

Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung der Mikrogliaakkumulation
im malignen Gliom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Yordan Todorov Radev

aus Yambol, Bulgarien

Datum der Promotion: 22.06.2014

INHALTSVERZEICHNIS

Abstract (English)	1
Abstract (Deutsch)	3
1. Einleitung	5
1.1 Das maligne Gliom.....	5
1.2 Angiogenese	6
1.3 Mikroglia.....	7
1.4 Zielsetzung	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Verwendete Medien, Puffer und sonstige Lösungen	9
2.2 Zellkultur.....	11
2.3 Intrazerebrale Tumorzellimplantation.....	12
2.4 Intraperitoneale Injektion von BrdU	13
2.5 Entnahme und Fixierung des Gehirns	13
2.6 Anfertigen von Cryoschnitten	14
2.7 Verwendete Färbungen.....	15
2.8 Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen.....	17
2.9 Statistik.....	18
3. Ergebnisse	19
3.1. Makroskopische und lichtmikroskopische Analysen der induzierten Gliome.....	19
3.2. Nachweis und Charakterisierung der im Tumorbereich vorhandenen Mikrogliazellen ...	20
3.3. Proliferation der Mikroglia im Tumormodell	30
3.4. Erscheinungsbild und Dichte der Blutgefäße im Tumorbereich.....	32
4. Diskussion	37
4.1. Die intrakranielle GL261-Implantation: Vor- und Nachteile der Methode	37
4.2. Akkumulation von Iba-1-positiven Zellen im experimentellen Gliom.....	38
4.3. Phänotyp der Mikroglia im experimentellen Gliom und in dessen Umgebung.....	40
4.4. Nachweis proliferierender Mikroglia mittels BrdU	42
4.5. Die Gefäße im experimentellen Gliom: Beschaffenheit, Dichte, Interaktion mit Mikrogliazellen	43
4.6. Diskussion der Erkenntnisse im Kontext der aktuellen Forschungsergebnisse	45
4.7. Ausblick	47
5. Zusammenfassung	50

6. Literaturverzeichnis	52
Eidesstattliche Versicherung	56
Hinweis zu den durchgeführten Tierversuchen	57
Lebenslauf	58
Danksagung	60

ABSTRACT

Introduction

Malignant glioma, particularly glioblastoma, poses a therapeutic challenge through its rapid growth, aggressive infiltration of brain tissue and highly active angiogenesis. Despite some progress in treatment, no significant improvement in the poor prognosis of this tumor has been achieved.

It has been known for decades that the tumor is infiltrated by numerous microglia, the role of these immune cells however remains unclear. There are indications that they could promote tumor angiogenesis through secretion of growth factors and disruption of extracellular matrix. A more exact understanding of the link between microglia and angiogenesis in malignant glioma could contribute to an improvement in therapy.

Methods

In the current work, C57BL/6 mice underwent stereotactic intracranial implantation of GL261 tumor cells into the right brain hemisphere. After killing the animals and processing the brains, histological slices were made, stained by H.E. and immunofluorescence and analyzed via light and fluorescence microscopy.

Results

Microglia cells were detected via Iba-1 staining. The density of microglia in the experimentally induced gliomas and their vicinity was significantly higher than in healthy tissue. Besides Iba-1, all microglia expressed CD68 and CD11b. A part of the microglia were positive for MHC II, however, most microglia were negative for MHC I. No marker allowed differentiation between resting and activated microglia. Proliferation of microglia was detected in the tumor hemisphere through intraperitoneal application of BrdU and BrdU staining in brain tissue. Proliferation was strongest in the peritumoral area.

Glioma vessels were assessed through CD31 immunofluorescence staining. Irregular vessels with enlarged lumen and tendency to form tangles were found. Vessel counts per mm² did not significantly differ between tumor, peritumoral area and tumor free hemisphere. A

considerable number of intratumoral and peritumoral vessels were colocalized with two or more microglia.

Take home points

At present, it is unclear whether microglia reach their high density in glioma through proliferation, invasion of blood monocytes or both. The proliferation shown through BrdU staining supports the hypothesis that proliferation of local cells contributes sizably to the increased number of microglia in glioma. The high number of tumor vessels colocalized with microglia supports the theory of a link between microglia and angiogenesis in glioma. The exact expression profile of tumor microglia needs to be examined, particularly regarding proangiogenic molecules. A different approach will be needed to assess the possibility of invasion of monocytes, which cannot be differentiated immunohistochemically from already present microglia. Clarification of these questions would lead to an improved understanding of glioma pathogenesis and possibly to a broader range of therapeutic options for this tumor.

ABSTRACT

Einleitung

Das maligne Gliom, insbesondere das Glioblastom, stellt durch sein schnelles Wachstum, aggressive Infiltration von Hirngewebe sowie hoch aktive Angiogenese eine therapeutische Herausforderung dar. Trotz einiger Fortschritte in der Therapie wurde keine Verbesserung der schlechten Prognose dieses Tumors erreicht.

Es ist seit Jahrzehnten bekannt, dass der Tumor von zahlreichen Mikroglia infiltriert wird, die Rolle dieser Zellen dabei bleibt allerdings unklar. Es gibt Indikationen, dass sie durch Sekretion von Wachstumsfaktoren und Abbau der Extrazellulärmatrix die Angiogenese unterstützen könnten. Ein genaueres Verständnis der Beziehung zwischen Mikroglia und Angiogenese im malignen Gliom könnte zur Verbesserung der Therapie beitragen.

Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden bei C57BL/6-Mäusen GL261-Tumorzellen stereotaktisch in die rechte Hirnhemisphäre implantiert. Nach Töten der Tiere und Präparation der Gehirne wurden histologische Gehirnschnitte angefertigt, durch H.E. und Immunfluoreszenz gefärbt und mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Ergebnisse

Mikroglia wurden mittels Iba-1-Färbung nachgewiesen. Die Mikroglia-dichte in den experimentell induzierten Gliomen und ihrer Umgebung war signifikant höher als im gesunden Gewebe. Neben Iba-1 exprimierten alle Mikroglia die marker CD68 und CD11b. Ein Teil der Mikroglia waren positiv für MHCII, die meisten waren allerdings negativ für MHCI. Keiner der Marker erlaubte eine Unterscheidung zwischen ruhenden und aktivierten Mikroglia. Durch intraperitoneale Applikation von BrdU und dessen Nachweis im Hirngewebe wurde eine Proliferation der Mikroglia in der Tumorchemisphäre nachgewiesen. Die Proliferation war in der Tumorchemisphäre am stärksten.

Gliomgefäße wurden durch CD31-Immunfluoreszenz analysiert. Es wurden unregelmäßige großlumige Gefäße nachgewiesen, die zur Knäuelbildung neigten. Die Gefäßdichte unterschied sich nicht signifikant zwischen Tumor, dessen Umgebung und der tumorfreien Hemisphäre.

Zahlreiche Gefäße im Tumor und in der Tumorumgebung waren mit zwei oder mehr Mikroglia kolokalisiert.

Schlussfolgerungen

Zurzeit ist es unklar, ob Mikroglia durch Proliferation, Einwanderung von Monozyten oder beides ihre hohe Zahl im Gliom erreichen. Die Proliferation, die durch die BrdU-Färbung nachgewiesen wurde, stützt die Hypothese, dass die Proliferation lokaler Zellen wesentlich zur Erhöhung der Mikrogliaanzahl im Gliom beiträgt. Die hohe Zahl von Tumorgefäßen, die mit Mikroglia kolokalisiert sind, unterstützt die Theorie einer möglichen Beziehung zwischen Mikroglia und Angiogenese im malignen Gliom. Das genaue Expressionsprofil der Tumormikroglia muss untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf proangiogene Moleküle. Die Möglichkeit einer Invasion von Monozyten muss mit anderen Methoden untersucht werden, da diese immunhistochemisch nicht von vorhandenen Mikroglia unterschieden werden können. Eine Klärung dieser Fragen würde zu einem besseren Verständnis der Gliompathogenese und möglicherweise zur Erweiterung der therapeutischen Optionen für diesen Tumor führen.

1. EINLEITUNG

1.1. Das maligne Gliom

1.1.1. Epidemiologie und Klassifikation des malignen Glioms

Primäre Hirntumore sind unter den zehn häufigsten Ursachen von krebbedingten Todesfällen. Gliome, eine Untergruppe der primären Hirntumore, haben eine Inzidenz von ca. 10 Fällen pro 100000 Einwohner und Jahr und machen 30 bis 40 % der intrakraniellen Tumore aus. Sie sind typischerweise Tumore des mittleren Lebensalters mit einem Altersgipfel zwischen 45 und 60 Jahren. In der Geschlechterverteilung überwiegen leicht die männlichen Patienten, die ca. 60 % des Patientenkollektivs ausmachen [1].

Je nach dessen pathomorphologischen Merkmalen wird das Gliom in Grade I bis IV eingeteilt [2]. Das pilozytische Astrozytom (Gliom Grad I) ist durch geringe Malignität gekennzeichnet, von manchen Autoren wird es sogar als benigne eingestuft[1]. Während das Gliom Grad II, auch fibrilläres Astrozytom genannt, ein mittleres Überleben von ca. 10 Jahren hat, ist die Prognose der hochgradigen Gliome III (anaplastisches Astrozytom) und IV (Glioblastoma multiforme, GBM) mit 24 bzw. 14 Monaten medianes Überleben wesentlich ungünstiger [2]. Histologisch zeichnet sich das GBM durch Zeichen der Zellentdifferenzierung sowie vaskuläre Proliferationen und ausgedehnte Nekrosen aus [3].

1.1.2. Pathophysiologie des malignen Glioms

Die Zellen, von denen maligne Gliome stammen, sind nicht endgültig identifiziert. Es existieren diverse Theorien, die u.a. neurale Stammzellen, Astrozyten, Oligodendrozyten und andere Zelltypen des Zentralnervensystems als deren Ausgangszellen vermuten [4].

Die Tumore selbst sind morphologisch durch eine starke Infiltrationsneigung charakterisiert [5]. Das ist einer der Gründe für die Schwierigkeiten einer möglichst vollständigen Tumorentfernung bei der Gliomresektion. Andere Merkmale insbesondere der höhergradigen Gliome sind starke Proliferationsaktivität, Nekrosen und Angiogenese [2]. Glioblastome gehören zu den am stärksten vaskularisierten Tumoren des Menschen [6].

1.2. Angiogenese

1.2.1. Definition, Vorkommen, Rolle

Angiogenese ist definiert als das Aussprossen neuer Kapillaren aus bestehenden Blutgefäßen [7]. Vaskulogenese dagegen bezeichnet das De-novo-Entstehen von Blutgefäßen, die erst danach Anschluss an das Gefäßsystem finden [8]. Der Prozess der Angiogenese spielt eine große Rolle bei der Ausbildung des Kreislaufsystems des Embryos, beim Erwachsenen findet Angiogenese physiologischerweise z.B. bei der Wundheilung statt. Darüber hinaus kommt dem Prozess eine große Rolle beim Wachstum und bei der Ausbreitung maligner Tumoren zu [9]. Angiogenese wird durch zahlreiche Signalmoleküle vermittelt, an erster Stelle durch den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), darüber hinaus u.a. durch Angiopoietin 1 und 2 sowie den Notch-Delta-like-Ligand-4-Signalweg [10].

1.2.2. Angiogenese des malignen Glioms

Seit Jahren ist die große Bedeutung der Angiogenese für das Wachstum und Ausbreitung maligner Tumoren bekannt [9]. Gliome und insbesondere Glioblastoma multiforme gehören zu den gefäßreichsten bekannten Tumoren, wobei die Angiogenese für das aggressive und schnelle Wachstum dieses Tumors von essenzieller Bedeutung ist [11]. Eines der Kennzeichen des GBM sind die oft geknäuelten, girlandenförmigen Gefäßproliferate, die insbesondere in der Nähe von Nekrosen und in der peripheren Infiltrationszone vorkommen. Die Basalmembran dieser Gefäße ist verdickt, die Permeabilität erhöht, und die Endothelzellen proliferieren aktiv. Eine hohe Gefäßdichte geht mit einer schlechten Prognose des Tumors einher [2].

Viele Einzelheiten zu den genauen Mechanismen der Angiogenese im malignen Gliom sind nur zum Teil verstanden. Da sie ein wichtiger Mechanismus für die Ausbreitung dieses Tumors ist, ist ihre weitere Erforschung von Interesse für die Entwicklung neuer Therapieansätze [2]. Ziele einer antiangiogenen Therapie wären etwa die Reduktion der existierenden und Verhinderung der Entstehung neuer Tumorgefäße [11]. Ein weiterer günstiger Effekt wäre ein effizienterer Transport z.B. von Chemotherapeutika nach einer Verbesserung der hämodynamischen Eigenschaften der Tumorgefäße, der sogenannten Normalisierung [12]. Erste Erfolge in der antiangiogenen Therapie mit Bevacizumab, einem monoklonalen Anti-VEGF-Antikörper, sind bereits erzielt worden [11].

1.3. Mikroglia

1.3.1. Allgemeines

Als Mikroglia werden die residenten Immunzellen des Zentralnervensystems bezeichnet [13]. Es handelt sich um Vertreter der Familie der mononukleären Phagozytenzellen, zu der etwa die Blutmonozyten und die Gewebsmakrophagen gehören [13]. Die Mikroglia vorläufer, die nicht identisch sind mit Blutmonozyten, wandern in das Zentralnervensystem während der Embryonalperiode ein, nach der Geburt dagegen findet unter physiologischen Bedingungen keine weitere Einwanderung statt [14]. Die Mikroglia sind im Wesentlichen in zwei Zuständen anzutreffen, einem ruhenden und einem aktiven Zustand. Die Mikroglia im Ruhezustand verfügen über mehrere bewegliche verzweigte Ausläufer, mit denen sie ein umschriebenes Gebiet auf Störungen der Homöostase hin prüfen [15]. Bei Störung dieser Homöostase können Mikroglia in den aktivierten Zustand übergehen. In diesem Zustand sind die Zellen abgerundet und zur Wanderung und Phagozytose fähig [13,15]. Außerdem können sie an der Immunantwort teilnehmen, u.a. durch Antigenpräsentation sowie Sekretion verschiedener Zytokine und Immunmediatoren [16]. Mikroglia sind an praktisch allen pathologischen Prozessen des Zentralnervensystems beteiligt [15].

1.3.2. Mikroglia im Zusammenhang mit dem malignen Gliom

Es ist seit langem bekannt, dass Mikroglia in signifikantem Umfang innerhalb von malignen Gliomen vorkommen. Es wird von einem Anteil von 10 bis 30 % am Tumolvolumen ausgegangen [17]. Die Aufklärung ihrer Rolle dagegen hat erst begonnen. Über die Mikrogliazellen ist bekannt, dass sie bei praktisch allen Formen von pathologischen Prozessen im Zentralnervensystem akkumulieren [15], und so könnte auch ihre Ansammlung im Tumor ein Ausdruck der Hirngewebsschädigung sein. Eine andere mögliche Erklärung wäre ein Versuch des Zentralnervensystems, den Tumor durch diese Immunzellen zu bekämpfen [18]. Es gibt allerdings auch Hinweise, dass die Mikrogliazellen die Ausbreitung des Glioms sogar fördern könnten [19].

Zur möglichen Herkunft der Mikrogliazellen im Gliom gibt es unterschiedliche Angaben. Viele Autoren beschreiben sowohl eine Proliferation und Migration von hirneigenen Mikroglia zum Tumor als auch ein Einwandern von Monozyten aus dem Blut [20]. Letztere Zellen werden manchmal auch als Tumormakrophagen bezeichnet, andere Autoren hingegen verwenden die Begriffe Mikroglia und Hirnmakrophagen synonym [21]. Es gibt auch Publikationen, die die

Rekrutierung von Nachschub für die Mikroglia aus dem peripheren Blutstrom generell in Frage stellen [22].

1.3.3. Möglicher Zusammenhang zwischen Mikroglia und Angiogenese im malignen Gliom

Trotz der schon lange bekannten und signifikanten Präsenz der Mikrogliazellen im Gliom gibt es erst seit den letzten Jahren Hinweise, dass diese Zellen eine Rolle beim Prozess der Angiogenese spielen könnten. Dafür spricht etwa, dass die Anhäufung von Mikroglia in der Gliomperipherie am größten ist [23], dem Ort, an dem die Angiogenese besonders aktiv stattfindet [24]. Außerdem sind mit steigendem Malignitätsgrad des Tumors sowohl mehr Gefäße als auch mehr Mikroglia zu finden [25]. Darüber hinaus ist bei Mikroglia die Synthese zahlreicher Mediatoren und Enzyme nachgewiesen worden, die in der Lage sind, das Wachstum neu entstehender Gefäße voranzutreiben [26,27]. Ein weiterer Hinweis auf proangiogene Eigenschaften der Mikroglia ist die Tatsache, dass bei experimentell induzierten Gliomen nach Depletion der Mikroglia die Gefäßdichte der Tumoren abnimmt [18].

1.4. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die im experimentellen Gliom akkumulierenden Mikrogliazellen hinsichtlich ihrer Zahl, Dichte, Verteilung, Expression von Oberflächenmarkern sowie Bezug zu Blutgefäßen zu charakterisieren. Als Modell wurden murine Gliomzellen der Linie GL261 verwendet, die intrakraniell in syngenesischen Mäusen des Stammes C57Bl/6 implantiert wurden. Die auf diese Art und Weise erzeugten experimentellen Gliome wurden untersucht, indem Gefrierschnitte daraus mittels Immunfluoreszenz gefärbt, mikroskopische Aufnahmen davon gemacht und mittels spezieller Software ausgewertet wurden.

Berücksichtigt werden sollte die Entwicklung der oben genannten Eigenschaften im zeitlichen Verlauf der Tumorerkrankung. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten zur Aufklärung der Herkunft, des Phänotyps und der Rolle der Mikroglia im Gliom beitragen. Außerdem sollte die Frage beantwortet werden, ob innerhalb des Tumors und in dessen Umgebung eine verstärkte Kollokalisierung der Mikroglia und der Blutgefäße vorliegt, was ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der Mikroglia am Prozess der Angiogenese wäre.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verwendete Medien, Puffer und sonstige Lösungen

Acetone for analysis, Merck KGaA Darmstadt

Albumin from bovine serum, lyophilized powder, $\geq 96\%$, Sigma-Aldrich Steinheim

Borate Buffered Saline, pH 8,2, tablets, Fluka Analytical/ Sigma Aldrich

Casein from bovine milk, Sigma-Aldrich Steinheim

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1x +4,5 g/l Glukose, +L-Glutamin, +25 mM HEPES, -Pyruvat, Gibco/Invitrogen

Eosin G für die Mikroskopie, Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe

Ethanol 100 Vol.-% (MEK) für Laborzwecke, vergällt mit Methylethylketon, Herbeta Arzneimittel Berlin

Fetal Bovine Serum „Gold“, PAA Laboratories, Herkunft: USA

Formamide $\geq 99\%$ (GC), Sigma-Aldrich Steinheim

Gelatine from cold water fish skin, Sigma-Aldrich Steinheim

Hydrochloric Acid 2,0N Solution, Sigma-Aldrich Steinheim

Immunoselect Antifading Medium, Dianova Hamburg

Immunoselect Antifading Medium DAPI, Dianova Hamburg

Isotonische Kochsalzlösung (0,9% NaCl), Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg

Ketavet® 100 mg/ml Injektionslösung, Pharmacia GmbH, Berlin

Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie, Merck KGaA Darmstadt

2-Methylbutan ROTIPURAN®, ≥99%, p.a. Isopentan, Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe

Paraformaldehyd purissimum, Sigma-Aldrich, Steinheim

PBS pH 7,4, lösliche Tabletten, Gibco/Invitrogen (Phosphate 10 mmol/l, KCl 2,68 mmol/l, NaCl 140 mmol/l)

PBS steril, pH 7,4, Gibco/Invitrogen (KH₂PO₄ 1,06 mmol/l, NaCl 155,17 mmol/l, Na₂HPO₄-7H₂O 2,97 mmol/l)

Penicillin/Streptomycin, PAA Laboratories (Penicillin 10000 IE/ml, Streptomycin 10 mg/ml in 0,9% NaCl)

Rompun 2% Injektionslösung (Xylazin-Hydrochlorid), Bayer Healthcare Leverkusen

D(+)-Saccharose (≥99,5%), Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe

Sodium Chloride ACS Reagent, ≥99%, Sigma-Aldrich Steinheim

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ≥99%, Ph. Eur., Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe

Triton® X-100, Sigma-Aldrich Steinheim

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (TRIS-HCl) zur Analyse, Merck KGaA Darmstadt

Trypan Blue Stain 0,4%, Gibco/Invitrogen

Trypsin EDTA 1:250 (10x), PAA Laboratories (Trypsin 5,0 mg/ml, EDTA (Titrplex III) 2,2 mg/ml in PBS)

Xylol (Isomere), ≥98%, rein, für die Histologie, Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe

2.2. Zellkultur

2.2.1. GL261-Tumorzellen in Kultur

Bei der GL261-Zelllinie handelt es sich um Gliomzellen, die mit dem Mausstamm C57BL/6 syngene sind. Diese Zellen werden oft im Mausmodell des malignen Glioms eingesetzt. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C gezüchtet bei einer Luftfeuchtigkeit von 99% und einem CO₂-Anteil von 5%. Sie wachsen adhärent in 250ml-Zellkulturflaschen unter Verwendung des DMEM-Mediums und Zusatz von 10% FCS sowie 100 Einheiten Penicillin und 0,1 mg Streptomycin pro ml Medium.

2.2.2. DiI-Färbung der GL261-Zellen

In manchen Fällen wurden die Zellen vor Implantation mit dem lipophilen roten Farbstoff DiI (Dioctadecyl-tetramethylindo-Carbocyanin perchlorate) gefärbt.

Dazu wurde das Kulturmedium der Zellen am Abend vor der geplanten Implantation abgesaugt und nach Waschen durch 15 ml frisches Medium mit DiI-Zusatz (Konzentration: 7,5µg/ml) ersetzt. Der Erfolg der Färbung war am Morgen der Implantation durch die mit bloßem Auge sichtbare violette Färbung der Zellpellets nach Zentrifugation zu betrachten.

2.2.3. Vorbereitung der GL261-Zellen für die intrazerebrale Implantation

Nachdem die Zellen eine optische Dichte zwischen 75-85% in der Kulturflasche erreicht hatten, wurde der Mediumüberstand abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und zur Ablösung vom Flaschenboden mit 2 ml 0,5% Trypsin-EDTA-Lösung behandelt, die 5 min bei 37°C im Inkubator einwirkte. Anschließend wurde die Wirkung der Lösung durch Zusatz von 8 ml DMEM-Medium gestoppt, die so entstandene Zellsuspension wurde 7 min bei 1300 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Nachdem die Gesamtzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt wurde, wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert und das Pellet in PBS resuspendiert, wobei die Menge PBS jeweils so gewählt wurde, dass sich eine Konzentration von 20000 Zellen pro µl ergab. Die Zellsuspension wurde unmittelbar nach der Herstellung zur Implantation verwendet.

2.3. Intrazerebrale Tumorzellimplantation

2.3.1. Verwendeter Mausstamm

Es wurden weibliche Mäuse des Stammes C57BL/6 operiert, die vom Hersteller Charles River Laboratories GmbH Germany, 97633 Sulzfeld, stammten. Das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Implantation war zwischen 8 und 12 Wochen.

2.3.2. Narkose

Die Tiere wurden mit 1,36 mg Ketamin und 0,096 mg Xylazin, jeweils pro 10 g Körpergewicht, narkotisiert. Die Narkosemittel wurden intraperitoneal gespritzt.

2.3.3. Stereotaktische intrazerebrale Implantation der GL261-Zellen

Der Kopf der narkotisierten Tiere wurde im Stereotaxiegerät (Hersteller: David Kopf Instruments) horizontal fixiert. Die Kopfhaut über dem Schädeldach wurde mit einem medianen Schnitt von ca. 1-1,5 cm Länge eröffnet. Mithilfe des Stereotaxiegerätes wurden die Koordinaten für die Implantation 1 mm anterior vom Bregma und 2 mm rechts von der Mittellinie bestimmt und als der Ort festgelegt, an dem der Schädelknochen mittels einer 23G-Kanüle durchbohrt wurde. In einer Hamilton MICROLITER™ Implantationspritze (Hamilton Bonaduz AG, Schweiz) wurde 1 µl Tumorzellsuspension aufgezogen, diese wurde dann in der Halterung des Stereotaxiegerätes fixiert und in die Schädelöffnung eingetaucht. Die Spritze wurde 4 mm in die Tiefe des Gehirns vorgeschoben und 1 mm zurückgezogen, um eine Höhle zu erzeugen, in der sich die injizierte GL261-Zellsuspension sammeln sollte. Der Inhalt der Spritze wurde langsam über 5 Minuten in kleinen Schritten injiziert. Nach Beenden der Injektion wurde die Spritze weitere 5 Minuten in ihrer Position belassen, um ein Absetzen der Zellen in der erzeugten Höhle zu erlauben. Anschließend wurde die Spritze in kleinen Schritten über 5 Minuten aus dem Hirngewebe herausgezogen. Die Haut des Tieres wurde mit einer fortlaufenden Naht wieder verschlossen.

2.4. Intraperitoneale Injektion von BrdU

Bromodesoxyuridin (BrdU) ist ein synthetisches Nukleosid, das in der S-Phase des Zellzyklus in das neu produzierte DNA-Molekül an Stelle des Thymidins eingebaut werden kann. Die weitere Synthese der DNA-Kette und die Basenpaarung werden dabei nicht beeinträchtigt. Die Substanz wird intraperitoneal verabreicht, um sie anschließend im Gewebe der getöteten Tiere mittels eines monoklonalen Antikörpers zu detektieren und so zu untersuchen, ob während der BrdU-Applikation im Gewebe Mitosen, d.h. Zellteilungen, stattgefunden haben.

Jedem Tier wurde täglich ab dem 1. postoperativen Tag 100 µl einer BrdU-Lösung mit einer Konzentration von 100 mg/ml intraperitoneal gespritzt.

2.5. Entnahme und Fixierung des Gehirns

2.5.1. Perfusion der Tiere

Die Tiere wurden wie in Punkt 2.3.2. beschrieben narkotisiert. Es wurde ein medianer Hautschnitt über Thorax und Bauch gesetzt. Die Bauchwandmuskulatur wurde mit einem Querschnitt am Rippenbogen eröffnet und das Zwerchfell von der unteren Thoraxapertur gelöst. Mit einer Schere wurde die vordere Thoraxwand seitlich vom restlichen Thorax abgeschnitten und nach oben geklappt, um Zugang zum Herzen zu verschaffen. Der rechte Vorhof wurde aufgeschnitten und der linke Ventrikel mit einer Spritze punktiert, in der 10 ml 4% PFA-Lösung aufgezogen worden waren. Die Lösung wurde langsam und mit konstantem Druck durch den großen Kreislauf des Tieres gespritzt, um das Blut aus dem Gefäßsystem herauszuwaschen und das Gewebe noch vor der Entnahme zu fixieren.

2.5.2. Entnahme des Gehirns

Der Kopf des Tieres wurde vom restlichen Körper abgetrennt. Die Kopfhaut wurde median vom Nacken her durchschnitten und von der Schädelkalotte abpräpariert. Mit einer Feinschere wurde im Anschluss der Schädelknochen vom Nacken her median durchtrennt und mit einer

spitzen Pinzette vorsichtig in kleinen Stücken entfernt, um das Gehirn so weit wie möglich freizupräparieren. Das Gehirn wurde danach von der Schädelbasis gelöst, indem der Kopf mit der ventralen Seite nach oben gehalten und die Hirnnerven und -gefäße abgetrennt wurden. Das gelöste Gehirn wurde in ein Röhrchen mit 4% Paraformaldehyd-(PFA)-Lösung aufgenommen.

2.5.3. Fixierung des Gehirns

Das Gehirn verblieb in der 4% PFA-Lösung für 24 Stunden. Danach wurde es aus dieser Fixierlösung entnommen und für jeweils 48 Stunden aufeinander folgend in 10%, 20% und 30% Saccharoselösung gelegt. Dies erfolgte, um aus dem Gewebe Wasser mittels der osmotisch wirksamen Saccharoselösung zu entziehen. Während der gesamten Fixier- und Entwässerungszeit verblieb das Gewebe bei 4° C.

2.5.4. Einfrieren des Gehirns

Nachdem die Entwässerung abgeschlossen war, wurde das Gehirn aus der Saccharoselösung entnommen und abgetrocknet. Es wurde eingefroren, indem es in einen Behälter mit 2-Methylbutan (Isopentan) für ca. 5 Minuten getaucht wurde, welches mittels Trockeneis gekühlt worden war. Das eingefrorene Gehirn wurde bis zur Herstellung der Cryoschnitte bei -80° C gelagert.

2.6. Anfertigen von Cryoschnitten

Die Gehirne wurden mittels eines MICROM HM 560 Gefriermikrotoms geschnitten. Dabei wurden sie zur Gewährleistung der optimalen Temperatur in TissueTek® OCT (Hersteller: Sakura) eingebettet und auf -28° C eingestellt. Das Gehirn wurde mit der Sagittalachse senkrecht zur Klinge eingestellt und nach Erreichen des Tumorgebiets, welches mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung ermittelt wurde, wurden 4 µm dicke Schnitte hergestellt und auf SuperFrost® Plus-Objektträger (Hersteller: R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik Emmendingen) aufgenommen. Diese wurden bei -80° C gelagert.

2.7. Verwendete Färbungen

2.7.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist in der Histologie weit verbreitet. In dieser werden basophile Gewebsbestandteile, wie z.B. Zellkerne, in blau, und azidophile Strukturen, wie z.B. das Zytoplasma vieler Zellen, in rot dargestellt.

Die Objektträger wurden aus dem Tiefkühler entnommen und ca. 20 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie 10 min lang in einer Acetonlösung fixiert. Nach der Entnahme aus dem Aceton wurden die Objektträger 5 min lang getrocknet und danach für 10 min in die Hämatoxylinlösung gestellt. Nach der Entnahme aus dem Hämatoxylin wurde das überflüssige Färbemittel mit dd H₂O abgewaschen. Die Objektträger wurden nach ca. 5 min Lufttrocknen für ca. 1 s in Eosinlösung eingetaucht und danach erneut ca. 5 min luftgetrocknet. Anschließend wurde das überflüssige Eosin abgewaschen, indem die Objektträger nacheinander in 70%, 80%, 96% und 100% Ethanollösung für jeweils 3 min gestellt wurden. Danach wurden sie in einer 100% Xylollösung für 10 min gebracht. Anschließend wird ein Tropfen Slide Preparation Mounting Medium (Richard Allan Scientific) auf den Objektträger gebracht und die Schnitte mit einem Deckglas bedeckt.

2.7.2. Liste der verwendeten Primärantikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendete Verdünnung</i>
Rabbit anti-Iba-1	Wako Chemicals	1:250
Rat anti-mouse CD31	BD Pharmingen	1:50
Rat anti-mouse MHCI	Abcam	1:100
Rat anti-mouse MHCII	Abcam	1:200
Rat anti-mouse CD68	Serotec	1:200
Rat anti-mouse CD11b	Abcam	1:100
Sheep anti-BrdU	ABR	1:250

2.7.3. Liste der verwendeten Sekundärantikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendete Verdünnung</i>
FITC donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Dianova	1:150
FITC donkey anti-sheep IgG	Dianova	1:200

(H+L)		
Cy3 donkey anti-rat IgG (H+L)	Dianova	1:200
Cy3 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Dianova	1:200

2.7.4. Immunfluoreszenzfärbung für die Antigene Iba-1, CD31, MHCI, MHCII, CD68 und CD11b

Es wurden Immunfluoreszenzfärbungen für das Antigen Iba-1 und jeweils parallel dazu eins der anderen oben angeführten Antigene durchgeführt. Die Zellkerne wurden mittels 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht.

Vor dem Färben wurden die Gefrierschnitte für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für weitere 30 min in einer 0,5%-Kaseinlösung geblockt, um der Entstehung von unspezifischen Antikörperreaktionen vorzubeugen. Anschließend wurden die verdünnten Primärantikörper für 2 h inkubiert (dunkel, Raumtemperatur, Feuchtekammer). Nach zweimaligem Waschen mit 0,5% Kasein wurde die Sekundärantikörperlösung aufgetragen und die Schnitte damit 2 h inkubiert (dunkel, Raumtemperatur, Feuchtekammer). Nach Waschen mit PBS und dd H₂O wurden die Schnitte mittels eines DAPI-haltigen Mediums (Immunoselect Antifading Medium DAPI) mit Deckgläsern eingedeckt.

2.7.5. Immunfluoreszenzfärbung für BrdU + Iba-1

Die Objektträger wurden vor dem Färben für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und in Trispuffer (TBS, Zusammensetzung für 10x-Lösung: 87,66 mg NaCl, 12,11 TRIS-HCl, 11 ddH₂O) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Aufschließung des BrdU-Antigens mittels einer Lösung aus 50% Formamid und 50% SCC (Zusammensetzung: 175,3 g NaCl, 88,2 g Natriumcitrat, 800ml H₂O, pH 7,0), die für 1 bis 2 h bei 65° C auf das Gewebe einwirkte. Nach Waschen mit SCC wurden die Schnitte in 2N HCl für 30 min bei 37° C und in Boratpuffer (BBS) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein Blocken mit Fish Skin Gelatine Puffer (Zusammensetzung: 497,5 ml TBS, 5g Bovine Serum Albumin, 2 ml Fish Skin Gelatine 50%, 0,5 ml Triton-X 100) für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde eine zweistündige Inkubation mit dem BrdU-Primärantikörper (dunkel, Raumtemperatur, Feuchtekammer) durchgeführt. Nach erneutem Waschen und Blocken mit Fish Skin Gelatine Puffer wurde der Sekundärantikörper FITC donkey anti sheep IgG (H+L) aufgetragen und für 1 h inkubiert (dunkel, Raumtemperatur, Feuchtekammer). Nach Waschen mit Fish Skin Gelatine Puffer wurde der BrdU-Färbung die Iba-1-Färbung angeschlossen. Dabei wurde mit dem Primärantikörper für 2 h inkubiert (dunkel, Raumtemperatur, Feuchtekammer), mit Fish Skin

Gelatine Puffer gewaschen und danach für 1 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert (dunkel, Raumtemperatur, Feuchtekammer). Danach wurden die Schnitte mit PBS und dd H₂O gewaschen und mittels Immunoselect Antifading Medium mit Deckgläsern eingedeckt.

2.8. Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen

2.8.1. Gewinnung von mikroskopischen Aufnahmen

Die mikroskopischen Aufnahmen der gefärbten Hirnschnitte wurden mit einem Zeiss Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop gemacht.

2.8.2. Festlegung und Flächenbestimmung der untersuchten Gewebeareale

Für die Bestimmung von Zellzahlen sowie die Untersuchung der Antigenexpression der Mikroglia wurden das Tumorrinnere, die peritumorale Region und die kontralaterale, tumorfreie Hemisphäre untersucht.

Der Tumor mitsamt Umgebung wurde möglichst vollständig mikroskopisch fotografiert. Die Tumorgrenzen ließen sich leicht anhand der sehr unterschiedenen Kerngestalt und -verteilung bestimmen. Alle abgebildeten Bereiche, die eindeutig die für den Tumor charakteristische Kernarchitektur besaßen, wurden zur Tumorregion gezählt. Als peritumorale Region wurde eine 100µm dicke Gewebsschicht definiert, die unmittelbar außen am Tumor angrenzte. Von der kontralateralen Hemisphäre wurde pro Gewebsschnitt jeweils eine Aufnahme getätigt, die jeweils vollständig ausgewertet wurde.

Die Fläche der untersuchten Gewebeareale wurde mittels der Software Carl Zeiss AxioVision Product Suite bestimmt.

2.8.3. Zählung der Mikrogliazellen und Blutgefäße

Die Mikroglia und Blutgefäße wurden manuell mittels der Software ImageJ ausgezählt.

2.9. Statistik

Mittels des Programms IBM SPSS Statistics 21 wurden sämtliche in der Arbeit abgebildeten Grafiken erstellt sowie die Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen vorgenommen. Die Signifikanzprüfung erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests sowie des Mann-Whitney-U-Tests für nichtverbundene Stichproben, ebenfalls durch IBM SPSS Statistics 21.

3. ERGEBNISSE

3.1. Makroskopische und lichtmikroskopische Analysen der induzierten Gliome

Es wurden syngene GL261-Gliomzellen in C57BL/6-Mäusen intrakraniell implantiert. Die Tiere wurden nach 7, 14 bzw. 21 Tagen getötet, das Gehirn wurde entnommen, in Formalin fixiert, entwässert und eingefroren. Aus dem gefrorenen Gehirn wurden 4 µm dicke Schnitte am Gefriermikrotom angefertigt und anschließend gefärbt.

Bei den Gliomen früher Stadien (Analyse nach 7 bzw. 14 Tagen) waren äußerlich an den Gehirnen bis auf die Einstichstelle am Cortex kaum Hinweise auf das Vorliegen eines Tumors zu sehen (Abb. 1a). An den meisten Gehirnen im späten Stadium (am Tag 21) dagegen sah man oft schon äußerlich das Vorliegen eines Glioms bzw. der dadurch induzierten Hämorrhagie (Abb. 1b).

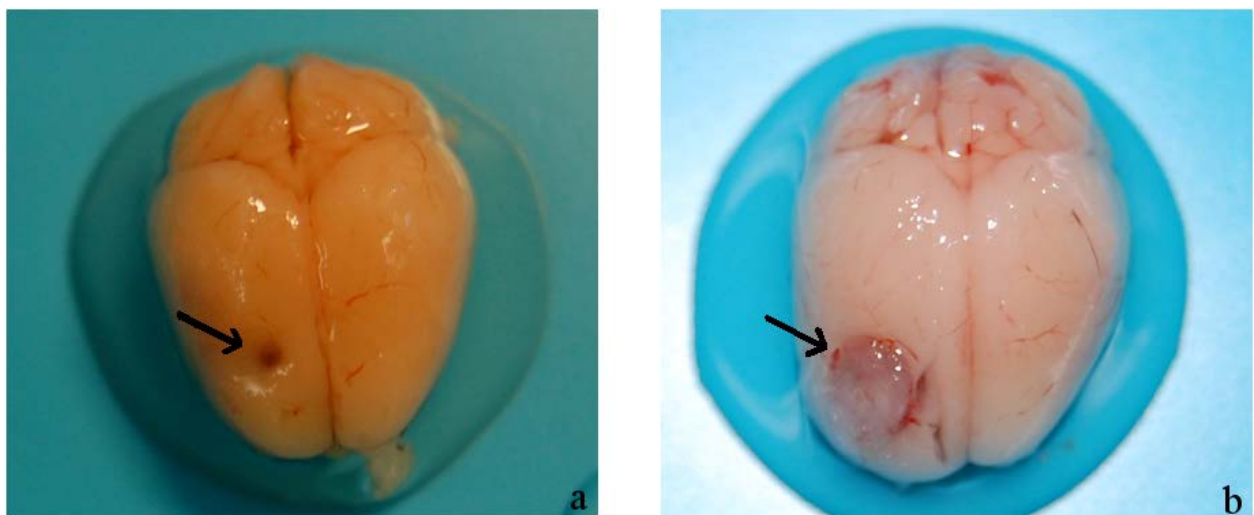


Abb. 1. Mausgehirne wurden 14 Tage (a) bzw. 21 Tage (b) nach Implantation entnommen. Am Tag 14 ist nur die Einstichstelle erkennbar (Pfeil), während zum Tag 21 aufgrund des extensiven Wachstums der Zellen der Tumor bereits auch makroskopisch sichtbar ist (Pfeil).

Auf histologischer Ebene mit Färbung von Hämatoxylin/Eosin (H./E.) zeigten sich jeweils unterschiedlich große Tumore, die im zeitlichen Verlauf an Größe zunahmen, sich meist deutlich vom umgebenden Gewebe abhoben und aus pleomorphen, dicht gepackten, rundlichen Zellen mit relativ großer Kern-Plasma-Relation bestanden (Abb. 2). Insbesondere bei späten Tumoren waren auch einige Strukturen zu beobachten, die aufgrund ihrer Form am ehesten als Blutgefäße identifiziert werden konnten (Abb. 2b, *).

Gliome zeichnen sich durch Einblutungen und nekrotische Bereiche aus. In unserem Mausmodell konnten diese Merkmale ebenfalls zum späten Wachstumszeitpunkt beobachtet werden (Abb. 2 a und b, **).

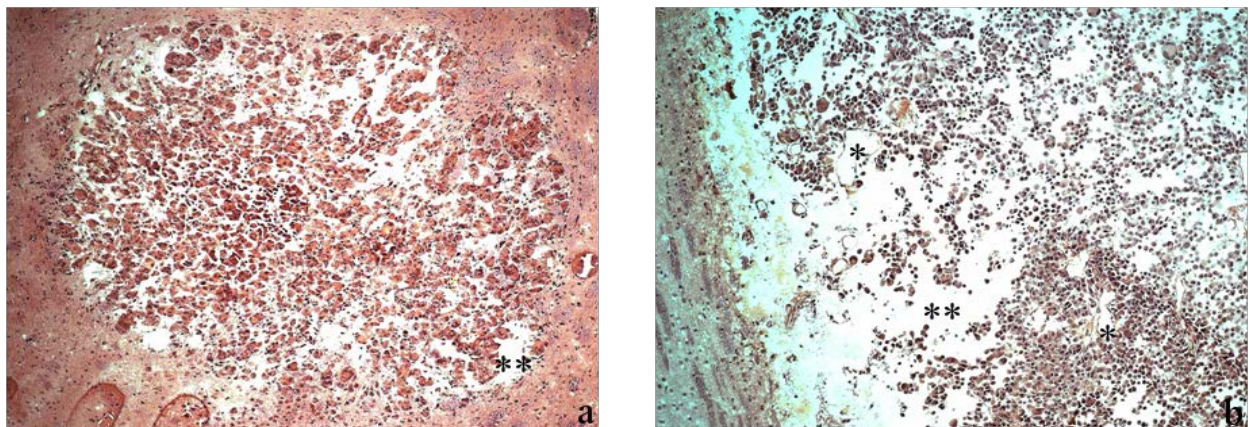


Abb. 2. H./E.-Färbung eines experimentellen Glioms nach 14 (a) bzw. 21 (b) Tagen, 10x-Vergrößerung. Während bei frühen Gliomen (a) kaum Gefäßanschnitte zu sehen sind, sind diese in späteren Tumoren häufig (b, *). In Schnitten beider Stadien finden sich zwischen dicht gepackten Zellen Lücken (**), die wahrscheinlich Nekrosen oder Hämorrhagien entsprechen.

3.2. Nachweis und Charakterisierung der im Tumorbereich vorhandenen Mikrogliazellen

Als Mikroglia werden die hirneigenen Abwehrzellen bezeichnet. Sie sind mit den Monozyten des Blutes und den Makrophagen in verschiedenen Geweben verwandt. Sie nehmen an der Immunreaktion im Zentralnervensystem u.a. durch Phagozytose und Antigenpräsentation

teil. Da es Hinweise gibt, dass diese Zellen am Gliomwachstum und insbesondere am Prozess der Angiogenese beteiligt sein könnten [26, 27], wurden die Mikroglia in der vorliegenden Arbeit in einer Reihe von Immunfluoreszenzfärbungen im Hinblick auf Dichte, Verteilung, Expression von Oberflächenmarkern sowie räumliches Verhältnis zu den Blutgefäßen untersucht.

3.2.1. Verteilung und Dichte der Mikroglia

Es wurde mittels Immunfluoreszenz die Darstellung von Iba-1 (Ionized Calcium binding protein)-positiven Zellen in den Gefrierschnitten vorgenommen, wobei Iba-1 von den meisten Autoren als ein Marker der hirneigenen Abwehrzellen angegeben wird [18]. Die Übersichtsvergrößerung ergab in allen Stadien ein Bild von mehr oder weniger ausgeprägter Anhäufung Iba-1-positiver Zellen im Bereich des Glioms (Abb. 3). Sowohl verzweigte als auch amöboide Mikroglia konnten beobachtet werden. Diese zwei Formen werden als Merkmal unterschiedlicher Aktivierungszustände beschrieben [28], wobei die ruhenden Zellen mehr Fortsätze haben und die aktivierten abgerundet sind. Die Mikrogliazellen waren in manchen Tumoren besonders an der Grenze zum unbetreffenen Gewebe in hoher Dichte zu beobachten. Dieser Befund würde die Beobachtungen anderer Autoren, dass die Mikrogliazellen besonders im Tumorrand eine hohe Zahl erreichen [23], bestätigen. Allerdings ergab die Gesamtbetrachtung der peritumorale Region eine zwar im Vergleich zum gesunden Gewebe erhöhte, im Vergleich zum Tumor allerdings niedrigere Mikroglia-dichte. Eine mögliche Ursache für diese geringere peritumorale Mikroglia-dichte könnte darin liegen, dass der Bereich mit besonders hoher Dichte am Rand streng genommen intratumoral liegt und in unserer Auswertung zum Tumor gezählt wurde.

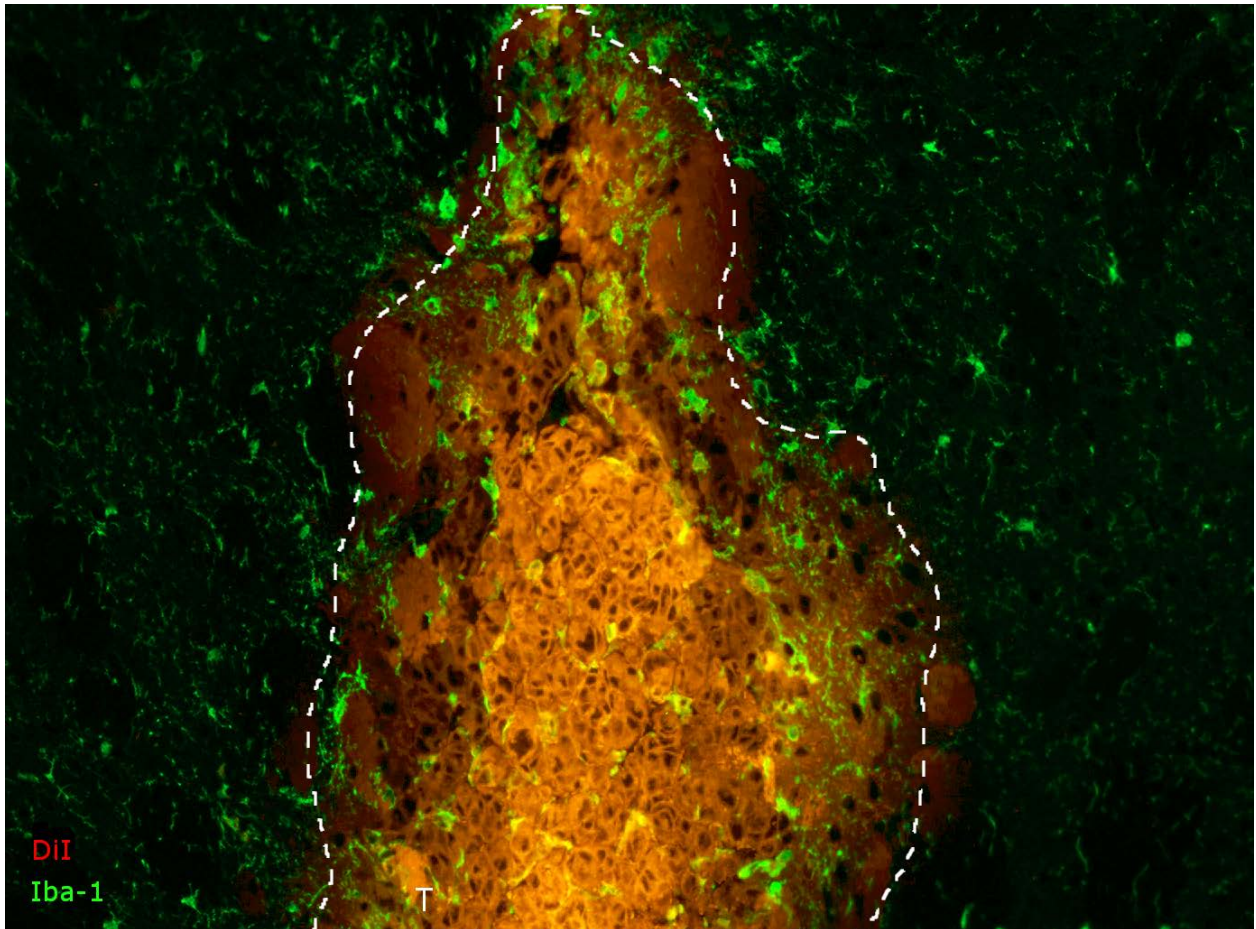


Abb. 3. Gliom nach 14 Tagen, 20x-Vergrößerung, Immunfluoreszenz. DiI-Färbung der Gliomzellen (rot), FITC-Markierung Iba-1-positiver Mikroglia (grün). Insbesondere im Bereich des Tumors (T), aber auch in dessen Umgebung lassen sich zahlreiche Iba-1-positive Zellen beobachten. Diese sind sowohl in verzweigter als auch in amöboider Form anzutreffen.

Weiter fiel auf, dass der Bereich, der durch so hohe Akkumulation von Iba-1-positiven Zellen gekennzeichnet war, immer etwas größer war als der durch rote Fluoreszenz der mit DiI angefärbten GL261-Zellen charakterisierte Tumor. Um zu prüfen, ob die Größe des mikrogliareichen Bereichs im gleichen Schritt wächst wie die des Tumors, wurden in anderen histologischen Schnitten, in denen die Zellkerne mit DAPI gefärbt wurden, mithilfe des Programms Carl Zeiss AxioVision Product Suite (Fa. Zeiss) im Einkanalbild (nur DAPI bzw. nur Iba-1 sichtbar) die Fläche jedes untersuchten Tumors und die Fläche des zugehörigen mikrogliareichen Areals in mehreren Schnitten bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Das Ergebnis war, dass im Verlauf der experimentell induzierten Erkrankung dieses Verhältnis leicht von durchschnittlich ca. 2,1 am 7. über 1,6 am 14. bis auf 1,5 am 21. postoperativen Tag

sank. Die Fläche der Mikrogliaverdichtung nimmt nicht mit der Geschwindigkeit des Tumorwachstums zu, auch wenn statistisch aufgrund der hohen Standardabweichung keine Signifikanz erreicht wurde. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wäre, dass der Saum von Gewebe mit hoher Mikroglia-dichte, welcher den Tumor umgibt, im Laufe des Gliomwachstums eine relativ gleiche Breite behält. Das heißt, der Tumor kann trotz wachsender Größe nur auf begrenzter Entfernung auf das umliegende Gewebe einwirken, welches sich dann u.a. durch Mikrogliaakkumulation reaktiv verändert. Die Fläche dieses Saums aus verändertem Gewebe wächst dann zwar mit, der in seinem Inneren wachsende Tumor erhöht aber seinen Durchmesser viel schneller und verschiebt damit das Flächenverhältnis zu seinen Gunsten (Abb. 4).

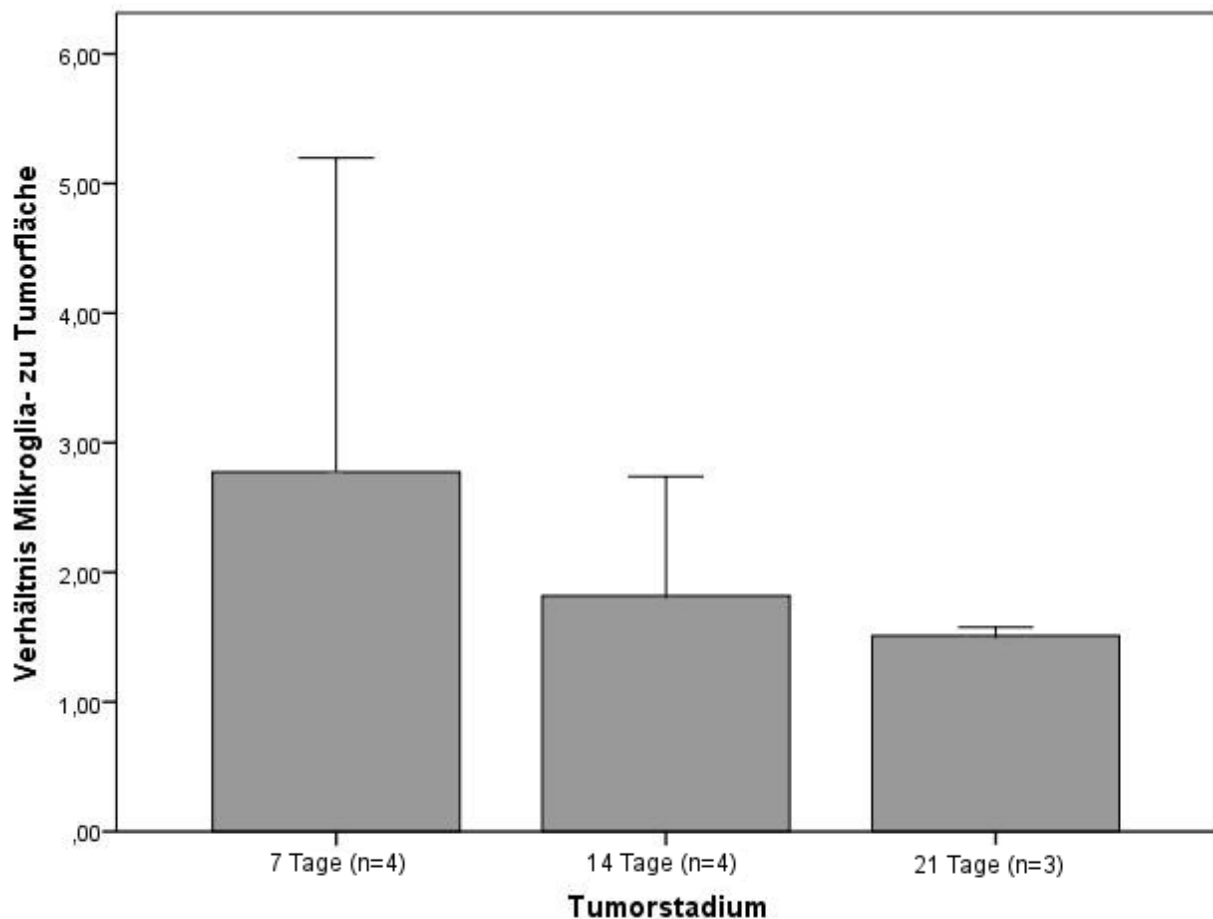


Abb. 4.Verhältnis zwischen Mikrogliaakkumulationsgebiet und Tumorfläche. Das Verhältnis wird im Verlauf der experimentellen Erkrankung tendenziell immer niedriger, erreicht aber keine statistische Signifikanz ($p=0,16$).

Nach Bestimmung der betreffenden Flächen des Tumors, von dessen unmittelbarer Umgebung sowie der nicht betroffenen linken Hemisphäre und Auszählung der darauf durch Iba-1-Färbung dargestellten Mikrogliazellen wurde die Zahl der letzteren ins Verhältnis zur Fläche (in mm²) gesetzt. Das Ergebnis zeigt eine in allen Tumorstadien zu beobachtende, signifikant höhere Dichte im Bereich des Tumors sowie der unmittelbaren Tumorumgebung im Vergleich zur Kontrolle der linken Hemisphäre. Im gesamten zeitlichen Verlauf ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen dem Tumor und dem peritumoralen Bereich (Abb. 5).

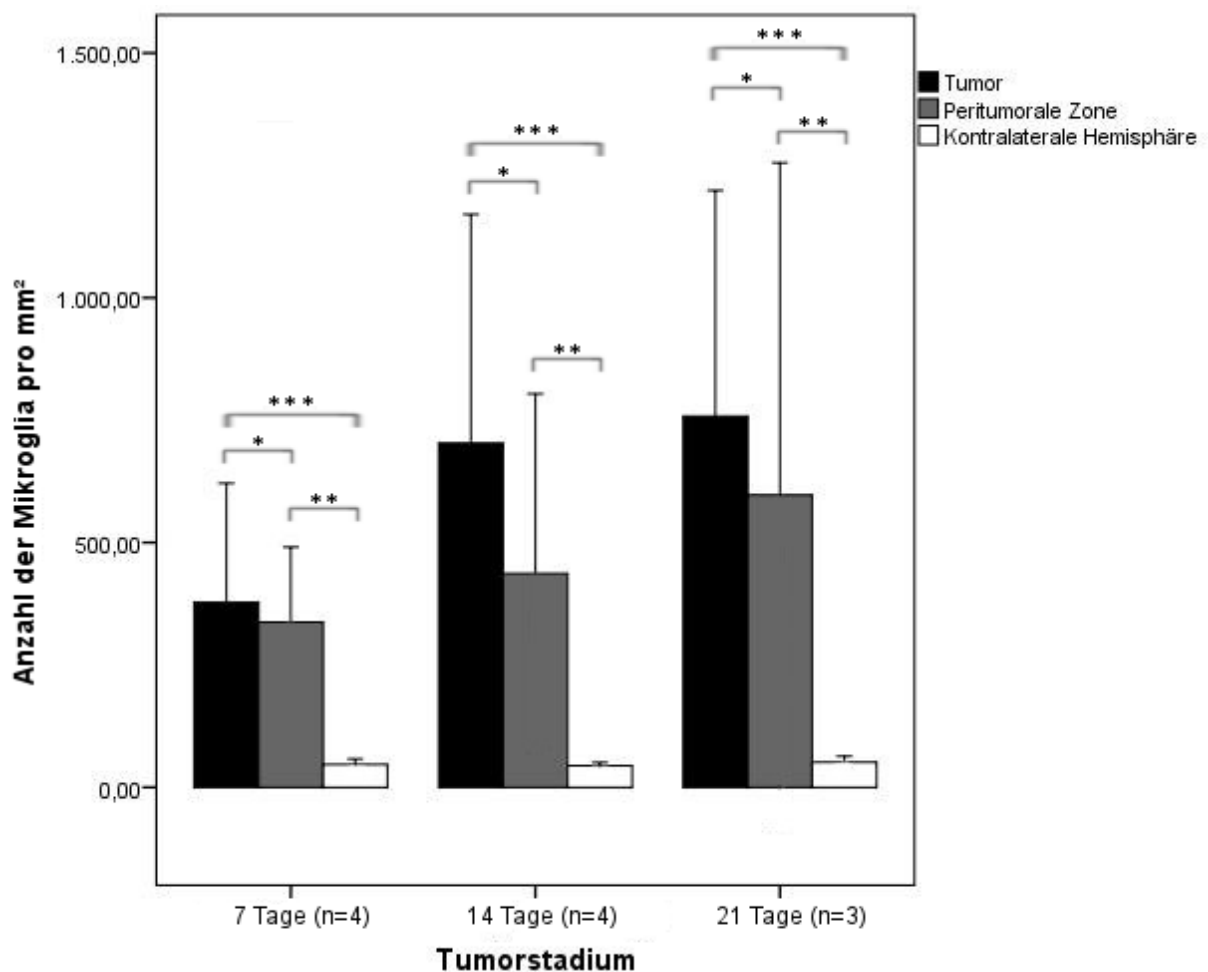


Abb. 5. Mikrogliazellichte im Tumor, peritumoral und in der kontralateralen Hemisphäre. Im Tumor erreicht die Dichte den höchsten Wert, die Differenz zum peritumoralen Gebiet nimmt im Verlauf zwar zu, erreicht aber keine Signifikanz (*, $p=0,19$). Kontralateral dagegen signifikant geringere Mikrogliazellichte, sowohl im Vergleich zum peritumoralen Gebiet (**, $p<0,01$) als auch zum Tumor (***, $p<0,01$).

Die beobachteten Ergebnisse zeigen, dass die Zahl der Mikroglia pro mm² sowohl intras als auch peritumoral im Vergleich zum gesunden Gewebe stark zunimmt (Abb. 5). Hingegen zeigt sich in der kontralateralen Hemisphäre keine Veränderung der Mikrogliazahl, weshalb davon auszugehen ist, dass bis zum Tag 21 der Tumor dort keine Veränderungen hervorruft. Im zeitlichen Verlauf steigt die Mikroglia-dichte im Tumor und peritumoral tendenziell an, der Anstieg erreicht aber keine statistische Signifikanz (Tumor: p=0,11; peritumorale Zone: p=0,43).

3.2.2. Antigenexpression

Es gibt Antigene von Mikroglia, die als Marker eines aktivierten Zustands beschrieben werden [28]. Von diesen wurden vier Marker ausgewählt und im zeitlichen Verlauf des Tumorstadiums analysiert. Dazu wurden die Immunfluoreszenzfärbungen der Antigene MHCI und MHCII, CD68 und CD11b parallel zu Iba-1 durchgeführt, um ein Expressionsprofil der Mikrogliazellen in den untersuchten Tieren zu erstellen.

3.2.2.1. MHCI-Expression

MHCI (Abkürzung: Major Histocompatibility Complex) ist ein Molekül, das auf der Oberfläche aller kernhaltigen Körperzellen vorkommt und an der Präsentation von intrazellulären Molekülen für CD8-positive Zellen des Immunsystems beteiligt ist [29]. In der durchgeführten MHCI-Färbung (Abb. 6) beobachteten wir vor allem ein sehr ausgeprägtes Signal der GL261-Gliomzellen. Sowohl in der tumorfreien wie auch in der tumorbehafteten Hemisphäre zeigten die Iba-1-positiven Zellen kaum MHCI-Fluoreszenz. Ein besonders hohes Vorkommen MHCI-positiver Mikroglia im Tumor oder dessen Umgebung im Vergleich zum vom Tumor nicht betroffenen Gewebe ließ sich nicht feststellen. Im zeitlichen Verlauf änderte sich dieser Befund nicht wesentlich.

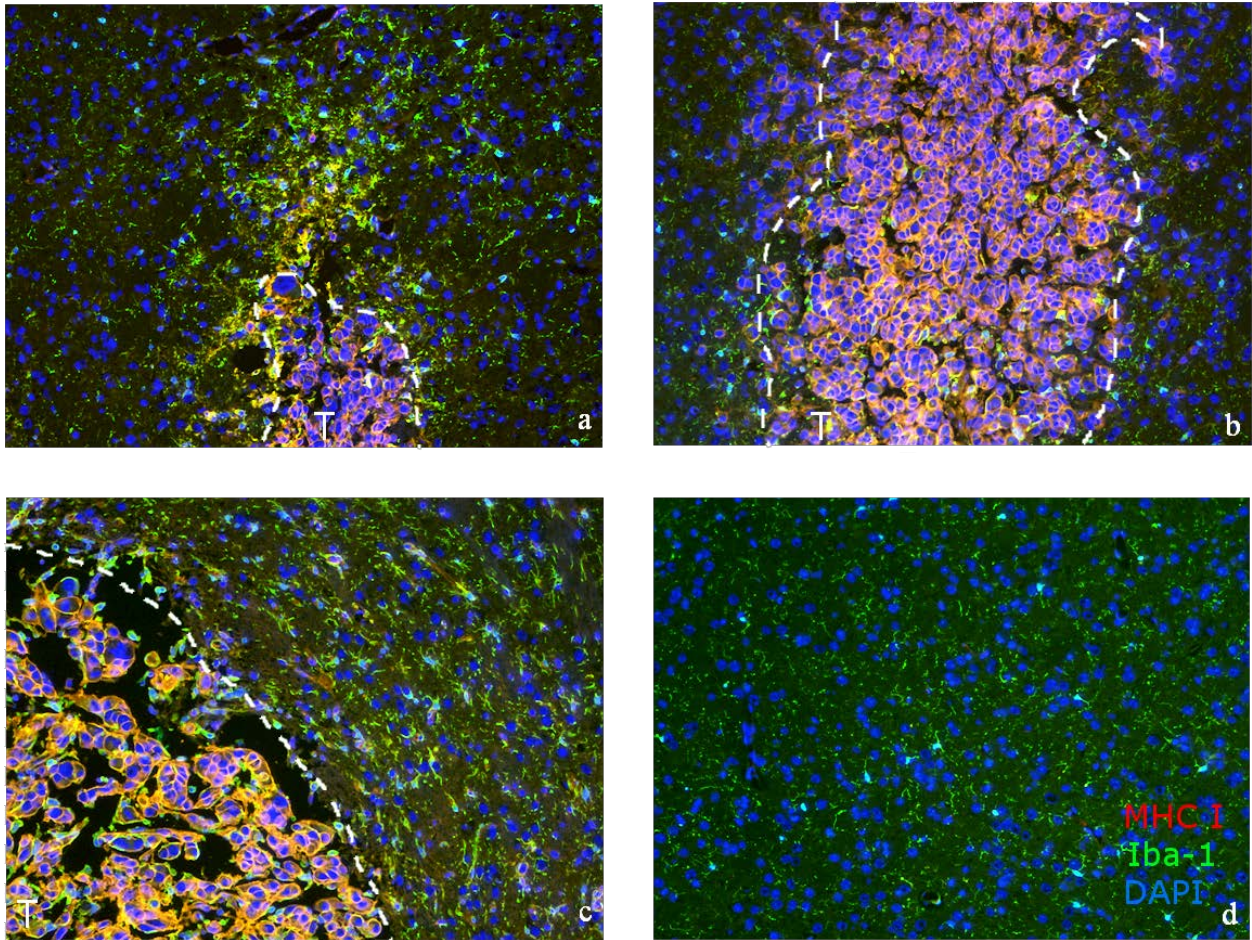


Abb. 6. Darstellung der MHC I-Expression. Iba-1 (FITC, grün), MHC I (Cy3, rot), Zellkerne (DAPI, blau), Tumor (T). Immunfluoreszenz, 20x-Vergrößerung. Tag 7 (a); Tag 14 (b); Tag 21 (c); kontralaterale Hemisphäre (d). In allen Stadien ergab sich eine positive Reaktion der Gliomzellen auf MHC I. Mikrogliazellen (grün) zeigen keine positive MHC I-Reaktion. In der tumorfreien Hemisphäre (d) sind keine MHC I-positiven Zellen zu beobachten.

3.2.2.2. MHC II-Expression

MHC II ist ein Oberflächenmolekül, das auf antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems wie z.B. Monozyten bzw. deren Abkömmlingen, dendritischen Zellen oder Lymphozyten vorkommt und u.a. an Interaktionen mit CD4-positiven T-Helfer-Zellen teilnimmt [30]. Auch dieses Molekül wird von manchen Autoren als spezifisch für aktivierte Mikrogliazellen angesehen [28]. Andere hingegen beobachten es auf allen Mikrogliazellen des Gehirns [13]. In den von uns untersuchten Tieren zeigten Mikroglia in der tumorfreien Hemisphäre im gesamten Verlauf des Versuchs keine Expression von MHC II. Einige, aber nicht alle Iba-1-positiven Zellen im Tumor zeigten auch eine positive Reaktion auf MHC II. Ihre

Häufigkeit sowie die Intensität ihrer Expression nahmen im Laufe des Tumorwachstums zu (Abb. 7).

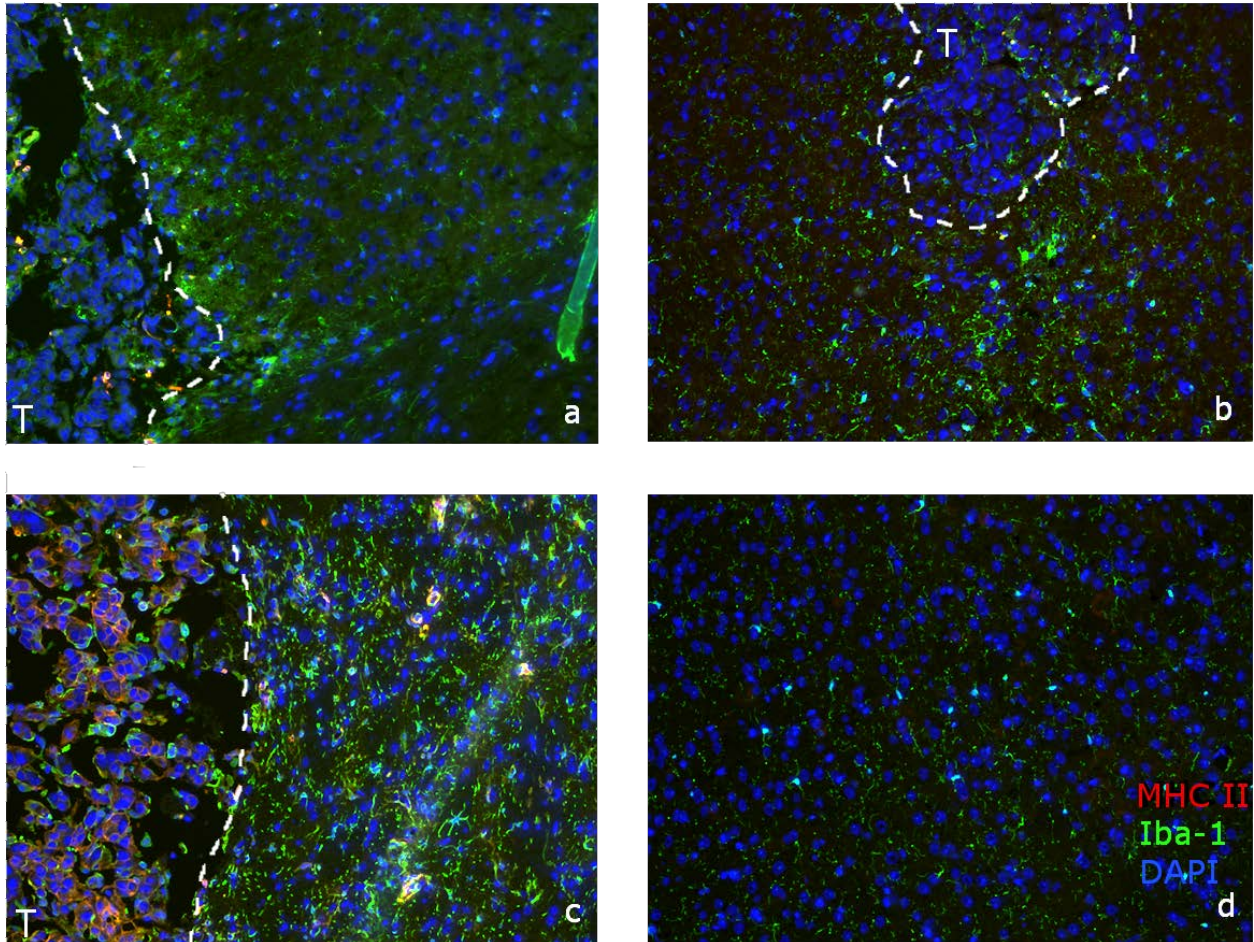


Abb. 7. Darstellung der MHCII-Expression. Iba-1 (FITC, grün), MHCII (Cy3, rot), Zellkerne (DAPI, blau), Tumor (T). Immunfluoreszenz, 20x-Vergrößerung. Tag 7 (a); Tag 14 (b); Tag 21 (c); kontralaterale Hemisphäre (d). In den frühen Stadien (7 Tage, a, und 14 Tage, b) selten MHCII-positive Zellen, sehr oft sind diese auch Iba-1-positiv. Ihre Zahl sowie die Intensität der Reaktion nehmen mit der Zeit zu (c). Kontralateral sind kaum MHCII-positive Zellen zu sehen.

3.2.2.3. CD68-Expression

CD68 oder Makrosialin ist ein Protein, das mit dem Phagosomen-Lysosomen-System in Verbindung steht und auf Zellen monozytärer Herkunft anzutreffen ist [31]. Auch hier gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben zur Expression dieses Moleküls von Mikroglia. Es wird diskutiert, ob alle [32] oder nur die aktivierten [28, 33] Mikroglia CD68 exprimieren. In unserem

Versuch zeigten fast alle Iba-1-positiven Zellen sowohl im Tumor und in dessen Umgebung als auch in der tumorfreien linken Hemisphäre eine CD68-Fluoreszenz, wobei diese bei den Tumormikrogliazellen etwas stärker ausgeprägt war. Dieses Muster erstreckte sich über alle untersuchten Tumorstadien (Abb. 8).

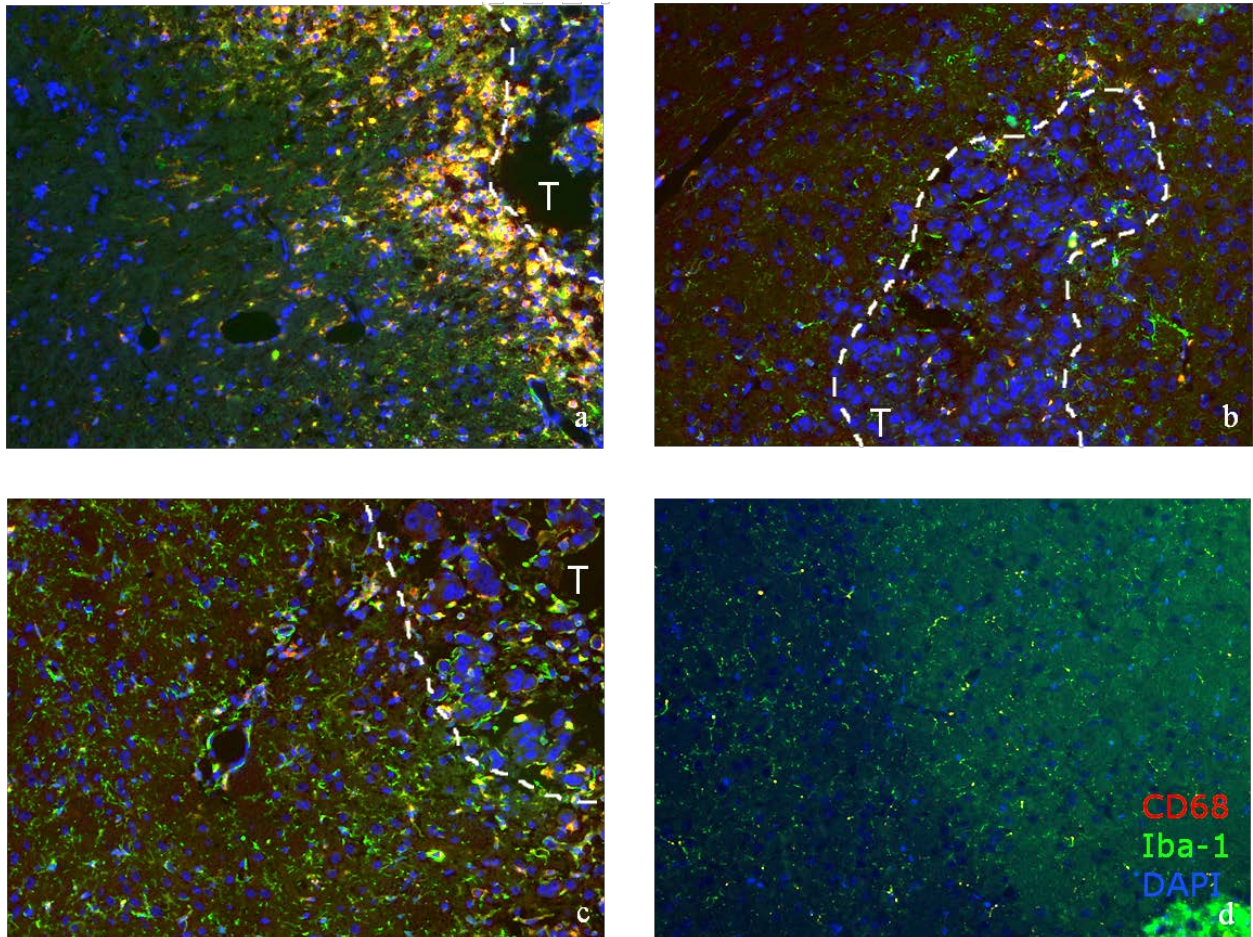


Abb. 8. Darstellung der CD68-Expression. Iba-1 (FITC, grün), CD68 (Cy3, rot), Zellkerne (DAPI, blau), Tumor (T). Immunfluoreszenz, 20x-Vergrößerung. Tag 7 (a); Tag 14 (b); Tag 21 (c); kontralaterale Hemisphäre (d). In allen Tumorstadien und in der tumorfreien Hemisphäre sind die Iba-1-positiven Zellen weitgehend auch CD68-positiv.

3.2.2.4. CD11b-Expression

CD11b, auch Integrin Alpha M, Mac-1 und Komplementrezeptor 3 (CR3) genannt, ist ein Oberflächenmolekül, das auf diversen Zellen des Immunsystems wie z.B. Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen oder natürlichen Killerzellen anzutreffen ist. Es beteiligt sich an Prozessen wie z.B. Adhäsion und Migration von Leukozyten, Phagozytose, zellvermittelter

Zytotoxizität, Chemotaxis sowie am Ablauf der Komplementreaktion [34]. Auch über CD11b werden Vermutungen angestellt, dass es aktive von ruhenden Mikroglia unterscheiden könnte [28,35], andere Autoren dagegen finden das Molekül auch bei ruhenden Mikroglia [13]. Der unternommene Färbungsversuch zeigte eine fast vollständige Übereinstimmung der beiden Antigene CD11b und Iba-1 mit sehr wenigen Zellen, die nur eines von beiden Molekülen exprimierten. In der kontralateralen Hemisphäre ist die Expression von CD11b mit der Iba-1-Färbung übereinstimmend, jedoch nur sehr schwach ausgeprägt (Abb. 9d). Hingegen zeigten die Mikroglia im Tumor eine verstärkte CD11b-Expression. Dies ließ sich in den drei untersuchten Tumorstadien in ungefähr gleichem Ausmaß beobachten (Abb. 9a-c).

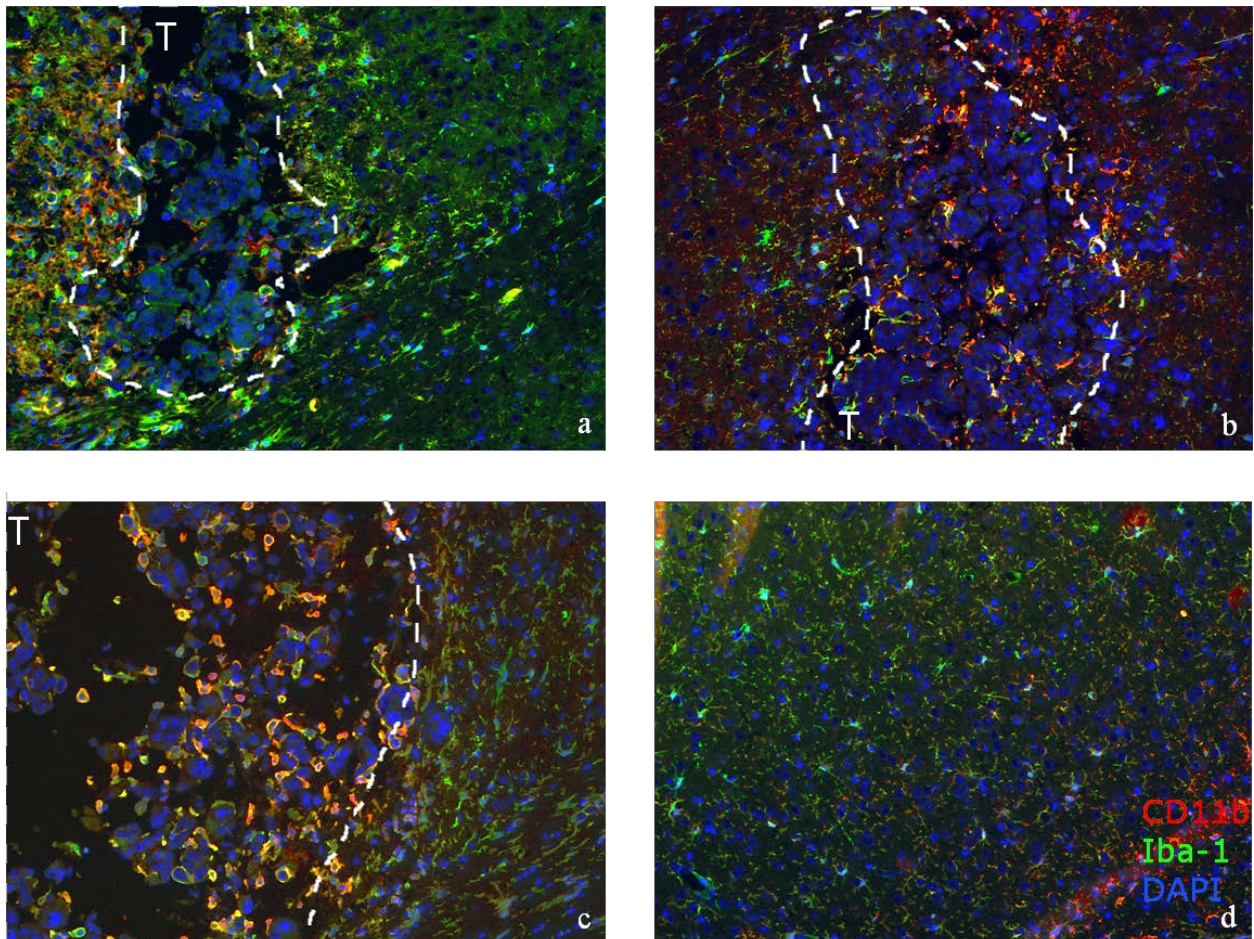


Abb. 9. Darstellung der CD11b-Expression. Iba-1 (FITC, grün), CD11b (Cy3, rot), Zellkerne (DAPI, blau), Tumor (T). Immunfluoreszenz, 20x-Vergrößerung. Tag 7 (a); Tag 14 (b); Tag 21 (c); kontralaterale Hemisphäre (d). In allen Tumorstadien und in der tumorfreien Hemisphäre sind die Iba-1-positiven Zellen weitgehend auch CD11b-positiv.

3.3. Proliferation der Mikroglia im Tumormodell

Der Versuch mit BrdU-Applikation wurde durchgeführt, um der Frage nachzugehen, ob die Mikrogliazellen des Gehirns, die eine sehr starke Anhäufung im Bereich des induzierten Glioms aufweisen, sich während des Krankheitsprozesses auch mitotisch teilen. BrdU wird bei der DNA-Replikation in das neue DNA-Molekül eingebaut, ohne die Basenpaarung zu stören, und kann nachher mittels eines Antikörpers im Zellkern nachgewiesen werden. Es wurden Iba-1-positive Zellen mit BrdU-positiven Kernen in allen Stadien und allen untersuchten Gewebebereichen nachgewiesen (Abb. 10), deren Häufigkeit sich jedoch untereinander stark unterschied.

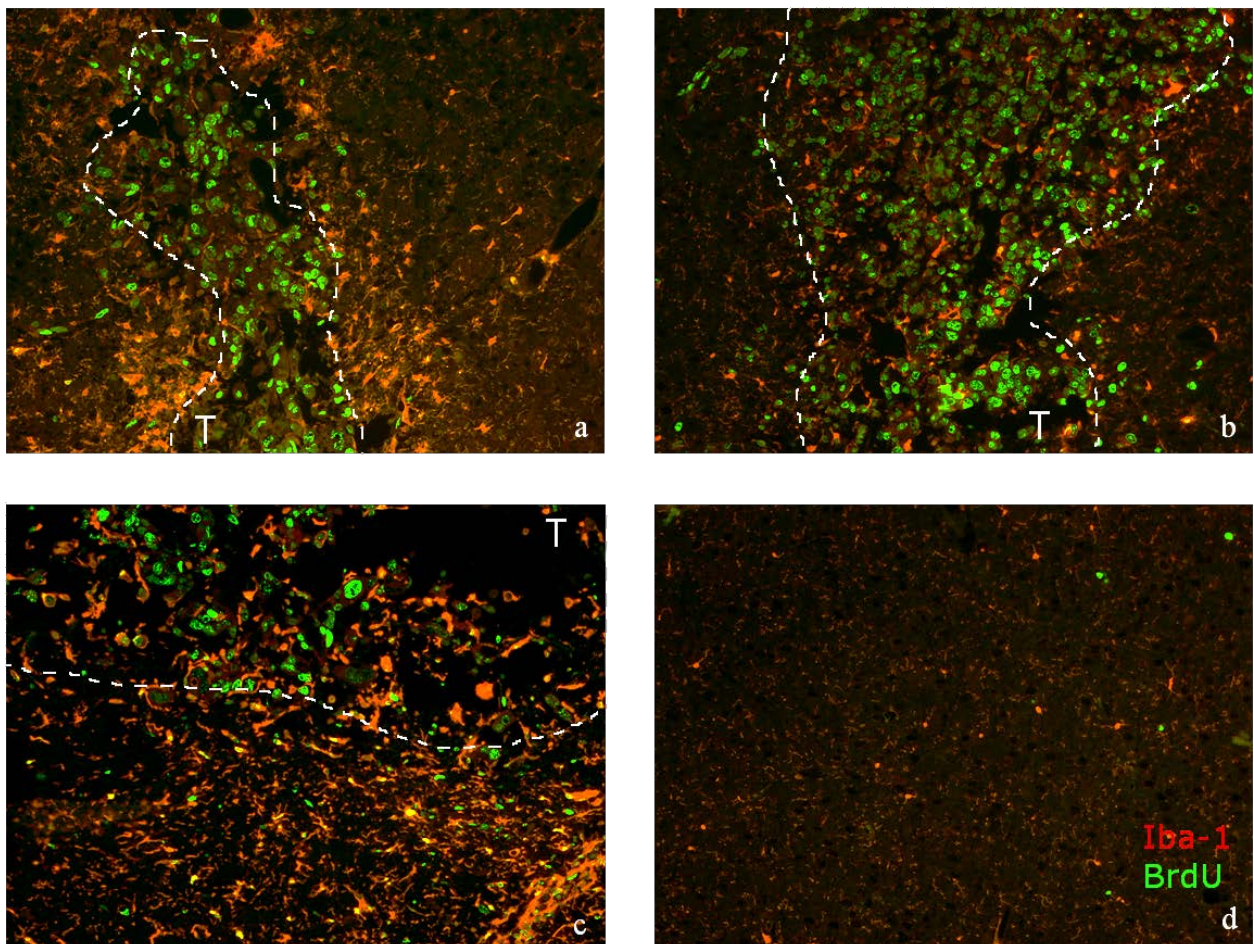


Abb. 10. Darstellung der BrdU-positiven Mikroglia. Iba-1 (Cy3, rot), BrdU (FITC, grün), Tumor (T). Immunfluoreszenz, 20x-Vergrößerung. Tag 7 (a); Tag 14 (b); Tag 21 (c); kontralaterale Hemisphäre (d). Im Bereich des Glioms zeigen sehr viele Tumorzellen eine positive BrdU-Reaktion (große grüne Kerne, keine Iba-1-Reaktion). Einige Iba-1-positive Zellen reagieren ebenfalls positiv auf BrdU, ihre Zahl steigt im Laufe der Erkrankung an. In der tumorfreien Hemisphäre sind kaum BrdU-positive Zellen zu beobachten.

Der Anteil proliferierender Zellen unter den Mikroglia in der tumorfreien linken Hemisphäre blieb in allen Stadien konstant bei ca. 5%. Innerhalb des Tumors betrug dieser Anteil am Tag 7 ebenfalls ca. 5%, stieg aber bis Tag 14 auf 10% und bis Tag 21 auf 15% an. Am höchsten war der Prozentsatz in der unmittelbaren Tumorumgebung, wo er 15% am Tag 7 betrug, 30% am Tag 14 und auf 35% am Tag 21 anstieg (Abb. 11).

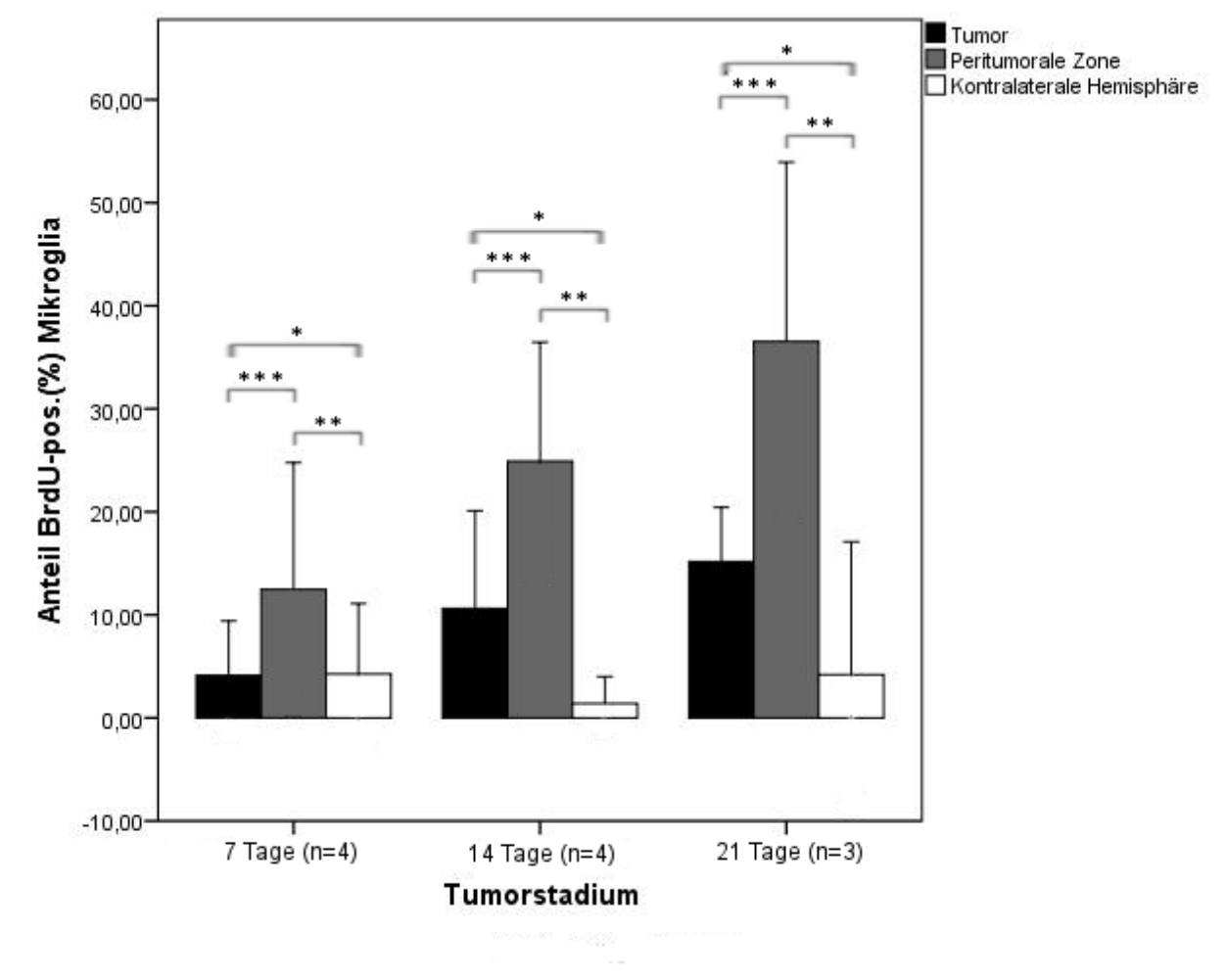


Abb. 11. Anteil der BrdU-positiven Mikrogliazellen. Der Anteil ist im Tumor (*, $p=0,007$) und insbesondere peritumoral (**, $p<0,01$) signifikant höher als in der tumorfreien Hemisphäre. Peritumoral signifikant mehr BrdU-positive Mikroglia als im Tumor (***, $p=0,005$). Der Wert nimmt im zeitlichen Verlauf peritumoral signifikant zu ($p=0,03$), im Tumor ist die Zunahme nicht signifikant ($p=0,06$).

Insbesondere die peritumoral, aber auch die intratumoral gelegenen Iba-1-positiven Zellen scheinen einen nicht geringen Anteil ihrer starken Anhäufung einer proliferativen Aktivität zu verdanken. Ob dies allein durch Proliferation residenter Mikroglia geschieht oder auch durch Nachschub von Zellen aus dem Knochenmark oder von peripheren Makrophagen, die vor oder nach ihrer Einwanderung proliferieren, kann mit der hier verwendeten Methode jedoch nicht geklärt werden. Sowohl Mikroglia als auch Makrophagen zeichnen sich durch die Expression der gleichen Oberflächenmoleküle aus [36].

3.4. Erscheinungsbild und Dichte der Blutgefäße im Tumorbereich

Die nebeneinander durchgeführte Immunfluoreszenzfärbung der zwei Antigene Iba-1 und CD31, welches auch PECAM genannt und zur selektiven Darstellung von Gefäßendothelien geeignet ist [37], sollte einen Einblick in die Ausstattung der experimentellen Gliome mit Blutgefäßen gewähren sowie in die Interaktion zwischen den Gefäßen und den Mikrogliazellen im Tumor und dessen Umgebung. Es wurde zum Vergleich wiederum die linke Hemisphäre herangezogen.

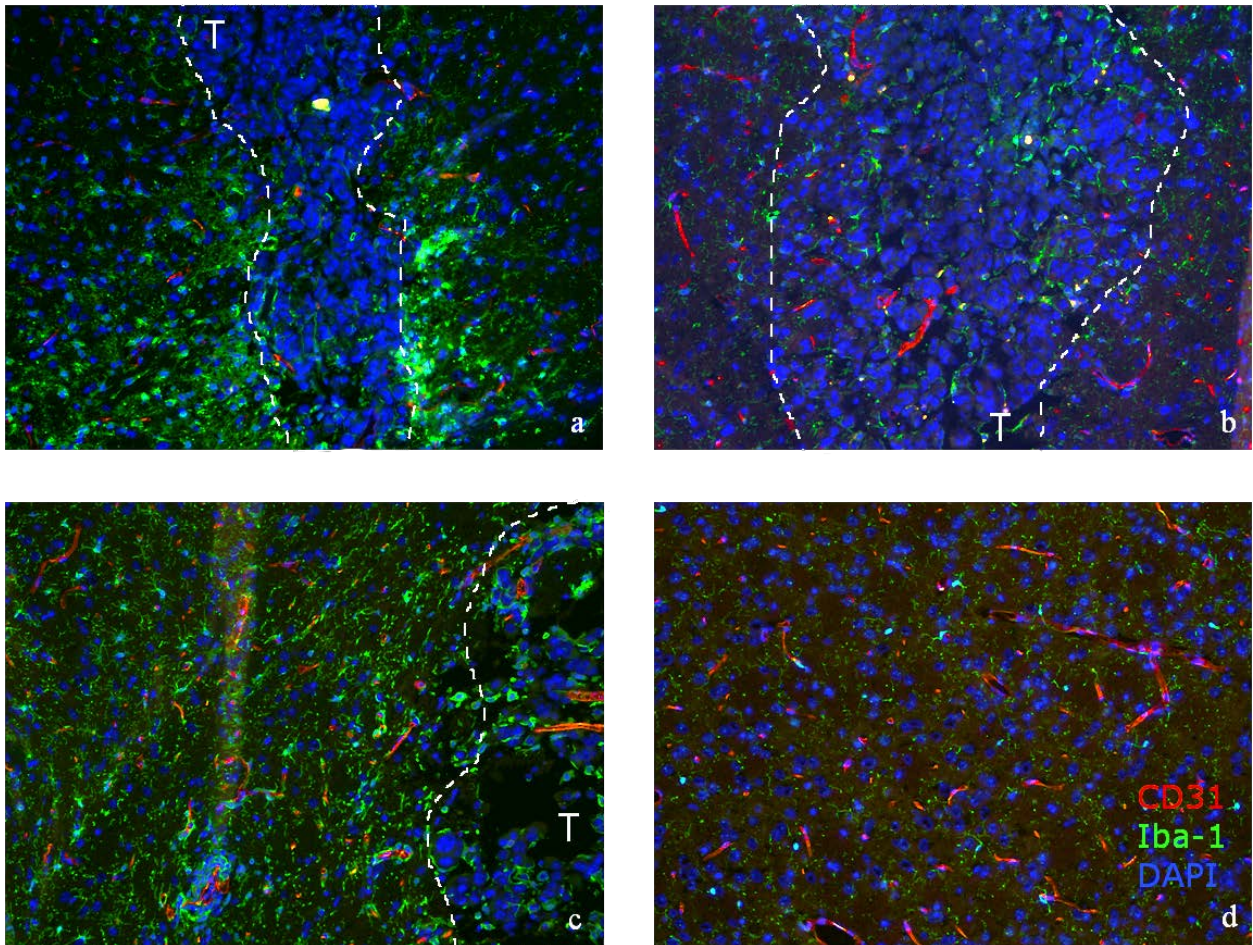


Abb. 12. Darstellung der Blutgefäße. Iba-1 (FITC, grün), CD31 (Cy3, rot), Zellkernen (DAPI, blau), Tumor (T). Immunfluoreszenz, 20x-Vergrößerung. Tag 7 (a); Tag 14 (b); Tag 21 (c); kontralaterale Hemisphäre (d). In den Tumoren sind großlumige Gefäße mit oft unregelmäßiger Gestalt zu sehen. Ihre Größe nimmt im Verlauf der Erkrankung zu. Einige Gefäße, insbesondere peritumoral im Stadium 21 Tage, sind eng von mehreren Mikroglia umschlossen. In der kontralateralen Hemisphäre sind kleine, regelmäßig verteilte Gefäßanschnitte zu erkennen, die keine Kolokalisation mit Mikrogliazellen aufweisen.

3.4.1. Gefäßdichte im Tumorareal

In Abb. 12 aufgeführte Aufnahmen lassen das Muster erkennen, dem alle untersuchten Tiere folgen: die Gestalt der Gefäße im Tumor war deutlich verschieden. Die intratumoralen Gefäße waren in der Regel deutlich großlumiger, hatten oft ein unregelmäßiges Profil im Querschnitt und bildeten, wie aus den gelegentlich dicht nebeneinander auftretenden mehrfachen Gefäßanschnitten zu vermuten war, oft Knäuel. Die Gefäße in der Tumorumgebung unterschieden sich weniger von denen in der tumorfreien Hemisphäre, diese waren nicht so groß

wie die Tumorgefäße, ihre Gestalt war regelmäßiger. In der tumorfreien linken Hemisphäre ergab sich das Bild sehr dicht und regelmäßig verteilter kleiner Blutgefäße.

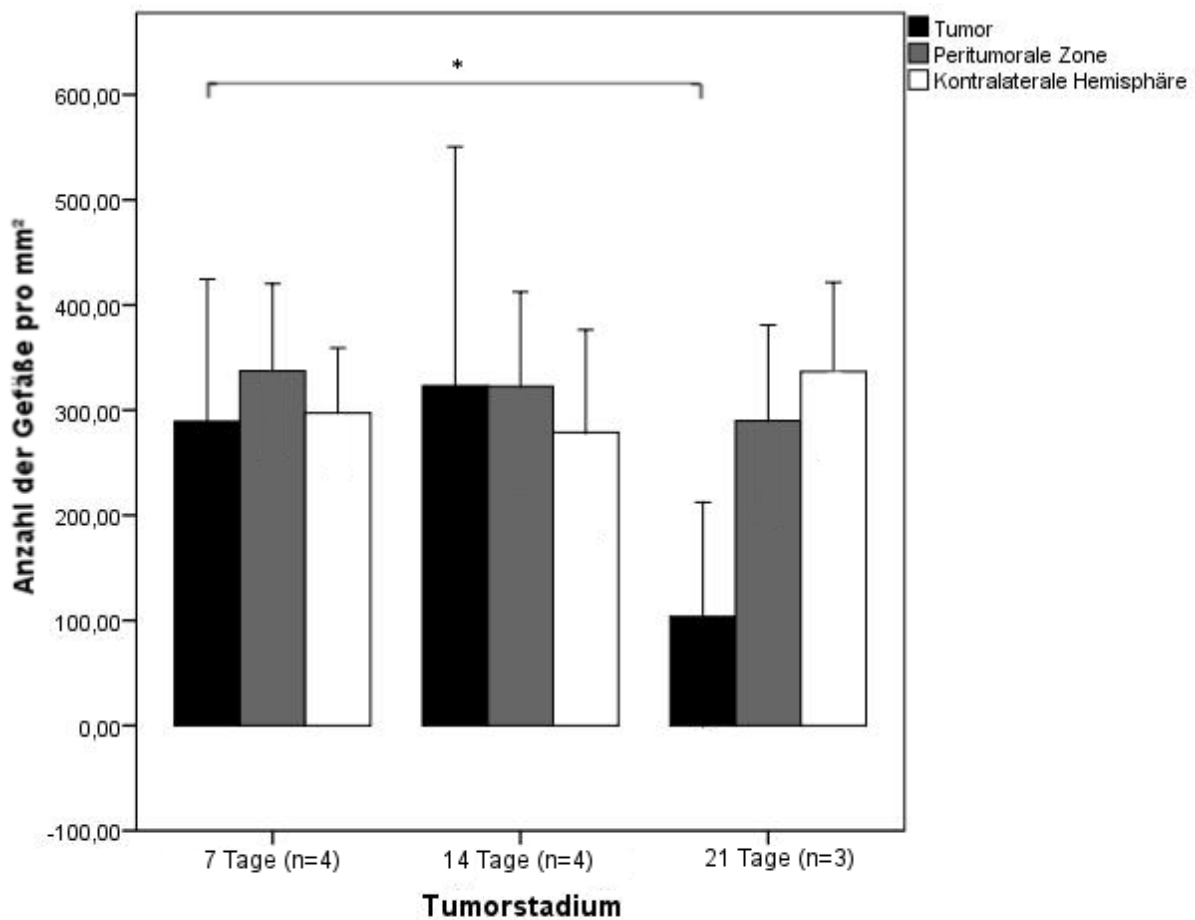


Abb. 13. Blutgefäßdichte pro mm². Keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumor, peritumoralem Gebiet und kontralateraler Hemisphäre. Lediglich intratumoral im Stadium 21 Tage ergab sich eine geringere Gefäßdichte, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war (*, p=0,49).

Die genaue Analyse ergab, dass zu keinem Zeitpunkt eine erhöhte Gefäßdichte im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre erreicht wurde (Abb. 13). Auffällig ist, dass im Stadium von 21 Tagen die Dichte sogar geringer war, als in den anderen Stadien sowie peritumoral und in der kontralateralen Hemisphäre. Der Tumor scheint also wachsen zu können, ohne auf eine steigende Anzahl von Blutgefäßen angewiesen zu sein. Eventuell gleicht er die gleichbleibende bzw. sinkende Gefäßdichte durch die Größenzunahme der Gefäße aus. Eine mögliche Aufgabe künftiger Untersuchungen wäre die Durchmesserbestimmung der Gefäße im experimentellen Gliom, um die tatsächliche Vaskularisierung genauer darzustellen.

3.4.2. Assoziation von Mikrogliazellen mit Tumorblutgefäßen

Eine weitere Beobachtung, die sich in Abb. 12 machen lässt, ist, dass es im Tumor und insbesondere in dessen Umgebung oft Blutgefäße gibt, die entweder komplett von Mikroglia und deren Fortsätzen umhüllt werden, oder im engen räumlichen Kontakt mit zwei oder mehr Mikrogliazellkörpern stehen. Wie aus Abb. 14 zu entnehmen ist, blieb der Anteil solcher Gefäße in der linken Hemisphäre über alle Tumorstadien konstant unter 1%. Derselbe Anteil war im Tumor und dessen Umgebung im Vergleich dazu durchweg signifikant höher. Er betrug im Tumor am Tag 7 ca. 15% und stieg über 23% am Tag 14 bis auf 31% am Tag 21 an. Der Anteil mikrogliaassoziierter Gefäße im peritumoralen Gebiet betrug am Tag 7 7%, am Tag 14 17% und am Tag 21 23%. Die Unterschiede zwischen dem Tumor und dessen Umgebung sowie die Unterschiede zwischen den verschiedenen Stadien in jeder Region erreichten keine statistische Signifikanz (Abb. 14).

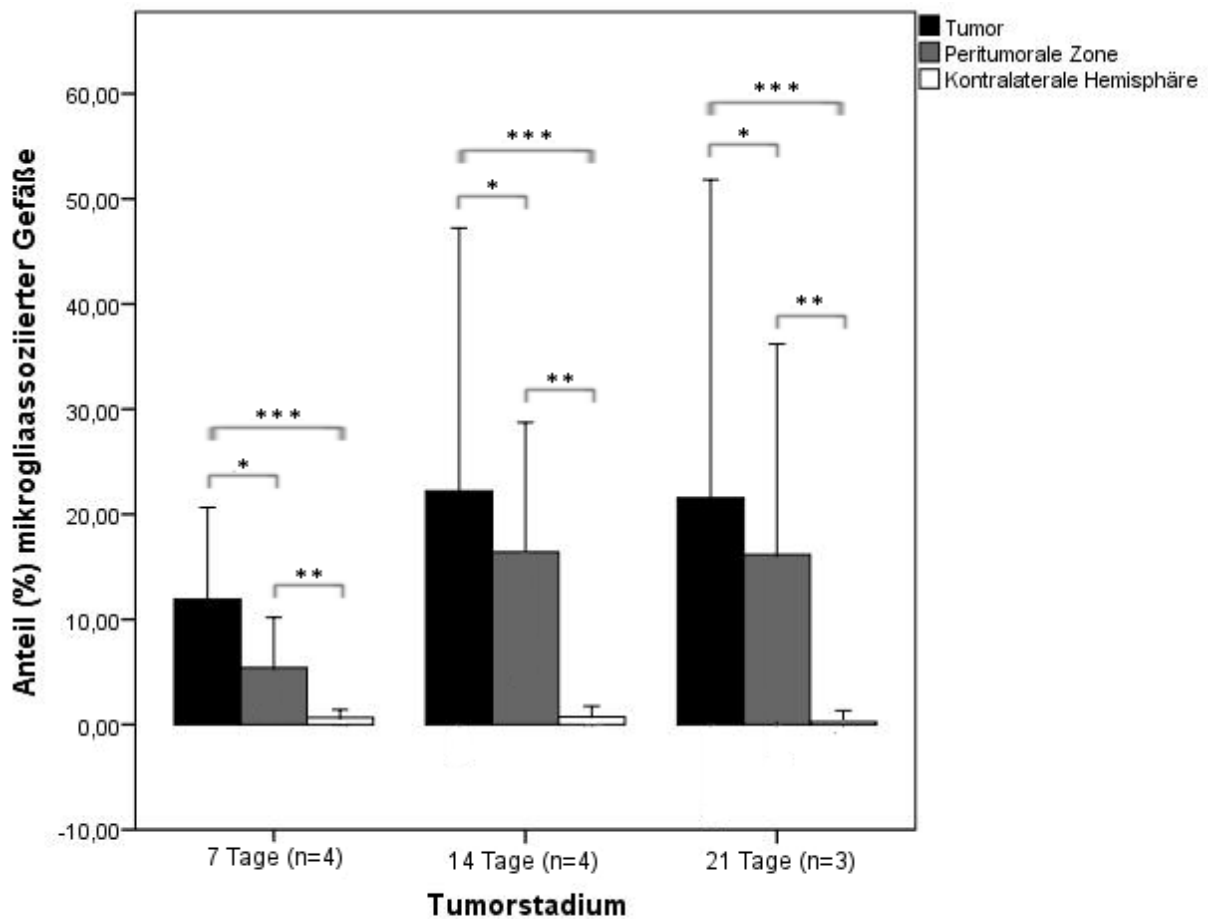


Abb. 14. Anteil der mit Mikroglia assoziierten Gefäße. Am häufigsten sind die Tumorgefäße mit Mikroglia kolokalisiert, bei den peritumoralen Gefäßen ist das etwas weniger häufig der Fall (*, nicht signifikant, $p=0,33$). In beiden Regionen steigt der Anteil im Verlauf tendenziell an. Kontralateral ist der Anteil signifikant geringer als peritumoral (**, $p<0,01$) und im Vergleich zum Tumor (***, $p<0,01$) und ändert sich im Verlauf nicht.

Es fand sich sowohl intra- als auch peritumoral sehr häufig eine Kolokalisation von Gefäßen und Mikroglia, die im gesunden Hirngewebe so nicht vorkommt. Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen ist es denkbar, dass die Iba-1-positiven Zellen Monozyten darstellen, die dabei sind, aus den Gefäßen auszuwandern. Denkbar ist auch, dass die Mikroglia allein wegen ihrer großen Dichtezunahme häufiger in Kontakt mit immer größer werdenden Gefäßen kommen. Nicht zuletzt könnte der Befund die Hypothese stützen, dass die Mikroglia auch funktionell mit den Gefäßen verbunden sind und an ihrer Genese teilnehmen.

4.DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde eine stereotaktische Implantation von GL261-Tumorzellen ins Gehirn von Mäusen des Stammes C57BL/6 vorgenommen. Die Tiere wurden getötet, die Gehirne aufgearbeitet und am Gefriermikrotom geschnitten. Die histologischen Schnitte wurden mittels H.E. und Immunfluoreszenz gefärbt und untersucht.

Untersucht wurden die Zahl, Dichte und Verteilung der Mikrogliazellen in den auf diese Art und Weise erzeugten experimentellen Gliomen. Die Expression verschiedener Oberflächenmarker durch diese Zellen wurde ebenfalls ermittelt. Die Gestalt, Verteilung und Dichte der Blutgefäße wurden bestimmt sowie das Lageverhältnis zwischen Gefäßen und Mikrogliazellen im Tumor. Zum Vergleich diente dabei stets die vom Tumor nicht betroffene linke Hemisphäre.

Ziel der Arbeit war es, die im Gliom akkumulierenden Mikrogliazellen genauer zu charakterisieren. Zur Quantifizierung der beobachteten Akkumulation wurde die Mikrogliazelldichte im Tumor, in dessen unmittelbarer Umgebung sowie in der nicht betroffenen kontralateralen Hemisphäre bestimmt. Des Weiteren wurde analysiert, ob Mikroglia im Tumorgewebe proliferieren. Um auf die Frage einer möglichen Beteiligung der Mikroglia am Prozess der Angiogenese einzugehen, wurde der Anteil mikrogliaassoziierter Gefäße im Tumor, im peritumoralen Gebiet sowie auf der Gegenseite bestimmt. Die Ergebnisse sollten zum besseren Verständnis der Rolle der Mikrogliazellen in der Gliompathologie und insbesondere bei der Gliomangiogenese beitragen.

4.1. Die intrakranielle GL261-Implantation: Vor- und Nachteile der Methode

Das GL261-Mausmodell wird als Standard in der experimentellen Gliomforschung betrachtet [38]. Als *in vivo* Methode hat es eindeutige Vorteile gegenüber anderen experimentellen Ansätzen wie etwa Zellkultur, indem es die Interaktion der Tumorzellen mit

dem Gewebsumilieu des Gehirns ermöglicht, welches bisher nicht unter experimentellen Bedingungen nachgebaut werden konnte. Außerdem erlaubt es die Erzeugung vieler Tumore zur gleichen Zeit und in syngenen Tieren, was eine gute Vergleichbarkeit erlaubt. Im Gegensatz dazu sind Gewebeproben von Patienten eher variabel, da sich die Patienten naturgemäß in Alter, Tumorart und –ausbreitung, genetische Ausstattung sowie Begleiterkrankungen unterscheiden. Die experimentell erzeugten Gliome der Maus haben allerdings den wesentlichen Nachteil, dass sie im Gegensatz zum natürlich vorkommenden Gliom nicht invasiv, sondern vor allem verdrängend wachsen [23]. Außerdem erfordert die Methode die invasive Injektion von Tumorzellen ins Gehirn, was an sich schon eine Verletzung der Homöostase und somit ein Stimulus für das örtliche Immunsystem darstellt. Somit ist das GL261-Modell ein gutes Werkzeug für die Erforschung des Glioms, jedoch sind seiner Vergleichbarkeit mit humanen Tumoren auch Grenzen gesetzt.

4.2. Akkumulation von Iba-1-positiven Zellen im experimentellen Gliom

In den induzierten experimentellen Gliomen wurden zahlreiche Iba-1-positive Zellen nachgewiesen. Dies entspricht den Beobachtungen zahlreicher Forscher [17,19]. Die Iba-1-positiven Zellen werden in dieser Arbeit als Mikroglia bezeichnet, obwohl diese zum Teil auch als Hirnmakrophagen bezeichnet werden [20]. Andere Autoren dagegen sehen in Mikroglia und Makrophagen zwei unterschiedliche Zellarten [21, 25], dabei wird die Bezeichnung „Makrophagen“ von manchen für die aktivierten Mikroglia verwendet [21, 28]. Es gibt allerdings keinen Beweis, dass es überhaupt möglich ist, beide Zellarten zu unterscheiden, da sie die gleichen Marker exprimieren [25]. Manche bezeichnen die hirneigenen Abwehrzellen als Mikroglia und die eingewanderten Blutzellen als Makrophagen [39]. Andererseits wird eine Einwanderung solcher Zellen ins Zentralnervensystem generell in Frage gestellt [22]. Es gibt insgesamt also einige Unklarheiten hinsichtlich der Identität und der Herkunft der Iba-1-positiven Zellen im Gliom, was sich in der uneinheitlichen Namensgebung widerspiegelt.

In Übersichtsvergrößerungen der Tumorschnitte waren im Einkanalbild relativ scharfe Areale abgrenzbar, die von Tumorzellen bzw. Mikrogliazellen in hoher Dichte eingenommen wurden. Diese Flächen wurden unabhängig voneinander mittels ImageJ bestimmt und ins Verhältnis gesetzt. Es ergab sich über den gesamten Zeitraum keine signifikante Veränderung

dieses Verhältnisses, die Tendenz war aber eher ein leichtes Absinken in den späteren Tumorstadien. Es fehlen vergleichbare Untersuchungen von anderen Autoren, da die meisten Autoren eher mit Mikrogliazahlen als mit Flächen arbeiten [23, 40]. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wäre, dass der peritumorale Bereich mit hoher Mikroglia-dichte im Laufe des Versuchs relativ gleich breit bleibt. Das heißt, der Tumor kann trotz seiner Größenzunahme nur auf begrenzter Entfernung auf das umliegende Gewebe einwirken, welches sich dann u.a. durch Mikrogliaakkumulation reaktiv verändert. Die Fläche dieses Saums aus verändertem Gewebe wächst dann zwar mit, der in seinem Inneren wachsende Tumor erhöht aber seinen Durchmesser viel schneller und verschiebt damit das Flächenverhältnis zu seinen Gunsten.

Die Dichte der Mikrogliazellen war im Tumor und in dessen unmittelbarer Umgebung signifikant höher als in der tumorfreien Hemisphäre. Dieser Befund erstreckte sich über alle Tumorstadien. Die Dichte im Tumor war am größten, wobei der Unterschied gegenüber dem peritumoralen Gebiet nicht signifikant war. Ein wesentlicher Unterschied, der sich im Vergleich zu den meisten Vorarbeiten ergab, war, dass in der vorliegenden Arbeit die Dichte der Mikroglia am Tumorrand nicht höher war als im Inneren des Tumors. Denkbar sind einige Faktoren, die diesen Unterschied erklären könnten. Zum einen ist der in der Arbeit erfasste Bereich des Tumorrands streng genommen außerhalb des eigentlichen Tumors gelegen, deswegen wird dieser in der Arbeit stattdessen als „peritumorales Gebiet“ bezeichnet. Zum anderen ist das Wachstumsverhalten des experimentellen Glioms wie oben beschrieben anders als beim natürlichen Gliom nicht invasiv, sondern vor allem verdrängend. Das ergibt möglicherweise einen qualitativ anderen Einfluss des experimentellen GL261-Glioms auf das umliegende Gewebe, welches dann eher auf den Wachstumsdruck als auf die viel geringere Tumorzellinvasion reagiert. Auch andere Autoren finden im Vergleich zwischen Tumorkern, Tumorrand und peritumoraler Zone die höchste Dichte von Mikroglia am Rand des Glioms [23].

Tendenziell stieg die Dichte sowohl im Tumor als auch peritumoral im zeitlichen Verlauf der Gliomerkrankung, wobei dieser Anstieg keine Signifikanz erreichte. Eine andere Arbeit fand dagegen im zeitlichen Verlauf des experimentellen murinen Glioms eine signifikante Zunahme der Mikroglia-dichte [41]. Möglicherweise ist die geringe Zahl der Versuchstiere in der vorliegenden Arbeit einer der Gründe, warum die Unterschiede der Dichte im zeitlichen Verlauf keine Signifikanz erreichten. Die steigende Dichte im Verlauf spricht für eine immer weiter voranschreitende Infiltration des Glioms mit Mikroglia. Auch die unmittelbare Umgebung scheint mit fortschreitendem Wachstum des Glioms immer stärker von Mikroglia infiltriert zu werden. Eine solche Dichtezunahme stützt die Hypothese einer Beteiligung der Mikroglia an

Prozessen, die wichtig sind für das Gliomwachstum, wie etwa Invasion und Angiogenese, auch wenn sie keineswegs für eine solche Beteiligung beweisend ist.

4.3. Phänotyp der Mikroglia im experimentellen Gliom und in dessen Umgebung

Es ist bekannt, dass Mikroglia in verschiedenen funktionellen Zuständen angetroffen werden können. Im gesunden Zentralnervensystem befassen sich diese Zellen mit ständiger Prüfung des Hirngewebes auf Störungen der Homöostase oder der strukturellen Integrität. Dafür setzen sie ihre zahlreichen beweglichen Fortsätze ein. Bei Störung der Struktur oder des funktionellen Gleichgewichts des Hirngewebes können die Mikroglia in einen anderen Zustand übergehen, den der aktivierten Mikroglia. In diesem Zustand nehmen die Zellen eine abgerundete, amöboide Zellform ein und werden zu Bewegung, Phagozytose sowie Interaktionen mit anderen Immunzellen fähig [15]. Aktivierte Mikroglia sind bei praktisch allen pathologischen Prozessen im Zentralnervensystem anzutreffen, darunter auch im malignen Gliom [22].

Es gibt andererseits wenig gesicherte Erkenntnisse über die Expression verschiedener Moleküle durch die Mikroglia in ihren verschiedenen Aktivitätszuständen. Diese Erkenntnisse stammen aus Versuchen mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen, u.a. Denervierung [28], es fehlen allerdings Daten zum malignen Gliom. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich die Mikroglia im Tumor, in der Tumorumgebung und in der tumorfreien Hemisphäre hinsichtlich der Expression von Aktivitätsmarkern unterscheiden. Ausgewählt wurden die Moleküle MHCI und MHCII, CD68 sowie CD11b, zu denen Daten aus Voruntersuchungen vorliegen, dass sie eine Unterscheidung zwischen aktivierten und ruhenden Mikroglia erlauben [28, 33, 35, 40,42].

MHCI ist als wichtiges Molekül für die Immunabwehr des Organismus bekannt. Es kommt auf der Membran aller kernhaltigen Zellen des Körpers vor und beteiligt sich an der Präsentation von Molekülen, die die Zelle synthetisiert. Es wird berichtet, dass Mikrogliazellen im aktivierten Zustand eine stärkere Expression dieses Moleküls gegenüber ruhenden Mikrogliazellen aufweisen. Die Daten stammen aus einem Versuch mit Axotomie des N. facialis bei Ratten [42].

In unseren Versuchen wurde MHCI vor allem durch die Gliomzellen exprimiert. Ähnliches wurde von Maes et al [38] berichtet. Das Signal der Mikroglia war durchweg sehr schwach. Insbesondere ließ sich kein Unterschied der Expression dieses Oberflächenmoleküls zwischen intra- und peritumoralen Mikroglia sowie Mikroglia der nicht betroffenen Hemisphäre beobachten.

MHCII wird vor allem von antigenpräsentierenden Zellen wie etwa Makrophagen, Lymphozyten oder dendritischen Zellen exprimiert. Seine Rolle besteht in der Interaktion mit CD4-positiven T-Lymphozyten bei der Präsentation fremder Antigene. Auch Mikrogliazellen exprimieren das Molekül als antigenpräsentierende Zellen des Zentralnervensystems. In Versuchen mit experimentellen Gliomen [40] und Fazialisaxotomie [42] wurde gezeigt, dass die Expression des MHCII nach Aktivierung der Mikroglia zunimmt. In den vorliegenden GL261-Implantationsversuchen wurde beobachtet, dass einige, aber nicht alle Mikrogliazellen positiv auf das MHCII-Antigen reagieren, vor allem die intra- und peritumoralen Mikroglia. Die Zahl der MHCII-positiven Mikroglia nahm in den späteren Tumorstadien leicht zu.

CD68 kommt auf den Membranen von Zellen monozytärer Herkunft vor, vor allem in Verbindung mit deren Phago- und Lysosomen [31]. In der Literatur gibt es Hinweise, dass das Molekül von sämtlichen Mikroglia exprimiert wird [32]. Andere Autoren sind hingegen der Meinung, dass die Expression in aktivierten Mikroglia stärker ist [33]. In allen Stadien der in der vorliegenden Arbeit induzierten Gliome fand sich ein ähnliches Muster: die Mikrogliazellen sowohl in den Gliomen als auch außerhalb exprimierten CD68. Die Expression der Tumormikroglia war allenfalls leicht intensiver.

CD11b, auch bekannt als Integrin Alpha M und Komplementrezeptor 3 (CR3) ist ein Molekül, welches auf diversen Zellen des Immunsystems vorkommt und an zahlreichen Prozessen wie etwa Migration von Leukozyten, Phagozytose, zellvermittelter Zytotoxizität und Komplementreaktion beteiligt ist [34]. Auch zu CD11b gibt es unterschiedliche Angaben in der Literatur, in der es einerseits als Marker aller Mikrogliazellen [13] und andererseits als Marker eines Zustands höherer Aktivität dieser Zellen [35, 40] beschrieben wird. In unseren Versuchen zeigten fast alle Iba-1-positiven Zellen auch ein positives Signal für CD11b, es gab sehr wenige Ausnahmen. Bei den Tumormikroglia schien die Expressionsintensität etwas höher zu sein als in der kontralateralen Hemisphäre. Dieser Befund zeigte sich in allen untersuchten Tumorstadien. Da aber die Immunfluoreszenz eine genaue Quantifizierung der Expressionsstärke nicht erlaubt, kann CD11b nicht als Aktivierungsmarker angesehen werden.

Insgesamt konnte sich in der vorliegenden Arbeit keines der untersuchten vier Moleküle als zuverlässiger Marker aktivierter Mikroglia bewähren. MHCI wurde insgesamt bei sehr wenigen Mikroglia nachgewiesen und seine Verwendung erscheint deswegen wenig sinnvoll. CD68 und CD11b wurden von fast allen Mikroglia exprimiert, und zwar unabhängig von der untersuchten Region und dem Tumorstadium. Das - subjektiv wahrgenommen - stärkere Signal von CD68 und CD11b bei den Tumormikroglia kann mit den Methoden der Immunfluoreszenz nicht objektiviert werden, da diese eine so genaue quantitative Aussage der Expressionsstärke nicht zulässt. Zwar zeigt sich bei MHCII eine tendenziell stärkere und häufigere Expression durch die Tumormikroglia, aber auch hier ist eine Quantifizierung dieses Unterschieds nicht möglich. Zusammenfassend kann man sagen, dass es bisher weder in der aktuellen Arbeit, noch in Vorarbeiten gelungen ist, aktivierte von ruhenden Mikroglia im Gliom anhand der Expression von Oberflächenmarkern immunhistochemisch zu unterscheiden. Die mikroskopische Unterscheidung geschieht bisher vor allem nach morphologischen Kriterien, wie etwa der relative Anteil von Mikrogliazellkörpern und -fortsätzen am Gewebe [36]. Es ist fraglich, ob die Immunhistologie bzw. Immunfluoreszenz eine geeignete Methode ist, um ohne Unterstützung durch andere Verfahren diese zwei Zustände der Mikroglia zu unterscheiden.

4.4. Nachweis proliferierender Mikroglia mittels BrdU

Bromodesoxyuridin (BrdU) ist ein Nukleotidanalogen, welches während der DNA-Replikation in das neu entstehende DNA-Molekül eingebaut wird, ohne die DNA-Kettenverlängerung oder die Basenpaarung zu stören. Im histologischen Präparat kann das Molekül mittels eines monoklonalen Antikörpers nachgewiesen werden, um proliferierende Zellen zu identifizieren [43]. Während der gesamten Zeit des Tumorstadiums wurde den Versuchstieren täglich BrdU verabreicht mit der Absicht, das Proliferationsverhalten der Mikrogliazellen im experimentellen Gliom zu untersuchen.

In allen Stadien der experimentellen Gliomerkrankung wurden proliferierende Mikroglia nachgewiesen. Ihr Anteil stieg dabei kontinuierlich an, sowohl im Tumor als auch peritumoral. Insbesondere in der unmittelbaren Tumorumgebung war der BrdU-positive Anteil an den Mikrogliazellen am größten. Dies lässt vermuten, dass der starke Anstieg der Mikroglia-dichte in diesem Bereich zu einem beachtlichen Anteil auf Proliferation beruht. In der tumorfreien linken

Hemisphäre dagegen wurden sehr wenige BrdU-positive Mikroglia nachgewiesen, und der Anteil war zu allen Zeitpunkten signifikant geringer als in den beiden anderen untersuchten Regionen.

Der BrdU-Versuch wurde unternommen, um zur Klärung der Frage der Herkunft von Tumormikroglia beizutragen. Es ist bis heute nicht geklärt, ob die Zellen ihre Zahl allein durch Vermehrung der ortsständigen Mikroglia oder auch durch Einwanderung von Blutmonozyten erhöhen. Ein Fehlen von Proliferation wäre ein sehr starker Hinweis gewesen, dass der – auch von anderen Autoren [41] – beobachtete Anstieg der Mikroglia-dichte im Verlauf der Gliomerkrankung überwiegend auf Einwanderung beruhen muss. Der Nachweis zahlreicher proliferierender Mikroglia dagegen ist kein Beweis, dass die höhere Dichte nur auf Proliferation beruht, ist aber als Hinweis zu werten, dass die Proliferation dabei eine wesentliche Rolle spielt.

4.5. Die Gefäße im experimentellen Gliom: Beschaffenheit, Dichte, Interaktion mit Mikrogliazellen

4.5.1. Gefäßmorphologie und -dichte

Ein bekanntes Charakteristikum des malignen Glioms und insbesondere des Glioblastoma multiforme (GBM) ist der Reichtum an Blutgefäßen [6]. Obwohl der Tumor sehr gut mit solchen bestückt ist, verfügt er nicht über eine gute Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, denn die Gefäße sind trotz ihrer hohen Dichte dysfunktional. Sie sind unter anderem oftmals nicht perfundiert oder undicht, sie haben unregelmäßige Formen und bilden Knäuel [9].

Morphologisch fanden sich in den Gefäßen der in dieser Arbeit induzierten Gliome diese bekannten Eigenschaften wieder. Das sehr regelmäßige Muster kleiner Gefäße, welches das gesunde murine Hirngewebe charakterisiert, war in der Tumorumgebung noch erhalten. Im Tumorrinneren dagegen herrschten unregelmäßig verteilte, sehr großlumige Gefäße vor, die teilweise zur Knäuelbildung neigten.

Die bestimmte Dichte der Gefäße im Tumor, in der peritumoralen Region und in der tumorfreien Hemisphäre ist in Abb. 13 wiedergegeben. Es ergaben sich dabei keine wesentlichen zahlenmäßigen Unterschiede weder zwischen den untersuchten Bereichen noch innerhalb eines

Bereichs im Laufe der Zeit – mit der Ausnahme der Tumoren des Stadiums 21 Tage. Dort gab es tendenziell weniger Gefäße, allerdings war der Unterschied nicht signifikant.

Auch andere Autoren, die das GL261-Modell einsetzen, berichten über eine nur geringe Vaskularisation des experimentell erzeugten Glioms [38].

Es gibt mehrere Faktoren, die diesen Befund erklären könnten. Zum einen findet in der letzten Woche der Tumorentwicklung (Tag 14 – Tag 21) eine extreme Größenzunahme des experimentellen Glioms statt. Es ist möglich, dass die Tumorangiogenese mit dieser Wachstumsexpansion nicht Schritt hält und das Verhältnis Gefäßzahl zu Tumorfläche deswegen abnimmt. Eine andere Beobachtung, die die scheinbare Dichtenabnahme der Gefäße erklären könnte, ist die subjektive Zunahme der durchschnittlichen Lumenweite der Gefäße bei den Tieren, die nach 21 Tagen getötet wurden. Auch andere Arbeiten beschreiben eine Zunahme der Größe und parallel dazu eine Abnahme der Dichte der Gefäße im zeitlichen Verlauf beim experimentellen Gliom [44], was als Zeichen einer Reifung der Gefäße in den späteren Stadien der Angiogenese gedeutet wird. Die Bestimmung der durchschnittlichen Gefäßweite wäre somit eine Aufgabe für eventuell folgende Arbeiten.

4.5.2. Mikroglia in Kontakt mit Tumorblutgefäßen

Eine wesentliche Frage, die durch die vorliegende Arbeit angegangen werden sollte, war, ob die beobachtete starke Ansammlung von Mikroglia im Gliom mit der Angiogenese im Zusammenhang stehen könnte. Dafür wurde bei der mikroskopischen Betrachtung des untersuchten Gewebes die Beobachtung gemacht, dass im und um den Tumor zahlreiche Gefäße entweder von Mikroglia umschlossen werden oder mit zahlreichen Mikroglia in engem Kontakt stehen. Im tumorfreien Gewebe der linken Hemisphäre dagegen kam das kaum vor. Um die Beobachtung genauer zu quantifizieren, wurde der Anteil mikrogliaassoziierter Gefäße bestimmt. Als mikrogliaassoziiert wurden Gefäße betrachtet, die entweder komplett von einer oder mehreren Mikroglia umschlossen wurden, oder mit mindestens zwei Mikrogliazellkörpern in direktem Kontakt standen (Abb. 14).

Ein wesentlicher Anteil der Blutgefäße im Tumor und im peritumoralen Gewebe ist demnach eng mit Mikroglia assoziiert. Der Anteil solcher Gefäße in der tumorfreien Hemisphäre dagegen ist sehr gering. Dort gibt es oft Kontakt zwischen einem Blutgefäß und einem oder mehreren Mikrogliafortsätzen – eine bekannte Eigenschaft der Mikrogliazellen, die auch bei

Abwesenheit von Krankheit den perivaskulären Raum des Zentralnervensystems eng überwachen[45].

Andere Autoren berichten über Kolokalisation von verzweigten Mikroglia mit Gefäßen und von amöboiden Mikroglia mit Gefäßproliferaten im experimentellen Gliom [36], allerdings wird die Zahl solcher Gefäße bzw. Gefäßproliferate nicht angegeben.

Der Umstand, dass im Tumor und im peritumoralen Gewebe so viele Gefäße in Kontakt mit den Mikrogliazellkörpern stehen, hat mehrere mögliche Ursachen. Zum einen ist es möglich, dass dieser Kontakt rein aus Platzgründen stattfindet, da es mit zunehmendem Tumorwachstum einerseits größere Gefäße, andererseits mehr Mikrogliazellen im Tumor gibt, womit auch eine Nachbarschaft dieser Strukturen wahrscheinlicher wird. Dies erscheint allerdings wenig plausibel, wenn man die doch sehr geordneten Strukturen betrachtet, die Mikroglia und Gefäße zusammen bilden (Abb. 12c), außerdem gibt es die meisten mikrogliaassoziierten Gefäße in der peritumoralen Region, in der die Mikroglia-dichte geringer ist als im Tumor. Es könnte sich bei den Iba-1-positiven Zellen um in Auswanderung begriffene Blutmonozyten handeln. Die charakteristische Form der Zellen allerdings lässt vermuten, dass es sich bei den Zellen doch um Mikroglia handelt. Oft sind Gefäße, die aus schon bestehenden Gefäßen aussprossen, von Mikroglia umgeben (Abb. 12). Das ist ein Grund zu vermuten, dass die beobachtete enge Assoziation zwischen Mikroglia und Gefäßen eventuell mit der stattfindenden Angiogenese zu tun haben könnte. Ein Beweis für eine Beteiligung der Mikroglia an diesem Prozess ist das allerdings noch nicht. Vielmehr müssen die Wechselbeziehungen zwischen Mikroglia und Gefäßen genauer erforscht werden. Unter anderem ist die Produktion von angiogenesefördernden Mediatoren durch Mikroglia und die Reaktion der Endothelzellen auf solche Mediatoren interessant.

4.6. Diskussion der Erkenntnisse im Kontext der aktuellen Forschungsergebnisse

Die vorliegende Arbeit sollte zur Klärung der Bedeutung von Mikroglia für die Pathogenese des malignen Glioms und insbesondere für die Gliomangiogenese beitragen. Die

Untersuchungen sollten an bisherige Erkenntnisse anknüpfen und als Grundlage für weitere Experimente auf dem Gebiet dienen.

Die ausgedehnte Infiltration von malignen Gliomen mit Mikrogliazellen ist zwar schon länger bekannt [17], aber erst in den letzten Jahren sind Anstrengungen unternommen worden, um die genaue Rolle dieser Zellen im Tumor abzuklären. Da die Mikroglia vor allem als Zellen der Immunabwehr bekannt sind, konzentrieren sich viele der Untersuchungen auf ihren Immunphänotyp im Gliom. [19,20,21,25,46]. In der vorliegenden Arbeit standen die Immuneigenschaften der Mikroglia nicht im Vordergrund. Es wurde lediglich die Ausstattung mit Molekülen wie MHCI und MHCII sowie CD68 und CD11b untersucht. Dabei wurde insbesondere MHCII als wesentliches Molekül der Antigenpräsentation bei einigen Mikroglia gefunden, was den von anderen Autoren postulierten reduzierten Immuneigenschaften der Gliommikroglia widerspricht. Die Ursachen dieser Diskrepanz wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Wenn eine Einwanderung von peripheren Immunzellen zum Gliom angenommen wird, könnten diese Zellen für die MHCII-Expression verantwortlich sein.

Auch die Herkunft der Gliommikroglia war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die meisten Autoren sind der Meinung, dass sowohl hirneigene Mikroglia als auch Monozyten aus dem Blutstrom vom Gliom angezogen werden [20,38,41,47]. In einer Arbeit gelang es sogar, Mikroglia mit Gadolinium zu markieren und Tieren intravenös zu verabreichen, bei denen experimentelle Gliome erzeugt worden waren. Die Zellen wurden dann mittels MRT im Gliom nachgewiesen [48]. Einige Autoren sehen es als unwahrscheinlich an, dass Monozyten durch die intakte Blut-Hirn-Schranke erwachsener Tiere gelangen können [22]. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich mittels BrdU Proliferation der Mikroglia nachgewiesen, was die Rekrutierung von Monozyten weder beweist noch widerlegt. Das verwendete Modell eignet sich nur bedingt, um dieser Frage nachzugehen, u.a. weil es nicht möglich ist, eingewanderte Monozyten von Mikroglia zu unterscheiden aufgrund der gleichen Markerexpression der beiden Zellarten. Auf mögliche Ansätze für das Überwinden dieses Problems wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

Obwohl einerseits der große Stellenwert der Angiogenese für das Gliomwachstum und andererseits die prominente Präsenz der Mikroglia in diesem Tumor gut beschrieben sind, gibt es kaum Arbeiten, die auf einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen beiden Umständen eingehen. Unter anderem wiesen einige Autoren die Fähigkeit von Mikroglia nach, VEGF und andere proangiogene Substanzen zu produzieren [25,26]. In einer anderen Arbeit wurde nach Mikroglia-depletion eine reduzierte Gefäßneubildung im experimentellen Gliom gefunden [18].

Angaben zu genauen Wechselwirkungen zwischen Mikroglia und Gefäßen fehlen dagegen. In der vorliegenden Dissertation wurde versucht, einige Erkenntnisse zu gewinnen, welche die spätere Erforschung dieser Fragestellung erleichtern sollen. Erste Aussagen zum Verhalten von Mikroglia und Gefäßen im GL261-Modell waren dabei ein vorrangiges Ziel. Der zeitliche Verlauf von Mikroglia- und Gefäßdichte intra- und peritumoral sowie in der tumorfreien linken Hemisphäre wurde bestimmt. Die Dichte der Mikroglia intra- und peritumoral stieg im zeitlichen Verlauf kontinuierlich an, die Gefäßdichte blieb weitgehend konstant. Das stützt die Hypothese einer Beteiligung der Mikroglia an der Angiogenese nicht. Ein Befund, der dagegen im Einklang mit dieser Hypothese ist, ist die weite Verbreitung von mit Mikroglia kolokalisierten Gefäßen im Tumor und in dessen Umgebung. Diese enge Nachbarschaft lässt die Hoffnung berechtigt erscheinen, dass es in zukünftigen Untersuchungen gelingen könnte, außer dem örtlichen auch einen funktionellen Zusammenhang zwischen Mikroglia und Gefäßen zu entdecken.

4.7. Ausblick

In den letzten Jahren sind viele neue Erkenntnisse zur Rolle der Mikroglia im malignen Gliom entstanden. Darunter sind einige Hinweise auf eine mögliche Beteiligung dieser Zellen an der Gliomangiogenese [18,25]. Auch im Rahmen der aktuellen Arbeit sind Ergebnisse entstanden, die die Hypothese einer proangiogenen Rolle der Mikroglia stützen. Es handelt sich allerdings noch nicht um feste Beweise für eine solche Beteiligung. Vielmehr muss das Wissen über die Eigenschaften der Tumormikroglia sowie die Wechselwirkungen zwischen Gliom, Mikroglia und Blutgefäßen noch weiter vertieft werden. Daraus könnten sich neue Ansätze zur Gliomtherapie ergeben, etwa auf den Gebieten der Antiangiogenese und der Immuntherapie.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, anhand der Expression von Oberflächenmolekülen den Aktivierungszustand der Mikroglia im experimentellen Gliom zu bestimmen. Dies gelang nicht. Die untersuchten Antigene MHC I und MHC II, CD68 und CD11b erlaubten nicht die Unterscheidung von intra- und peritumoralen Mikroglia im Vergleich zu den Mikroglia im gesunden Gewebe. Eine Möglichkeit, mit anderen Mitteln die Frage des Aktivierungszustandes anzugehen, wäre die morphologische Auswertung der Mikrogliazellen

mit Bestimmung etwa der Zahl der Fortsätze oder des Anteils der Fortsätze und Somata an der Gesamtfläche [36].

Eine weitere Fragestellung, die für künftige Therapiemöglichkeiten von Relevanz sein könnte, ist die Herkunft der Mikroglia im Gliom zu klären und insbesondere eine mögliche Einwanderung peripherer Blutzellen. Es gibt nämlich Ansätze, das Gliom durch Gentransfer, gezielte Toxinbelieferung oder siRNA anzugreifen, indem man einwandernde Blutzellen als Vehikel benutzt [39,48]. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich die Proliferation von Mikroglia beschrieben. Leider sind Mikroglia und eventuell einwandernde Monozyten phänotypisch ähnlich, was deren Unterscheidung erschwert. Ein möglicher Ansatz zur weiteren Abklärung wäre die Gabe von Knochenmark eines – möglicherweise transgenen – anderen Tieres nach Bestrahlung, dessen Zellen leicht nach Einwanderung ins Gehirn von den autologen Mikroglia zu unterscheiden wären [22].

Damit die Interpretierbarkeit des GL261-Modells im Hinblick auf die Angiogenese verbessert werden kann, sind weitere Untersuchungen zum Angiogeneseverhalten dieses Tumors erforderlich. Ein Ansatz dabei wäre die oben erwähnte Bestimmung des durchschnittlichen Gefäßdurchmessers im zeitlichen Verlauf. Sehr viel genauer lässt sich die Angiogenese z.B. durch Intravitalmikroskopie beobachten, bei der der Prozess – etwa durch Anlage eines Schädelfensters - in Echtzeit verfolgt werden kann [49]. Allerdings kann der Tumor dabei nur epikortikal und nicht intrazerebral implantiert werden, was wiederum eine wesentliche Abweichung vom gängigen GL261-Modell wäre.

Um gezielt den Einfluss von Mikroglia auf die Angiogenese zu prüfen, wäre es hilfreich, die Immunzellen selektiv auszuschalten, um anschließend nach Tumorimplantation die neu entstehenden Gefäße hinsichtlich ihrer Zahl und Morphologie zu untersuchen. Ein Modell, mit dem dies möglich erscheint, wäre die transgene CD11b-HSVTK-Maus. Bei diesem Tier exprimieren die Mikroglia die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase, was die Zellen empfindlich auf Virustatika macht. So lässt sich durch gezielte Applikation von Ganciclovir die Mikrogliapopulation signifikant reduzieren [50,51]. So kann anschließend geprüft werden, wie bei einem experimentellen Gliom die Angiogenese verläuft.

Für die Entwicklung gezielter Therapien ist es unerlässlich, das Wissen über die Wechselwirkungen zwischen Gliom, Mikroglia und Endothel auf zellulärer und molekularer Ebene zu vertiefen. Dabei können Mikrogliazellen aus Gliomen isoliert und ihr Expressionsprofil untersucht werden [52]. Sollten dabei proangiogene Mediatoren nachgewiesen

werden, würde das für eine Beteiligung der Immunzellen an der Angiogenese sprechen. Ein weiterer Ansatz wäre eine Kokultur der so isolierten Mikroglia mit Endothelvorstufen, um so frei von Störfaktoren den Einfluss auf das Verhalten des Endothels zu untersuchen [53].

Insgesamt sind auf vielen verschiedenen Ebenen weitere Untersuchungen notwendig, um die komplexen Zusammenhänge zwischen dem malignen Gliom, den diesen Tumor infiltrierenden Mikroglia und der Angiogenese zu verstehen. Wenn diese Voraussetzung erfüllt ist, können auch die verschiedenen Möglichkeiten der Gliomtherapie geprüft werden, die sich aus den neuen Erkenntnissen ergeben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Primäre Hirntumore sind unter den zehn häufigsten Ursachen von krebisbedingten Todesfällen. Das maligne Gliom, insbesondere das Glioblastom, von der WHO als Gliom Grad IV eingestuft, stellt durch schnelles Wachstum, aggressive Infiltration von Hirngewebe und ausgeprägte Angiogenese eine therapeutische Herausforderung dar. Trotz einiger Fortschritte von chirurgischer, radio- sowie chemotherapeutischer Behandlung konnte bisher keine wesentliche Verbesserung der schlechten Prognose dieses Tumors erreicht werden.

Viele Aspekte der Pathophysiologie des malignen Glioms sind bis heute nur zum Teil verstanden. Zwar ist seit Jahrzehnten bekannt, dass der Tumor von zahlreichen Mikrogliazellen durchsetzt ist, aber die Rolle dieser Immunzellen dabei ist unklar. Es gibt unter anderem Hinweise, dass sie mittels Sekretion von Wachstumsfaktoren sowie Abbau von Extrazellulärmatrix der Tumorangiogenese Vorschub leisten könnten. Ein genaueres Verständnis über den Zusammenhang zwischen Mikroglia und Angiogenese im malignen Gliom könnte zu einer verbesserten Behandlung dieses Tumors beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei Mäusen des Stammes C57BL/6 Tumorzellen der Linie GL261 stereotaktisch in die rechte Hemisphäre des Gehirns implantiert. Nach Töten der Tiere und Aufarbeitung der Gehirne wurden histologische Schnitte angefertigt, mittels H.E. und Immunfluoreszenz gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Mikrogliazellen wurden mittels Iba-1-Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Die Dichte der Mikrogliazellen war im experimentell induzierten Gliom und in dessen Umgebung signifikant höher als im gesunden Hirngewebe. Neben Iba-1 exprimierten sämtliche Mikrogliazellen die Marker CD68 und CD11b. Ein Teil der Mikroglia reagierte auch auf MHCII positiv, für MHCI dagegen waren die meisten Mikroglia negativ. Insgesamt ermöglichte aber keiner der untersuchten Marker eine Unterscheidung zwischen ruhenden und aktivierten Mikroglia. Mittels intraperitonealer Verabreichung von Brdu und Nachweis im Hirngewebe mittels eines Antikörpers wurde eine Proliferation der Mikrogliazellen in der Tumorehemisphäre nachgewiesen. Die Proliferation war peritumoral am stärksten ausgeprägt.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung des Antigens CD31 wurden die Blutgefäße im experimentellen Gliom untersucht. Es wurden unregelmäßige, großlumige, z.T. geknäuelte Gefäße nachgewiesen, deren Anzahl sich von der Dichte im peritumoralen Bereich und in der

tumorfreen Hemisphäre nicht signifikant unterschied. Ein wesentlicher Anteil der intra- und peritumoralen Gefäße war räumlich mit zwei oder mehr Mikroglia kolokalisiert.

Die vorliegenden Ergebnisse geben Hinweise zur Herkunft und Rolle der Mikroglia im malignen Gliom. Zurzeit ist unklar, ob die Mikroglia durch Proliferation, Einwanderung von Blutmonozyten oder durch beides ihre hohe Dichte im Gliom erreichen. Die mittels BrdU nachgewiesene Proliferation – übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Autoren – stützt die Hypothese, dass die Proliferation lokaler Mikroglia einen wesentlichen Beitrag dazu leistet. Der hohe Anteil an Tumorgefäßen, die mit Mikroglia kolokalisiert waren, ist mit der Theorie vereinbar, dass Mikroglia im Zusammenhang mit der Angiogenese im Gliom stehen könnten. Um diese Hypothesen zu belegen, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. Unter anderem muss das genaue Expressionsprofil der Tumormikroglia untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf proangiogene Mediatoren. Ferner ist zur Klärung einer möglichen Einwanderung von Monozyten – da diese immunhistochemisch nicht von schon vorher vorhandenen Mikroglia zu unterscheiden sind – ein anderer Ansatz notwendig. So könnten etwa Blutzellen von transgenen Tieren verwendet werden, die sich durch ein fremdes Gen bzw. dessen Produkt von den Empfänger-mikroglia unterscheiden. Die Klärung dieser Fragen würde zu einem besseren Verständnis der Gliompathogenese und somit eventuell zu einer Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten bei diesem Tumor führen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Schneider T, Mawrin C, Scherlach C et al. Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int.* 2010 Nov; 107(45):799-807
2. Onishi M, Ishikawa T, Kurozumi K et al. Angiogenesis and Invasion in Glioma. *Brain Tumor Pathol* 2011; 28:13–24
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 2007; 114:97-109
4. Taylor LP. Diagnosis, Treatment, and Prognosis of Glioma. *Neurology.* 2010 Nov 2; 75(18 Suppl 1):S28-32.
5. Sul J, Fine HA. Malignant Gliomas: New Translational Therapies. *Mt Sinai J Med.* 2010 Nov-Dec;77(6):655-66.
6. Plate KH, Risau W. Angiogenesis in malignant Gliomas. *Glia* 1995 Nov; 15(3):339-47.
7. Thomas KA Vascular Endothelial Growth Factor, a Potent and Selective Angiogenic Agent. *J Biol Chem* 1996; 271: 603–606.
8. Arora R, Papaioannou VE The murine allantois: a model system for the study of blood vessel formation. *Blood.* 2012 Sep 27;120(13):2562-72.
9. Carmeliet P VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer Oncology 2005;69(suppl 3):4–10
10. Kerbel RS Tumor angiogenesis. *N Engl J Med.* 2008 May 8;358(19):2039-49.
11. Khasraw M, Simeonovic M, Grommes C et al. Bevacizumab for the treatment of high-grade glioma. *Expert Opin Biol Ther.* 2012 Aug;12(8):1101-11.
12. Jain R Taming vessels to treat cancer. *Sci Am.* 2008 Jan;298(1):56-63.
13. Kim SU, de Vellis J Microglia in health and disease. *J Neurosci Res.* 2005 Aug 1;81(3):302-13.
14. Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev.* 2007 Feb;53(2):344-54.
15. Hanisch UK, Kettenmann H Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007, 10:1387–1394.
16. Häusler KG, Prinz M, Nolte C et al. Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell

- wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 16, pp. 2113-2122, 2002
17. Morimura T, Neuchrist C, Kitz K et al. Monocyte subpopulations in human gliomas: expression of Fc and complement receptors and correlation with tumor proliferation. *Acta Neuropathol.* 1990;80(3):287-94.
 18. Galarneau H, Villeneuve J, Gowing G et al. Increased Glioma Growth in Mice Depleted of Macrophages. *Cancer Res.* 2007 Sep 15;67(18):8874-81.
 19. Bettinger I, Thanos S, Paulus W Microglia promote glioma migration. *Acta Neuropathol* (2002) 103 :351–355
 20. Graeber MB, Scheithauer BW, Kreutzberg GW Microglia in Brain Tumors. *Glia* 2002 Nov;40(2):252-9.
 21. Hussain SF, Yang D, Suki D et al. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro Oncol.* 2006 Jul;8(3):261-79.
 22. Ajami B, Bennett JL, Krieger C et al. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* 2007 Dec;10(12):1538-43.
 23. Engelhorn T, Savaskan NE, Schwarz MA et al. Cellular characterization of the peritumoral edema zone in malignant brain tumors. *Cancer Sci.* 2009 Oct;100(10):1856-62.
 24. Bello L, Lucini V, Carrabba G et al. Simultaneous Inhibition of Glioma Angiogenesis, Cell Proliferation, and Invasion by a Naturally Occurring Fragment of Human Metalloproteinase-2. *Cancer Res.* 2001 Dec 15;61(24):8730-6.
 25. Watters JJ, Schartner JL, Badie B. Microglia function in brain tumors. *Journal of Neuroscience Research* 81:447–455 (2005)
 26. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002; 196: 254–265.
 27. Platten M, Kretz A, Naumann U et al. Monocyte Chemoattractant Protein–1 Increases Microglial Infiltration and Aggressiveness of Gliomas. *Ann Neurol.* 2003 Sep;54(3):388-92.
 28. Thomas WE. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Research Reviews*, 17 (1992) 61-74.
 29. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature.* 1988 Aug 4;334(6181):395-402.

30. Eisenlohr LC, Luckashenak N, Apcher S et al. Beyond the classical: influenza virus and the elucidation of alternative MHC class II-restricted antigen processing pathways. *Immunol Res.* 2011 Dec;51(2-3):237-48.
31. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood.* 1993 Mar 15;81(6):1607-13.
32. Chen L, Yang P, Kijlstra A et al. Distribution, markers, and function of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm.* 2002 Mar;10(1):27-39.
33. Graeber MB, Streit WJ, Kiefer R et al. New expression of myelomonocytic antigens by microglia and perivascular cells following lethal motor neuron injury. *J Neuroimmunol.* 1990 May;27(2-3):121-32.
34. Larson RS, Springer TA. Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev.* 1990 Apr;114:181-217.
35. Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW et al. Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J Neurosci Res.* 1988 Sep;21(1):18-24.
36. Sasaki A, Yokoo H, Tanaka Y et al. Characterization of microglia/macrophages in gliomas developed in *S-100b-v-erbB* transgenic rats. *Neuropathology.* 2013 Jan 20.
37. Gumina RJ, Kirschbaum NE, Rao PN et al. The human PECAM1 gene maps to 17q23. *Genomics.* 1996 Jun 1;34(2):229-32.
38. Maes W, Van Gool SW. Experimental immunotherapy for malignant glioma: lessons from two decades of research in the GL261 model. *Cancer Immunol Immunother* (2011) 60:153–160.
39. Gabrusiewicz K, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M et al. Characteristics of the Alternative Phenotype of Microglia/Macrophages and its Modulation in Experimental Gliomas. *PLoS One.* 2011;6(8):e23902.
40. Kushchayev SV, Sankar T, Eggink LL et al. Monocyte galactose/N-acetylgalactosamine-specific C-type lectin receptor stimulant immunotherapy of an experimental glioma. Part 1: stimulatory effects on blood monocytes and monocyte-derived cells of the brain. *Cancer Manag Res.* 2012;4:309-23.
41. Kennedy BC, Maier LM, D'Amico R et al. Dynamics of central and peripheral immunomodulation in a murine glioma model. *BMC Immunol.* 2009 Feb 18;10:11.
42. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Peripheral nerve lesion produces increased levels of major histocompatibility complex antigens in the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 1989 Feb;21(2-3):117-23.

43. Kee N, Sivalingam S, Boonstra R et al. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods*. 2002 Mar 30;115(1):97-105.
44. Viel T, Boehm-Sturm P, Rasic S et al. Non-invasive imaging of glioma vessel size and densities in correlation with tumour cell proliferation by small animal PET and MRI. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013 Jun 11.
45. Sá-Pereira I, Brites D, Brito MA. Neurovascular unit: a focus on pericytes. *Mol Neurobiol*. 2012 Apr;45(2):327-47.
46. Ellert-Miklaszewska A, Dabrowski M, Lipko M et al. Molecular definition of the pro-tumorigenic phenotype of glioma-activated microglia. *Glia*. 2013 May 7.
47. Badie B, Schartner J. Role of Microglia in Glioma Biology. *Microscopy Research and Technique* 54:106–113 (2001)
48. Ribot EJ, Miraux S, Konsman JP et al. In vivo MR tracking of therapeutic microglia to a human glioma model. *NMR Biomed*. 2011 Dec;24(10):1361-8.
49. Foltz RM, McLendon RE, Friedman HS et al. A pial window model for the intracranial study of human glioma microvascular function. *Neurosurgery*. 1995 May;36(5):976-84; discussion 984-5.
50. Grathwohl SA, Kälin RE, Bolmont T et al. Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. *Nat Neurosci*. 2009 Nov;12(11):1361-3.
51. Heppner FL, Greter M, Marino D et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med*. 2005 Feb;11(2):146-52.
52. Kees T, Lohr J, Noack J et al. Microglia isolated from patients with glioma gain antitumor activities on poly (I:C) stimulation. *Neuro Oncol*. 2012 Jan;14(1):64-78.
53. Matsumoto J, Dohgu S, Takata F. Lipopolysaccharide-activated microglia lower P-glycoprotein function in brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett*. 2012 Aug 22;524(1):45-8.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Yordan Todorov Radev, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung der Mikrogliaakkumulation im malignen Gliom“ 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) 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.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, 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

Hinweis zu den durchgeführten Tierversuchen

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden im Rahmen des Tierversuchsantrags mit der Nummer **G0152/09** durchgeführt, der durch das Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt wurde.

Lebenslauf

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

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Vajkoczy für die Möglichkeit, die Arbeit an seiner Einrichtung durchzuführen sowie für seine richtungsgebenden und wertvollen Hinweise bedanken.

Der erfolgreiche Abschluss der Arbeit wäre ohne die kompetente und engagierte Hilfe meiner direkten Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Susan Brandenburg nicht möglich gewesen. Ihr danke ich an dieser Stelle für die kompetente und engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. Michael Synowitz danke ich für die Einführung in die Methode der stereotaktischen Tumorimplantation.

Ich danke Frau Nahid Hakiy für die geduldige Einarbeitung in die Methoden der Zellkultur und der Histologie sowie Frau Irina Kremenetskaia für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für die Unterstützung während der Jahre des Studiums und der Promotion.