

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

DISSERTATION

Anwendung eines GL261-Tumormodells in CCR2-defizienten  
Mäusen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Matthäus Felsenstein

aus Berlin

Datum der Promotion: 09.09.2016

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1. Zusammenfassung/Abstract .....</b>	<b>1</b>
1.1. Zusammenfassung .....	1
1.2. Abstract .....	2
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>4</b>
2.1. Glioblastoma multiforme (GBM).....	4
2.2. CCL2-CCR2 Signalweg .....	6
2.2.1. CCR2-Defizienz in Mausmodellen .....	8
2.3. Mikroglia .....	9
2.4. Tumorassoziierte Makrophagen und Mikroglia.....	11
2.5. Fragestellung.....	13
<b>3. Materialien und Methoden .....</b>	<b>15</b>
3.1. Material und Software.....	15
3.1.1. Geräte/Hersteller .....	15
3.1.2. Chemikalien/Puffer/Lösungen.....	15
3.1.3. Zellkulturmedien/Zusätze .....	16
3.1.4. Software .....	17
3.2. Tierexperimentelles Arbeiten .....	17
3.2.1. Versuchstiere.....	17
3.2.2. Genotypisierung.....	18
3.2.2.1. Lyse der Biopsieproben .....	18
3.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Identifizierung des Genotyps .....	19
3.2.3. Narkoseverfahren .....	20
3.2.4. Stereotaktische intrazerebrale Tumorzellimplantation (TZI) .....	21
3.2.5. MRT-Analyse.....	23
3.2.6. Kardiale Gehirnperfusion .....	24
3.3. Zellkultur.....	25
3.3.1. Kultivierung der GL261 Tumorzelllinie .....	25
3.3.1.2. Splitten .....	26
3.3.1.3. Einfrieren .....	26
3.3.1.4. Zellkultivierung vor Tumorzellimplantation .....	27
3.3.2. Zellseparation und Aufreinigung .....	27
3.3.3. Chamber-Slides .....	29
3.4. Proteinbiochemie.....	30
3.4.1 Histologische Aufarbeitung .....	30

3.4.2. Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung .....	31
3.4.3. Immunfluoreszenzmikroskopie/Immunhistochemie .....	31
3.4.3.1. Prinzip .....	31
3.4.3.2. Vorgehen .....	32
3.4.4. ApopTag®Red in situ (Kit Methode) .....	33
3.4.4.1. Prinzip .....	33
3.4.4.2. Vorgehen .....	34
3.4.5. Immunzytochemie.....	34
3.4.6. FACS-Analyse .....	35
3.4.6.1. Prinzip der Durchflusszytometrie.....	35
3.4.6.2. FACS-Analyse vitaler Zellen .....	36
3.4.5.3. FACS-Färbung.....	36
3.5. Datenanalyse.....	38
3.5.1. Tumolvolumetrische MRT-Analyse .....	38
3.5.2. Auswertung Fluoreszenzmikroskopie.....	39
3.5.2.1. Analyse der Makrophagen/Mikroglia .....	40
3.5.2.2. Gefäßanalyse .....	40
3.5.2.3. Analyse der Zellproliferation/-apoptose.....	41
3.5.3. Auswertung der FACS-Analyse .....	41
3.5.4. Statistische Auswertung.....	42
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
4.1. Überexpression von CCR2 auf Mikroglia/Makrophagen im Gliom-Modell .....	43
4.2. Zucht und Typisierung der CCR2ko-Mäuse .....	44
4.3. Charakterisierung der IBA1 <sup>+</sup> -Mikroglia: Wildtyp vs. CCR2ko.....	45
4.3.1. Vergleichbare Verteilung IBA1 <sup>+</sup> -Mikroglia im naivem Gehirngewebe .....	46
4.3.2. Mikroglia zeigen unterschiedliche Morphologie <i>in vitro</i> .....	47
4.4. Mikroglia/Makrophagen: Akkumulation und Phänotyp im Gliom-Model bei CCR2-Defizienz .....	49
4.4.1. Veränderte Zusammensetzung von Immunzellen in CCR2ko-Mäusen nach TZI.....	49
4.4.2. Verminderte intratumorale Akkumulation von IBA1 <sup>+</sup> -Mikroglia/Makrophagen in CCR2ko-Mäusen .....	51
4.4.3. Unveränderte proliferative und apoptotische Aktivität der Mikroglia/Makrophagen im Tumorgewebe .....	52
4.4.4. <i>In vivo</i> Expression von Monozyten-/Makrophagen-Markern CD11b und CD68 .....	54
4.4.5. <i>In vivo</i> Expression von Markern für die Antigenpräsentation MHC-I und MHC-II.....	56
4.4.6. Expression ko-stimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86.....	58
4.5. Einfluss des CCR2-Defizits auf die TumorgroÙe.....	59

4.5.1. Vergleichbares infiltratives Wachstum anhand Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung.....	60
4.5.2. Beschleunigtes Tumorwachstum in CCR2ko-Mäusen .....	61
4.5.3. Größere Tumorumfängen der CCR2ko-Mäuse bei erhöhter proliferativer Aktivität und gleichbleibender Apoptoserate der Tumorzellen .....	63
4.6. Veränderte Vaskularisierung in Tumoren CCR2-defizienter Mäuse .....	64
4.6.1. Vergleichbare Gefäßdichte und –fläche in normalem Gehirnparenchym .....	65
4.6.2. Keine Unterschiede in Gefäßdichte und –fläche in Tumorebenen.....	66
4.6.3. Differenzierte Betrachtung verdeutlicht Veränderung der Gefäßarchitektur .....	67
4.7. Reduzierte Interaktion zwischen IBA1 <sup>+</sup> -Mikroglia/Makrophagen und intratumoralen Blutgefäßen in CCR2ko-Mäusen .....	69
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>70</b>
5.1. Kritische Betrachtung des verwendeten Mausmodells .....	70
5.1.1. CCR2 knock-out Modell .....	70
5.1.2. Das syngene GL261-Gliommodell .....	71
5.2. Einfluss der CCR2-Defizienz auf die myeloide Zellpopulation.....	73
5.2.1 Charakterisierung der Mikroglia/Makrophagen.....	73
5.2.1.1. Expressionsprofil der Mikroglia/Makrophagen <i>in vitro</i> .....	73
5.2.1.2. Expressionsprofil der Mikroglia/Makrophagen <i>in vivo</i> .....	74
5.2.2. Rekrutierungsfunktion des CCL2-CCR2 Signalweges .....	75
5.3. Einfluss der CCR2-Defizienz auf die Tumorbilogie.....	78
5.3.1. Veränderung des Tumorumfängens bei erhöhter proliferativer Aktivität der Tumorzellen in CCR2ko-Mäusen .....	78
5.3.2. Veränderte Gefäßarchitektur bei Differenzierung in Mikro- und Makrogefäße.....	79
5.4. Die Funktion von Mikroglia/Makrophagen im Gliom-Modell und ihre mögliche therapeutische Bedeutung.....	82
<b>6. Verzeichnisse .....</b>	<b>84</b>
6.1. Literaturverzeichnis.....	84
6.2. Abkürzungsverzeichnis.....	93
6.3. Abbildungsverzeichnis .....	95
6.4. Tabellenverzeichnis .....	96
<b>7. Anhang.....</b>	<b>97</b>
7.1. Eidesstattliche Versicherung.....	97
7.2. Lebenslauf .....	98
7.3. Danksagung .....	99

# 1. Zusammenfassung/Abstract

## 1.1. Zusammenfassung

**Einleitung:** Das Glioblastoma multiforme (GBM) gehört zu den niedrig differenzierten Gliomen des zentralen Nervensystems (WHO IV°) mit ausgesprochen schlechter Prognose. Daher ist ein tieferes tumorbiologisches Verständnis dieser Entität notwendig. Die Tumormasse besteht zu einem großen Anteil aus infiltrierenden Mikroglia/Makrophagen (5-20%). Diese werden unter anderem durch CCL2-CCR2 Interaktion bei ausgeprägter Freisetzung von CCL2 aus Tumorzellen rekrutiert. Mikroglia/Makrophagen werden pro-tumorale und pro-angiogene Eigenschaften zugesprochen, die das Wachstumsverhalten der Gliome beeinflussen können. In einem Gliom-Mausmodell wurden daher im Zuge dieser Arbeit die tumorbiologischen Prozesse mit Fokus auf die Rekrutierung und Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen anhand von CCR2knock-out (CCR2ko)-Mäusen untersucht.

**Methoden:** Die syngene Tumorzelllinie GL261 wurde stereotaktisch in das Gehirnparenchym von CCR2ko- und C57Bl6/J-Mäusen (Wildtyp) implantiert. Anhand von MRT-Messungen wurden die Tumorumfänge im Verlauf bestimmt (d7, d14, d21) und verglichen. Die Gehirne wurden durch histologische Fixierung aufgearbeitet und sowohl der Phänotyp als auch die Anzahl der infiltrierenden Mikroglia/Makrophagen ermittelt. Die Vaskularisierung wurde anhand einer CD31-Färbung analysiert. Eine weitere Charakterisierung der Immunzellen erfolgte nach Homogenisierung des Hirngewebes. Hierbei wurden vitale Abwehrzellen anhand von Oberflächenmarkern mit Hilfe einer FACS-Analyse untersucht. Mikroglia wurden zudem aus naivem Gewebe via MACS-Technologie isoliert und über mehrere Tage kultiviert.

**Ergebnisse:** Die Analyse der CCR2ko- und der Wildtyp-Mäuse ergab eine ähnliche Ausgangssituation im Gehirn, wobei sowohl die Anzahl der Mikroglia als auch die Gefäßdichte vergleichbar waren. Nach Tumorzellinokulation zeigten sich jedoch eindeutige Unterschiede. Es wurde eine verringerte Akkumulation der Mikroglia/Makrophagen um 30% (p-Wert 0,0018) im Tumorgewebe der CCR2ko-Mäuse detektiert. Diese beruhte auf einer reduzierten Rekrutierung und nicht etwa auf einer verminderten Proliferation oder erhöhten Apoptoserate dieser Zellen. Die FACS-Analyse

zeigte die veränderte Immunzellzusammensetzung anhand der Oberflächenmarker CD11b und CD45. Die verbliebenen intratumoralen Mikroglia/Makrophagen in den CCR2ko-Mäusen exprimierten charakteristische monozytäre Marker wie IBA1, CD11b und CD68, sowie Moleküle zur Antigenpräsentation (MHC-I/MHC-II). Die verminderte Anzahl an Mikroglia/Makrophagen im Tumorgewebe der CCR2ko-Tiere ging einher mit signifikant größeren Tumorumfängen (p-Wert 0,0005). Trotz im Mittel verdoppelter Tumorgößen waren keine Unterschiede in der Gefäßdichte oder -fläche nachzuweisen. Jedoch verdeutlichten detaillierte und differenzierte Untersuchungen der Gefäße eine veränderte Gefäßstruktur.

**Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen den Einfluss des CCL2-CCR2 Signalwegs auf die Mikroglia/Makrophagen-Population und Tumorprogression. So konnte im verwendeten CCR2ko-Modell gezeigt werden, dass die verminderte Rekrutierung von Mikroglia/Makrophagen mit einem verstärkten Gliomwachstum einhergeht. Folglich scheinen Mikroglia/Makrophagen, die unabhängig vom CCL2-CCR2 Signalweg im Tumor akkumulieren, pro-tumorale Eigenschaften zu haben. Die genauere Charakterisierung dieser verbliebenen Mikroglia oder Makrophagen könnte für die Entwicklung zukünftiger Behandlungskonzepte für GBMs von großer Bedeutung sein.

### 1.2. Abstract

**Objective:** Glioblastoma multiforme (GBM) belongs to the most malignant glial tumor type (WHO IV°) with poor prognosis. Therefore, more profound tumor-immunological understanding is necessary. Glioma consist of large amounts of infiltrated microglia/macrophages (5-20%). These cells are recruited through chemo-attractants such as CCL2 released to a great extend by tumor cells. Microglia/macrophages presumably possess pro-tumoral and pro-angiogenic properties affecting tumor development. The aim of the study was to analyze possible alterations in tumor biology of CCR2-deficient mice with focus on recruitment and activation of microglia/macrophages during glioma growth.

**Methods:** The glioma cell line (GL261) was stereotactically implanted into the brain parenchyma of transgenic CCR2ko- as well as C57Bl6/J-mice (wildtype). Using MRI-analysis, tumor volumes were measured and compared at specific time points (d7, d14, d21). Brain tissue was prepared and fixed for histological analysis. Here, the amount of infiltrating immune cells and phenotype were determined. Vascularization was assessed via immunohistochemistry performed with CD31-staining. In addition, the characterization of vital immune cells was applied by using Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS). Microglia isolated out of naïve brain tissues via MACS-technology were subsequently cultivated and observed for several days.

**Results:** Analyses of CCR2-deficient and wildtype-mice revealed similar phenotypes in naïve brain tissues when comparing the amount of microglia and the vessel-density within both mice strains. But differences occurred during tumor growth. Accumulation of microglia/macrophages was significantly reduced by up to 30% (p-value 0.0018) due to an impaired recruitment whereby no differences in proliferative activity or rate of apoptosis were displayed. Staining of cells with CD11b- and CD45-antibodies and subsequent FACS-analysis revealed an altered immune cell composition. Remaining microglia/macrophages expressed characteristic monocyte markers (IBA1, CD11b, CD68) and molecules for antigen presentation (MHC-I, MHC-II). The CCR2-deficient mice showed significantly increased tumor volumes (p-value 0.0005) and enhanced proliferative activity of tumor cells despite unchanged vessel-density and -area within tumor tissue. But detailed analyses of the vasculature revealed structural changes, which might be responsible for tumor biological changes.

**Conclusion:** Our data clearly demonstrate the importance of CCL2-CCR2 signaling in the context of microglia/macrophage accumulation and glioma progression. The recruitment of microglia/macrophages into the tumor tissue was significantly diminished affecting tumor biology and enhancing tumor growth. Remaining intratumoral immune cells exhibit signs of pro-tumoral properties. More detailed characterization could make them to interesting targets for future glioma therapies.

## 2. Einleitung

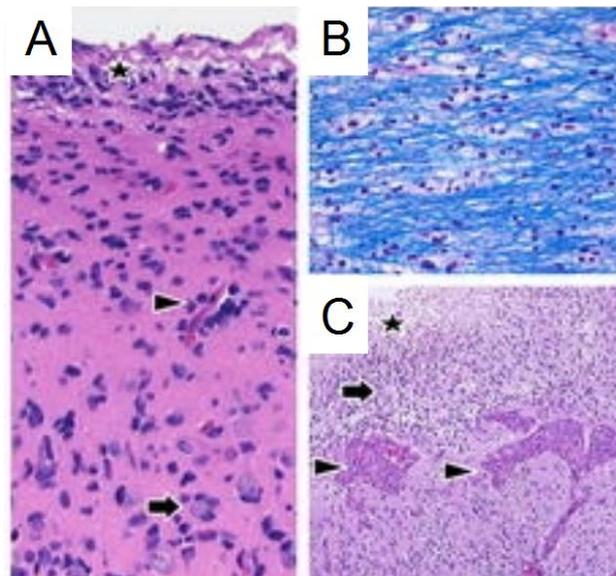
### 2.1. Glioblastoma multiforme (GBM)

Die GBM gehören als hirneigene histologisch schlecht differenzierte Gliome (WHO Grad IV) zu den hoch malignen und aggressivsten Tumoren des Menschen. Sie machen mit einem Anteil von 60-70% die größte Gruppe der Gliome aus, sind mit 45,6% die häufigsten malignen Gehirntumore und kommen gehäuft in zunehmenden Alter vor (1, 2). So treten jedes Jahr 3,19 neue Fälle auf 100000 Einwohner weltweit auf (2). Aufgrund seiner ausgeprägten Malignität und der bisher unzureichenden therapeutischen Möglichkeiten ist die GBM-Forschung weiterhin von immenser wissenschaftlicher Bedeutung (3).

Derzeit existiert nach aktuellem wissenschaftlichen Stand kein kurativer Therapieansatz für das GBM (3). Auch bei optimaler Therapie haben die Patienten bei Diagnosestellung ein medianes Überleben von nur 12 bis 15 Monaten, sowie eine 3-Jahresüberlebensrate von 8,7% (2). Bisher konnten keine spezifischen Risikofaktoren, bis auf einen nachgewiesenen Zusammenhang mit vorangegangener Strahlentherapie, eruiert werden (4). Die ausgeprägte Malignität wird dem diffusen und infiltrativen Wachstumscharakter der Tumorzellen zugeschrieben. Dadurch ist es dem GBM möglich, entlang der myelinisierten Fasern der weißen Hirnsubstanz, perineuronal, den Meningen (subpial) und der perivaskulären Bindegewebsstränge in das Gehirnparenchym vorzudringen (5). Weiterhin charakteristisch sind die ausgeprägten Hypoxie bedingten Zellreaktionen. Diese sind verantwortlich für die namensgebende histologische und zytologische Heterogenität, hohe Anteile nekrotischer Tumorareale und die Pseudopalisadenbildung (Abb. 2-1) (5, 6).

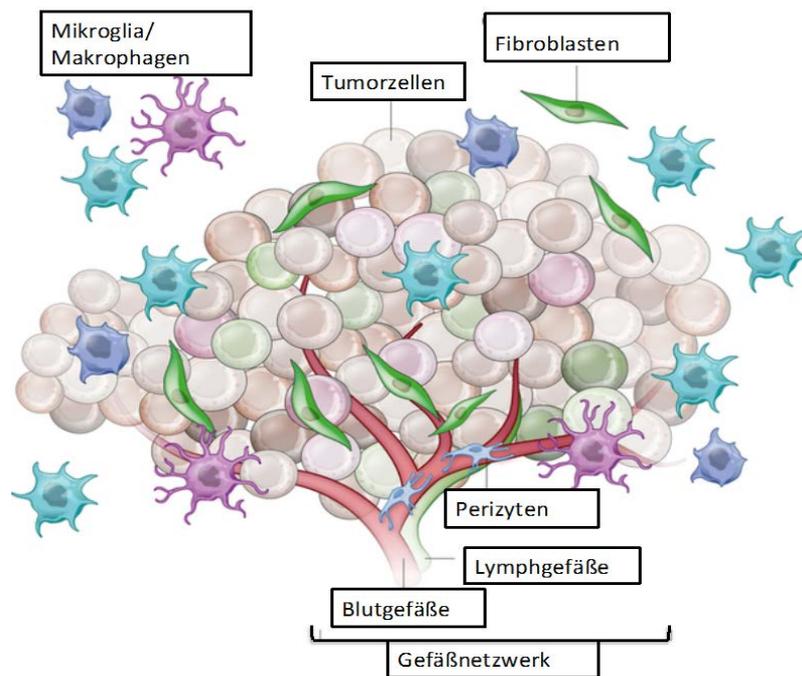
Nach heutigem Verständnis erfolgt die Einteilung in primäre und sekundäre Glioblastome nach biologischen und genetischen Gesichtspunkten (7, 8). Primäre Glioblastome kommen vorwiegend bei älteren Patienten über 50 Lebensjahren vor und sind mit >90% die wesentlich häufiger vorkommende GBM-Form. Sie besitzen charakteristische genetische Veränderungen, wie beispielsweise EGFR-Mutationen, PTEN-Mutationen auf Chromosom 10 oder p16-Deletionen und entwickeln sich sehr schnell *de novo* ohne nachweisbare Vorläuferläsionen. Sekundäre Glioblastome kommen hingegen vorwiegend bei jüngeren Patienten vor und entwickeln sich aus low-grade oder anaplastischen Astrozytomen. Sie zeigen ein anderes genetisches Profil mit Mutationen

auf p53, PDGFR-Überexpression und andere Abnormitäten im p16- und Retinoblastom-Signalweg. Trotz dieser eindeutigen Unterschiede ist es rein nach morphologischen und histologischen Gesichtspunkten kaum möglich, zwischen diesen beiden Formen zu unterscheiden. Die eindeutige Zuordnung der Tumorform ist dennoch von entscheidender Bedeutung aufgrund der unterschiedlichen therapeutischen Behandlungskonzepte (7, 8).



**Abb. 2-1 Histologische Eigenschaften von GBM.** (A) Subpiales Wachstum entlang der Meningen (Sternchen), sowie perineuronale Satellitose (Pfeil) und mikrovaskuläre Proliferation (Pfeilkopf). (B) Diffuse Zellvermehrung und Infiltration von Tumorzellen entlang gut erhaltener myelinisierter neuronaler Fasern. (C) Nekrotische Areale (Sternchen) mit umliegenden Pseudopalisaden (Pfeil) und mikrovaskulärer Proliferation (Pfeilköpfe). Modifiziert nach Claes *et al.* (2007) (5).

Die Tumormasse eines GBM besteht nicht rein aus Tumorzellen, sondern auch zu einem großen Anteil aus Abwehrzellen wie Mikroglia und Makrophagen, Endothelzellen, Astrozyten, Fibroblasten und Perizyten (Abb. 2-2) (9). Dabei machen Mikroglia/Makrophagen 5-20% der gesamten Tumormasse aus (10). Es wird angenommen, dass diese nicht-neoplastischen Zellen einen enormen Einfluss auf das Tumorwachstum und die Tumorbilogie ausüben und daher von wesentlichem Interesse für mögliche experimentelle und sogar klinische Therapieansätze sein könnten (11-13).



**Abb. 2-2 GBM-Mikromilieu.** Die Tumormasse im GBM setzt sich neben den entarteten Tumorzellen aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen und Strukturen zusammen, die das Tumor-Mikromilieu bilden. Modifiziert nach Junttila & de Sauvage (2013) (14).

Die radikale Resektion des Tumorgewebes unter besonderer Berücksichtigung eloquenter oder sogar lebensnotwendiger Areale, sowie die adjuvante Strahlen- und Chemotherapie stellen nach wie vor den therapeutischen Goldstandard dar (15-17). Zuletzt schien durch die adjuvante Gabe des Chemotherapeutikums Temozolamid eine zwar beschränkte, aber dennoch nachweisbare Lebensverlängerung von 12,1 zu 14,6 Monaten, sowie eine Erhöhung der 2-Jahresüberlebensrate von 10,4% auf 26,5% möglich zu sein (18). Durch die Erlangung eines tieferen Verständnisses der tumorbiologischen Prozesse des GBM sollte es in Zukunft möglich sein, zielgerichtete Therapiekonzepte zu entwickeln.

## 2.2. CCL2-CCR2 Signalweg

Der Chemokin-Rezeptor CCR2 ist ein G-Protein gekoppeltes 7-Transmembranprotein auf der Zelloberfläche unterschiedlicher Leukozyten wie Makrophagen, dendritischen Zellen, basophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten (19). Er gehört zu der CC-Chemokinrezeptor-Familie. Diese ist gekennzeichnet durch das direkte

Aufeinanderfolgen N-terminal liegender Cysteinreste auf einer dafür definierten Aminosäuresequenz (20). Der wichtigste CCR2-Rezeptorligand ist CCL2/MCP-1 (Monocytic Chemotactic Protein 1). Jedoch interagieren auch weitere Chemokine wie CCL7, CCL11 und CCL13 und führen gemeinsam zu einer Rekrutierung von rezeptortragenden Leukozyten (19, 21, 22). Während inflammatorischer Prozesse werden vornehmlich  $\text{Ly6C}^{\text{high}}/\text{CCR2}^+/\text{CX3CR1}^{\text{low}}$  Zellen im Sinne von peripheren Monozyten und professionell antigen-präsentierende Zellen aus dem Knochenmark ins Blut bis hin zum entzündlichen Gewebe rekrutiert (19, 23-25).

Die entscheidende Rolle von CCR2 in entzündlichen Prozessen wurde in unterschiedlichen Mausmodellen nachgewiesen: So werden Makrophagen, die während atherosklerotischer Prozesse einwandern und wesentlich zur Pathogenese dieser Gefäßerkrankung beitragen, über diesen Signalweg rekrutiert (26-28). Während neuroinflammatorischer Prozesse, beispielsweise induziert durch das EAE-Mausmodell für Autoimmunenzephalitis, infiltrieren Abwehrzellen ebenso vornehmlich über diesen Signalweg (29, 30). Hier konnte im Menschen eine Korrelation zwischen CCL2-Genexpression und der Prädisposition für Multiple Sklerose festgestellt werden (31). Auch im Mausmodell induzierte Schlaganfälle führten zur Infiltration von Monozyten, deren Einwanderung nachweislich über spezifische CCR2-Depletion vermindert werden konnte. Die dadurch reduzierte Entzündungsreaktion ging mit einem verbesserten Outcome der Versuchstiere einher (32, 33).

Aufgrund dieser und verschiedener anderer Studien, sowie dem Wissen der besonderen Rolle von Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs), fand der CCL2-CCR2 Signalweg in einer Vielzahl von Tumormodellen Anwendung. TAMs werden zum Teil proinflammatorische als auch pro-tumorale Eigenschaften zugeschrieben (2.4.), die das unkontrollierte Tumorzellwachstum verstärken und die Tumorprogression weiter fördern (34-36). So konnte man zuletzt zeigen, dass die CCR2-CCL2 Interaktion im Sinne einer veränderten Monozyteninfiltration in der Tumorprogression und Metastasierung eine zentrale Rolle einnimmt (37, 38).

Diese Erkenntnisse finden auch schon länger in der Gliom-Tumorimmunologie Beachtung und therapeutische Ansätze in Form von spezifischer CCL2-Depletion zur Reduktion der TAMs werden bereits mit noch zu überprüfendem Erfolg verfolgt (39). Es konnte nachgewiesen werden, dass CCL2 in hoher Konzentration von Gliom-Zellen auch im Menschen produziert wird und dort zur Akkumulation von Makrophagen führt (40-42).

Weiterhin zeigt die CCL2-abhängige Makrophagen-Rekrutierung ein verstärkt infiltratives Wachstum der Gliome und trägt zu der Aggressivität des Tumors bei (43).

Seit Entwicklung der RFP/CCR2-knockin-Reportermaus durch Saederup *et al.* (2010) wurde eine anerkannte Unterscheidung von ortsständigen Mikroglia (CCR2<sup>-</sup>CX3CR1<sup>+</sup>) und myeloiden Makrophagen (CCR2<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup>) durch diesen Rezeptor postuliert und in mehreren Versuchsansätzen angewendet (44-46). Jedoch wird von manchen auch der Standpunkt vertreten, dass ebenso ortständige Mikrogliazellen CCR2 exprimieren und gleichermaßen von diesem Signal angelockt werden können (43, 47). Zusammenfassend wurde in der Literatur die Rolle von CCR2 während entzündlicher Prozesse als wesentlicher Rekrutierungsfaktor bereits eingehend untersucht und als mögliches therapeutisches Target näher betrachtet (25, 48). Jedoch sind bis heute nur unzureichende Erfolge und Effekte durch bis in Phase-II Studien geprüfte anti-CCR2 Therapien zu verzeichnen (19, 49, 50). Ursächlich hierfür ist am ehesten das noch mangelnde Verständnis der genauen pathophysiologischen CCR2-Funktion in der ausgeprägten Komplexität entzündlicher Prozesse.

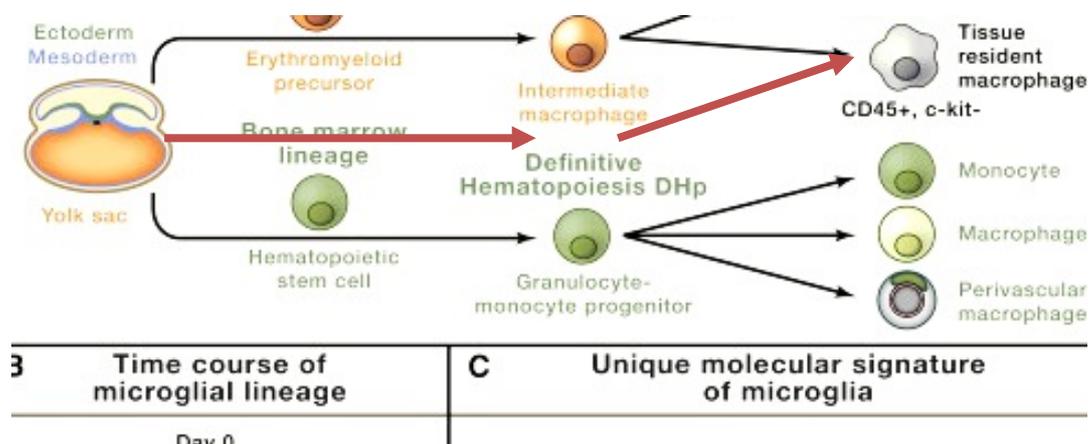
### 2.2.1. CCR2-Defizienz in Mausmodellen

Zur Untersuchung der *in vivo* Funktion des CCL2-CCR2 Signalwegs unter unterschiedlichen pathologischen Konditionen und in unterschiedlichen Modellen, wurde eine CCR2-knock-out Maus von Kuziel *et al.* (1997) generiert (51). Diese zeigt eine reduzierte Funktionalität des Rezeptors durch gezielte Deletion des Genlokus. Die CCR2ko-Mäuse sind fertil, vermehren sich nach erwarteter Mendelscher-Ratio und weisen keine morphologischen oder andere entwicklungsbedingte Abnormitäten auf (51, 52). Es konnte phänotypisch eine deutliche Reduktion der Rekrutierungsfunktion myeloider Monozyten während inflammatorischer Prozesse nachgewiesen werden (51, 52).

Das CCR2ko Modell wurde bereits erfolgreich und vielfach in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen angewandt (53-55). In Tumormodellen wurde die Disruption des CCL2-CCR2 Signalweges bisher unzureichend untersucht und nach unseren Erkenntnissen bisher noch nicht in einem Glioblastom-Mausmodell analysiert (56).

## 2.3. Mikroglia

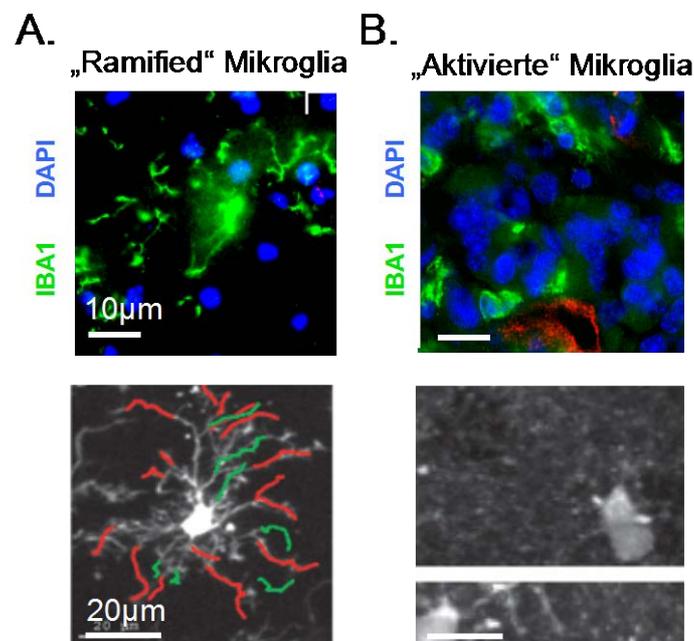
Mikroglia wurden erstmalig 1932 durch Rio-Hortega neben Astrozyten und Neuronen als weiteres Zellkompartiment beschrieben und er erkannte damals allein durch Silberimprägnation und Lichtmikroskopie die funktionellen Eigenschaften im Sinne von ortsständigen Abwehrzellen (57). Tatsächlich sind Mikroglia eine besondere hirneigene Zellpopulation und gelten als residente Makrophagen des zentralen Nervensystems (ZNS). Das besondere an ihnen ist, dass diese anders als die meisten anderen Gewebemakrophagen und Monozyten, nicht den klassischen myeloiden Vorläuferzellen entspringen, sondern sich früh in der ontogenetischen und hämatopoetischen Entwicklung aus primitiven Makrophagen im Dottersack differenzieren (44, 58, 59). Sie wandern von außen (subpial) ins Gehirn ein und manifestieren sich anschließend unabhängig und durch lebenslange Selbsterneuerung im Gehirn (60) (Abb. 2-3). Sie erneuern sich nach der embryonalen Entwicklung nicht mehr aus myeloiden Monozyten (61, 62).



**Abb. 2-3 Mikrogliaentwicklung.** Mikroglia entwickeln sich in der frühen embryonalen Phase aus Vorläuferzellen im Dottersack, anders als die von den hämatopoetischen Stammzellen abstammenden myeloiden Monozyten und die Mehrzahl der Gewebemakrophagen. Modifiziert nach Salter & Beggs (2014) (60).

Mikrogliazellen machen im gesunden Gehirngewebe etwa 10% aller Zellen im ZNS aus (63). Unter diesen physiologischen Bedingungen bilden sie ausgeprägte Ausläufer aus. In dieser vermeintlich inaktiven Form werden sie als „verzweigte“ („ramified“) Mikroglia bezeichnet (Abb. 2-4) (64, 65). In diesem „ruhenden“ Stadium sind sie entgegen der

früheren Auffassung hoch-aktiv, überwachen ihre Umgebung über ihre kontraktile Fortsätze und haben hierbei eine zentrale homöostatische Funktion im ZNS (66). Bei Störungen dieser Homöostase, wie z.B. bei Entzündungen, Ischämien, Tumoren usw. kommt es zu morphologischen Veränderungen in Form einer Abnahme der Fortsatzanzahl. Sie nehmen eine amöboide Zellform an und können sich in dieser aktivierten Form entlang chemotaktischer Signale bewegen und in entferntere Areale einwandern. Ähnlich wie Gewebemakrophagen besitzen sie die Fähigkeit der Phagozytose und können Störfaktoren dadurch aktiv bekämpfen (64). Außerdem können sie über die Freisetzung von Chemokinen andere Abwehrzellen rekrutieren (67). Diese morphologische als auch funktionelle „Aktivierung“ lässt sich in *in vitro* Kulturen durch Aktivierungssignale induzieren und verdeutlicht die sensible und zügige Reaktion der Mikroglia auf Veränderungen in der Umgebung (68).



**Abb. 2-4 „Ruhende“ und „aktivierte“ Mikroglia *in vivo*.** (A) Darstellung von IBA1-markierten Mikroglia aus naivem Gehirn- und (B) Tumorgewebe von C57Bl/6J-Mäusen (oben). Die Aktivierung mit Verminderung der Anzahl der Fortsätze durch Retraktion (rechts-unten) aufgenommen durch 2-Photonen-Mikroskopie. Modifiziert nach Nimmerjahn *et al.* (2005) (66) & eigene Immunfluoreszenzen (oben).

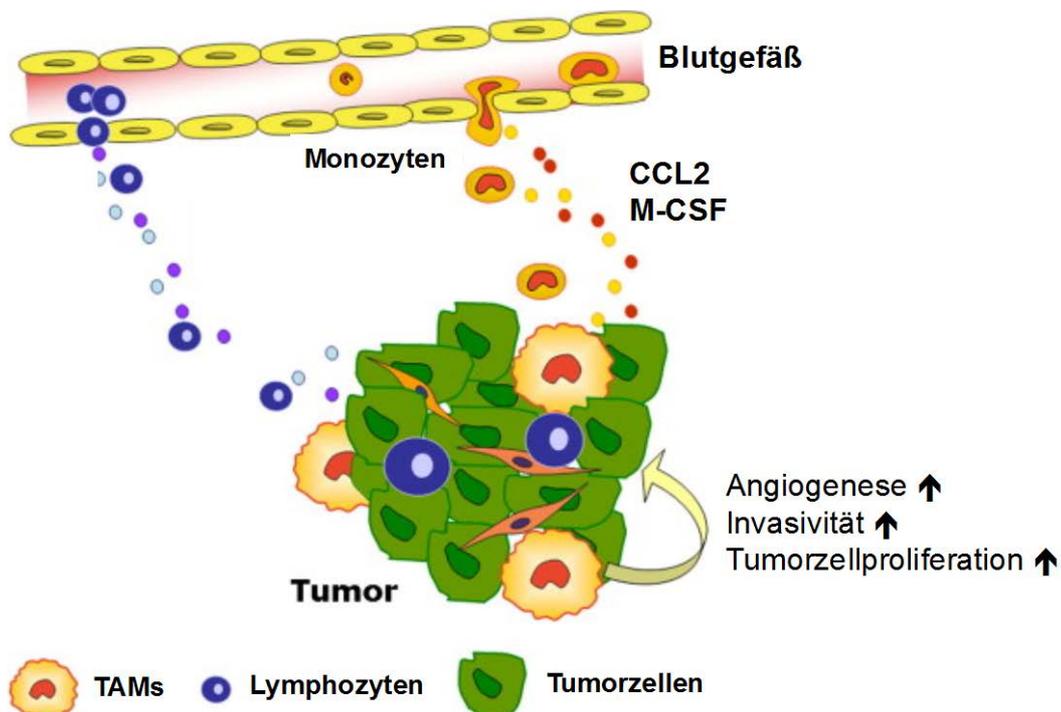
Die Identifikation und Visualisierung von Mikroglia in neuronalem Gewebe wurde durch unterschiedliche Oberflächen- oder intrazelluläre Moleküle realisiert. So wurden Moleküle wie z.B. Isolectin B4 entdeckt, die zwar Mikroglia sichtbar anfärben können, deren funktionelle Bedeutung aber weiterhin unklar bleibt (69). Wesentlich spezifischer waren

Strukturen, denen eine eindeutige etablierte Funktion, wie z.B. Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle, Enzyme, zugeschrieben werden konnten. Mit der Entdeckung von IBA1, als wesentliches Protein des Calciumstoffwechsels, wurde ein relativ spezifisches Molekül mit weit verbreiteter Anwendung zur Visualisierung der Mikroglia (aber auch Makrophagen) etabliert (70). In neueren Studien werden neue Marker zur spezifischeren Mikroglia-Identifikation, wie P2ry12 und FCRLS, untersucht (71). Während der Aktivierung von Mikroglia, kommt es zur Hochregulation der meisten Oberflächenmoleküle wie IBA1 und CD11b (72). Manche ko-stimulatorischen Moleküle, wie CD80 und CD86 werden sogar nur in der aktivierten Form der Mikroglia und Makrophagen exprimiert (64). Da die Diskriminierung von Mikroglia zu anderen Zellen zwar relativ einfach, jedoch zu ähnlich strukturierten myeloiden Monozyten (Makrophagen) bisher noch nicht möglich war, wurde zunehmend nach Unterschieden in deren Expressionprofil gefahndet. Herkömmliche Makrophagen-Marker wie CD11b, IBA1 oder F4/80 können jedoch gleichermaßen auf allen ZNS-Mikroglia/Makrophagen während inflammatorischer Prozesse nachgewiesen werden (73). Es werden Ansätze verfolgt in denen anhand charakteristischer FACS-Färbungen durch die monozytären Oberflächenmoleküle CD45 und CD11b zwischen zwei unterschiedlichen CD11b-Populationen unterschieden werden kann. So wurde die CD45<sup>low</sup>-Population als reine parenchymale Mikroglia-Zellpopulation und die CD45<sup>high</sup>- als aktivierte/einwandernde Makrophagen-Population beschrieben (74-76). Jedoch wurde bereits erkannt, dass die Differenzierung, in eine CD45<sup>high</sup>- oder CD45<sup>low</sup>-Population vor allem bei zunehmend voranschreitender ZNS-Läsion nicht immer eindeutig erfolgen kann (64). Im Tumormodell konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass diese Klassifizierung tatsächlich nicht ausreicht (77).

### **2.4. Tumorassoziierte Makrophagen und Mikroglia**

Es ist bekannt, dass Leukozyten, insbesondere Makrophagen, einen hohen Anteil der Tumormasse ausmachen und damit das Mikromilieu innerhalb dieses Tumors bilden: Anfänglich noch in der Annahme, dass infiltrierende Makrophagen rein anti-tumorale, zytotoxische Eigenschaften besitzen und den Tumor versuchen aktiv zu bekämpfen (78). In den letzten zwei Dekaden wurde aber zunehmend deutlicher, dass diese Ansicht nicht ganz zutreffend war und TAMs direkt oder indirekt das Tumorwachstum sogar fördern

können (79, 80). In vielen Studien, insbesondere auch an Gliomen, konnte gezeigt werden, dass aus zunehmender Anzahl der TAMs eine schlechtere Prognose für die Patienten resultiert (79, 81, 82). Die Infiltration dieser Immunzellen wird durch die Freisetzung löslicher Faktoren wie den Chemokinen (CCL2, CCL5, CCL7 u.a.) und Zytokinen (M-CSF, VEGF) ausgelöst (83). CCL2 und M-CSF gelten als die potentesten Rekrutierungs- und Differenzierungsfaktoren für diese Makrophagen. Sie werden von Tumorzellen freigesetzt und führen zur Infiltration sowie Differenzierung der Makrophagen im Tumorgewebe (Abb. 2-5) (35, 84, 85). Während zu Beginn des Tumorwachstums meist gewebeumliegende Zellen angelockt werden, akkumulieren mit zunehmender Tumorgröße auch periphere myeloide Monozyten (77, 86).



**Abb. 2-5 Chemokinfreisetzung der Tumorzellen.** Chemokine/Zytokine wie CCL2/M-CSF werden durch Tumorzellen freigesetzt und führen zur Rekrutierung und Transmigration von myeloiden Monozyten. Diese differenzieren sich nach entsprechender Stimulierung im Tumor zu TAMs mit pro-tumoralen, pro-angiogenen M2-Eigenschaften. Modifiziert nach Allavena *et al.* (2011) (35).

Ebenso wird bei zunehmendem Tumolvolumen die nutritive Versorgung der Tumorzellen durch Angiogenese sichergestellt. Die Angiogenese ist ein hoch-komplexer, mehrstufiger Prozess. Dabei können TAMs eine wichtige Rolle spielen, da sie nachweislich pro-angiogene Faktoren wie VEGF, IL-8, CSF-1, MMP, Angiogenin und lysosomale Enzyme zur Gefäßneubildung freisetzen können (79, 87).

Die Tatsache, dass TAMs die adaptive anti-tumorale Immunantwort unterdrücken können, unterstreicht deren pro-tumorale Funktion. Dieses Phänomen wird als „alternative Aktivierung“ bezeichnet, welche der adaptiven regulatorischen T-Zell-Antwort ähnelt (88, 89).

Die intratumorale Umwandlung und Differenzierung von rekrutierten, myeloiden Monozyten in TAMs, wird durch die Freisetzung von TGF- $\beta$ , M-CSF, IL-10 und IL-4 vermittelt (88, 89). Die heterogenen Eigenschaften von Makrophagen werden durch das vereinfachte Modell einer M1/M2-Polarisation der Makrophagen beschrieben (88). Die Einteilung beruht auf dem Reaktionsverhalten der Makrophagen auf Aktivierungs- (INF- $\alpha$ ; LPS) und Inhibierungs-Faktoren (IL-4, IL-10, IL-13). Die verschiedenen polarisierten Makrophagen unterscheiden sich dabei durch die Expression/Sezernierung bestimmter Rezeptoren, Chemokine, Zytokine, sowie in deren Effektor-Funktionen (87, 88). Die M1-Makrophagen besitzen dabei eher zytotoxische, anti-tumorale und pro-inflammatorische und die M2-Makrophagen eher modulierende, adaptive und pro-tumorale Eigenschaften. Jedoch sollte berücksichtigt werden, dass *in vivo* Makrophagen unterschiedlichen und auch divergierenden Signalen ausgesetzt werden. Dadurch können diese Zellen vermutlich diverse funktionelle Zwischenstufen einnehmen, so dass ein Kontinuum zwischen diesen Aktivierungsstadien wahrgenommen werden sollte (88).

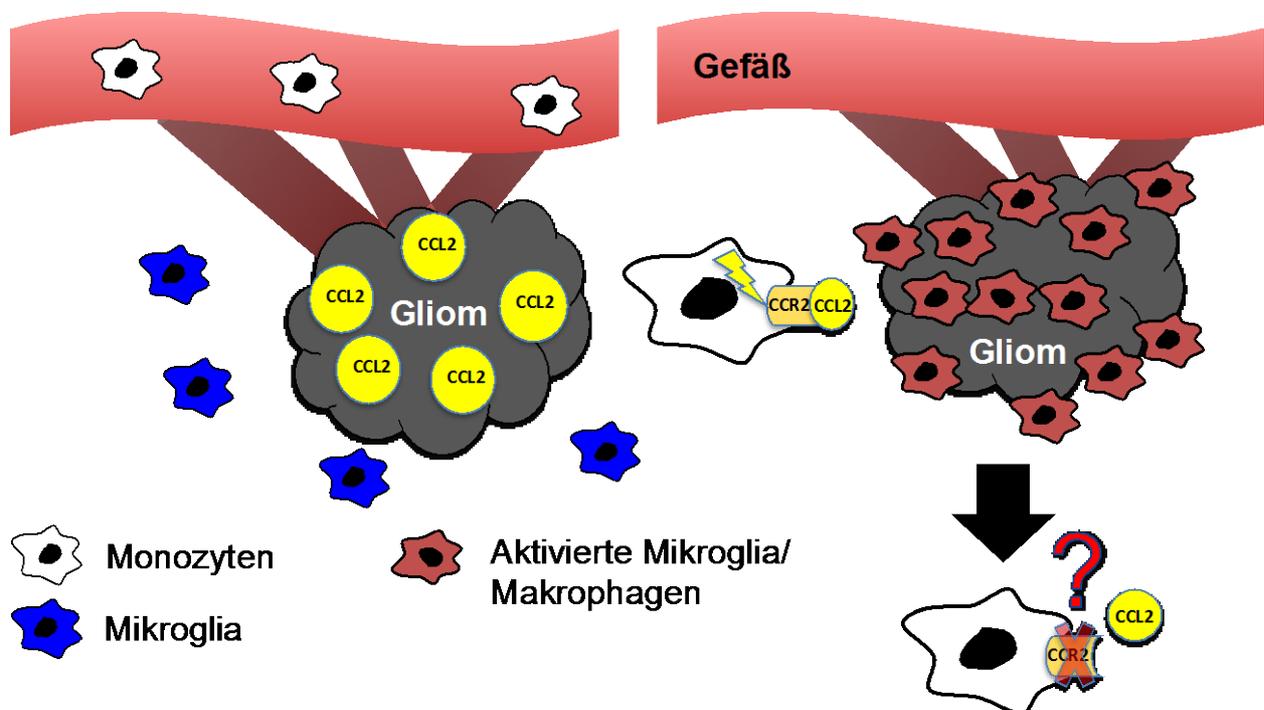
Es ist im Wesentlichen erforderlich tumorassoziierte Immunzellen differenzierter zu betrachten und ihre potentiell anti- oder pro-tumoralen Wirkungen in GBM-Modellen weiter zu untersuchen.

## 2.5. Fragestellung

Das GBM ist ein hochaggressiver Hirntumor, für den bisher keine kurativen Therapieansätze existieren. Während des neoplastischen Prozesses migrieren Mikroglia/Makrophagen, die einen hohen Anteil der Tumormasse ausmachen, ins Tumorgewebe. Ihre Funktion und ihr Einfluss im und auf den Tumor ist bisher im Wesentlichen noch unklar.

Anhand vorangegangener Experimente und Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, konnte auf RNS-Ebene eine deutliche Hochregulation des CCR2-Rezeptors auf infiltrierenden Mikroglia/Makrophagen beobachtet werden. Nach aktuellem wissenschaftlichem Stand über die Funktion des CCL2-CCR2 Signalwegs als Rekrutierungsfaktor für myeloide

Monozyten und der ausgeprägten Freisetzung von CCL2 aus Gliomzellen (Abb. 2-6), galt es im Rahmen dieser Arbeit die tumorimmunologischen Prozesse bei spezifischer Ausschaltung des Signalwegs zu untersuchen. Ziel war es daher, durch die Nutzung einer CCR2ko-Mauslinie in einem GBM-Mausmodell (syngene Tumorzelllinie GL261) den CCR2 Einfluss auf die Funktion der Mikroglia/Makrophagen zu analysieren. Hierbei sollten sowohl phänotypische als auch biologische Unterschiede im Tumorwachstum mit Wildtyp(C57Bl/6J)-Mäusen verglichen werden. Um einen möglichen Einfluss der Mikroglia/Makrophagen auf die Tumervaskularisierung festzustellen, sollten die CCR2ko-Mäuse auch auf mögliche Veränderungen des Gefäßwachstums untersucht werden. Zusammenfassend sollte die Anwendung CCR2-defizienter Mäuse neue Erkenntnisse im Einfluss der Mikroglia/Makrophagen auf die Gliom-Biologie erbringen.



**Abb. 2-6 Arbeitsmodell.** CCL2 wird von Tumorzellen in die Umgebung freigesetzt und führt nach Interaktion mit dem CCR2-Rezeptor auf der Oberfläche von Mikroglia/Makrophagen zu deren Akkumulation im Tumor. Es sollte ermittelt werden, wie sich eine CCR2-Defizienz im Gliom-Modell auswirkt.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Material und Software

##### 3.1.1. Geräte/Hersteller

Tab. 1: Zusammenfassung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelkammer	Biozym
FACS Canto II	BD Pharmingen
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss)
Haarschneidemaschine	Braun
Hamilton-Spritze, Serie 7000	MICROLITER®, Carl Roth GmbH
Inkubator Heraeus BBD620	Thermo Fisher Scientific
Kryostat MICROM HM 650	MICROM
Magnetrührer Yellowline	MSH
Nahtmaterial	Ethicon; Prolene
SuperFrost Plus Objektträger	Langenbrick
PCR- Cycler T-Gradient	Biometra
Pipetten	Eppendorf
Sicherheits-Sterilwerkbänke Hera Safe	Thermo Fischer Scientific
Stereotaktischer Rahmen	Stoelting
Thermomixer comfort	Eppendorf
VortexGenie II	Scientific Industries
Wippe Shaker DRS-12	NeoLab
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific

##### 3.1.2. Chemikalien/Puffer/Lösungen

Tab. 2: Zusammenfassung der verwendeten Puffer und Medien

Bezeichnung	Inhalt	Hersteller
Agarose 1%	1g Agarose in 100ml SDS-H <sub>2</sub> O	ROCHE
BSA 0,5%	5g Bovine Serum Albumin in 1L PBS	Sigma Aldrich
β-Mercapto-ethanol		Sigma Aldrich
Casein 0,5/1%	5g/10g Milchprotein in 1L PBS	Sigma Life Science
DAPI	4',6-diamidino-2- phenylindole	Sigma Aldrich

**Tab. 2: Zusammenfassung der verwendeten Puffer und Medien (Fortsetzung)**

Ethanol	Ethanol	Merck Milipore
Gelatine 2%	Von Kaltwasserfisch-Haut	Sigma Life Science
HBSS(+)	Hank Salt Solution mit Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG
HBSS(-)	Hank Salt Solution ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG
Iso-Propanol	Iso-Propanol	Merck Milipore
KCl	Kaliumchlorid	Merck Milipore
NaCl	Natriumchlorid	Merck Milipore
Nonidet P40 Substitute	Octylphenoxypolyethoxyethanol	ROCHE
PBS	Phosphat buffered saline aufgelöst in Millipore® - Wasser	Gibco
PFA 4%	40g Paraformaldehyd in 1L PBS	Sigma Aldrich
Platinum® Taq-Polymerase	Thermostabile Polymerase des thermophilen Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i> (Taq)	Invitrogen
Proteinkinase K	Proteinase aus <i>Tritirachium album</i>	ROCHE
RNAse-freies H <sub>2</sub> O	Durch Biofilter von RNAsen befreites Wasser	Sigma Aldrich
Saponin 0,5%	5g Sapogenin in 1L PBS/BSA	Sigma Aldrich
Tris (pH9)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma Aldrich
Triton X-100	t-Oct-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>x</sub> OH	Sigma Aldrich
Tween-20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate	SERVA Electrophoresis GmbH
0,5% Trypsin/EDTA	Trypsin in Natrium- Ethylendiamin-Tetraacetat	PAA Laboraties

### 3.1.3. Zellkulturmedien/Zusätze

**Tab. 3: Zusammenfassung der Zellkulturmedien**

Bezeichnung	Inhalt	Hersteller
DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium)	High Glucose + L-Glutamin + Pyruvat, + Phenolrot	Gibco
DMSO	Dimethylsufoxid	Merck Milipore
FCS 10%	Fötales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH

Natriumpyruvat (100 nM)	Pyruvat	PAA Laboratories GmbH
-------------------------	---------	-----------------------

**Tab. 3: Zusammenfassung der Zellkulturmedien (Fortsetzung)**

Pen/Strep	Penicillin Streptomycin (50 µg/ml) Lösung	PAA Laboratories GmbH
Trypsin 0,5%	Trypsin (0,5%)-EDTA Lösung	PAA Laboratories GmbH
X-vivo	Serumfreies hämatopoetisches Zellmedium + Gentamycin + Phenolrot	LONZA

### 3.1.4. Software

**Tab. 4: Zusammenfassung verwendeter Programme/Software**

Programm	Verwendung	Hersteller
Analyze 10.0	- MRT-Volumetrie	AnalyzeDirect
Axio Vision 4	- Immunfluoreszenz-Aufnahmen	Carl Zeiss
Excel 2010	- IF-Auswertung	Microsoft
FlowJo 7	- FACS-Auswertung	Tree Star Inc.
Graphpad Prism 5	- Statistik - Graphen	STATCON LaJolla; Carlifornia; USA
ImageJ	-Immunfluoreszenz-Auswertung - Bildbearbeitung	<a href="http://imagej.nih.gov/ij/download.html">http://imagej.nih.gov/ij/download.html</a>
ParaVision Version 4.0	- MRT-Aufnahmen	Bruker

## 3.2. Tierexperimentelles Arbeiten

### 3.2.1. Versuchstiere

In dieser Arbeit wurde für die *in vivo* Experimente ein syngenes Tumormodell des Glioblastoma multiforme verwendet. Dabei wurden murine GL261 Tumorzelllinien in die Gehirne von C57Bl/6J- (Charles River) und CCR2ko- (Prof. Heikenwälder, Helmholtz-Zentrum/München; nach *Kuziel et al.* 1997) stereotaktisch implantiert (3.2.4.). Die Mausinzuchtstämme C57Bl/6J zählen zum Standard in der immunologischen und onkologischen Forschung.

**Tab. 5: Charakteristika der verwendeten Tierart**

<b>Spezies</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Gewicht</b>	<b>Alter</b>
Mus musculus	Weiblich/Männlich	20-35g	6- 12Wochen

Die Mäuse wurden in einer hauseigenen Tierhaltung (Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin = FEM, Universitätsmedizin Charité Berlin) unter kontrollierten Bedingungen, in Polycarbonat-Käfigen, im 12 Stunden-Hell-/Dunkelrhythmus zu maximal 6 Tieren pro Käfig, gehalten. Die Käfige wurden mit grober Einstreu bestückt, sowie Nestmaterial wie Papiertücher, Rückzugshäuschen und Plastikröhren hinzugefügt. Die Mäuse wurden durch erfahrene Tierpfleger betreut.

Für die Versuchsdurchführung an Tieren wurde die erforderliche Qualifikation (Teilnahme am Tierkudkurs; FELASA A) nachgewiesen. Die Tierversuche erfolgten nach §8TierSchG in Übereinstimmung mit der Tierschutzgenehmigung des Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter der Registriernummer G0152/09.

### **3.2.2. Genotypisierung**

Zur Züchtung der Knock-Out (CCR2ko) Tiere und Auswahl von Mäusen mit eindeutigem genotypischen CCR2 „knock-outs“, war eine Genotypisierung aus lysiertem Schwanzgewebe notwendig. Die Lyse diente der Freisetzung von Desoxyribonukleotidphosphat (DNS)-Material aus den Zellen. Unter der eigentlichen Polymerase-Kettenreaktion(PCR) versteht man die anschließende mehrschrittige Sequenzierung und Amplifikation der DNS.

#### **3.2.2.1. Lyse der Biopsieproben**

Für die Andauung des Mausgewebes zur Freisetzung von DNS-Material wurde ein spezieller Lysepuffer benötigt (Tab.6). Der Lysepuffer (20µl/Biopsie) wurde mit Proteinase K (7µl/Biopsie) zusammengeführt und mit RNase freiem Wasser im Verhältnis 10:1 (207µl/Biopsie) aufgefüllt.

Im optimalen Wirkungsbereich der Proteinkinase K von 55°C wurde das Gewebe in einem Thermomixer bei 750rpm über Nacht lysiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte mittels Denaturierung bei 95°C über 10min. Anschließend konnte das Lysat bei -20°C weggefroren oder direkt für die PCR verwendet werden.

**Tab. 6: Ansatz des Lysepuffers für Schwanzbiopsien**

Ansatz	Menge
1M Tris (pH9)	5ml
1MKCl	25ml
Nonidet P40 Substitut	2,5ml
Tween 20	2,5ml
ddH2O	15ml
Lysispuffer	50ml

### 3.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Identifizierung des Genotyps

Die lysierten Proben wurden zur Auftrennung des Erbmaterials vom restlichen Gewebe bei 13.000rpm und 4°C für etwa 12 Minuten zentrifugiert. Aus dem Überstand der abzentrifugierten Lysate wurden 2µl Template-DNS/Probe entnommen und mit je 18µl Master-Mix in entsprechenden PCR-Reaktionsgefäßen zusammengeführt. Es waren 2 unterschiedliche Master-Mix Ansätze zur differenzierten Detektion des CCR2ko-Gens und des WT-Gens notwendig. Der jeweilige Master-Mix (WT- bzw. CCR2ko-Ansatz) bestand aus 8µl bzw. 8µl GoTaq (Taq-Polymerase), 7µl bzw. 4µl Primer-Delution und 3µl bzw. 6µl RNase-freiem Wasser. Die Primer-Delution setzte sich aus den entsprechenden Primer der komplementären DNS-Stränge (Tab.7), sowie den einzelnen Nukleotiden zusammen und wurde in einer vom Hersteller vorgegebenen Konzentration von 0,375µM mit RNase freiem Wasser verdünnt. Die PCR-Reaktionen zur DNS-Amplifikation wurden in Temperaturzyklus-Steuergeräten (Thermocycler) durchgeführt (Tab.8).

**Tab. 7: PCR-Primersequenzen**

Gen		Primersequenz (5´->3´)	Reference	Hersteller
WT	fwd	ACC TCA GTT CAT CCA CGG CAT AC	1609774	TIB Molbiol Berlin
	rev	CCC AAA GAC CCA CTC ATT TGC AGC	1609775	
CCR2ko	fwd	TTG TCA AGA CCG ACC TGT CCG	1609776	
	rev	GAC GAG ATC ATC GCC GTC GGG CA	1609777	

**Tab. 8: PCR-Ablauf im Thermocycler**

	CCR2ko	WT	
Initialisierung	94°C	2min	
Denaturierung	94°C	20sec	
Hybridisierung	60°C	30sec	x 45 CCR2ko
Elongation	72°C	5min	
Lagerung	4°C		x 35 WT

### 3.2.2.3. Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der DNS-Proben in der Gelelektrophorese nach ihrer Bandengröße verwendeten wir 1%-iges Agarosegel, welches mit Ethidiumbromid (1:1000) zur fluoreszierenden Darstellung der Banden versetzt wurde. Das PCR-Produkt, sowie ein DNS-Standard (DNS-Leiter) zur Größenbestimmung, wurden in die vorgesehenen Gelkammern pipettiert. Die DNS-Proben in der Agarose wurden unter 110mV Spannung und einer Stromstärke von 300A für etwa 40min laufen gelassen. Das Auftrennungsergebnis konnte in einer UV-Lichtkammer sichtbar gemacht und fotografiert werden. Für beide PCR-Ansätze wurde bei positivem Ergebnis eine Bande von 400bp erwartet.

### 3.2.3. Narkoseverfahren

Für die intrazerebrale Implantation von Tumorzellen (TZI), ebenso wie für die Perfusion der Gehirne, wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit einem Narkosegemisch narkotisiert.

**Tab. 9: Zusammensetzung der Narkose**

Narkose Zusammensetzung	Volumen	Hersteller
Ketanest® 100mg/ml	340µl	Pfizer
Rompun® 2%	120µl	Bayer
NaCl 0,9%	1620µl	Braun
Narkose-Mix	2080µl	

Jede Maus erhielt dabei eine Dosis des Narkose-Mixes von 60 $\mu$ l (bzw. 80 $\mu$ l) pro 10g Körpergewicht durch eine 30G-Kanüle intraperitoneal appliziert.

### 3.2.4. Stereotaktische intrazerebrale Tumorzellimplantation (TZI)

TZI ist eine etablierte Methode zur Implantation von Tumorzellen in Nagetieren und Realisierung eines orthotopen Gliom-Modells (90, 91). Es wurde eine stereotaktische intrazerebrale Tumorzellimplantation rechts-lateral mit der syngenen Tumorzelllinie GL261 in C57BL/6 Mäusen durchgeführt (92). Die Implantation von GL261 Tumorzellen gehört zu den am meisten genutzten murinen Gliom-Mausmodellen. Sie weisen nach Inokulation ein zügiges, aggressives und mäßig-infiltratives Wachstumsmuster in ihrem syngenen Empfänger, der C57BL6- Maus auf (92, 93). Die stereotaktischen Operationen wurden in speziellen OP Räumen des Laboratoriums durchgeführt und die dafür notwendigen Instrumente in einem Autoklaven sterilisiert.

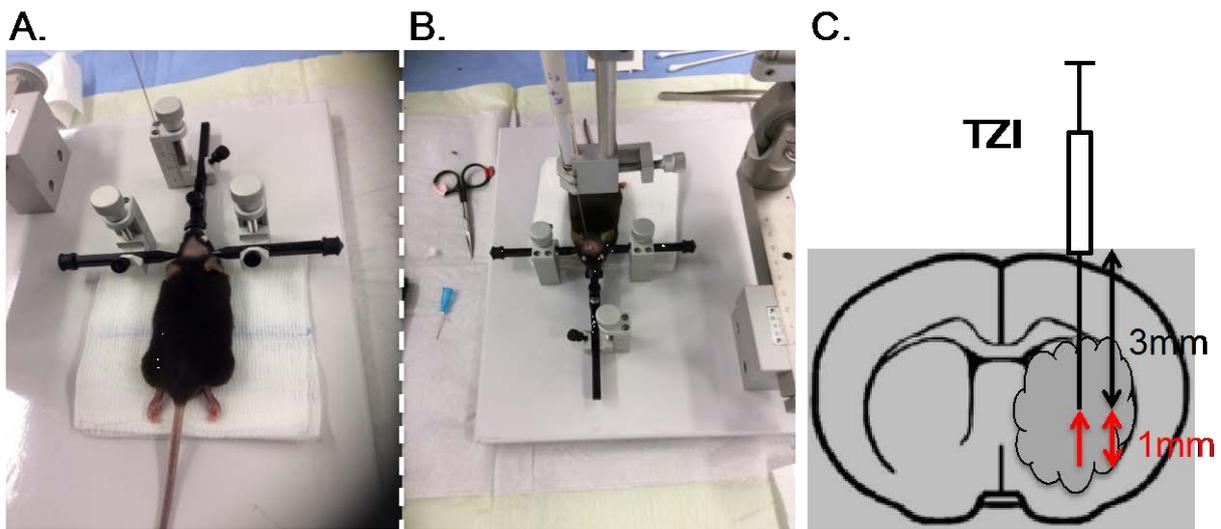
Nach Vorbereitung der Tumorzellen (3.3.1.4.), wurden die CCR2ko- sowie WT-Mäuse für ihre chirurgische Intervention durch die bereits beschriebene Narkosebehandlung vorbereitet (3.2.3.). Um die ausreichende Narkosetiefe sicherzustellen, wurde die Körperreaktion durch Zehenkneifen und Bestreichen der Vibrissen getestet. War die Anästhesie nicht tief genug, konnte der Narkosemix in geringer Dosierung (max. 50 $\mu$ l) zusätzlich subkutan verabreicht werden.

Die Kopfhare wurden durch eine elektrische Haarschneidemaschine entfernt. Die tief schlafende Maus wurde in eine spezielle stereotaktische Vorrichtung eingespannt (Abb. 3-1). Die stereotaktische Vorrichtung zur Fixierung der Kopfposition, ermöglichte millimetergenaue Korrekturereinstellungen, sowie eine akkurate und standardisierte TZI. Die Schneidezähne der Maus wurden in einer Beißschiene eingespannt und es erfolgte die korrekte Positionierung der Kopfhalteschiene. Zur Wärmeisolierung der Maus wurde eine Mullbinde als Unterlage verwendet. Um eine Austrocknung der Augen zu vermeiden, wurde anschließend eine Augensalbe aufgetragen.

Nach sachgerechter Vorbereitung wurde die chirurgische Prozedur begonnen. Die Haut wurde mit Iso-Propanol 70% zur Desinfektion befeuchtet. Zunächst wurde mit Hilfe einer Schere eine Hautinzision gesetzt und der Hautschnitt zur besseren Übersicht entsprechend erweitert. Das Bregma, der Kreuzungspunkt der Sutura coronalis (Kranznaht) und Sutura sagittalis (Pfeilnaht), als gut einsehbarer, schnell auffindbarer

Orientierungspunkt, diente der standardisierten und reproduzierbaren TZI. Daraufhin wurde die Hamilton-Spritze® in die entsprechende Vorrichtung des stereotaktischen Rahmens eingespannt (Abb. 3-1.B.). Die Hamilton-Spritze® wurde kurz vorher mit 1µl der Tumorzellsuspension, welche 20.000 Tumorzellen beinhaltete, aufgezogen. Zum Auffinden der korrekten Implantationsposition, wurde die Spritze 1mm anterior, sowie 2mm rechts-lateral vom Bregma entlanggeführt. Dieser Punkt wurde mit einem Stift markiert und dann mit einer 23G-Kanüle angebohrt. Austretendes Blut wurde mit einem Baumwollstab aufgesogen, um einen trockenen Bohrkanal zu sichern. Anschließend wurde die Hamilton-Spritze® in dem Bohrkanal positioniert und senkrecht zum Schädelknochen eingeführt. Wenn die Nadelspitze grade so in dem Bohrkanal eintauchte, begann die weitere Positionierung. Die Nadelspitze wurde 4mm in die Tiefe abgesenkt und das Gehirngewebe durchdrungen. Waren die 4mm erreicht wurde die Spritze wiederum um 1mm zurückgezogen, so konnte ein Reservoir für die Tumorzellsuspension und damit zur optimalen Zellansammlung geschaffen werden (Abb. 3-1).

Die Tumorzellsuspension wurde über einen Zeitraum von 5min gleichmäßig injiziert. Damit verhinderte man Zellschäden, sowie die optimale Ausbreitung der Zellen im Reservoir. Nachdem die Nadel für weitere 5min im Bohrkanal belassen wurde, wurde sie über weitere 5min langsam zurückgezogen. Die langsame Injektion und die sehr vorsichtige Entfernung der Nadel war für die konstante und optimale Verteilung der Tumorzellen im Gehirngewebe sowie zur Vermeidung unnötiger Gewebeerletzungen notwendig. Wenn die Nadel vollständig entfernt worden war, konnte die Maus aus dem stereotaktischen Rahmen genommen werden. Die Inzisionswunde wurde mit 4-0 monofilem nicht-resorbierbaren Nahtmaterial in einer fortlaufenden Nahttechnik genäht. Von post-interventioneller Bedeutung war der Wärmeerhalt der weiterhin narkotisierten Maus. Dafür wurde die Maus in einer Mullbinde auf einer Wärmeplatte bei 37°C warm gehalten. Die Vitalität wurde regelmäßig überprüft und kontrolliert bis die Maus das Bewusstsein wiedererlangte. Jetzt konnte die Maus in ihren ursprünglichen Käfig überführt werden.



**Abb. 3-1: Planung und Durchführung der stereotaktischen Tumorzellimplantation (TZI).** (A) Darstellung der eingespannten Maus im stereotaktischen Rahmen. (B) Sichtbar ist auch die eingespannte Hamilton-Spritze, die am fixierten Schädel der Maus und am Bregma orientierend justiert werden kann. (C) Intrazerebrale Positionierung der Spritze mit einer 4mm Distanz vom Bohrkanal nach basal und anschließendem Rückzug von 1mm. Hier wird die Tumorzellsuspension appliziert.

### 3.2.5. MRT-Analyse

Die Magnet Resonanz Tomographie (MRT) ist ein gängiges diagnostisches Schnittbildverfahren im klinischen Alltag. In der kranialen Bildgebung bietet es vor allem durch die sehr gute Auflösung von Weichteilstrukturen und ödematösen Veränderungen wesentliche Vorteile im Vergleich zu Röntgenstrahlen. Seit einiger Zeit hat das MRT auch einen festen Platz in laborexperimentellen Ansätzen, aufgrund der sehr guten Untersuchungsmöglichkeit auch kleinerer Tiere wie Mäuse und Ratten. Die experimentellen Messungen wurden an einem Bruker PharmaScan® 7.0 Tesla (Bruker Biospin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland) im Neurowissenschaftlichen Forschungsinstitut, Campus Charité Mitte, Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Aufgrund der guten Vaskularisation des Glioms in diesem Mausmodell wurde für eine bessere Gewebekontrastierung das Gadolinium enthaltende MRT-Kontrastmittel Magnevist® (Bayer) in einer NaCl-Verdünnung (1:5) eingesetzt und kurz vor der Messung

in die Schwanzvene appliziert. Um eine optimale Auflösung zu erreichen, mussten Bewegungen der Maus auf ein Minimum reduziert werden. Die dafür notwendige Inhalationsnarkose erfolgte mit einem gut steuerbaren Gasgemisch mit Isofluran 1,5-2% (Forene, Abbot, Wiesbaden/Deutschland) in 30%N<sub>2</sub>O/ 70%O<sub>2</sub> und einem Fluss von 1-2l/min. Die Maus schlief innerhalb weniger Sekunden ein und konnte in die Haltevorrichtung der MRT-Schiene eingespannt werden. Die Maus wurde unter konstanter Gasinsufflation in Narkose gehalten. Über eine Elektrode auf dem Rücken konnten während der Prozedur die Atem- und Herzfrequenz kontinuierlich aufgezeichnet und überwacht werden.

Die Messungen wurden in drei verschiedene Messepisoden aufgeteilt. Zu allererst wurde sichergestellt, dass eine korrekte Kopfposition vorlag oder es wurden die Einstellungen an die abweichende Kopfposition angepasst. Dafür wurde ein grobschichtiges Übersichtsbild mit geringer Auflösung innerhalb weniger Sekunden erstellt (sogenannter Tripilot). Durch dieses Übersichtsbild wurde eine zentrale Sagittalschicht des Gehirns aufgenommen, an das die weiteren Aufnahmen und Schichtdicken angepasst wurden. Wenn alle Einstellungen passten, wurden nacheinander T1- und T2-gewichtete Bilder in hoher Auflösung erstellt.

Die T1-gewichteten Bilder dienen der Darstellung des Tumors, welcher durch das Kontrastmittel Magnevist® eindeutig abzugrenzen war. Da in T2-gewichteten Bildern starre Flüssigkeiten hyperintens erscheinen, eigneten sie sich besonders gut zur Darstellung des umgebenden Ödems. Für die Tumorummetrie wurden beide Wichtungen ausgewertet (3.5.1.).

### **3.2.6. Kardiale Gehirnperfusion**

Die Mäuse wurden an Tag 21 aus dem Versuch genommen und die Gehirne zur weiteren Aufarbeitung entnommen. Aufgrund der guten Durchblutung des Gehirngewebes war es nötig, dieses von Blut zu reinigen und entsprechend zu fixieren. Für eine gleichmäßige Verteilung der Lösung erfolgte die Gehirnperfusion mit PFA 4% (für histochemische Analysen) oder PBS (für Zellseparation in Zellkultur) bei schlagendem Herzen der Maus. Die Mäuse erhielten dafür eine Narkose mit 80µl pro 10g Körpergewicht der Narkoselösung (3.2.3.). Um sicher zu gehen, dass die Maus ausreichend tief schlief wurde die Körperreaktion durch Zehenkneifen und Bestreichen der Vibrissen getestet. Es konnte mit Hilfe einer Schere die Haut über dem Thorax (Brustkorb) für eine gute

Übersicht eingeschnitten und eröffnet werden. Der Brustkorb wurde vom Zwerchfell aus vorsichtig rechts parasternal in der gesamten Länge eröffnet und ein Brustkorbfenster ausgeschnitten. Wichtig war nun die herznahe Durchtrennung der Blutzirkulation durch das Einschneiden der ins Herz mündenden venösen Gefäße. Nun erfolgte die Fixierung des Herzens mit einer chirurgischen Pinzette an der Herzspitze (Apex) und es wurden die 10ml PFA 4% bzw. PBS langsam in den noch schlagenden linken Ventrikel durch eine 10ml Spritze und 23G-Nadel injiziert. So konnte das im Organismus zirkulierende Blut durch PFA 4% bzw. PBS ausgewaschen werden und das Gehirn fixiert bzw. gereinigt werden. Der Kopf der Maus wurde vom restlichen Körper getrennt und die Haut über der Schädelkalotte eingeschnitten. Die Schädelkalotte wurde mit einer Pinzette vorsichtig von kaudal nach rostral vom Hirngewebe abgelöst und freigelegt. Um das Gehirn komplett zu lösen, wurden die Hirnnerven durchtrennt. Nun konnte das Gehirn in zwei unterschiedlichen Varianten verwendet werden. Für Gefrierschnitte wurde das Gehirn in 4% PFA überführt, bei 4°C für 24h gekühlt gelagert und zur weiteren histologischen Aufarbeitung entwässert und eingefroren (3.4.1.). Für die Zellseparation wurde das Gehirn in HBSS(-)-Puffer auf Eis gelagert und in der Zellkultur weiter verarbeitet (3.3.2.).

### **3.3. Zellkultur**

#### **3.3.1. Kultivierung der GL261 Tumorzelllinie**

Die Kultivierung der GL261 Zellen erfolgte in einem für sie geeignetem DMEM-Medium (+10% FCS +PenStrep) in 75cl Zellkulturflaschen (Falcon®) im Brutschrank bei 37° mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub>-Kammerluftanteil.

##### **3.3.1.1. Auftauen**

Die Zellen wurden in Kryo-Röhrchen (Sarstedt) im Stickstofftank (-196°C) gelagert und zur Erhaltung der Funktionsfähigkeit schnell im Wasserbad bei 37° aufgetaut. Um das DMSO (Dimethylsulfoxid) auszuwaschen, wurden die Zellen in DMEM (+FCS; +Pen/Strep) in ein Falcon®-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1300rpm für 7min bei RT, wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1ml DMEM (+FCS; +Pen/Strep) re-suspendiert. Anschließend wurden die GL261 Zellen in einer 75cl

Zellkulturflasche (Falcon®) für adhärenente Zellen mit bereits enthaltendem 10ml Kulturmedium ausplattiert. Nach Kultivierung über mehrere Tage bildeten sie eine einfache, gleichmäßige Schicht („Monolayer“) und erreichten nach 3 Tagen eine Konfluenz von etwa 80%. Das war der optimale Zeitpunkt zur weiteren Verwendung der Zellen für die Tumorzellimplantation.

### 3.3.1.2. Splitten

Das Splitten war zur Expansion der Zelllinie notwendig. Diese wurde nach mehrtägiger Kultivierung bei einer 80%-igen Konfluenz der GL261 Zellen durchgeführt. Der Mediumüberstand wurde abgezogen und es erfolgte ein 2-maliges Waschen mit 5ml PBS. Durch Zugabe von 1ml Trypsin/EDTA 0,5% und 1-minütiger Inkubation mit anschließendem Abklopfen der Zellen, wurden die GL261 Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10ml DMEM abgestoppt.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1300rpm, 7min) pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 1ml DMEM (+FCS; +Pen/Strep) gründlich re-suspendiert (30-40x), die Zellsuspension wurde auf 5 Flaschen verteilt (1:5 Splitten) und in jeweils 10ml DMEM (+FCS; +Pen/Strep) kultiviert.

### 3.3.1.3. Einfrieren

Anders als das Auftauen, musste das Einfrieren langsam erfolgen, um die zelluläre Funktionsfähigkeit aufrecht zu erhalten. Nach Kultivierung wurden adhärenente GL261 Tumorzellen mit Trypsin/EDTA 0,5% über 1 Minute inkubiert und durch Abklopfen vom Flaschenboden abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10ml DMEM abgestoppt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1300rpm, 7min) pelletiert. Das DMEM wurde abgesaugt und das Zellpallet in 5ml eiskalter Einfrierlösung (+FCS +10% DMSO) aufgenommen. Die Zellen wurden auf 5 Kryo-Tubes (Sarstedt®) mit je 1ml aufgeteilt und in einen speziell dafür vorgesehenem Einfriercontainer (Nalgene™; Cryo 1°C Freezing-Container) überführt. Dieser konnte zum langsamen und schrittweisen Einfrieren bei -80°C über etwa 24h verwendet werden. Nun wurden die Zellen bei -196°C in einem Stickstofftank gelagert.

### 3.3.1.4. Zellkultivierung vor Tumorzellimplantation

Die Tumorzellen wurden wie beschrieben aufgetaut, im Brutschrank bei 37°C zum weiteren Wachstum kultiviert und wurden erst bei einer Konfluenz von 80% verarbeitet. Dieser Punkt wurde nach 72h Kultivierung erreicht. Das DMEM aus der Zellkulturflasche wurde entfernt und die Zellen mit 2x 5ml PBS gewaschen. Durch Zugabe von Trypsin/EDTA 0,5%, 1-minütiger Inkubation und anschließendem Abklopfen der Zellen, wurden die GL261 Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10ml DMEM abgestoppt.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1300rpm, 7min) pelletiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpallet wurde in PBS auf 1ml re-suspendiert. Wichtig war die exakte Aufnahme in 1ml zur Berechnung der Tumorzellzahl. Diese wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, wobei eine Verdünnung (1:10) der Tumorzellsuspension mit Trypanblau (Gibco®) zur Darstellung der toten Zellen berücksichtigt werden musste. Die Auszählung der Zellen erfolgte dann unter zehnfacher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop. Die Anzahl der Zellen im Raster der Neubauer-Zählkammer entsprach einer Konzentration von etwa  $\times 10^5$ /ml in der Zellsuspension (unter Berücksichtigung der 10-fachen Verdünnung mit Trypanblau).

Nun konnte das Volumen, welches für die Inokulation der Tumorzellen bei der Tumorzellimplantation (TZI) benötigt wurde, berechnet werden. Ziel war eine standardisierte Zellmenge von  $2 \times 10^5$  pro Tier und damit pro  $\mu\text{l}$  (20.000 Zellen/ $\mu\text{l}$ ). Dafür wurden die Zellen in entsprechend berechneter Menge PBS aufgenommen. Dieses Volumen wurde in einem gekühlten Tube aufbewahrt und stand zur Tumorzellimplantation bereit.

### 3.3.2. Zellseparation und Aufreinigung

Die Zellseparation durch das MACS®-Neuronal Tissue Dissociation Kit (Milteny Biotec) war zur Analyse bestimmter Zellpopulationen in bindegewebig organisierten Geweben notwendig. Stefan Milteny *et al.* (1990) entwickelte eine spezielle Methode, die es ermöglichte, Zellpopulationen durch Anlagerung an magnetische Mikropartikel von etwa 100nm Durchmesser voneinander zu trennen (94). Zellen von besonderem Interesse mit spezifischen Oberflächenmarkern werden durch diese magnetischen Mikropartikel beim Durchlaufen durch eine im Magnetfeld befindliche Säule zurückgehalten (Hier: CD11b<sup>+</sup>-

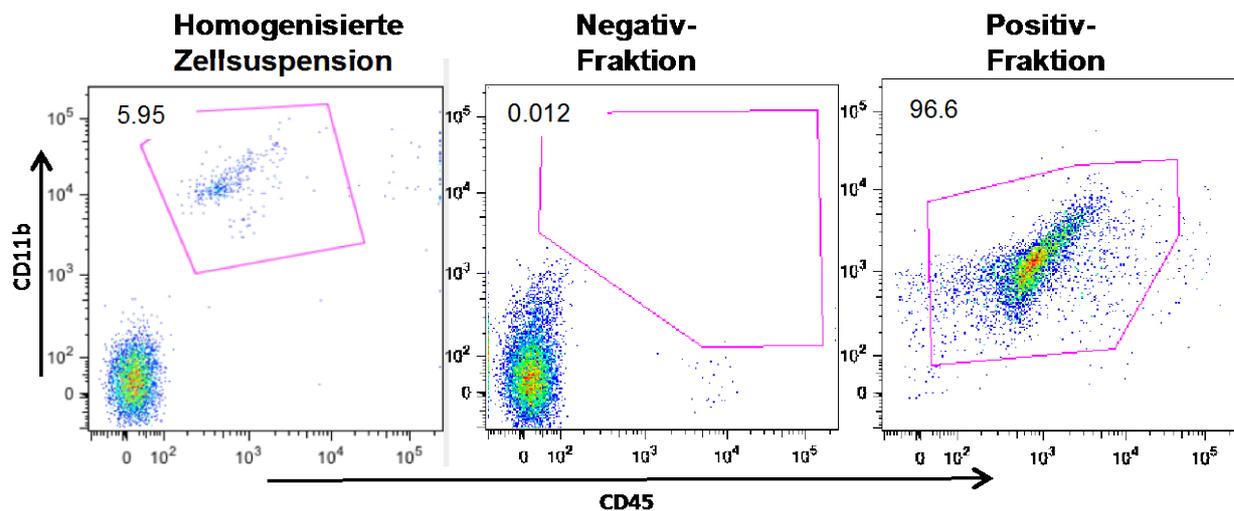
Zellen). Die Zellen ohne entsprechend markiertem Oberflächenmarker (Hier: CD11b<sup>-</sup>-Zellen) können hingegen die Säule durchlaufen. Die zurückgehaltenen Zellen können durch eine im Folgenden beschriebene Methode wieder freigesetzt werden:

Naive oder Tumor-tragende Mausgehirne, sowie die beiden Maustypen (CCR2ko vs WT), wurden zur Zellseparation getrennt analysiert. Die Gehirne wurden jeweils mit 10ml kühlem PBS perfundiert. Dadurch konnte das Gehirn von im Kreislauf befindlichen Blutzellen und anderen Abwehrzellen gesäubert werden. Das Hirngewebe wurde nach Perfusion in eine Pufferlösung HBSS(-) auf Eis überführt (3.2.6.).

Das Cerebellum (Kleinhirn) wurde vom Restgewebe getrennt und entfernt. Das Großhirngewebe wurde in möglichst kleine Teile mit einem Skalpell zerlegt. Nun wurde das Gewebe gründlich in HBSS(-) gewaschen. Die Enzymmische wurden entsprechend Herstellerangaben (Milteny Biotec) mit dem Gehirngewebe in einem 15ml Falcon®-Tube zusammengesetzt, mit verdünntem  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und bei 37°C für 15min inkubiert. Nun erfolgte die Zugabe der Solution 3 und 4 (Milteny Biotec) in die Gehirnsuspension. Das Gewebe wurde nun mehrfach mechanisch bearbeitet, mit speziell-abgerundeten Pasteurpipetten resuspendiert und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Wenn das Gehirngewebe zu einer möglichst homogenen Suspension verarbeitet worden war, wurde diese gefiltert (Pre-Seperation Filter; Milteny Biotec). Nach Zentrifugation wurden die Zellen in BSA 0,5%/PBS 2-mal gewaschen. Danach wurden die gekühlten MACS-Säulen in den entsprechenden Magneten fixiert. Vor dem Befüllen der Säulen, wurden für die Zellsuspension entsprechende anti-CD11b „Micro-Beads“ (Milteny Biotec) verwendet. Diese hafteten sich nach Inkubation bei 8°C für 15min an die passenden Oberflächenrezeptoren der Zellen (hier: CD11b-positive Zellen) an. Zwei unterschiedliche Säulen mit unterschiedlicher Partikeldurchlässigkeit wurden nacheinander eingesetzt. Zuerst wurden die größeren (LS)-Säulen benutzt. Die Säulen wurden jeweils mit BSA 0,5%/PBS zum kalibrieren befeuchtet. Nun wurde die mit Mikropartikeln angereicherte Zellsuspension in die Säulen appliziert. Eine Negativfraktion, mit entsprechend nicht markierten Oberflächenrezeptoren, konnte unten aufgefangen und verworfen werden. Die Positivfraktion mit den Mikropartikeln verblieb in der Säule und konnte durch folgende spezielle Methode ausgewaschen werden. Die Säule wurde aus dem Magnetfeld entfernt und musste zügig mit BSA 0,5%/PBS unter Druck mit einem Stempel bearbeitet werden. Dadurch konnte die entsprechende Positivfraktion unten aufgefangen werden und enthielt im optimalen Fall nur CD11b-positive Zellen. Da erfahrungsgemäß diese durch (LS)-Säulen gewonnene Positivfraktion

meist keine ausreichende Reinheit (<90%) der zu analysierenden Zellpopulation besaß, wurde die Prozedur erneut mit (MS)-Säulen wiederholt.

Die zweite Positivfraktion aus den (MS)-Säulen konnte durch die hohe Reinheit (meist >95%) für weitere Analysen verwendet werden (Abb. 3-2).



**Abb. 3-2: Überprüfung der Reinheit durch FACS in naiven Mäusen.** MACS®-Zellsortierung mit CD11b-MicroBeads, sowie anschließender FACS-Färbung zur Überprüfung der Reinheit. Die aufgefangene Negativ-Fraktion weist nahezu keine CD11b-markierten Zellen auf, während die aus den Säulen freigesetzte Positiv-Fraktion in hoher Konzentration (>95%) aus CD11b<sup>+</sup>-Zellen besteht. Somit lag eine ausreichend hohe Reinheit vor, um für weitere Untersuchungen von einer reinen Mikroglia/Makrophagen-Population ausgehen zu können.

### 3.3.3. Chamber-Slides

Zur *in vitro* Kultivierung hirneigener Mikroglia/Makrophagen, wurden aus naiven Mausgehirnen entsprechend der CD11b<sup>+</sup>-Fraktion durch die MACS®- Zellseparation Zellen isoliert. Durch die oben beschriebene Aufreinigung konnte eine hoch-reine CD11b<sup>+</sup>-Fraktion gewonnen werden. Die Zellanzahl der Positiv-Fraktion wurde durch die Neubauer-Zählkammer (3.3.1.4.) bestimmt. Diese Zählung war zur gleichmäßigen Aufteilung der Zellen auf die Kammern („Chambers“) notwendig. Zellen wurden unter zwei unterschiedlichen Kulturbedingungen aufgereinigt und kultiviert. Zum einen in einem X-vivo-Medium, zum anderen in einem „tumor conditioned medium“ (TCM). Die TCM-Lösung wurde aus einem mit Tumorzellen (GL261) angereicherten Kulturmedium,

welches nach 72h Zellkultivierung aus dem Überstand gewonnen wurde, angefertigt. Es besaß aufgrund des mit Stimulations- und Wachstumsfaktoren angereicherten Mediums, eine ausgeprägte differenzierungsstimulierende Potenz für die Mikroglia/Makrophagen. Die aufgereinigten Mikroglia/Makrophagen wurden in entsprechenden Kulturmedien auf eine 8-well Chamber-Slide (Ibidi®) mit  $2 \times 10^5$  Zellen/Chamber ausplattiert. Es erfolgte eine 7-tägige Kultivierung der Zellen. Die Kulturmedien wurden zur optimalen Differenzierung und Adhärenz der Zellen alle 2 Tage gewechselt. Im Anschluss konnten die Zellen durch ein speziell für „culture-slides“ modifiziertes Färbeprotokoll dargestellt werden. Die Chamber-Slides ermöglichten eine einfache Kultivierung der Zellen, sowie deren anschließende Fixierung. Diese war zur weiteren fluoreszenzmikroskopischen Analyse nötig (3.4.4.).

### **3.4. Proteinbiochemie**

#### **3.4.1 Histologische Aufarbeitung**

Die Gehirne, die nach oben beschriebener Perfusion für 24h in 4% PFA bei 4°C eingelegt wurden, wurden zur Anfertigung von Kryoschnitten schrittweise entwässert (3.2.6.). Dazu wurde das Gehirn in Saccharose-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen eingelegt. Zuerst erfolgte die Umbettung des Gehirns von 4% PFA in 10% Saccharose-Lösung. Eine ausreichende Gewebesättigung war erreicht, wenn das Gehirn den Boden der Falcon®-Röhrchen berührte (etwa 12h). Nun erfolgte die weitere Umbettung in 20%- und danach 30%- Saccharose Lösung nach der gleichen Prozedur (je etwa 24h).

Wenn das Gehirn weitgehend gesättigt bzw. entwässert war, wurde es weggefroren. Dafür nutzt man flüssigen Stickstoff, der nur unter entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen verwendet wurde (Handschuhe, Schutzbrille). Das Gehirn wurde auf einem Aluminium-Plättchen gelegt, welches in eine Plastikschiene gesetzt wurde. Diese Plastikschiene wurde mit dem flüssigen Stickstoff (-196°C) befüllt. Das Gehirn auf dem Metallplättchen konnte durch die gute Kälteleitung schnell eingefroren (Schockfrieren) werden. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C und das Gehirn lag zur weiteren histologischen Aufarbeitung für Gefrierschnitte bereit.

Zur Anfertigung von dünnen histologischen Schnittpräparaten nutzten wir ein in Kryostat-Technik angewendetes Rotationsmikrotom (Microm, HM560). Es wurde eine an die

Raum- und Außentemperatur, sowie der Luftfeuchtigkeit angepasste Temperatureinstellung vorgenommen. Dabei variierte die Einstellung von etwa  $-25$  bis  $-30^{\circ}\text{C}$  in der Kammer, während die Temperatur des Messers um etwa  $-2^{\circ}\text{C}$  tiefer eingestellt wurde. Die Gehirne wurden aus dem  $-80^{\circ}\text{C}$  Kühltank entnommen und direkt in flüssige Gelatine 2% eingebettet, welche sich im Kryostat erhärtete. Das eingebettete Gehirn konnte nach entsprechendem einspannen im Bock mit dem Mikrotom geschnitten werden. Es wurden  $10\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt, sodass in der späteren Färbung möglichst nur eine einschichtige Darstellung der Zellen repräsentiert wurde. Die Schnitte wurden auf Objektträger (SuperFrost®Plus, R. Langenbrinck) aufgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.4.2. Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung

Die H.E.-Analyse diente der Übersichtsdarstellung der Gehirngewebe. So ließ sich Tumorgewebe vom gesunden Gehirnparenchym deutlich abgrenzen und eine Beurteilung der Infiltration, sowie des Wachstumsmusters der Gliome war möglich. Die H.E.-Färbung erfolgte nach einem neuropathologischen Standardprotokoll.

Die Gewebeschnitte wurden aus dem Gefrierschrank ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) entnommen und bei Raumtemperatur getrocknet. Es erfolgte eine Fixierung der Schnitte mit Aceton für 5 Minuten. Dann wurden die Schnitte in gereiften Haemalaun für 3min gefärbt und anschließend mit Leitungswasser abgewaschen. Die nächste Färbung erfolgte mit Eosin für 30sec, welche ebenso mit Leitungswasser abgewaschen wurde. Nun erfolgte die schrittweise Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe über 70%-, 80%-, 96%-, 100%-igem Ethanol für je 90sek. Anschließend wurden die Schnitte 2-mal hintereinander in einer Xylol-Lösung für je 1min eingetaucht. Die Schnitte wurden in Roti®-Histokit-II eingebettet und mit einem Deckglas versiegelt.

### 3.4.3. Immunfluoreszenzmikroskopie/Immunhistochemie

#### 3.4.3.1. Prinzip

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine weit verbreitete, spezielle Form der Lichtmikroskopie. Vereinfacht kann man sagen, dass in dem zu untersuchenden Präparat

ein vorher aufgetragener und an bestimmten Zellstrukturen gebundener fluoreszierender Farbstoff aufliegt. Dieses sogenannte Fluorochrom kann durch Licht bestimmter Wellenlängen zum Leuchten gebracht werden. Dieses Emissionslicht kann wiederum optisch getrennt und durch einen Detektor für das Auge dargestellt werden (95, 96). Auch wir nutzten die Fluoreszenzmarkierung zur Darstellung verschiedener Zellen für die Aufnahme mikroskopischer Bilder. Wir benötigten diese für die *ex vivo* Analyse verschiedener im Mausgehirn existierender Zellen und Zellbestandteile.

### 3.4.3.2. Vorgehen

Vor dem Auftragen von Antikörperlösungen auf die Schnitte, mussten zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen diese mit einer Proteinlösung (Casein 0,5%/PBS) geblockt werden. Das Blocken wurde über 30min in einer mit Casein 0,5%/PBS gefüllten Küvette durchgeführt. Die Objektträger wurden danach für etwa 10min getrocknet. Die Umrandung der Schnitte erfolgte mit einem DAKO®-Fettstift.

Eine Antikörperlösung mit den entsprechenden Primärantikörpern (Tab.10) wurde aufgetragen. Zur Ausbildung eines Flüssigkeitsreservoirs wurde die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten und die Grenze durch den getrockneten DAKO®-Fettstift genutzt. Nach einer Inkubationszeit von 2h zur ausreichenden Antikörper-Epitop Bindung, konnte die Antikörperlösung entfernt werden. Die Schnitte bzw. der Objektträger wurden in 2 Waschschritten mit je 5min Casein 0,5%/PBS auf einem Schüttler gewaschen, um die freien nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen. Nun erfolgte das Auftragen der an ein Fluorochrom-gebundenen Sekundärantikörper (Tab.11) in einer verdünnten Lösung, nach bereits beschriebenen Prinzip. Eine erneute Inkubation von 90min war zur ausreichenden Antikörper-Antikörper Bindung notwendig. Es erfolgte wiederum die Entfernung der Antikörperlösung in zwei Waschschritten auf einem Schüttler zu je 5min mit PBS. Die Objektträger wurden zusätzlich 2-mal je 5min mit bi-destilliertem Wasser (Millipore®) gewaschen.

Für die Kernfärbung verwendeten wir ein spezielles DAPI-Einbettmedium (DAKO®), welches auf entsprechend trockenen Schnitten direkt aufgetragen werden konnte. Diese wurden eingedeckelt, über Nacht im Dunkeln bei 4°C im Kühlschrank getrocknet und am nächsten Tag mit Nagellack versiegelt, um ein Austrocknen zu verhindern.

**Tab. 10: Verwendete Primärantikörper für Immunhistochemie**

Primärantikörper	Donor	Verdünnung	Hersteller
CD11b	Ratte	1:100	Abcam
CD31	Ratte	1:50	BD Pharmingen
CD68	Ratte	1:200	Serotec
IBA1	Kaninchen	1:250	WAKO
IBA1	Ziege	1:100	Abcam
Ki-67	Kaninchen	1:100	Thermo Scientific
MHC-I	Ratte	1:100	Abcam
MHC-II	Ratte	1:200	Abcam

**Tab. 11: Verwendete Sekundärantikörper für Immunhistochemie**

Sekundärantikörper	Epitop	Verdünnung	Hersteller
Dylight 488	Anti-Ratte	1:200	Dianova
Dylight 488	Anti-Kaninchen	1:200	Dianova
Dylight 549	Anti-Kaninchen	1:200	Dianova
Dylight 549	Anti-Ziege	1:200	Dianova
Cy3	Anti-Ratte	1:200	Dianova
FITC	Anti-Kaninchen	1:200	Dianova

### 3.4.4. ApopTag®Red in situ (Kit Methode)

#### 3.4.4.1. Prinzip

Zur Untersuchung apoptotischer Zellen wurde ein spezialisiertes „Apoptosis Detection Kit“ (ApopTag®) genutzt. Dieses beruht auf der herkömmlichen TUNEL-Technologie (97) (98). Im Prinzip wurden dabei freie 3´OH-Enden, die aufgrund der während der Apoptose gehäuft auftretenden DNS-Strangbrüche entstehen, enzymatisch (terminale Desoxynukleotidtransferase=TdT) durch chemisch veränderte Oligonukleotide (Digoxigenin-dNTP) markiert. Mit einem Fluorochrom (Rhodamin) modifizierte Digoxigenin-Antikörper konnten, wenn sie vermehrt an die Digoxigenin dNTP binden, durch ein Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

### 3.4.4.2. Vorgehen

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten und mit 4% PFA perfundierten Kryostatschnitte wurden bei Raumtemperatur für 30min getrocknet. Eine vorbereitete und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlte Ethanol-Essigsäure Lösung (2:1) wurde für 5min auf die Schnitte aufgetragen. Diese diente der Permeabilisierung der Zellmembranen. Es folgten 2 Waschrunde durch PBS und das anschließende Auftragen eines Äquilibrations-Puffer auf die Schnitte. Dieser konnte nach 10sek entfernt werden und eine mit einem Reaktionspuffer angereicherte TdT- (terminale Desoxyribonukleotid-Transferase) Lösung wurde auf die Proben aufgetragen. Dafür war eine Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Inkubationsschrank notwendig. Es erfolgten wiederum 2 Waschrunde durch eine dafür vorgesehene verdünnte Waschlösung. Eine Rhodamin-Lösung wurde mit dazugehöriger Blocking-Solution vorbereitet. Diese wurde in angegebener Menge auf die Schnitte aufgetragen. Hierbei war eine Inkubation bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer notwendig. Nach der abgelaufenen Zeit wurden die Objektträger in PBS gewaschen und eine IBA1-Gegenfärbung zur Darstellung der Mikroglia/Makrophagen konnte nach entsprechendem Protokoll (3.4.3.2.) durchgeführt werden.

### 3.4.5. Immunzytochemie

Zur immunzytochemischen Darstellung isolierter Mikroglia/Makrophagen wurden diese in 8-well Chamber-Slides (Ibidi®) kultiviert (3.3.3.). Das Medium aus den Chamber-Slides wurde vorsichtig abgesaugt. In 2 Waschrunden mit PBS wurden die am Boden adhärenen Zellen vorsichtig gewaschen. Eine anschließende Fixierung für 20min mit 4% PFA war für die Färbung notwendig. Wiederum wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Casein 1%/Probe für 30min geblockt.

Nun erfolgte das Auftragen der Primärantikörper (150 $\mu\text{l}$ /Kammer) mit anschließender Inkubation für 2h bei Raumtemperatur in der Dunkelkammer. IBA1, CD11b und CD68 als charakteristische Mikroglia/Makrophagen-Marker wurden als Primärantikörper eingesetzt.

**Tab. 12: Verwendete Primärantikörper für Immunzytochemie**

Primärantikörper	Donor	Verdünnung	Hersteller
CD11b	Ratte	1:100	Abcam
CD68	Ratte	1:100	AbD seroTec
IBA1	Kaninchen	1:100	WAKO

**Tab. 13: Verwendete Sekundärantikörper für Immunzytochemie**

Sekundärantikörper	Epitop	Verdünnung	Hersteller
Cy3	Anti-Ratte	1:200	Dianova
Dylight 488	Anti-Kaninchen	1:200	Dianova

Die Zellen wurden 2-mal vorsichtig mit 400µl/Kammer mit PBS gewaschen. Das Auftragen der Sekundärantikörper erfolgte in der gleichen Weise wie der Primärantikörper (150µl/Kammer) zu je 1:200. Die Zellen wurden je 2-mal gründlich mit PBS und Aqua bidest. 400µl/Kammer gewaschen. Der Begrenzungsaufsatz wurde entfernt, DAPI- Mounting-Medium aufgetragen und die Objektträger mit einem dünnen Deckplättchen versiegelt.

### 3.4.6. FACS-Analyse

#### 3.4.6.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die „Fluorescence activated cell sorting“- (FACS-) Analyse dient der spezifischen Untersuchung einer Zellsuspension nach Markierung der zu untersuchenden Zellpopulation mit einem oder mehreren an dem entsprechenden Epitop bindenden Fluorochromen (99). Die Zellsortierung geht zurück auf Mack Jett Fowllyer, der bereits 1965 Zellen anhand bestimmter Impedanzänderungen sortierte. Daraus entwickelte Leonard C. Herzenberg wenig später die FACS-Methode (100). Er konnte erstmalig antigenbindende Zellen durch fluoreszierende Antikörper mit einem Durchflusszytometer sortieren und zählen.

Die zu untersuchende Zellsuspension fließt unter Druck durch eine sich zunehmend verengende Säule, wobei sich die Zellen an der Messkanüle einzeln hintereinander anordnen (99, 101). Die Zellen werden mit einem bzw. mehreren Lasern bestrahlt, wobei

diese den Strahl in Abhängigkeit der Granularität, Plasma/Kern-Relation oder deren fluoreszierendes Signal in einem charakteristischen Winkel streuen (99, 101). Das Streuungslicht wird detektiert und in ein digitales Messsignal umgewandelt.

Die FACS-Messungen wurden am FACS Canto II (Becton Dickinson) durchgeführt und wurden durch eine FlowJo-Software (Tree Star Inc) ausgewertet (3.5.2.).

### 3.4.6.2. FACS-Analyse vitaler Zellen

Die FACS-Methode wurde nach Herstellung einer Zellsuspension genutzt oder wurde weiter nach der oben beschriebenen Zellseparation durch die MACS®-Technik verwendet (3.3.2.). Diese ermöglichte die Untersuchung und Einteilung lebender und mit CD11b- und CD45-markierter Abwehrzellen. Nach Erreichen einer möglichst reinen CD11b<sup>+</sup>-Zellpopulation und Ermittlung der Zellmenge in der Zellsuspension (Neubauer-Zählkammer 3.3.1.4.), wurden diese für die Fluoreszenzfärbung vorbereitet. Die Zellsuspension wurde gründlich mit BSA 0,5%/PBS gewaschen und bei 2400rpm für 6min zentrifugiert. FACS-Antikörper wurden zur Färbung mit BSA 0,5%/PBS verdünnt (CD11b-PE 1:100; CD45-APC 1:200) und zu jeder Probe pipettiert. Nach Inkubation für 10min wurden die Zellen erneut mit BSA 0,5%/PBS gewaschen und zentrifugiert. Die DAPI-Kernfärbung wurde bei der Messung hinzugefügt (1:100), um avitale Zellen aussortieren zu können.

**Tab. 14: Verwendete FACS-Antikörper für vitale Zellen**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Donor</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
CD11b-PE	Ratte	1:200	BioLegend
CD45-APC	Ratte	1:200	BD Pharmingen

### 3.4.5.3. FACS-Färbung

Zusätzlich zu der beschriebenen Zellsortierung mit Hilfe der Zellmarker CD11b/CD45 erfolgte nach Gehirnhomogenisierung die Untersuchung der Mikroglia/Makrophagen-Zellpopulation mittels unterschiedlicher Aktivierungs-/Antigenitätsmarker für Monozyten.

Nach Erhalt der Zellsuspension wurden die Zellen mit PFA 0,5% zur Durchführung einer Färbung fixiert. Es wurden 500µl jeder Zellsuspension entnommen und diese wiederum auf 2x 250µl aufgeteilt. Die Zellen wurden mit 5ml PBS zur Entfernung vorhandener freier Proteine gewaschen, abzentrifugiert (1200rpm) und der Überstand abgesaugt. Es erfolgte die Aufnahme der Zellen in 1ml 2%igem PFA mit gründlicher Resuspension. Die Fixierung war nach 20-minütiger Inkubation gewährleistet. Die Zellen wurden gründlich mit 10ml kaltem BSA 0,5%/PBS gewaschen, abzentrifugiert (1200rpm) und der Überstand abgesaugt. Zur Lagerung wurden die Zellen in 1ml PBS/BSA 0,5% aufgenommen und konnten für einige Tage im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden. Für die Färbung wurden 100µl der Zellsuspension pro Färbung verwendet. Isotyp-Kontrollen dienten als Negativkontrollen, dadurch konnten unspezifische Bindungen des Primärantikörpers detektiert werden.

Die Zellsuspension wurde in 1ml 0,5% Saponin gewaschen, welches der reversiblen Permeabilisierung diente und intrazelluläre Färbungen ermöglichte. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 2400rpm für 7min. Je Probe wurden 100µl 0,5% Saponin und eine entsprechende Antikörpermenge zusammengeführt (Tab.15 &16).

**Tab. 15: Verwendete FACS-Antikörper für Färbung fixierter Zellen**

Primärantikörper	Donor	Verdünnung	Hersteller
CD11b-PE	Ratte	1:100	BioLegend
CD45-APC	Ratte	1:100	BD Pharmingen
CCR2-PE	Ratte	1:20	R&D Systems
MHC-I	Maus	1:50	BioLegend
MHC-II	Maus	1:50	BioLegend
CD80	Armenian Hamster	1:50	BioLegend
CD86	Ratte	1:50	BioLegend

**Tab. 16: Verwendete FACS-ISO-Antikörper für Färbung fixierter Zellen**

Isotyp-Antikörper	Donor	Verdünnung	Hersteller
ISO CCR2 Typ-C	Ratte	1:20	R&D Systems
ISO MHC-I IgG2b	Maus	1:5	BioLegend

ISO MHC-II IgG2a	Maus	1:20	BioLegend
ISO CD80 IgG	ArmenianHamster	1:50	BioLegend
ISO CD86 IgG2a	Ratte	1:50	BioLegend

Jedes der Oberflächenmoleküle wurde mit CD11b-PE (1:100) und CD45-APC (1:100) zur Erkennung der Mikroglia/Makrophagen-Zellpopulation gefärbt. Nach Suspension der Zellen mit der Antikörper-Mischung wurden diese für 20min bei Raumtemperatur in Dunkelkammer inkubiert. Ein erneuter Waschschrift wurde mit 1ml 0,5% Saponin durchgeführt und die Lösung anschließend bei 4°C und 2400rpm für 7min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 300µl PBS/BSA 0,5% zur weiteren FACS-Analyse und Auswertung aufgenommen.

### 3.5. Datenanalyse

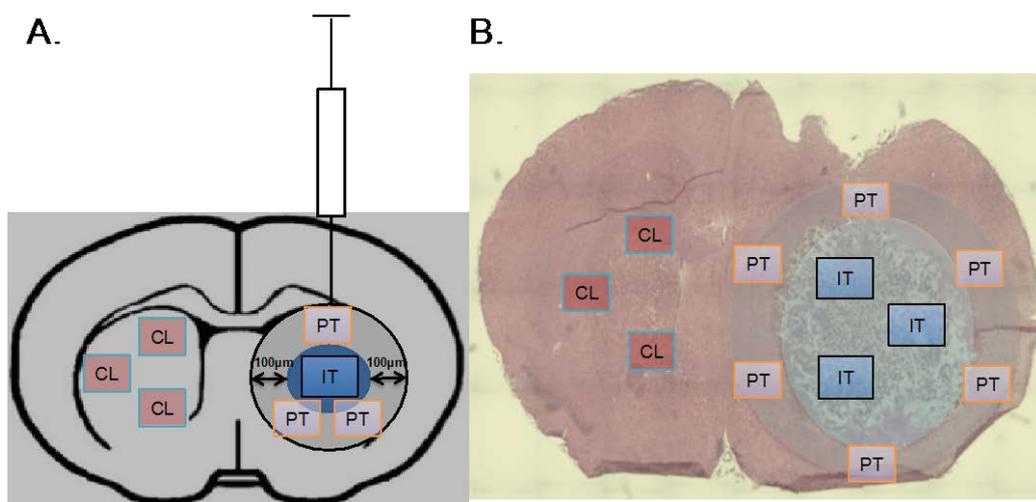
#### 3.5.1. Tumorummetrische MRT-Analyse

Zur volumetrischen Bestimmung der Tumorgößen und der damit einhergehenden Auswertung der MRT-Bilder wurde ein spezielles Auswertungsprogramm Analyze 10.0 genutzt. Die durch die MRT-Anlage gespeicherten Bilder (DICOM-Format) wurden zur Erkennung durch das Analyze 10.0-Programm umgewandelt, was durch das Programm ImageJ (Tree Star Inc.) realisiert werden konnte. Durch das Analyze-Programm konnten die Bilder mit verstärkter Kontrastierung und Farbtintensität bearbeitet und untersucht werden. Zur Volumetrie wurden geeignete Punkte im Tumor aufgesucht und eine „Region of interest“ (ROI) markiert. Die Tumorgrenzen konnten Millimeter genau am Kontrastübergang der Tumorgrenze angepasst und auch manuell nachgebessert werden. Dieses Vorgehen wurde in jeder Schicht erneut angewendet und an den Tumor angepasst. Somit konnte aus den Tumorflächen in den einzelnen Schichten und dem Wissen der Schichtdicken ein 3-dimensionales Volumen berechnet werden. Dieses wurde für jedes Tier einzeln, sowie jeweils als Mittelwert aus der T1- und T2-Wichtung berechnet. Insgesamt wurden pro Gruppe (CCR2ko vs. WT) 12 Tiere je Datenzeitpunkt analysiert.

### 3.5.2. Auswertung Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzbilder wurden 24h nach Färbung aufgenommen. Es wurde folgendes Gerät verwendet: Zeiss® Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop. Da es sich meist um Dreifach-Färbungen handelte, mussten die entsprechenden Kanäle eingestellt und einzeln aufgenommen werden.

Zur Auswertung der Mikroglia/Makrophagen-Zellzählung und Gefäßanalyse waren bei insgesamt 6 Tieren, pro Tier je 9 Gewebeschnitte zu untersuchen. Je Gewebeschnitt wurden 3-5 intratumorale (im Tumor lokalisiert), 5 peritumorale (100 µm um Tumorgrenze herum) und 3 kontralaterale Bilder ausgewertet (Abb. 3-4). Wichtig dabei war, dass sich die Bilder nicht überschneiden, sodass keine überlappende Zell-/Gefäßzählung durchgeführt wurde. Für jedes Bild wurden entsprechend der 3 Kanäle blau (DAPI), grün (FITC), rot (Cy3) je ein Bild in möglichst hoher Auflösung aufgenommen. Die Bilder wurden dann als Einzelbilder aber auch als Dreifach-Färbung gespeichert. Dadurch konnten die Zellen deutlich identifiziert und entsprechend gezählt werden.



**Abb. 3-4: Planung zur Auswertung der immunohistochemischen Bilder.** (A&B) Nach TZI und 21d Tumorwachstum bildete sich ein gut abgrenzbarer Tumor. Zur Auswertung der Immunfluoreszenzen wurden unterschiedliche Areale betrachtet. Kontralaterale Areale (CL) dienten der Analyse eines Ausgangswertes. Intratumorale Areale (IT) als auch peritumorale Areale (PT) als direkt angrenzender Bereich (100µm Distanz von Tumorgrenze) wurden analysiert.

### 3.5.2.1. Analyse der Makrophagen/Mikroglia

Die Analyse der Makrophagen/Mikroglia erfolgte anhand Ihres Oberflächenmarkers IBA1. IBA1 konnte durch das Fluorochrom FITC sehr spezifisch zur Darstellung gebracht werden. Makrophagen/Mikroglia wurden nur als solche definiert, wenn sie auch einen eindeutigen Zellkern (DAPI) besaßen. So war eine klar definierte Auszählung eines Schnittes möglich. Intratumoral wurden letztendlich alle entsprechenden IBA1<sup>+</sup>-Zellen ausgezählt und deren Dichte auf die entsprechende Fläche berechnet. Bei peritumoralen Bildaufnahmen an der Tumorgrenze wurde zunächst die Grenze des Tumors an einer relativ eindeutig erkennbaren Tumorgrenze markiert. Daraufhin konnte durch das Bildauswertungsprogramm eine von der Grenze ausgemessene Distanz von 100µm bestimmt und parallel zur Tumorgrenze markiert werden. So ließ sich das peritumorale Gebiet ausmessen und dessen Fläche berechnen. Dadurch konnten auch die sich in diesem Areal befindlichen Mikroglia/Makrophagen ausgezählt und deren Dichte bestimmt werden. Kontralaterale Mikroglia/Makrophagen wurden ähnlich dem intratumoralen Bereich auf der gesamten Bildfläche ausgezählt.

### 3.5.2.2. Gefäßanalyse

Gefäße die anhand des Endotheladhäsionsmarkers CD31 (PECAM-1) sichtbar wurden, konnten anhand des Fluorochroms Cy3 eindeutig zugeordnet werden. Die Gefäße wurden ähnlich den Mikroglia/Makrophagen einzeln ausgezählt. Hierbei war das Vorhandensein eines entsprechenden Endothelzellkernes nicht notwendig. Weiterhin wurden die Flächen (in mm<sup>2</sup>) anhand des Innendurchmessers der Gefäße gemessen, für alle Gefäße aufaddiert und auf die Gesamtfläche (in mm<sup>2</sup>) des zu analysierenden Areals bezogen. Zur differenzierten Betrachtung der Gefäßarchitektur wurden Gefäße in zwei Gruppen unterteilt: Die größeren Makrogefäße mit einem Durchmesser von  $\geq 10\mu\text{m}$  und die kleineren Mikrogefäßen mit einem Durchmesser  $< 10\mu\text{m}$ . Weiterhin waren aufgrund von vorangegangenen Untersuchungen, sowie diverser Beobachtungen unserer Gruppe Mikroglia/Makrophagen-assoziierte Gefäße von besonderem Interesse. Diese wurden ebenso differenziert zwischen den unterschiedlichen Gruppen betrachtet. Als

Mikroglia/Makrophagen-assoziiertes Gefäß wurde jedes Gefäß mit mindestens 2 direkt anliegenden IBA1<sup>+</sup>-Zellen definiert.

### 3.5.2.3. Analyse der Zellproliferation/-apoptose

Die Zellproliferation oder -apoptose konnten durch einen intrazellulären Proliferationsmarker Ki-67 bzw. Apoptose-Marker Digoxigenin und dem jeweiligen Fluorochrom Cy3 bzw. Rhodamin deutlich sichtbar gemacht werden. Da insbesondere die proliferative und apoptotische Aktivität der Tumorzellen von Interesse waren, wurden nur intratumorale Bilder mit 3 Gewebeschnitten je Tier und 5 Bilder pro Gewebeschnitt ausgewertet. Es wurden alle deutlich Ki-67 positive bzw. Rhodamin positive Zellen mit nachweislichen Zellkern (DAPI) gezählt und die Dichte auf die entsprechende Fläche kalkuliert. Es wurden zusätzlich IBA1<sup>+</sup>-Zellen untersucht, um auch deren proliferative bzw. apoptotische Aktivität zu bestimmen. Auch hier war der eindeutige Zellkernnachweis jeder Zelle obligat.

### 3.5.3. Auswertung der FACS-Analyse

Mithilfe der Durchflusszytometrie und der vorherigen Markierung mittels fluoreszierender Antikörper konnten die Anteile der jeweiligen Zellen in der Zellsuspension bestimmt werden. Die FACS-Analyse wurde zum einen zur Untersuchung parenchymaler bzw. intratumoraler Abwehrzellen anhand der Oberflächenmarker CD11b und CD45 verwendet. Zum anderen wurden CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>-Zellen anhand unterschiedlicher Aktivierungsmarker markiert und hinsichtlich positiver Signale untersucht.

Zur Auswertung verwendeten wir das Programm FlowJo (Tree Star Inc.), welches durch das FACS Canto II-Gerät gespeicherte fcs.-Dateien öffnen konnte. Vorerst wurden alle durch das Gerät registrierte Zellen dargestellt. Diese konnten anhand einer Messung der Vorwärts- („forward scatter“=FSC) und Seitwärts- („sideward scatter“=SSC) Lichtstreuung (Lichtstreuungsdetektion anhand der Plasma-Kernrelation bzw. Granularität) grob sortiert werden. Kernhaltige Zellen wurden weiter nach Ihrem DAPI-Signal „gegatet“. Avitale Zellen mit nachweislichem DAPI-Signal wurden „ausgegatet“. Nun konnte eine Analyse anhand der Oberflächensignale für CD11b und CD45 erfolgen.

### 3.5.4. Statistische Auswertung

Zur Darstellung der erhobenen Daten wurde das Programm Graph-Pad Prism® 6.0 verwendet. Zur Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Mausgruppen wurden Säulendiagramme verwendet. Zur Analyse der Daten wurden jeweils die Mittelwerte mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben.

Zum Nachweis signifikanter Unterschiede wurde für die beiden zu vergleichenden Gruppen der ungepaarte doppelseitige t-Test verwendet. Zur entsprechenden Berechnung konnte ebenso das statistische Programm Graph-Pad Prism®, sowie Microsoft Excel® 2010 verwendet werden. Die Signifikanz wurde, wie folgt angegeben (Tab.17):

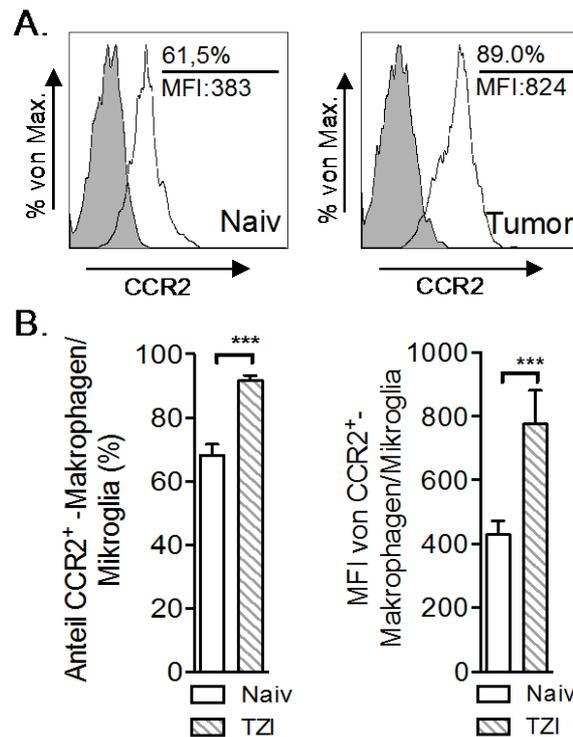
**Tab. 17: Darstellung der Signifikanz**

<b>P-Wert</b>	<b>Signifikanz</b>
$p < 0,05$	*
$p < 0,01$	**
$p < 0,001$	***

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Überexpression von CCR2 auf Mikroglia/Makrophagen im Gliom-Modell

Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass CCR2 auf RNS-Ebene in Mikroglia/Makrophagen hochreguliert wird. Zur Untersuchung der Relevanz und des Expressionsmusters von CCR2 in C57Bl/6J-Mäusen wurden Mausgehirne naiver Wildtyp-Mäuse, sowie Gehirne nach Tumorzellimplantation (TZI) homogenisiert und nach entsprechender FACS-Färbung analysiert. Anhand der Oberflächenmarker CD45 und CD11b konnten die Mikroglia/Makrophagen identifiziert und die CCR2-Expression durch eine zusätzliche CCR2-Färbung analysiert werden. Es zeigte sich eine deutliche CCR2-Expression der CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>-Zellfraktion sowohl in naiven als auch tumortragenden C57Bl6/J-Mäusen. Ein ausgeprägter Expressions-Shift in tumortragenden Gehirnen für CCR2 war anhand der Histogramme zu beobachten und wies auf eine Erhöhung der Rezeptordichte auf Mikroglia/Makrophagen hin (Abb. 4-1.A.). Die Berechnung des prozentualen Anteils der CCR2<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen, sowie deren MFI („mean fluorescence intensity“), also des CCR2-Signals pro Zelle, zeigten eine signifikante Erhöhung 21 Tage nach TZI (Abb. 4-1.B.). Somit konnte die ausgeprägte Expression von CCR2 auf Mikroglia/Makrophagen nachgewiesen werden und eine Aktivierung dieser Zellen anhand der Hochregulation während des Tumorwachstums angenommen werden. Man könnte schlussfolgern, dass CCR2 eine wesentliche Funktion für Mikroglia/Makrophagen während tumorimmunlogischer Prozesse zu haben scheint.

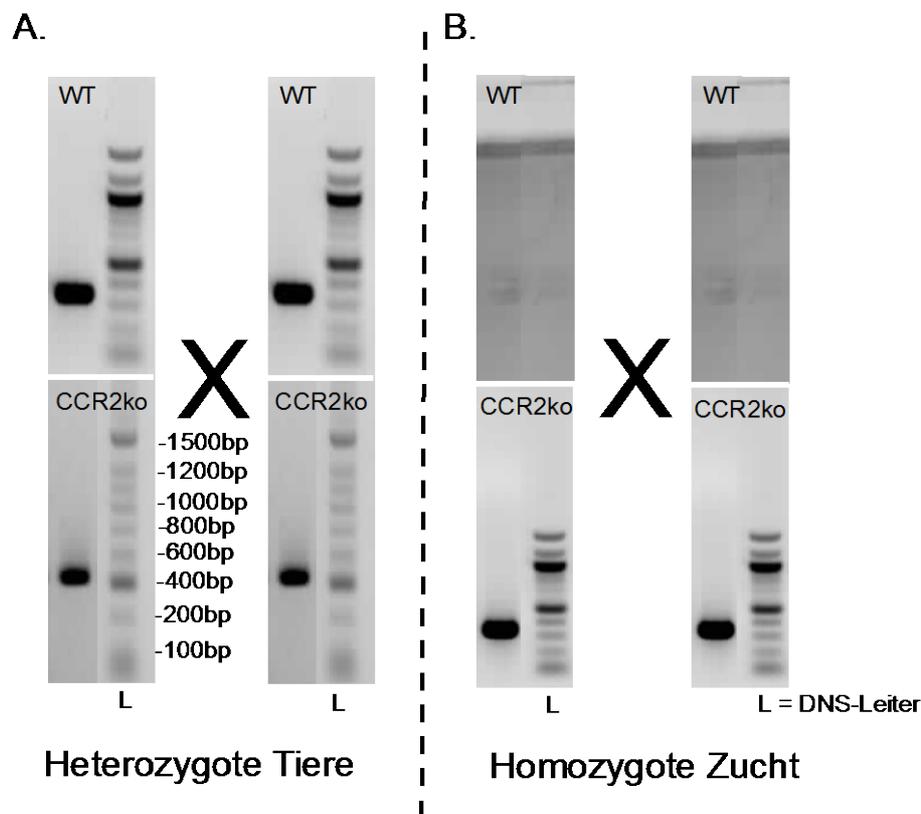


**Abb. 4-1: CCR2-Expression in naiven und tumortragenden C57Bl6/J-Mäusen.** (A) Dargestellt sind die Histogramme von naiven sowie tumortragenden Mäusen nach FACS-Analyse. In grau die Isotyp-Kontrollen und in weiß die spezifische CCR2-Färbung. Zu erkennen ist der deutliche Expressions-Shift nach TZI. (B) Sowohl die Berechnung des MFI („mean fluorescence intensity“), als auch der prozentuale CCR2<sup>+</sup>-Anteil sind nach TZI signifikant erhöht. n= 5-10 pro Gruppe; p<0,001(\*\*\*)

## 4.2. Zucht und Typisierung der CCR2ko-Mäuse

Zur Ermittlung der spezifischen Funktion von CCR2 wurde ein CCR2-knock-out Modell verwendet. Zum Aufbau einer Zucht wurde mit homozygoten CCR2ko-Mäusen aus dem Institut von Herrn Professor Heikenwälder, Helmholtz-Zentrum/München, gearbeitet. Eine heterozygote Folgegeneration entstand über einen Embryotransfer in C57Bl6/J-Mäuse. Die heterozygoten Tiere wurden untereinander gekreuzt, um homozygote CCR2ko-Tiere zu erhalten. Die Genotypisierung zur gezielten Verpaarung erfolgte durch zwei PCR's (Abb. 4-2). Dabei ergaben die Genprodukte bei Verwendung der WT- oder CCR2ko-Primer jeweils eine Bande bei 400bp. Nur bei eindeutiger Identifizierung eines homozygoten Genotyps wurden die Tiere für die weitere Zucht verwendet. Zusätzlich

wurden die Tiere jeweils vor Versuchsbeginn genotypisiert, um sich der Anwendung eines reinen CCR2ko-Modells sicher sein zu können.



**Abb. 4-2: Genotypisierung.** (A) Dargestellt ist die heterozygote Folgegeneration nach Embryotransfer. (B) Diese wurden untereinander verpaart, um eine homozygote Zucht zu etablieren.

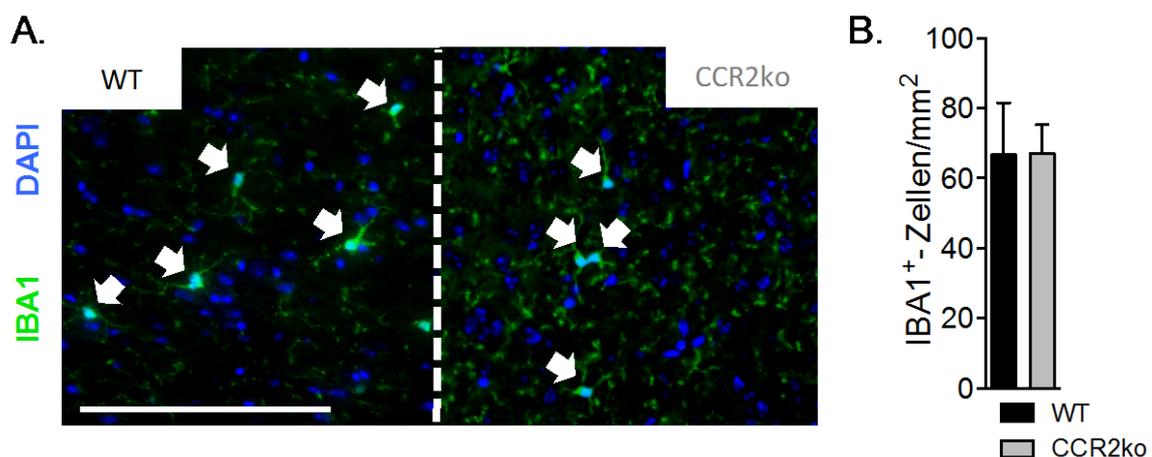
### 4.3. Charakterisierung der IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia: Wildtyp vs. CCR2ko

In naiven Mausgehirnen kann durch die intakte Blut-Hirn-Schranke von einer reinen Mikroglia-Population ausgegangen werden. Sie stellen die ortsständigen Abwehrzellen des ZNS dar (63, 64). Nach heutigen Erkenntnissen findet nur eine vernachlässigbar geringe Migration von myeloiden Monozyten beziehungsweise Makrophagen ins gesunde Gehirn statt (61, 62). Die Mikroglia sollten zur Untersuchung der Ausgangslage, sowie Beurteilung der Reife der Immunzellen in CCR2ko-Mäusen, analysiert und mit den C57Bl6/J-WT verglichen werden. Zur Ermittlung der Mikroglia-Dichte der kontralateralen Gewebeschnitte wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt und ausgewertet. Die

kontralaterale bzw. hier die linke Gehirnhemisphäre war ein von Tumor unberührter Bereich. Histologisch als auch immunfluoreszenz-mikroskopisch glich dieses Gewebe dem naiver Mäuse. Ebenso wurde für die FACS-Analyse das kontralaterale Gehirngewebe zur Homogenisierung getrennt aufgearbeitet und als naive Referenz betrachtet, um mögliche Veränderungen der Ausgangslage in CCR2ko-Mäusen zu detektieren. Mikroglia aus naivem Gehirngewebe wurden zur *in vitro* Kultivierung zusätzlich spezifisch isoliert und in ihrer Morphologie nach 7 Tagen begutachtet.

#### 4.3.1. Vergleichbare Verteilung IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia im naivem Gehirngewebe

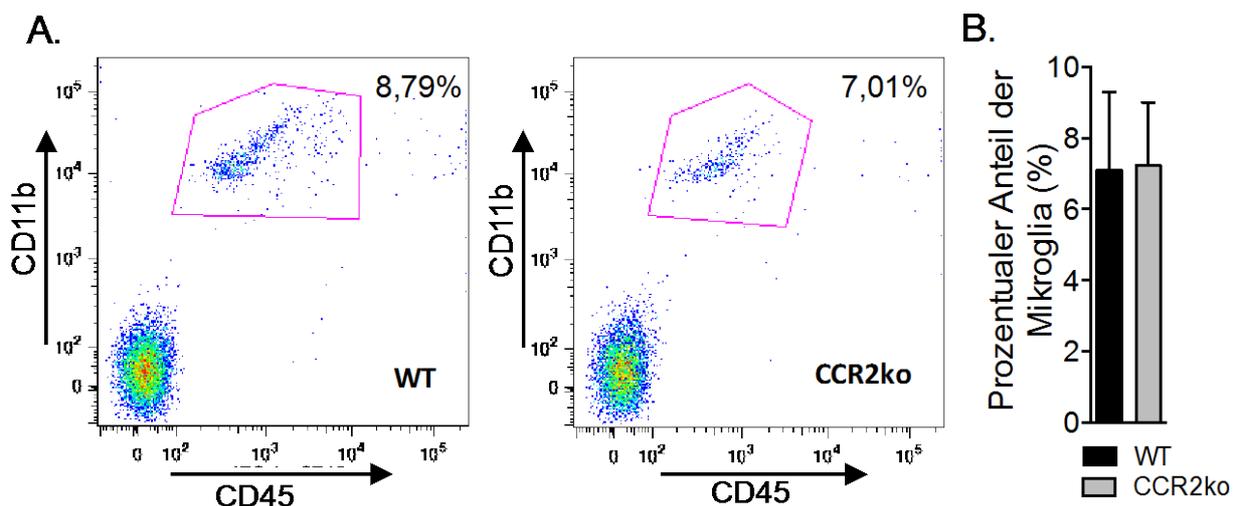
Zur Untersuchung der bereits beschriebenen Ausgangslage wurden Immunfluoreszenzschnitte ausgewertet. Hier zeigten die IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia die charakteristische verzweigte Struktur („ramified“) mit ausschweifenden dünnen Zellfortsätzen. Dabei sind die Zellen in einem „ruhend“-kontrollierenden Zustand und nehmen wichtige homöostatische Funktionen ein (64, 65). Die Mikroglia waren gleichmäßig in allen Schnitten des kontralateralen Gehirngewebes in verhältnismäßig geringer Dichte verteilt (Abb. 4-3.A.). Diese Beobachtung konnte nach Auszählung der Mikroglia bestätigt werden. Dabei konnte eine nahezu identische Dichte dieser Zellen in CCR2ko-Mäusen im Vergleich zu der WT-Kontrolle bestimmt werden (Abb. 4-3.B.).



**Abb. 4-3: Dichte der kontralateralen Mikroglia.** (A) Deutlich zu erkennen sind die verzweigten („ramified“), „ruhenden“ Mikroglia (IBA1<sup>+</sup>) im naiven Gehirnparenchym, (B) welche nach Auszählung in beiden Maustypen in nahezu identischer Dichte vorkommen. n=5 pro Gruppe; Maßstabsbalken = 100µm

Zur weiteren Untersuchung und Charakterisierung der naiven Gehirne wurden diese homogenisiert. In einem weiteren Schritt wurden die Zellen anhand einer FACS-Färbung mit den monozytären Oberflächenmarkern CD11b und CD45 markiert und für die Durchflusszytometrie verwendet. Anhand dieser Marker konnte eine einzelne, sowohl für CD45 als auch für CD11b positive Zellfraktion nachgewiesen werden (Abb. 4-4.A.). Aufgrund der intakten Blut-Hirn-Schranke konnte diese als reine Mikroglia-Population angesehen werden (64, 102). Berechnete man den Anteil der Mikroglia im Verhältnis zur Gesamtheit der Gehirnzellen, so ließen sich für CCR2ko- und für WT-Mäuse ähnliche Anteile der Mikroglia-Fraktion bestimmen (Abb. 4-4.B.).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mikroglia in beiden Gruppen in identischer Dichte vorlagen und auch deren Anteil an der Gesamtheit der Hirnzellen vergleichbar war.

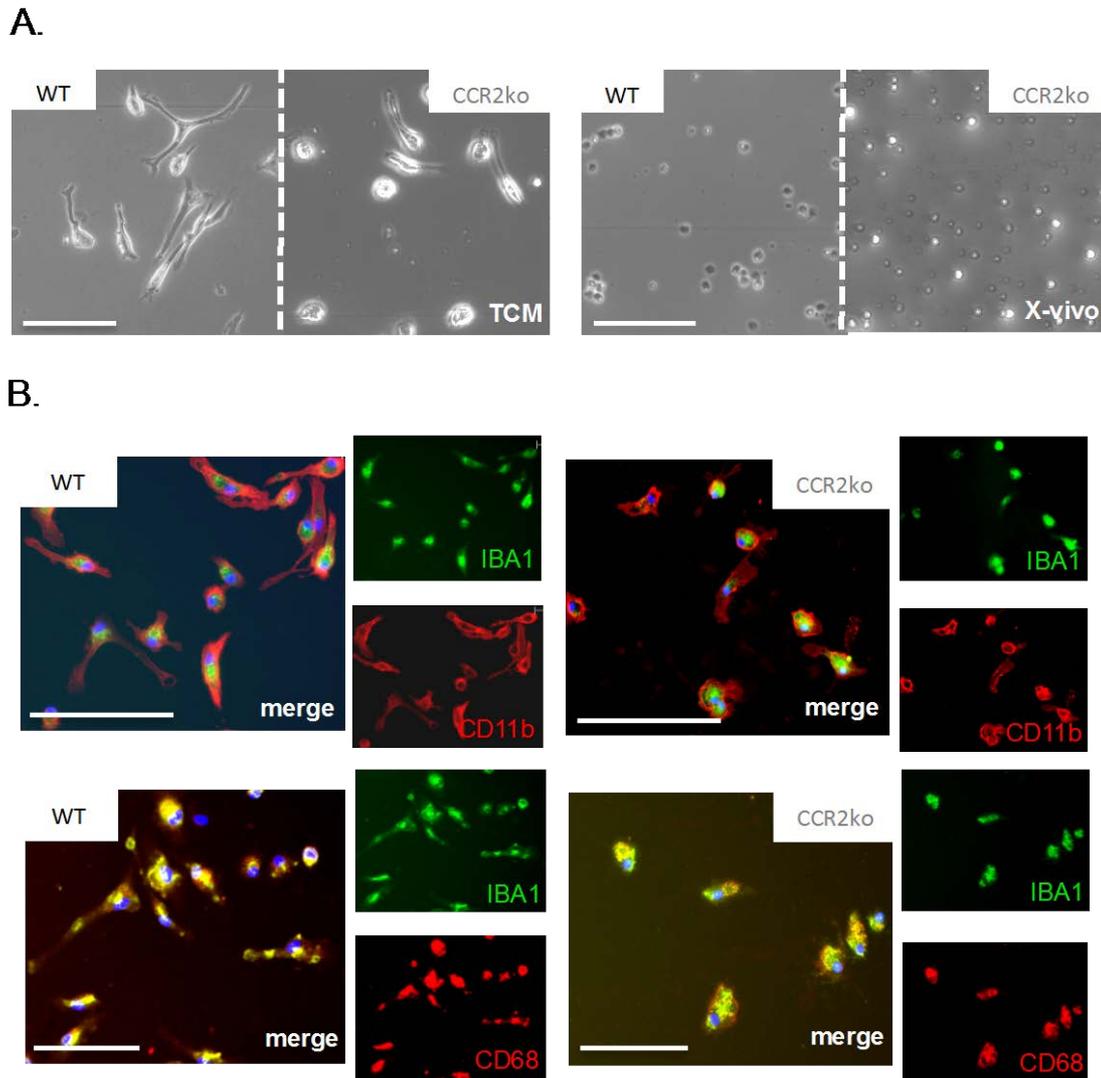


**Abb. 4-4: Mikroglia aus naivem Gehirngewebe im FACS.** (A) Nach Anfärbung vitaler Zellen sind CD11b<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup> „gegatete“ Abwehrzellen im naiven Gehirngewebe zu erkennen. Aufgrund der intakten Blut-Hirnschranke ist von einer reinen Mikroglia-Population auszugehen. (B) Diese sind in ähnlichen prozentualen Anteilen in WT- als auch in CCR2ko-Mäusen vorhanden. n=6 pro Gruppe.

#### 4.3.2. Mikroglia zeigen unterschiedliche Morphologie *in vitro*

Nach Homogenisierung und MACS®-Zellisolierung anhand ihres Oberflächenmoleküls CD11b wurden Mikrogliazellen aus naivem Mausgehirngewebe extrahiert (3.3.2.). Nach Erlangen einer hochreinen Positivfraktion (>95%) wurden die Zellen *in vitro* kultiviert und unterschiedlichen Kulturbedingungen ausgesetzt (TCM & X-vivo). Hierbei differenzierten

sie sich und bildeten adhärenzte Zellausläufer entsprechend ihrer zellulären Charakteristika als amöboide Abwehrzellen. Diese waren mit Hilfe einer Phasenkontrast-Bildaufnahme deutlich unter dem Mikroskop zu erkennen (Abb. 4-5.A.).



**Abb. 4-5: Mikroglia-Kulturen aus WT und CCR2ko-Mäusen an Tag 7.** (A) Phasenkontrast-aufnahme nach 7 Tagen in TCM und X-vivo. Nur in TCM kultivierte Mikroglia überlebten (links). Nach Kultivierung sind deutliche Unterschiede in der Zelldifferenzierung (unterschiedliche Ausbildung von Zellfortsätzen) zwischen WT und CCR2ko erkennbar. (B) Immunfluoreszenzfärbung mit monozytären Oberflächenmarkern IBA1, CD11b und CD68. In TCM-Medium kultivierte IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen exprimieren CD11b sowie CD68 gleichermaßen in WT- und in CCR2ko-Mäusen. Maßstabsbalken = 100µm.

Dabei differenzierten sich die im TCM-Medium kultivierten Zellen wesentlich schneller und auch ausgeprägter während die Zellen im X-Vivo-Medium eine verkürzte

Überlebenszeit aufwiesen und nur wenige Zellen 7 Tage überlebten (Abb. 4-5.A.rechts). Es konnten in der Phasenkontrastaufnahme diskrete phänotypische Unterschiede zwischen in TCM kultivierten Wildtyp- und CCR2ko-Mikroglia dargestellt werden. Die CCR2ko Mikroglia bildeten wesentlich weniger Fortsätze aus, wiesen dafür aber größere Zelleiber auf (Abb. 4-5.A.links). Nach der Fixierung konnten die Zellen entsprechend ihrer charakteristischen monozytären Oberflächenmarker CD11b, CD68 und IBA1 angefärbt werden. Dabei ließen sich Mikroglia in beiden Maustypen gleichermaßen in ausreichender Kontrastierung anfärben und wiesen keine wesentlichen Unterschiede in ihrem Expressionsmuster auf (Abb. 4-5.B.).

#### **4.4. Mikroglia/Makrophagen: Akkumulation und Phänotyp im Gliom-Model bei CCR2-Defizienz**

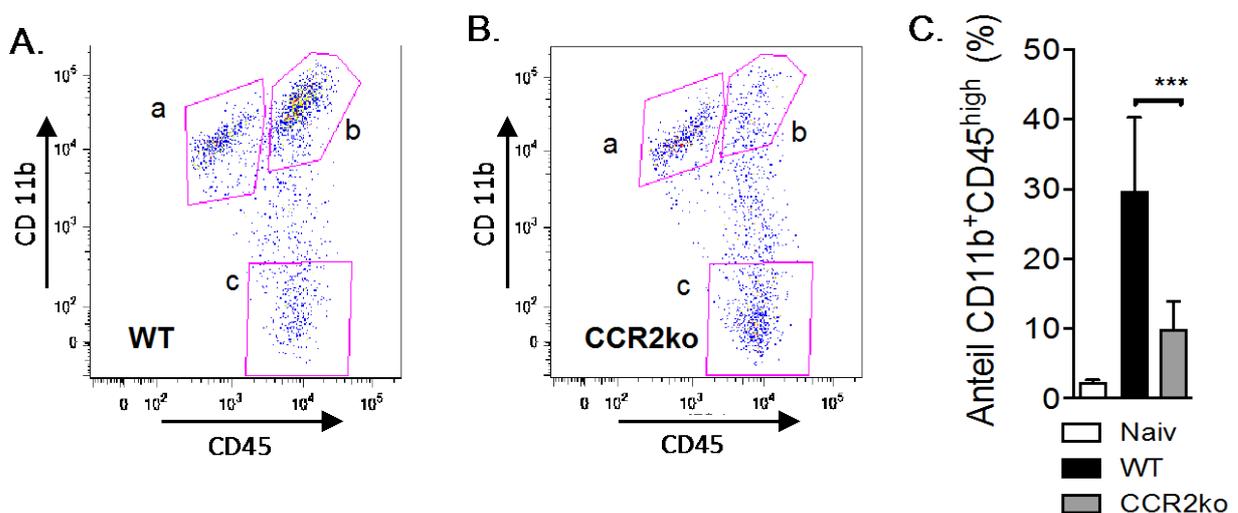
Die charakteristische Abwehrzellzusammensetzung im naiven Gehirngewebe verändert sich während des Tumorwachstums wesentlich. Das ist zum einen auf die zusammenbrechende Blut-Hirn-Schranke, aber zum anderen auch auf den sich verändernden Aktivierungsstatus der Abwehrzellen, während des entzündlichen Prozesses, zurückzuführen (10, 103). Einwandernde myeloide Monozyten differenzieren sich im Tumor zu Gewebemakrophagen und bilden zusammen mit den Mikroglia und Lymphozyten das immunologische Kompartiment des Tumors (9).

Anhand von FACS- als auch Immunfluoreszenz-Untersuchungen sollten die Immunzellen hinsichtlich ihrer Dichte, Verteilung, zellulären Aktivität und Expression im tumortragenden Gehirngewebe analysiert werden. Dafür wurden CCR2ko und WT-Mäuse 21 Tage nach TZI miteinander verglichen.

##### **4.4.1. Veränderte Zusammensetzung von Immunzellen in CCR2ko-Mäusen nach TZI**

In der FACS-Analyse ließen sich im tumortragenden Gehirngewebe anhand der Oberflächenmoleküle CD11b und CD45 im wesentlichen 3 unterschiedliche Abwehrzellpopulationen nachweisen (Abb. 4-6). Als erstes die schon aus dem naiven Gehirngewebe bekannte CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>-Zellfraktion (Abb. 4-6.A&B. (a)). Jedoch zeigte sich hierbei eine zweite charakteristische Subpopulation, welche deutlich positiver für

CD45 war ( $CD45^{high}$ ) (Abb. 4-6.A&B (b)). Diese Zellpopulation wird stets von vielen als reine Makrophagen-Population angesehen (9, 103). Wobei anzumerken ist, dass die Einteilung der Mikroglia und Makrophagen alleine nach der CD45-Expression kontrovers diskutiert wird (64, 74, 77). Weiterhin ließ sich eine  $CD11b^-$ - und  $CD45^+$ -Fraktion nachweisen (Abb. 4-6.A&B. (c)). Diese für Lymphozyten charakteristische Marker-Expression war ein weiterer Hinweis für die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke im Tumor, da diese das Gehirn unter normalen Bedingungen kaum penetrieren (104, 105). Schon bei alleiniger Betrachtung der Dot-Plots nach Zytometrie war ein deutlicher Unterschied der Zellzusammensetzung zwischen den CCR2ko- und den WT- Kontrollen zu erkennen (Abb. 4-6.A+B.). Tatsächlich konnte ein hoch signifikant verminderter Anteil der  $CD11b^+CD45^{high}$ -Population in den CCR2ko-Mäusen nachgewiesen werden. Im Mittel war die Fraktion dieser Zellen in den CCR2ko-Mäuse um 67% reduziert (Abb. 4-6.C.). Keine signifikanten Unterschiede ergaben die Untersuchungen der  $CD11b^+CD45^+$ - und der  $CD11b^-CD45^+$ -Fraktion (Daten nicht dargestellt). Die Ergebnisse wiesen auf eine deutliche Veränderung der Immunzell-Zusammensetzung in tumortragenden CCR2ko-Tieren hin.



**Abb. 4-6: Einwanderung von Immunzellen nach TZI.** (A) Nach „Gating“ der Immunzellen anhand der Oberflächenmarker CD11b und CD45 sind drei unterschiedliche Zellpopulationen zu erkennen. (a)  $CD11b^+CD45^+$  ; (b)  $CD11b^+CD45^{high}$  ; (c)  $CD11b^-CD45^+$ . (B+C) Auffällig ist die signifikant verminderte Akkumulation von  $CD11b^+CD45^{high}$ -Zellen in CCR2ko Tumoren. n= 4-8 pro Gruppe;  $p < 0,001$ (\*\*\*)

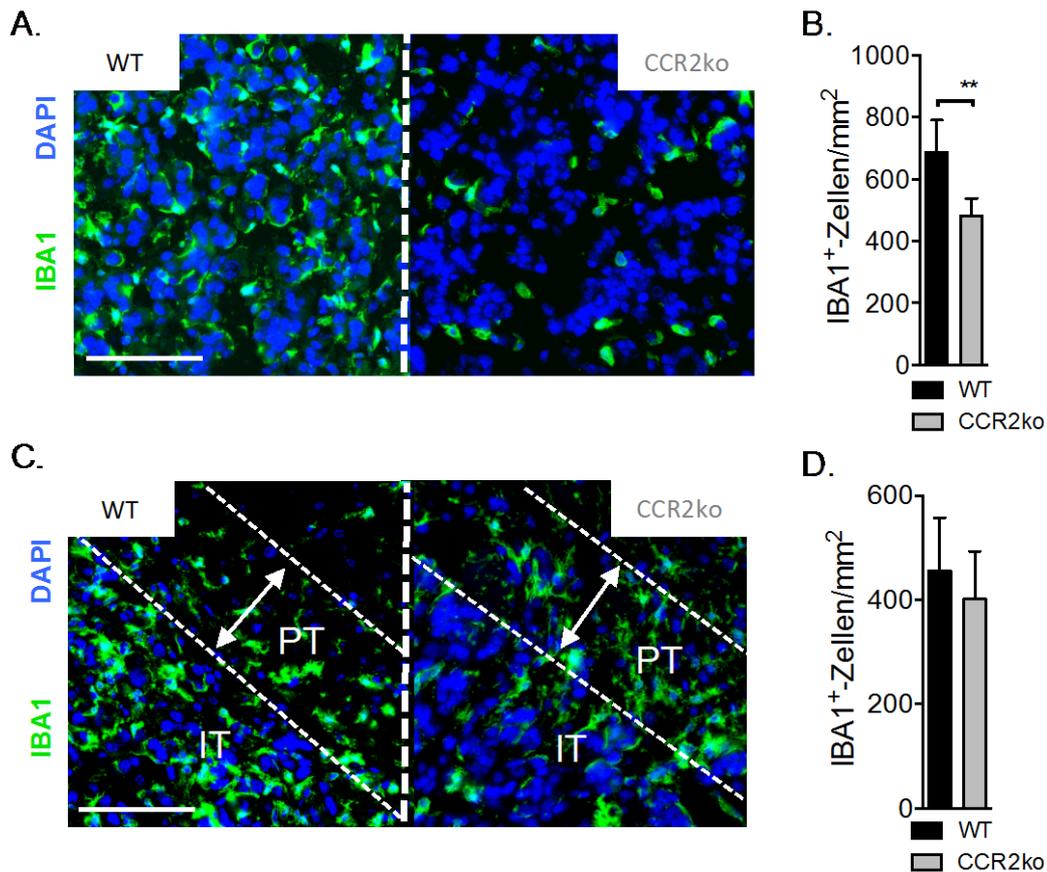
#### 4.4.2. Verminderte intratumorale Akkumulation von IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen in CCR2ko-Mäusen

Mit zunehmender Proliferation der GL261-Tumorzellen akkumulieren IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen in hoher Anzahl und machen etwa 10-20% der Tumorzellmasse aus (10). Daher ist der Einfluss von Mikroglia/Makrophagen in der Tumorbilogie naheliegend und diese Zellpopulation von hohem wissenschaftlichen Interesse. Wie bereits beschrieben, wurden die IBA1<sup>+</sup>-Zellen mit eindeutigen Zellkernnachweis gezählt und deren Dichte sowohl intra- als auch peritumoral berechnet.

Dabei zeigten sich in den Immunfluoreszenz-Aufnahmen eindeutige phänotypische Unterschiede zwischen den Gruppen mit einer verminderten intratumoralen Dichte IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen (Abb. 4-7.A.). Tatsächlich konnte nach Auszählung eine signifikant verminderte Mikroglia/Makrophagen-Dichte in den CCR2ko-Tumoren im Vergleich zum WT berechnet werden. Diese betrug in den CCR2ko-Tumoren im Mittel 30% weniger (Abb. 4-7.B.). Dies wies auf eine reduzierte Rekrutierungsfähigkeit von Abwehrzellen in den CCR2ko-Mäusen während des Tumorwachstums hin.

Die TZI mit der syngenen Tumorzelllinie GL261 ist ein anerkanntes Gliom-Mausmodell mit nachweisbar infiltrativem Charakter (93). Jedoch konnte man in den Immunfluoreszenz-Aufnahmen eine eindeutige Tumorgrenze festlegen. Außerhalb dieser Grenze waren nur wenige pleomorph-kondensierte Zellkerne der Tumorzellen nachzuweisen. Diese Grenzzone besaß trotzdem eine wesentliche Rolle bei der Untersuchung der Mikroglia/Makrophagen. In dem direkten Umgebungsareal waren weiterhin in hohem Maße IBA1<sup>+</sup>-Zellen nachweisbar. Dabei handelte es sich vermutlich um aktivierte Mikroglia/Makrophagen. Diese Zellen besaßen die typische vergrößerte und amöboide Form dieser Zellen. Daher wurde ein Bereich von 100µm Abstand von der Tumorgrenze analysiert (Abb. 4-7.C). Dieser Bereich konnte mithilfe des Auswertungsprogrammes ImageJ als Fläche dargestellt werden. Die Mikroglia/Makrophagen-Dichte wurde innerhalb dieser Fläche berechnet. Es zeigten sich jedoch zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede im peritumoralen Gewebe (Abb. 4-7.D.).

Es scheint, dass die reduzierte Dichte von Mikroglia/Makrophagen vornehmlich den intratumoralen aber nicht peritumoralen Bereich betrifft. Es war jedoch unklar, ob die verminderte Mikroglia/Makrophagen-Dichte auch auf eine veränderte zelluläre Aktivität zurückzuführen war. Dies sollte im Folgenden betrachtet werden.



**Abb. 4-7: Intratumorale und peritumorale Akkumulation IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen.** (A) Nach histochemischer Aufarbeitung der d21-Tumore und immunfluoreszierender Färbung für IBA1 kann man die Akkumulation der Mikroglia/Makrophage beurteilen. (B) Es zeigt sich eine signifikant verminderte IBA1<sup>+</sup>-Dichte intratumoral. (C) Der peritumorale Bereich wurde nach Identifizierung der Tumorgrenze mit einer Distanz von 100 μm von dieser definiert. (D) Hier zeigt sich kein Unterschied im Vergleich zur WT-Kontrolle. Maßstabsbalken = 100 μm. n = 6 pro Gruppe. p < 0,01 (\*\*)

#### 4.4.3. Unveränderte proliferative und apoptotische Aktivität der Mikroglia/Makrophagen im Tumorgewebe

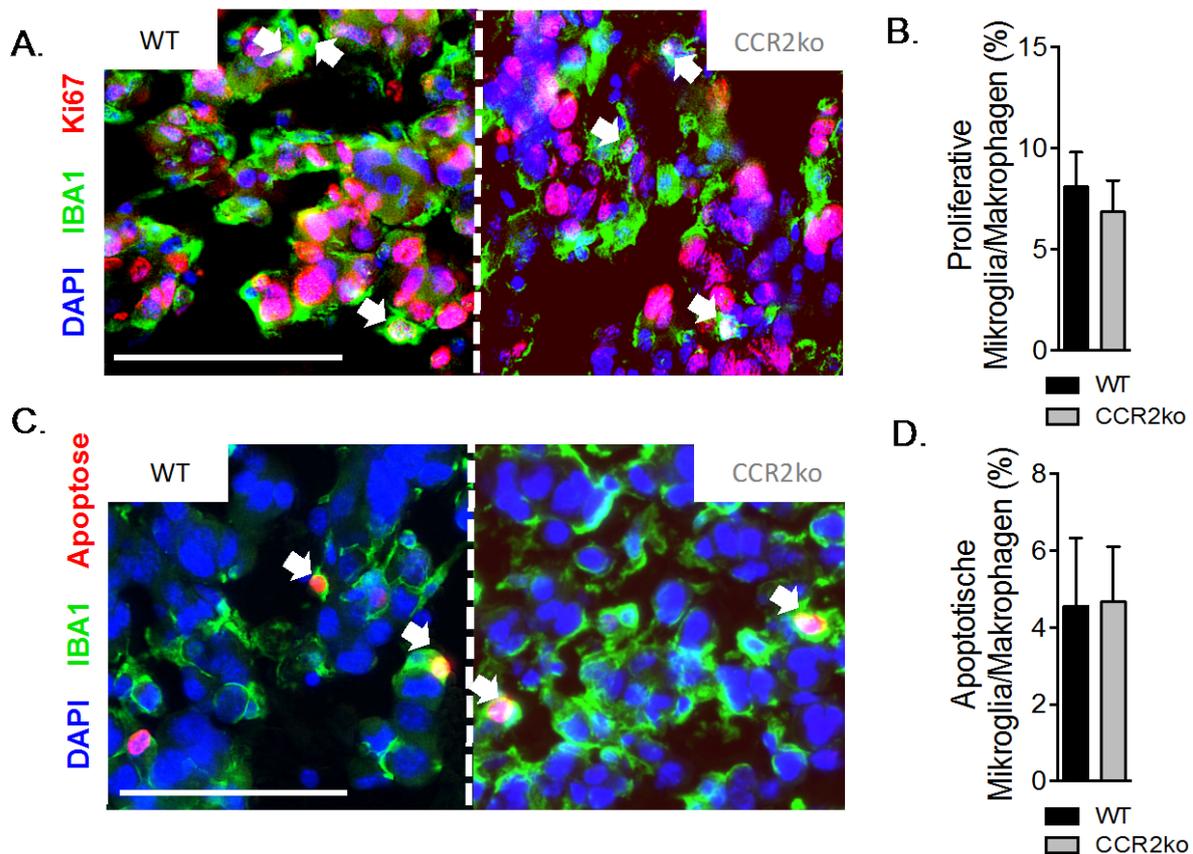
Da die Ursache der reduzierten intratumoralen Dichte der Mikroglia/Makrophagen unklar war, sollte die Analyse der intratumoralen IBA1<sup>+</sup>-Zellen, mit dem Proliferationsmarker Ki67 und einem „Apoptosis Detection Kit“ (ApopTag®), Hinweise auf deren zelluläre Aktivität geben. Vor allem sollte untersucht werden, ob die reduzierte Anzahl der Zellen auf eine verminderte Rekrutierung oder auf eine Veränderung des Gleichgewichtes von Apoptose zu Proliferation zurückzuführen war. Aus Untersuchungen unserer

Arbeitsgruppe war bekannt, dass während des fortgeschrittenen Wachstumsstadiums auch Abwehrzellen in hohem Maße proliferieren und zum immunologischen Pool der Gliome beitragen (Brandenburg *et al.*, Manuskript eingereicht; (106)).

Nach Anfärbung der Gefrierschnitte mit dem Proliferationsmarker Ki67 waren intrazelluläre Kernsignale deutlich zu erkennen. Da diese gleichermaßen proliferativ-aktive Tumorzellen anfärben, sind diese in der Abbildung ebenfalls dargestellt. Hier interessierte jedoch die proliferative Aktivität der IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen, welche entsprechend durch IBA1/Ki67-Kosignale dargestellt werden konnten (Abb. 4-8.A.). Es wurde der prozentuale Anteil der Ki67<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen an der insgesamt vorhandenen intratumoralen Mikroglia/Makrophagen Population berechnet. Dabei waren keine Unterschiede zu erkennen und eine veränderte proliferative Aktivität der Mikroglia/Makrophagen in CCR2ko-Mäusen war somit auszuschließen (Abb. 4-8.A.).

Für die Beurteilung der apoptotischen Aktivität wurde der prozentuale Anteil apoptotischer IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen bestimmt. Dafür wurden apoptotische Mikroglia/Makrophagen nach Anfärbung durch ein „Apoptosis Detection Kit“ (ApopTag®), sowie anschließender IBA1-Färbung sichtbar gemacht. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen zwischen den Gruppen war nahezu identisch (Abb. 4-8.B.).

Die Ergebnisse zeigten, dass die verminderte intratumorale Akkumulation von Mikroglia/Makrophagen in CCR2ko-Mäusen weder auf eine veränderte zelluläre Teilungsaktivität noch ein erhöhtes Zellsterben zurückzuführen war. Somit war eine verminderte Rekrutierung auf der Basis des unterbrochenen CCL2-CCR2 Signalwegs am wahrscheinlichsten.



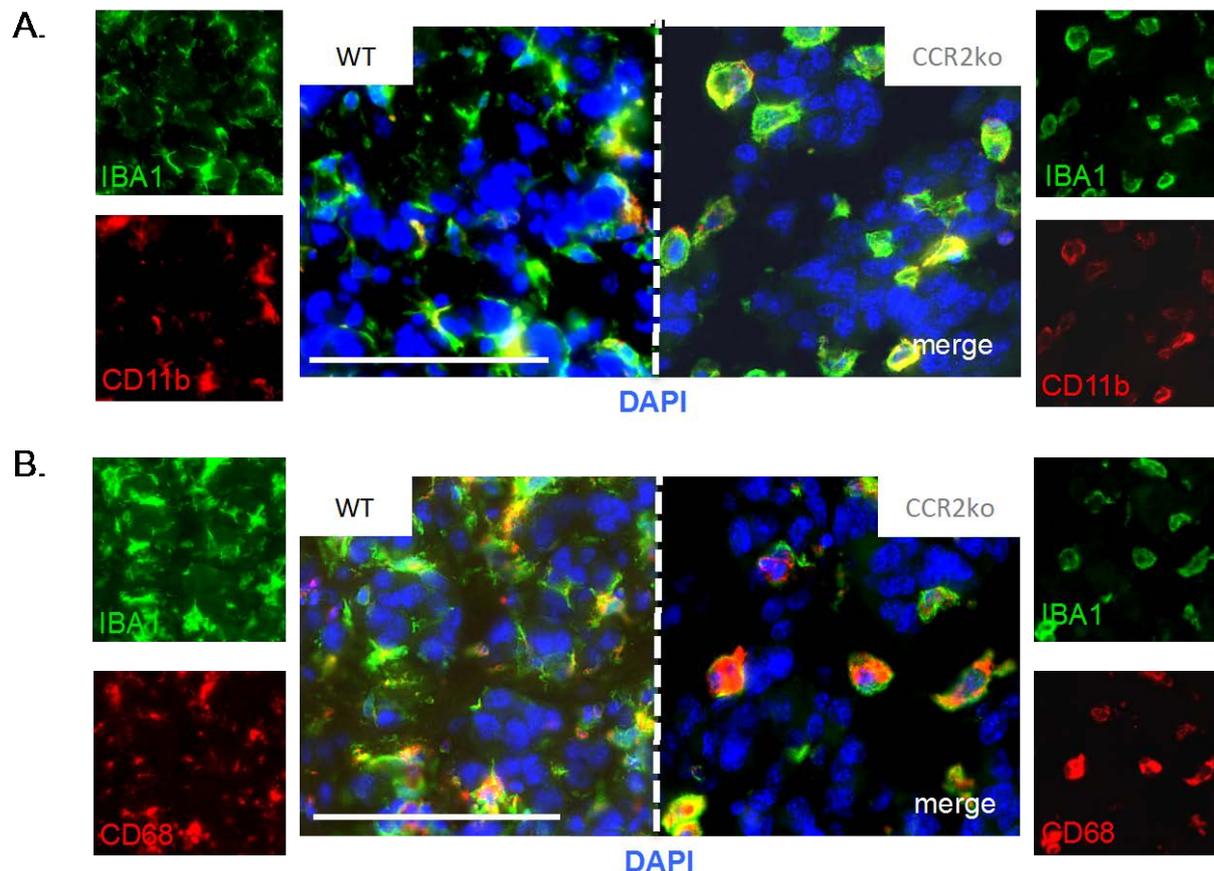
**Abb. 4-8: Proliferation und Apoptose von IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen.** (A) Dargestellt ist eine Ki67-Färbung proliferativer Zellen und eine IBA1-Färbung von Mikroglia/Makrophagen. Ausgezählt wurden Ki67/IBA1-Kosignale (Pfeile). (B) Es sind in der proliferativen Aktivität der IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen keine Unterschiede zwischen den beiden Maustypen zu beobachten. (C) Dargestellt ist eine ApoptTag®-Färbung apoptotischer Zellen und IBA1-Färbung von Mikroglia/Makrophagen. Ausgezählt wurden Apoptose/IBA1-Kosignale (Pfeile). (D) Es zeigt sich in Bezug auf die apoptotische Aktivität der Mikroglia/Makrophagen kein Unterschied zwischen den beiden Maustypen. Maßstabsbalken = 100µm. n= 6 pro Gruppe.

#### 4.4.4. *In vivo* Expression von Monozyten-/Makrophagen-Markern CD11b und CD68

Während des Tumorwachstums infiltrieren im Wildtyp in hohem Maße Mikroglia und Makrophagen. Diese reagieren entlang chemotaktischer Signale, die im entzündlichen Gewebe freigesetzt werden (19). Die Chemokin/Rezeptor-Interaktion führt nicht nur zur Rekrutierung sondern ebenso zur Zellaktivierung. Dies unterstützt die professionelle Abwehrreaktion phagozytierender Zellen. Nachweislich werden Oberflächenmoleküle, wie CD11b, IBA1, CD68, CD80 und CD86 gleichermaßen in Mikroglia und Makrophagen bei deren Aktivierung hochreguliert (64, 72-74, 107). Deren Expression lässt auf eine

immunologische Funktion der Abwehrzellen während des inflammatorischen Prozesses schließen. Es wurde daher die Expression dieser Moleküle in CCR2ko-Mäusen 21 Tage nach TZI untersucht und mit der von C57Bl6/J-Mäusen verglichen.

Nachdem in kultivierten Mikroglia die Ko-Expression charakteristischer Monozytenmarker CD11b und CD68 *in vitro* nachgewiesen werden konnte (3.3.2.), wurde auch die *in vivo* Situation dieser Moleküle in Mausgehirnen nach TZI untersucht. Mikroglia/Makrophagen zeigten sowohl in WT- als auch in CCR2ko-Tumoren eine deutliche Expression von CD11b und CD68 (Abb. 4-9.A&B). Im Vergleich zum kontralateralen Gewebe war hier eine deutliche Hochregulation entsprechend einer Aktivierung zu erkennen (nicht dargestellt). Da keine offensichtlichen phänotypischen Unterschiede in der Expression nachgewiesen werden konnten, wurde auf eine eingehende Untersuchung mit Auszählung entsprechender Zellen verzichtet.



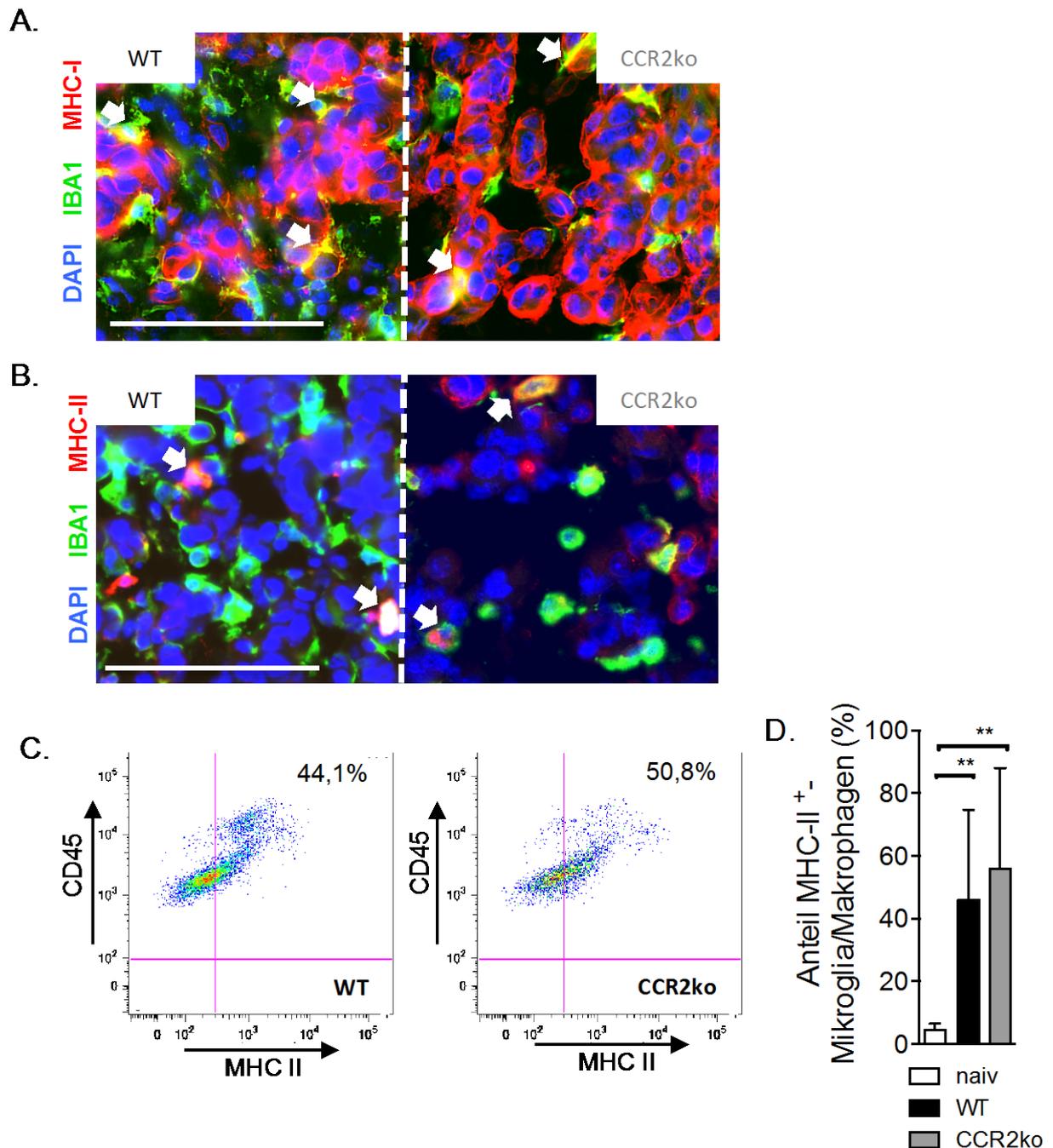
**Abb. 4-9: *In vivo* Expression von CD11b und CD68 der Mikroglia/Makrophagen.** (A) Dargestellt ist eine CD11b-Färbung der IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen. Es sind keine Unterschiede zwischen den beiden Maustypen in der Expression dieses Makrophagen-Markers zu erkennen. (B) Dargestellt ist eine CD68-Färbung der IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen. Es sind keine Unterschiede zwischen den beiden Maustypen in der Expression dieses Makrophagen-Markers zu erkennen. Maßstabsbalken = 100µm.

#### 4.4.5. *In vivo* Expression von Markern für die Antigenpräsentation MHC-I und MHC-II

In der Tumorummunologie spielen Moleküle zur Antigenpräsentation wie MHC-I und MHC-II eine wesentliche Rolle und werden im hohen Maße von Tumorzellen und Abwehrzellen während des entzündlichen Prozesses beim Tumorwachstum exprimiert (107). Sie dienen, nach entsprechender intrazellulärer Prozessierung, der Präsentation körperfremder Strukturen (MHC-Restriktion), sowie Regulierung und Rekrutierung von Abwehrzellen (74, 107). MHC-I wird auf nahezu allen Körperzellen exprimiert, während die Expression von MHC-II auf professionell antigenpräsentierende Zellen (APC) beschränkt bleibt (9, 74, 107). Da Mikroglia/Makrophagen zu diesen professionell antigenpräsentierenden Zellen gehören und sie scheinbar eine zentrale immunologische Funktion innerhalb des Tumorwachstums besitzen, wurde die Expressionsintensität dieser Oberflächenmoleküle untersucht.

Bei immunfluoreszenz-mikroskopischer Untersuchung der MHC-I-Expression zeigte sich erwartungsgemäß direkt intratumoral eine ausgeprägte Expression. Vornehmlich Tumorzellen exprimierten MHC-I an ihrer Zelloberfläche. Jedoch konnte auch zum Teil eine konsekutive Ko-Expression von IBA1 und MHC-I als Nachweis für die Antigenität nukleärer Mikroglia/Makrophagen nachgewiesen werden (Abb. 4-10.A.).

Das meist nur von professionell antigenpräsentierenden Zellen exprimierte MHC-II, konnte auf IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen nachgewiesen werden. Jedoch zeigten nicht alle IBA1<sup>+</sup>-Zellen eine MHC-II-Expression (Abb. 4-10.B.). Aufgrund dieses eher selektiven Expressionsmusters wurde der Anteil der MHC-II-Expression der Mikroglia/Makrophagen im FACS untersucht und diese zwischen den beiden Maustypen verglichen. Als Kontrolle dienten naive C57Bl/6J-Mausgehirne, die nur zu einem sehr geringen Anteil MHC-II exprimierten (Abb. 4-10.D.). In tumortragenden Mausgehirnen der zu vergleichenden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der MHC-II-Expression von eingewanderten CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>-Immunzellen. Diese war aber in beiden Maustypen im Vergleich zu naiven Mikroglia signifikant hochreguliert (Abb. 4-10.C&D.). Somit konnte zwar kein funktionell veränderter Phänotyp eingewanderter Abwehrzellen in den CCR2ko-Mäusen erkannt, jedoch eine deutliche Hochregulation dieser antigenprozessierenden Moleküle in beiden Maustypen nachgewiesen werden.

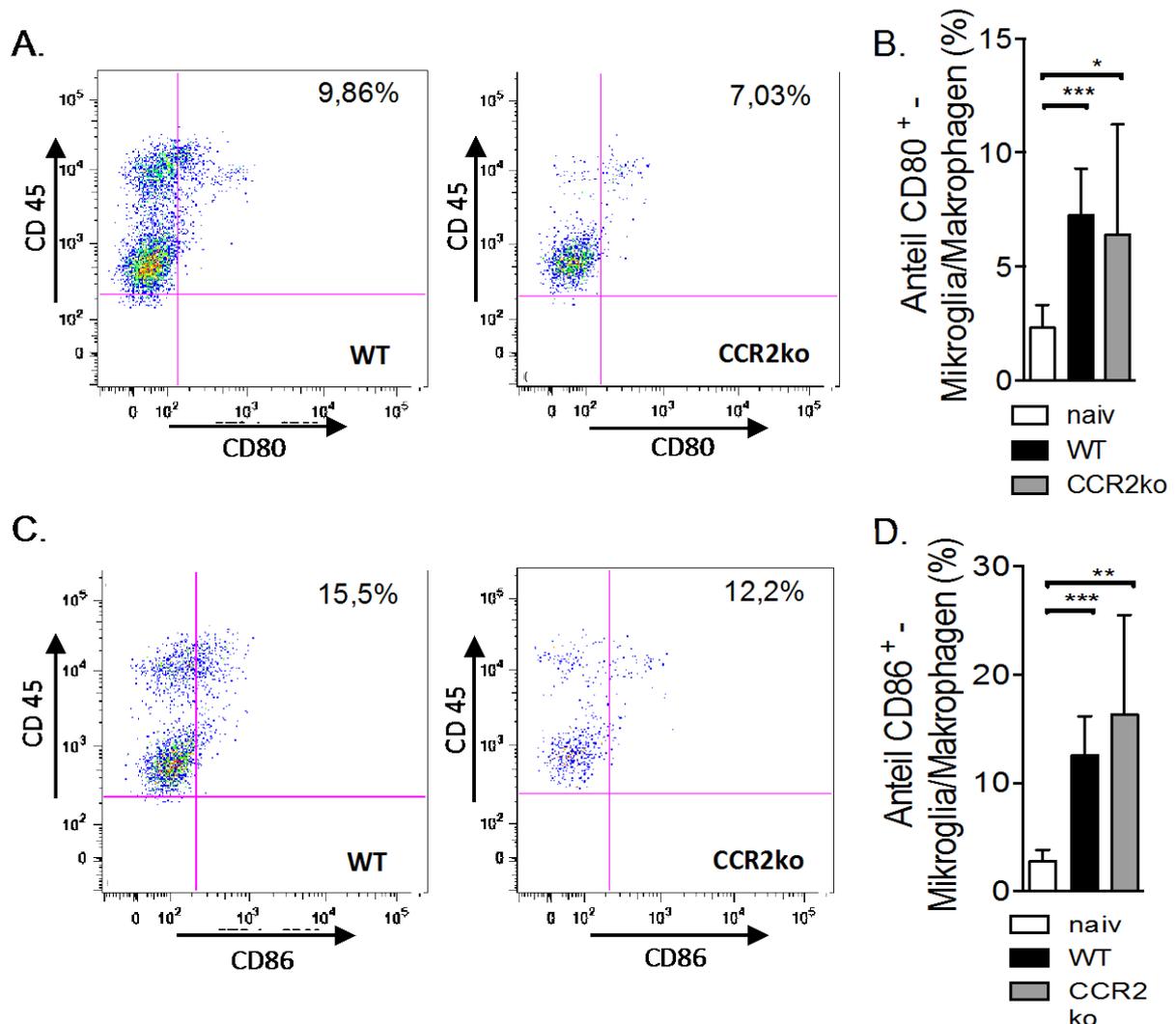


**Abb. 4-10: MHC-I- und MHC-II-Expression *in vivo*.** (A) Dargestellt ist die MHC-I-Expression auf Tumorzellen und MHC-I/IBA1-Ko-Expression der Mikroglia/Makrophagen (Pfeile). Hierbei zeigten sich keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den Maustypen. (B) Dargestellt ist die Expression von MHC-II auf den professionell antigenpräsentierenden Mikroglia/Makrophagen (Pfeile). (C) Diese waren nur zu einem gewissen Anteil positiv für MHC-II, was sich in der FACS-Analyse bestätigte. (D) Es sind jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Maustypen zu beobachten. Maßstabsbalken = 100µm. n = 4-8 pro Gruppe. p < 0,01 (\*\*)

#### 4.4.6. Expression ko-stimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86

Während eines Entzündungsprozesses werden weitere Aktivierungsmarker hochreguliert: So sind CD80 und CD86 an der Zelloberfläche von Monozyten und B-Lymphozyten wichtige ko-stimulatorische Moleküle als Liganden für CD28 und CTLA-4 zur T-Zellaktivierung (108). Diese werden nachweislich in aktivierten Mikroglia/Makrophagen hochreguliert und können nach entsprechender Färbung nachgewiesen werden (64, 74). Zur Auswertung und Kontrolle möglicher Unterschiede in der immunologischen Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen, wurden diese Moleküle anhand einer FACS-Analyse in den jeweiligen tumortragenden Mausgehirnen untersucht. Hierbei dienten wiederum naive B157/6J-Gehirne als Kontrolle, da in diesen die Aktivierungsmoleküle der Monozyten in einem nur sehr geringem Ausmaß exprimiert werden. Sowohl CD80 als auch CD86 zeigten eine signifikante Hochregulation im WT (Abb. 4-11.A&B.). Insgesamt war die Expression für CD86 ausgeprägter im Vergleich zu CD80 (Abb. 4-11.A&B.). Im Vergleich zu CCR2ko konnten jedoch keine Unterschiede ermittelt werden (Abb. 4-11.A&B.).

Zusammenfassend war die zelluläre Expression ko-stimulatorischer Moleküle in CCR2ko-Mäusen nicht eingeschränkt und es konnten auch allgemein keine Veränderungen in der Aktivierung der infiltrierenden Mikroglia/Makrophagen nachgewiesen werden.



**Abb. 4-11: CD80 und CD86 Expression auf CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>-Abwehrzellen in der FACS-Analyse.** (A) Dargestellt ist die Expression von CD80 in tumortragenden Gehirnen beider Maustypen, wobei diese vornehmlich von CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup>-Zellen exprimiert wurden. (B) Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung verglichen zu naiven Kontrollgewebe, jedoch ohne Unterschiede zwischen den Maustypen. (C) Ähnlich verhält es sich bei der Expression von CD86, bei einem im Mittel höherem Anteil positiver Zellen. (D) Es können keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Expressionsniveaus der CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>-Zellen festgestellt werden. n= 4-8 pro Gruppe. p<0,05(\*); p<0,01(\*\*); p<0,001

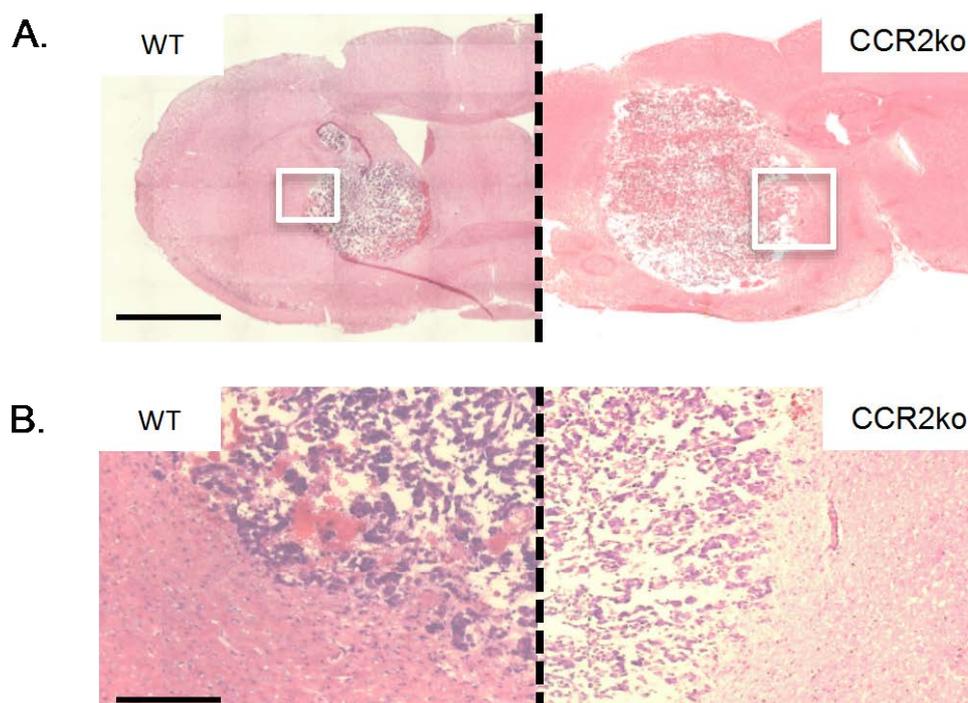
#### 4.5. Einfluss des CCR2-Defizits auf die Tumorgroße

Ziel dieser Arbeit war es, Einflüsse der CCR2-Defizienz zum einen auf die Rekrutierung von Mikroglia/Makrophagen zu untersuchen, aber im Wesentlichen auch einen möglichen Einfluss auf die Tumorbilogie zu detektieren. Da angenommen wurde, dass

Mikroglia/Makrophagen einen großen Einfluss auf tumorbiologische Prozesse besitzen, erschien eine weitere Analyse des Tumors aufgrund der verminderten Infiltration von Mikroglia/Makrophagen sinnvoll. Zur histologischen Übersicht wurden nach neuropathologischem Standardprotokoll Hämatoxylin-Eosin(H.E.)-Färbungen angefertigt (3.4.2.). Zusätzlich fanden tumorvolumetrische Messungen statt und die Tumorzellen wurden hinsichtlich ihrer proliferativen und apoptotischen Aktivität untersucht.

#### 4.5.1. Vergleichbares infiltratives Wachstum anhand Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung

Für die H.E.-Färbung wurden Schnitte von Tag 21 zur histologischen Beurteilung der Tumore verwendet. Es waren dabei typische histologische GBM-Charakteristika wie Hyperzellularität mit nukleären Atypien, nekrotische Areale und eine diskrete infiltrative Komponente vorhanden (Abb. 4-12.A.).



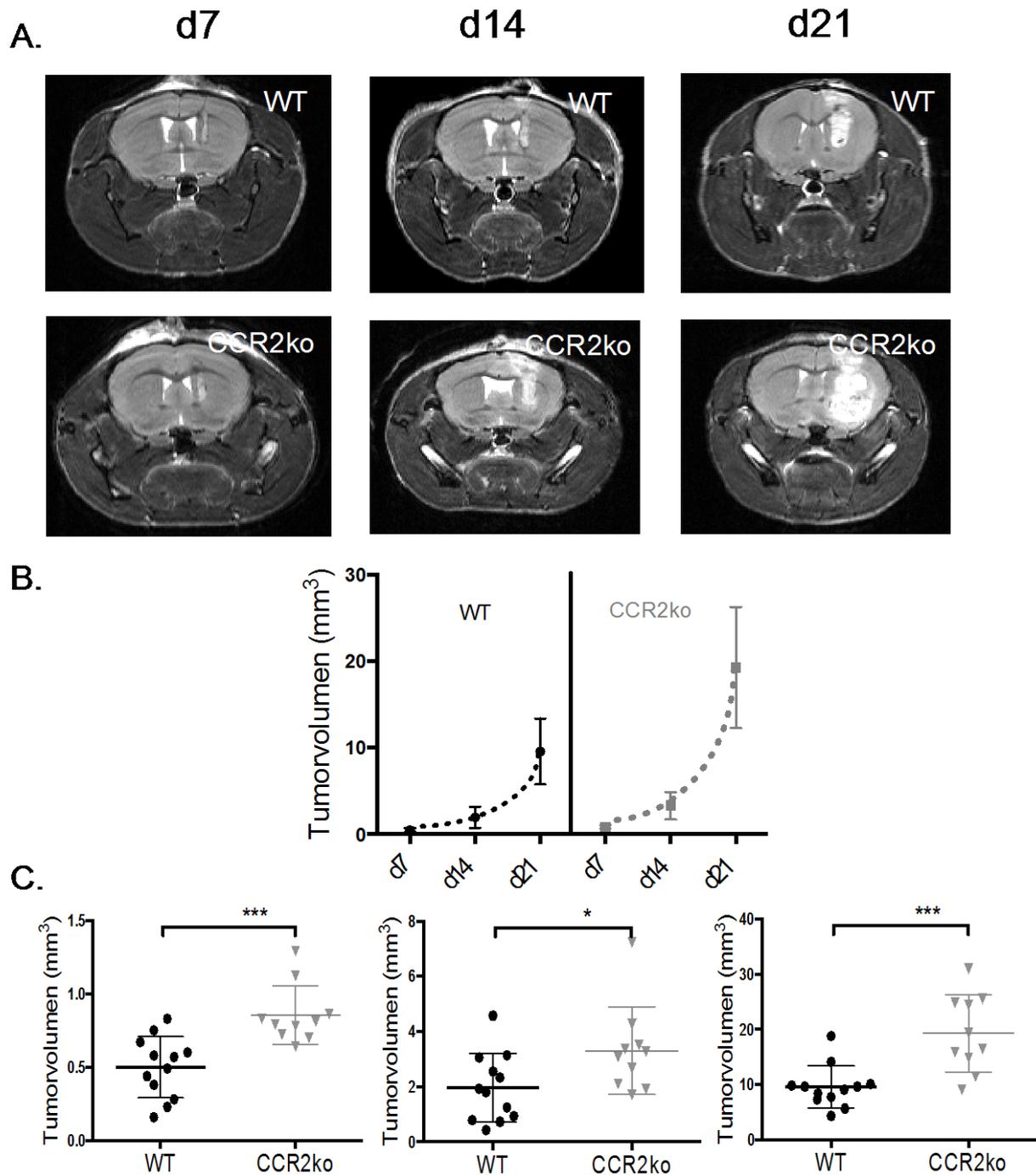
**Abb. 4-12: H.E.-Färbung der Gliome.** (A) In der Übersichtsfärbung sind die tumortragenden Anteile deutlich sichtbar, wobei abgesehen der größeren Tumore der CCR2ko-Mäuse keine Unterschiede im Wachstumsverhalten auffällig sind. Maßstabsbalken = 1mm. (B) Auch bei näherer Betrachtung sind keine Unterschiede bezüglich des infiltrativen Wachstumsverhalten der Tumore zwischen den Maustypen zu erkennen. Maßstabsbalken = 100 $\mu$ m.

Es war ersichtlich, dass CCR2ko-Mäuse größere Tumore entwickelten (Abb. 4-12.A.). Nach sorgfältiger Begutachtung der Tumorränder waren keine Unterschiede im Infiltrationscharakter der Gliome zu entdecken (Abb. 4-12.B.).

### **4.5.2. Beschleunigtes Tumorwachstum in CCR2ko-Mäusen**

Aufgrund des unklaren Wachstumsverlaufes der GL261-Tumorzellen in CCR2ko-Mäusen, wurden an 3 spezifischen Zeitpunkten (d7, d14, d21) nach TZI die Tumorumfänge anhand einer MRT-Analyse untersucht. Der gemeinsame Endpunkt am Tag 21 wurde so gewählt, da so eine möglichst repräsentative Tumormenge bei gleichzeitiger Minimierung der Sterberate erreicht wurde. Dabei wurde zum einen das Tumorwachstum im Verlauf beobachtet, aber zum anderen auch die Tumormenge zu den einzelnen Zeitpunkten direkt im Vergleich untersucht.

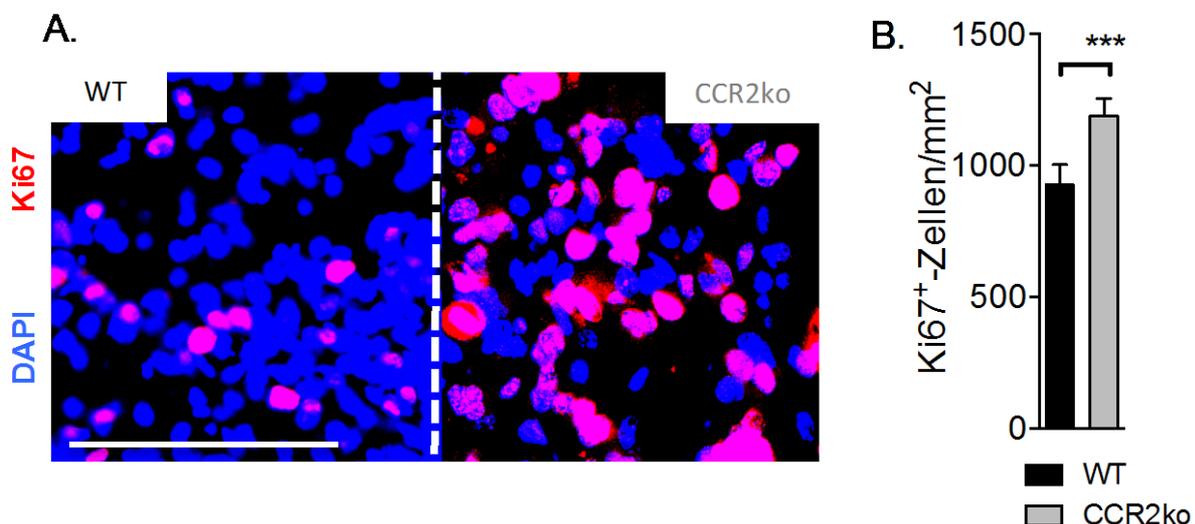
Bereits bei Begutachtung der MRT-Bilder zeigten, die in der rechten Gehirnhälfte gelegenen Tumore der CCR2ko-Mäuse deutliche Größenunterschiede im Vergleich zum WT (Abb. 4-13.A.). Über die Zeit gesehen, zeigte sich sowohl in den WT- als auch den CCR2ko-Mäusen der charakteristische exponentielle Wachstumsverlauf der GL261-Tumorzelllinie mit einem Maximum an Tag 21 (Abb. 4-13.B.). Hierbei wurde jedoch beobachtet, dass der Wachstumsverlauf in den WT-Mäusen erheblich abgeflachter war (Abb. 4-13.B.). Bei Betrachtung der Tumorumfänge zu den einzelnen Zeitpunkten zeigten die CCR2ko-Mäuse größere Tumorumfänge. Dabei waren zu allen Zeitpunkten signifikante Unterschiede zu verzeichnen (Abb. 4-13.C.). Somit konnte ein beschleunigter, exponentieller Wachstumsverlauf im CCR2ko-Modell beobachtet werden, dessen weitere Untersuchung erfolgte.



**Abb. 4-13: MRT-Darstellung und Volumetrie der Tumore an d7, d14 und d21 nach TZI.** (A) Erkennbar sind die orthotop, paraventrikulär, sowie substriatal gelegenen Tumore in der rechten Gehirnhemisphäre der beiden Maustypen. (B) Charakteristisch ist das exponentielle Tumorwachstum der Tumorzelllinie GL261. (C) Signifikant vergrößerte Tumolvolumina in den CCR2ko-Tieren zeigen sich zu allen beobachteten Zeitpunkten.  $n = 10-12$  pro Gruppe.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

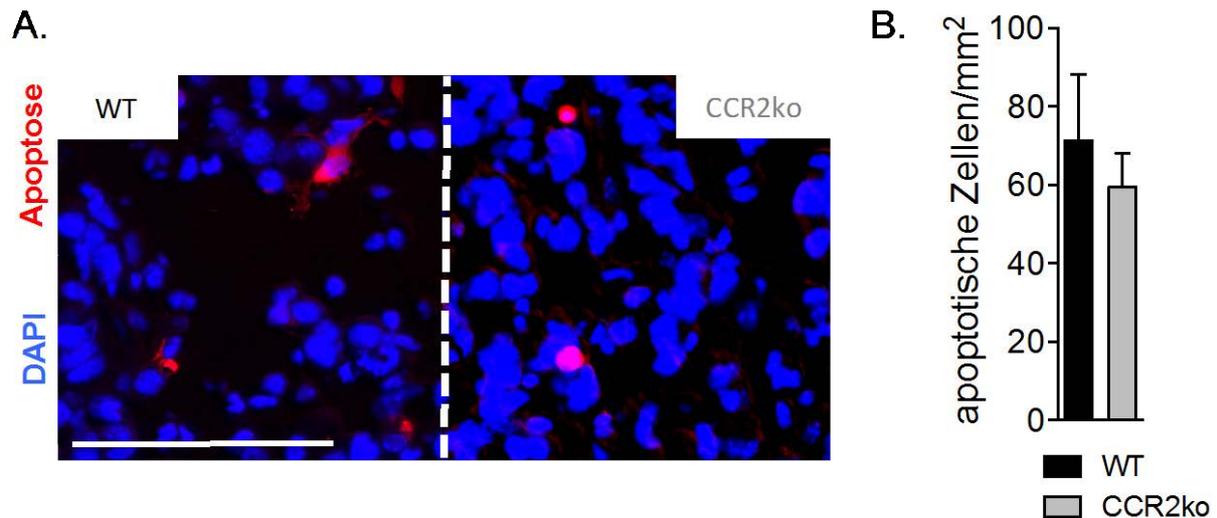
#### 4.5.3. Größere Tumorumfänge der CCR2ko-Mäuse bei erhöhter proliferativer Aktivität und gleichbleibender Apoptoserate der Tumorzellen

Da die Unterschiede der Tumormassen offensichtlich, aber der Mechanismus dahinter unklar war, wurden die Tumorzellen hinsichtlich ihrer proliferativen Aktivität untersucht. Ki67 diente hierbei als Proliferationsmarker. Schon bei alleiniger Betrachtung der Tumore und ihrer proliferativen Signale, waren mehr Ki67<sup>+</sup>-Zellen in den CCR2ko Mäusen zu beobachten (Abb. 4-14.A.). Passend zur Tumormasse zeigte sich eine signifikante, um 22%, erhöhte proliferative Aktivität der Tumorzellen (Anzahl der Ki67<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup>-Tumorzellkerne) in den CCR2ko-Tieren (Abb. 4-14.B.).



**Abb. 4-14: Proliferation der Tumorzellen.** (A) Dargestellt sind die DAPI<sup>+</sup>, pleo-/polymorphen, sowie vergrößerten Tumorzellkerne, deren proliferative Aktivität durch Ki67-Signale sichtbar wird. (B) Eine signifikant erhöhte proliferative Aktivität für diese Tumorzellen ist zu beobachten. Maßstabsbalken = 100µm. n = 6 pro Gruppe. p < 0,001 (\*\*\*)

Neben der Proliferation stellt die Apoptose-Rate einen wichtigen Faktor zur Untersuchung der Tumorzellaktivität dar. Mit Hilfe des „Apoptosis Detection Kit“ (ApopTag®) wurden apoptotische Zellkerne nachgewiesen. Dabei war kein offensichtlicher Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen (Abb. 4-15.A.). Auch nach entsprechender Auszählung konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 4-15.B.).



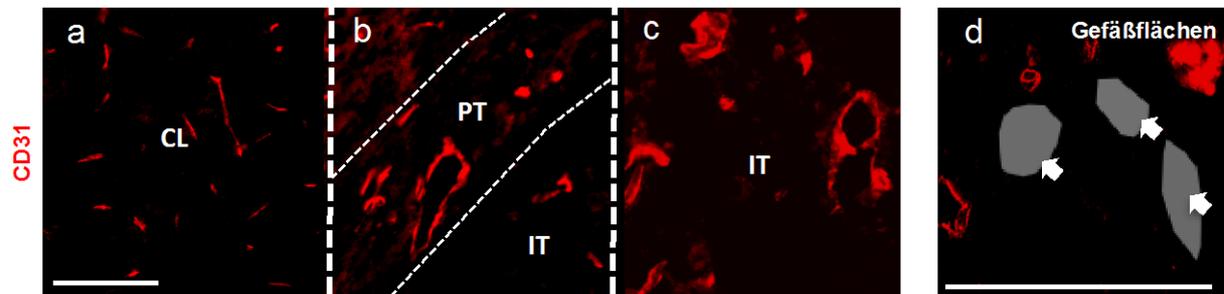
**Abb. 4-15: Apoptose der Tumorzellen.** Dargestellt sind die DAPI<sup>+</sup>-, pleo-/polymorphen, sowie vergrößerten Tumorzellkerne, deren Apoptoserate durch ApopTag® sichtbar wird. (B) Es waren keine signifikanten Unterschiede in der apoptotischen Aktivität der Tumorzellen zu beobachten. Maßstabsbalken = 100µm. n= 6 pro Gruppe.

Somit konnte angenommen werden, dass die größeren Tumore der CCR2ko-Mäuse auf eine erhöhte proliferative Aktivität bei gleichbleibender Apoptose-Rate zurückzuführen waren.

#### 4.6. Veränderte Vaskularisierung in Tumoren CCR2-defizienter Mäuse

Die Bedeutung von Gefäßen und der Angiogenese für das Tumorwachstum ist bekannt. Für eine Ursachensuche der veränderten Tumorgößen war eine Gefäßanalyse der CCR2ko-Tumore im Vergleich zu den C57Bl6/J-Mäusen naheliegend. Die Gefäßuntersuchung im Gehirngewebe erfolgte mittels des spezifischen Endothelzellmarkers CD31 (PECAM-1). Dabei wurde ähnlich wie bei den Mikroglia/Makrophagen eine Auszählung unterschiedlicher Hirnareale vorgenommen. Es wurden die kontralateralen Areale (CL) analysiert, welche natives Gehirngewebe darstellten und zur Beurteilung der Ausgangslage herangezogen wurden. Außerdem wurden intratumorale (IT), sowie peritumorale Bereiche (PT) erfasst und zwischen den Gruppen verglichen (Abb. 4-16.a-c.). Die Gefäße wurden jeweils mit Hilfe eines speziellen ImageJ-Tool (Cell-counter) einzeln ausgezählt, deren Dichte bezogen auf die Fläche bestimmt, sowie eine Flächenberechnung für die markierten Gefäße durchgeführt (Abb.

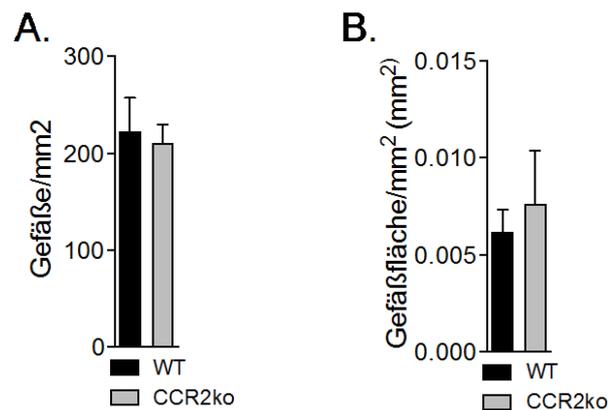
4-16.d.). Die Gefäße wurden zur näheren Betrachtung in zwei Gruppen unterteilt (Makro- & Mikrogefäße) und die Analysen erneut durchgeführt. Eine Assoziation von IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen zu den Gefäßen war auffällig und wurde für weitere Untersuchungen berücksichtigt.



**Abb. 4-16: Gefäßdarstellung in unterschiedlichen Hirnarealen anhand des Endothelzellmarkers CD31.** (a) Zu erkennen waren die dünnen und kleinen Gefäße kontralateraler Hirnareale (CL), (b) die veränderte und dichtere Gefäßarchitektur des tumorangrenzenden peritumoralen Bereiches (PT), (c) sowie die intratumorale Gefäßversorgung (IT) mit zum Teil größeren Gefäßdurchmessern. (d) Gefäßareale wurden anhand des Innendurchmessers der mit CD31<sup>+</sup>-Endothelzellen umrandeten Gefäße ausgemessen (Pfeile). Maßstabsbalken = 100μm.

#### 4.6.1. Vergleichbare Gefäßdichte und –fläche in naivem Gehirnparenchym

Wie bereits beschrieben, wurden für die Bestimmung eines Ausgangswertes die Gefäße der naiven, kontralateralen Gehirnhälfte ausgezählt und deren Fläche bezogen auf den mm<sup>2</sup> bestimmt. Nach Betrachtung der CD31-gefärbten Schnitte zeigte sich auf der kontralateralen Seite eine charakteristische Anfärbung dünner, filigraner Gefäßäste entsprechend naivem Gehirngewebes (Abb. 4-16.a.). Die Auszählung und Berechnung der Dichte erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mausotypen (Abb. 4-17.A.). Nach Berechnung der Gefäßflächen kam es zu ähnlichen Erkenntnissen (Abb. 4-17.B.). Auch sonst waren keine weiteren Auffälligkeiten zu beobachten und man konnte daher festhalten, dass die Ausgangslage für die Analyse der Gefäße innerhalb beider Gruppen vergleichbar war.

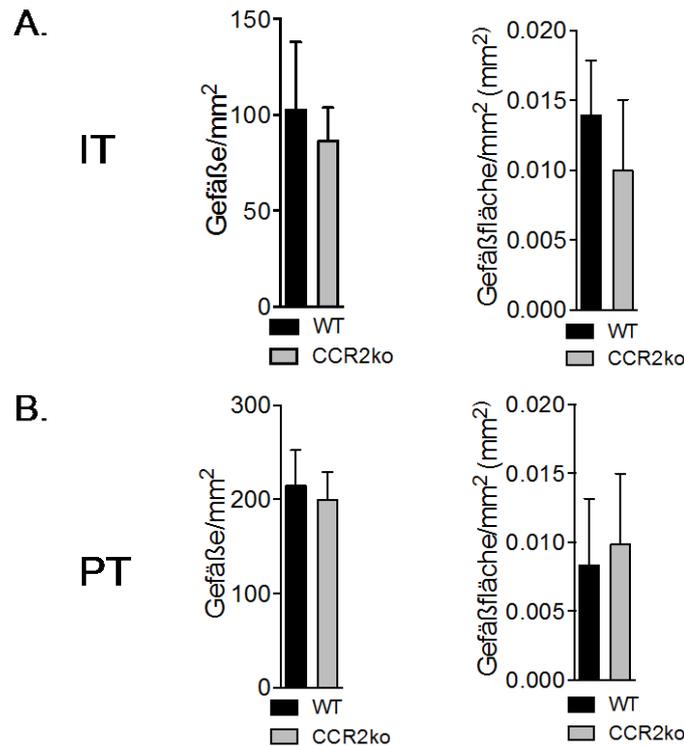


**Abb. 4-17: Kontralaterale GefäÙzählung und Flächenberechnung.** (A) Dargestellt ist die GefäÙdichte bezogen auf den mm<sup>2</sup> in kontralateralen Gehirnarealen. (B) Weiterhin wurde die GefäÙfläÙe (in mm<sup>2</sup>), bezogen auf den mm<sup>2</sup> Gehirnparenchym, berechnet. n= 6 pro Gruppe.

#### 4.6.2. Keine Unterschiede in GefäÙdichte und –fläÙe in Tumorarealen

Die intratumorale GefäÙanalyse ermöglicht eine Aussage über die GefäÙversorgung und damit auch über die nutritive Versorgung des Tumors. Sie könnte Hinweise und damit auch eine Erklärung für die unterschiedliche Zellaktivität der Tumorzellen zwischen den Maustypen geben. Jedoch konnte man nach GefäÙauszählung keinen signifikanten Unterschied zwischen den Maustypen feststellen. Auch wenn man die GefäÙfläÙe im Mittel auf den mm<sup>2</sup> berechnete, zeigten sich nur latente, nicht-signifikante Unterschiede zwischen WT- und CCR2ko-Tumoren (Abb. 4-18.A.).

Peritumorale Areale waren ebenso von besonderem Interesse, da sie die Ausgangsregion für die Tumorversorgung und Angiogenese darstellten. Die GefäÙversorgung war in diesem Bereich besonders ausgeprägt. Jedoch zeigten sich auch hier weder in Bezug auf die GefäÙdichte noch in den GefäÙfläÙen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Maustypen (Abb. 4-18.B.).



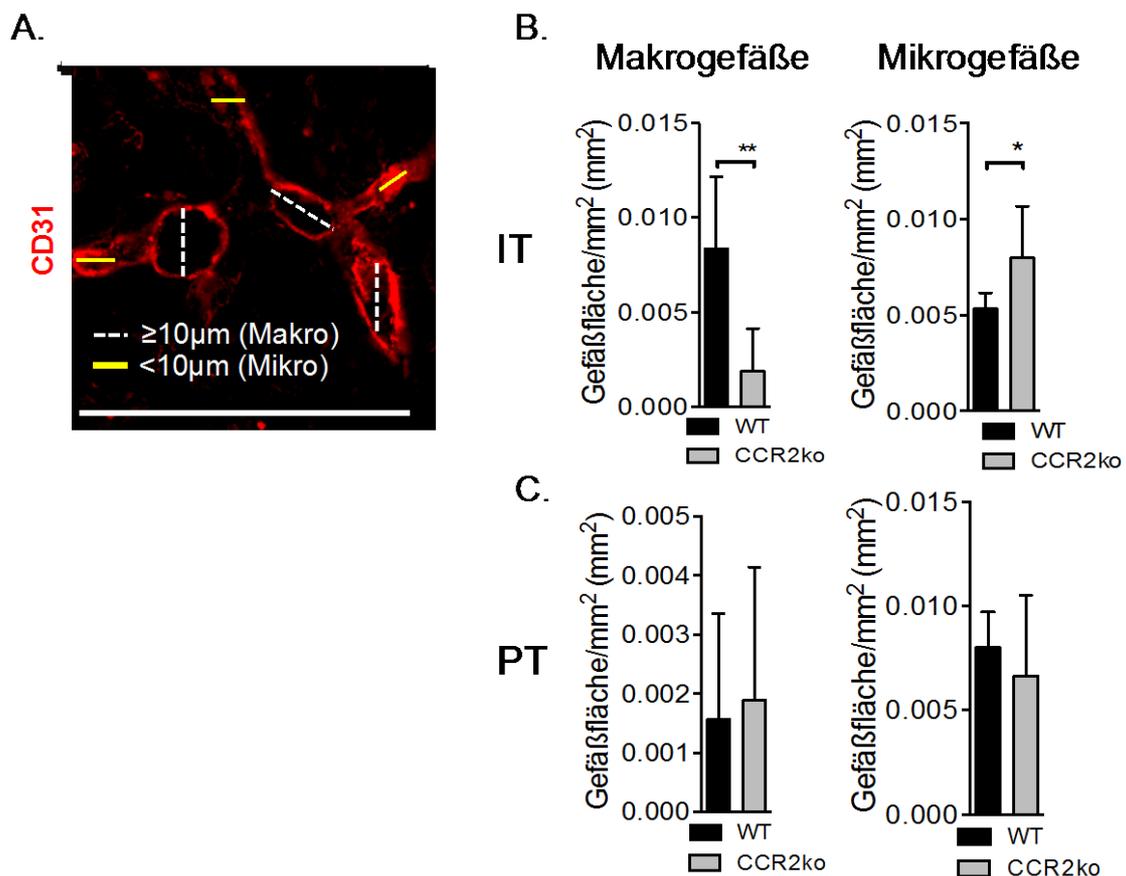
**Abb. 4-18: GefäÙzählung und Flächenberechnung in intratumoralen sowie peritumoralen Arealen.** (A) Dargestellt ist die GefäÙdichte bezogen auf den mm<sup>2</sup> in intratumoralen Bereichen. Weiterhin wird die GefäÙfläÙe (in mm<sup>2</sup>), bezogen auf den mm<sup>2</sup>, berechnet. (B) Ähnlich verhält es sich in den peritumoralen Bereichen. Hier sind keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. n= 6 pro Gruppe.

#### 4.6.3. Differenzierte Betrachtung verdeutlicht Veränderung der GefäÙarchitektur

Nach näherer Betrachtung der GefäÙe beider Maustypen waren diskrete Unterschiede wahrnehmbar, so dass die GefäÙe in zwei Gruppen aufgeteilt wurden. Es wurden größere MakrogefäÙe mit einem Durchmesser  $\geq 10\mu\text{m}$  von kleineren MikrogefäÙen mit einem Durchmesser  $< 10\mu\text{m}$  unterschieden (Abb. 4-19.A.). Diese Einteilung machte es möglich, Unterschiede zu objektivieren, sowie eine Veränderung der GefäÙarchitektur zu erkennen.

So konnten deutliche Unterschiede der intratumoralen GefäÙfläÙe zwischen WT- und CCR2ko-Tieren beobachtet werden. Hierbei zeigten sich bei der Analyse der MakrogefäÙe größere GefäÙfläÙen der WT-Tumore im Vergleich zu denen der CCR2ko-Tumore. Bei den MikrogefäÙen verhielt es sich mit signifikant größeren GefäÙfläÙen in

den CCR2ko-Tumoren im Vergleich zu denen der WT-Tumore umgekehrt (Abb. 4-19.B.). Peritumoral waren diese Unterschiede jedoch nicht zu erkennen (Abb. 4-19.C.). Zusammenfassend konnten nach differenzierter Betrachtung der Gefäßmorphologie, signifikante Unterschiede der Gefäßarchitektur zwischen den WT- und den CCR2ko-Tumoren bestimmt werden.

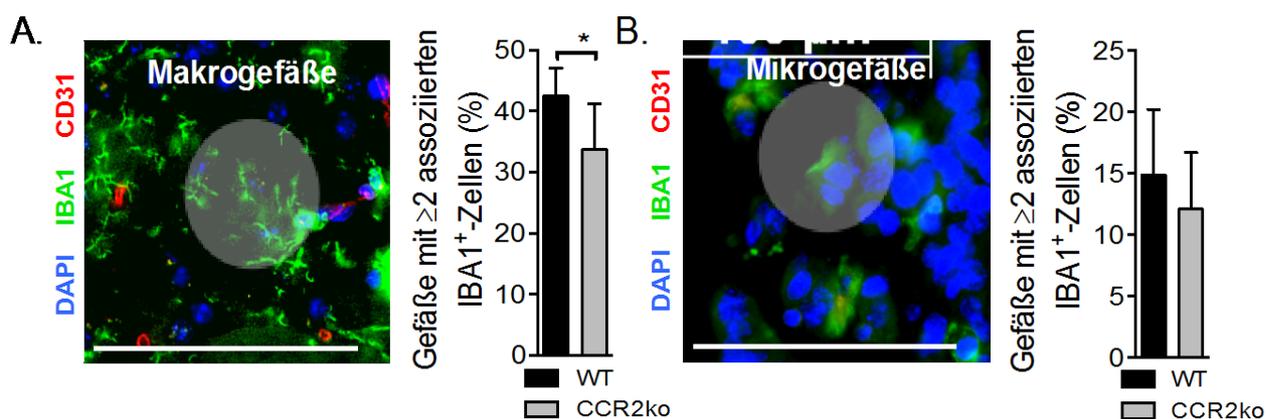


**Abb. 4-19: Differenzierte Betrachtung der Gefäße in Mikro- und Makrogefäße.** (A) Dargestellt sind unterschiedliche morphologische Varianten von CD31-markierten Gefäßen, die zur differenzierten Betrachtung und Analyse in kleinere Mikro- und größere Makrogefäße unterteilt werden. (B) Deutlich zu erkennen ist die Veränderung der Gefäßarchitektur in CCR2ko-Mäusen mit geringerer Fläche der Makrogefäße zugunsten größerer Flächen der Mikrogefäße. (C) In peritumoralen Bereichen ist hingegen keine Veränderung der Gefäßarchitektur zu erkennen. Maßstabsbalken = 100 $\mu\text{m}$ . n= 6 pro Gruppe.  $p < 0,05$ (\*);  $p < 0,01$ (\*\*)

#### 4.7. Reduzierte Interaktion zwischen IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen und intratumoralen Blutgefäßen in CCR2ko-Mäusen

In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich gezeigt werden, dass im Tumor eine hohe Anzahl von Mikroglia/Makrophagen direkt mit Gefäßen in Kontakt treten (Brandenburg *et al.*; Manuskript eingereicht;(106)). Dies ließ einen Einfluss der Mikroglia/Makrophagen auf die Gefäße und Angiogenese vermuten. Deshalb wurden die Gefäße mit  $\geq 2$  assoziierten beziehungsweise direkt anliegenden IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen gezählt und zwischen den untersuchten Gruppen verglichen (Abb. 4-20.A&B.).

Intratumoral zeigte sich eine signifikant verminderte Anzahl von IBA1<sup>+</sup>-assoziierten Makrogefäßen (Abb. 4-20.A.). Für die Mikrogefäße war das nicht der Fall (Abb. 4-20.B.). Peritumoral waren sowohl für Makro-, als auch für Mikrogefäße keine signifikanten Unterschiede in der IBA1<sup>+</sup>-Assoziation festzustellen (nicht dargestellt).



**Abb. 4-20 Intratumorale Makrogefäßinteraktion mit IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen.** (A) Exemplarisch ist ein Makrogefäß ( $\geq 10\mu\text{m}$ ) dargestellt, das mit  $\geq 2$  Mikroglia/Makrophagen assoziiert ist. Im Mittel ist eine verminderte intratumorale Makrogefäß/IBA1<sup>+</sup>-Assoziation zu zählen. (B) Exemplarisch ist ein Mikrogefäß ( $< 10\mu\text{m}$ ) dargestellt, das mit  $\geq 2$  Mikroglia/Makrophagen assoziiert ist. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu beobachten. Maßstabsbalken = 100µm. n= 6 pro Gruppe. Signifikanz: p < 0,05(\*)

## 5. Diskussion

### 5.1. Kritische Betrachtung des verwendeten Mausmodells

#### 5.1.1. CCR2 knock-out Modell

Es wurde mit CCR2ko-Mäusen (C57Bl6J-Hintergrund) gearbeitet, welche basierend auf dem etablierten Modell von Kuziel *et al.* (1997) eine nachweisliche CCR2-Gen disruption aufwies (51). Diese Arbeitsgruppe konnte erstmalig eine deutlich verminderte Rekrutierung von Makrophagen auf einen inflammatorischen Stimulus hin (eine Thioglycolat-induzierte Peritonitis) nachweisen. Seitdem ist die CCR2ko-Maus ein etabliertes und häufig verwendetes experimentelles Modell zur Untersuchung der Rekrutierung von peripheren Monozyten/Makrophagen (52, 53, 55). Dabei sind die Mäuse in ihrer Vitalität, Entwicklung und Fertilität nicht eingeschränkt, was in diesem Projekt nach hausinterner Zucht bestätigt werden konnte. In naiven Mäusen ist auch die Anzahl monozytärer Makrophagen oder myeloider Stammzellen nicht reduziert (51, 52). Passend dazu konnte in dieser Arbeit die Beobachtung einer ähnlich ausgeprägten Dichte von Mikroglia in naivem Mausgehirngewebe gemacht werden (Abb. 4-3 & 4-4). Zudem scheinen die Mikroglia/Makrophagen der CCR2ko-Mäuse sich in ihrer Marker-Expression *in vivo* als auch *in vitro* nicht von WT-Mäusen zu unterscheiden (Abb. 4-5; 4-9; 4-10). Erst nach Induktion eines inflammatorischen Stimulus, hier die Tumorzellinokulation, konnte eine verminderte monozytäre Rekrutierung und damit ein deutlicher Phänotyp detektiert werden (Abb. 4-7).

Auffällig in der Literatur ist, dass die eingeschränkte Funktionalität bisher sowohl in den anfänglichen Arbeiten durch Kuziel *et al.* (1997) oder Boring *et al.* (1997), als auch in später veröffentlichten Arbeiten, nur durch den eingeschränkten Rekrutierungsmechanismus sowie auf DNS-Ebene demonstriert wurde (25, 51-53, 55). Daher war eine weitere Grundlage dieser Arbeit, den Genotyp der Mäuse anhand einer PCR nachzuvollziehen und eine CCR2ko-Zucht unter kontrollierten Bedingungen aufzubauen. Es konnte regulär der Einbau des mutierten CCR2-Genabschnittes und das Fehlen des WT-Allels in CCR2ko-Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 4-2). Der Einbau des mutierten CCR2ko-Gens zeigte sich beim Aufbau einer homozygoten Zucht über Generationen stabil.

Gemeinsam mit der reduzierten Rekrutierung von Mikroglia/Makrophagen und dem eindeutigen Genotyp, konnte von einem funktionstüchtigen Modell ausgegangen werden.

Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass ein weiterer Nachweis eines infunktionalen CCR2-Rezeptors auf Proteinebene oder auf RNS-Ebene wünschenswert wäre. Wie bereits erwähnt wurde der Nachweis des CCR2 knock-outs bisher nur über die verminderte Rekrutierung und über den Genotyp hergestellt, wobei Daten über eine verringerte RNS-Expression von CCR2 oder auch auf Proteinebene fehlen (25, 51-53, 55). Auch bei uns durchgeführten Versuchen zur Detektierung des Rezeptors (Immunfluoreszenz-Analyse mit Antikörper gegen CCR2; nicht dargestellt) konnte kein Phänotyp in CCR2ko-Mäusen festgestellt werden. Dies liegt am wahrscheinlichsten an der bereits von einigen angezweifelte Spezifität der Antikörper (Abcam hat Antikörper bereits vom Markt genommen) (44). Die RNS-Isolierung wird durch weitere Arbeiten außerhalb dieses Projektes durchgeführt.

### 5.1.2. Das syngene GL261-Gliommodell

Es werden in der Literatur unterschiedliche Möglichkeiten der Tumorzellimplantation für experimentelle Glioblastom-Modelle beschrieben. Dabei wird grob zwischen den häufig subkutanen und immuninkompetenten Xenograft-Modellen aus humanen Gliomzelllinien (U251; U87) und den intrazerebral-syngenen Nager-Modellen aus synthetisch hergestellten Tumorzelllinien (C6, CNS-1, GL261) unterschieden (109-111). Aufgrund der langjährigen Erfahrung und der Notwendigkeit eines immunkompetenten Empfängermodells erfolgte die stereotaktische intrazerebrale Tumorzellimplantation mit der syngenen Tumorzelllinie GL261 aus C57BL/6 Mäusen (93).

Das murine GL261-Modell wurde ursprünglich durch Zellisolierung nach Implantation karzinogen-wirkender Methylchloran-Partikeln entwickelt (112). Einige der Versuchstiere entwickelten Gliome, die als Grundlage früherer GL261-Modelle dienten (113). Die GL261-Tumorzelllinie weist nach *in vivo* Inokulation ein relativ rasches, mäßig-infiltratives und homogenes Zellwachstum auf (93, 114). Am Tag 21 an dem die Tiere aus dem Versuch genommen wurden, waren die Tumorgrenzen eindeutig abzugrenzen. Die klassischen histologischen Charakteristika des primären GBM wie Hyperzellularität mit nukleären Atypien, perineuronale Sallitosis, haemorrhagische Nekrosen, ausgeprägte Invasivität sowie eine gewisse infiltrative Komponente waren vorhanden (Abb. 4-12). Der Tumor ist hoch-aggressiv und die Tiere versterben bei Implantation von  $1 \times 10^5$  Zellen im Mittel nach 25 Tagen, bei  $2 \times 10^4$  Zellen nach 31 Tagen (93, 114). Jedoch erkennt man nach histologischer Aufarbeitung auch deutliche Unterschiede zu dem humanen Gliom.

Sie bilden nicht die girlandenförmigen, hoch-infiltrativen Ausläufer des humanen GBMs aus (93, 114). Die Tumorzellen ordnen sich nicht in der charakteristischen perinekrotischen Anordnung in Form von Pseudopallisaden an (114). Es waren, soweit in den Übersichtsfärbungen beurteilbar, keine mikrovaskulären Proliferationen zu erkennen (Abb. 4-12). Das GL261-Tumormodell ist somit zwar ein gut reproduzierbares Gliom-Mausmodell und bildet viele dem GBM angelehnte histologische Charakteristika aus, jedoch müssen die beschriebenen Unterschiede zu dem humanen primären GBM berücksichtigt werden.

In dieser Arbeit wurden histologische Gefrierschnitte zur H.E.-Färbung angefertigt. Sie dienten zum einen der Beschreibung der bereits genannten Charakteristika des GL261-Tumormodells, zum anderen aber auch der Detektion potentieller Wachstumsunterschiede der WT-Tumore im Vergleich zu den CCR2ko-Tumoren. Abgesehen von den Tumorgößen waren keine Unterschiede im infiltrativem Wachstumsverhalten oder der Invasivität nachzuweisen (Abb. 4-12). Somit konnte angenommen werden, dass der CCL2-CCR2 Signalweg keinen Einfluss auf die Invasivität und Aggressivität der Tumore in diesem Modell besaß. Jedoch konnte die Beurteilung aufgrund der generell gering ausgeprägten Invasivität des Gliom-Modells, nicht abschließend geklärt werden.

Bekannt ist, dass TAMs, meist aufgrund nekrotischer Zellreaktionen, pro-invasive (CXCR4; MMP-2) und pro-angiogene (VEGF; SDF1) Faktoren freisetzen, die die infiltrativen Charakteristika von Tumoren weiter verstärken können (113, 115-117). Aufgrund der beobachteten verminderten Dichte von Mikroglia/Makrophagen im CCR2ko-Modell (Abb. 4-7), ist es möglich, dass diese Freisetzung nur noch in einem reduzierten Ausmaß geschah. Es wäre folglich zu verminderten infiltrativen Eigenschaften der Tumorzellen gekommen. Dies ist aber, aufgrund der nur eingeschränkt sichtbaren infiltrativen Komponente des GL261-Modells, sehr schwer nachzuweisen. Eine Reduktion der infiltrativen Eigenschaften war in den CCR2ko-Mäusen nicht darstellbar (Abb. 4-12). Das beschleunigte Tumorwachstum der CCR2ko-Modelle spricht ebenso gegen diese Annahme (Abb. 4-13).

Zur weiteren Untersuchung der CCR2ko-Mäuse und einer Beurteilung einer Freisetzung von pro-angiogenen und pro-invasiven Faktoren durch die verbliebenen intratumoralen Mikroglia/Makrophagen, wäre eine RNS-Analyse aus diesen Zellen (nach MACS-Isolierung) eine Möglichkeit zur Beurteilung einer potentiellen Veränderung ihres Expressionsprofils (82, 118). Erkenntnisse über die Invasivität der GL261-Zelllinie

könnte mithilfe eines *in vitro* „Invasion Assay“ (Matrigel Matrix®) gewonnen werden, die den aus unterschiedlichen Maustypen isolierten Mikroglia/Makrophagen ausgesetzt werden könnten. Somit könnten zum einen die Invasivität der GL261-Zellen direkt und zum anderen der Einfluss der Mikroglia/Makrophagen auf die Tumorzellen beurteilt werden (119, 120). Da jedoch der Fokus dieses Projektes in der Charakterisierung der Mikroglia/Makrophagen, aber nicht des GL261-Modells in CCR2ko-Mäusen lag, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

## 5.2. Einfluss der CCR2-Defizienz auf die myeloide Zellpopulation

### 5.2.1 Charakterisierung der Mikroglia/Makrophagen

#### 5.2.1.1. Expressionsprofil der Mikroglia/Makrophagen *in vitro*

Die Mikroglia gelten als hirneigene Makrophagen. Es sollte beachtet werden, dass diese sich frühzeitig in der embryonalen Entwicklung aus primitiven Vorläuferzellen, mutmaßlich im Dottersack, als eigene Zellpopulation entwickeln. Dabei unterscheiden sie sich in vielen Aspekten von myeloiden Monozyten (44, 58). Ihr einzigartiger Phänotyp, als sich stark verzweigende, und auch in „Ruhe“ zur Homöostase beitragende Zellpopulation, verdeutlicht ihre besondere Rolle im Vergleich zu herkömmlichen myeloiden Abwehrzellen (64, 66). Jedoch ist es sehr schwierig, Mikroglia von infiltrierenden Monozyten, während pathologischer Prozesse rein durch ihr Expressionsmuster zu unterscheiden. Mikroglia exprimieren ebenso wie die infiltrierenden Monozyten klassische Leukozytenmarker wie CD45, CD68 oder F4/80 (121, 122). Auch die monozytären Oberflächenmarker CD11b und IBA1 werden gleichermaßen von infiltrierenden Makrophagen und Mikroglia exprimiert und unter inflammatorischen Konditionen hochreguliert (64, 72, 122).

Bei Untersuchung von naivem Gehirngewebe kann man jedoch von einer reinen Mikroglia-Zellpopulation ausgehen. Hier ist die Blut-Hirn-Schranke intakt und durch die Unterteilung in zwei getrennte immunologische Kompartimente scheint es, nach heutigen Erkenntnissen, zu nahezu keiner monozytären Migration ins gesunde ZNS zu kommen (62, 123). Durch Isolierung und Sortierung von CD11b<sup>+</sup>-Abwehrzellen aus naivem Mausgehirnen durch MACS®, gelang es in dieser Arbeit eine hochreine, vitale Mikroglia-Zellfraktion zu kultivieren (3.3.3.). Dies ermöglichte die Untersuchung vitaler Mikroglia-

Zellen, die nach 7 Tagen in mit Stimulantien angereichertem TCM-Medium zum Teil starke Verzweigungen aufwiesen (ähnlich residenter Mikroglia), aber auch die charakteristische Form aktivierter amöboider Abwehrzellen annehmen konnten (Abb. 4-5.) (124). In Kulturmedien ohne zusätzliche Stimulation (*X-vivo*) überlebten die Mikroglia in diesem Ansatz nicht (Abb. 4-5.A.). Die diskreten, aber auffälligen phänotypischen Unterschiede zu isolierten Mikroglia-Zellen aus CCR2ko-Mäusen sind schwer zu interpretieren und bedürfen weiterer Analysen (Abb. 4-5.A.). Es könnte aber, ähnlich wie es schon für CD11b gezeigt werden konnte, eine unbekannte Veränderung des zytoskeletalen Zellaufbaus und Neuordnung der Mikroglia-Zellen ursächlich sein (125). Dabei kommt es bei Aktivierung des CD11b-Rezeptors zu einer Interaktion mit einem zytoskeletalen Protein und einer damit einhergehenden Veränderung des Phänotyps. Ähnliche Prozesse mit Neuordnung von Aktinfilamenten konnte durch eine Komplementaktivierung auf der Oberfläche von Mikroglia nachgewiesen werden (126). Ob ein Chemokinrezeptor solche intrazellulären Prozesse in Gang setzen kann, ist bisher nicht bekannt.

Die Mikroglia wurden hinsichtlich ihrer Expression charakteristischer Monozytenmarker untersucht. Dabei wurde sich auf den Komplementrezeptor CD11b, dem Antigenitäts-/Phagozytose-Marker CD68 und dem im Calcium-Stoffwechsel beteiligten Oberflächenmarker IBA1 beschränkt. Die isolierten Mikrogliazellen exprimierten diese monozytären Marker und ließen damit eine Charakterisierung der untersuchten Zellpopulationen zu. Jedoch scheinen die Oberflächenmarker auf den Mikroglia gleichermaßen durch beide Mausstypen exprimiert zu werden und unterschieden sich dabei nicht in ihrer Expressionsintensität oder -verteilung (Abb. 4-5.B.). Somit scheinen die Zellen in ihrer Ausreifung nicht eingeschränkt und sich trotz des funktionslosen CCR2-Rezeptors regelrecht zu entwickeln. Eine regelrechte ontogenetische Entwicklung dieser Zellen wurde bereits von einigen beschrieben und unterstreicht die normale immunologische Entwicklung der CCR2ko-Mäuse (44, 123).

### 5.2.1.2. Expressionsprofil der Mikroglia/Makrophagen *in vivo*

Nach *in vitro* Charakterisierung von Mikroglia in naiven Mausgehirnen, wurde eine Charakterisierung der Mikroglia/Makrophagen im Tumormodell vorgenommen. Wie angedeutet, ist es unter pathologischen Bedingungen nicht möglich, zwischen Mikroglia und Makrophagen zu unterscheiden. Auch die Zuordnung nach immunhistochemischen

Gesichtspunkten ist, abgesehen von Chimären, kaum möglich (46). Es wurde nach ähnlichem Schema, wie bei der *in vitro* Charakterisierung vorgegangen. Monozytäre Oberflächenmarker wie CD11b und CD68, sowie der besondere Mikroglia/Makrophagen-Marker IBA1 wurden immunhistochemisch analysiert.

Es zeigten sich keine Unterschiede in der Expressionsintensität der Marker bei den Mikroglia/Makrophagen zwischen den beiden Maustypen (Abb. 4-9.A.&B.). Jedoch war eine Hochregulation dieser Aktivierungsmarker im entzündlichen Tumorgewebe, im Vergleich zu naivem Kontrollgewebe (kontralateral), zu erkennen (nicht dargestellt). Diese Aktivierung während neuroinflammatorischer Prozesse wurde bereits sowohl für CD11b, CD68, als auch IBA1 eingehend beschrieben (70, 125, 127).

Mikroglia, sind ähnlich Makrophagen, sehr potente Phagozyten und können Zelldetritus ebenso wie infunktionales Gewebe beseitigen und andere Zellen über antigenpräsentierende Moleküle aktivieren und rekrutieren. Klassische Moleküle professionell antigenpräsentierender Zellen (APC) wie MHC-I und MHC-II werden sowohl von Mikroglia als auch von Makrophagen exprimiert und während des Tumorwachstums hochreguliert (64, 74). Diese sollten als weitere Parameter zur Untersuchung der Mikroglia/Makrophagen in den CCR2ko-Mäusen dienen. Wie erwartet, wurden sowohl MHC-I als auch MHC-II im Tumorgewebe aufgrund der erhöhten Antigenität des tumorinflammatorischen Prozesses hochreguliert. Es zeigten sich jedoch zwischen beiden Maustypen keine offensichtlichen Unterschiede (Abb. 4-11.A.+B.). Somit schienen die noch vorhandenen und intratumoral akkumulierenden Makrophagen/Mikroglia zur Antigenpräsentation fähig und somit funktionell nicht eingeschränkt.

### 5.2.2. Rekrutierungsfunktion des CCL2-CCR2 Signalweges

Wie bereits erwähnt, scheint die Bedeutung des CCL2-CCR2 Signalwegs für die Rekrutierung von peripheren Makrophagen unbestritten. Schon vor zwei Dekaden konnte der damals noch als MCP-1 bezeichnete Ligand isoliert und Rekrutierungsfunktionen zugeordnet werden (128, 129). Als Chemokin besitzt CCL2 die Fähigkeit Monozyten zum Ort seiner höchsten Konzentration zu locken (19, 37). Vornehmlich die monozytäre Subpopulation  $Ly6C^{high}CCR2^{+}CX3CR1^{low}$  scheint durch diesen löslichen Faktor rekrutiert zu werden. Diese Zellpopulation akkumuliert während inflammatorischer Prozesse im entzündlichen Gewebe (19, 25). Nicht rekrutiert werden residente Monozyten

Ly6C<sup>low</sup>CCR2<sup>-</sup>CX3CR1<sup>high</sup>, neutrophile, sowie eosinophile Granulozyten, bei denen der entsprechende Rezeptor fehlt (19, 24, 51). Der funktionelle Einfluss dieses Signalweges wird bei Modellen mit fehlendem CCR2-Rezeptor deutlich. So konnte in murinen CCR2ko-Modellen gezeigt werden, dass die verminderte Monozyteninfiltration zu einer verlangsamten Krankheitsprogression in unterschiedlichen Pathologien wie der Atherosklerose, Autoimmunenzephalitis (EAE) oder sogar nach Schlaganfall führt (27, 29, 33). Die Rolle von CCR2 in einem Glioblastom-Mausmodell wurde bisher nur unzureichend untersucht. Es war bekannt, dass CCL2 zur Rekrutierung der bereits genannten Makrophagen-Population (Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup>CX3CR1<sup>low</sup>) während des Gliomwachstums führt (41). Es konnte weiterhin durch selektive anti-CCL2-Antikörper gezeigt werden, dass die monozytäre Infiltration während des Tumorwachstums reduziert werden kann (39). Aber nach eingehender Recherche wurden CCR2ko-Mäuse in einem GL261 basierendem Glioblastom-Modell noch nicht eingehend untersucht. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine verminderte Infiltration von Mikroglia/Makrophagen die Tumorbiologie und damit das Tumorwachstum beeinflusst.

Daher war es Grundlage dieser Arbeit die Expression von CCR2 auf Mikroglia/Makrophagen zu untersuchen. Hierbei zeigte sich eine Hochregulation des Rezeptors mit einem deutlichen Aktivierungs-Shift 21 Tage nach TZI. Dabei konnte eine Zunahme der Expressionsintensität pro Zelle (MFI) nachgewiesen werden (Abb. 4-1). Somit konnte angenommen werden, dass CCR2 eine Aktivierung dieser Abwehrezellen anzeigt und weiterhin eine wesentliche Rolle in den immunologischen Prozessen während des Tumorwachstums nach TZI einnimmt.

So konnte in dieser Arbeit anhand eines CCR2ko-Modells ein verändertes Verteilungsmuster von Mikroglia/Makrophagen während des tumorimmunologischen Prozesses nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine signifikant verminderte intratumorale IBA1<sup>+</sup>-Akkumulation am Tag 21 nach Tumorzellinokulation (Abb. 4-7.A.). Da sich die Mikroglia/Makrophagen beider Maustypen weder in ihrer proliferativen, noch in ihrer apoptotischen Aktivität unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass diese Beobachtung auf einer verminderten Akkumulation dieser Zellen beruhte (Abb. 4-8.A.&B.). In Analogie dazu zeigten die Ergebnisse der FACS-Analysen einen verminderten prozentualen Anteil der CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup>-Population (Abb. 4-6). Die Ergebnisse zeigten die deutlich eingeschränkte Rekrutierung von Mikroglia/Makrophagen in den CCR2ko-Mäusen. Es stellte sich jedoch die Frage um was für eine Zellpopulation es sich genau handelte.

IBA1<sup>+</sup>-Antikörper werden zur Identifizierung zerebraler Mikroglia aber auch Makrophagen verwendet (70, 72). So ist es nicht möglich rein durch immunhistochemische Untersuchungen zwischen diesen beiden Subpopulationen zu unterscheiden (70). Jedoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass vornehmlich rekrutierte Monozyten aus der Peripherie betroffen waren. So wurde in peritumoralen Arealen keine veränderte Akkumulation IBA1<sup>+</sup>-Zellen während des Tumorwachstums nachgewiesen (Abb. 4-7.B.). Diese bestehen ausschließlich aus residenten Mikroglia (77) (Brandenburg *et al.* Manuskript eingereicht; (106)) .

Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung einer verminderten CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup>-Population in der FACS-Analyse untermauert. Die Unterscheidung von Makrophagen und Mikroglia allein durch ihren CD45-Aktivierungstatus wird von vielen Arbeitsgruppen seit längerem praktiziert (64, 74-76). Dabei wird zwischen einer CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup>-Makrophagen-Population und einer CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>-Mikroglia-Population unterschieden. Diese Einteilung würde die Hypothese stützen, dass es im CCR2ko-Modell zu einer verminderten Infiltration von vornehmlich peripheren Makrophagen/Monozyten kommt. Jedoch sollte berücksichtigt werden, dass die strikte Einteilung nach dem CD45-Aktivierungsstatus zur Zeit stark angezweifelt wird und über die Zuordnung der betroffenen Zellpopulationen nicht eindeutig entschieden werden kann (64, 77).

Zur weiteren Analyse der betroffenen Zellpopulation müsste diese weiter definiert werden. Eine Identifikation dieser Zellen kann rein nach immunhistochemischen beziehungsweise proteinbiochemischen Gesichtspunkten bisher nicht erfolgen. Experimente mit chimären Mausmodellen, die durch genetische Modifikationen bestimmte Zellcharakteristika visualisieren können, wären eine potentielle Möglichkeit zur Bestimmung eben dieser betroffenen Abwehrzellpopulation (46, 77, 130). Voraussetzung ist aber eine Kopfschutz-Bestrahlung zur Generierung von Chimären ohne Affektion der Blut-Hirn-Schranke um unspezifische Einwanderungen peripherer Immunzellen zu verhindern (77).

### 5.3. Einfluss der CCR2-Defizienz auf die Tumorbilogie

#### 5.3.1. Veränderung des Tumolvolumens bei erhöhter proliferativer Aktivität der Tumorzellen in CCR2ko-Mäusen

Nach Etablierung eines CCR2ko-Modells mit eindeutigem Nachweis einer reduzierten intratumoralen Mikroglia/Makrophagen-Akkumulation, war es nun Ziel, herauszufinden, was die verminderte Anzahl der Mikroglia/Makrophagen für einen Einfluss auf den Tumor ausübte. Bekannt war, dass TAMs einen großen Einfluss auf das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren in unterschiedlichen Modellen besitzen (79, 89). Nach Akkumulation kommt es zur M2-Konfiguration mit pro-tumoralen Eigenschaften (82, 88, 89). TAMs fördern durch direkte Freisetzung von Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ ; M-CSF) und pro-angiogenen Faktoren (VEGF; MMP) die Tumorzellproliferation (71, 87). Die Korrelation von TAMs und TumorgroÙe beziehungsweise Tumorprogression wurde bereits in unterschiedlichen Tumormodellen untersucht: So resultierte eine schlechtere Prognose bei Tumoren mit hoher TAMs-Dichte der Mamma, Prostata, des Ovars und der Zervix (131-133). Auch in Gliom-Patienten konnte eine Korrelation zwischen der Dichte M2-aktiver TAMs und der Invasivität, Proliferation und letztlich auch der Prognose von Tumoren nachgewiesen werden (82).

In unserem Gliommodell ergab die MRT-Analyse mit Tumolvolumetrie deutlich vergrößerte Tumore in den CCR2ko-Tieren (Abb. 4-13.C.). Die CCR2ko-Tumore zeigten zu jedem Untersuchungszeitpunkt eine Verdopplung ihres Volumens bei weiterhin exponentieller Kinetik (Abb. 4-13.B).

Es drängte sich die Frage auf, was mit der proliferativen Aktivität geschieht, wenn TAMs in Form von akkumulierenden Mikroglia/Makrophagen, durch den gestörten CCL2/CCR2-Mechanismus, vermindert einwanderten und daraus größere Tumolvolumina resultierten. Die proliferative Aktivität wurde durch eine Ki67-Analyse der Tumorzellen bestimmt. Hierbei zeigte sich die deutlich erhöhte proliferative Aktivität innerhalb der CCR2ko-Tumore (Abb. 4-14). Diese war im Schnitt um 22% höher im Vergleich zu den WT-Tumorzellen (Abb. 4-14.B.). Um auszuschließen, dass generell ein erhöhter Zellumsatz zu Grunde lag, wurde zusätzlich die apoptotische Aktivität gemessen. Hierbei schienen die Tumorzellen in CCR2ko-Mäusen keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle aufzuweisen (Abb. 4-15).

Die Ergebnisse scheinen, entgegen der bisherigen Literatur, auf einen insgesamt eher suppressiven Charakter der nun fehlenden TAMs bzw. Mikroglia/Makrophagen auf das Tumorstadium hinzuweisen. Jedoch sollte berücksichtigt werden, dass weiterhin eine relativ hohe Dichte IBA1<sup>+</sup>-Zellen in der Immunfluoreszenz, sowie CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>-Zellen im FACS in den Gliomen der CCR2ko-Mäuse nachzuweisen waren. Somit scheint ein ausgeprägter Anteil von Abwehrzellen CCL2-CCR2 Signalweg unabhängig rekrutiert zu werden. Diese können somit weiterhin einen Einfluss auf die Tumorbildung und -zellen ausüben. Vornehmlich myeloide Monozyten/Makrophagen werden als CCR2<sup>+</sup> angegeben, während Mikroglia wenig CCR2 exprimieren (19, 25, 44). Wenn davon ausgegangen wird, dass zum größten Teil aktivierte myeloide Monozyten/Makrophagen von dem ausgeschalteten Signalweg betroffen sind, könnte man annehmen, dass die als TAMs funktionierenden Mikroglia pro-tumorale Funktionen übernehmen. Diese scheinen in ihrer Potenz sogar eine größere Auswirkung zu haben, als die normalerweise vorhandenen Makrophagen.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, sollte isolierte RNS aus durch MACS aufgereinigte Mikroglia/(Makrophagen) tumortragender CCR2ko-Mäusen gewonnen und die Genexpression analysiert werden. Somit könnte ein Aktivierungsstatus entsprechend einer M1- oder M2-Konfiguration für diese Zellen bestimmt werden (82, 88). Dies soll in Folgeversuchen separat durchgeführt werden. Interessant bleibt jedoch die tiefgreifende Beeinflussung des Tumormetabolismus anhand der veränderten proliferativen Aktivität der Tumorzellen, allein durch die Veränderung der Abwehrzellzusammensetzung bzw. – dichte.

### **5.3.2. Veränderte Gefäßarchitektur bei Differenzierung in Mikro- und Makrogefäße**

Das unkontrollierte Tumorstadium nach TZI, ist abhängig von der nutritiven Gefäßversorgung der Tumorzellen. Beispielsweise weist das primäre GBM, bei entsprechender Größe, ausgeprägte hypoxische Zellreaktionen mit Pseudopallisaden auf (6). Eine Hypoxie führt zur Freisetzung von HIF1-alpha, welches wiederum in hohem Maße pro-angiogene Faktoren wie VEGF, SDF1 und CXCL2 freisetzt (134-136)(Brandenburg *et al.*,Manuskript eingereicht; (106)). Weiterhin werden MMPs und TGF-β aus den Endothelzellen freigesetzt, sowie Perizyten durch Glioma-Stammzellen ausgebildet, die zu einem Umbau der Gefäßwände führen (Remodeling) (137, 138). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass hypoxische Zellreaktionen zu einem

ausgeprägten Gefäßremodeling führen und wesentlich zu der hohen Aggressivität und Malignität des GBM beitragen. Hypoxische sowie angiogene Faktoren dienen bereits als therapeutischer Angriffspunkt zur adjuvanten Tumorthherapie, mit bisher nur geringem Erfolg (139, 140).

In dieser Arbeit wurden Gefäße anhand des Endothelzellmarkers CD31 auf Gewebeschnitten analysiert. CD31 (PECAM-1)-Antikörper ist ein gegen das interzelluläre Endothel-Adhäsionsmolekül gerichteter Antikörper, der die eindeutige Darstellung der zerebralen Gefäße ermöglicht (141). Es konnte die Dichte der Gefäße im Tumor, die Gefäßfläche bezogen auf die Tumorfläche, sowie die Gefäßarchitektur beurteilt werden. Im Vergleich zu den WT-Kontrollen wiesen die größeren CCR2ko-Tumore weder in der Dichte noch in der flächenhaften Ausbreitung signifikante Unterschiede der Gefäße auf (Abb. 4-18.A.&B.). Es waren jedoch Veränderungen der Gefäßarchitektur nachzuweisen. Die Einteilung in Mikro- und Makrogefäße diente zur differenzierten Analyse der Gefäße. Es konnte gezeigt werden, dass die durchschnittliche Fläche der Makrogefäße eindeutig kleiner war, während die der Mikrogefäße in den CCR2ko-Mäusen zunahm (Abb. 4-19). Diese Unterschiede wiesen auf ein verzweigteres und unter Umständen reiferes Gefäßsystem innerhalb der CCR2ko-Tumore hin und könnten die Ursache der erhöhten proliferativen Aktivität und größeren Tumorumfänge sein.

Der Einfluss des ausgeschalteten CCL2-CCR2 Signalwegs auf Veränderungen der Gefäßarchitektur sind im Einzelnen unklar. Für CXC-Chemokine konnten bereits eindeutige direkt pro-angiogene Einflüsse nachgewiesen werden (142). Für die CC-Rezeptorfamilie ist der Bezug zur Angiogenese etwas schwieriger. Bisher konnte in keiner *in vivo* Studie eine direkte Korrelation zwischen CCR2/CCL2 und pro-angiogenen Einflüssen hergestellt werden. Jedoch wird anhand von *in vitro* Ergebnissen ein pro-angiogenes Potential durch einen endothelialen CCR2-Nachweis angenommen (143). Ebenso konnten indirekte Effekte auf das Gefäßwachstum durch Applikation von CCL2 auf Endothelzellen als auch auf Prostata-Tumorzellen durch Freisetzung pro-angiogener Faktoren wie VEGF nachgewiesen werden (144).

Vermutlich spielt zusätzlich die reduzierte Rekrutierung von myeloiden Monozyten/Makrophagen eine zentrale Rolle für die Gefäßintegrität und Invasivität von Tumoren (117, 119). Es wurde eine verminderte Assoziation von IBA1<sup>+</sup>-Mikroglia/Makrophagen vor allem zu Makrogefäßen beobachtet (Abb. 4-20.A.). Die verminderte Interaktion zu Mikrogefäßen war nur latent und nicht-signifikant (Abb. 4-20.B.). Was diese verminderte Interaktion bedeutete, bleibt unklar. Sie könnte einfach

das Resultat einer verminderten Akkumulation von Mikroglia/Makrophagen sein oder aber auch einen Grund für die veränderte Gefäßarchitektur darstellen. So konnte in unterschiedlichen klinischen Studien eine Korrelation zwischen der Anzahl der TAMs und der Gefäßdichte gefunden werden (145, 146). Nachweislich sezernieren TAMs vor allem unter hypoxischen Bedingungen viele pro-angiogene Faktoren (VEGF; MMP-9) (87, 147, 148). Es konnte bereits durch eine direkte Inhibierung der Rekrutierung von Makrophagen ein verminderter angiogener Phänotyp mit veränderter Tumorprogression in einem murinen Brustkrebs-Modell demonstriert werden (149). Die Analyse einer Mikroglia/Makrophagen- (bzw. TAMs-) Assoziation zu Gefäßen wurde nach unseren Erkenntnissen bisher noch nicht durchgeführt. Die Aussagekraft dieser Auswertung bleibt, aufgrund des noch nicht nachgewiesenen direkten Einfluss auf die Endothelzellen, derzeit noch fraglich.

Zusammenfassend unterstützen viele Erkenntnisse aus der Literatur die Beobachtung einer veränderten Gefäßarchitektur in CCR2ko-Mäusen. Nähergehende Analysen des Gefäßaufbaus sind ausstehend. So könnte man die Gefäßintegrität anhand des Perizytenmarkers Desmin näher bestimmen. Diese stabilisieren nachweislich die Gefäßwände und scheinen eine Rolle bei der Angiogenese zu spielen (150). Weitergehend wäre eine Perfusion Albumin-gekoppelter FITC-Lektin Partikel möglich, um die endotheliale Stabilität zu untersuchen, eine mögliche Gefäßfragilität nachzuweisen, sowie endotheliales „sprouting“ als Angiogenese-Korrelat zu bestimmen (151, 152). Zu aller Letzt wäre auch ein etwas aufwendigeres „*in vivo*-imaging“ (Intravitalmikroskopie) anhand eines Schädelfenstermodells möglich, wodurch eine direkte Beurteilung des Gefäßwachstums sowie der Architektur möglich wäre (153). Dadurch könnten zudem direkte Blutflussraten und die Tumorgefäßversorgung im Allgemeinen näher untersucht werden. Zusammengefasst bedarf es weiterer Untersuchungen um den Einfluss des ausgeknockten CCR2-Rezeptors auf den aufgetretenen Phänotyp zu untersuchen.

#### 5.4. Die Funktion von Mikroglia/Makrophagen im Gliom-Modell und ihre mögliche therapeutische Bedeutung

Die selektive Veränderung tumorassoziierter nicht neoplastischer Zellen, als wesentlicher Bestandteil des Tumor-Mikromilieus, gilt bei vielen als potenzieller therapeutischer Angriffspunkt (86, 154). Seit der Erkenntnis, dass TAMs tumorimmunologische Prozesse beeinflussen und zum Teil pro-tumoral und pro-angiogen wirken, werden Mechanismen gesucht, Subpopulationen spezifisch zu detektieren um deren Funktionen zu Gunsten einer effektiveren Tumorabwehr zu modifizieren (86, 89). So wird von vielen Arbeitsgruppen auch die Differenzierung zwischen Mikroglia und Makrophagen für selektivere Angriffsziele angestrebt (46, 76, 155). Diese gestaltete sich aber in der Vergangenheit häufig schwieriger als erwartet. So ist es bis heute kaum möglich rein nach funktionellen Gesichtspunkten wie Oberflächenmarkern zwischen diesen Zellen zu unterscheiden. Aufwendige Modelle mit Chimären ermöglichen diese Unterscheidung, aber nur wenn die Blut-Hirn-Schranke mithilfe einer Kopfschutzbestrahlung geschützt wird (46, 77). Trotzdem ist es im Gliommodell besonders schwer, klare intratumorale Funktionen den unterschiedlichen TAMs zuzuordnen. Wie beschrieben reflektieren und ähneln TAMs in unterschiedlichen Tumormodellen zu einem großen Anteil M2-gepolten Makrophagen (35, 88). Sie produzieren entsprechend ihrer immun-modulatorischen und -suppressiven Eigenschaften IL-10, Prostaglandin-E2 (PGE2) und hemmen dadurch die anti-tumorale T-Zellantwort („alternative Aktivierung“) (87). Weiterhin fördern sie das Tumorstadium auch durch die bereits beschriebene pro-angiogene Wirkung mit Hilfe von VEGF, MMP und IL-8 (87). Zusätzlich werden direkte pro-tumorale Effektorfunktionen durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren (EGFR; TGF- $\beta$ ) vermittelt (79, 88, 89, 156).

CD163 und CD204 als postulierte Marker für einen M2-Aktivierungsstatus ebenso wie die IL-10-, TGF- $\beta$ -, CSF1-Sekretion, sind in Gliompatienten und GBM-Modellen für infiltrierende Makrophagen/Mikroglia nachweisbar. Jedoch bisher ohne klar zwischen diesen beiden Zellpopulationen zu unterscheiden (10, 82, 86, 87). Anhand von HSV-TK-Mäusen, in denen ein CD11b-Promotor integriert wurde und dadurch Mikroglia/Makrophagen nach einer Ganciclovir-Applikation depletiert werden können, konnte gezeigt werden, dass nach Gliomzell-Implantation kleinere Tumore entstehen (155). Dies resultierte vermutlich aus dem Wegfall der pro-tumoralen Stimuli. Es konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass die infiltrativen, invasiven und pro-tumoralen

Eigenschaften der Glioma-Zellen durch Freisetzung von TGF- $\beta$  und MMP-2 aus Mikroglia verstärkt werden und durch selektive Mikroglia-Depletion z.B. durch Cyclosporin-Applikation vermindert werden können (119, 157, 158). Es spricht also vieles für pro-tumorale Effektorfunktionen sowohl der Mikroglia als auch der Makrophagen.

In dem verwendeten CCR2ko-Modell waren klare wachstumsfördernde Effekte zu erkennen (Abb. 4-13), die vermutlich auf die verminderte Einwanderung einer Subpopulation (IBA1<sup>+</sup> in Immunfluoreszenz bzw. CD45<sup>high</sup> im FACS) zurückzuführen sind (Abb. 4-6 & 4-7). Diese Subpopulation in CCR2ko-Mäusen gilt es zukünftig näher zu beschreiben. Zumindest zeigt es die unterschiedlichen Funktionen der Zellen innerhalb des Tumors. So wird in dieser Arbeit deutlich, dass eine selektive Reduktion einer Zellfraktion eher ungewünschte Effekte im Sinne einer beschleunigten Wachstumsprogression haben kann (Abb. 4-13). Von besonderem Interesse könnten jedoch die im Tumor beobachteten verbliebenen Abwehrzellen (IBA1<sup>+</sup>) sein (Abb. 4-7). Diese scheinen ausgeprägte pro-tumorale Eigenschaften zu besitzen und damit die Gefäßstruktur beeinflussen zu können (Abb. 4-19.B.). Wenn man davon ausgeht, dass es sich dabei tatsächlich um eine reine Mikroglia-Zellpopulation handele (5.2.2.), könnte eine spezifische Mikroglia-Depletion zu potentiell wirksamen Therapiekonzepten führen. Dafür ist jedoch deren eindeutige Identifikation *in vivo* nötig und eine profundere Charakterisierung dieser Zellen ausstehend.

In der Literatur lassen sich jedoch in dem GBM-Mausmodellen klare Hinweise für pro-tumorale Funktionen der infiltrierenden Mikroglia/Makrophagen zeigen (82, 86). Eingeschränkt konnten bereits therapeutische Effekte, nach spezifischer Ausschaltung einer pro-tumoralen Zellpopulation, nachgewiesen werden (117, 155, 158). Die eindeutige Zuordnung von Subpopulationen wäre hilfreich, differenziertere und selektive Angriffspunkte zu definieren, um so Effekte besser interpretieren zu können. Mit der CCR2-Defizienz scheint eine spezifische Zellpopulation angesprochen worden zu sein. Durch zukünftige chimäre Versuchsansätze soll in unserer Arbeitsgruppe eine Charakterisierung der Immunzellen stattfinden, um so einzelne intratumorale Zellpopulationen (Mikroglia vs Makrophagen) während des Tumorwachstums detektieren zu können. Nach den in dieser Arbeit hervorgebrachten Ergebnissen wird spekuliert, ob gerade die residenten Mikroglia ausgeprägte pro-tumorale und pro-angiogene Funktionen besitzen und diese in Zukunft näher betrachtet werden sollten.

## 6. Verzeichnisse

### 6.1. Literaturverzeichnis

1. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 2005;109:93–108.
2. Quinn TO, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol*. 2014;16:1-63.
3. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008;359:492-507.
4. Fisher J, Schwartzbaum J, Wrensch M, Wiemels J. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin* 2007;25:867-90.
5. Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol*. 2007;114:443–58.
6. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, Devi SN, Kaur B, Van Meir EG. Pseudopalisades in Glioblastoma Are Hypoxic, Express Extracellular Matrix Proteases, and Are Formed by an Actively Migrating Cell Population. *Cancer Res* 2004;64:920-7.
7. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007;170:1445-53.
8. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007;21:2683-710.
9. Charles N, Holland E, Gilbert R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia*. 2011;59:1169-80.
10. Watters JJ, Schartner JM, Badie B. Microglia function in brain tumors. *J Neurosci Res*. 2005;81:447-55.
11. Polanska UM, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. *J Cell Physiol* 2013;228:1651-7.
12. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012;15:298-306.
13. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-74.
14. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013;501:346-54.
15. Asthagiri A, Pouratian N, Sherman J, Ahmed G, Shaffrey ME. Advances in brain tumor surgery. *Neurol Clin*. 2007;25:975-1003.
16. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*. 2006;7:392-401.
17. Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol*. 2007;25:4127-36.
18. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987-96.

19. Bachelierie F, Ben-Baruch A, Bruckhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 2014;66:1-79.
20. Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Maysushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J, Rot A, Schall T, Tsang M. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22:1067-8.
21. Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, Hamid Q, Murphy PM, Luster AD. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol.* 1996;157:5613-26.
22. Ben-Baruch A, Xu L, Young PR, Bengali K, Oppenheim JJ, Wang JM. Monocyte chemotactic protein-3 (MCP3) interacts with multiple leukocyte receptors. C-C CKR1, a receptor for macrophage inflammatory protein-1 alpha/Rantes, is also a functional receptor for MCP3. *J Biol Chem* 1995;270:22123-8.
23. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:669-92.
24. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010;327:656-61.
25. Mildner A, Mack M, Schmidt H, Brück W, Djukic M, Zabel MD, Hille A, Priller J, Prinz M. CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain.* 2009;132:2487-500.
26. Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, Pittet MJ. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest* 2007;117:195-205.
27. Combadière C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, Merval R, Proudfoot A, Tedgui A, Mallat Z. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation.* 2008;117:1649-57.
28. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Investigation.* 2007;117:185-94.
29. Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, Karpus WJ. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2000;192:899-905.
30. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* 2011;14:1142-9.
31. Ockinger J, Stridh P, Beyeen AD, Lundmark F, Seddighzadeh M, Oturai A, Sørensen PS, Lorentzen AR, Celius EG, Leppä V, Koivisto K. Genetic variants of CC chemokine genes in experimental autoimmune encephalomyelitis, multiple sclerosis and rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2010;11:142-54.
32. Hughes PM, Allegrini PR, Rudin M, Perry VH, Mir AK, Wiessner C. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:308-17.

33. Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke*. 2007;38:1345-53.
34. Rollins BJ. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur J Cancer*. 2006;42:760-7.
35. Allavena P, Germano G, Marchesi F, Mantovani A. Chemokines in cancer related inflammation. *Exp Cell Res* 2011;317:664-73.
36. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, Delaney A, Jones SJ, Iqbal J, Weisenburger DD, Bast MA. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2010;362:875-85.
37. Borsig L, Wolf MJ, Roblek M, Lorentzen A, Heikenwalder M. Inflammatory chemokines and metastasis--tracing the accessory. *Oncogene*. 2014;33(32):17-24.
38. Zhang J, Patel L, Pienta KJ. CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:41-8.
39. Zhu X, Fujita M, Snyder LA, Okada H. Systemic delivery of neutralizing antibody targeting CCL2 for glioma therapy. *J Neurooncol*. 2011;104:83-92.
40. Kielian T, van Rooijen N, Hickey WF. MCP-1 expression in CNS-1 astrocytoma cells: implications for macrophage infiltration into tumors in vivo. *J Neurooncol*. 2002;56:1-12.
41. Leung SY, Wong MP, Chung LP, Chan AS, Yuen ST. Monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in gliomas. *Acta Neuropathol* 1997;93:518-27.
42. Jordan JT, Sun W, Hussain SF, DeAngulo G, Prabhu SS, Heimberger AB. Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:123-31.
43. Platten M, Kretz A, Naumann U, Aulwurm S, Egashira K, Isenmann S, Weller M. Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. *Ann Neurol*. 2003;54:388-92.
44. Mizutani M, Pino PA, Saederup N, Charo IF, Ransohoff RM, Cardona AE. The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood. *J Immunol* 2012;188:29-36.
45. Zhou W, Ke SQ, Huang Z, Flavahan W, Fang X, Paul J, Wu L, Sloan AE, McLendon RE, Li X, Rich JN, Bao S. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol* 2015;17:170-82.
46. Saederup N, Cardona AE, Croft K, Mizutani M, Cotleur AC, Tsou CL, Ransohoff RM, Charo IF. Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS One*. 2010;27:13693.
47. El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, Luster AD. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 2007;13:432-8.
48. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA, Pollard JW. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011;475:222-5.
49. Schall TJ, Proudfoot AE. Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:355-63.
50. Horuk R. Chemokine receptor antagonists: overcoming developmental hurdles. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:23-33.

51. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12053-8.
52. Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RVJ, Broxmeyer HE, Charo IF. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest* 1997;100:2552-61.
53. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 2007;117:902-9.
54. Izikson L, Klein RS, Charo IF, Weiner HL, Luster AD. Resistance to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice Lacking the CC Chemokine Receptor (CCR)2. *J Exp Med* 2000;192:1075-80.
55. Belarbi K, Jopson T, Arellano C, Fike JR, Rosi S. CCR2 deficiency prevents neuronal dysfunction and cognitive impairments induced by cranial irradiation. *Cancer Res.* 2013;73:1201-10.
56. Izhak L, Wildbaum G, Jung S, Stein A, Shaked Y, Karin N. Dissecting the autocrine and paracrine roles of the CCR2-CCL2 axis in tumor survival and angiogenesis. *PLoS One.* 2012;7:28305.
57. Rio-Hortega P. Microglia. In *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System* Penfield W, editor. New York/USA.1932.
58. Kurz H, Christ B. Embryonic CNS macrophages and microglia do not stem from circulating, but from extravascular precursors. *Glia.* 1998;22:98-102.
59. Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* 2007;53:344-54.
60. Salter MW, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell.* 2014;158:15-24.
61. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 2010;330:841-5.
62. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 2007;10:1538-43.
63. Aguzzi A, Barres BA, Bennett ML. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science.* 2013;339:156-61.
64. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiology* 2011;91:461-553.
65. Ling EA, Wong WC. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia.* 1993;7:9-18.
66. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005;308:1314-8.
67. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007;10:1387-94.
68. Abd-el-Basset E, Fedoroff S. Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures. *J Neurosci Res* 1995;41:222-37.
69. Streit WJ, Kreutzberg GW. Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol.* 1987;16:249-60.
70. Imai Y, Kohsaka S. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. *Glia.* 2002;40:164-74.
71. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, Fanek Z, Liu L, Chen Z, Rothstein

- JD, Ransohoff RM. Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 2014;17:131-43.
72. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;57:1-9.
73. Carson MJ, Bilousova TV, Puntambekar SS, Melchior B, Doose JM, Ethell IM. A rose by any other name? The potential consequences of microglial heterogeneity during CNS health and disease. *Neurotherapeutics*. 2007;4:571-9.
74. Zhang GX, Li J, Ventura E, Rostami A. Parenchymal microglia of naïve adult C57BL/6J mice express high levels of B7.1, B7.2, and MHC class II. *Exp Mol Pathol* 2002;73:35-45.
75. Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dörries R, Butcher GW, ter Meulen V. Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7438-42.
76. Parney IF, Waldron JS, Parsa AT. Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma-associated macrophages. Laboratory investigation. *J Neurosurg*. 2009;110:572-82.
77. Müller A, Brandenburg S, Turkowski K, Müller S, Vajkoczy P. Resident microglia, and not peripheral macrophages, are the main source of brain tumor mononuclear cells. *Int J Cancer*. 2015;137:278-88.
78. Tagliabue A, Mantovani A, Kilgallen M, Herberman RB, McCoy JL. Natural cytotoxicity of mouse monocytes and macrophages. *J Immunol*. 1979;122:2363-70.
79. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002;196:254-65.
80. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992;176:287-92.
81. Nishie A, Ono M, Shono T, Fukushi J, Otsubo M, Onoue H, Ito Y, Inamura T, Ikezaki K, Fukui M, Iwaki T. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res* 1999;5:1107-13.
82. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol* 2008;216:15-24.
83. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454:436-44.
84. Nowicki A, Szenajch J, Ostrowska G, Wojtowicz A, Kruszewski AA, Maruszynski M, Aukerman SL, Wiktor-Jedrzejczak W. Impaired tumor growth in colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-deficient, macrophage-deficient op/op mouse: evidence for a role of CSF-1-dependent macrophages in formation of tumor stroma. *Int J Cancer* 1996;65:112-9.
85. Sielska M, Przanowski P, Wylot B, Gabrusiewicz K, Maleszewska M. Distinct roles of CSF family cytokines in macrophage infiltration and activation in glioma progression and injury response. *J Pathology*. 2013;230:310-21.
86. Gabrusiewicz K, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M, Sielska M, Frankowska M, Kaminska B. Characteristics of the alternative phenotype of microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas. *PLoS One*. 2011;6.

87. Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci* 2014;105:1-8.
88. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002;23:549-55.
89. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141:39-51.
90. Shelton LM, Mukherjee P, Huysentruyt LC, Urits I, Rosenberg JA, Seyfried TN. A novel pre-clinical in vivo mouse model for malignant brain tumor growth and invasion. *Journal of neuro-oncology*. 2010;99(2):165-76.
91. Baumann BC, Dorsey JF, Benci JL, Joh DY, Kao GD. Stereotactic intracranial implantation and in vivo bioluminescent imaging of tumor xenografts in a mouse model system of glioblastoma multiforme. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012(67).
92. Jacobs VL, Valdes PA, Hickey WF, De Leo JA. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN neuro*. 2011;3(3):e00063.
93. Szatmari T, Lumniczky K, Desaknai S, Trajcevski S, Hidvegi EJ, Hamada H, Safrany G. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer science*. 2006;97(6):546-53.
94. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990;11(2):231-8.
95. Renz M. Fluorescence Microscopy - A Historical and Technical Perspective. *Cytometry A*. 2013:767-79.
96. Moerner WE. New directions in single-molecule imaging and analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:12596–602
97. Gavrieli Y, Sherman Y, Shmuel A, Ben-Sasson Y. Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *The Journal of Cell Biology*. 1992;119:493-501.
98. Gudrun G. Schmitz TW, Rudolf Seibl, and Christoph Kessler<sup>1</sup>. Nonradioactive Labeling of Oligonucleotides in Vitro with the Hapten Digoxigenin by Tailing with Terminal Transferase. *ANALYTICAL BIO*. 1991;192:222-31.
99. Bakke AC. The Principles of Flow Cytometry Department of Pathology, Oregon Health Science University: laboratory medicine; 2001 [cited 2015 /09]. Available from: <http://labmed.ascpjournals.org/content/32/4/207.full.pdf>.
100. Julius MH, Masuda T, Herzenberg LA. Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1972;69(7):1934-8.
101. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem*. 2000;46:1221-9.
102. Prinz M, Mildner A. Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia*. 2011;59:177-87.
103. Badie B, Schartner JM. Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. *Neurosurgery*. 2000;46:957-61.
104. Adamson P, Wilbourn B, Etienne-Manneville S, Calder V. Lymphocyte trafficking through the blood-brain barrier is dependent on endothelial cell heterotrimeric G-protein signaling. *FASEB J*. 2002;16:1185-94.
105. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 1991;28:254-60.

106. Brandenburg S, Müller A, Turkowski K, Radev YT, Rot S, Schmidt C, Bungert AD, Acker G, Schorr A, Hippe A, Miller K, Heppner FL, Homey B, Vajkoczy P. Resident microglia rather than macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors. Manuscript submitted. 2015.
107. Badie B, Bartley B, Schartner J. Differential expression of MHC class II and B7 costimulatory molecules by microglia in rodent gliomas. *J Neuroimmunol* 2002;133:39-45.
108. Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 Families: Signaling and Function. *Immunologic Research*. 1999;19/1:1-24.
109. Ozawa T, Wang J, Hu LJ, Bollen AW, Lamborn KR, Deen DF. Growth of human glioblastomas as xenografts in the brains of athymic rats. *In Vivo*. 2002;16:55-60.
110. Li Y, Owusu A, Lehnert S. Treatment of intracranial rat glioma model with implant of radiosensitizer and biomodulator drug combined with external beam radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58:519-27.
111. Kruse CA, Molleston MC, Parks EP, Schiltz PM, Kleinschmidt-DeMasters BK, Hickey WF. A rat glioma model, CNS-1, with invasive characteristics similar to those of human gliomas: a comparison to 9L gliosarcoma. *Journal of neuro-oncology*. 1994;22:191-200.
112. Seligman AM, Shear MJ. Experimental Production of Brain Tumors in Mice with Methylcholanthrene. *Am J Cancer*. 1939;37:364.
113. Newcomb EW, Zagzag D. The muring GL261 glioma experimental model to assess novel brain tumor treatments. *CNS-Cancer: Models, Markers, Prognostic factors, Targets and Therapeutic approaches*; EGMeir (Ed); Springer 2009:228-33.
114. Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, Muhammad AG, King GD. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *J Neurooncol*. 2007;85:133-48.
115. Stevenson CB, Ehtesham M, McMillan KM, Valadez JG, Edgeworth ML. CXCR4 expression is elevated in glioblastoma multiforme and correlates with an increase in intensity and extent of peritumoral T2-weighted magnetic resonance imaging signal abnormalities. *Neurosurgery*. 2008;63:560-9.
116. Barbera-Guillem E, Nyhus JK, Wolford CC, Friece CR, Sampsel JW. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res* 2002;62:7042-9.
117. Markovic DS, Vinnakota K, Chirasani S, Synowitz M. Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:12530-5.
118. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:618-31.
119. Wesolowska A, Kwiatkowska A, Slomnicki L, Dembinski M, Master A, Sliwa M, Franciszkiewicz K, Chouaib S, Kaminska B. Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma invasion--an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor. *Oncogene*. 2008;27:918-30.
120. Wick W, Platten M, Weller M. Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *J Neurooncol* 2001;53:177-85.
121. Penninger JM, Irie-Sasaki J, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos AJ. CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol* 2001;2:389-96.
122. Matsumoto H, Kumon Y, Watanabe H, Ohnishi T, Shudou M, Takahashi H, Imai Y, Tanaka J. Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label neutrophils rather than

- microglia in traumatic and ischemic brain lesions. *J Neurosci Res* 2007;85:994-1009.
123. Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci.* 2007;10:1544-53.
  124. Slepko N, Levi G. Progressive activation of adult microglial cells in vitro. *Glia.* 1996;16:241-6.
  125. Roy A, Fung YK, Liu X, Pahan K. Up-regulation of microglial CD11b expression by nitric oxide. *J Biol Chem.* 2006;281:14971-80.
  126. Nolte C, Möller T, Walter T, Kettenmann H. Complement 5a controls motility of murine microglial cells in vitro via activation of an inhibitory G-protein and the rearrangement of the actin cytoskeleton. *Neuroscience.* 1996;73:1091-107.
  127. Perego C, Fumagalli S, De Simoni MG. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflammation.* 2011;10:2094-8.
  128. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Kuratsu J, Leonard EJ. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med.* 1989;169:1449-59.
  129. Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* 1990;136:1229-33.
  130. Priller J, Flügel A, Wehner T, Boentert M. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 2001;7:1356-61.
  131. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56:4625-9.
  132. Reinartz S, Schumann T, Finkernagel F, Wortmann A, Jansen JM, Meissner W, Krause M, Schwörer AM, Wagner U, Müller-Brüsselbach S, Müller R. Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse. *Int J Cancer.* 2014;134:32-42.
  133. Shimura S, Yang G, Ebara S, Wheeler TM, Frolov A, Thompson TC. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. *Cancer Res* 2000;60:5857-61.
  134. Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer.* 2000;88:2606-18.
  135. Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, Yee H, Voura EB, Newcomb EW. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest* 2006;86:1221-32.
  136. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996;16:4604-13.
  137. Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell.* 2013;153:139-52.
  138. Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol.* 2005;7:134-53.

139. Tan C, de Noronha RG, Roecker AJ, Pyrzynska B, Van Meir EG. Identification of a novel small-molecule inhibitor of the hypoxia-inducible factor 1 pathway. *Cancer Res.* 2005;65:605-12.
140. Cohen MH, Shen YL, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Oncologist.* 2009;14:1131-8.
141. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, Lyman S, Paddock C, Muller WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 1990;247:1219-22.
142. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehler JE, Strieter RM. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol* 2000;165:5269-77.
143. Salcedo R1 PM, Young HA, Wasserman K, Ward JM. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2000;96:34-40.
144. Li X, Loberg R, Liao J, Ying C, Snyder LA. A destructive cascade mediated by CCL2 facilitates prostate cancer growth in bone. *Cancer Res* 2009;69:1685-92.
145. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:4625-9.
146. Takanami I, Takeuchi K, Kodaira S. Tumor-associated macrophage infiltration in pulmonary adenocarcinoma: association with angiogenesis and poor prognosis. *Oncology.* 1999;57:138-42.
147. Lewis C, Murdoch C. Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol* 2005;167:627-35.
148. Hagemann T, Wilson J, Burke F, Kulbe H, Li NF, Plüddemann A, Charles K, Gordon S, Balkwill FR. Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *J Immunol* 2006;176:5023-32.
149. Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, Qian H, Xue XN, Pollard JW. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* 2006;66:11238-46.
150. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003;314:15-23.
151. Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, HM. B. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J Clin Invest.* 2004;113:516-27.
152. Hecht N, Marushima A, Nieminen M, Kremenetskaia I, von Degenfeld G, Woitzik J, Vajkoczy P. Myoblast-mediated gene therapy improves functional collateralization in chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke.* 2015;46:203-11.
153. Foltz RM, McLendon RE, Friedman HS, Dodge RK, Bigner DD, Dewhirst MW. A pial window model for the intracranial study of human glioma microvascular function. *Neurosurgery.* 1995;36:976-84.
154. Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, Anselmo A, Pesce S, Allavena P. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell.* 2013;23:249-62.
155. Zhai H, Heppner FL, Tsirka SE. Microglia/macrophages promote glioma progression. *Glia.* 2011;59:472-85.
156. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* 2010;22:231-7.

157. Markovic DS, Glass R, Synowitz M, Rooijen N, Kettenmann H. Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64:754-62.
158. Sliwa M, Markovic D, Gabrusiewicz K, Synowitz M, Glass R, Zawadzka M, Wesolowska A, Kettenmann H, Kaminska B. The invasion promoting effect of microglia on glioblastoma cells is inhibited by cyclosporin A. *Brain.* 2007;130:476-89.

## 6.2. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
Abb	Abbildung
APC	Allophycocyanin
bidest	Bi-Destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCL	CC-Motif Chemokin Ligand
CCR	CC-Motif Chemokin Rezeptor
CCR2ko	CC-Motif Chemokin Rezeptor 2 knock-out
CD	Cluster of differentiation
cl	Centiliter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CSF	Colony stimulating factor
CX3CR1	CX3C-Motif Chemokin Rezeptor 1
Cy	Cyanine
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorecence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g	Gramm

GBM	Glioblastoma multiforme
GL261	Murine Gliom Tumorzelllinie 261
GoTaq	Hitzestabile Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
h	hour = Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HBSS	Hanks balanced salt solution
IBA1	Ionized calcium binding protein 1
IL	Interleukin
ILB4	Isolectin B4
Inf	Interferon
ISO	Isotyp
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6C	Lymphocyte antigen 6C
MACS	Magnetische Zellsortierung, <i>Magnetic immune cell isolation</i>
max.	Maximal
MCAO	Middle cerebral artery occlusion
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix metalloproteinase
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
mV	Millivolt
NaCl	Natrium-Chlorid
nm	Nanometer
OP	Operation
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
RFP	Red fluorescent protein
RNS	Ribonukleinsäure
ROI	Region of interest
rpm	revolutions per minute = Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden

Strep	Streptomycin
TAMs	Tumor associated macrophages
TdT	Terminale Desoxynukleotidtransferase
TGF	Transforming growth factor
TZI	Stereotaktische Tumorzellimplantation
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

### 6.3. Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1 Histologische Eigenschaften von GBM.....	5
Abb. 2-2 GBM-Mikromileu .....	6
Abb. 2-3 Mikrogliaentwicklung .....	9
Abb. 2-4 „Ruhende“ und aktivierte Mikroglia <i>in vivo</i> .....	10
Abb. 2-5 Chemokinfreisetzung der Tumorzellen.....	12
Abb. 2-6 Arbeitsmodell .....	14
Abb. 3-1: Planung und Durchführung der stereotaktischen Tumorzellimplantation .....	23
Abb. 3-2: Überprüfung der Reinheit durch FACS.....	29
Abb. 3-4: Planung zur Auswertung der immunhistochemischen Bilder .....	39
Abb. 4-1: CCR2-Expression in naiven und tumortragenden C57Bl6/J-Mäusen.....	44
Abb. 4-2: Genotypisierung.....	45
Abb. 4-3: Dichte der kontralateralen Mikroglia. ....	46
Abb. 4-4: Mikroglia aus naivelem Gehirngewebe im FACS .....	47
Abb. 4-5: Mikroglia-Kulturen aus WT und CCR2ko-Mäusen an Tag 7 .....	48
Abb. 4-6: Einwanderung von Immunzellen nach TZI .....	50
Abb. 4-7: Intratumorale und peritumorale Akkumulation IBA1 <sup>+</sup> Mikroglia/Makrophagen .....	52
Abb. 4-8: Proliferation und Apoptose von IBA1 <sup>+</sup> -Mikroglia/Makrophagen.....	54
Abb. 4-9: <i>In vivo</i> Expression von CD11b und CD68 der Mikroglia/Makrophagen.....	55

Abb. 4-10: MHC-I- und MHC-II- Expression <i>In vivo</i> .....	57
Abb. 4-11: CD80 und CD86 Expression auf CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> -Abwehrzellen in der FACS-Analyse .....	59
Abb. 4-12: H.E.-Färbung der Gliome .....	60
Abb. 4-13: MRT-Darstellung und Volumetrie der Tumore an d7, d14 und d21 nach TZI.....	62
Abb. 4-14: Proliferation der Tumorzellen .....	63
Abb. 4-15: Apoptose der Tumorzellen .....	64
Abb. 4-16: Gefäßdarstellung in unterschiedlichen Hirnarealen anhand des Endothelzellmarkers CD31 .....	65
Abb. 4-17: Kontralaterale Gefäßzählung und Flächenberechnung.....	66
Abb. 4-18: Gefäßzählung und Flächenberechnung in intratumoralen sowie peritumoralen Arealen.....	67
Abb. 4-19: Differenzierte Betrachtung der Gefäße in Mikro- und Makrogefäße.....	68
Abb. 4-20 Intratumorale Makrogefäßinteraktion mit IBA1+ Mikroglia/Makrophagen.....	69

### 6.4. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammenfassung der verwendeten Geräte .....	15
Tab. 2: Zusammenfassung der verwendeten Puffer und Medien.....	15
Tab. 3: Zusammenfassung der Zellkulturmedien .....	16
Tab. 4: Zusammenfassung verwendeter Programme/Software .....	17
Tab. 5: Charakteristika der verwendeten Tierart .....	18
Tab. 6: Ansatz des Lysepuffers für Schwanzbiopsien.....	19
Tab. 7: PCR-Primersequenzen.....	19
Tab. 8: PCR-Ablauf im Thermocycler .....	20
Tab. 9: Zusammensetzung der Narkose.....	20
Tab. 10: Verwendete Primärantikörper für Immunhistochemie .....	33
Tab. 11: Verwendete Sekundärantikörper für Immunhistochemie.....	33
Tab. 12: Verwendete Primärantikörper für Immunzytochemie .....	35
Tab. 13: Verwendete Sekundärantikörper für Immunzytochemie.....	35
Tab. 14: Verwendete FACS-Antikörper für vitale Zellen.....	36
Tab. 15: Verwendete FACS-Antikörper für Färbung fixierter Zellen .....	37
Tab. 16: Verwendete FACS-ISO-Antikörper für Färbung fixierter Zellen.....	37
Tab. 17: Darstellung der Signifikanz .....	42

## 7. Anhang

### 7.1. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Matthäus Felsenstein, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Anwendung eines GL261-Tumormodells in CCR2-defizienten Mäusen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

## **7.2. Lebenslauf**

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

### 7.3. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Peter Vajkoczy für die Möglichkeit meine Dissertation in der experimentellen Neurochirurgie durchzuführen, für das von Ihm gezeigte Vertrauen in meine Arbeit und seine fortwährenden Hilfestellungen bei wissenschaftlichen Problemen.

Ganz herzlich möchte ich meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Susan Brandenburg, als wesentlichem Kopf dieser Doktorarbeit, danken. Während der gesamten Promotionszeit stand sie mir intensiv, tatkräftig und geduldig zur Seite. Durch Ihre wissenschaftliche Expertise, aber auch mentale Unterstützung, war es mir möglich meine Promotion mit Freude und hoher Motivation abzuschließen.

Wesentlicher Dank gilt auch meinen Kollegen und Kolleginnen der „AG Mikroglia“, in deren Umfeld ich einen fruchtbaren wissenschaftlichen Austausch, aber darüber hinaus auch freundschaftliche Beziehungen erfahren durfte.

Herzlicher Dank gilt meinen Freunden, die mich in allen Lebenslagen begleitet haben und in der nicht immer einfachen Zeit zu mir gestanden haben.

Zu guter Letzt möchte ich die Menschen erwähnen, die mich privat immer unterstützt und ermutigt haben. Sie gaben mir den notwendigen Halt und haben immer an mich geglaubt. Dafür danke ich meiner Familie und meiner Freundin Nadija Güc.