoll unterliegt. Auch der Gewebsverband selbst dürfte sich auf die Phagozytose-Rate auswirken. So legen Ergebnisse von Untersuchungen humaner phagozytärer Immunzellen eine Beeinflussung der Phagozytose durch extrazelluläre Matrixproteine nahe (Brown 1986). Eine konstante Umgebung zur organotypischen Extrazellulärmatrix bieten die hier verwendeten Schnittkulturen und erweisen sich somit als wichtiges präklinisches Testsystem,

welches wesentliche Tumoreigenschaften des Glioblastoms abbildet und auch viele der oben genannten Limitationen anderer Modelle überwindet (Merz et al. 2013; Diaz-Aparicio et al. 2016). Aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen starken intratumoralen Heterogenität der Tumorproben und der Tatsache mehrerer chirurgischer Entnahmeorte (Helios Klinikum Berlin-Buch, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein) dürfte bei mehreren beteiligten operierenden Personen durch die individuell abhängige Selektion einer experimentell-geeigneten Gewebeprobe ein potentieller Confounder resultieren. Der genaue tumorinterne Entnahmeort dürfte jedoch eine wichtige Rolle spielen, da sich myeloide Zellen aus Tumorkern und -peripherie transkriptionell unterscheiden lassen. So können Makrophagen häufiger im Tumorkern und Mikroglia eher peripher vorgefunden werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass antiinflammatorische Marker vermehrt im Tumorkern und myeloide proinflammatorische Zellen präferentiell stärker in der Peripherie eines GBMs vorliegen. Diese Differenzierung suggeriert ebenfalls eine funktionelle Konsequenz für die genannten Immunzellen (Darmanis et al. 2017).

Der zeitliche Versatz zwischen Probeentnahme und der experimentellen Prozessierung könnte sich zudem auf die Funktionalität der GAMs auswirken und eine Teilursache für deren geringe phagozytäre Reaktivität auf z.B. UDP oder Temozolomid darstellen.

Da in der vorliegenden Arbeit zufallsbedingt nur Gewebe von männlichen Patienten verwendet wurde, ergibt sich hierdurch ein Bias, der sich auch funktionell auswirken dürfte, zumal tierexperimentelle Daten geschlechtsspezifische Unterschiede in der Phagozytosekapazität von Mikroglia nahelegen (Yanguas-Casás et al. 2018).

Einer der wesentlichen Limitationen der Ergebnisinterpretation ist der fehlende Vergleich der Phagozytose-Raten der GAMs mit Vergleichsproben aus gesundem Hirngewebe. In einigen Studien wurde hierzu dem Glioblastom jeweilig benachbartes Gewebe als Kontrolle genutzt (Willingham et al. 2012). Da jedoch einige Tumorzellen auch entfernt des Primarius histologisch und makroskopisch verborgen vorliegen können und auch die kontralaterale Hemisphäre von GlioblastompatientInnen durch das funktionelle, multizelluläre Tumornetzwerk verändert sind, verbleibt jedoch die Naivität der Mikrogliazellen/Makrophagen innerhalb von GliompatientInnen fraglich (Sahm et al. 2012; Osswald et al. 2015). Der Mangel an geeignetem Kontrollgewebe in der Hirntumorforschung wird deshalb oftmals durch Epilepsiegewebe zu überbrücken versucht. (Glass und Synowitz 2014). Allerdings liegen Hinweise einer funktionellen Phagozytosestörung von Mikroglia bei Epilepsie vor, sodass die durch dieses Gewebe

gewonnenen Ergebnisse nur schwer als „normale“ Kontrolle zu interpretieren sein dürften (Abiega et al. 2016). Obwohl organotypische Modelle - wie bereits beschrieben - besser als 2D-Kulturen die in-vivo Situation abbilden dürften, verbleiben dennoch in dieser Arbeit wesentliche experimentelle Limitationen, welche die Interpretation und Translation gewonnener Erkenntnisse erschweren.

So entsteht durch Zugabe von nicht zu zersetzenden Polystyren-Partikeln in Kombination mit fetalem Kälberserum zur erleichterten Aufnahme, z. B. über Oponierung mittels Komplementfaktoren eine künstliche Umgebung, welcher GAMs in-vivo nicht ausgesetzt sind (Diaz-Aparicio et al. 2016; Sierra et al. 2013). Aufgrund mangelnder stabiler Färbetechniken für die heterogenen Primärtumorzellen, wurde dennoch auf letztgenannte zurückgegriffen, obwohl bekannt ist, dass die rezeptorvermittelte Phagozytose von Polystyren-Partikeln durch Mikrogliazellen darüber hinaus andere Rezeptoren als beispielsweise bei Phagozytose von apoptotischem Zellmaterial involvieren dürfte (Sierra et al. 2013). Eine Schwierigkeit von Polystyren-Mikrosphären zur Bestimmung von Phagozytose war seit langem die Unterscheidung zwischen aufgenommenen und der Zellmembran eng anliegenden Partikeln (Větvicka und Fornůsek 1987). Hinsichtlich dieser lang bestehenden Problematik liegt eine Stärke in der beschriebenen Auswertungsmethode dieser Studie, da mittels 3D-Rekonstruktion konfokaler Schnittbildstapelbilder die Diskriminierung zwischen zellextern und -intern gelegenen Polystyren-Partikeln deutlich erleichtert wird.

Obwohl in der Auswertung mittels Imaris ein Großteil der methodischen Schritte konstant gehalten werden konnte, ergab sich dennoch aus der sehr variablen Färbungsqualität und der daraus resultierenden Bildqualität die Notwendigkeit manueller Korrekturen bei offensichtlich fehlerhafter Bilderkennung. Da diese jedoch bei allen Konditionen und unter Verblindung der auswertenden Person stattfanden, dürfte sich der daraus resultierende Bias geringhalten. Dennoch wäre es von Vorteil in künftigen Arbeiten mittels verbesserter Färbetechniken, diese Problematik überwinden zu können.

Um auch statistisch die bemerkenswerte intra- und intertumorale Heterogenität des Glioblastoms abzubilden sowie aufgrund des geschachtelten, ebenenunterteilten Datensatzes wurde in dieser Arbeit versucht, mittels Mehrebenenanalyse eine Methode zur Auswertung für Phagozytosedaten mit derartigem Aufbau durchzuführen. In beiden Experimenten konnte zwar der größte Teil der Varianzheterogenität auf Ebene der Residuen ausgemacht werden, allerdings aufgrund der zu geringen Observationszahl

(Bildebene) keine weitere Differenzierung in den Behandlungseffekt und den Teil aus der Bildzugehörigkeit resultierenden Teil vorgenommen werden. Die statistische Auswertung von Experimenten mit vergleichbarem Aufbau sollte aus diesem Grund ein höheres n anstreben, um das statistische Modell stabil durchführen zu können (Aarts et al. 2015).

#### **4.3. Experiment 1: Kein Effekt von ATP, UDP und Cytochalasin D auf die Phagozytose-Aktivität von GAMs**

Überraschenderweise zeigte sich in Experiment 1 auf Tumorebene (Abbildung 14) keine signifikante Änderung der Phagozytose-Aktivität von GAMs durch 100µM UDP, obwohl bei tumorunabhängigen Mikroglia aus Ratten eine stimulierende Wirkung von 100µM UDP über den P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor auf die Aufnahme von Latexpartikeln gezeigt wurde (Koizumi et al. 2007). Allerdings weist die zitierte Studie von Koizumi et al. einige methodische Unterschiede zur vorliegenden Arbeit auf, sodass die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar sind, da in der zitierten Studie Mikroglia von Ratten zu Verwendung kamen, sodass auch hier ein Speziesunterschied zu dieser Arbeit vorliegt. Des Weiteren betrug die Inkubationszeit der Mikroglia mit 100µM UDP bei Koizumi et al. nur 20 Minuten, es wurden etwas kleinere 1µM große Latexpartikeln verwendet und die Studie wurde unabhängig von einem tumorspezifischen Mikromilieu durchgeführt. Zum Beispiel die Partikelgröße scheint dabei die Zahl phagozytierter Partikel zu beeinflussen (Champion et al. 2008). Eine weitere Erklärung wäre eine veränderte Rezeptorexpression des P2Y<sub>6</sub> Rezeptors der Mikroglia in der Umgebung des Glioblastoms. So findet sich in einer RNA-Sequenzierung von humanen GAMs im Vergleich zu nicht-tumorentstammenden Mikroglia/Makrophagen das Gen des P2Y<sub>6</sub>-Rezeptors nicht unter den 334 signifikant veränderten ( $\geq 2$  fach) Genen (Szulzewsky et al. 2016). Auf mRNA Ebene scheint somit im Gegensatz zu murinen Glioblastommodellen der Rezeptor in humanen GAMs nicht signifikant erhöht zu sein (Szulzewsky et al. 2015). Dies könnte darauf hindeuten, dass unter dem Einfluss humaner Glioblastomzellen Phagozytoseprozesse - vermittelt über den mikroglialen P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor - eine untergeordnete Rolle spielen. Jedoch verbleibt dies aufgrund der mangelnden Datenlage und aufgrund methodischer Differenzen zwischen den beiden genannten Studien hypothetisch. Zur weiteren Bestätigung der Ergebnisse bestünde

beispielsweise die Möglichkeit in Zellkulturexperimenten den Effekt von UDP auf die mikrogliale Phagozytose nach Behandlung mit GCM zu überprüfen.

Extrazelluläres ATP, unter anderem Hinweissignal für Mikroglia auf apoptotisches Zellmaterial im Gehirn, ist gradientenabhängig sowohl bei Chemotaxis, als auch bei der Phagozytose von Mikroglia beteiligt (Di Virgilio et al. 2009). Besonders mikrograduelle Unterschiede scheinen dabei als „Find-me“ Signal zur Beseitigung abgestorbener Zellen zu wirken, wohingegen weitverteilte hohe ATP-Konzentrationen die phagozytische Detektionsfähigkeit hemmen (Abiega et al. 2016). Obwohl in der zitierten Studie die Aufnahme apoptotischen Materials durch Mikroglia in Epilepsiemodellen untersucht wurden und keine Latexpartikel verwendet wurden, ist es gut denkbar, dass ähnliche Mechanismen im Falle von Glioblastomen eine Rolle spielen. Allgemein ist eine intratumoral erhöhte extrazelluläre ATP-Konzentration bei malignen Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe bekannt, welche auch durch die geringe hydrolytische Degradationsaktivität von ATP durch Gliomzellen bedingt sein dürfte (Di Virgilio 2012; Wink et al. 2003). In dieser Arbeit beeinflusste die Zugabe von 100µM ATP zu GAMs in organotypischen Schnittkulturen die mittlere Aufnahme von Latexpartikeln pro Zelle nicht signifikant. Wie bei Abiega 2016 diskutiert, könnte der Effekt von zusätzlichen 100µM ATP innerhalb generell erhöhter ATP-Konzentrationen im Tumorschnitt ihre signalgebende Wirkung auf GAMs verloren haben. In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der experimentellen Gewinnung der organotypischen GBM-Schnitte das Tumorgewebe an den Schnitträndern geschädigt und die Phagozytose randständig analysiert (siehe Abb. 9), sodass auch eine Beeinflussung der Ergebnisse durch freigesetzte Nukleotide aus dem Zytosol dieser verletzter Zellen vorstellbar ist (Di Virgilio et al. 2009).

Da allerdings innerhalb der hier untersuchten Glioblastomschnittkulturen die primär vorliegende, extrazelluläre Nukleotidkonzentration von UDP oder ATP an unbehandelten Schnitten nicht weiter bestimmt wurde, verbleibt diese Annahme hypothetisch. Um dies zu vermeiden, könnte zukünftig der Versuch unternommen werden, die ATP-Konzentration in der Schnittkultur zu bestimmen, um einen Hinweis auf das generell vorliegende „ATP-Niveau“ zu bekommen. Insgesamt liegen widersprüchliche Daten zum Effekt von 100µM ATP auf Mikroglia oder Makrophagen vor, da in Makrophagen einerseits eine Erhöhung der Phagozytose-Aktivität gezeigt wurde, wohingegen in der mikroglialen Zelllinie BV2 keine Veränderung im Vergleich

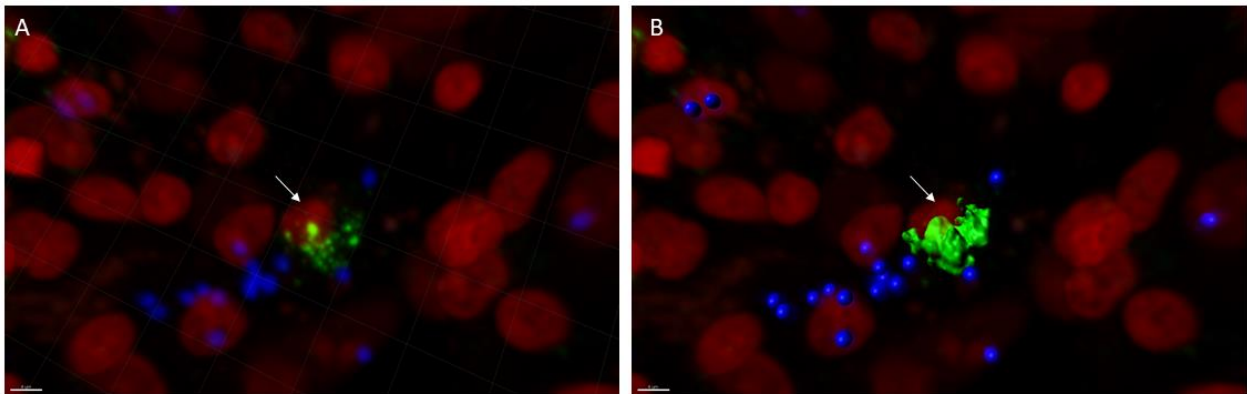


zur Kontrolle festzustellen war (Marques-da-Silva et al. 2011; Hassan et al. 2014). Ein Teil der unterschiedlichen Ergebnisse dürfte wiederum methodische Ursachen haben, bedingt über die unterschiedliche Zellgewinnung (primäre peritoneale Makrophagen versus mikrogliale Zelllinie), der unterschiedlichen Bestimmung der Phagozytose (durchflusszytometrisch versus konfokalmikroskopisch) und der unterschiedlichen Inkubationszeit (30min versus 2h). Eine differenziertere Analyse mit Testung verschiedener Inkubationszeiten auch in der Schnittkulturen dürfte dabei mehr Hinweise auf die Wirkung von ATP in der organotypischen GBM-Kultur liefern.

#### 4.3.1. Cytochalasin D-Wirkung auf GAMs im GBM-Tumormilieu

Cytochalasin D, in vielen Studien als Negativkontrolle für mikrogliale Phagozytose verwendet (Hassan et al. 2014; Marques-da-Silva et al. 2011), inhibierte die Phagozytose in Experiment 1 überraschenderweise nicht signifikant (siehe auch Abbildung 14). Obwohl sich tendenziell eine niedrigere Phagozytose-Rate unter 1 $\mu$ M Cytochalasin D im Vergleich zu DMSO abzeichnete, zeigte sich für alle Tumoren gemittelt weder ein statistisch signifikanter Effekt noch eine dosisabhängige stärkere Inhibierung der Phagozytose-Rate unter den höheren Cytochalasin-Konzentrationen 5 $\mu$ M und 10 $\mu$ M. Bei Einzelbetrachtung der Tumoren deutete sich zwar eine Dosisabhängigkeit an (siehe Abbildung 15A und 15F), allerdings für die Gesamtheit der Tumoren traf dies nicht zu. Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus folgendem Zusammenhang: Erstens dürfte die heterogene Färbequalität der Tumorschnitte, das konfokalmikroskopische Auflösungsvermögen und das von der Bildqualität abhängige, semi-manuelle 3D-Rekonstruktionsverfahren eine „Unschärfe“ im Sinne eines basalen Grundfehlers für alle Konditionen nach sich ziehen. Dadurch könnten an die Zellmembran angrenzende Polystyren-Mikrosphären ungenau detektiert werden und teilweise falsch positiv erfasst werden. Vor dem Hintergrund einer generell hohen Streubreite innerhalb der Phagozytose-Indices humaner Glioblastomschnitte wäre über ein höheres n auf Tumorebene dieser Problematik teilweise beizukommen. Diese „Unschärfe“ dürfte sich jedoch auf die Phagozytose-Indices von Cytochalasin D stärker auswirken, aufgrund eines bereits in den 1960er Jahren beschriebenen Zusammenhangs, dass Säugetierzellen unter dem Einfluss von Cytochalasin ihren Zellkern ausstülpfen oder sogar ganz „enukleieren“ können (Carter 1967). Dieser Prozess wurde häufiger mit höheren Konzentrationen von Cytochalasin B beobachtet. Tatsächlich war auch in

einigen GAMs ein ähnliches Phänomen zu beobachten, insbesondere bei den höheren Cytochalasin D-Konzentrationen (5 $\mu$ M und 10 $\mu$ M) (siehe auch Abbildung 19). Im Hinblick auf den Phagozytose-Index, berechnet als Quotient aus phagozytierten Partikeln zu Zellzahl, dürfte bei geringer gezählter Zellzahl im Verhältnis zu wenigen phagozytierten oder nahe anliegenden Mikrosphären der Phagozytose-Index falsch hoch ausfallen, da die Zellzahl sich aus der Anzahl der Zellkerne innerhalb der IBA1-positiven Oberfläche zusammensetzt. Probatorisch wurden aus diesem Grund für eine Tumorprobe geringere Cytochalasin D- Konzentrationen von 0.1 $\mu$ M und 0.5 $\mu$ M sowie eisgekühltes DMSO als Negativkontrolle eingesetzt. Die niedrigsten mittleren Phagozytose-Indices fanden sich dabei für die 1 $\mu$ M-Konzentration und für eisgekühltes DMSO. Obwohl aus den Einzelwerten für nur eine Tumorprobe keine weitergehende Aussage möglich ist, erscheinen die beiden letztgenannten als aussichtsreichste Negativkontrollen für zukünftige Testreihen, da insbesondere für eisgekühltes DMSO die oben beschriebene Problematik einer Zellkern-Enukleation nicht bekannt ist und sich damit die Zellzahl valider bestimmen lässt.



**Abbildung 19:** Repräsentatives Beispielbild einer IBA1-positiven Zelle nach einstündiger Inkubation mit Cytochalasin D 10 $\mu$ M vor (A) und nach (B) 3D-Rekonstruktion.

Die rotgefärbte, zur Zelle zugehörig erscheinende Zellkernstruktur befindet sich teilweise außerhalb der IBA1-positiven, rekonstruierten Oberfläche (siehe Pfeilmarkierung). Weiße Längenmarkierung am jeweils linken unteren Bildrand entspricht 4 $\mu$ m.

#### 4.4. Temozolomid und die Phagozytose von GAMs

Temozolomid, Teil der derzeitigen Standardtherapie für die Behandlung des Glioblastoms, besitzt neben des direkten tumorzellschädigenden Effekts auch noch dosisabhängig immunmodulatorische Auswirkungen auf die umgebenden Immunzellen

des Tumors, wie z. B. dendritische Zellen und T-Zellen (Karachi et al. 2018). Allerdings verbleibt der direkte Effekt von Temozolomid auf Mikroglia und Makrophagen, als wichtiger Bestandteil des tumoralen Zellverbandes, dabei weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund wurde erstmalig in dieser Studie der Effekt einer 72-stündigen Inkubation mit TMZ auf die Phagozytose-Aktivität von humanen GAMs im Zellverband von Glioblastomschnittkulturen in einem breiten Dosispektrum von 5-200 $\mu$ M untersucht, wobei sich für keine der Konzentrationen eine signifikante Änderung der phagozytotischen Aufnahme der Polystyren-Mikrosphären ergab. Diese Ergebnisse passen zu den Resultaten einer kürzlich erschienenen Studie, in welcher in-vitro die Phagozytose einer humanen GBM-Zelllinie durch Makrophagen - stammend aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes - untersucht wurde. Dabei wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erst ab 500 $\mu$ M Temozolomid ein signifikanter Anstieg der phagozytotischen Elimination von Gliomzellen beobachtet, welcher in geringeren Konzentrationen nicht nachweisbar war (Gholamin et al. 2020). Möglicherweise liegt diese Konzentrationsabhängigkeit an der Tatsache, dass - wie in einer weiteren Studie festgestellt - erst ab 500 $\mu$ M die Apoptoserate ab diesem Grenzwert signifikant anstieg (Roemeling et al. 2020). Jedoch unter der Kombination von Temozolomid und der Blockade von CD47 ließ sich die Phagozytose von GBM-Zellen deutlich erhöhen (Roemeling et al. 2020; Gholamin et al. 2020). Zukünftig wäre es dabei interessant diese therapielevanten Ergebnisse in der GBM-Schnittkultur zu testen. Ein wesentlicher Wirkmechanismus des potenziell phagozytosesteigernden Effekts von Temozolomid wurde ebenfalls kürzlich nachgewiesen. Das Alkylans scheint dabei die Translokation von Proteinen des endoplasmatischen Retikulums an die Plasmamembran zu induzieren, welche die Phagozytose der jeweiligen Zellen durch Phagozyten erleichtern (Roemeling et al. 2020). Innerhalb der zuletzt zitierten Studie war allerdings schon bei einer Konzentration von 100 $\mu$ M TMZ die Phagozytose drei verschiedener Glioblastomzelllinien signifikant erhöht. Methodische Unterschiede z. B. in der Verwendung unterschiedlicher Tumorzelllinien (LN-299 versus LN-229, U251, U87), unterschiedlich langer Inkubationszeiten mit TMZ (24h versus 72h) und divergierender Kokulturrezeiten der Phagozyten mit den Tumorzellen (2h versus 4h) könnten die unterschiedlichen Ergebnisse erklären (Gholamin et al. 2020; Roemeling et al. 2020). Zur Beeinflussung der Phagozytose in Schnittkulturen liegen jedoch keine vergleichbaren Studienergebnisse vor. Die in dieser Arbeit festgestellten, unveränderten Phagozytose-Raten durch Temozolomid stehen aus mehreren Gründen jedoch nicht

unbedingt im Widerspruch mit dem Ergebnis, dass in-vitro 100µM Temozolomid die Phagozytose von GBM-Zelllinien durch Makrophagen signifikant erhöhte (Roemeling et al. 2020). Dies lässt sich auf die methodischen Unterschiede dieser Arbeit mit der zitierten in-vitro Studie zurückführen. Folgende Gründe wären hier exemplarisch aufzuführen: a) Ein wesentlicher Unterschied liegt in den primär beteiligten Zellen, da in dieser Studie primäre Mikroglia und Makrophagen (GAMs) untersucht wurden, wohingegen die Gruppe um Roemeling et al. entweder die humane, monozytäre THP-1-Zelllinie oder dem Knochenmark entstammende, murine antigenpräsentierende Zellen verwendete. Des Weiteren wurde b) im Gegensatz zur Bestimmung der Phagozytose-Rate über Latexpartikel die direkte Tumorzellaufnahme gemessen. Obwohl die Inkubationszeit mit Temozolomid von 72h vergleichbar ist, besteht c) in einer Kokulturzeit von 4h zwischen GBM-Zelllinie und Phagozyten eine evidente Differenz, zu der durch die Architektur der Schnittkultur determinierten, konstanten Beeinflussung der GAMs durch das Tumormilieu im Zellverband einer GBM-Schnittkultur. Jeder der aufgeführten Punkte (a-c) kann potenziell die Phagozytose beeinflussen. So unterscheiden sich z.B. Zelllinien (wie THP-1) oftmals genetisch und funktionell von primären Zellen. Zudem ist die Translation von Ergebnissen aus murinen Zellenpopulationen durch die evolutionäre Divergenz zum humanen Organismus limitiert (Timmerman et al. 2018). Eine divergierende rezeptorische Detektion von Latexpartikeln im Vergleich zu Zellmaterial, der Einfluss sowohl unterschiedlicher Kokulturzeiten im Gliomkontext als auch des Zellverbandes in Schnittkulturen auf die Phagozytose wurde bereits an anderer Stelle dieser Arbeit erwähnt. Im Falle der Schnittkulturen könnten zudem inhibitorische Effekte z. B. durch sich langsam teilende Gliomstammzellen innerhalb des Zellverbandes generell phagozytosesteigernde Effekte z.B. durch Temozolomid, wie in der Einzellzellkultur festgestellt, nivellieren (Roemeling et al. 2020; Wu et al. 2010).

Die Phagozytose-Aktivität als Reaktion auf die mehrtägige Behandlung mit Temozolomid zeigte sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Tumorprobe deutlich heterogen (siehe auch Abbildung 18). So variierte der mittlere Phagozytose-Index unter 100µM Temozolomid zwischen dem relativ höchsten Wert innerhalb eines Tumors und dem niedrigsten Relativwert innerhalb des Gewebes eines anderen Patienten (vgl. Abbildung 18B und 18E). Dies deutet auf die Notwendigkeit einer weiteren subgruppenspezifischen Stratifizierung in der Bewertung der Phagozytose von GAMs hin. Besonders interessant für zukünftige Arbeiten wäre dabei eine funktionelle

Differenzierung der Phagozytose im Hinblick auf den tumordominanten genetischen Subtyp. Hierzu müsste zunächst der jeweilige Subtyp des/r Patienten/In bestimmt und in den Schnittkulturen bestätigt werden. Obwohl dies nicht in dieser Studie analysiert wurde, würde die Entschlüsselung subtypspezifischer, funktioneller Unterschiede von GAMs im Glioblastom eine äußerst therapierelevante Information bedeuten, dessen Vorliegen bisher zwar vermutet, jedoch trotz intensiver in-vitro Studien bisher nicht systematisch nachgewiesen werden konnte (Chen und Hambardzumyan 2018). Einschränkend ist darauf hinzuweisen, dass die Fallzahlen für eine solche weitere subtypspezifische Analyse nochmals deutlich erhöht werden müssten, um für jeden der vier Subtypen ausreichende Anzahlen für die statistische Auswertung vorzuweisen und trotz intratumoraler Heterogenität valide Ergebnisse zu erzielen.

#### **4.5. Limitation und Ausblick**

Bedingt durch die schlechte Therapierbarkeit des inter- und intratumoral sehr heterogenen Glioblastoms besteht ein hoher Bedarf für neue Therapiestrategien und deren präklinische Testmöglichkeiten. Gerade die Nutzung bereits angelegter, antitumoraler, körpereigener Immunantworten erscheint dabei vor dem Hintergrund erster Therapieerfolge im Rahmen anderer Tumorentitäten als erfolgsversprechend. Die Phagozytose, eine der grundlegenden Funktionen von Mikroglia und Makrophagen, ist eine dieser potenziellen Immunantworten des Körpers - auch gegen Tumorzellen. Unter dem Einfluss des Glioblastoms und insbesondere dessen Tumorstammzellen scheint diese jedoch supprimiert zu sein. Evidenz zu diesem Thema wurde jedoch hauptsächlich in-vitro oder tierexperimentell gewonnen, wohingegen Arbeiten zur Übertragung bisheriger Erkenntnisse auf den humanen Organismus eine Seltenheit sind. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein Modell zur Untersuchung der Phagozytose-Aktivität von GAMs innerhalb der zellulären Matrix humaner GBM-Schnittkulturen etabliert und anhand zweier Experimente getestet. Experiment 1 untersuchte dabei die Nukleotide UDP und ATP, beide als Signalmoleküle in Phagozytose-Prozessen involviert, sowie Cytochalasin D als Aktinpolymerisationsinhibitor in drei verschiedenen Konzentrationen. Die gemittelten Werte über alle Tumoren hinweg ergaben keine signifikante Beeinflussung des Phagozytose-Index durch die Testsubstanzen in Experiment 1. Überraschenderweise wirkte sich weder UDP, vorbekannt mit phagozytosesteigernder Wirkung auf tumorunabhängige Mikroglia,

noch Cytochalasin D, als oftmals verwendeter Phagozytose-Inhibitor, signifikant auf die Ergebnisse aus. Im Falle von UDP wäre es in künftigen Arbeiten von Bedeutung, die fehlende Phagozytose-Induktion zu validieren und mögliche Ursachen, z. B. aufgrund einer funktionellen oder strukturellen Hemmung des UDP-Signalwegs im Tumormilieu, zu überprüfen. Cytochalasin D als Negativkontrolle zeigte zwar für einige einzelne Tumoren eine dosisabhängige Reduktion, erwies sich jedoch in der Gesamtschau als nicht suffizient, um in GAMs die Phagozytose im Sinne einer Negativkontrolle relevant zu inhibieren. Dabei dürften auch vorbeschriebene zelluläre Sekundäreffekte von Cytochalasin D, wie eine mögliche E nukleation, für das Zustandekommen der Ergebnisse eine Rolle gespielt haben. Eisgekühltes DMSO als Negativkontrolle wies innerhalb eines Tumors vergleichbar niedrige, mittlere Phagozytose-Werte wie 1µM Cytochalasin D auf und könnte eine Alternative für zukünftige derartige Assays sein. Dies müsste über eine höhere Fallzahl für diese Kondition validiert werden.

Das alkylierende Chemotherapeutikum Temozolomid hatte bis zu einer Konzentration von 200µM nach 72-stündiger Inkubation der Tumorschnitte ebenfalls keinen Einfluss auf den mittleren Phagozytose-Index. Dies korrespondiert mit bisherigen Ergebnissen aus der Zellkultur, dass die Phagozytose (hier jedoch von Tumorzellen) bis zu einer Konzentration von 500µM nicht signifikant erhöht war (Gholamin et al. 2020).

In der Gesamtschau zeigten sowohl Experiment 1 als auch Experiment 2 eine hohe Streubreite der mittleren Phagozytose-Indices, deren Ursache unter anderem in der Zusammenfassung der sehr heterogenen intertumoralen Phagozytosewerte der jeweiligen Einzeltumoren begründet sein dürfte. Diese Tatsache legt neben einer generellen Fallzahlerhöhung auf Tumorebene die Notwendigkeit einer Bestimmung des genetischen Subtyps nahe, um ein eventuell subtypspezifisches Phagozytoseverhalten von GAMs in Abhängigkeit zum vorherrschenden Glioblastomtyp nachzuweisen. Zudem böte eine Fallzahlerhöhung die Möglichkeit einer stabilen statistischen Auswertung der resultierenden, geschachtelten Datensätze im Rahmen einer Mehrebenenanalyse. Die Fallzahl war in dieser Arbeit aufgrund einer inkonstanten Verfügbarkeit von Tumorgewebe limitiert.

Ein Teil der hohen Streubreite beider Experimente könnte in zukünftigen Arbeiten ähnlichen Aufbaus reduziert werden, indem vor Gewebentnahme der Zielbereich radiologisch definiert wird. Eine damit resultierende Auswahl jeweils ähnlicher Tumorbereiche (Tumorperipherie versus Tumorkern) würde eventuell die intratumoral Heterogenität reduzieren und somit eine weitere Differenzierungsebene der

experimentellen Methodik hinzufügen. Innerhalb dieses klinisch-radiologischen Vorbereitungsschritt wäre es zudem möglich auch das operative Zugangsgewebe als Kontrollgruppe zu verwenden. Obwohl dieses aufgrund des naheliegenden Tumors nicht als vollkommen tumorunabhängiges Gewebe gelten dürfte, dürfte es für einen Überblick des generellen „phagozytotischen Niveaus“ von GAMs in GBM-Schnittkulturen im Vergleich zum Zugangsgewebe ausreichen.

Trotz einiger noch zu verbessernder methodischer Limitationen ist mit dieser Arbeit die Etablierung einer translationalen Plattform zur Testung unterschiedlichster Substanzen auf die Phagozytose-Aktivität von GAMs im Glioblastom gelungen. Mit der Verwendung von Schnittkulturen dürfte die Erforschung der Phagozytose im GBM deutlich näher an die in-vivo Situation rücken und können bereits erfolgte Ergebnisse aus der Zellkultur validiert werden. Die hieraus gewonnenen Ergebnisse dürften einen weiteren Schritt hin zu einer individualisierten GBM-Therapie liefern, insbesondere, wenn das beschriebene Testsystem über die genetische Subtypbestimmung des Glioblastomgewebes eine weitere patientenindividualisierte Differenzierungsebene erföhre.

#### **4.6. Zusammenfassung**

Mit der Diagnose des häufigsten, hirneigenen Malignoms des erwachsenen Menschen, des Glioblastoms, ist trotz intensiver Forschung an therapeutischen Möglichkeiten eine geringe mittlere Überlebensdauer verbunden. Ein wesentlicher Anteil der zellulären Zusammensetzung des Glioblastoms wird von gliom-assoziierten Mikroglia und Makrophagen (GAMs) bestimmt. Obwohl im Verständnis der Phagozytose therapeutisches Potenzial liegt, ist diese zentrale Funktion von GAMs im humanen Tumorkontext in Ermangelung experimenteller Modelle weitestgehend unerforscht. Deshalb bestand das Ziel der hier durchgeführten Untersuchung in der Etablierung und Testung eines humanen in-situ Phagozytose-Assays für GAMs.

Diesbezüglich wurden aus humanem Glioblastomgewebe von insgesamt neun Patienten organotypische Schnitte angefertigt und innerhalb zweier Experimente die Phagozytose-Indices der GAMs nach konfokalmikroskopischer Aufnahme und anschließender 3D-Rekonstruktion bestimmt. Experiment 1 fokussierte sich dabei auf die Beeinflussung der Phagozytose-Rate der GAMs durch jeweils 100µM ATP und UDP sowie Cytochalasin D in den Konzentrationen 1µM, 5µM und 10µM, wohingegen

Experiment 2 die Wirkung des Chemotherapeutikums Temozolomid in den Konzentrationen 5 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M und 200 $\mu$ M beobachtete.

Nach Mittelwertbildung der Phagozytose-Indizes aus den Bildwerten der sechs für Experiment 1 verwendeten Tumoren zeigte weder UDP, ATP oder Cytochalasin D eine signifikante Beeinflussung der Phagozytose im Vergleich zur Kontrollgruppe DMSO. Auch Temozolomid wirkte sich nicht signifikant auf die Phagozytose-Rate der GAMs innerhalb der fünf untersuchten humanen Glioblastomproben aus. Sowohl morphologisch als auch funktionell offenbarten GAMs aus humanen organotypischen Glioblastom-schnittkulturen über beide Experimente hinweg eine evidente intertumorale Heterogenität.

Das hier etablierte Modell humaner gliom-assoziiierter Mikroglia und Makrophagen liefert erstmalig Ergebnisse zur Phagozytose der Immunzellen innerhalb einer humanen Tumorgewebsarchitektur, zeigt die hohe morphologische und phagozytotische Heterogenität von GAMs und dürfte nach Validierung der Ergebnisse durch z.B. durch subtypspezifischen Klassifizierung der Tumoren eine geeignete patientenindividualisierte Plattform zur funktionalen Testung neuer Therapeutika auf den Einfluss auf die Phagozytose humaner GAMs im GBM bieten.



## Literaturverzeichnis

- Aarts, Emmeke; Dolan, Conor V.; Verhage, Matthijs; van der Sluis, Sophie (2015): Multilevel analysis quantifies variation in the experimental effect while optimizing power and preventing false positives. In: *BMC neuroscience* 16, S. 94. DOI: 10.1186/s12868-015-0228-5.
- Abiega, Oihane; Beccari, Sol; Diaz-Aparicio, Irune; Nadjar, Agnes; Layé, Sophie; Leyrolle, Quentin; Gómez-Nicola, Diego; Domercq, María; Pérez-Samartín, Alberto; Sánchez-Zafra, Víctor; Paris, Iñaki; Valero, Jorge; Savage, Julie C.; Hui, Chin-Wai; Tremblay, Marie-Ève; Deudero, Juan J. P.; Brewster, Amy L.; Anderson, Anne E.; Zaldumbide, Laura; Galbarriatu, Lara; Marinas, Ainhoa; Vivanco, Maria dM; Matute, Carlos; Maletic-Savatic, Mirjana; Encinas, Juan M.; Sierra, Amanda (2016): Neuronal Hyperactivity Disturbs ATP Microgradients, Impairs Microglial Motility, and Reduces Phagocytic Receptor Expression Triggering Apoptosis/Microglial Phagocytosis Uncoupling. In: *PLoS biology* 14 (5), e1002466. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002466.
- Ajami, Bahareh; Bennett, Jami L.; Krieger, Charles; McNagny, Kelly M.; Rossi, Fabio M. V. (2011): Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. In: *Nature neuroscience* 14 (9), S. 1142–1149. DOI: 10.1038/nn.2887.
- Ajami, Bahareh; Bennett, Jami L.; Krieger, Charles; Tetzlaff, Wolfram; Rossi, Fabio M. V. (2007): Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. In: *Nature neuroscience* 10 (12), S. 1538–1543. DOI: 10.1038/nn2014.
- Alcantara Llaguno, Sheila; Sun, Daochun; Pedraza, Alicia M.; Vera, Elsa; Wang, Zilai; Burns, Dennis K.; Parada, Luis F. (2019): Cell-of-origin susceptibility to glioblastoma formation declines with neural lineage restriction. In: *Nature neuroscience*. DOI: 10.1038/s41593-018-0333-8.
- Alcantara Llaguno, Sheila R.; Wang, Zilai; Sun, Daochun; Chen, Jian; Xu, Jing; Kim, Euseok; Hatanpaa, Kimmo J.; Raisanen, Jack M.; Burns, Dennis K.; Johnson, Jane E.; Parada, Luis F. (2015): Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. In: *Cancer cell* 28 (4), S. 429–440. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.09.007.
- Aldape, Kenneth; Zadeh, Gelareh; Mansouri, Sheila; Reifenberger, Guido; Deimling, Andreas von (2015): Glioblastoma. Pathology, molecular mechanisms and markers. In: *Acta neuropathologica* 129 (6), S. 829–848. DOI: 10.1007/s00401-015-1432-1.
- Alliot, F.; Godin, I.; Pessac, B. (1999): Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. In: *Brain research. Developmental brain research* 117 (2), S. 145–152.
- Annovazzi, Laura; Mellai, Marta; Bovio, Enrica; Mazzetti, Samanta; Pollo, Bianca; Schiffer, Davide (2018): Microglia immunophenotyping in gliomas. In: *Oncology letters* 15 (1), S. 998–1006. DOI: 10.3892/ol.2017.7386.

- Badie, B.; Schartner, J. M. (2000): Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. In: *Neurosurgery* 46 (4), 957-61; discussion 961-2.
- Beccari, Sol; Diaz-Aparicio, Irune; Sierra, Amanda (2018): Quantifying Microglial Phagocytosis of Apoptotic Cells in the Brain in Health and Disease. In: *Current protocols in immunology*, e49. DOI: 10.1002/cpim.49.
- Bettinger, Ina; Thanos, Solon; Paulus, Werner (2002): Microglia promote glioma migration. In: *Acta neuropathologica* 103 (4), S. 351–355. DOI: 10.1007/s00401-001-0472-x.
- Billingham, C.; Powell, M. R.; Jenner, K. A.; Johnston, D. A.; Gatherer, M.; Nicoll, J. A. R.; Boche, D. (2013): Rat astrocytic tumour cells are associated with an anti-inflammatory microglial phenotype in an organotypic model. In: *Neuropathology and applied neurobiology* 39 (3), S. 243–255. DOI: 10.1111/j.1365-2990.2012.01283.x.
- Braganza, Melissa Z.; Kitahara, Cari M.; Berrington de González, Amy; Inskip, Peter D.; Johnson, Kimberly J.; Rajaraman, Preetha (2012): Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: a systematic review. In: *Neuro-oncology* 14 (11), S. 1316–1324. DOI: 10.1093/neuonc/nos208.
- Brandenburg, Susan; Müller, Annett; Turkowski, Kati; Radev, Yordan T.; Rot, Sergej; Schmidt, Christin; Bungert, Alexander D.; Acker, Güliz; Schorr, Anne; Hippe, Andreas; Miller, Kelly; Heppner, Frank L.; Homey, Bernhard; Vajkoczy, Peter (2016): Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors. In: *Acta neuropathologica* 131 (3), S. 365–378. DOI: 10.1007/s00401-015-1529-6.
- Brown, E. J. (1986): The role of extracellular matrix proteins in the control of phagocytosis. In: *Journal of leukocyte biology* 39 (5), S. 579–591. DOI: 10.1002/jlb.39.5.579.
- Brown, S. S.; Spudich, J. A. (1979): Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments. In: *The Journal of cell biology* 83 (3), S. 657–662.
- Bulavina, Larisa; Szulzewsky, Frank; Rocha, Adriana; Krabbe, Grietje; Robson, Simon C.; Matyash, Vitali; Kettenmann, Helmut (2013): NTPDase1 activity attenuates microglial phagocytosis. In: *Purinergic Signalling* 9 (2), S. 199–205. DOI: 10.1007/s11302-012-9339-y.
- Carter, S. B. (1967): Effects of cytochalasins on mammalian cells. In: *Nature* 213 (5073), S. 261–264. DOI: 10.1038/213261a0.
- Champion, Julie A.; Walker, Amanda; Mitragotri, Samir (2008): Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. In: *Pharmaceutical research* 25 (8), S. 1815–1821. DOI: 10.1007/s11095-008-9562-y.
- Charles, Nikki A.; Holland, Eric C.; Gilbertson, Richard; Glass, Rainer; Kettenmann, Helmut (2012): The brain tumor microenvironment. In: *Glia* 60 (3), S. 502–514.

- Chen, Zhihong; Hambardzumyan, Dolores (2018): Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1004. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01004.
- Damoiseaux, J. G.; Döpp, E. A.; Calame, W.; Chao, D.; MacPherson, G. G.; Dijkstra, C. D. (1994): Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. In: *Immunology* 83 (1), S. 140–147.
- Darmanis, Spyros; Sloan, Steven A.; Croote, Derek; Mignardi, Marco; Chernikova, Sophia; Samghababi, Peyman; Zhang, Ye; Neff, Norma; Kowarsky, Mark; Caneda, Christine; Li, Gordon; Chang, Steven D.; Connolly, Ian David; Li, Yingmei; Barres, Ben A.; Gephart, Melanie Hayden; Quake, Stephen R. (2017): Single-Cell RNA-Seq Analysis of Infiltrating Neoplastic Cells at the Migrating Front of Human Glioblastoma. In: *Cell reports* 21 (5), S. 1399–1410. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.10.030.
- Di Virgilio, F.; Adinolfi, E. (2017): Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. In: *Oncogene* 36 (3), S. 293–303. DOI: 10.1038/onc.2016.206.
- Di Virgilio, Francesco (2012): Purines, purinergic receptors, and cancer. In: *Cancer research* 72 (21), S. 5441–5447. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1600.
- Di Virgilio, Francesco; Ceruti, Stefania; Bramanti, Placido; Abbracchio, Maria P. (2009): Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. In: *Trends in neurosciences* 32 (2), S. 79–87. DOI: 10.1016/j.tins.2008.11.003.
- Diaz-Aparicio, Irune; Beccari, Sol; Abiega, Oihane; Sierra, Amanda (2016): Clearing the corpses. Regulatory mechanisms, novel tools, and therapeutic potential of harnessing microglial phagocytosis in the diseased brain. In: *Neural regeneration research* 11 (10), S. 1533–1539. DOI: 10.4103/1673-5374.193220.
- Du, Li; Zhang, Ying; Chen, Yang; Zhu, Jie; Yang, Yi; Zhang, Hong-Liang (2017): Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. In: *Molecular neurobiology* 54 (10), S. 7567–7584. DOI: 10.1007/s12035-016-0245-0.
- Edmondson, Rasheena; Broglie, Jessica Jenkins; Adcock, Audrey F.; Yang, Liju (2014): Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. In: *Assay and drug development technologies* 12 (4), S. 207–218. DOI: 10.1089/adt.2014.573.
- Elliott, Michael R.; Cheken, Faraaz B.; Trampont, Paul C.; Lazarowski, Eduardo R.; Kadl, Alexandra; Walk, Scott F.; Park, Daeho; Woodson, Robin I.; Ostankovich, Marina; Sharma, Poonam; Lysiak, Jeffrey J.; Harden, T. Kendall; Leitinger, Norbert; Ravichandran, Kodi S. (2009): Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. In: *Nature* 461 (7261), S. 282–286. DOI: 10.1038/nature08296.
- Engler, Jane R.; Robinson, Aaron E.; Smirnov, Ivan; Hodgson, J. Graeme; Berger, Mitchel S.; Gupta, Nalin; James, C. David; Molinaro, Annette; Phillips, Joanna J. (2012): Increased microglia/macrophage gene expression in a subset of adult and pediatric astrocytomas. In: *PLoS one* 7 (8), e43339. DOI: 10.1371/journal.pone.0043339.

- Fang, Kuan-Min; Yang, Chung-Shi; Sun, Synthia H.; Tzeng, Shun-Fen (2009): Microglial phagocytosis attenuated by short-term exposure to exogenous ATP through P2X receptor action. In: *Journal of neurochemistry* 111 (5), S. 1225–1237. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06409.x.
- Feng, Xi; Szulzewsky, Frank; Yerevanian, Alexan; Chen, Zhihong; Heinzmann, David; Rasmussen, Rikke Darling; Alvarez-Garcia, Virginia; Kim, Yeonghwan; Wang, Bingcheng; Tamagno, Ilaria; Zhou, Hao; Li, Xiaoxia; Kettenmann, Helmut; Ransohoff, Richard M.; Hambardzumyan, Dolores (2015): Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis. In: *Oncotarget* 6 (17), S. 15077–15094. DOI: 10.18632/oncotarget.3730.
- Friedman, H. S.; Kerby, T.; Calvert, H. (2000): Temozolomide and treatment of malignant glioma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6 (7), S. 2585–2597.
- Friedmann-Morvinski, Dinorah; Bushong, Eric A.; Ke, Eugene; Soda, Yasushi; Marumoto, Tomotoshi; Singer, Oded; Ellisman, Mark H.; Verma, Inder M. (2012): Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. In: *Science (New York, N.Y.)* 338 (6110), S. 1080–1084. DOI: 10.1126/science.1226929.
- Gholamin, Sharareh; Youssef, Osama A.; Rafat, Marjan; Esparza, Rogelio; Kahn, Suzana; Shahin, Maryam; Giaccia, Amato J.; Graves, Edward E.; Weissman, Irving; Mitra, Siddhartha; Cheshier, Samuel H. (2020): Irradiation or temozolomide chemotherapy enhances anti-CD47 treatment of glioblastoma. In: *Innate immunity* 26 (2), S. 130–137. DOI: 10.1177/1753425919876690.
- Ginhoux, Florent; Greter, Melanie; Leboeuf, Marylene; Nandi, Sayan; See, Peter; Gokhan, Solen; Mehler, Mark F.; Conway, Simon J.; Ng, Lai Guan; Stanley, E. Richard; Samokhvalov, Igor M.; Merad, Miriam (2010): Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. In: *Science (New York, N.Y.)* 330 (6005), S. 841–845. DOI: 10.1126/science.1194637.
- Glass, Rainer; Synowitz, Michael (2014): CNS macrophages and peripheral myeloid cells in brain tumours. In: *Acta neuropathologica* 128 (3), S. 347–362. DOI: 10.1007/s00401-014-1274-2.
- Gordon, Siamon; Taylor, Philip R. (2005): Monocyte and macrophage heterogeneity. In: *Nature reviews. Immunology* 5 (12), S. 953–964. DOI: 10.1038/nri1733.
- Greenberg, S. (1995): Signal transduction of phagocytosis. In: *Trends in cell biology* 5 (3), S. 93–99.
- Haage, Verena; Semtner, Marcus; Vidal, Ramon Oliveira; Hernandez, Daniel Perez; Pong, Winnie W.; Chen, Zhihong; Hambardzumyan, Dolores; Magrini, Vincent; Ly, Amy; Walker, Jason; Mardis, Elaine; Mertins, Philipp; Sauer, Sascha; Kettenmann, Helmut; Gutmann, David H. (2019): Comprehensive gene expression meta-analysis identifies signature genes that distinguish microglia from peripheral monocytes/macrophages in

health and glioma. In: *Acta neuropathologica communications* 7 (1), S. 20. DOI: 10.1186/s40478-019-0665-y.

Hambardzumyan, Dolores; Bergers, Gabriele (2015): Glioblastoma. Defining Tumor Niches. In: *Trends in cancer* 1 (4), S. 252–265. DOI: 10.1016/j.trecan.2015.10.009.

Hambardzumyan, Dolores; Gutmann, David H.; Kettenmann, Helmut (2016): The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. In: *Nature neuroscience* 19 (1), S. 20–27. DOI: 10.1038/nn.4185.

Harden, T. K.; Lazarowski, E. R. (1999): Release of ATP and UTP from astrocytoma cells. In: *Progress in brain research* 120, S. 135–143. DOI: 10.1016/s0079-6123(08)63551-7.

Hassan, Samia; Eldeeb, Khalil; Millns, Paul J.; Bennett, Andrew J.; Alexander, Stephen P. H.; Kendall, David A. (2014): Cannabidiol enhances microglial phagocytosis via transient receptor potential (TRP) channel activation. In: *British journal of pharmacology* 171 (9), S. 2426–2439. DOI: 10.1111/bph.12615.

Hegi, Monika E.; Diserens, Annie-Claire; Gorlia, Thierry; Hamou, Marie-France; Tribolet, Nicolas de; Weller, Michael; Kros, Johan M.; Hainfellner, Johannes A.; Mason, Warren; Mariani, Luigi; Bromberg, Jacqueline E. C.; Hau, Peter; Mirimanoff, René O.; Cairncross, J. Gregory; Janzer, Robert C.; Stupp, Roger (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. In: *The New England journal of medicine* 352 (10), S. 997–1003. DOI: 10.1056/NEJMoa043331.

Herting, C. J.; Chen, Z.; Pitter, K. L.; Szulzewsky, F.; Kaffes, I.; Kaluzova, M.; Park, J. C.; Cimino, P. J.; Brennan, C.; Wang, B.; Hambardzumyan, D. (2017): Genetic driver mutations define the expression signature and microenvironmental composition of high-grade gliomas. In: *Glia* 65 (12), S. 1914–1926. DOI: 10.1002/glia.23203.

Hussain, S. Farzana; Yang, David; Suki, Dima; Grimm, Elizabeth; Heimberger, Amy B. (2006): Innate immune functions of microglia isolated from human glioma patients. In: *Journal of translational medicine* 4, S. 15. DOI: 10.1186/1479-5876-4-15.

Imai, Y.; Ibata, I.; Ito, D.; Ohsawa, K.; Kohsaka, S. (1996): A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. In: *Biochemical and biophysical research communications* 224 (3), S. 855–862. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1112.

Johnson, Brett E.; Mazar, Tali; Hong, Chibo; Barnes, Michael; Aihara, Koki; McLean, Cory Y.; Fouse, Shaun D.; Yamamoto, Shogo; Ueda, Hiroki; Tatsuno, Kenji; Asthana, Saurabh; Jalbert, Llewellyn E.; Nelson, Sarah J.; Bollen, Andrew W.; Gustafson, W. Clay; Charron, Elise; Weiss, William A.; Smirnov, Ivan V.; Song, Jun S.; Olshen, Adam B.; Cha, Soonmee; Zhao, Yongjun; Moore, Richard A.; Mungall, Andrew J.; Jones, Steven J. M.; Hirst, Martin; Marra, Marco A.; Saito, Nobuhito; Aburatani, Hiroyuki; Mukasa, Akitake; Berger, Mitchel S.; Chang, Susan M.; Taylor, Barry S.; Costello, Joseph F. (2014): Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of

- recurrent glioma. In: *Science (New York, N.Y.)* 343 (6167), S. 189–193. DOI: 10.1126/science.1239947.
- Karachi, Aida; Dastmalchi, Farhad; Mitchell, Duane A.; Rahman, Maryam (2018): Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma. In: *Neuro-oncology* 20 (12), S. 1566–1572. DOI: 10.1093/neuonc/noy072.
- Koizumi, Schuichi; Ohsawa, Keiko; Inoue, Kazuhide; Kohsaka, Shinichi (2013): Purinergic receptors in microglia. Functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. In: *Glia* 61 (1), S. 47–54. DOI: 10.1002/glia.22358.
- Koizumi, Schuichi; Shigemoto-Mogami, Yukari; Nasu-Tada, Kaoru; Shinozaki, Yoichi; Ohsawa, Keiko; Tsuda, Makoto; Joshi, Bhalchandra V.; Jacobson, Kenneth A.; Kohsaka, Shinichi; Inoue, Kazuhide (2007): UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. In: *Nature* 446 (7139), S. 1091–1095. DOI: 10.1038/nature05704.
- Kreutzberg, G. W. (1996): Microglia. A sensor for pathological events in the CNS. In: *Trends in neurosciences* 19 (8), S. 312–318.
- Kvisten, Magnus; Mikkelsen, Vilde E.; Stensjøen, Anne Line; Solheim, Ole; van der Want, Johannes; Torp, Sverre H. (2019): Microglia and macrophages in human glioblastomas. A morphological and immunohistochemical study. In: *Molecular and clinical oncology* 11 (1), S. 31–36. DOI: 10.3892/mco.2019.1856.
- Leece, Rebecca; Xu, Jordan; Ostrom, Quinn T.; Chen, Yanwen; Kruchko, Carol; Barnholtz-Sloan, Jill S. (2017): Global incidence of malignant brain and other central nervous system tumors by histology, 2003–2007. In: *Neuro-oncology* 19 (11), S. 1553–1564. DOI: 10.1093/neuonc/nox091.
- Lehrer, Steven; Rheinstein, Peter H.; Rosenzweig, Kenneth E. (2019): Allergy may confer better survival on patients with gliomas. In: *Clinical neurology and neurosurgery* 177, S. 63–67. DOI: 10.1016/j.clineuro.2018.12.021.
- Louis, David N.; Ohgaki, Hiroko; Wiestler, Otmar D.; Cavenee, Webster K.; Burger, Peter C.; Jouvett, Anne; Scheithauer, Bernd W.; Kleihues, Paul (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. In: *Acta neuropathologica* 114 (2), S. 97–109. DOI: 10.1007/s00401-007-0243-4.
- Louis, David N.; Perry, Arie; Reifenberger, Guido; Deimling, Andreas von; Figarella-Branger, Dominique; Cavenee, Webster K.; Ohgaki, Hiroko; Wiestler, Otmar D.; Kleihues, Paul; Ellison, David W. (2016): The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System. A summary. In: *Acta neuropathologica* 131 (6), S. 803–820. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Lun, Melody; Lok, Edwin; Gautam, Shiva; Wu, Erxi; Wong, Eric T. (2011): The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. In: *Journal of neuro-oncology* 105 (2), S. 261–273. DOI: 10.1007/s11060-011-0575-8.
- Mantovani, Alberto; Sica, Antonio; Sozzani, Silvano; Allavena, Paola; Vecchi, Annunziata; Locati, Massimo (2004): The chemokine system in diverse forms of

macrophage activation and polarization. In: *Trends in immunology* 25 (12), S. 677–686. DOI: 10.1016/j.it.2004.09.015.

Markovic, D. S.; Vinnakota, K.; Chirasani, S.; Synowitz, M.; Raguet, H.; Stock, K.; Sliwa, M.; Lehmann, S.; Kälin, R.; van Rooijen, N.; Holmbeck, K.; Heppner, F. L.; Kiwit, J.; Matyash, V.; Lehnardt, S.; Kaminska, B.; Glass, R.; Kettenmann, H. (2009): Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (30), S. 12530–12535. DOI: 10.1073/pnas.0804273106.

Marques-da-Silva, Camila; Burnstock, Geoffrey; Ojcius, David M.; Coutinho-Silva, Robson (2011): Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. In: *Immunobiology* 216 (1-2), S. 1–11. DOI: 10.1016/j.imbio.2010.03.010.

Merz, Felicitas; Gaunitz, Frank; Dehghani, Faramarz; Renner, Christof; Meixensberger, Jürgen; Gutenberg, Angelika; Giese, Alf; Schopow, Kosta; Hellwig, Christian; Schäfer, Michael; Bauer, Manfred; Stöcker, Horst; Taucher-Scholz, Gisela; Durante, Marco; Bechmann, Ingo (2013): Organotypic slice cultures of human glioblastoma reveal different susceptibilities to treatments. In: *Neuro-oncology* 15 (6), S. 670–681. DOI: 10.1093/neuonc/not003.

Meyer, Mona; Reimand, Jüri; Lan, Xiaoyang; Head, Renee; Zhu, Xueming; Kushida, Michelle; Bayani, Jane; Pressey, Jessica C.; Lionel, Anath C.; Clarke, Ian D.; Cusimano, Michael; Squire, Jeremy A.; Scherer, Stephen W.; Bernstein, Mark; Woodin, Melanie A.; Bader, Gary D.; Dirks, Peter B. (2015): Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (3), S. 851–856. DOI: 10.1073/pnas.1320611111.

Mimura, N.; Asano, A. (1976): Synergistic effect of colchicine and cytochalasin D on phagocytosis by peritoneal macrophages. In: *Nature* 261 (5558), S. 319–321.

Miranda-Filho, Adalberto; Piñeros, Marion; Soerjomataram, Isabelle; Deltour, Isabelle; Bray, Freddie (2017): Cancers of the brain and CNS. Global patterns and trends in incidence. In: *Neuro-oncology* 19 (2), S. 270–280. DOI: 10.1093/neuonc/now166.

Mittelbronn, M.; Dietz, K.; Schluesener, H. J.; Meyermann, R. (2001): Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. In: *Acta neuropathologica* 101 (3), S. 249–255.

Morantz, R. A.; Wood, G. W.; Foster, M.; Clark, M.; Gollahon, K. (1979): Macrophages in experimental and human brain tumors. Part 2. Studies of the macrophage content of human brain tumors. In: *Journal of neurosurgery* 50 (3), S. 305–311. DOI: 10.3171/jns.1979.50.3.0305.

Morimura, T.; Neuchrist, C.; Kitz, K.; Budka, H.; Scheiner, O.; Kraft, D.; Lassmann, H. (1990): Monocyte subpopulations in human gliomas. Expression of Fc and complement

receptors and correlation with tumor proliferation. In: *Acta neuropathologica* 80 (3), S. 287–294.

Müller, Annett; Brandenburg, Susan; Turkowski, Kati; Müller, Susanne; Vajkoczy, Peter (2015): Resident microglia, and not peripheral macrophages, are the main source of brain tumor mononuclear cells. In: *International journal of cancer* 137 (2), S. 278–288. DOI: 10.1002/ijc.29379.

Nimmerjahn, Axel; Kirchhoff, Frank; Helmchen, Fritjof (2005): Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5726), S. 1314–1318. DOI: 10.1126/science.1110647.

Ohgaki, Hiroko; Kleihues, Paul (2013): The definition of primary and secondary glioblastoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (4), S. 764–772. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.

Omuro, Antonio; DeAngelis, Lisa M. (2013): Glioblastoma and other malignant gliomas. A clinical review. In: *JAMA* 310 (17), S. 1842–1850. DOI: 10.1001/jama.2013.280319.

Osswald, Matthias; Jung, Erik; Sahm, Felix; Solecki, Gergely; Venkataramani, Varun; Blaes, Jonas; Weil, Sophie; Horstmann, Heinz; Wiestler, Benedikt; Syed, Mustafa; Huang, Lulu; Ratliff, Miriam; Karimian Jazi, Kianush; Kurz, Felix T.; Schmenger, Torsten; Lemke, Dieter; Gömmel, Miriam; Pauli, Martin; Liao, Yunxiang; Häring, Peter; Pusch, Stefan; Herl, Verena; Steinhäuser, Christian; Krunic, Damir; Jarahian, Mostafa; Miletic, Hrvoje; Berghoff, Anna S.; Griesbeck, Oliver; Kalamakis, Georgios; Garaschuk, Olga; Preusser, Matthias; Weiss, Samuel; Liu, Haikun; Heiland, Sabine; Platten, Michael; Huber, Peter E.; Kuner, Thomas; Deimling, Andreas von; Wick, Wolfgang; Winkler, Frank (2015): Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. In: *Nature* 528 (7580), S. 93–98. DOI: 10.1038/nature16071.

Ostrom, Quinn T.; Bauchet, Luc; Davis, Faith G.; Deltour, Isabelle; Fisher, James L.; Langer, Chelsea Eastman; Pekmezci, Melike; Schwartzbaum, Judith A.; Turner, Michelle C.; Walsh, Kyle M.; Wrensch, Margaret R.; Barnholtz-Sloan, Jill S. (2014): The epidemiology of glioma in adults. A "state of the science" review. In: *Neuro-oncology* 16 (7), S. 896–913. DOI: 10.1093/neuonc/nou087.

Ostrom, Quinn T.; Gittleman, Haley; Truitt, Gabrielle; Boscia, Alexander; Kruchko, Carol; Barnholtz-Sloan, Jill S. (2018): CBTRUS Statistical Report. Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. In: *Neuro-oncology* 20 (suppl\_4), iv1-iv86. DOI: 10.1093/neuonc/now131.

Parker, Nicole Renee; Khong, Peter; Parkinson, Jonathon Fergus; Howell, Viive Maarika; Wheeler, Helen Ruth (2015): Molecular heterogeneity in glioblastoma. Potential clinical implications. In: *Frontiers in oncology* 5, S. 55. DOI: 10.3389/fonc.2015.00055.



- Parney, Ian F.; Waldron, James S.; Parsa, Andrew T. (2009): Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma-associated macrophages. Laboratory investigation. In: *Journal of neurosurgery* 110 (3), S. 572–582. DOI: 10.3171/2008.7.JNS08475.
- Patel, Anoop P.; Tirosh, Itay; Trombetta, John J.; Shalek, Alex K.; Gillespie, Shawn M.; Wakimoto, Hiroaki; Cahill, Daniel P.; Nahed, Brian V.; Curry, William T.; Martuza, Robert L.; Louis, David N.; Rozenblatt-Rosen, Orit; Suvà, Mario L.; Regev, Aviv; Bernstein, Bradley E. (2014): Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. In: *Science (New York, N.Y.)* 344 (6190), S. 1396–1401. DOI: 10.1126/science.1254257.
- Penfield, W. (1925): Microglia and the Process of Phagocytosis in Gliomas. In: *The American journal of pathology* 1 (1), 77-90.15.
- Qazi, M. A.; Vora, P.; Venugopal, C.; Sidhu, S. S.; Moffat, J.; Swanton, C.; Singh, S. K. (2017): Intratumoral heterogeneity. Pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 28 (7), S. 1448–1456. DOI: 10.1093/annonc/mdx169.
- Ransohoff, Richard M. (2016): A polarizing question. Do M1 and M2 microglia exist? In: *Nature neuroscience* 19 (8), S. 987–991. DOI: 10.1038/nn.4338.
- Reinartz, Roman; Wang, Shanshan; Kebir, Sied; Silver, Daniel J.; Wieland, Anja; Zheng, Tong; Küpper, Marius; Rauschenbach, Laurèl; Fimmers, Rolf; Shepherd, Timothy M.; Trageser, Daniel; Till, Andreas; Schäfer, Niklas; Glas, Martin; Hillmer, Axel M.; Cichon, Sven; Smith, Amy A.; Pietsch, Torsten; Liu, Ying; Reynolds, Brent A.; Yachnis, Anthony; Pincus, David W.; Simon, Matthias; Brüstle, Oliver; Steindler, Dennis A.; Scheffler, Björn (2017): Functional Subclone Profiling for Prediction of Treatment-Induced Intratumor Population Shifts and Discovery of Rational Drug Combinations in Human Glioblastoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 23 (2), S. 562–574. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2089.
- Ribes, Sandra; Ebert, Sandra; Regen, Tommy; Agarwal, Amit; Tauber, Simone C.; Czesnik, Dirk; Spreer, Annette; Bunkowski, Stephanie; Eiffert, Helmut; Hanisch, Uwe-Karsten; Hammerschmidt, Sven; Nau, Roland (2010): Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated and encapsulated *Streptococcus pneumoniae* by murine microglia. In: *Infection and immunity* 78 (2), S. 865–871. DOI: 10.1128/IAI.01110-09.
- Roemeling, Christina A. von; Wang, Yifan; Qie, Yaqing; Yuan, Hengfeng; Zhao, Hai; Liu, Xiujie; Yang, Zhaogang; Yang, Mingming; Deng, Weiye; Bruno, Katelyn A.; Chan, Charles K.; Lee, Andrew S.; Rosenfeld, Stephen S.; Yun, Kyuson; Johnson, Aaron J.; Mitchell, Duane A.; Jiang, Wen; Kim, Betty Y. S. (2020): Therapeutic modulation of phagocytosis in glioblastoma can activate both innate and adaptive antitumour immunity. In: *Nature communications* 11 (1), S. 1508. DOI: 10.1038/s41467-020-15129-8.

Rosales, A. A.; Roque, R. S. (1997): Microglia-derived cytotoxic factors. Part I. Inhibition of tumor cell growth in vitro. In: *Brain research* 748 (1-2), S. 195–204.

Sahm, Felix; Capper, David; Jeibmann, Astrid; Habel, Antje; Paulus, Werner; Troost, Dirk; Deimling, Andreas von (2012): Addressing diffuse glioma as a systemic brain disease with single-cell analysis. In: *Archives of neurology* 69 (4), S. 523–526. DOI: 10.1001/archneurol.2011.2910.

Sanai, Nader; Alvarez-Buylla, Arturo; Berger, Mitchel S. (2005): Neural stem cells and the origin of gliomas. In: *The New England journal of medicine* 353 (8), S. 811–822. DOI: 10.1056/NEJMra043666.

Schafer, Dorothy P.; Lehrman, Emily K.; Kautzman, Amanda G.; Koyama, Ryuta; Mardinly, Alan R.; Yamasaki, Ryo; Ransohoff, Richard M.; Greenberg, Michael E.; Barres, Ben A.; Stevens, Beth (2012): Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. In: *Neuron* 74 (4), S. 691–705. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.03.026.

Schwartzbaum, Judith; Ding, Bo; Johannesen, Tom Borge; Osnes, Liv T. N.; Karavodin, Linda; Ahlbom, Anders; Feychting, Maria; Grimsrud, Tom K. (2012): Association between prediagnostic IgE levels and risk of glioma. In: *Journal of the National Cancer Institute* 104 (16), S. 1251–1259. DOI: 10.1093/jnci/djs315.

Sierra, Amanda; Abiega, Oihane; Shahraz, Anahita; Neumann, Harald (2013): Janus-faced microglia. Beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 7 (6), S. 1–22. DOI: 10.3389/fncel.2013.00006.

Sottoriva, Andrea; Spiteri, Inmaculada; Piccirillo, Sara G. M.; Touloumis, Anestis; Collins, V. Peter; Marioni, John C.; Curtis, Christina; Watts, Colin; Tavaré, Simon (2013): Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (10), S. 4009–4014. DOI: 10.1073/pnas.1219747110.

Stoppini, L.; Buchs, P. A.; Muller, D. (1991): A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. In: *Journal of neuroscience methods* 37 (2), S. 173–182.

Stoyanov, George St; Dzhenkov, Deyan L. (2018): On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme - Morphology, Genetics and Epigenetics. In: *Folia medica* 60 (1), S. 48–66. DOI: 10.1515/folmed-2017-0069.

Stupp, Roger; Hegi, Monika E.; Mason, Warren P.; van den Bent, Martin J.; Taphoorn, Martin J. B.; Janzer, Robert C.; Ludwin, Samuel K.; Allgeier, Anouk; Fisher, Barbara; Belanger, Karl; Hau, Peter; Brandes, Alba A.; Gijtenbeek, Johanna; Marosi, Christine; Vecht, Charles J.; Mokhtari, Karima; Wesseling, Pieter; Villa, Salvador; Eisenhauer, Elizabeth; Gorlia, Thierry; Weller, Michael; Lacombe, Denis; Cairncross, J. Gregory; Mirimanoff, René-Olivier (2009): Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study. 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. In: *The Lancet. Oncology* 10 (5), S. 459–466. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.

Stupp, Roger; Mason, Warren P.; van den Bent, Martin J.; Weller, Michael; Fisher, Barbara; Taphoorn, Martin J. B.; Belanger, Karl; Brandes, Alba A.; Marosi, Christine; Bogdahn, Ulrich; Curschmann, Jürgen; Janzer, Robert C.; Ludwin, Samuel K.; Gorlia, Thierry; Allgeier, Anouk; Lacombe, Denis; Cairncross, J. Gregory; Eisenhauer, Elizabeth; Mirimanoff, René O. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. In: *The New England journal of medicine* 352 (10), S. 987–996. DOI: 10.1056/NEJMoa043330.

Suchorska, Bogdana; Weller, Michael; Tabatabai, Ghazaleh; Senft, Christian; Hau, Peter; Sabel, Michael C.; Herrlinger, Ulrich; Ketter, Ralf; Schlegel, Uwe; Marosi, Christine; Reifenberger, Guido; Wick, Wolfgang; Tonn, Jörg C.; Wirsching, Hans-Georg (2016): Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is associated with improved survival in recurrent glioblastoma-results from the DIRECTOR trial. In: *Neuro-oncology* 18 (4), S. 549–556. DOI: 10.1093/neuonc/nov326.

Szulzewsky, Frank; Arora, Sonali; Witte, Lot de; Ulas, Thomas; Markovic, Darko; Schultze, Joachim L.; Holland, Eric C.; Synowitz, Michael; Wolf, Susanne A.; Kettenmann, Helmut (2016): Human glioblastoma-associated microglia/monocytes express a distinct RNA profile compared to human control and murine samples. In: *Glia* 64 (8), S. 1416–1436. DOI: 10.1002/glia.23014.

Szulzewsky, Frank; Pelz, Andreas; Feng, Xi; Synowitz, Michael; Markovic, Darko; Langmann, Thomas; Holtman, Inge R.; Wang, Xi; Eggen, Bart J. L.; Boddeke, Hendrikus W. G. M.; Hambardzumyan, Dolores; Wolf, Susanne A.; Kettenmann, Helmut (2015): Glioma-associated microglia/macrophages display an expression profile different from M1 and M2 polarization and highly express Gpnmb and Spp1. In: *PloS one* 10 (2), e0116644. DOI: 10.1371/journal.pone.0116644.

Tamimi, Ahmad Faleh; Juweid, Malik (2017): Glioblastoma. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. Hg. v. Steven de Vleeschouwer. Brisbane (AU).

Thakkar, Jigisha P.; Dolecek, Therese A.; Horbinski, Craig; Ostrom, Quinn T.; Lightner, Donita D.; Barnholtz-Sloan, Jill S.; Villano, John L. (2014): Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 23 (10), S. 1985–1996. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275.

The Cancer Genome Atlas Research Network (2008): Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. In: *Nature* 455 (7216), S. 1061–1068. DOI: 10.1038/nature07385.

Timmerman, Raissa; Burm, Saskia M.; Bajramovic, Jeffrey J. (2018): An Overview of in vitro Methods to Study Microglia. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 12, S. 242. DOI: 10.3389/fncel.2018.00242.

Tomaszewski, William; Sanchez-Perez, Luis; Gajewski, Thomas F.; Sampson, John H. (2019): Brain Tumor Microenvironment and Host State: Implications for Immunotherapy. In: *Clinical Cancer Research* 25 (14), S. 4202. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1627.

- Vairano, Mauro; Graziani, Grazia; Tentori, Lucio; Tringali, Giuseppe; Navarra, Pierluigi; Dello Russo, Cinzia (2004): Primary cultures of microglial cells for testing toxicity of anticancer drugs. In: *Toxicology letters* 148 (1-2), S. 91–94. DOI: 10.1016/j.toxlet.2003.12.058.
- Verhaak, Roel G. W.; Hoadley, Katherine A.; Purdom, Elizabeth; Wang, Victoria; Qi, Yuan; Wilkerson, Matthew D.; Miller, C. Ryan; Ding, Li; Golub, Todd; Mesirov, Jill P.; Alexe, Gabriele; Lawrence, Michael; O'Kelly, Michael; Tamayo, Pablo; Weir, Barbara A.; Gabriel, Stacey; Winckler, Wendy; Gupta, Supriya; Jakkula, Lakshmi; Feiler, Heidi S.; Hodgson, J. Graeme; James, C. David; Sarkaria, Jann N.; Brennan, Cameron; Kahn, Ari; Spellman, Paul T.; Wilson, Richard K.; Speed, Terence P.; Gray, Joe W.; Meyerson, Matthew; Getz, Gad; Perou, Charles M.; Hayes, D. Neil (2010): Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. In: *Cancer cell* 17 (1), S. 98–110. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
- Větvíčka, Václav; Fornůšek, Lubor (1987): Polymer microbeads in immunology. In: *Biomaterials* 8 (5), S. 341–345. DOI: 10.1016/0142-9612(87)90003-2.
- Virchow, Rudolf (1865): Die krankhaften Geschwülste. Dreissig Vorlesungen, gehalten während des Wintersemesters 1862-1863 an der Universität zu Berlin. Berlin: Hirschwald (Achtzehnte Vorlesung: Psammome, Melanome, Gliome; pp 106-169, Zweiter Band).
- Voisin, Pierre; Bouchaud, Véronique; Merle, Michel; Diolez, Philippe; Duffy, Laura; Flint, Kristian; Franconi, Jean-Michel; Bouzier-Sore, Anne-Karine (2010): Microglia in close vicinity of glioma cells. Correlation between phenotype and metabolic alterations. In: *Frontiers in neuroenergetics* 2, S. 131. DOI: 10.3389/fnene.2010.00131.
- Walentynowicz, Kacper A.; Ochocka, Natalia; Pasierbinska, Maria; Wojnicki, Kamil; Stepniak, Karolina; Mieczkowski, Jakub; Ciechomska, Iwona A.; Kaminska, Bozena (2018): In Search for Reliable Markers of Glioma-Induced Polarization of Microglia. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1329. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01329.
- Weller, Michael; van den Bent, Martin; Tonn, Jörg C.; Stupp, Roger; Preusser, Matthias; Cohen-Jonathan-Moyal, Elizabeth; Henriksson, Roger; Le Rhun, Emilie; Balana, Carmen; Chinot, Olivier; Bendszus, Martin; Reijneveld, Jaap C.; Dhermain, Frederick; French, Pim; Marosi, Christine; Watts, Colin; Oberg, Ingela; Pilkington, Geoffrey; Baumert, Brigitta G.; Taphoorn, Martin J. B.; Hegi, Monika; Westphal, Manfred; Reifenberger, Guido; Soffietti, Riccardo; Wick, Wolfgang (2017): European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. In: *The Lancet. Oncology* 18 (6), e315-e329. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30194-8.
- Wesseling, P.; Capper, D. (2018): WHO 2016 Classification of gliomas. In: *Neuropathology and applied neurobiology* 44 (2), S. 139–150. DOI: 10.1111/nan.12432.
- Wick, Wolfgang; Weller, Michael; van den Bent, Martin; Sanson, Marc; Weiler, Markus; Deimling, Andreas von; Plass, Christoph; Hegi, Monika; Platten, Michael; Reifenberger,

Guido (2014): MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. In: *Nature reviews. Neurology* 10 (7), S. 372–385. DOI: 10.1038/nrneurol.2014.100.

Willingham, Stephen B.; Volkmer, Jens-Peter; Gentles, Andrew J.; Sahoo, Debashis; Dalerba, Piero; Mitra, Siddhartha S.; Wang, Jian; Contreras-Trujillo, Humberto; Martin, Robin; Cohen, Justin D.; Lovelace, Patricia; Scheeren, Ferenc A.; Chao, Mark P.; Weiskopf, Kipp; Tang, Chad; Volkmer, Anne Kathrin; Naik, Tejaswitha J.; Storm, Theresa A.; Mosley, Adriane R.; Edris, Badreddin; Schmid, Seraina M.; Sun, Chris K.; Chua, Mei-Sze; Murillo, Oihana; Rajendran, Pradeep; Cha, Adriel C.; Chin, Robert K.; Kim, Dongkyoon; Adorno, Maddalena; Raveh, Tal; Tseng, Diane; Jaiswal, Siddhartha; Enger, Per Øyvind; Steinberg, Gary K.; Li, Gordon; So, Samuel K.; Majeti, Ravindra; Harsh, Griffith R.; van de Rijn, Matt; Teng, Nelson N. H.; Sunwoo, John B.; Alizadeh, Ash A.; Clarke, Michael F.; Weissman, Irving L. (2012): The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (17), S. 6662–6667. DOI: 10.1073/pnas.1121623109.

Wink, Marcia R.; Lenz, Guido; Braganhol, Elizandra; Tamajusuku, Alessandra S. K.; Schwartzmann, Gilberto; Sarkis, João J. F.; Battastini, Ana M. O. (2003): Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. In: *Cancer letters* 198 (2), S. 211–218. DOI: 10.1016/s0304-3835(03)00308-2.

Wolf, Susanne A.; Boddeke, H. W. G. M.; Kettenmann, Helmut (2017): Microglia in Physiology and Disease. In: *Annual review of physiology* 79, S. 619–643. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034406.

Wu, Adam; Wei, Jun; Kong, Ling-Yuan; Wang, Yongtao; Priebe, Waldemar; Qiao, Wei; Sawaya, Raymond; Heimberger, Amy B. (2010): Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. In: *Neuro-oncology* 12 (11), S. 1113–1125. DOI: 10.1093/neuonc/noq082.

Yanguas-Casás, Natalia; Crespo-Castrillo, Andrea; Ceballos, Maria L. de; Chowen, Julie A.; Azcoitia, Iñigo; Arevalo, Maria Angeles; Garcia-Segura, Luis M. (2018): Sex differences in the phagocytic and migratory activity of microglia and their impairment by palmitic acid. In: *Glia* 66 (3), S. 522–537. DOI: 10.1002/glia.23263.

Zhai, Haiyan; Heppner, Frank L.; Tsirka, Stella E. (2011): Microglia/macrophages promote glioma progression. In: *Glia* 59 (3), S. 472–485. DOI: 10.1002/glia.21117.

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Jan-Frederik Fischer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Etablierung eines in-situ Phagozytose-Modells für gliom-assoziierte Mikroglia/Makrophagen in humanen Glioblastom-Schnittkulturen“ („Establishing of an in-situ phagocytosis assay for glioma-associated microglia/macrophages in human glioblastoma slice cultures„) 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        03.12.2021

### **Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Jan-Frederik Fischer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

- Nichts anzugeben

## **Curriculum Vitae**

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





### **Publikationsliste:**

Schlabitz, S., Fischer, J.F., Kowski, A.B.; Ungewöhnliches Tremorsyndrom bei 81-jährigem Mann mit langsam progredienter Ataxie; *DGNeurologie* 3; 140–142 (2020).  
<https://doi.org/10.1007/s42451-020-00158-w>

Fischer J, Mainka T, Worbe Y, Pringsheim T, Bhatia K, Ganos C; Self-injurious behaviour in movement disorders: systematic review; *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2020; 91:712-719.

Tina Mainka, Jan-Frederik Fischer, Julius Huebl, et al., The neurological and neuropsychiatric spectrum of adults with late-treated phenylketonuria, *Parkinsonism & Related Disorders*, 2021, 89; 167-175.

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich an dieser Stelle bei Prof. Helmut Kettenmann für die Möglichkeit bedanken, am MDC Berlin-Buch in der Abteilung „Zelluläre Neurowissenschaften“ diese Doktorarbeit zu erstellen sowie für Ratschläge, Hinweise, kritische Anmerkungen und die beständige Supervision.

Zudem möchte ich an dieser Stelle auch meiner Betreuerin PD Dr. Susanne Wolf danken, die mich in die Laborarbeit einführte, supervidierte und für eine lange Zeit mit Forschungsideen weiterhalf. An ihre Stelle trat PD Dr. Charlotte Flüh, die zuerst als Neurochirurgin sowohl den Probenversand aus Kiel organisierte als auch im Verlauf der Arbeit mir bei der Korrektur unterstützend zur Seite stand. Dafür möchte ich ihr sehr danken. Ebenfalls danken möchte ich Dr. Darko Markovic, welcher ebenfalls von neurochirurgischer Seite von klinischer Seite die Organisation und Versorgung der Tumorproben übernahm.

Einen besonderen Dank möchte ich auch an das gesamte Team der „Advanced Light Microscopy“ richten, insbesondere Konstantin Grohmann und Matthias Richter für die technische Supervision und viel unkomplizierte, praktische Hilfe.

Meine erste Zeit im Labor war sehr geprägt von den Einarbeitungen insbesondere durch Martin Mersch, welchem ich viele praktische Hinweise und Ideen verdanke. Insgesamt möchte ich mich bei allen Labormitgliedern für Hilfestellungen und den konstruktiven, gedanklichen Austausch bedanken wie z.B. Dr. Meron Maricos, Dr. Philipp Jordan, Dr. Stefan Wendt, Dr. Niklas Meyer, Dr. Markus Semtner, Dr. Christiane Nolte, Dr. Dilansu Guneykaya, Dr. Verena Haage, Dr. Masataka Ifuku und Nina Schwendiger, um nur einige zu nennen. Ich schätzte die Anmerkungen, Korrekturen, Hinweise, Ideen und die praktische Hilfe aller Labormitglieder sehr.

Bei allen technischen Fragen standen mit alle biologisch-technischen Assistentinnen, Regina Piske, Maren Wendt und Nadine Scharek, stets unterstützend zur Seite. Diese Hilfe möchte ich hier ausdrücklich dankend erwähnen. Für organisatorische und administrative Fragen war Birgit Jarchow stets eine humorvolle Ansprechpartnerin.

Für die professionelle statistische Beratung möchte ich mich herzlich bei Dario Zocholl und Konstantin Göbler bedanken.

Allen die mich über die gesamte Zeit der Doktorarbeit begleiteten, berieten, motivierten, nachfragten und in schwierigen Momenten aufmunternd zur Seite standen, bin ich sehr

dankbar und schätze mich glücklich diese in meinem Umfeld zu haben. Hier möchte ich Beate, Dietmar, Lara, Martin, Dominik, Anton, Sarah, Elena, Swaantje, Tim, Merle, Annika, Nico, Klara, Lennart, Marisa, Benno, Pia, Christoph, Josephine, Patricia, Kai, Philipp, Elena, Henrike, Christian, Paula, Birte, Manuel, Cosimo, Sim und Clara nennen und allen ausdrücklich danken.