

Aus der Arbeitsgruppe Zelluläre Neurowissenschaften
des Max-Delbrück Zentrums für Molekulare Medizin, Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von ortho-Vanillin in der Therapie des
Glioblastoma multiforme.

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

vorgelegt an der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Anna Bachorz

aus Szczecin (Polen)

Datum der Promotion: 03.03.2023

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in (1) am 22.04.2020.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	- 6 -
Abbildungsverzeichnis	- 7 -
Abkürzungsverzeichnis	- 9 -
Zusammenfassung	-10-
Abstract	-12-
Einleitung.....	-13-
Tumor	-13-
a) Onkogenese	-13-
b) Kennzeichen des Krebses	-14-
c) Therapie	-18-
Glioblastoma multiforme	-20-
a) Morphologie	-20-
b) Topographie	-22-
c) Genetischer Hintergrund und Ursprung	-23-
d) Klinische Symptomatik	-25-
e) Diagnostik	-25-
f) Therapie der Wahl	-26-
Mikroglia	-27-
a) Ursprung	-27-
b) Morphologie	-28-
c) Funktion	-29-
d) Geschlechtsunterschiede	-30-
e) Tumor-assoziierte-Mikroglia	-30-
Glioblastoma multiforme – Mikroglia – Interaktion	-30-
a) Einfluss von Glioblastoma multiforme auf Mikroglia	-31-
b) Einfluss von TAM auf Glioblastoma multiforme	-32-
c) Glioblastoma multiforme und Mikroglia - Toll-Like-Rezeptor-2-Signalkaskade	-34-
Toll-Like-Rezeptor Familie	-35-
a) Vorkommen	-36-
b) Biochemie	-36-
c) Toll-like-Rezeptor-2	-38-
Antagonisierung des TLR-2	-39-

Vanillin	-40-
a) Biochemie	-40-
b) Toxizität	-42-
c) Eigenschaften	-43-
Zielsetzung	-44-
Materialien und Methoden	-45-
Materialien	-45-
Zelllinien	-45-
Tiere	-46-
Zellkultur	-46-
Testsubstanzen	-50-
Farbstoffe	-51-
Organotypische Hirnschnitte	-52-
Migrations-Assay	-53-
Mikroskopieren	-54-
Geräte	-56-
Medien	-57-
Methoden	-57-
Zellkultur allgemein	-57-
Mikroglia Zellkultur	-58-
Gliom Zelllinien	-58-
Tiere	-59-
Alamar Blue Assay.....	-60-
Trypan-Blau Zelltod-Assay	-61-
Zellmigrations-Assay mit Boyden-Kammer	-63-
Organotypische Hirnschnitte	-67-
Konfokalmikroskopie	-73-
Lichtmikroskopie	-74-
Statistische Analyse	-74-
Ergebnisse	-75-
Stoffwechsel von Tumorzellen und Mikroglia unter dem Einfluss von o-Vanillin	-75-
Vitalität von Tumorzellen und Mikroglia unter dem Einfluss von o-Vanillin ..	-79-
Tumorstadium in murinen organotypischen Hirnschnitten	-90-

Tumorwachstum in murinen organotypischen Hirnschnitten nach Mikroglia-Depletion	-95-
Migration von Mikroglia unter dem Einfluss von o-Vanillin	-102-
Wechselwirkung von o-Vanillin und Minocyclin	-104-
Diskussion	-106-
Therapeutische Relevanz des o-Vanillin in der Behandlung von Glioblastoma multiforme	-106-
o-Vanillin hat einen zytotoxischen Effekt auf murine und humane Tumorzellen	- 106 -
o-Vanillin reduziert das Tumorwachstum in <i>ex vivo</i> Experimenten durch Hemmung der Proliferation	-109-
Beeinflussung der Mikroglia-Aktivierung durch o-Vanillin	-110-
o-Vanillin reduziert die TLR-2 und ATP-induzierte Migration der Mikroglia-110-	
o-Vanillin reduziert das Tumorwachstum <i>ex vivo</i> auch Mikroglia-unabhängig ..	
.....	- 112 -
Beeinflussung der GL261-Zellaktivierung durch o-Vanillin	-114-
o-Vanillin beeinflusst möglicherweise direkt den TLR-2-Pfad in GL261-Tumoren	-115-
Vorbereitung auf die <i>in vivo</i> Experimente mit o-Vanillin	-116-
Die richtige o-Vanillin-Konzentration für <i>in vivo</i> Experimente muss ermittelt werden	-116-
Die pharmakokinetischen Eigenschaften von o-Vanillin müssen untersucht werden	-117-
Literaturverzeichnis	-118-
Eidesstattliche Versicherung	-126-
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	-127-
Lebenslauf	-128-
Publikationsliste.....	-130-
Danksagung	-131-

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Charakteristika von Tumoren.	-13-
Tabelle 2 Morphologische Charakteristika von Glioblastom-Zellen.	- 21 -
Tabelle 3 Glioblastom-assoziierte Erkrankungen	-23-
Tabelle 4 Die wichtigsten Mutationen assoziiert mit Glioblastoma multiforme..	- 24 -
Tabelle 5 TLR-Familie.	-37-
Tabelle 6 Die physikalischen und chemischen Eigenschaften von o-Vanillin.	-42-
Tabelle 7 Zytotoxizität von o-Vanillin in Menschen.	-43-
Tabelle 8 Zelllinien	-45-
Tabelle 9 Tiere	-46-
Tabelle 10 Zubehör	-46-
Tabelle 11 Medien und Chemikalien	-48-
Tabelle 12 Testsubstanzen.....	-50-
Tabelle 13 Farbstoffe	-51-
Tabelle 14 Organotypische Hirnschnitte	-52-
Tabelle 15 Migrations-Assay	-53-
Tabelle 16 Mikroskopieren.....	-54-
Tabelle 17 Software	-55-
Tabelle 18 Zubehör	-56-
Tabelle 19 Geräte	- 56 -
Tabelle 20 Anzahl der Tumoren in organotypische Hirnschnitten.....	- 89 -
Tabelle 21 Anzahl der Tumoren in organotypischen Hirnschnitten nach der Mikroglia.Depletion	- 97 -
Tabelle 22 Zytotoxische Effekte von o-Vanillin auf verschiedene Tumorzellen.	- 106 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Kennzeichen des Krebses	-15-
Abbildung 2 Histologische Aufnahme von Glioblastoma multiforme	-22-
Abbildung 3 Diagnostische Bildgebung von Glioblastoma multiforme	-26-
Abbildung 4 Einfluss vom Glioblastom-Zellen auf die Mikroglia.	-32-
Abbildung 5 Einfluss von TAM auf die Glioblastom-Zellen..	- 34 -
Abbildung 6 Glioblastom-induzierter TLR-2-Signalfad in Mikroglia.	-35-
Abbildung 7 TLR-2-Signalfad.	-39-
Abbildung 8 Chemische Struktur von Vanillin und ortho-Vanillin.	-41-
Abbildung 9 GL261-Zellen in der Zählkammer nach der Färbung mit Trypan Blau. .	-62-
Abbildung 10 Macro zur Analyse von Boyden-Kammer Experiment in FIJI.	-64-
Abbildung 11 Der Auswertungsablauf einer Aufnahme von Boyden-Chamber-Membran.	-65-
Abbildung 12:Experimentablauf von organotypischen Hirnschnitten.	-69-
Abbildung 13 Experimentablauf von organotypischen Hirnschnitten nach der Depletion von Mikroglia.	-71-
Abbildung 14 Mikroglia-Zellstoffwechsel nach der Behandlung mit o-Vanillin..	- 74 -
Abbildung 15 GL261-Zellstoffwechsel nach der Behandlung mit o-Vanillin	-75-
Abbildung 16 Vergleich des Zellstoffwechsels zwischen Tumorzellen und Mikroglia	- 76 -
Abbildung 17 Mikroskopische Aufnahmen von Mikroglia.	-78-
Abbildung 18 Mikroglia-Zellvitalität nach der Behandlung mit o-Vanillin.	-79-
Abbildung 19 Mikroskopische Aufnahmen von GL261-Tumorzellen.	-80-
Abbildung 20 GL261-Zellvitalität nach Behandlung mit o-Vanillin..	- 81 -
Abbildung 21 U87-Zellvitalität nach der Behandlung mit o-Vanillin..	- 82 -
Abbildung 22 Vergleich der Zellvitalität zwischen Tumorzellen und Mikroglia.	- 83 -
Abbildung 23 Vergleich der Zellvitalität zwischen GL261-Tumorzellen und U87- Tumorzellen.	-84-
Abbildung 24 Mikroskopische Aufnahmen von GL261-Zellen, U87-Zellen und Mikroglia nach der Inkubationszeit von 120 Stunden.	-85-
Abbildung 25 GL261-Zellvitalität nach der Behandlung mit o-Vanillin für 48, 72 und 120 Stunden.	-86-
Abbildung 26 U87-Zellvitalität nach der Behandlung mit o-Vanillin für 48, 72 und 120 Stunden.	-87-
Abbildung 27 Vergleich der Zellvitalität zwischen GL261-Tumorzellen und U87- Tumorzellen nach der Behandlung mit o-Vanillin für 48, 72 und 120 Stunden. .	-88-
Abbildung 28 Einbettung des GL261-Tumors in dem murinen Hirngewebe..	- 89 -
Abbildung 29 3D-Rekonstruktion von inokulierten mCherry-GL261-Tumoren.	-90-
Abbildung 30 Organotypische Hirnschnitte. Tumoroberfläche.	- 91 -
Abbildung 31 Organotypische Hirnschnitte. Tumolvolumen..	- 92 -
Abbildung 32 Organotypische Hirnschnitte. Tumoroberfläche und Tumolvolumen. .	- 93 -
Abbildung 33 Mikroglia vor und nach der Behandlung mit Clodronat-Liposomen.....	- 94 -
Abbildung 34 Mikroskopische Aufnahmen von Gehirnschnitten der McGreen Mäuse.-	95

Abbildung 35 3D-Rekonstruktion von inokulierten mCherry-GL261-Tumoren nach der Mikroglia-Depletion.	- 96 -
Abbildung 36 Organotypische Hirnschnitte nach der Mikroglia-Depletion. Tumoroberfläche.	-98-
Abbildung 37 Organotypische Hirnschnitte nach der Mikroglia-Depletion. Tumorzvolumen..	- 99 -
Abbildung 38 Organotypische Hirnschnitte nach der Mikroglia-Depletion. Tumoroberfläche und Tumorzvolumen..	- 100 -
Abbildung 39 Boyden-Kammer-Membranen nach der Behandlung mit o-Vanillin..	- 101 -
Abbildung 40 Migration von Mikroglia nach der o-Vanillin-Behandlung..	- 102 -
Abbildung 41 GL261-Zellstoffwechsel nach der Behandlung mit o-Vanillin und Minocyclin	- 104 -

Abkürzungsverzeichnis

Bezeichnung	Abkürzung im Text
Adenosintriphosphat	ATP
Arginin 1	ARG-1
CC-Chemokinligand 2	MCP-1
CXC-Motiv-Chemokin 12	CXCL12
Desoxyribonukleinsäure	DANN
Glial cell-derived neurotrophic factor	GDNF
Glioma 261	GL261-Zellen
Interleukin-6	IL-6
Isocitrat-Dehydrogenase-1-Gen	IDH-Gen
Kohlenstoffdioxid	CO ₂
Matrix-Metalloprotease 2	MMP-2
Matrix-Metalloprotease-14	MMP-14
Matrix-Metalloprotease-9	MMP-9
Mitogen-aktiviertes-Protein-Kinase	MAPK
Monozytenkolonien-stimulierender Faktor	CSF-1
Mustererkennungsrezeptoren / Pattern recognition receptors	PRR
myeloid differentiation primary-response gene 88	My88
Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells	NF-KB
O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gen	MGMT-Gen
ortho-Vanillin	o-Vanillin
Pathogen-assoziierte molekulare Mustern /Pathogen-associated molecular patterns	PAMP
Programmiertes-Zelltodprotein 1	PD-1
Prostaglandin 2	PGE-2
Protein p53	p53
Retinoblastoma Gen	RB
Toll-like-Rezeptor-2	TLR-2
Transformierender Wachstumsfaktor – Beta	TGF-β
Transformierender Wachstumsfaktor-Alpha	TGF-α
Tumor-assoziierte Mikroglia	TAM
Tumornekrose-Faktor-Alpha	TNF-α
Uppsala 87 Malignant Glioma	U87-Zellen
Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor	VEGF

Zusammenfassung

Die Therapiemöglichkeiten vom Glioblastoma multiforme (Glioblastom), dem häufigsten malignen hirneigenen Tumor, sind trotz multimodaler Ansätze nicht zufriedenstellend, da sie lediglich zu einem Medianüberleben von 15 Monaten führen. Eins der tumorunterstützenden Mechanismen ist der Toll-Like-Rezeptor-2-Signalpfad (TLR-2), der die Expression von Matrix-Metalloproteasen bedingt und die Invasion des Tumors im Gewebe ermöglicht. Der TLR-2 wird sowohl von den tumorunterstützenden Immunzellen - Tumor-Assoziierten-Mikroglia (TAM)- als auch von den Tumorzellen selbst exprimiert. Eine mögliche Antagonisierung dieses Signalweges durch das ortho-Vanillin (o-Vanillin), bekannt aus der Lebensmittelindustrie, wurde neulich diskutiert, angesichts der Fähigkeit dieser Substanz, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren.

In dieser Arbeit wurden sowohl der TLR-2- abhängige als auch TLR-2-unabhängige Einfluss von o-Vanillin auf das Glioblastom untersucht, um die potenziellen therapeutischen Ansätze zu identifizieren. Mithilfe von Alamar Blue und Trypan Blue Vitalitätsexperimenten konnte die optimale o-Vanillin Konzentration von 100µM ermittelt werden, die sowohl die murinen GL261- als auch die humanen U87-Glioblastom-Zellen beeinträchtigt, ohne die gesunden Mikroglia zu schädigen. In *ex vivo* organotypischen Hirnschnitten konnte der reduzierende Einfluss von o-Vanillin auf die Tumorgroße bewiesen werden, der vermutlich auf die Proliferationshemmung der Tumorzellen zurückzuführen ist. Dieser Effekt ist nicht ausschließlich TAM-abhängig, da nach der Depletion von Mikroglia und anschließender o-Vanillin-Behandlung die Abnahme des Tumorwachstums beobachtet werden konnte. Zudem zeigte das-Vanillin in dem Boyden-Kammer-Experiment einen reduzierenden Effekt auf die Migration der Tumorzellen. Der promigratorische Effekt von sowohl TLR-2-Agonisten als auch ATP wurde durch o-Vanillin gehemmt, was die Involvierung von TLR-2-unabhängigen Mechanismen vermuten lässt. Letztendlich schwächte die Zugabe von dem bekannten TLR-2-Singlaweg-Antagonisten – Minocyclin - den reduzierenden Effekt von o-Vanillin auf den Tumorstoffwechsel im Alamar Blue-Vitalitätsexperiment ab, was eine mögliche kompetitive Wirkung dieser beiden Substanzen an dem TLR-2 impliziert.

Das o-Vanillin reduziert das Tumorwachstum und die Migration der Mikroglia im murinen *in vitro* und *ex vivo* Modell sowohl über den TLR-2-Signalweg als auch TLR-2-unabhängig. Die weitere Erforschung des Einflusses von o-Vanillin auf die humanen

Glioblastoma -Zellen in *ex vivo* Experimenten sowie die Pharmakokinetik der Substanz sollte vor *in vivo* Experimenten in Mäusen erfolgen, um den potenziellen therapeutischen Nutzen bei der Behandlung des Glioblastoma multiforme in Menschen zu evaluieren.

Abstract

The treatment of glioblastoma multiforme (glioblastoma), the most common primary malignant brain tumour, is not satisfying despite multimodal approaches since they only lead to a median survival of 15 months. One of the tumour-supporting mechanisms is the toll-like receptor 2 (TLR-2) signaling pathway which leads to the expression of Matrix metalloproteases and enables the tumour to invade the tissue. The TLR-2 is expressed both by the protumourgenic immune cells –tumour-associated microglia - and by the tumour cells themselves. A possible antagonization of this signaling pathway by ortho-vanillin (O-vanillin), known from the food industry, has recently been discussed, due to the ability of this substance to cross the blood-brain barrier.

In this work both the TLR-2-dependent and the TLR-2-independent influence of O-vanillin on the glioma was examined in order to identify the potential therapeutic approaches. With the help of Alamar Blue and Trypan Blue vitality assays, the optimal O-vanillin concentration of 100 μ M was determined, which affects both the murine GL261 and the human U87 glioma cells without damaging the normal microglia. In the ex vivo organotypic brain slice culture the reducing influence of O-vanillin on the tumour size could be proven, which is presumably due to the inhibition of proliferation of the tumour cells. This effect is not exclusively dependent on TAMs, since the decrease in tumour growth could also be observed after depletion of microglia and subsequent o-vanillin treatment. In addition, the o-vanillin showed a reducing effect on the migration of the tumour cells in the Boyden chamber assay. The promigratory effect of both TLR-2 agonists and ATP was inhibited by O-vanillin, which suggests the involvement of TLR-2-independent mechanisms. Ultimately, the addition of a known TLR-2-signaling pathway antagonist - minocycline decreased the reducing effect of O-vanillin on the tumour metabolism in the Alamar Blue vitality experiment, which implies a possible competitive effect of these two substances on the TLR-2.

The O-vanillin reduces tumour growth and migration of the microglia in the murine in vitro and ex vivo model via the TLR-2 signaling pathway and in TLR-2-independent manner. Further research on the influence of O-vanillin on human glioblastoma cells in ex vivo experiments and the pharmacokinetics of the substance should be carried out before starting the in vivo experiments in order to evaluate the potential therapeutic benefit in treating glioblastoma multiforme in human.

Einleitung

Tumor

Der Begriff „Tumor“ kommt aus dem lateinischen und wird übersetzt als „die Schwellung“, was unspezifisch die Volumenprogredienz des gegebenen Gewebes bedeutet. Es wird auch als Synonym für das Wort Neoplasie verwendet, welche die Neubildung von Gewebe durch unkontrollierte Zellproliferation beschreibt (2). Neoplasien, in dieser Arbeit weiter als Tumore bezeichnet, können in maligne, benigne sowie semimaligne aufgeteilt werden. Die Charakteristika jeder Gruppe können der Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1

Charakteristika von Tumoren erstellt anhand von (2).

Charakteristika/Gruppe	Maligne	Benigne	Semimaligne
Abgrenzung zum gesunden Gewebe	Unscharf	Scharf, abgekapselt	Unscharf/scharf
Wachstum	Schnell	Langsam	Langsam
Invasivität	Invasiv, destruierend	Nicht invasiv	Potenziell invasiv, lokal destruierend
Zelldifferenzierung	Niedrig, heterogen	Hoch, homogen	Hoch, homogen
Metastasierung	Möglich	Keine	Keine
Prognose	Schlecht	Gut	Gut

Die Tumore stellen eine überaus heterogene Gruppe der Erkrankungen dar, da sie jegliches Gewebe im menschlichen Körper betreffen können und somit in unterschiedlichen Symptomen und Eigenschaften imponieren.

a) Onkogenese

Die Tumorentstehung wird als Onkogenese oder Karzinogenese bezeichnet (3). Dabei handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen, bei dem es durch ein Zusammenspiel

von den Onkogenen und Tumorsuppressorgenen zur Entartung und zum Funktionsverlust des gesunden Gewebes kommt (3).

- **Onkogene**

Die Proteine, die das Zellwachstum und die Zellproliferation regulieren, werden durch Proto-Onkogene codiert (4). Im Falle einer Gen-Mutation kommt es zur Überexpression von diesen Proteinen und zum Übergang in die Onkogene, welche die unkontrollierte Tumorentwicklung fördern (3). Die dafür verantwortlichen Mutationen sind vom Funktions-Gewinn-Typ, haben einen stimulierenden Charakter und führen zum Kontrollverlust über die Proliferation der Zellen. Damit ein Onkogen das Tumorstadium fördert, ist es ausreichend, dass eine Kopie des Gens von der Mutation betroffen ist (3).

- **Tumorsuppressorgene**

Die Proteine, die Zellzyklus und Apoptose kontrollieren, werden als Tumorsuppressoren bezeichnet und von Tumorsuppressorgenen codiert. Durch eine Funktions-Verlust- oder Funktions-Reduktion-Mutation entfallen die Überwachungsmechanismen und die uneingeschränkte, tumorfördernde Zellproliferation setzt ein (3).

- **Knudson-Hypothese (Two-Hits-Hypothese)**

Gesunde Individuen besitzen zwei intakte Kopien von demselben Gen, das die gleichen Proteine codiert. Die Knudson-Hypothese betrifft die Tumorsuppressorgene und besagt, dass beide Kopien des Gens mutiert oder beschädigt werden müssen, damit die Kontrollfunktion eines Tumorsuppressors gänzlich entfällt (3, 5). Damit es dazu kommt, müssen zwei unabhängige Geschehen – „two-hits“ (aus dem Englischen: „zwei Schläge“) erfolgen, bei denen jeweils eine Kopie des Gens funktionsuntüchtig wird.

b) Kennzeichen des Krebses

Tumorzellen, unabhängig von der Tumorgenese und dem Ursprungsgewebe, weisen typische Charakteristika auf. Sie werden als Kennzeichen des Krebses (original aus dem Englischen: Hallmarks of Cancer) bezeichnet und beschreiben Eigenschaften der Tumorzellen, die sie vom normalen Gewebe unterscheiden (6). Eine Reihe von allen gemeinsamen Eigenschaften von Tumoren wurde 2011 von Hanahan und Weinberg rekapituliert und ergänzt (6). Die Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung von den Kennzeichen des Krebses.

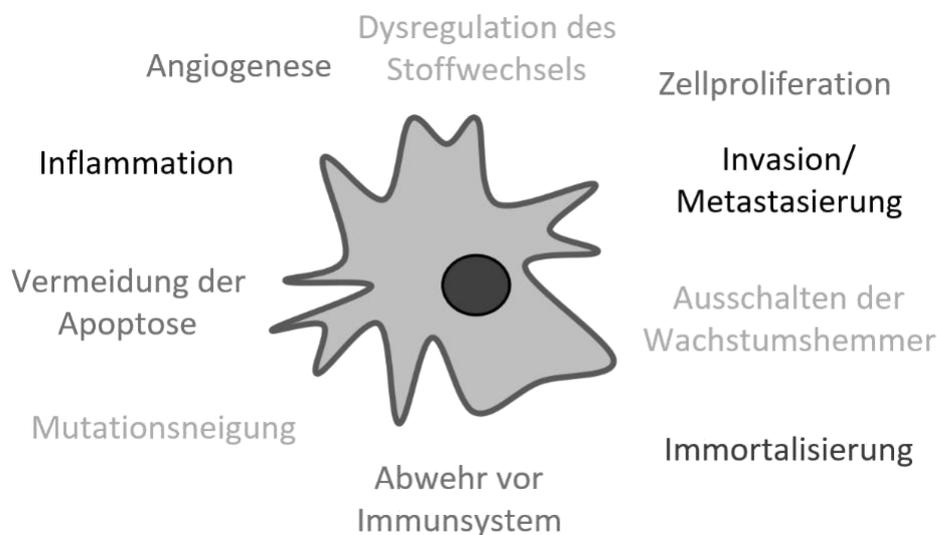


Abbildung 1

Schematische Darstellung der Kennzeichen des Krebses nach Hanahan und Weinberg (6). Die graue Zelle in der Mitte der Abbildung symbolisiert eine entartete Tumorzelle. Zu den Merkmalen der bösartigen Tumorzellen gehören unkontrollierte Zellproliferation, Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung, Ausschalten der Wachstumshemmer, Immortalisierung der Zellen, Abwehr von Immunsystem, Mutationsneigung, Vermeidung der Apoptose, chronische Inflammation, tumoreigene Angiogenese sowie Dysregulation des Stoffwechsels.

- **Induzieren von Angiogenese**

Für die Sauerstoffversorgung sowie den Abtransport von Zellmetaboliten und CO₂ ist ein ausreichend entwickeltes Gefäßsystem erforderlich. Im Tumorgewebe werden Gefäßneubildung-stimulierende Agenzien überschüssig freigesetzt, was die ununterbrochene Gefäßneubildung – Angiogenese – fördert (6).

- **Unkontrollierte Zellproliferation**

Tumorzellen vermehren sich uneingeschränkt und mit viel höherer Rate als gesunde Zellen. Durch Überstimulation von Wachstumsrezeptoren, wie den Tyrosinkinasen, werden Proliferationsgene im Überschuss exprimiert und der Übergang in die proliferative Zellzyklusphase wird eingeleitet, was zu autokrin verstärktem Tumorwachstum führt (6).

- **Ausweichen vor Wachstumshemmer**

In gesundem Gewebe sind bestimmte Proteine, wie RB oder p53, für das Einleiten einer Reparatur oder eines programmierten Zelltodes bei den geschädigten, nicht funktionsfähigen oder übermäßig aktivierten Zellen verantwortlich. Die Tumorzellen sind imstande, diese Schutzmechanismen auszuschalten, indem sie die wachstumshemmenden Proteine durch Mutationen funktionsunfähig machen (6).

- **Invasion und Metastasierung**

Die Freisetzung von Matrix-degenerierenden Proteinen erleichtert den Tumorzellen die Destruktion vom umgebenden Gewebe und schafft Platz für die entarteten Zellen. Durch den Verlust von Adhäsionsmolekülen wie den E-Catherinen, gelingt es den Tumorzellen, sich aus dem Ursprungsort zu lösen. Die infiltrativ wachsenden Tumoren erreichen die Blut- sowie Lymphbahn (Intravasation) und wandern dann in die anderen Körperregionen, um sich dort als Metastasen anzusiedeln (6).

- **Das Vermeiden vom Zelltod**

Die Tumorzellen haben Mechanismen entwickelt, die den programmierten Zelltod umgehen, indem sie vor allem den intrinsischen Apoptose-Signalweg über Cytochrom-c stören. Zum einen wird das Tumorsuppressor-Gen p53 durch Mutationen inaktiviert, zum anderen kann die Expression von den antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2 oder Bcl-x hochreguliert werden bei gleichzeitiger Runterregulierung der proapoptotischen Proteine Bax, Bim, Puma (6).

- **Replikative Immortalisierung der Zellen**

Jede Zelle hat eine limitierte Fähigkeit zur Proliferation und erreicht ein irreversibles Stadium des Zellteilungsstillstandes, die Seneszenz. Verantwortlich dafür ist das sukzessive Kürzen von Telomeren, den repetitiven DNA-Sequenzen an den Chromosom-Enden. Die Tumorzellen haben im Vergleich zu den gesunden Zellen ein uneingeschränktes replikatives Potenzial, da sie Telomerase produzieren können, ein Enzym das die Telomere wiederaufbauen kann und so vor dem Erreichen der Seneszenz schützt (6).

- **Resilienz gegenüber Immunmechanismen**

Um das Immunsystem zu deaktivieren müssen die Tumorzellen entweder der Erkennung durch Immunzellen entweichen oder die Abwehrmechanismen schwächen. Die wenig immunogenen Tumorzellen entgehen der Detektion, indem sie die typischen Rezeptorproteine nicht exprimieren, die von Immunzellen erkannt werden (6).

- **Tumor unterstützende Inflammation**

Die Umgebung von Tumorzellen wird zu einem großen Teil von Immunzellen des nativen und adaptiven Immunsystems gebildet, ähnlich dem entzündeten Gewebe in tumorfreien Zellverbänden (3). Das neoplastische Gewebe wird jedoch von den Immunzellen teilweise gefördert, indem die zur Entwicklung von der Tumor-Mikroumwelt essenziellen Moleküle geliefert werden. Dazu gehören Wachstumsfaktoren, Überlebensfaktoren, proangiogenetische Chemokine, Enzyme, die die extrazelluläre Matrix modifizieren. Die Entzündungsreaktionen, die schon im frühen Stadium der Neoplasien ansetzen, ermöglichen und beschleunigen die weitere Entartung der Zellen und das Tumorwachstum (3, 6).

- **Genom-Instabilität und Mutationsneigung**

Die Tumorzellen entwickeln sich auf Basis von DNA-Mutationen, die die Zelle destabilisieren und dem neoplastischen Gewebe einen Vorteil verleihen. Die mutierten Zellen weisen viel mehr reaktive DNA auf und eine gesteigerte Neigung zu weiteren Mutationen (6).

- **Dysregulation des Zellstoffwechsels**

Trotz ausreichender Versorgung mit Sauerstoff gewinnen die Tumorzellen die Energie aus Glukose bevorzugt auf dem Weg der Glykolyse, wobei die Glukose zum Laktat umgewandelt wird. Der vermehrte Einbau der Glukose-Transporter in die Zellmembran steigert die Glukoseaufnahme. Die Nebenprodukte der anaeroben Glykolyse können weiter verstoffwechselt und zur Bildung von Nukleosiden und Aminosäuren verbraucht werden. Diese sind unentbehrliche Substrate für das Wachstum schnell proliferierender Tumorzellen (6).

c) Therapie

Die Therapie von Tumoren variiert in Abhängigkeit von Tumorart und Tumorstadium. Im Allgemeinen kann man 3 Therapieansätze identifizieren, die häufig miteinander kombiniert werden: operative Therapie, Chemotherapie und Radiotherapie (3). Bei bestimmten Tumorarten können auch weitere Behandlungsoptionen in Erwägung gezogen werden, wie die Immuntherapie, lokale Tumorvergiftung, Wärmetherapie und andere (3).

Chemotherapie

Die Chemotherapie bezeichnet eine medikamentöse Behandlung des Tumors mit verschiedenen toxischen Substanzen, den Chemotherapeutika. Durch verschiedene Mechanismen, wie DNA-Methylierung, DNA-Interkalation oder Schäden an dem Zellzytoskelett wird die Proliferation der Tumorzellen gehemmt (3). Das Ziel dieser Therapie ist die Aufhaltung des Tumorwachstums durch Zytostatika, sowie die Induktion des Tumorzelltodes durch Zytotoxine, welche die Apoptose in den neoplastischen Zellen einleiten (7). Die Chemotherapie ist nebenwirkungsreich und bringt nicht immer die Heilung, weswegen sie oft mit anderen Therapieoptionen kombiniert wird. Es kann zwischen adjuvanter und neoadjuvanter Chemotherapie unterschieden werden (7).

Adjuvante Chemotherapie

Adjuvante Chemotherapie wird nach der Resektion des Tumors angewandt, um eventuelle Tumorreste abzutöten (7).

Neoadjuvante Chemotherapie

Die neoadjuvante Chemotherapie wird vor der Tumorresektion verabreicht, um die Tumorgröße zu verringern und somit den Erfolg bei der operativen Entfernung zu unterstützen (7).

Operative Therapie

Bei allen malignen und operablen Tumoren wird die chirurgische Entfernung angestrebt. Die Operationstüchtigkeit eines Tumors wird einerseits durch die Tumorlokalisation und andererseits durch den allgemeinen Zustand sowie die Prognose des Patienten bestimmt. Die operative Entfernung kann vollständig oder unvollständig erfolgen, in

Abhängigkeit davon, ob ein Resttumor erhalten bleibt. Manchmal umfasst die Resektion nicht nur das Tumorgewebe, sondern auch benachbarte Strukturen (3).

Radiotherapie

Der Wirkungsansatz von der Radiotherapie, auch als Strahlentherapie bezeichnet, basiert auf der Anwendung von ionisierender Strahlung zur Bekämpfung der neoplastischen Zellen und Heilung beziehungsweise Verzögerung der Progression von Tumorerkrankungen (8). Ursprünglich wurden vor allem die Gamma-, Röntgen- sowie Elektronenstrahlung benutzt, die auch heutzutage die Mehrheit der Strahlentherapie ausmachen (8). Es kommt dabei zur Ionisierung der Wassermoleküle und Entstehung von hochtoxischen freien Radikalen, die DNA-Strangbrüche verursachen und die Zellteilung der Tumorzellen verhindern (3). Zu den neuen Ansätzen gehört die Behandlung mit Neutronen, Protonen sowie schweren Ionen (8).

Das Tumorgewebe ist strahlensensitiver im Vergleich zum gesunden Gewebe (8). Bei radiotherapiesensitiven Tumoren kann man bei direkter Bestrahlung des veränderten Gewebes mit einer Gesamtdosis von 20 bis 80 Gray eine Heilwirkung erzeugen (9). Radiotherapie wird oft zusammen mit Chemotherapie und Chirurgie kombiniert, sodass eine Beschwerdelinderung, Prognoseverbesserung und in manchen Fällen komplette Heilung erfolgen kann (3). Bei der Radiotherapie können analog zur Chemotherapie auch die adjuvante und neoadjuvante Variante angewandt werden.

Krebsimmuntherapie

Ein in den letzten zwanzig Jahren immer mehr an Bedeutung gewinnender Therapieansatz ist die Krebsimmuntherapie. Hierbei wird versucht die Krebszellen über das Immunsystem zu bekämpfen (10). Man unterscheidet zwischen passiven und aktiven Therapieansätzen, die als passive und aktive Impfung bezeichnet werden (3).

Passive Impfung

Eine Form der passiven Immunisierung ist die adaptive Immunisierung (3). Hierbei werden patienteneigene Leukozyten entnommen, unter Laborbedingungen kultiviert und wieder eingepflanzt (3). Zu den spezifischen passiven Impfstoffen gehören jegliche Antikörper, darunter die monoklonalen Antikörper sowie adaptive T-Lymphozyten (3). Die Antikörper sollen selektiv an Tumorzellen binden und Signalkaskaden auslösen, zum

Beispiel solche, die zur Apoptose führen. Die Gruppe der unspezifischen Impfstoffe wird von Zytokinen und Zytokin-induzierten-Killerzellen gebildet (3).

Aktive Impfung

Die aktive Immunisierung gegenüber Tumorzellen erfolgt durch Auslösung der Immunantwort. Dem Patienten werden dabei Tumorigenimpfstoffe verabreicht, die das Immunsystem stimulieren. Die Tumorzellen können durch das Immunsystem erkannt werden und in das Apoptose- oder zumindest Seneszenz-Stadium überführt werden (3). Es wird an so genannten Tumorigenimpfstoffen geforscht, welche abgetötete Tumorzellen oder Zellextrakte beinhalten und das Immunsystem darauf trainieren sollen, die Tumorzellen zu erkennen und zu bekämpfen. Ein Beispiel für eine erfolgreiche prophylaktische Vakzinierung gegen Tumore ist der Impfstoff gegen Humane Papilloma Viren (HPV), die das Zervix-, Vulva- sowie Penis-Karzinom auslösen können (3).

Glioblastoma multiforme

Der häufigste primäre maligne hirneigene Tumor im Erwachsenenalter ist Glioblastoma multiforme, auch als Glioblastom oder Gliom bekannt (11). Die Inzidenz beträgt in Europa 2-3 pro 100.000 Einwohner und wird minimal häufiger beim männlichen Geschlecht beobachtet (Männer-zu-Frauen-Verhältnis: 1,23 zu 1) (11). Bewohner von industriellen Gebieten oder kaukasischer Herkunft erkranken häufiger (11). Das Glioblastom wird von der Weltgesundheitsorganisation (WHO – aus dem englischen World Health Organisation) als Astrozytom Grad IV eingestuft, was mit einer schlechten Prognose und hohen Bösartigkeit einhergeht (12).

a) Morphologie

Das morphologische Bild vom Glioblastom beinhaltet heterogene, mehrkernige Zellen mit polymorphen Zellekernen (Anisokorie) und Nukleoli (11, 12). Der Chromatingehalt ist erhöht (11). Das Zellkern-Zytoplasma-Verhältnis ist erhöht, zudem kommt es gehäuft zu atypischen Mitosen (11). Das Glioblastom ist stark vaskularisiert, wobei sich die neugebildeten Gefäße von normalen Gefäßen unterscheiden, da sie hyperplastische und heterogene Endothelien aufweisen (3, 11). Sie stellen keinen Kontakt zu den Astrozyten her (11). Durch Bildung von Mikrothromben und Druckaufbau in den Tumorgefäßen kommt es zu endothelialen Schäden und Einblutungen in das Gewebe (11). Auch Nekrosen werden häufig beobachtet und werden als typisches Merkmal von

Glioblastoma multiforme bezeichnet (12). Eine Zusammenfassung der morphologischen Eigenschaften des Glioblastoms gibt die Tabelle 2 wider. Abbildung 2 zeigt eine exemplarische histologische Aufnahme des Glioblastoms.

Tabelle 2

Morphologische Charakteristika von Glioblastom-Zellen. Erstellt anhand von (3, 11, 12).

Charakteristika	Glioblastom-Zellen (WHO Grad IV Tumor)
Zellform	Polygonal, spindelförmig, polymorph, unscharf begrenzt
Zytoplasma	Azidophil
Zellkern	Vergrößert, polymorph
Nukleolus	Oval/länglich, polymorph, hyperchromatisch, zentral und perizentrisch lokalisiert
Synzytiale Zellen	Vorhanden
Zellkern-Zytoplasma-Verhältnis	Erhöht
Immunzellen	Vorhanden: Lymphozyten, Neutrophile, Makrophagen
Nekrosen	Vorhanden
Vaskularisierung	Sehr hoch
Gefäßmorphologie	Hyperplastisch, heterogen; Anwesenheit der Weibel-Palade-Körperchen
Mitosen	Häufig

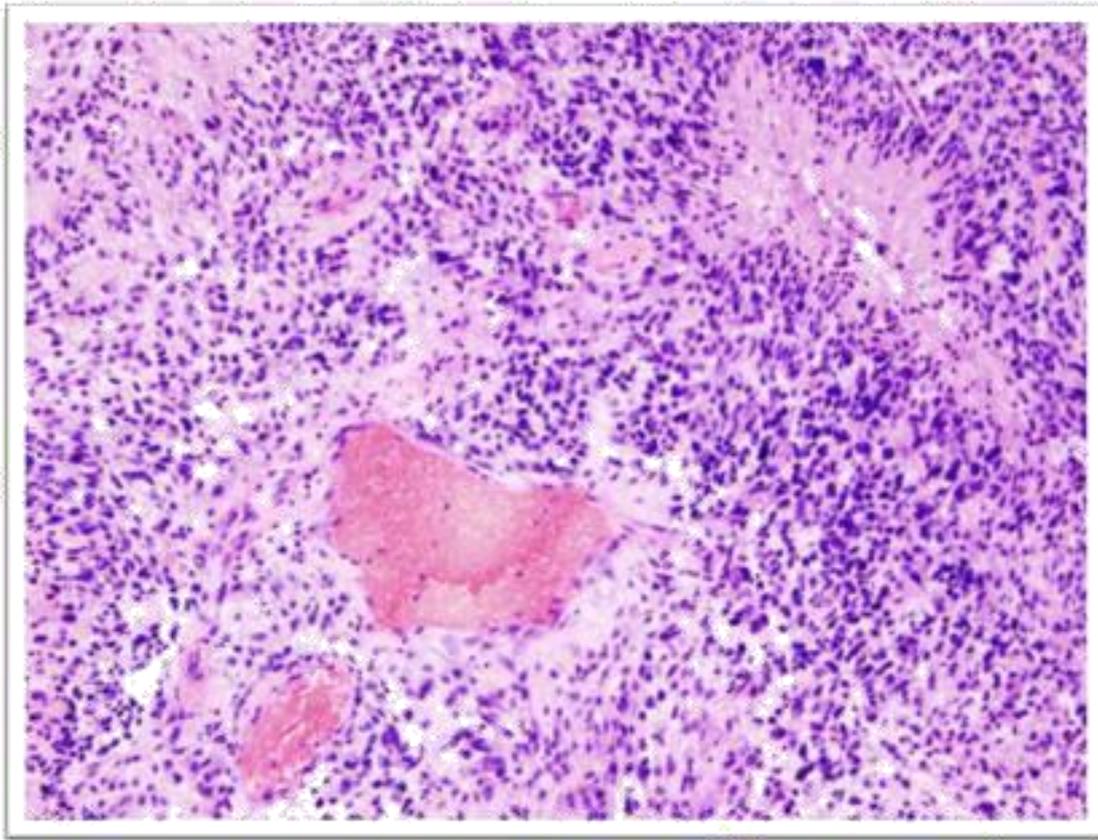


Abbildung 2

Histologische Aufnahme von Glioblastoma multiforme in Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Zu erkennen sind mehrere palisadenförmig angeordnete Zellen mit erhöhtem Chromatingehalt (blaue Zellkerne) sowie Nekrosen. Die Abbildung wurde freundlicherweise durch Wikimedia Commons zur Verfügung gestellt (copyright 2006, genehmigte Verfügung) (13).

b) Topographie

Topographisch sind Glioblastomen am häufigsten in der Großhirnrinde lokalisiert, bevorzugt im Temporal- und Frontallappen (14). Oft wachsen sie als sogenannte Schmetterlingstumore über den Balken hinaus und infiltrieren somit beide Hemisphären (11, 14). Gliome treten auch subtentorial im Hirnstamm und Kleinhirn auf (14). Sie weisen ein infiltratives, diffuses Wachstum auf und können nicht klar von dem umgebenden Gewebe unterschieden werden (14).

c) Genetischer Hintergrund und Ursprung

Glioblastomen entwickeln sich primär in bis zu 90 % der Fälle aus der weißen Substanz im Gehirn und haben ihren Ursprung in den neuroglialen Vorläuferzellen (15). In den übrigen 10 % der Fälle können sie sich jedoch auch sekundär aus den anderen Astrozytomen niedrigeren Grades entwickeln – vor allem aus dem diffusen und dem anaplastischen Astrozytom (15). Diese sind mit einer Isocitrat-Dehydrogenase-1-Gen-Mutation (IDH) assoziiert und werden häufiger bei Kindern und jungen Erwachsenen beobachtet (15). In primären Glioblastomen kommt es hauptsächlich zur Mutation der Gene, die Zellwachstum, Zellzyklus (Übergang von der G1- in die S-Phase), Apoptose- und Reparaturmechanismen sowie Telomerlänge beeinflussen. Typischerweise, in etwa 50 % der Fälle, kommt es zur Methylierung des Promotors vom MGMT-Gen (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gen) und folgend zur Abnahme von dessen Expression (15, 16). Reparaturprozesse an der DNA können dadurch nicht suffizient durchgeführt werden. Diese Mutation ist ein wichtiger prädiktiver Indikator, da sie das Ansprechen auf die Chemotherapie mit Temozolomid bestimmt und zu geringer Verlängerung der Überlebenszeit führt (16). Ein bestätigter Risikofaktor für die Entwicklung von dem Glioblastom ist ionisierende Strahlung (17). Glioblastoma multiforme wird auch mit bestimmten genetischen Erkrankungen und Infektionen mit dem humanen Zytomegalie-Virus assoziiert (18), ohne dass die genauen Pathomechanismen bekannt sind. Tabelle 3 veranschaulicht ausgewählte, mit dem Glioblastom assoziierte Erkrankungen beziehungsweise Syndrome.

Tabelle 3

Glioblastom-assoziierte Erkrankungen – Auswahl. Erstellt anhand von (15, 19)

Erkrankung	Assoziierte Mutation
Tuberöse Sklerose	Tumorsuppressorgene: TSC1 und TSC2
Turcot-Syndrom	Tumorsuppressorgene: hMLH1 und hPMS2
Multiple Endokrine Neoplasie Typ IIa	Protoonkogen: RET
Neurofibromatose Typ I	Protoonkogen: NF-1-Genlocus

Ausgewählte mit Glioblastoma multiforme assoziierte Gen-Mutationen wurden in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4

Die wichtigsten Mutationen assoziiert mit Glioblastoma multiforme – Auswahl. Erstellt anhand von (15).

Abkürzung	Bezeichnung	Mutationsstelle	Mutationsart	Funktion
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase	Chromosom 10	Suppression	Apoptose
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase	Chromosom 15	Überexpression	Zellstoffwechsel
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Chromosom 7	Überexpression	Zellwachstum
FGFR2	Fibroblast Growth Factor Receptor 2	Chromosom 10	Überexpression	Zellwachstum
IRS2	Insulin-Receptor-Substrat-2	Chromosom 13	Überexpression	Zellstoffwechsel
CDK6	Cyclin-abhängige-Kinase-6	Chromosom 7	Suppression	Zellzyklus-Kontrolle
MET	Tyrosinkinase Met	Chromosom 7	Überexpression	Zellwachstum
MDM2	Mouse double minute 2 homolog	Chromosom 12	Überexpression	Apoptose
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog	Chromosom 10	Suppression	Apoptose
NF1	Neurofibromatose-Typ-1-Gen	Chromosom 7	Überexpression	Zellwachstum
RB	Retinoblastoma Gen	Chromosom 13	Suppression	Apoptose
p53	Protein p53	Chromosom 17	Suppression	Apoptose

d) Klinische Symptomatik

Die klinische Manifestation folgt aus der Tumorlokalisation und dem Entwicklungsstadium. Zu den häufigsten Symptomen gehören Kopfschmerzen, Sehstörungen in Form von Doppelbildern, Gangauffälligkeiten in Form von Ataxie, Schwindel, Synkopen und sekundäre Krampfanfälle (11). Das verdrängende Wachstum führt zum Anstieg des intrakraniellen Druckes und Hydrocephalus (11). Das wenig spezifische Krankheitsbild führt zu Fehldiagnosen und erklärt – zusammen mit dem schnellem Tumorwachstum - warum die Tumore erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden.

e) Diagnostik

Computertomographie (CT) und Kernspintomographie (MRT) werden zur Erstellung der Verdachtsdiagnose durchgeführt. Im CT imponiert das Glioblastom nach der Kontrastmittelgabe als eine unregelmäßige Raumforderung mit ringförmiger Signalverstärkung an den Tumorrändern (20). In der MRT-Bildgebung kann man zusätzlich zu der Kontrastmittelanreicherung auch die zystischen Strukturen, Blutungen sowie Nekrosen identifizieren (20). Zeichen eines Ödems können in angrenzendem Gewebe in beiden Untersuchungstechniken beobachtet werden (11). Eine endgültige Diagnose wird erst nach der histologischen Sicherung der Biopsie gestellt (11). Abbildung 3 zeigt eine exemplarische CT- und MRT-Aufnahme von Glioblastoma multiforme.

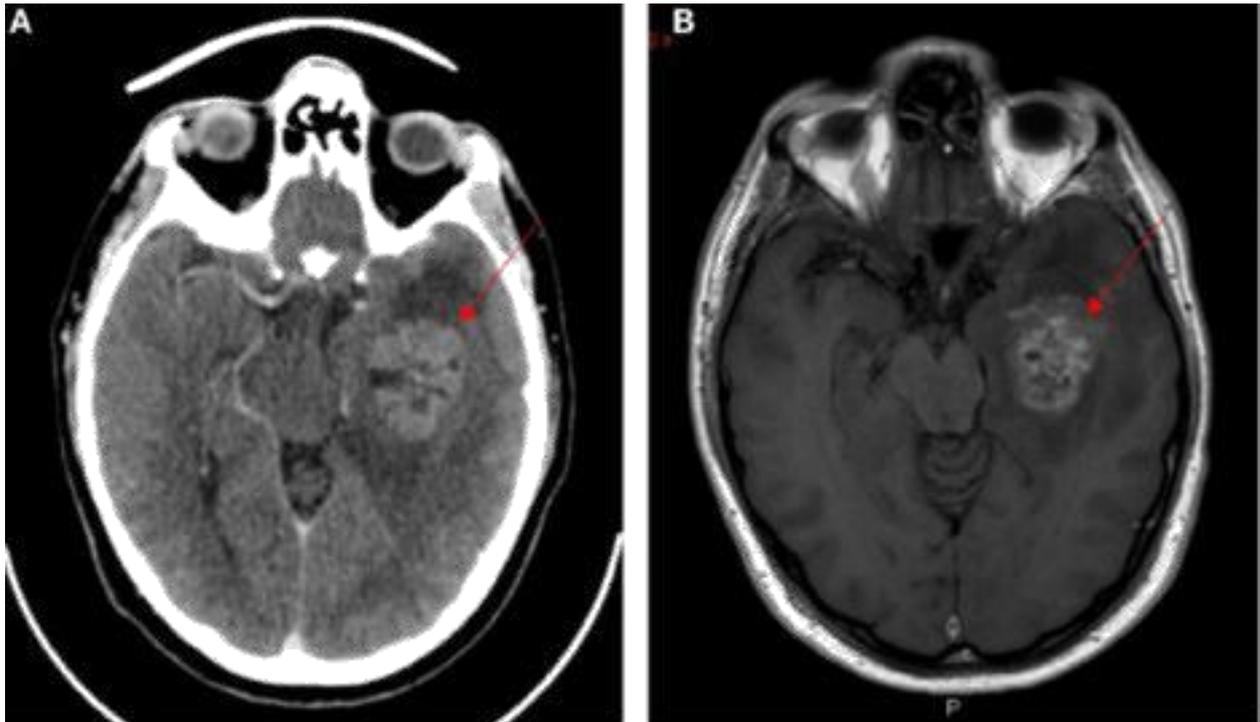


Abbildung 3

Diagnostische Bildgebung von Glioblastoma multiforme. Der Tumor wurde mit Hilfe von CT (A) und MRT (B) jeweils nach der Kontrastmittelgabe in dem frontotemporalen Lappen links dargestellt und mit dem roten Pfeil markiert. Die Abbildung stammt aus Bradshaw et al (20).

f) Therapie der Wahl

Eine Heilung von Glioblastomen ist nicht möglich und jeder Therapieansatz sollte deswegen als palliativ angesehen werden (11, 21). Das Mittel der Wahl bei der Therapie von Glioblastomen ist die Resektion und darauffolgende kombinierte Radio-Chemotherapie nach Stupp (22). Das vollständige Entfernen von Tumorzellen ist aufgrund der hohen Proliferationsrate und Ausbreitung in das umgebende Gewebe nicht möglich (22). Die besten Ergebnisse werden erzielt mit der adjuvanten Radiotherapie von 50-60 Gray und Chemotherapie mit dem Temozolomid aus der Gruppe der Alkylanzien (22). Temozolomid weist eine hohe Bioverfügbarkeit von knapp 100% auf und kann in das zentrale Nervensystem gut eindringen, wo man einen Konzentrationsspiegel von 20-30% der systemischen Konzentration beobachten kann (23). Die Standarddosis am Anfang der Behandlung beträgt 75 mg/m^2 (Körperoberfläche) pro Tag für 6 Wochen (22).

Alternativ können auch monoklonale Antikörper gegen vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) in Form des Präparats Bevacizumab verabreicht werden (11). So kann die Tumor-assoziierte-Angiogenese gehemmt und die tumoreigenen Gefäße beschädigt werden (11). Es konnten jedoch keine eindeutigen Vorteile dieses Therapeutikums für die Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit nachgewiesen werden, sodass Bevacizumab nicht zu der Standardtherapie in Deutschland gehört (21).

Zu den neusten Therapieansätzen gehören außerdem Tumortherapiefelder, bei denen elektromagnetische Wechselfelder niedriger Intensität durch Anbringen von Keramik-Gelpads auf dem Schädel kontinuierlich, nicht invasiv verabreicht werden können (24, 25). So sollte eine Störung des Spindelapparates bei der Zellteilung induziert werden, um die Tumorzellen in die Apoptose zu bringen. Hierbei kann das mediane Überleben um bis zu 4,5 Monate verlängert werden und beträgt somit 20 Monate (24).

Trotz fortschrittlicher Standardtherapie variiert das mediane Überleben zwischen den Studien und beträgt lediglich zwischen 12 und 17 Monaten nach der Primärresektion (26-28), da der Tumor eine sehr hohe Rezidivneigung aufweist (29).

Mikroglia

a) Ursprung

Die Mikroglia sind die primären, nativen Immunzellen des Gehirns und wurden zum ersten Mal als Mikrogliazellen von Rio Hortega 1919 beschrieben. Sie entwickeln sich aus den primitiven Makrophagen des Dottersacks im Embryonalleben und steigen dann in das Gehirngewebe hoch, sodass sie kurz darauf im IV. Ventrikel nachgewiesen werden können (30). Im Gegensatz zu der langjährigen Überzeugung, die peripheren Makrophagen könnten das Gehirn bei pathologischem Geschehen infiltrieren und dann zu Mikroglia ausdifferenzieren, weiß man heute, dass diese Immunzellen von den im Gehirn ansässigen Mikroglia selbst stammen (30).

Die Entwicklung der Mikroglia wird durch den CSF-1 Signalweg eingeleitet (31).

b) Morphologie

Das frühere Modell hat zwei morphologische Typen der Mikroglia beschrieben, welche auf die unterschiedlichen Aktivierungszustände der Zellen zurückzuführen sind und von der Makrophagen-Einteilung abgeleitet wurden (32). Das proinflammatorische Stadium (M1) und das Reparaturstadium (M2) wurden lange zur Beschreibung der Mikroglia-Phenotypen benutzt, werden jedoch heutzutage immer häufiger als Modell abgelehnt (30, 32). Die Mikroglia-Aktivierung wird gegenwärtig als viel komplexerer Prozess angesehen. Die Morphologie der Mikroglia variiert in verschiedenen Erkrankungen sowie im Alter (30). Bestimmte Phenotypen werden beobachtet, wobei der Übergang von einem Phenotyp zum anderen jederzeit erfolgen kann (30, 33).

Verzweigt

Der verzweigte Phenotyp der Mikroglia zeichnet sich durch lange, verzweigte Ausstülpungen und kleinen Zellkörper aus (33, 34). Die Zellen sind immobil, können jedoch über die dendritisch verzweigten Fortsätze konstant in Kontakt mit der Umgebung bleiben, wo sie kleinste Änderungen des physiologischen Milieus registrieren (34). Mikroglia dieser Form führen keine Phagozytose durch (34). Sie werden überwiegend in Abwesenheit von Pathogenen und apoptotischen Zellen gefunden (34).

Reaktiv

Hier wird der Mikroglia-spezifische Marker Iba-1 besonders hoch exprimiert (33).

Nicht-phagozytierend

In Anwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen, Zellresten und Pathogenen sowie bei Milieu-Veränderungen werden die Fortsätze der Mikroglia breiter und kürzer (33). Die Zellen nehmen die MHC I und MHC II Proteine auf, steigern die Sekretion von zytotoxischen und proinflammatorischen Molekülen und erhöhen die Proliferationsrate (33).

Phagozytierend

Die phagozytierenden Zellen weisen eine amöboide Form auf (33). Im Gegensatz zu dem nicht-phagozytierenden Typ kann in diesen Zellen Phagozytose stattfinden und folgend auch die T-Zell-Antwort eingeleitet werden (33). Die Zellen migrieren entlang des

chemotaktischen Gradienten zu der Quelle der Störung und tragen vor Ort zur inflammatorischen Reaktion bei (30, 33).

Amöboid

Dieser Phänotyp ähnelt morphologisch den phagozytierenden Mikroglia, unterscheidet sich jedoch im Hinblick auf die Antigen-präsentierende Funktion (30). Die Zellen bewegen sich frei durch das Hirngewebe und entfernen Zellreste auf dem Weg der Phagozytose, rufen dabei allerdings keine entzündlichen Reaktionen hervor (33).

Gitterzellen

Phagozytierende Zellen, die ihre Kapazitäten erreicht haben und kein weiteres Material aufnehmen können, werden zu den Gitterzellen (33).

Die Mikroglia-Zellen weisen untereinander eine hohe Heterogenität auf. In Abhängigkeit von der Gehirnregion ändert sich das Expressionsmuster der Mikroglia für bestimmte Rezeptoren, wie Neurotensin-2-, Endothelin-, Histamin-, Dopamin-, Nikotin-, Serotonin-, Somatostatin-, GABA- und Vasopressin-Rezeptoren (30). Manche Mikroglia interagieren hauptsächlich mit Neuronen und werden als deren Satelliten-Zellen bezeichnet (30).

c) Funktion

Mikroglia-Zellen erfüllen im Gehirn die Rolle der Makrophagen in der Peripherie (30). Sie sorgen für die Homöostase, indem sie stets das Gehirngewebe überwachen (30). Sie erkennen Pathogene und Zellreste und entfernen sie auf dem Weg der Phagozytose (30). Mikroglia scheinen auch imstande zu sein, die apoptotischen Zellen zu lokalisieren und an den Ort des Geschehens zu migrieren (30, 33).

Mikroglia-Zellen tragen zur neuronalen Entwicklung bei, indem sie die unbenutzten Synapsen beseitigen und die Neuroplastizität ermöglichen (30, 31). Darüber hinaus unterstützen sie die Proliferation und das Zellüberleben der neuralen Präkursor-Zellen (30). Es wurde eine Reihe von Signalwegen beschrieben, die beim pathologischen Geschehen partiell oder vollständig von Mikroglia-Zellen eingeleitet werden. Zu den wichtigsten gehören die Signalkaskade des TNF- α und der diversen TLR-Rezeptoren (30). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sind vor allem die TLR-Rezeptoren von Bedeutung, die in einem separaten Kapitel (Toll-Like-Rezeptor-Familie, s. - 35 -) beschrieben werden.

d) Geschlechtsunterschiede

Die Mikroglia unterscheiden sich in Bezug auf Morphologie und teilweise auch auf die Funktionalität zwischen dem männlichen und weiblichen Geschlecht, was am ehesten auf Unterschiede im Hormonhaushalt zurückzuführen ist (35). In der präoptischen Region ist die Dichte der Mikroglia beim männlichem Geschlecht höher (30). Morphologisch imponieren diese Zellen mit erhöhtem Zellkörper und reduzierter Ramifikation sowie Ausstülpungslänge im Vergleich zu den weiblichen Mikroglia (30, 35). Diese Unterschiede werden als die Ursache für die Geschlechtsunterschiede in manchen psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen wie zum Beispiel Autismus in Betracht gezogen (36).

e) Tumor-assoziierte-Mikroglia

Die Tumormasse in den Hirntumoren besteht bis zu 30 % aus den infiltrierenden Mikroglia sowie peripheren Monozyten – wobei der Anteil der Mikroglia an den myeloischen Zellen ca. 75 % beträgt und der Anteil der peripheren Monozyten 25 % (37). Diese Zellen unterscheiden sich funktionell von den Mikroglia in gesundem Gewebe, vor allem in Bezug auf das Expressionsniveau bestimmter Zytokine und werden als Tumor-assoziierte-Mikroglia (TAM) bezeichnet (38). Die TAM werden von den Glioblastom-Zellen zur Expression bestimmter, tumorwachstumsfördernder Faktoren stimuliert und beteiligen sich somit an der Tumorentwicklung, anstatt die neoplastischen Zellen korrekt zu erkennen und zu eliminieren (38). Ein bedeutsamer Signalweg ist hier die TLR-2-Signalkaskade (38).

Glioblastoma multiforme – Mikroglia – Interaktion

Interaktionen zwischen Mikroglia und Glioblastom-Zellen ereignen sich auf mehreren Ebenen und betreffen unter anderem Änderungen der extrazellulären Matrix, die Reorganisation vom Zytoskelett der Mikroglia, die Regulation und Sekretion von Zytokinen, Chemokinen sowie von neurotrophen und metabolischen Faktoren (38).

Die Gliome setzen verschiedene chemoaktive Faktoren frei, wie MCP-1, GDNF, CSF-1 und Versican, welche die Mikroglia in die Tumor-assoziierten-Mikroglia (TAM)

umwandeln (38). Die Präsenz von TAM wird mit höherer Aggressivität des Tumors und schlechterer Prognose für die Patienten in Verbindung gebracht (38).

a) Einfluss von Glioblastoma multiforme auf Mikroglia

- **Mikroglia Rekrutierung**

Die Immunzellen werden durch eine Reihe von Substanzen angelockt, die der Tumor produziert. Dazu gehören unter anderem CSF-1, MCP-1, GDNF, Osteopontin, Lactadherin und Tenascin-C (38). CSF-1 ist verantwortlich für die Reifung der phagozytierenden Zellen und steigert deren chemotaktische Aktivität (38). Osteopontin und Lactadherin aktivieren den TAM Integrin/FAK/PI3K-Signalweg und führen zu Veränderungen in der Aktin-Bildung in den Mikroglia (38). Auch Tenascin-C und GDNF stimulieren die Reformierung des Zytoskeletts der Immunzellen und führen so zur Migration der Mikroglia in Richtung der Tumorzellen (38).

Aus der Reihe der Chemokine sind vor allem die Fractalkine und CXCL-12 von großer Bedeutung für die Chemotaxis in den Mikroglia. Fractalkine werden unter normalen Umständen durch Neuronen und Astrozyten produziert (39). Die Glioblastoma-Zellen produzieren ebenso Fractalkine und locken so die Mikroglia an (38). CXCL-12 stimuliert die Migration von Mikroglia insbesondere zu den hypoxischen Arealen des Tumors (38).

- **Mikroglia Aktivierung**

Unter dem Einfluss von den genannten und weiteren Chemo- und Zytokinen erfolgt die Stimulation und Aktivierung der Mikroglia. Die Zellen exprimieren vermehrt tumorfördernde Faktoren, während die Expression der tumorsupprimierenden Substanzen runterreguliert wird. Es folgt die Transformation von Mikroglia in die TAM (38).

- **Suppression der Immunantwort**

Interleukine spielen eine Schlüsselrolle in der Immunreaktion. Interleukin-10 (IL-10), exprimiert durch das Glioblastom, ist imstande, die Expression von MHC-II präsentierenden Genen an der Mikroglia-Oberfläche zu reduzieren, sodass die Immunantwort in T-Zellen nicht induziert werden kann (38). Es kann auch die Produktion von proinflammatorischen Faktoren wie TNF- α in Mikroglia runterregulieren (38). Auch die gegen den Tumor gerichteten zytotoxischen T-Lymphozyten werden über sogenannte

Zellzyklus-Kontrollpunkte (aus dem Englischen Checkpoints) reguliert, wie der PD-1 Rezeptor und seine Liganden PD-L1 und PD-L2 (38). Vor allem PD-L1 ist hoch exprimiert im Glioblastom (38). Er interagiert mit den PD-1 Rezeptoren an den aktivierten T-Zellen und ruft die negative Antwort hervor, sodass die Immunzellen den Tumor nicht angreifen (38).

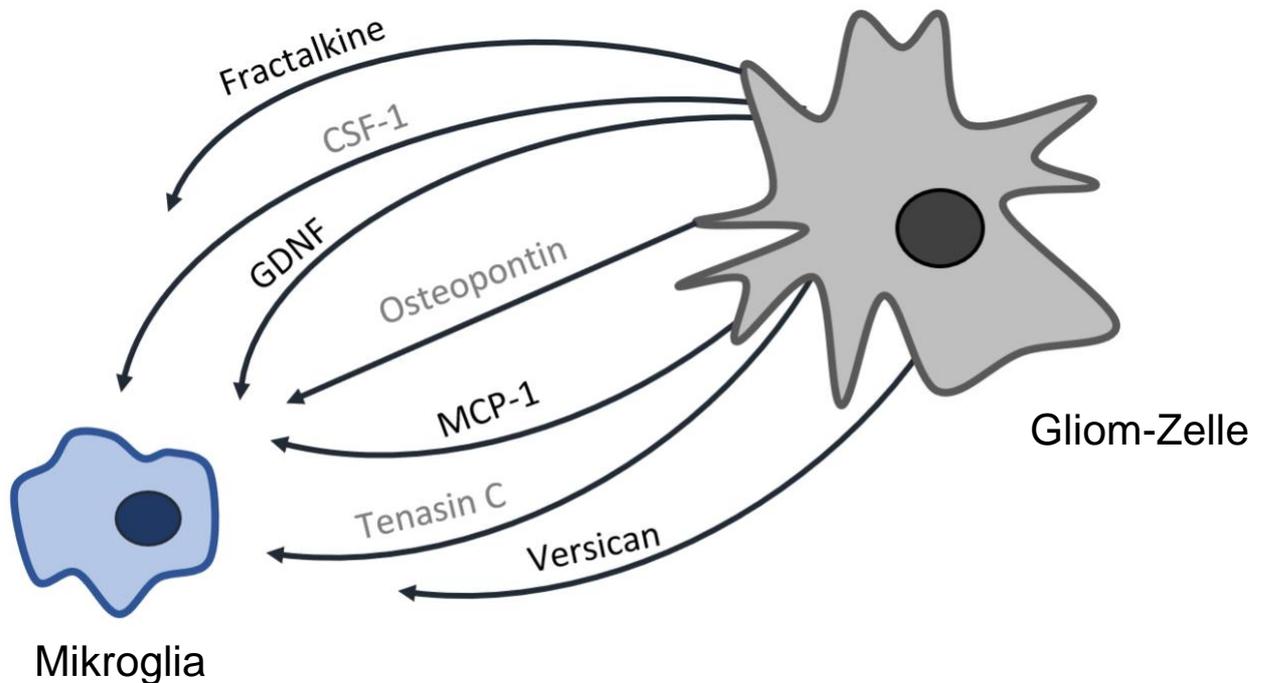


Abbildung 4

Schematische Darstellung des Einflusses vom Glioblastom-Zellen auf die Mikroglia. Die Gliom-Zellen schütten mehrere Faktoren aus, die zur Aktivierung und Migration der Mikroglia führen. Dazu gehören Fractalkine, CSF-1, GDNF, Osteopontin, MCP-1, Tenasin C sowie Versican.

b) Einfluss von TAM auf Glioblastoma multiforme

Die TAM stimulieren die Produktion von antiinflammatorischen Molekülen wie TGF- β , ARG1, IL-10 wie auch den proinflammatorischen Molekülen TNF- α , IL1- β , CXCL-10 (38). Auch die Angiogenese und Invasivität des Tumors werden unterstützt durch VEG, MMP-2, MMP-9 und MMP-14(38).

- **Tumorwachstum und -proliferation**

Die TAM werden veranlasst, den EGF vermehrt zu exprimieren, das an dem entsprechenden Rezeptor der Tumorzellen bindet und die Proliferation der neoplastischen Zellen einleitet (38). Die TAM produzieren Interleukine, TGF- β , MCP-1 und PGE-2, die das Tumorwachstum unterstützen (38). Als Folge der Stimulation mit Osteopontin und Lactadherin wird die Freisetzung von der Arginase-1 (ARG-1) gesteigert, die wiederum von den Tumorzellen als wichtiges Signalprotein empfangen wird und die Tumorzellproliferation fördert (38). Mikroglia produzieren auch das Stress-induzierbare Protein (STI-1), welches die Proliferation und Migration der Glioblastom-Zellen stimuliert (38). Dies geschieht als Antwort auf das von dem Glioblastom kontinuierlich freigesetzte CSF-1 (38).

- **Tumorzellinvasion und Metastasierung**

- ✓ **Interleukin-6**

Das von Glioblastom-Zellen produzierte MCP-1 erhöht die Expression von IL-6 in TAM, was die Invasivität und das Metastasierungspotenzial des Tumors über die TLR-4-Signalkaskade unterstützt (38). IL-6 induziert außerdem die VEGF-Synthese und leitet somit die Angiogenese der Tumorgefäße ein (38). Vor allem in den hypoxischen Tumorregionen werden TAM dazu veranlasst, die Bildung neuer Gefäße mit dem VEGF zu fördern (38). Interessanterweise können die TAM in den tumorinhibierenden Typ zurück umgewandelt werden, wenn die VEGF-Produktion extern gestört wird (38).

- ✓ **Matrix-Metalloproteasen**

Die für die Invasivität des Tumors unentbehrlichen Substrate sind die Metalloproteasen. Sie degradieren die extrazelluläre Matrix in der Umgebung des Tumors und ermöglichen damit die Ausbreitung der neoplastischen Zellen (38). Die Metalloprotease-2, Metalloprotease-9 und Metalloprotease-14 werden vermehrt von TAM unter dem Einfluss der IL-6, der Fractalkine sowie überwiegend als Endprodukte der TLR-2-abhängigen Signalkaskade produziert (38).

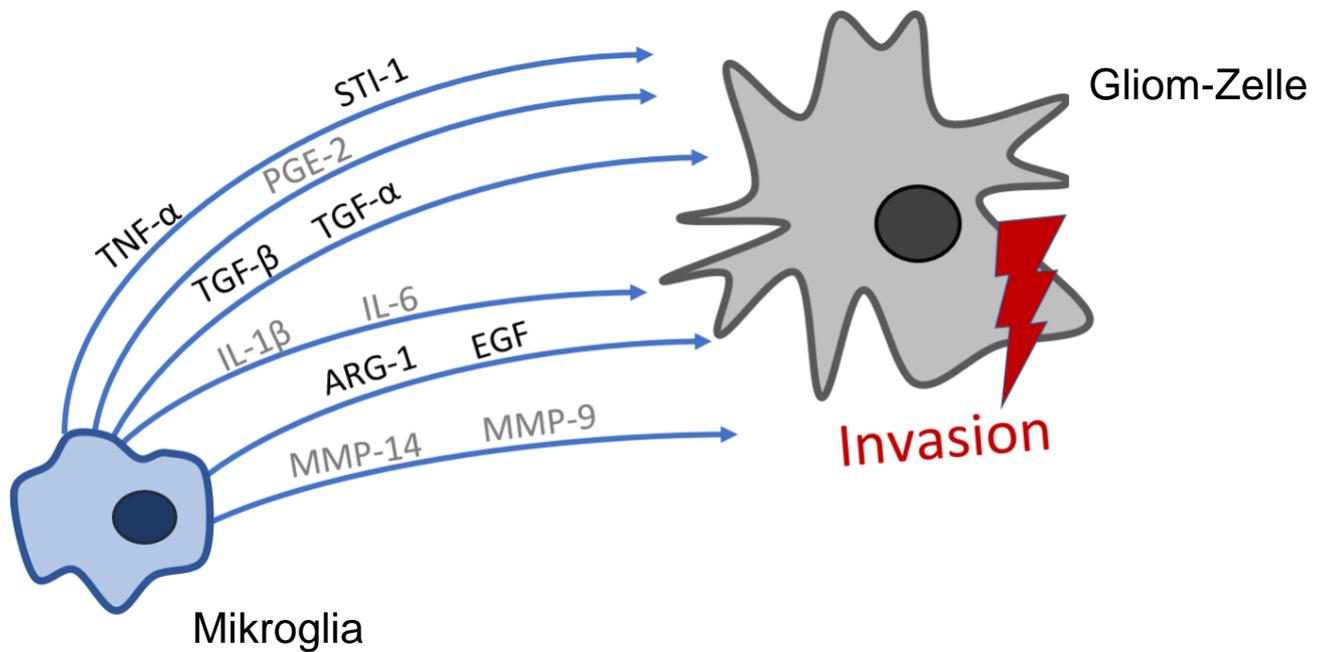


Abbildung 5

Schematische Darstellung des Einflusses von TAM auf die Glioblastom-Zellen. Zuvor von Gliom-Zellen stimulierte Tumor-assoziierte Mikroglia exprimieren eine Reihe von proinflammatorischen Substanzen, die die extrazelluläre Matrix degradieren und die Invasion des Tumors begünstigen. Dazu gehören TNF- α , TGF- α und TGF- β , STI-1, PGE-2, IL-1 β , IL6, ARG-1, EGF sowie MMP-9 und MMP-14.

- **Immunsuppression**

Die Glioblastom-Zellen sind imstande, die TAM zur Produktion von immunsuppressiven Molekülen, wie IL-10, TGF- β 1, MCP-1 zu stimulieren (38). MCP-1 setzt eine Signalkaskade in Gang, an deren Ende IL-10 und TGF- β produziert werden (38). Je nach Expressionslevel kann TGF- β sowohl tumorfördernd als auch tumorinhibierend wirken (38). Zusätzlich hemmt TGF- β in hohen Konzentrationen die gegen den Tumor gerichtete Immunreaktion (38). Die TAM exprimieren sehr hohe Mengen an TGF- β und können auch zur Expression von PD-L1 und somit zur T-Zell-Blockade vom Tumor angeregt werden (38).

c) Glioblastoma multiforme und Mikroglia - Toll-Like-Rezeptor-2-Signalkaskade

Das von Mikroglia-Zellen produzierte TGF- β stimuliert die Glioblastom-Zellen zur Expression von der MMP-2 in ihrer inaktiven Form (38). Damit sie ihre Wirkung entfalten

kann, muss sie aktiviert werden durch MMP-14 (38). Die Glioblastoma-Zellen aktivieren den Toll-Like-Rezeptor-2-Signalweg durch die Freisetzung von dem TLR-2- Agonisten Versican (38). Dieser bindet an den TLR-2, welcher in Mikroglia exprimiert wird (38). Als Folge wird die MMP-9 freigesetzt und die MMP-14 an der Mikroglia-Zellmembran exprimiert (38). Die MMP-14 bindet an der inaktiven MMP-2 und überführt sie in das aktive Stadium (38).

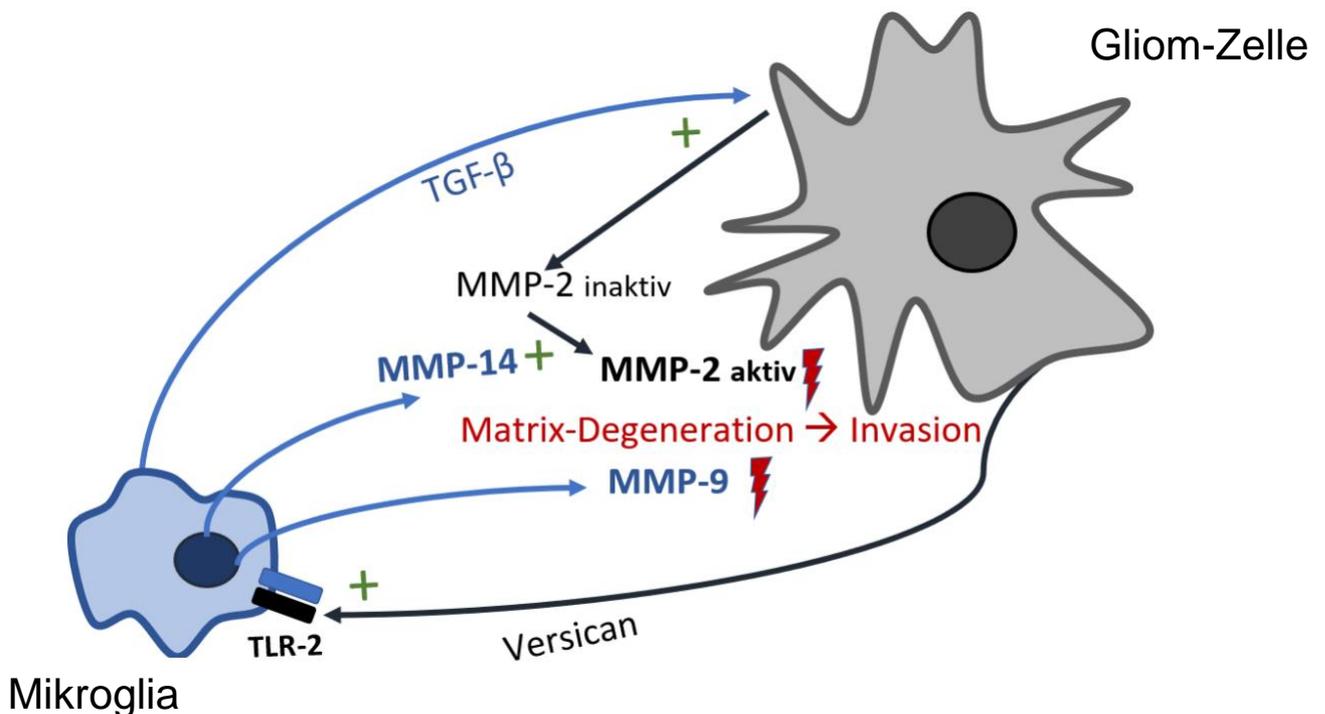


Abbildung 6

Darstellung des Gliom-induzierten TLR-2-Signalpfades in Mikroglia. Die aktivierten Mikroglia schütten TGF- β aus, das die Gliom-Zellen zur Expression von inaktiver MMP-2 veranlasst. Die Tumorzelle produziert auch Versican, das als TLR-2-Ligand an den mikroglialen TLR-2 andockt und die Signalkaskade aktiviert. Infolgedessen exprimieren die TAM MMP-9 und MMP-14. MMP-14 führt die inaktive MMP-2 in die aktive Form über. Die MMP-9 und aktivierte MMP-2 führen zur Degeneration der extrazellulären Matrix und ermöglichen die Invasion des Tumors.

Toll-Like-Rezeptor Familie

Die Toll-Like-Rezeptoren (TLR) sind Proteine, die an den Signalwegen der angeborenen Immunantwort beteiligt sind. Sie gehören zur Familie der Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRR) und aktivieren die Immunantwort-Kaskade durch

Erkennung von pathogen-assoziierten molekularen Mustern (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), wie beispielsweise dem Lipopolysaccharid, einem Bestandteil der Zellwand von bestimmten Bakterien (40). Die TLR beteiligen sich damit an der Abwehr vor mikrobiologischen Pathogenen. Die Mehrzahl der TLR spielen eine Rolle in der Entwicklung und Progression des Glioblastoma multiforme (40). Der Fokus dieser Arbeit liegt auf dem TLR-2.

a) Vorkommen

Die TLR werden überwiegend von den Immunzellen exprimiert (40). Dazu gehören Lymphozyten, dendritische Zellen, Makrophagen in der Peripherie sowie die Mikroglia im zentralen Nervensystem. In viel geringerem Ausmaß können die TLR auch in den Epithelzellen vorkommen (40).

b) Biochemie

Toll-like-Rezeptoren sind Transmembran-Glykoproteine vom Typ I, bestehend aus der intrazellulären Domäne TIR (aus dem Englischen: toll–interleukin1 receptor homology domain), einer einzelnen Transmembran-Helix-Domäne und einer Exodomäne, die von N-terminalen, Leucinreichen LRR-Sequenzen (aus dem Englischen: Leucine-rich Repeats) gebaut wird (40). Es wurden bisher dreizehn Subtypen des TLR beschrieben, von denen zehn bei Menschen auftreten (40). Die TLR-3, -7, -8, und -9 werden intrazellulär in der Membran von Endosomen und Endolysosomen exprimiert, während die übrigen TLR (1,2,4,5,6,10) sich in der Zellmembran der Immunzellen befinden (40). Allen TLR gemeinsam ist die TIR-Domäne, welche die Aktivierung von der intrazellulären Signalkaskade vermittelt (40). Die Unterschiede zwischen den einzelnen TLR folgen aus den unterschiedlichen Kontakt-Proteinen für die TIR-Domäne sowie feinen strukturellen Unterschieden in den immer vorhandenen LRR-Sequenzen, welche die Pathogene erkennen (40).

Tabelle 5
TLR-Familie – Übersicht. Erstellt anhand von(40)

	Lokalisation	zu erkennende Pathogene	Kaskade- inizierende Proteine	exprimierte Gene
TLR-1	Zellmembran	Uropathogenetische Bakterien	MyD88	Inflammatorische Zytokine
TLR-1/2	Zellmembran	Triacyl-Lipopeptide	TIRAP, MyD88	Inflammatorische Zytokine
TLR-2/6	Zellmembran	Diacyl-Lipopeptide	TIRAP, MyD88	Inflammatorische Zytokine
TLR- 3	Endosomen- membran	ds-RNA	Trif	Inflammatorische Zytokine, Interferon Alpha
TLR-4	Zellmembran	Lipopolysacharide	TIRAP, MyD88, TRAM, Trif	Inflammatorische Zytokine, Interferon- α
TLR-5	Zellmembran	Flagellin	MyD88	Inflammatorische Zytokine
TLR-7/8	Endosomen- membran	Midazoquinoline ssRNA	MyD88	Inflammatorische Zytokine, Interferon- α
TLR-9	Endosomen- membran	CpG DNA Hemozoin	MyD88	Inflammatorische Zytokine, Interferon- α
TLR-11 (murin)	Zellmembran	Profilin-ähnliche Proteine Uropathogenetische Bakterien	MyD88	Inflammatorische Zytokine

c) Toll-like-Rezeptor-2

Der Toll-Like-Rezeptor-2 (TLR-2) wird auch CD282 genannt (aus dem Englischen: cluster of differentiation 282) und wird vom TLR-2-Gen auf dem Chromosom 4 kodiert (40).

- **Dimerisation**

Der TLR-2 bildet Heterodimere mit TLR-1 und TLR-6 (40).

- **Funktion**

Der TLR-2 vermittelt die Immunantwort gegen Hefe und Gram-positive Bakterien sowie eine Reihe von viralen Erregern in einer Signalkaskade, die in die Expression von NF- κ B resultiert (40). Beispiele für Agonisten von TLR-2 sind Peptidoglykane, Lipopeptide, Lipoprotein sowie auch das von dem Glioblastoma multiforme ausgeschüttete Versican (38, 40). Im Darm beteiligt sich der TLR-2 an der Entgiftung bestimmter karzinogener Substanzen, wie Benzopyrene, indem er die Expression des Enzyms CYP1A1 reguliert (40).

- **Signalweg**

Der Signalweg zwischen MyD88-Aktivierung (aus dem Englischen: myeloid differentiation primary-response gene 88) und NF- κ B (aus dem Englischen: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) sowie AP-1 Stimulation ist fast allen TLR gemeinsam (41). Für TLR-2 ist das Vorhandensein des TIRAP (TIR-Adaptorprotein) von essenzieller Bedeutung (41). Durch den Stimulus vom entsprechenden TLR-Liganden bildet der TLR-2 einen Heterodimer mit TLR-1 oder TLR-6. Es kommt zur Umstrukturierung des TLR-2-Dimers. Die TIR-Domäne des TIRAP bindet an der TIR-Domäne des Rezeptors und rekrutiert das Adaptorprotein MyD88 (41). Das aktivierte MyD88 rekrutiert die IL-1-Rezeptor-assoziierte-Kinase 4 (IRAK-4), welche anschließend die IRAK-1 und IRAK-2 phosphoryliert, die wiederum den TRAF-6 (TNF-Rezeptor-Assoziierter-Faktor) unabhängig voneinander aktivieren (41). Das führt zur Aktivierung vom IKK-Komplex, welcher die I κ B phosphoryliert und ubiquitiniert (41). Als Folge kommt es zur Hochregulation der NF- κ B -Gen-Expression (41). Der TRAF-6 aktiviert auch die Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK p38) (41). Diese wiederum stimuliert AP-1 und triggert die Gen-Transkription von Zytokinen (41). Die Endprodukte vom TLR-2 Signalweg sind diverse Zytokine wie IL-2, IL-12, TGF- α , TGF- β und Metalloproteasen wie MMP-14, MMP-2 und MMP-9 (41).

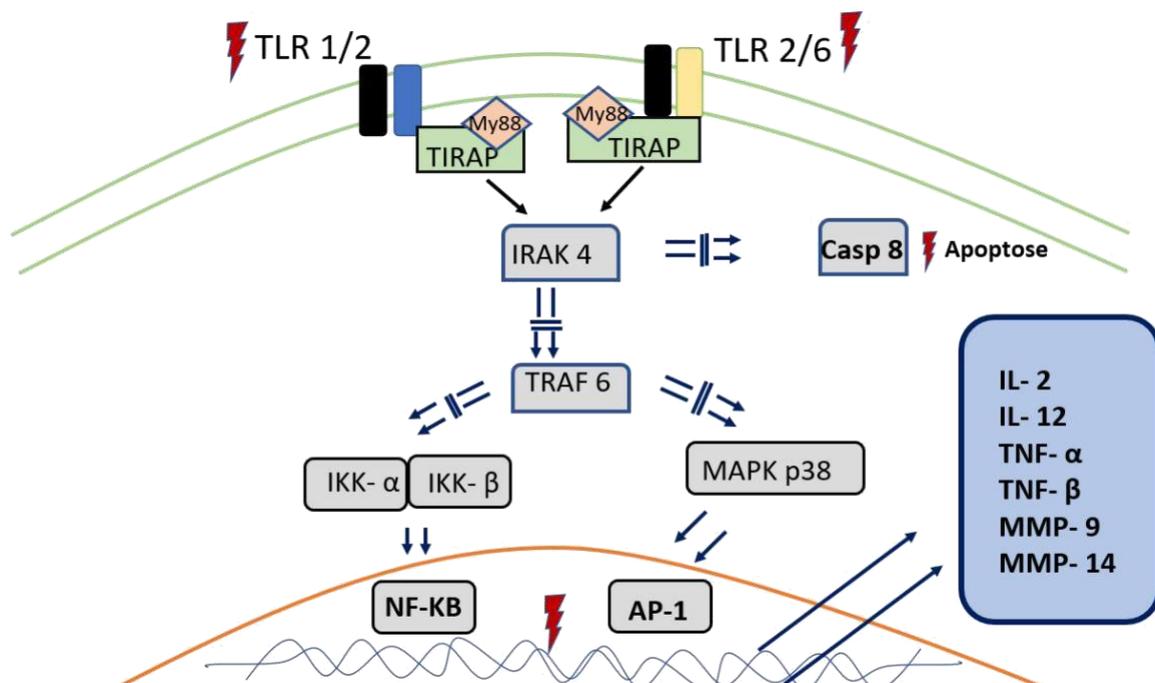


Abbildung 7

Vereinfachte schematische Darstellung des TLR-2-Signalfades. Durch entsprechende Stimuli bildet der membranständige TLR-2 einen Heterodimer mit dem TLR-1 oder TLR-6 und aktiviert die intrazellulär gelegene Einheit TIRAP, die einen Komplex mit My88 bildet. Daraufhin kommt es zur Aktivierung von IRAK-4, gefolgt von Casp8, welche Apoptose auslösen kann. IRAK-4 aktiviert auch in mehreren Schritten den TRAF-6 und folgend MAPK p38 sowie einen Komplex aus IKK- α und IKK- β . Das führt zur Aktivierung von AP-1 und NF- κ B, die die Expression unterschiedlicher proinflammatorischer Zytokine hervorrufen, darunter IL-2, IL-12, TNF- α , TNF- β sowie MMP-9 und MMP-14.

Antagonisierung des TLR-2

Zwei wichtige Adaptorproteine in der TLR-2-Signalkaskade sind MyD88 und TIRAP. Die TIR-Domäne des TLR-2 enthält in ihrer kristallinen Struktur eine funktionelle Tasche, die von der BB-Schleife gebildet wird – einer hochkonservierten Sequenz, die zwischen dem zweiten Strang (Beta-B-Strang) und der zweiten Helix (Alpha-B-Helix) lokalisiert ist (42). Mutationen in diesem Bereich führen zum Funktionsverlust der TIR-Domäne und fehlender Rekrutierung von My88 im Rahmen der TLR-2-Signalkaskade (42). Diese

Tasche kann von kleinen Molekülen besetzt werden, die dann als TLR-2 Antagonisten fungieren (42). Vor allem C₂₉-Moleküle, benannt nach der Anzahl von Kohlenstoffatomen, die sie enthalten, haben sich als potente TLR-2-Antagonisten erwiesen (42). Dazu gehört unter anderem der natürliche Aroma- und Duftstoff ortho-Vanillin (42).

- **TLR-2 und Glioblastoma multiforme**

Obwohl die TLR-Familie in den gesunden Zellen ausschließlich von den Immunzellen exprimiert wird, konnte ein Nachweis von mehreren TLRs in den murinen Tumorzellen GL261 erbracht werden (43). Auch der für diese Arbeit bedeutsame TLR-2 war in diesen Zellen hochreguliert (43). Die Expression von TLR-2 in humanen U87-Tumorzellen und peripheren Monozyten ist vergleichbar (44).

- **TLR-2 und Minocyclin**

Minocyclin gehört zur Gruppe der Tetracycline – Antibiotika, welche die bakterielle Proteinsynthese durch Interaktion mit der ribosomalen 30s-Einheit hemmen (45). Zusätzlich inhibiert Minocyclin auch den MAP-Kinase-Weg, einen Teil von dem TLR-2-Signalpfad (45). Infolgedessen kommt es unter anderem zur Reduktion der Expression von der MMP-14 in Mikroglia (46). Dieser Mechanismus führt im Glioblastom zur Abnahme der Tumorexpansion (46).

Vanillin

Vanillin ist ein natürlicher Aromastoff, der hauptsächlich in den Kapsel Früchten der Pflanze *Vanilla planifolia* (Gewürzvanille) vorkommt und eine weitverbreitete Anwendung in der Lebensmittelindustrie und Kosmetik findet (47).

a) Biochemie

Als chemische Verbindung kann Vanillin den Derivaten von Benzylaldehyden zugeordnet werden, die aus dem charakteristischen aromatischen Ring bestehen (47). Man kann drei funktionelle Gruppen unterscheiden: die Aldehydgruppe, die Methoxygruppe und die Hydroxylgruppe (48).

Ortho-Vanillin (o-Vanillin) ist eine besondere Form des Vanillins, das durch die Position der Hydroxylgruppe (OH-Gruppe) relativ zur Aldehydgruppe an dem aromatischen Ring bestimmt wird (48). Die OH-Gruppe bindet bei dem o-Vanillin an dem C2-Atom ausgehend von dem C-Atom der Aldehydgruppe, im Gegensatz zum para-Vanillin – auch einfach Vanillin genannt – bei der die Gruppe entsprechend dem C4-Atom entspringt (48). Dies hat einen Einfluss auf die räumliche Ausbreitung der chemischen Substanz und ihre Reagibilität mit anderen Substanzen (48). Die chemische Bezeichnung des o-Vanillins lautet 2-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (48).

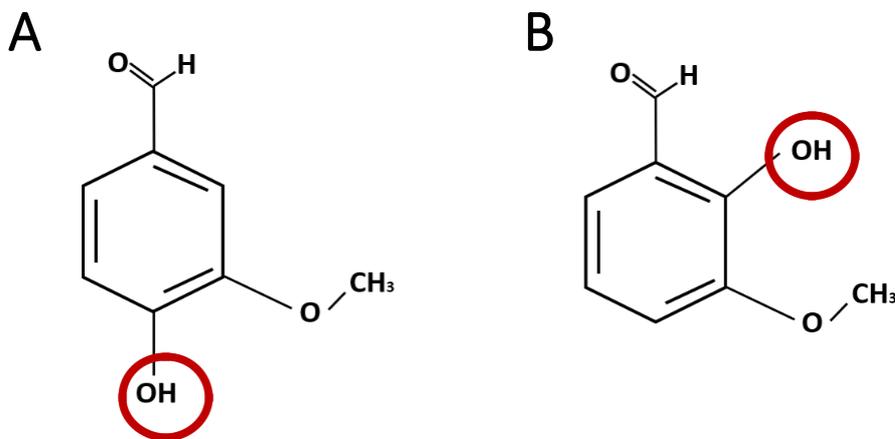


Abbildung 8

Chemische Struktur von Vanillin und ortho-Vanillin. (A) Vanillin unterscheidet sich von dem o-Vanillin (B) in der Position von Hydroxy-Gruppe (-OH) an dem aromatischen Ring.

Die stereotaktische Formel ist gemeinsam für alle drei Varianten des Vanillins und wird beschrieben als C₈H₈O₃ (48). Die physikalischen und chemischen Eigenschaften von o-Vanillin können der Tabelle 6 entnommen werden

Tabelle 6

Physikalische und chemische Eigenschaften von o-Vanillin. Erstellt anhand von (48)

Physikalische Eigenschaften	
Schmelzpunkt	265,5 °C
Siedepunkt	44,5 °C
Aggregatzustand	fest
Form	kristalline Nadeln
Farbe	hellgelb
Löslichkeit	hoch: Tetraflurohydant (5,37M), Ethanol (3,04M), Methanol (2,27M) niedrig: Wasser
Chemische Eigenschaften	
Stereotaktische Formel	C ₈ H ₈ O ₃
Molekulare Masse	152,15 g/mol
Dichte	1,231 g/mL
Ausgehende Substanz	Benzaldehyd
Funktionelle Gruppen	Aldehydgruppe, Hydroxylgruppe, Methoxylgruppe

b) Toxizität

o-Vanillin wird im Allgemeinen als wenig bis moderat toxisch bezeichnet. Der amerikanische Industrieverband Flavor and Extract Manufacturers Association (FEMA), der Duft- und Geschmacksstoffe als sicher zum Verzehr klassifiziert, hat Vanillin einen positiven Sicherheitsstatus verliehen - GRAS (aus dem Englischen: generally regarded as safe) (49).

Die orale letale Dosis beschreibt die Menge einer Substanz, die benötigt wird, um die Hälfte der exponierten Zellen zu töten. Für o-Vanillin beträgt sie 1,58-2,8 g/kg (pro Kilogramm Körpergewicht) bei der oralen Aufnahme durch Ratten (48). Die Konzentration von o-Vanillin, die in der Lebensmittelindustrie angewandt wird variiert zwischen 0,3 und 33 mM (49).

Die Toxizität des o-Vanillins wurde von der amerikanischen Bundesbehörde für arbeitsmedizinische Forschung (The National Institute for Occupational Safety and Health - NIOSH) bestimmt und kann der Tabelle 7 entnommen werden (48).

Tabelle 7

Zytotoxizität von o-Vanillin in Menschen. Erstellt anhand von NIOSH-Daten in (48).

Zytotoxizität in Menschen		
o-Vanillin		
Test	Zelltyp	Dosis
DNA-Schäden	Alle Zellen	2,5mM
Störung des Schwesterchromatid-Austauschs	Lymphozyten	1 mM
Akute Toxizität	Alle Zellen	2,5 mM

c) Eigenschaften

Es wurden antimutagene, antiangiogenetische und analgetische Eigenschaften des o-Vanillins beschrieben (50-52). Es wirkt protektiv oder beschwerdelindernd bei einer Reihe von Erkrankungen, darunter bei Colitis ulcerosa und Sichelzellanämie (53, 54). o-Vanillin wirkt auch antioxidativ, indem es die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) beseitigt und so den oxidativen Schäden an Lipiden und Proteinen vorbeugt (50). In neueren Studien wurde auch der antikarzinogene Einfluss des o-Vanillins beschrieben (52, 55-58).

Zielsetzung

Das übergeordnete Ziel dieser Doktorarbeit ist die Untersuchung des Einflusses von o-Vanillin auf Glioblastoma multiforme und die Evaluation des möglichen therapeutischen Einsatzes dieser Substanz bei Gliomen.

Insbesondere sollte zum einen die Rolle des o-Vanillins in der TLR-2-vermittelten Mikroglia-Aktivierung weiter untersucht werden.

Zum anderem sollte auch die mögliche direkte Beeinflussung der Tumorzellen durch die Hemmung des TLR-2-Pfades in den GL261-Zellen evaluiert werden.

Auch die potenzielle Rolle der o-Vanillin-induzierten aber TLR-2-unabhängigen Mechanismen im murinen Tumormodell sollte erörtert werden.

Materialien und Methoden

Materialien

Zelllinien

Tabelle 8 Zelllinien

Zelllinie	Bezeichnung im Text	Information	Bezugsquelle
Glioma 261 Wildtyp	GL261-Zellen	Adhärente murine Gliom-Zellen; Ursprung des Tumors: intrakranielle Injektion von 3-Methylcholanthren in CL57/BL6 Mäusen	National Cancer Institute, NCI-Frederick, MD, USA
Uppsala 87 Malignant Glioma	U87-Zellen	Adhärente humane Gliom-Zellen; Ursprung des Tumors: Biopsat eines primären Glioblastoma multiforme vom unbekanntem Patienten 1966	ECACC, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mikroglia	Mikroglia	Adhärente primäre murine Ursprung der Zellen: Hirnrinde neugeborener C57BL/6 Mäuse	C57BL/6 Mäuse
mCherry Glioma 261	mCherry GL261-Zellen	Adhärente murine Gliom-Zellen; Ursprung: Glioma 261 Wildtyp; Zellen transfiziert mit mCherry-Protein (GeneCopoeia)	Glioma 261 Wildtyp

Tiere

Tabelle 9
Tiere

Name	Bezeichnung im Text	Information	Bezugsquelle
C57BL/6 Wildtyp Mäuse	C57BL/6 Mäuse	-	Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA
C57BL/6 MacGreen Mäuse	MacGreen Mäuse	aus den C57BL/6 Wildtyp Mäusen generiert; Vektor pEGFP-N1	C57BL/6 Mäuse

Zellkultur

Zubehör

Tabelle 10
Zubehör

Material	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
BRAND® Neubauer Zählkammer	Zählkammer	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zellkultur-Flasche T25	Zellkultur-Flasche T25	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürmbrecht, Deutschland
Zellkultur-Flasche T75	Zellkultur-Flasche T75	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürmbrecht, Deutschland

Material	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
Pipettenspitzen Brand Standard (10µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf Research Pipetten (2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Pipetten 2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pipetboyacu 2	Pipetboy	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Pasteur-Pipetten	Glaspipette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TC Platte, 96 Well, Standard F	96-Well-Platte	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürmbrecht, Deutschland
TC Platte, 24 Well, Standard F	24-Well-Platte	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürmbrecht, Deutschland
TC Platte, 12 Well, Standard F	12-Well-Platte	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürmbrecht, Deutschland
TC Platte, 6 Well, Standard F	6-Well-Platte	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürmbrecht, Deutschland
CELLSTAR, Zellkulturschale, 35mm x 10mm	Kleine Petri-Schale	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Material	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
TC-Schale 100, Standard	Große Petri-Schale	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürmbrecht, Deutschland
SafeSealMicrotubes, Eppendorf Gefäß 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Eppendorf Gefäß 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürmbrecht, Deutschland
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Falcon Röhrchen 15 ml	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Falcon Röhrchen 50 ml	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Zellschaber	Zellschaber	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürmbrecht, Deutschland
Steritop™ Filtereinheiten, 33 mm	Sterilfilter	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland

Medien und Chemikalien

*Tabelle 11
Medien und Chemikalien*

Medium/Substanzname	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
DMEM - Dulbecco´s modified Eagle´s Medium	DMEM	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Medium/Substanzname	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
Advanced RPMI 1640 Medium	RPMI	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
DPBS - Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline; no calcium, no magnesium	PBS	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
HBSS - Hank's Balanced Salt Solution	HBSS	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
L-Glutamin	L-Glutamin	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Penicillin/Streptomycin, flüssig 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml	Penicillin/Streptomycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Recombinant Human Insulin	Insulin	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Vitamin C	Vitamin C	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Tris	Tris	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Trypsin/EDTA	Trypsin	VWR International, Darmstadt, Deutschland

Medium/Substanzname	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
Glucose	Glucose	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Testsubstanzen

Tabelle 12
Testsubstanzen

Produktname	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
Adenosine 5'-triphosphate disodiumsalhydrate, ATP	ATP	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
LPS	LPS	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Pam3Cys-Ser-(Lys)4, TLR1/TLR2 agonist	TLR-2-Agonist	Abcam, Cambridge, MA, USA
O-Vanillin, 99%. 0,007 % in Ethanol gelöst	O-Vanillin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
3-Ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde ReagentPlus®, 99%	Ethylvanillin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ClodronateLiposomes, 5 ml	Clodronat-Liposomen	Liposoma B.V, Amsterdam, Niederlanden

Farbstoffe

Tabelle 13
Farbstoffe

Produktname	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride	DAPI	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hoechst	Hoechst	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Trypan Blue solution 0.4%, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture	Trypan Blau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
alamarBlue™ CellViabilityReagent	AlamarBlue	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Organotypische Hirnschnitte

Tabelle 14
Organotypische Hirnschnitte

Produktname	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
Falcon® 6-well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate	OBSC-6-Well-Platte	Corning Optical Communications GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Falcon® Permeable Support for 6-well Plate with 0.4 µm Transparent PET Membrane	Einlage für OBSC-6-Well-Platte	Corning Optical Communications GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vibratingmicrotom HM 650 V	Vibratom	Microm GmbH, Neuss, Deutschland
Doppelseitige Rasierklinge	Rasierklinge	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
UHU Sekundenkleber, blitzschnell	Sekundenkleber	UHU GmbH & Co. KG, Bühl/Baden, Deutschland
Hamilton Syringe 7001KH (SYR 1µl)	Injektionsspritze	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Messbecher 250 ml	Messbecher	VITLAB GmbH, Grossostheim, Deutschland
Pinzette gerade Stumpf 250 mm	stumpfe Pinzette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Produktname	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
Pinzette gerade spitz 140 mm	spitze Pinzette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schere Physiologie gebogen spitz 160 mm	große Schere	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikroskopierschere schwere Qualität gerade scharf 125 mm, 35 mm	kleine Schere	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Löffel ROTILABO® große Form, 210 mm	großer Löffel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Löffel ROTILABO® Typ Mehrzwecklöffel kleine Form, 150 mm	kleiner Löffel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Filterpapier Durchmesser 150 mm	Filterpapier	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Migrations-Assay

*Tabelle 15
Migrations-Assay*

Produktname	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
Differential Quik Stain Kit (Modified Giemsa) 250 ml	Boyden-Kammer-Färbungs-Kit	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstrasse, Deutschland

Produktname	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
48-Well Micro Chemotaxis Chamber	Boyden-Kammer	Neuro Probe Inc, Gaithersburg, MD 20877, USA
Polycarbonate Filters 8 µm Pores 25x80mm	Boyden-Kammer-Membran	Neuro Probe Inc, Gaithersburg, MD 20877, USA
35 mm Schale, 14 mm Glasdurchmesser, Unbeschichtet	Petri-Schale mit Glasboden	MatTek Corporation, Ashland, MA, USA
Agar-Agar, Kobe I	Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Mikroskopieren

Mikroskope

Tabelle 16
Mikroskopieren

Mikroskop	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
Zeiss Konfokales Laser Scanning Mikroskop 710 NLO	Zeiss 710 NLO	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zeiss Mikroskop Axiovert 25	Zeiss Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Software

Tabelle 17
Software

Name	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
FIJI	ImageJ	National Institutes of Health and the Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, University of Wisconsin, USA
Imaris 8 software Version 9.5.0	Imaris	Bitplane AG, Zürich, Schweiz
Microsoft Office	Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten
GraphPad Prism 8	GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Sand Diego, Vereinigte Staaten
ZEN	ZEN-Software	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Zubehör

Tabelle 18
Zubehör

Produktname	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
Thermo Scientific™ SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger	Adhäsionsobjektträger	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Deckgläser 24 x 60 mm	Deckgläser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aqua-Poly/Mount	Eindeckmedium	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstrasse, Deutschland

Geräte

Tabelle 19
Geräte

Produktname	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
Microcentrifuge, MiniStarsilverline	Mikrozentrifuge	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf® Refrigerated Centrifuge, Model 5810R	Zentrifuge	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Tecan Plate Reader Infinite 200 Pro	Plattenleser	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
See-saw-rocker SSM4, Schwanker	Schwanker	Cole-Parmer, Staffordshire, ST15, OSA, Großbritannien

Produktname	Bezeichnung im Text	Bezugsquelle
Antair, Sicherheitswerkbank, BSK 6 MP	Sicherheitswerkbank	Antair, New York, USA
Forma™ Steri-Cult™ CO2-Inkubator 3310	Inkubator	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
GFL Wasserbad 1002	Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Sartorius Analysenwaage Competence CPA224S- 0CE	Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Heidolph, Vortex- Schüttler, Reax 2000	Vortex-Schüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

Medien

Kulturmedium-1: DMEM mit 10% FCS, 1% Streptomycin/Penicillin, 1% L-Glutamin.

Kulturmedium-2: DMEM mit 25% HBSS, 25% FCS, 2% L-Glutamin, 50mM Natriumbicarbonat, 5mM Tris, 2,46 mg/ml Glucose, 1µg/ml Insulin, 0,8µg/ml Vitamin C, 100µg/ml Streptomycin und 100µg/ml Penicillin.

Kulturmedium-3: RPMI mit 10% FCS; 1% Streptomycin/Penicillin, 1% L-Glutamin.

Migrations-Kulturmedium: DMEM mit 1% Streptomycin/Penicillin, 1% L-Glutamin.

Methoden

Zellkultur allgemein

Alle lebenden primären Zellen und Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C, bei einer Kohlenstoffdioxidkonzentration von 5% und Luftfeuchtigkeit von 90% aufbewahrt.

Je nach Protokoll wurden diese in Flaschen, Well-Platten oder Zellkultureinsätzen kultiviert. Bei den Zelllinien wurde das Medium jeden zweiten Tag gewechselt. Die Zellen wurden passagiert, sobald sie eine Konfluenz von 70-80% erreicht hatten.

Mikroglia Zellkultur

Da Mikroglia zwischen Tumor inhibierendem und assistierendem Typ wechseln können und damit Einfluss auf die Tumor-Entwicklung haben, soll die Wirkung von o-Vanillin im Hinblick auf ihre Vitalität und Fähigkeit zur Migration untersucht werden.

Die primären Mikroglia Zellen wurden aus der Hirnrinde neugeborener C57BL/6 Mäuse gemäß dem Protokoll von Prinz und Hanisch (59) präpariert. Die Mäuse wurden am 0.-2.Tag postnatal enthauptet und das Gehirn wurde aus dem Schädel präpariert. Nach der Entfernung vom Hirnstamm, Kleinhirn und Riechkolben wurde das Gehirn in eiskalte HBBS-Lösung transferiert. Danach wurden die Meningen und Blutgefäße vorsichtig entfernt und das Gewebe in 1 mm Stücke mechanisch zerkleinert, dann mit 1% Trypsin behandelt. Darauf folgend wurde das Gewebe mechanisch mit einer Pipette weiter zerkleinert und dreimal mit HBSS-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden dann ausplattiert und 9 bis 12 Tage im Kulturmedium 1 inkubiert. Nach dem siebten Tag wurden die Mikroglia Zellen durch sanftes Schütteln (100 rpm) für 1 Stunde bei 37°C isoliert. Sie wurden in T25 Zellkulturflaschen im Kulturmedium 1 kultiviert.

Gliom Zelllinien

Die Gliom-Zelllinien repräsentieren das Glioblastoma multiforme in den *in vitro* und *ex vivo* Modellen.

U87-Glioblastoma Zelllinie (U87-Zelllinie)

Durch Verwenden der humanen Gliom-Zelllinie U87 soll evaluiert werden, inwieweit mögliche Effekte von o-Vanillin im murinen Modell auf Menschen übertragen werden können. Der Vergleich soll ausschließlich *in vitro* mit der GL261-Zelllinie erfolgen. Die Zellen wurden in T25 Zellkulturflaschen und im Kulturmedium 1 kultiviert.

Glioma 261 Zelllinie (GL261-Zelllinie)

Die murinen GL261-Zellen wurden in T25 Zellkulturflaschen und im Kulturmedium 1 kultiviert.

mCherry Glioma 261 Zelllinie (mCherry GL261-Zelllinie)

Die murine mCherry Glioma 261 Zelllinie (mCherry GL261-Zellen) wurde nach dem Protokoll von Vinnakota et al. erstellt (60). Dazu wurden die GL261-Zellen mit der kurzen, Haarnadelstruktur-bildenden RNA transfiziert, die mit dem rot fluoreszierenden mCherry-Protein (GeneCopoeia) markiert worden war. Die transfizierten Zellen wurden mit Puromycin (5µg/ml) behandelt, um die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen zu ermöglichen.

Die mCherry GL261 wurden in T75 Zellkulturflächen und im Kulturmedium 3 kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Tiere

Alle Tiere wurden in der Tierhaltungseinrichtung des Max-Delbrück-Zentrums für Molekulare Medizin in der Helmholtz-Gemeinschaft gemäß der staatlichen (Landesamt für Gesundheit und Soziales) und internen Regeln (Max-Delbrück-Zentrums für Molekulare Medizin in der Helmholtz-Gemeinschaft) gehalten. Die Mäuse haben in einem 12 Stunden Licht-Dunkelheit- Zyklus mit uneingeschränktem Zugang zu Wasser und Nahrung gelebt. Alle Maßnahmen zur Schmerz- und Leidensminderung wurden unternommen. Alle Experimente wurden unter strikter Einhaltung der Tierschutzrechte durchgeführt (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, Deutschland, Zulassungsnummer (T0014/08, O360/09, A-0376/17)).

C57BL/6 Wildtyp Mäuse

Die C57BL/6 Mäuse wurden für die Gewinnung von primären neonatalen Mikroglia-Zellen sowie für die Anfertigung der organotypischen Hirnschnitte benötigt.

C57BL/6 Csf1r-EGFP Mäuse (MacGreen Mäuse)

Die C57BL/6 Csf1r-EGFP Mäuse (MacGreen Mäuse) wurden aus den C57BL/6 Wildtyp Mäusen nach dem Protokoll von Sasmono et. al (61) generiert. Für die Vektorerstellung wurden die Gene C-fms ausgewählt, welche den CSF-1 (colony-stimulating-factor-1) und das grün fluoreszierende Protein (GFP) der Makrophagen codieren. Der erstellte Vektor pEGFP-N1 beinhaltet das humane Cytomegalie Virus (CMV), das die Expression des EGFP steigert.

Die MacGreen Mäuse wurden zur Kontrolle der Depletion und des Überlebens der Mikroglia-Zellen unter dem Einfluss von Testsubstanzen in den organotypischen Hirnschnitten gebraucht.

Alamar Blue Assay

Ziel dieser Untersuchung war es, den Einfluss von o-Vanillin auf die Stoffwechselaktivität von Glioma und Mikroglia *in vitro* zu ermitteln.

Die Ermittlung der Stoffwechselaktivität von Zellen mit dem AlamarBlue Assay basiert auf der Oxidations/Reduktionsreaktion des AlamarBlue-Farbstoffes und dem damit verbundenen Übergang aus der nicht fluoreszierenden (blau) in die fluoreszierende (rot) Form. Metabolisch aktive Zellen nehmen den oxidierten, nicht fluoreszierenden AlamarBlue-Farbstoff auf, woraufhin dieser reduziert und in die fluoreszierende Form überführt wird. Zellen mit herabgesetzter Stoffwechselaktivität nehmen weniger AlamarBlue-Farbstoff auf, sodass insgesamt weniger fluoreszierender Farbstoff vorliegt und das Absorptionsvermögen des Präparats niedriger ausfällt.

Zellvorbereitung

Zur Bestimmung des Stoffwechselliveaus der Zellen wurde der Alamar Blue Assay verwendet. Sowohl für die primären neonatalen Mikroglia als auch für die Tumorzelllinien (humane U87-Zellen und murine GL261-Zellen) wurden das selbe Herstellerprotokoll angewandt.

Die primären neonatalen Mikroglia Zellen wurden direkt aus den Neugeborenen C57BL/6 Wildtyp-Mäusen präpariert.

Die murinen GL261 Zellen beziehungsweise die humanen U87 Zellen wurden aus einer 25 cm³ Zellkulturflasche nach 1-minütiger Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung geerntet. Nach anschließender Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen für 5 Minuten bei 300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen im Kulturmedium 1 resuspendiert, sodass sich eine finale Zellkonzentration von 10⁵ Zellen/µl ergab. Danach wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension in die Wells einer 96-Well-Platte überführt. Nach 24-stündiger Lagerung im Inkubator wurde das Kulturmedium 1 verworfen und die Wells einmal für 2 Minuten mit PBS-Lösung gewaschen. Danach wurden die Wells mit 100 µl des Kulturmediums 1, gegebenenfalls mit darin enthaltenen Testsubstanzen wie o-Vanillin oder Minocyclin

aufgefüllt und für 3, 6 oder 24 Stunden im Inkubator gelagert. Als Kontrollgruppe wurden die Zellen mit reinem Kulturmedium ohne jegliche Testsubstanzen betrachtet.

Färbung der Zellen

Nach der Inkubation mit Testsubstanzen wurde das Medium verworfen und die Wells einmal für 2 Minuten mit PBS-Lösung gewaschen. Folgend wurden jeweils 100 µl von 10%-AlamarBlue-Kultumedium1-Lösung in die Wells gegeben und die Zellen wurden für 3 weitere Stunden im Inkubator gelagert. Anschließend wurde in einem Plattenleser die Absorption von Licht bei den Wellenlängen 570 nm und 600 nm gemessen.

Analyse

Um aus den Licht-Absorptionsmessungen ein Maß für die Stoffwechselaktivität der Zellen zu erhalten, wurde folgende, vom Hersteller vorgegebene Gleichung verwendet:

$$\frac{A_{570} - A_{600}}{A_{570} + A_{600}} = \frac{\epsilon_{ox} \cdot c \cdot d}{\epsilon_{red} \cdot c \cdot d} = \frac{\epsilon_{ox}}{\epsilon_{red}}$$

Mit den Parametern:

- Wellenlänge $\lambda_1 = 570$ nm
- Wellenlänge $\lambda_2 = 600$ nm
- ϵ_{ox} = molarer Extinktionskoeffizient der oxidierten Form des AlamarBlue, 80,586 für λ_1 und 117,216 für λ_2
- A = Absorption des Lichts im Well mit Testsubstanz
- A° = Absorption des Lichts im Well mit unbehandelter Kontrollgruppe

Trypan-Blau Zelltod-Assay

Zur Bestimmung der Sterberate von Zellen infolge einer Behandlung mit o-Vanillin wurde der Farbstoff Trypan-Blau verwendet, welcher in perforierte Zellen eindringen kann. Diese sind infolgedessen blau eingefärbt, während Zellen mit intakter Membran diesen nicht aufnehmen. Eine perforierte, eingefärbte Zelle ist somit eindeutig tot, jedoch ist eine nicht gefärbte Zelle nicht eindeutig als vital zu betrachten.

Vorbereitung der Zellen

Für die Tumorzellen GL261 und U87 sowie für Mikroglia wurde dasselbe Protokoll verwendet. Zunächst wurde die Zellkonzentration auf 10^6 Zellen/ml eingestellt. Danach

wurden jeweils 200 µl Zellsuspension in jedes Well einer 12-Well-Platte pipettiert. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Volumen in jedem Well mit dem Kulturmedium 1 vorsichtig auf 1,5 ml erhöht. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Inkubator gelagert. Nach der Inkubation wurde das Medium verworfen und neues Kulturmedium 1, gegebenenfalls mit hinzugefügten Testsubstanzen, zugegeben. Die negative Kontrollgruppe erhielt das reine Kulturmedium 1 und die positive Kontrollgruppe eine Lösung aus 35%-Ethanol in Kulturmedium 1. Wenn die Behandlung länger als 48 Stunden dauerte, wurden die jeweiligen Testsubstanzen beim Mediumswechsel wieder dazu gegeben.

Färbung der Zellen

Nach Ablauf der Inkubationszeit mit den Testsubstanzen wurde das alte Medium aus den Wells entfernt und vorsichtig in zuvor vorbereitete, beschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäße hinein pipettiert. Jedem Well wurden anschließend 100 µl Trypsin-EDTA-Lösung hinzugegeben. Nach einer Minute Einwirkzeit wurden die Zellen vorsichtig abpipettiert und in die entsprechenden Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Folgend wurden die Zellen 5 Minuten lang bei 4 °C und 300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 50 µl Kulturmedium 1 aufgelöst. Danach wurden 50 µl Trypan-Blau-Lösung hinzugegeben und vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren mit einer 20 µl Pipette resuspendiert.

Auswertung

Gleich nach dem Färben der Zellen wurden 10 µl Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer hinein pipettiert und die Zellzahl unter dem Lichtmikroskop mit dem 20 x Objektiv ermittelt. Hierbei wurden sowohl lebende als auch abgestorbene Zellen gezählt. Lebende Zellen waren als weiß/nicht gefärbt zu erkennen, während sich abgestorbene Zellen durch dunkle Färbung auszeichneten (siehe Abbildung 9). Hierbei wurden Zellen aus 4 verschiedenen Quadranten der Zählkammer gezählt und anschließend der Mittelwert für die weitere Auswertung verwendet.

Die Zellvitalität wurde als prozentueller Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtzahl der Zellen in der jeweiligen Probe ausgedrückt.

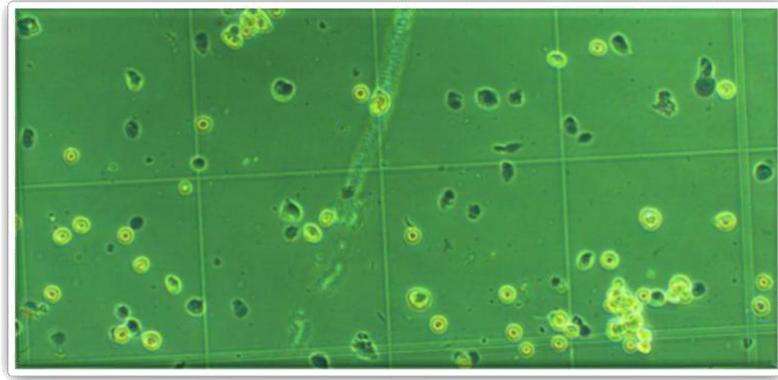


Abbildung 9

Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahme von GL261-Zellen in der Zählkammer nach der Färbung mit dem Farbstoff Trypan-Blau. Die hell imponierenden Zellen stellen die vitalen Zellen dar, während die dunklen, mit Trypan-Blau gefärbten Zellen als tot gelten.

Zellmigrations-Assay mit Boyden-Kammer

Mit dieser Methode sollte der Einfluss von o-Vanillin auf die Migration der Mikroglia untersucht werden, da dies bei der Rekrutierung der Mikroglia durch den Tumor eine Rolle spielen könnte.

Boyden-Kammer

Die Boyden-Kammer besteht aus zwei aufeinander liegenden 48-Well-Platten, die voneinander durch eine poröse Membran getrennt werden. Eine Gummiabdichtung stellt sicher, dass sämtliche Substanzen und Zellen nur über die Membran von einem Well ins andere gelangen können. In der oberen 48-Well-Platte befinden sich die Zellen, in der unteren potenziell chemotaktisch aktive Substanzen, die die Zellen zur Migration stimulieren können. Zellen, die von der Oberseite zur Unterseite durch die Membran migrieren gelangen auf die Unterseite der Membran, wo sie fixiert und abgebildet werden können.

Vorbereitung der Zellen

Zur Bestimmung der Migration der Mikroglia-Zellen unter dem Einfluss von Testsubstanzen wurden vorerst die frisch gewonnenen Mikroglia-Zellen im Migrations-Kulturmedium auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Testsubstanzen wurden ebenfalls in Migrations-Kulturmedium gelöst. In der Positivkontrolle wurde das

Migrations-Kulturmedium mit 100 μ M ATP und in der Negativkontrolle das reine Migrations-Kulturmedium benutzt. Der pro-migratorische Effekt von ATP ist bereits in der Literatur beschrieben und wird unter anderem über den Gi-gekoppelten P2Y-Rezeptor erreicht (62). Ebenso wurde ein TLR-2-Agonist verwendet (siehe Materialien).

Zuerst wurden die 48 Wells der unteren Boyden-Kammer mit jeweils 28 μ l Migrations-Kulturmedium, gegebenenfalls mit Testsubstanzen, gefüllt. Danach wurde mithilfe einer Pinzette die Membran mit 8 μ m Porengröße vorsichtig auf die mit Medium gefüllte untere Boyden-Kammer platziert. Folgend wurden die Gummiabdichtung und die obere Boyden-Kammer befestigt. Anschließend wurden jeweils 50 μ l Zellsuspension in jedes Well pipettiert. Die Boyden-Kammer wurde dann für 150 Minuten im Inkubator gelagert. In dieser Zeit sollten die Zellen in die untere Kammerhälfte über die Membran migrieren.

Färbung der Zellen

Nach der Inkubation mit Testsubstanzen wurden die obere Boyden-Kammer sowie Gummi-Abdichtung entfernt. Die Membran wurde vorsichtig mithilfe einer Pinzette in eine Petri-Schale transferiert und gemäß Herstellerprotokoll gefärbt. Zunächst wurde die Membran für 30 Sekunden in das Fixationsmedium gelegt. Darauffolgend wurde die Membran für 30 Sekunden in eine weitere Petri-Schale mit dem Zellkernfarbstoff des Kammer-Herstellers transferiert. Anschließend wurde die Membran für 30 Sekunden in eine Petri-Schale mit HE-Lösung überführt. Schließlich wurde die Membran zweimal für jeweils 60 Sekunden im destillierten Wasser gewaschen und für 24 Stunden bei Raumtemperatur zum Trocknen an einer Klammer aufgehängt. Sobald die Membran trocken war, wurden die Well-Grenzen mit dem schwarzen Kugelschreiber umrandet, um die Well-Grenzen im Mikroskop finden zu können. Mithilfe von Klebeband wurde die Membran an einem Objektträger befestigt und der überflüssige Farbstoff aus dem oberen Teil der Membran mit dem Wattestäbchen entfernt.

Auswertung

Die Membran wurde mit weißem Transmissionslicht durch ein 20 x Objektiv betrachtet (Mikroskop Zeiss Axiovert 25). Es wurden vier Bilder pro Well aufgenommen. Anschließend wurde mithilfe von einem selbst geschriebenen Makros in FIJI das Signal der Zellen extrahiert und so die Anzahl der migrierten Zellen abgeschätzt (Abbildung 10).

```

1. original =getTitle();
2.
3. // Das originale Bild wird dupliziert.
4. run("Duplicate...", " ");
5. copy =getTitle();
6.
7. // Maximumfilter
8. run("Maximum...", "radius=1.5");
9.
10. // Herausfiltern der großen Strukturen. Nur die kleinen Strukturen
    (die Zellen, kleiner als 15 Pixel) bleiben erhalten.
11. run("Bandpass Filter...", "filter_large=1500 filter_small=15
    suppress=None tolerance=5 autoscale saturate");
12.
13. // Das Bild wird in die Farbkanäle zerlegt.
14. run("Split Channels");
15.
16. selectWindow(copy+" (blue)");
17. close();
18. selectWindow(copy+" (red)");
19. close();
20.
21. // Der grüne Farbkanal liefert das beste Signal
22. selectWindow(copy+" (green)");
23.
24. // Umwandlung in ein binäres Bild mit dem Renyi-Entropie-Algorithmus.
    Der Hintergrund wird als hell gesetzt
25. setAutoThreshold("RenyiEntropy");
26.
27. setOption("BlackBackground", false);
28.
29. run("Convert to Mask");
30. run("Grays");
31. result_img=getTitle();
32.
33. // Erstellen des Histogramms vom Binärbild.
34. // Zählen der hellen Pixel (die von den Zellen bedeckte Fläche).
35. run("Histogram");
36.
37. //Übereinanderlegen des Original- und des Binärbildes, um die
    extrahierten Zellen darzustellen.
38. imageCalculator("Add create", result_img, original);
39.

```

Abbildung 10

Das selbstgeschriebene Macro zur Analyse vom Boyden-Kammer Experiment in FIJI. Der dunkelrot eingefärbte Text erklärt die jeweiligen Schritte.

Die Zellen sind im RGB-Bild (Farbraum Rot, Grün, Blau) als dunkle Punkte zu erkennen. Um dunkle und helle Bereiche besser voneinander abgrenzen zu können, wurde der Maximums-Filter appliziert. Dadurch wurden einzelne Dunkle Pixel inmitten eines hellen Bereichs als hell gesetzt, um nicht fälschlicherweise als Zelle detektiert zu werden. Anschließend wurde ein Bandpass-Filter appliziert, welche alle Strukturen, die größer als 15 Pixel (ungefähre Größe einer Zelle) waren, herausgefiltert. Da der grüne Farbkanal das beste Signal lieferte, wurde nur dieser für die weitere Verarbeitung verwendet.

Schließlich wurde das Bild mithilfe des Renyi-Entropie-Algorithmus in ein Binäres Bild umgewandelt. Der Hintergrund wurde als dunkel mit dem Wert 0 gesetzt, während die Zellen als hell mit dem Wert 1 gesetzt wurden. Mithilfe des Histogramms wurde dann die Anzahl heller und dunkler Pixel ermittelt und damit auch die von Zellen besetzten Fläche (Abbildung 11).

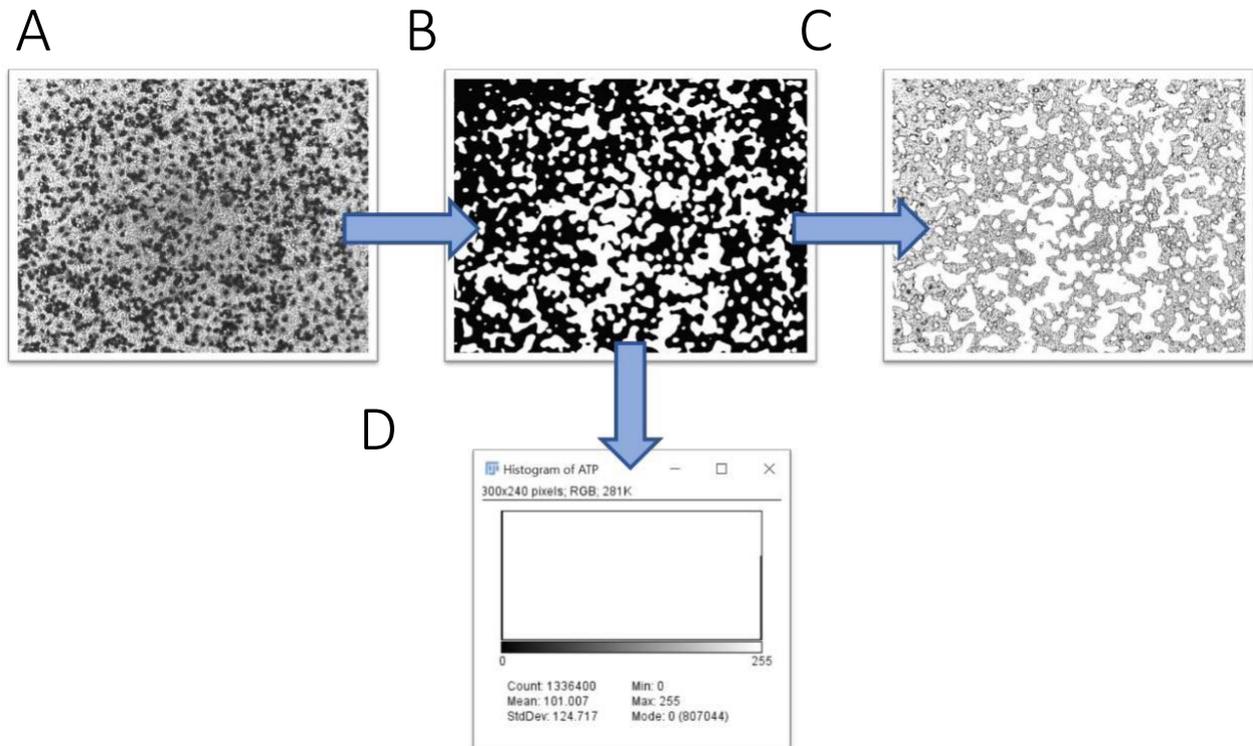


Abbildung 11

Der Auswertungsablauf einer exemplarischen lichtmikroskopischen Aufnahme der Boyden-Kammer-Membran. (A) Original-Bild (RGB-Farbraum), nicht verarbeitet. (B) Binäres Bild nach Extraktion des Zellsignals mithilfe des FIJI-Makros. Die Zellen sind weiß und der Hintergrund schwarz. (C) Zum Abgleich mit dem Originalbild werden (A) und (B) überlagert. (D) Das Histogramm des binären Bildes zeigt die Anzahl dunkler (Min: 0) und heller (Max: 255) Pixel.

Organotypische Hirnschnitte

Die Verwendung von organotypischen Hirnschnitten an Stelle einzelner Zelltypen stellt die Vorstufe zum *in vivo* Experiment dar und ermöglicht die Untersuchung der Effekte von o-Vanillin in einer Realitätsnahen Umgebung, welche sich jedoch außerhalb des lebenden Organismus befindet, *ex vivo*. Hierbei werden dünne Schnitte von Mäuse-Gehirnen einige Tage kultiviert. Es werden Gliom-Zellen in das Gewebe gespritzt um einen Tumor zu imitieren und eine Behandlung mit o-Vanillin wird vorgenommen. Das hier verwendete Protokoll zur Anfertigung der Hirnschnitte stellt eine modifizierte Version des bekannten Protokolls von Darko Markovic (63) dar.

Präparation des Gehirngewebes

Vorerst wurden weibliche Mäuse C57BL/6 beziehungsweise weibliche transgenische McGreen-Mäuse im Alter von 14 bis 16 Tagen durch zervikale Dislokation getötet. Der Kopf wurde hinter den Ohren mit einer chirurgischen Schere vom Korpus getrennt.

Für die Präparation des Gehirngewebes wurde zuerst ein subkutaner Mittellinienschnitt entlang und oberhalb des Interhemisphärenspalts durchgeführt. Die Haut wurde auf die Seite verlagert, sodass die Schädelkalotte und Teile der Schädelbasis sichtbar wurden. Danach wurde der Vorderteil des Frontalknochens zwischen den Augen mithilfe einer chirurgischen Schere vorsichtig geöffnet und die Sehnerven durchtrennt, ohne dass das umgebende Hirngewebe verletzt worden ist. Zur Trennung des Schädels vom Hirngewebe wurde eine schmale kleine Pinzette vorsichtig unter den angebrochenen Frontalknochen eingeführt, um die stumpfe Präparation des Schädels zu ermöglichen.

Nach vollständiger Präparation der Schädelkalotte wurde das Gehirn mitsamt Hirnstamm und Kleinhirn mit einem schmalen Löffelspatel vom unten aufgehoben und sofort in eiskalte HBSS-Lösung transferiert. Danach wurde das Gehirn mit einem größeren Laborlöffel auf eine mit Eis befüllte Petri-Schale transferiert und das Kleinhirn mithilfe eines Skalpells abgetrennt.

Aus einem zuvor präparierten Gel-Block aus 5%-Agarose in Wasser wurde ein 1 cm³ großer Würfel ausgeschnitten und mit Sekundenkleber auf einer magnetischen Platte befestigt. Das Gehirn wurde vor dem Agar-Block auf der magnetischen Platte mit Sekundenkleber angebracht, um ein Verrutschen beim Schneiden zu verhindern.

Die magnetische Platte wurde in den mit eiskalter HBSS-Lösung befüllten Teil des Vibratoms platziert, sodass das Gehirn vollständig mit Flüssigkeit bedeckt wurde. Die Geschwindigkeit des Vibratoms wurde auf Stufe 9, die Schnittdicke auf 250 µm und die Frequenz auf 300 Hz eingestellt. Das Gehirn wurde mit der Klinge des Vibratoms geschnitten und die einzelnen Gehirnschnitte wurden mit einer sterilen Pasteurpipette mit abgeschnittener Spitze leicht angesaugt, um sie in eine mit eiskalter HBSS-Lösung befüllte 6-Well-Platte zu transferieren.

Organotypische Hirnschnitte in der Zellkultur

Die frisch angefertigten Hirnschnitte wurden in Zellkultureinsätze überführt, die sich in einer neuen 6-Well-Platte befanden. Die Wells wurden zuvor mit 37 °C warmen Kulturmedium 1 befüllt. Der Boden der Zellkultureinsätze besteht aus einer Polycarbonat Membran mit 0,4 µm Poren. Dies ermöglicht den Zugang zu Nährstoffen des Mediums. Die Wells waren nur soweit mit Medium befüllt, dass die obere Seite des Hirnschnitts nicht mit Flüssigkeit bedeckt war. Anschließend wurde die 6-Well-Plate im Inkubator gelagert. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium 1 für die weitere Kultivierung durch das Kulturmedium 2 ersetzt. Dieses wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Depletion primärer Mikroglia

Die Depletion der Mikroglia in den Hirnschnitten sollte durch Zugabe der Clodronat-Liposomen zum Kultivierungsmedium erreicht werden. Der Anteil der Liposomen-Lösung am Kultivierungsmedium betrug hierbei 10%. Nach 24-stündiger Lagerung im Inkubator wurde das Medium durch das Kulturmedium 2 ersetzt. Weitere Behandlungen konnten erst nach 72-stündiger Regeneration des Gehirngewebes erfolgen (Abbildung 13).

Vorbereitung der Tumorzellen

Für die Inokulation der Tumorzellen in die Hirnschnitte wurden die rot fluoreszierenden mCherry-GL261-Zellen mit einer 10µl-Hamilton-Spritze und mithilfe eines Mikromanipulators in das Gehirngewebe eingespritzt. Die Tumorzellinokulation erfolgte nach 24 Stunden (Abbildung 12) beziehungsweise im Falle einer zusätzlichen Clodronat-Behandlung nach 96 Stunden post mortem (Abbildung 13).

Die mCherry-GL261-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% mit Trypsin-EDTA-Lösung (3 ml bei 75cm³-Kulturflasche) für eine Minute behandelt. Anschließend wurde die Trypsin/EDTA-Lösung mit Kulturmedium 3 neutralisiert (9 ml bei 75cm³-Kulturflasche)

und die Zellen wurden geerntet. Die Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Zentrifugation bei 400 rpm und 4 °C für 5 Minuten wurde der Überstand mit der Pasteurpipette abgesaugt und die Zellkonzentration auf $50 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit dem Kulturmedium 3 eingestellt. Die Zellen wurden anschließend auf Eis gelagert.

Vorbereitung des Mikromanipulators

Der Mikromanipulator wurde sorgfältig mit einem in 70%-Ethanol getränkten Labor-Reinigungstuch desinfiziert. Die 10µl-Hamilton-Spritze wurde vor dem Benutzen mit 70%-Ethanol, destilliertem Wasser sowie PBS-Lösung gereinigt und am Mikromanipulator befestigt. Pro Inokulation (2 bis 3 Hirnschnitte im Zellkultureinsatz) wurde jeweils 1 µl Zellsuspension aufgezogen.

Inokulation von Tumorzellen

Pro Hirnhälfte eines Gehirnschnitts wurde ein Volumen von 0,1 µl Zellsuspension inokuliert. Die Spitze der Spritze wurde immer an die gleiche anatomische Region in der Nähe der Basalganglien platziert. Vor dem Einsenken in das Gewebe wurde die Spritze auf einer freien Stelle der Zellkultureinsatz-Membran heruntergefahren, bis die Spitze der Spritze Kontakt mit dieser hatte. Dann wurde diese um 250 µm zurück gefahren (Dicke des Hirnschnitts). Die Spitze wurde zur gewünschten Position im Hirnschnitt bewegt und um 200 µm in den Hirnschnitt herabgesenkt. Anschließend wurde die Spritze um 50 µm zurückgezogen und 0,1 µl Zellsuspension wurden über einen Zeitraum von 10 Sekunden gleichmäßig in das Hirngewebe eingespritzt. Danach wurde die Spritze über einen Zeitraum von 30 Sekunden in 20 µm Schritten vorsichtig aus dem Hirnschnitt entfernt.

Nach der Inokulation von Tumorzellen wurden die Zellkultureinsätze mit Hirnschnitten in eine neue 6-Well-Platte mit frischem Kulturmedium 2 transferiert.

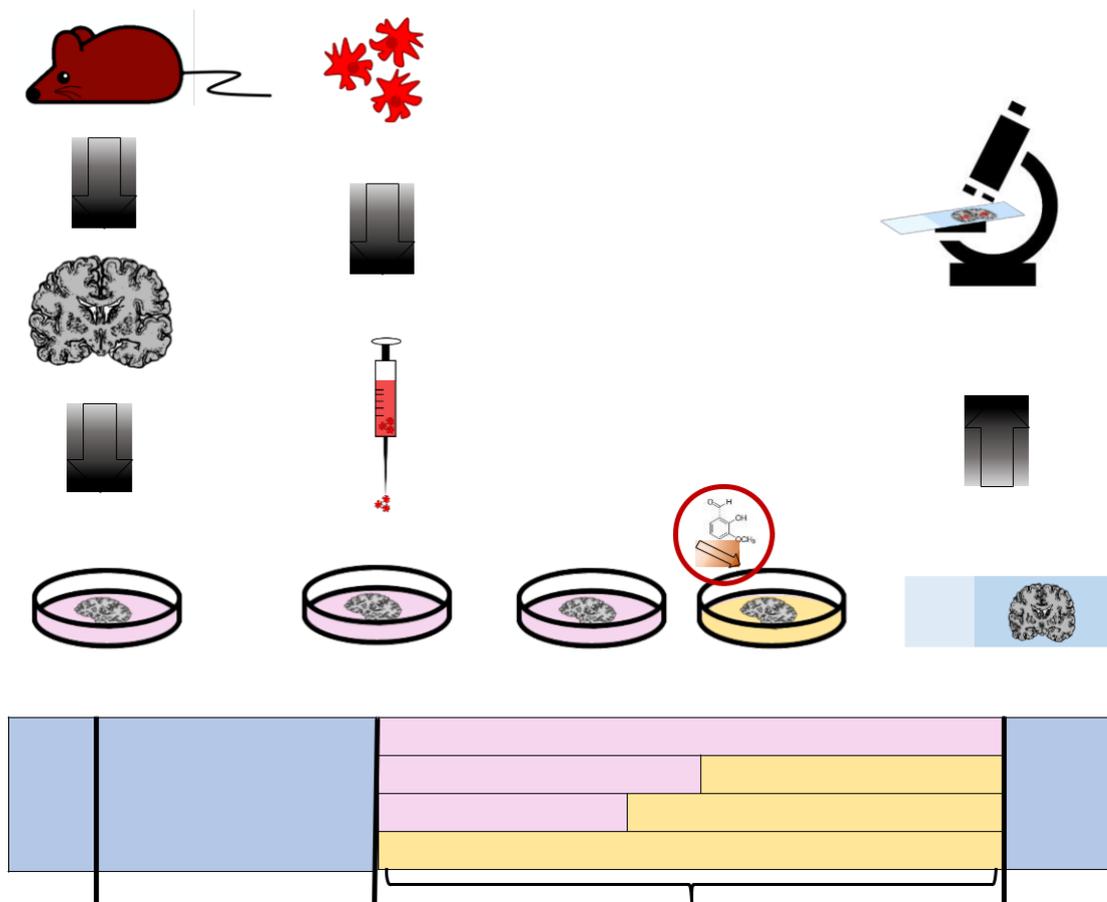


Abbildung 12:

Schematische Darstellung des Ablaufs des Experiments mit o-Vanillin Behandlung von organotypischen Hirnschnitten. Zuerst wurde das Gehirn einer BL6-Maus präpariert, in dünne Scheiben geschnitten und im Kulturmedium 1 inkubiert (Zeitpunkt 0h). Nach 24 Stunden wurden die mCherry-GL261-Zellen in jede Hemisphäre des Hirnschnittes inokuliert. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Hirnschnitte für 120 Stunden mit Kulturmedium 2 mit oder ohne 100 µM o-Vanillin behandelt. Anschließend wurden die Hirnschnitte fixiert, gefärbt und unter dem Konfokal-Mikroskop betrachtet.

o-Vanillin Behandlung

Die Hirnschnitte mit inokulierten Tumoren wurden für 120 Stunden unter unterschiedlichen Bedingungen weiter kultiviert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 48 h und 72 h) wurde den Hirnschnitten Kulturmedium mit o-Vanillin bis zum Ende der 120 Stunden verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt hierbei reines Medium ohne o-

Vanillin (CTRL 120 h). Die übrigen Gruppen werden entsprechend der Dauer der o-Vanillin Behandlung bezeichnet. Die Zugabe von o-Vanillin zum Zeitpunkt 0 entspricht der o-Vanillin-120h-Gruppe, Zugabe nach 48 Stunden liefert die o-Vanillin-72h-Gruppe und die Zugabe nach 72 Stunden ist die o-Vanillin-48h-Gruppe. Das o-Vanillin wurde in den jeweiligen Gruppen bei jedem Mediumswechsel bis zur Zeit der Fixierung erneut dazugegeben.

Fixierung, Färbung und Befestigung der Hirnschnitte

Die Hirnschnitte wurden 144 Stunden beziehungsweise im Falle der Mikroglia-Depletion 216 Stunden post mortem fixiert.

Fixierung

Die Hirnschnitte wurden dreimal mit jeweils 1 ml PBS-Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde 4%-Formaldehydlösung für eine Stunde hinzugegeben, jeweils 1 ml in das Well und 1 ml in den Zellkultureinsatz. Danach wurden die Hirnschnitte erneut dreimal mit jeweils 1 ml PBS-Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen.

Färbung

Für die Zellkernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst, gelöst in PBS-Lösung bei einer Konzentration von 5 µg/ml verwendet. Jeweils 1 ml Farbstofflösung wurde in das Well und in den Zellkultureinsatz für 30 Minuten dazugegeben. Danach wurden die Gehirnschnitte dreimal mit jeweils 1 ml PBS-Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen.

Befestigung der Hirnschnitte auf dem Objektträger

Die einzelnen Hirnschnitte wurden mithilfe eines sterilen Skalpells zusammen mit der Polycarbonat-Membran aus dem Zellkultureinsatz ausgeschnitten und vorsichtig auf den Objektträger übertragen (die Membran-Seite auf dem Objektträger). Anschließend wurden zwei bis vier Tropfen vom Eindeckmedium auf die Hirnschnitte gegeben und das Deckglas vorsichtig aufgelegt, um der Luftblasenbildung vorzubeugen.

Zum Austrocknen wurden die Hirnschnitte für mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur vor Licht geschützt gelagert. Anschließend wurden sie bei 4°C aufbewahrt.

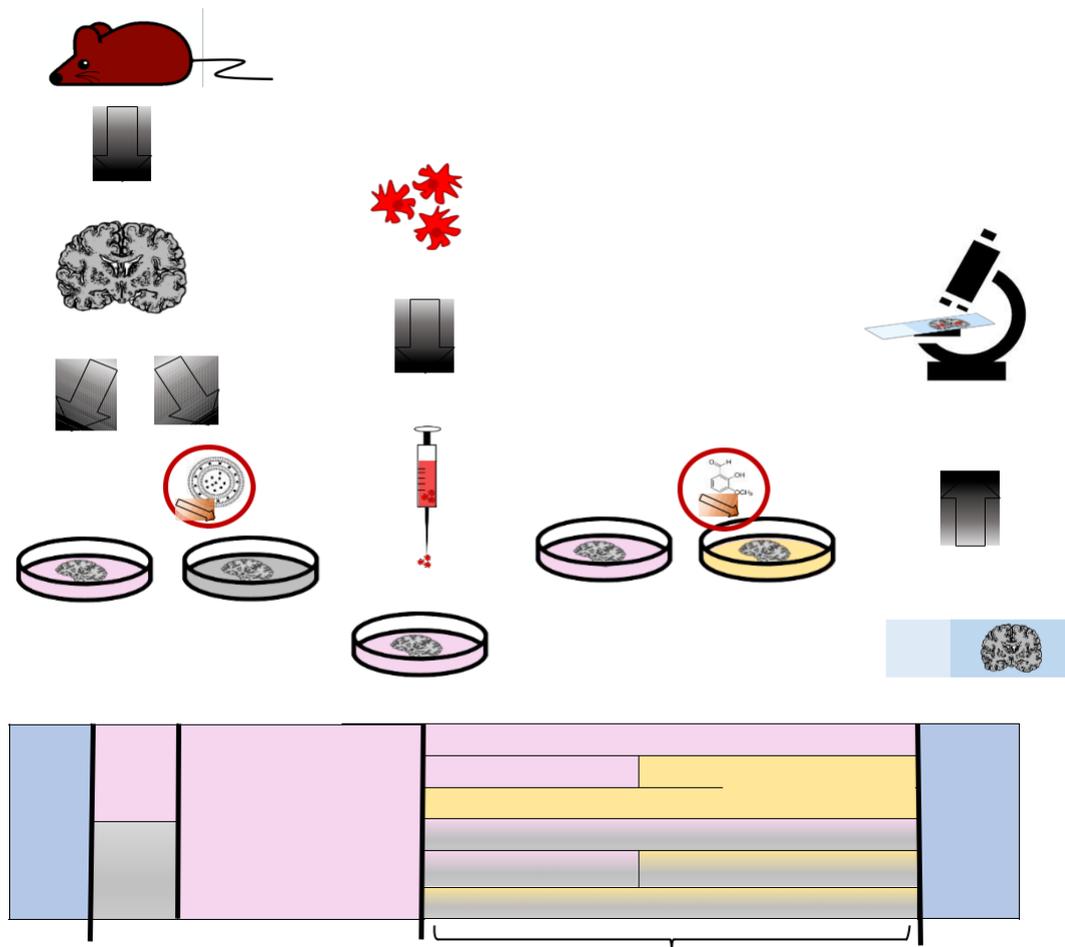


Abbildung 13

Schematische Darstellung des Experiment-Ablaufs mit *o*-Vanillin Behandlung von organotypischen Hirnschnitten nach der Depletion von Mikroglia. Zuerst wurde das Gehirn einer BL6-Maus beziehungsweise einer McGreen-Maus präpariert und geschnitten. Die Hälfte der Hirnschnitte wurden mit dem 10%-Clodronat-Liposom-Medium für 24 Stunden zwecks Mikroglia-Depletion behandelt. Danach folgte eine 72-stündige Regenerationsphase im Kulturmedium 2 für alle Hirnschnitte. Nach insgesamt 96 Stunden post mortem wurden die *mCherry*-GL261-Zellen in jede Hemisphäre des Hirnschnittes inokuliert. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Hirnschnitte für 120 Stunden mit Kulturmedium 2 mit oder ohne 100 μM *o*-Vanillin behandelt. Anschließend wurden die Hirnschnitte fixiert, gefärbt und unter dem Konfokal-Mikroskop betrachtet.

Mikroskopie und Analyse

Von den Gehirnschnitten wurden mithilfe des Mikroskops ZEISS 710 LMS-System in 20x-Vergrößerung 3D-Scans aufgenommen. Die Probe wurde in alle 3 Raumrichtungen abgerastert (Tile-Scan in x-y-Ebene und z-Stack), wobei die x-y-Ebene der Schnittebene entspricht und die z-Achse senkrecht dazu steht. Die Anzahl der Teilbilder wurde auf die Größe des Tumors angepasst. Es wurde bei fest eingestellter Laserleistung von 20 % gearbeitet.

Analyse der 3D-Scans

Die mithilfe des Konfokal-Floureszenz-Mikroskops ZEISS 710 LMS erstellten 3D-Scans wurden mit der Bildanalysesoftware Imaris8 weiter verarbeitet. Zunächst wurde manuell die 3D-Region ausgewählt, in welcher der Tumor sich befand. Anschließend wurde ein binäres Bild erzeugt, um den Hintergrund (auf Wert 0 gesetzt) vom Fluoreszenz-Signal des Tumors (auf Wert 1 gesetzt) unterscheiden zu können. Dazu wurde ein absoluter Schwellenwert für die Intensität von 15 gewählt und für alle untersuchten 3D-Scans beibehalten. Um eine geschlossene Oberfläche für den Tumor zu erhalten, wurde ein Filter-Kriterium angewendet mit der Bezeichnung „number of voxels“. Hierbei wurde der Wert 1000 gewählt. Anschließend wurde das Volumen und die Oberfläche vom Tumor von Imaris berechnet.

Konfokalmikroskopie

Alle verwendeten konfokalen Fluoreszenz-Mikroskope gehören zur Advanced Light Microscopy Facility (ALM Facility) am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin.

ZEISS 710 LMS

Das ZEISS 710 LMS Mikroskop wurde zur Erstellung von 3D-Scans von organotypischen Hirnschnitten verwendet. Dafür wurden die Argonlaser 405 nm, 488 nm und 561 nm und die Trocken-Objektive mit 10- und 20-facher Vergrößerung benutzt. Für den mCherry-Farbstoff wurde eine Anregungswellenlänge von 550 nm und eine Emissionswellenlänge von 645 nm ausgewählt. Für den Hoechst-Farbstoff betrug die Anregungswellenlänge 350 nm und Emissionswellenlänge 455 nm. Das EGFP, welches in MacGreen-Mäusen

exprimiert wurde, wurde mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt und emittierte Licht der Wellenlänge 510 nm.

Lichtmikroskopie

Zum Betrachten von Zellen mit Trypan-Blau-Färbung sowie Zellen in Migrations- und Motilitätsexperimenten wurde das Zeiss Axiovert 25 Lichtmikroskop benutzt. Dafür wurden Trocken-Objektive mit 10- und 20-facher Vergrößerung sowie ein Immersionsöl-Objektiv mit 40-facher Vergrößerung angewandt.

Statistische Analyse

Die statistische Analyse für Auswertung von allen Ergebnissen wurde mithilfe von Software Prism GraphPad 8 durchgeführt. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanzen für Ein-Parameter-Datensätze wurde das Student's t-Test angewandt.

Zum Vergleich von Mehr-Parameter-Gruppen wurden das One-way-Anova- sowie das Two-way Anova-Verfahren eingesetzt. Bei multiplen Tests wurde im Falle von One-Way-Anove mit Dunnet's-Test korrigiert, bei Two-Way-Anova mit Tukey's Test. Die Signifikanz wurde über den p-Wert wie folgt definiert: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Ergebnisse

Stoffwechsel von Tumorzellen und Mikroglia unter dem Einfluss von o-Vanillin

Teilergebnisse dieses Kapitels wurden bereits veröffentlicht in (1) am 22.04.2020. Die in dieser Dissertation präsentierten Daten können in den Absolutwerten von bereits publizierten Daten abweichen, da in der Zwischenzeit weitere Versuche durchgeführt wurden. Es handelt sich hierbei um die in Abbildung 14 und Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse.

Der Einfluss von o-Vanillin auf den Stoffwechsel von Mikroglia und GL261 Zellen wurde mit dem Alamar-Blue-Assay untersucht. Die Zellen wurden jeweils für 3, 6 und 24 Stunden mit 10 μM , 100 μM und 1000 μM o-Vanillin behandelt. Die Kontrollgruppe enthielt das Kulturmedium 1.

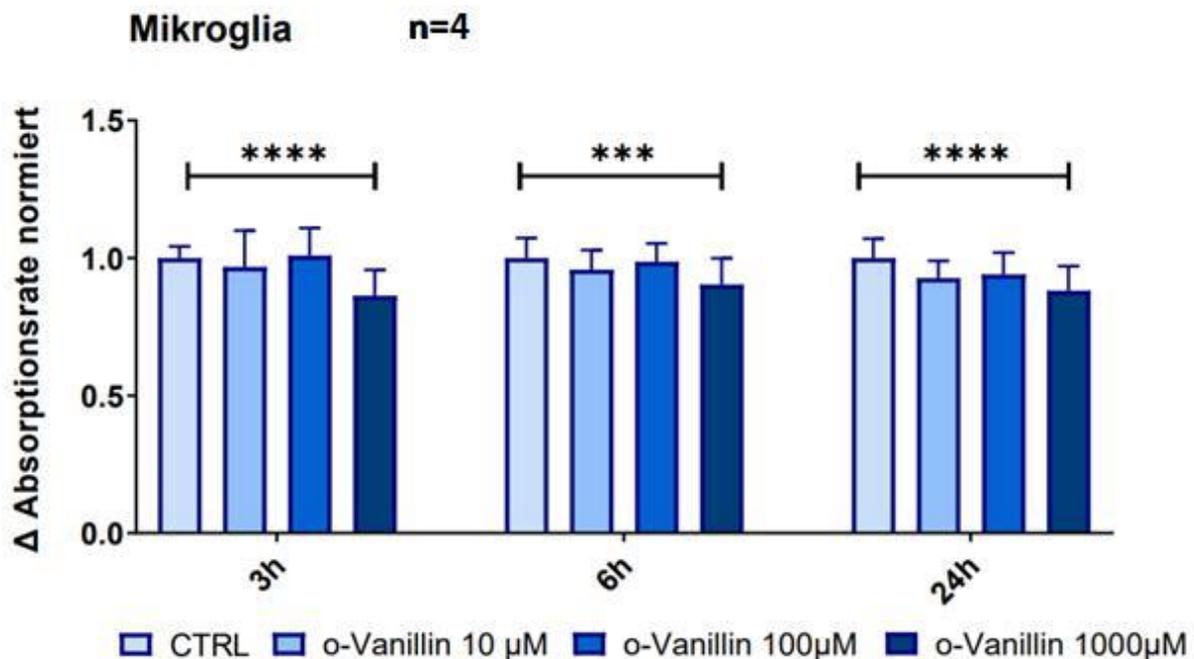


Abbildung 14

Mikroglia-Zellstoffwechsel nach der Behandlung mit 10 μM , 100 μM und 1000 μM o-Vanillin für 3, 6 und 24 Stunden. Gezeigt ist die mit dem Alamar-Blue-Assay ermittelte Absorptionsrate als Maß für den Stoffwechsel der Zellen normiert auf den Mittelwert der Negativkontrolle (CTRL).

Der Stoffwechsel der murinen Mikroglia nimmt nur bei Behandlung mit 1000 μM o-Vanillin signifikant ab. Dies hängt nicht von der Inkubationszeit ab. ***: $<0,0001$, ****: $<0,0001$.

Der Stoffwechsel der Mikroglia nahm bei allen Inkubationszeiten in der 1000 μM o-Vanillin-Gruppe ab. Nach 3 Stunden konnte im Mittel ein Abfall um 14%, nach 6 Stunden um 10% und nach 24 Stunden um 12% beobachtet werden. Eine geringfügige Stoffwechselreduktion um 6% konnte in der 100 μM o-Vanillin-Gruppe nach 24-stündiger Behandlung beobachtet werden, diese war jedoch nicht signifikant.

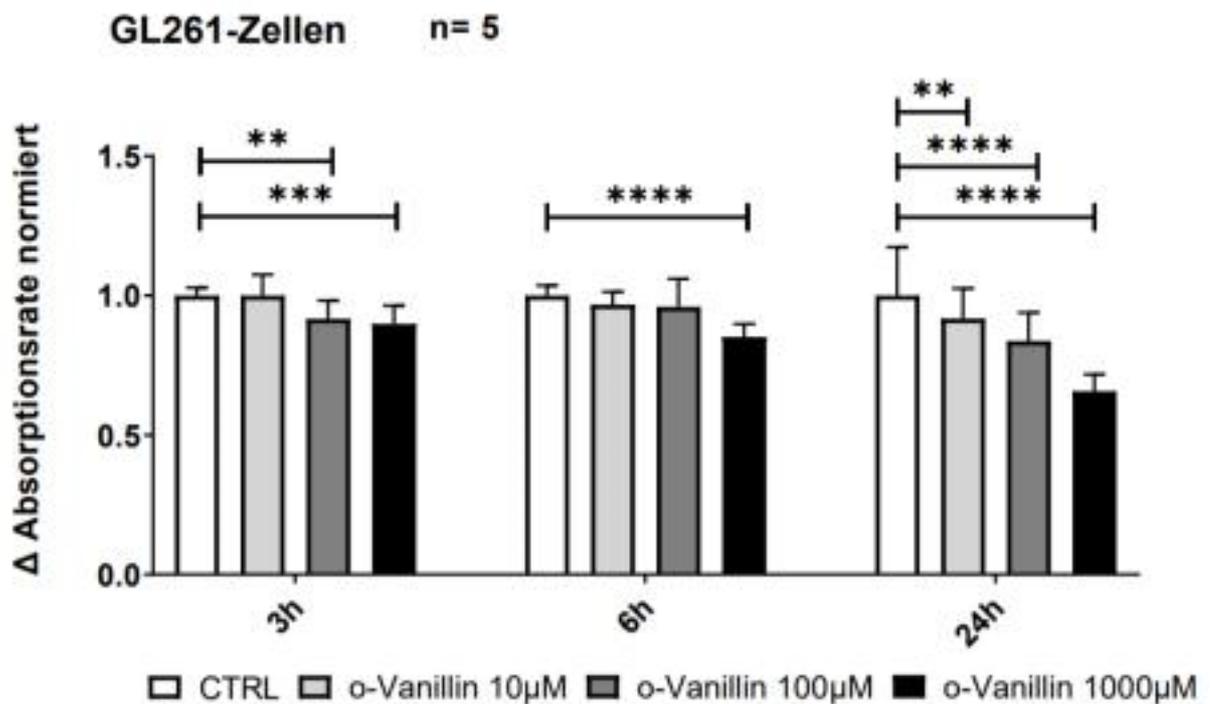


Abbildung 15

GL261-Zellstoffwechsel nach der Behandlung mit 10 μM , 100 μM und 1000 μM o-Vanillin für 3, 6 und 24 Stunden. Gezeigt ist die mit dem Alamar-Blue-Assay ermittelte Absorptionsrate als Maß für den Stoffwechsel der Zellen normiert auf den Mittelwert der Negativkontrolle (CTRL). Nach 3 Stunden Inkubationszeit nimmt der Stoffwechsel der Tumorzellen sowohl in der 100 μM o-Vanillin als auch in der 1000 μM o-Vanillin Gruppe signifikant ab. Eine weitere Reduktion konnte nach 6 Stunden in der 1000 μM o-Vanillin-Gruppe beobachtet werden. Der Abfall des Stoffwechsels nach 24-stündiger Behandlung war für alle o-Vanillin-Konzentrationen signifikant. **: <0,01, ***: <0,0001, ****: <0,0001.

Der Stoffwechsel der Tumorzellen wurde bereits nach 3-stündiger Inkubation mit 100 μM o-Vanillin um 8% und mit 1000 μM o-Vanillin um 10% reduziert. Nach 6-stündiger Behandlung mit 1000 μM o-Vanillin konnte ebenfalls ein Abfall des Stoffwechsels um 15% beobachtet werden. Die Reduktion um 4% in der 100 μM o-Vanillin Gruppe war hierbei nicht signifikant. Die 24-stündige o-Vanillin-Behandlung hatte einen reduzierenden Effekt auf den Tumorzellen-Stoffwechsel für alle getesteten Konzentrationen. Ein Abfall der

Werte um 8% für 10 µM, 16% für 100 µM und 34% für 1000 µM o-Vanillin konnte beobachtet werden (Abbildung 15).

Zur Veranschaulichung des unterschiedlichen Einflusses von o-Vanillin auf die Tumorzellen und Mikroglia wurden die Ergebnisse der Stoffwechsel-Untersuchung für beide Zellarten miteinander verglichen (Abbildung 16).

GL261-Zellen und Mikroglia

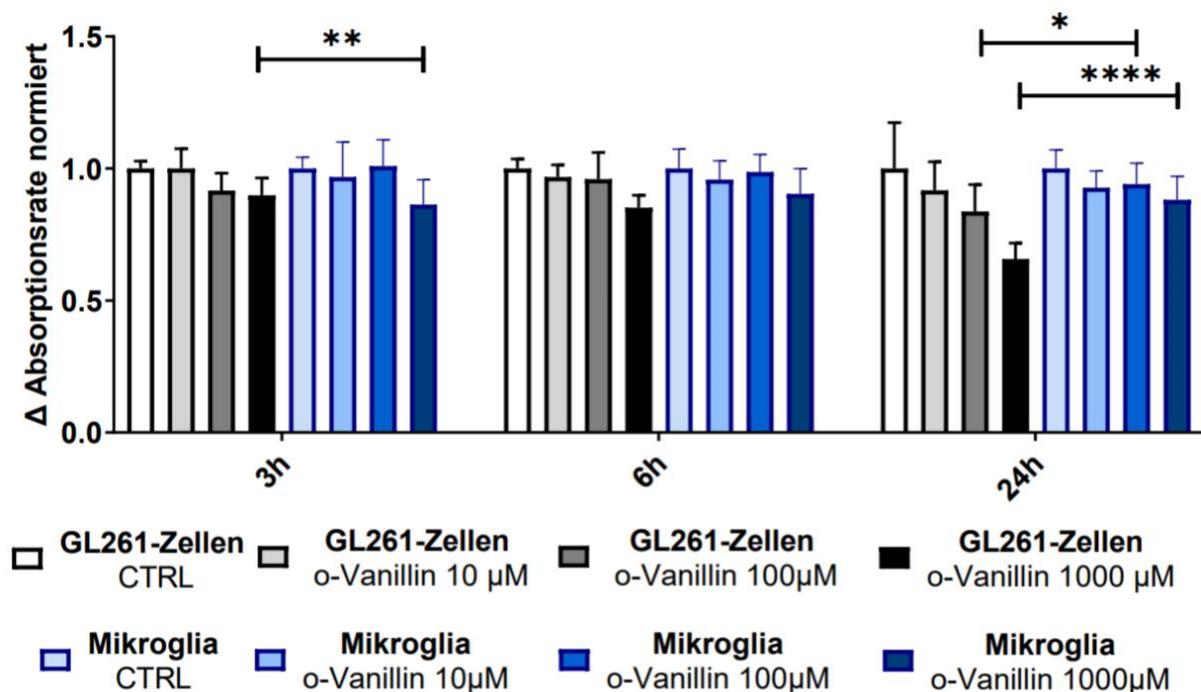


Abbildung 16

Vergleich des Zellstoffwechsels zwischen Tumorzellen und Mikroglia. Es wurden die Mittelwerte normiert auf die jeweiligen Kontrollgruppen abgebildet. Es wurden nur gleiche Behandlungsbedingungen paarweise miteinander verglichen. Der Stoffwechsel der Tumorzellen nach 3-stündiger Inkubation mit 100 µM o-Vanillin war signifikant kleiner als der Stoffwechsel der Mikroglia. Nach 24 Stunden war der Stoffwechsel der GL261-Zellen sowohl in der 100 µM o-Vanillin als auch 1000 µM o-Vanillin Gruppen kleiner als der Stoffwechsel von Mikroglia. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellarten nach 6-stündiger Inkubation mit o-Vanillin. *: <0,05, ****: <0,0001.

Nach 3-stündiger Behandlung mit 100 µM o-Vanillin blieb der Stoffwechsel der Mikroglia unverändert, während es in den Tumorzellen zur statistisch signifikanten Reduktion um 8% kam. Nach 6-stündiger Inkubation erreichte die Reduktion des Stoffwechsels ähnliche Werte für GL261-Zellen und Mikroglia. Es konnten keine relevanten Unterschiede

beobachtet werden. Die 24-stündige Inkubation mit o-Vanillin zeigte wiederum deutliche Unterschiede im Stoffwechsel der Tumorzellen und Mikroglia. Der Stoffwechsel in der 100 μM o-Vanillin Gruppe war um 10 Prozentpunkte kleiner für GL261-Zellen. Die Behandlung mit 1000 μM o-Vanillin führte zum Stoffwechselabfall um 22 Prozentpunkte in den Tumorzellen im Vergleich zu Mikroglia (Abbildung 16).

Wenn eine Stoffwechsel-Reduktion sowohl für Tumorzellen als auch Mikroglia angestrebt wird, ist eine o-Vanillin von 1000 μM zu bevorzugen. Sollen jedoch primär die Tumorzellen beeinträchtigt werden, sind 100 μM o-Vanillin besser geeignet. Da an dieser Stelle noch keine Aussage über die Vitalität der Zellen getätigt wird, kann noch keine Entscheidung hinsichtlich der optimalen o-Vanillin-Konzentration gefällt werden.

Vitalität von Tumorzellen und Mikroglia unter dem Einfluss von o-Vanillin

Für die Bestimmung des Einflusses von o-Vanillin auf die Zellvitalität in Abhängigkeit von der Konzentration und Behandlungsdauer wurden die murinen und humanen Tumorzellen (GL261- und U87-Zellen) sowie die murinen Mikroglia mit 10 μM , 100 μM und 1000 μM o-Vanillin behandelt. Die Inkubationszeiten betragen 6 und 24 Stunden für GL261-Zellen und Mikroglia und 24 Stunden für U87-Zellen. Als positive Kontrollgruppe wurden die Zellen nur mit dem Kulturmedium 1 behandelt. Die Abbildung 17 zeigt exemplarische Aufnahmen von Mikroglia vor und nach der Behandlung mit 100 μM o-Vanillin und dessen Einfluss auf die Morphologie und Konfluenz der Zellen.

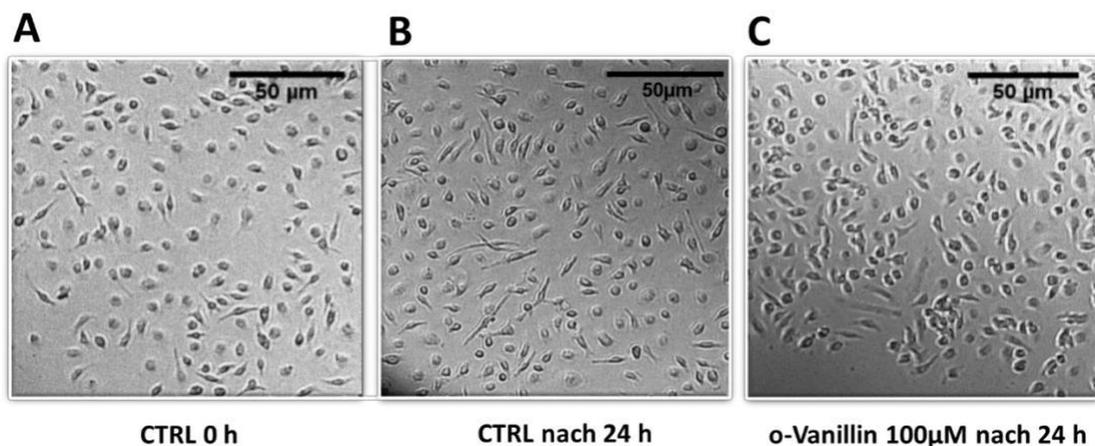


Abbildung 17

Mikroskopische Aufnahmen von Mikroglia für die Vitalitätsbestimmung nach der o-Vanillin Behandlung. (A) zeigt die Kontrollgruppe direkt vor dem Behandlungsbeginn und (B) die Kontrollgruppe nach 24 Stunden Inkubationszeit. In (C) sind die Mikroglia nach 24-stündiger Inkubation mit 100 μM o-Vanillin dargestellt. Die Dichte der adhärennten Zellen sowie ihre Morphologie sind in allen Gruppen vergleichbar.

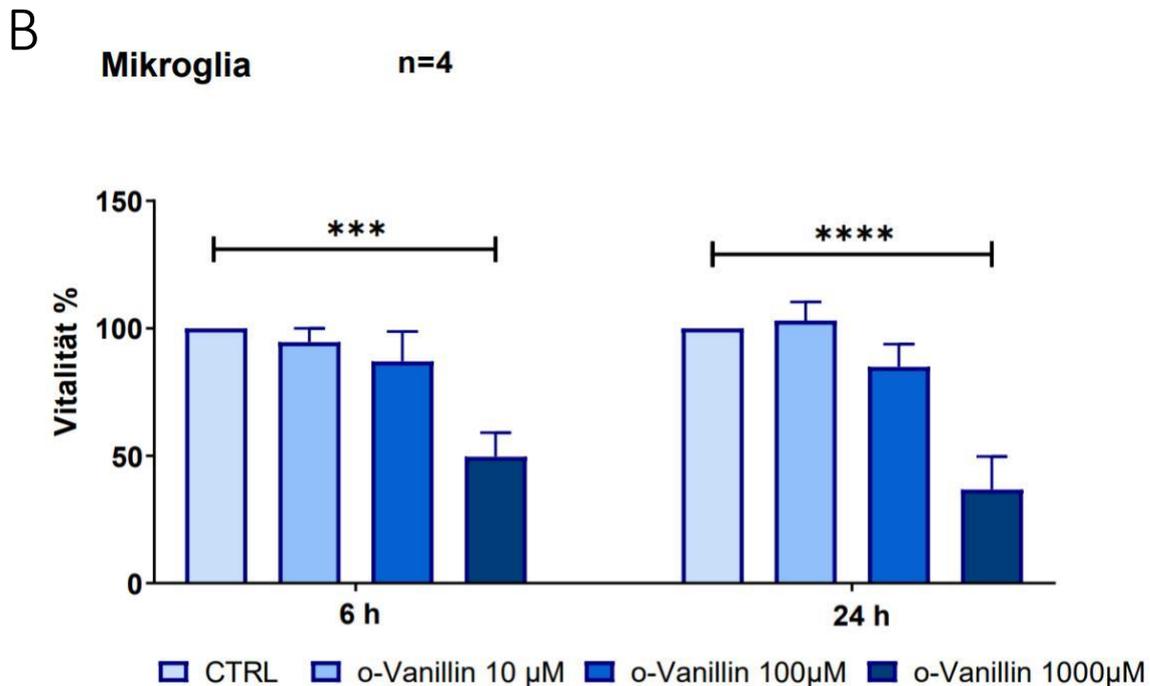
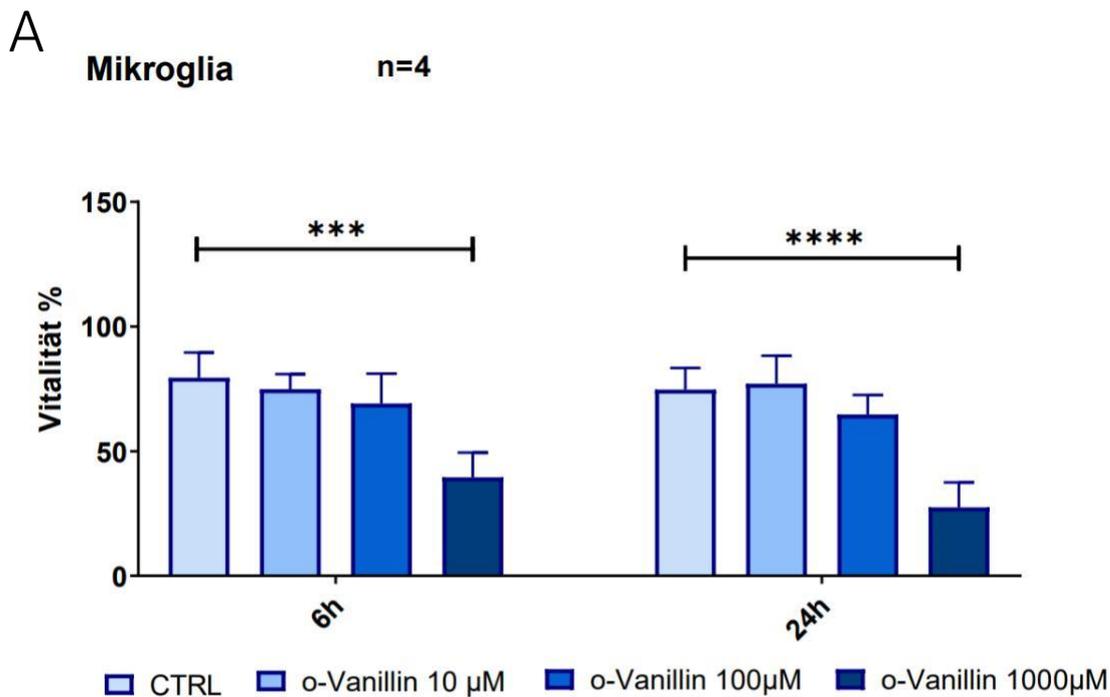


Abbildung 18

Mikroglia-Zellvitalität nach der Behandlung mit 10 µM, 100 µM und 1000 µM o-Vanillin für 6 und 24 Stunden. Nach Färbung der behandelten Zellen mit dem Farbstoff Trypan-Blau wurde der prozentuale Anteil vitaler Zellen ermittelt. Es werden die Absolutwerte (A) und die auf den Mittelwert der Negativkontrolle (CTRL) normierten Werte (B) gezeigt. Die Vitalität der Mikroglia nimmt sowohl nach 6- als auch nach 24-stündiger Behandlung mit 1000 µM o-Vanillin signifikant ab. Niedrigere o-Vanillin-Konzentrationen haben keine signifikante Wirkung. Die Signifikanzen wurden für (A) ausgerechnet und in (B) übernommen. **: <0,01, ***: <0,0001, ****: <0,0001.

Die Mikroglia wiesen nach 6-stündiger Behandlung mit 1000 μM o-Vanillin einen signifikanten Abfall der Vitalität um 50 % auf. Dieser Effekt war nach 24 Stunden noch stärker, da hier die Vitalität der Mikroglia sogar um 65% abfiel. Bei 100 μM o-Vanillin war die Reduktion der Zellvitalität um 13 % nach 6 Stunden und um 15 % nach 24 Stunden jedoch nicht signifikant. Zudem sind in exemplarischen Aufnahmen mit dem Mikroskop keine offensichtlichen morphologischen Unterschiede zwischen 100 μM o-Vanillin behandelten und unbehandelten Mikroglia zu sehen (Abbildung 17). Dementsprechend hatte die Behandlung mit 10 μM o-Vanillin ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die Vitalität (Abbildung 18).

Im Gegensatz dazu zeigten exemplarische Mikroskopie-Aufnahmen in Abbildung 19, dass die murinen GL261-Tumor-Zellen bei 24-stündiger Behandlung mit 100 μM o-Vanillin morphologische Veränderungen aufwiesen, welche bei der unbehandelten Kontrolle ausblieben.

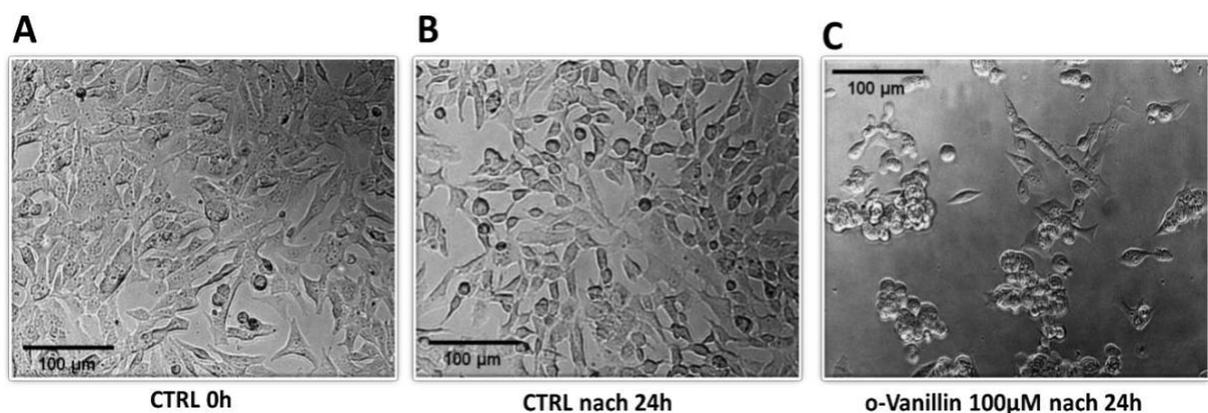


Abbildung 19

Mikroskopische Aufnahmen von GL261-Tumorzellen. (A) zeigt die Kontrollgruppe direkt vor Beginn der Behandlung und (B) die Kontrollgruppe nach 24 Stunden Inkubationszeit. In (C) sind die Tumorzellen nach 24-stündiger Inkubation mit 100 μM o-Vanillin zu sehen. Die Dichte der adhärennten Zellen ist im (C) deutlich geringer im Vergleich zu (A) und (B). Ebenso sind die Zellen in (C) abgerundet und weisen damit eine veränderte Morphologie im Vergleich zu (A) und (B) auf.

Nach 6-stündiger Inkubation fiel die Vitalität der GL261-Zellen sowohl in der 100 μM o-Vanillin-Gruppe als auch in der 1000 μM o-Vanillin Gruppe ab. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe konnte eine Reduktion um 25% nach der Behandlung mit 100 μM o-Vanillin und um 58% nach der Behandlung mit 1000 μM o-Vanillin festgestellt werden. Die selbe Tendenz war auch nach 24-stündiger Behandlung zu beobachten. 100 μM o-

Vanillin verursachten einen Vitalitätsabfall von 47 % und 1000 μM o-Vanillin von 80 %. Die Abnahme der Vitalität der Zellen nach Behandlung mit 10 μM o-Vanillin war jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 20).

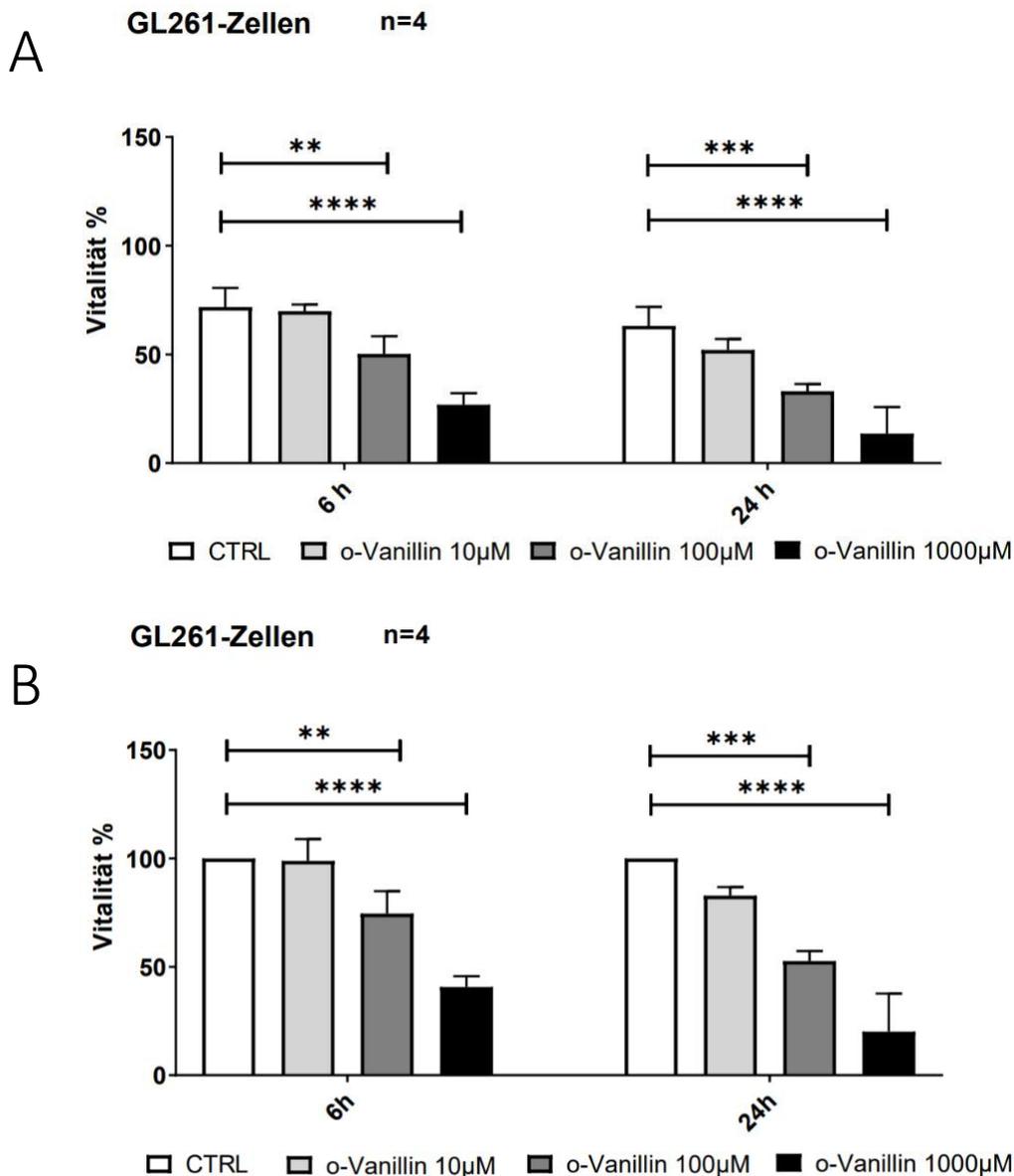
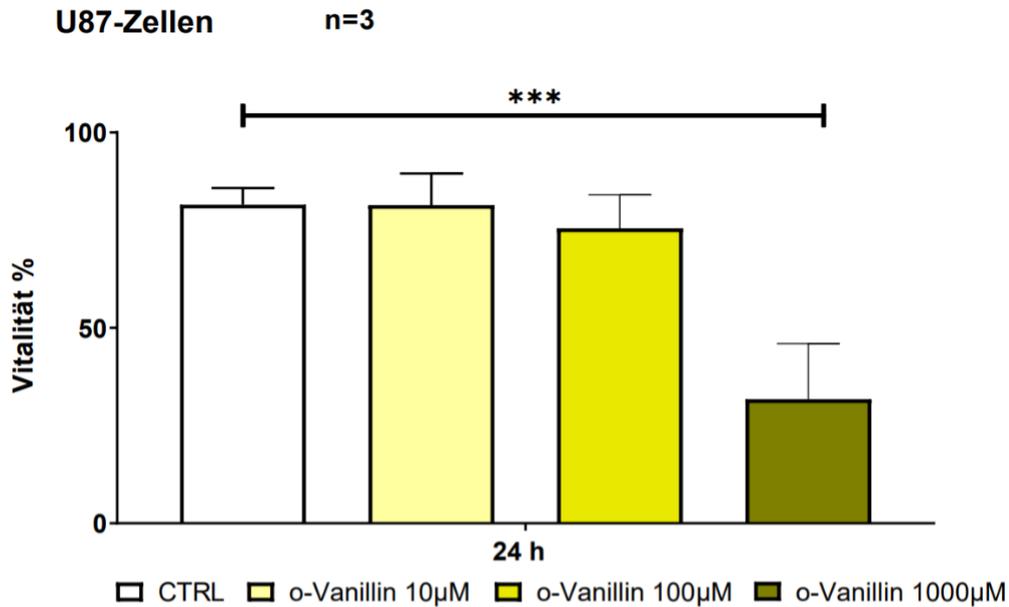


Abbildung 20

Vitalität der murinen GL261-Tumor-Zellen nach Behandlung mit 10 μM , 100 μM und 1000 μM o-Vanillin für jeweils 6 und 24 Stunden. Nach der Färbung der behandelten Zellen mit dem Farbstoff Trypan-Blau wurde der prozentuale Anteil vitaler Zellen ermittelt. Es sind die Absolutwerte (A) und die auf den Mittelwert der Negativkontrolle (CTRL) normierten Werte (B) gezeigt. Die Vitalität der Tumorzellen nimmt bereits nach 6-stündiger Behandlung mit 100 μM und 1000 μM o-Vanillin signifikant ab. Der Effekt ist nach 24 Stunden Behandlung noch stärker. Die Signifikanzen wurden für (A) ausgerechnet und in (B) übernommen. **: <0,01, ***: <0,0001, ****: <0,0001.

A



B

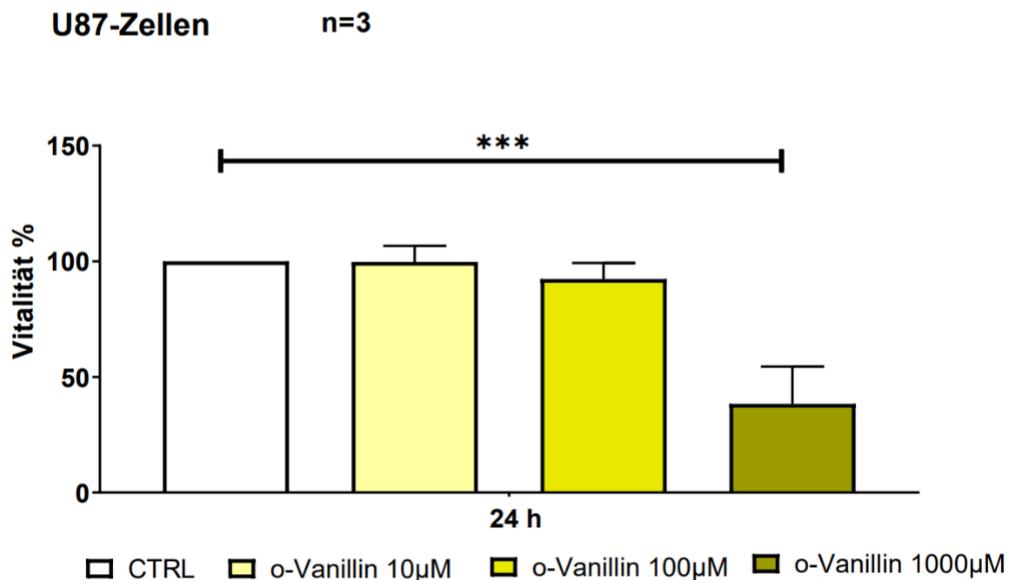


Abbildung 21

Vitalität der humanen U87-Tumor-Zellen nach Behandlung mit 10 µM, 100 µM und 1000 µM o-Vanillin für 24 Stunden. Nach der Färbung der behandelten Zellen mit dem Farbstoff Trypan-Blau wurde der prozentuelle Anteil von vitalen Zellen ermittelt. Es sind die Absolutwerte (A) und die auf den Mittelwert der Negativkontrolle (CTRL) normierten Werte (B) dargestellt. Die Vitalität der Zellen nimmt nach 24-stündiger Behandlung mit 1000 µM o-Vanillin signifikant ab. Die Reduktion der Zellvitalität bei Behandlung mit 100 µM o-Vanillin war jedoch nicht signifikant. Die Signifikanzen wurden für (A) ausgerechnet und in (B) übernommen. ***: <0,0001.

Die Vitalität der U87-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 1000 μM o-Vanillin fiel um 62% ab. Die Behandlung mit 10 μM und 100 μM o-Vanillin hatten jedoch keinen signifikanten Vitalitätsabfall zur Folge (Abbildung 21).

GL261-Zellen und Mikroglia

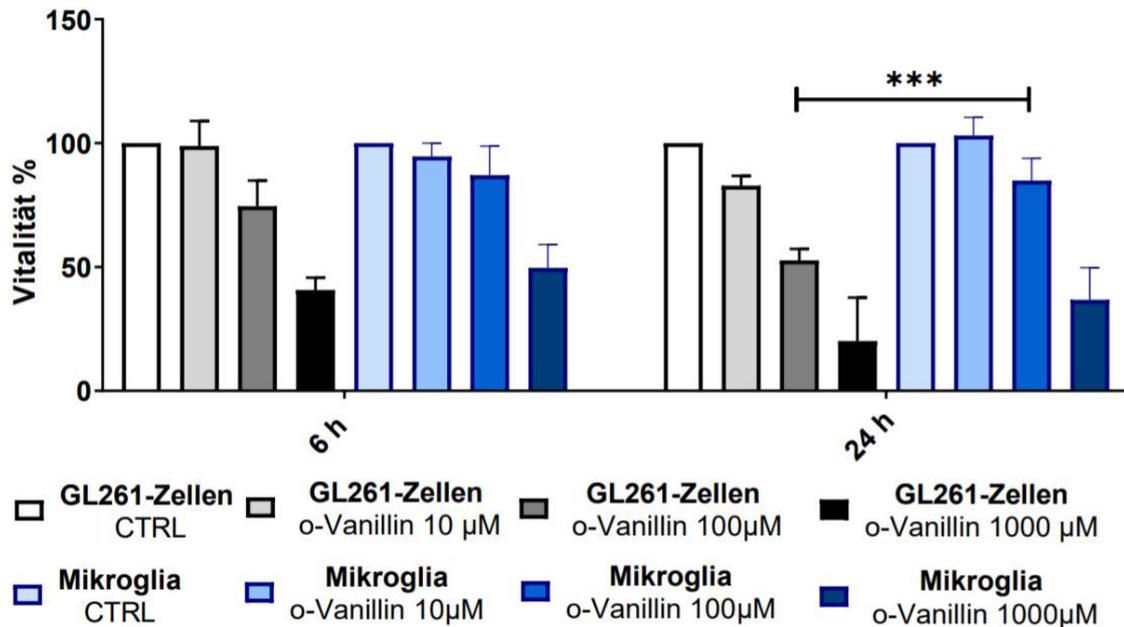


Abbildung 22

Vergleich der Zellvitalität zwischen Tumorzellen und Mikroglia. Es wurden die Mittelwerte normiert auf die jeweiligen Kontrollgruppen abgebildet. Die Vitalität der Tumorzellen nach 24-stündiger Inkubation mit 100 μM o-Vanillin war signifikant kleiner als die Vitalität der Mikroglia. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellarten in der 1000 μM o-Vanillin-Gruppe. Die bereits ermittelten Signifikanzen innerhalb derselben Zellart wurden nicht dargestellt. ***: $<0,001$.

Bei Gegenüberstellung des Effekts von o-Vanillin auf GL261-Zellen und Mikroglia zeigt sich ein um 33 Prozentpunkte stärkerer Vitalitätsabfall für GL261 bei 100 μM o-Vanillin nach 24-stündiger Inkubation (Abbildung 22). Abgesehen davon waren jedoch keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

GL261-Zellen und U87-Zellen

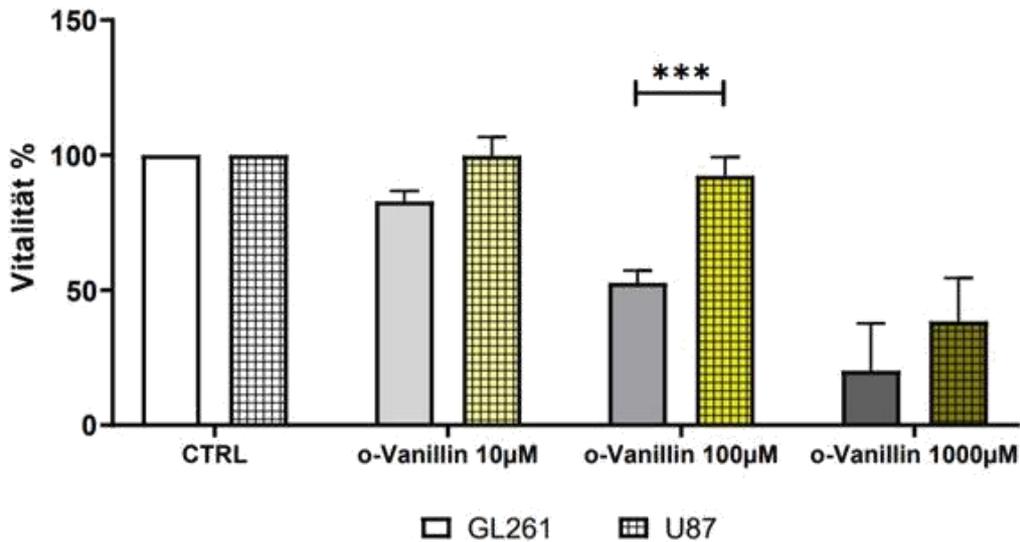


Abbildung 23

Vergleich der Zellvitalität von murinen GL261- und humanen U87-Tumorzellen nach 24-stündiger Behandlung mit 10 µM, 100 µM und 1000 µM o-Vanillin. Es wurden die auf die Kontrollgruppe normierten Werte dargestellt. Der Vitalitätsabfall in den GL261-Tumorzellen war signifikant größer als in U87-Tumorzellen. Bei 1000 µM o-Vanillin ist jedoch ein Vitalitätsabfall für beide Zelltypen zu verzeichnen – ohne signifikanten Unterschied zueinander. Die bereits ermittelten Signifikanzen innerhalb derselben Zellart wurden nicht dargestellt. ***: <math><0,001</math>.

Bei direktem Vergleich der o-Vanillin-Wirkung auf murine GL261- und humane U87-Tumor-Zellen zeigte sich, dass o-Vanillin einen stärkeren Effekt auf die murinen Zellen hat. So fiel die Vitalität der murinen Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 100 µM o-Vanillin um 40 Prozentpunkte mehr als bei den humanen Zellen. Bei 1000 µM o-Vanillin fiel der Effekt jedoch ähnlich stark aus, sodass es hier keinen signifikanten Unterschied in der Vitalität gab (Abbildung 23).

Somit ergibt sich, dass eine o-Vanillin Konzentration von 1000 µM zwar hoch genug ist um die Vitalität humaner und muriner Tumorzellen um mehr als 50 % zu senken, jedoch auch die der Mikroglia. Bei 100 µM waren die Mikroglia vitaler als die murinen Tumorzellen. Der Effekt auf die humanen Tumorzellen war jedoch nicht signifikant. Zudem zeichnete sich die Tendenz ab, dass ein längerer Behandlungszeitraum den Effekt von o-Vanillin verstärkt. Daher wurden für 100 µM o-Vanillin größere Behandlungszeiträume untersucht: 48, 72 und 120 Stunden. Tatsächlich ist eine

deutliche Veränderung der Zellmorphologie nach 120-stündiger Behandlung mit 100 μM o-Vanillin bei beiden Tumor-Zelltypen zu verzeichnen (Abbildung 24).

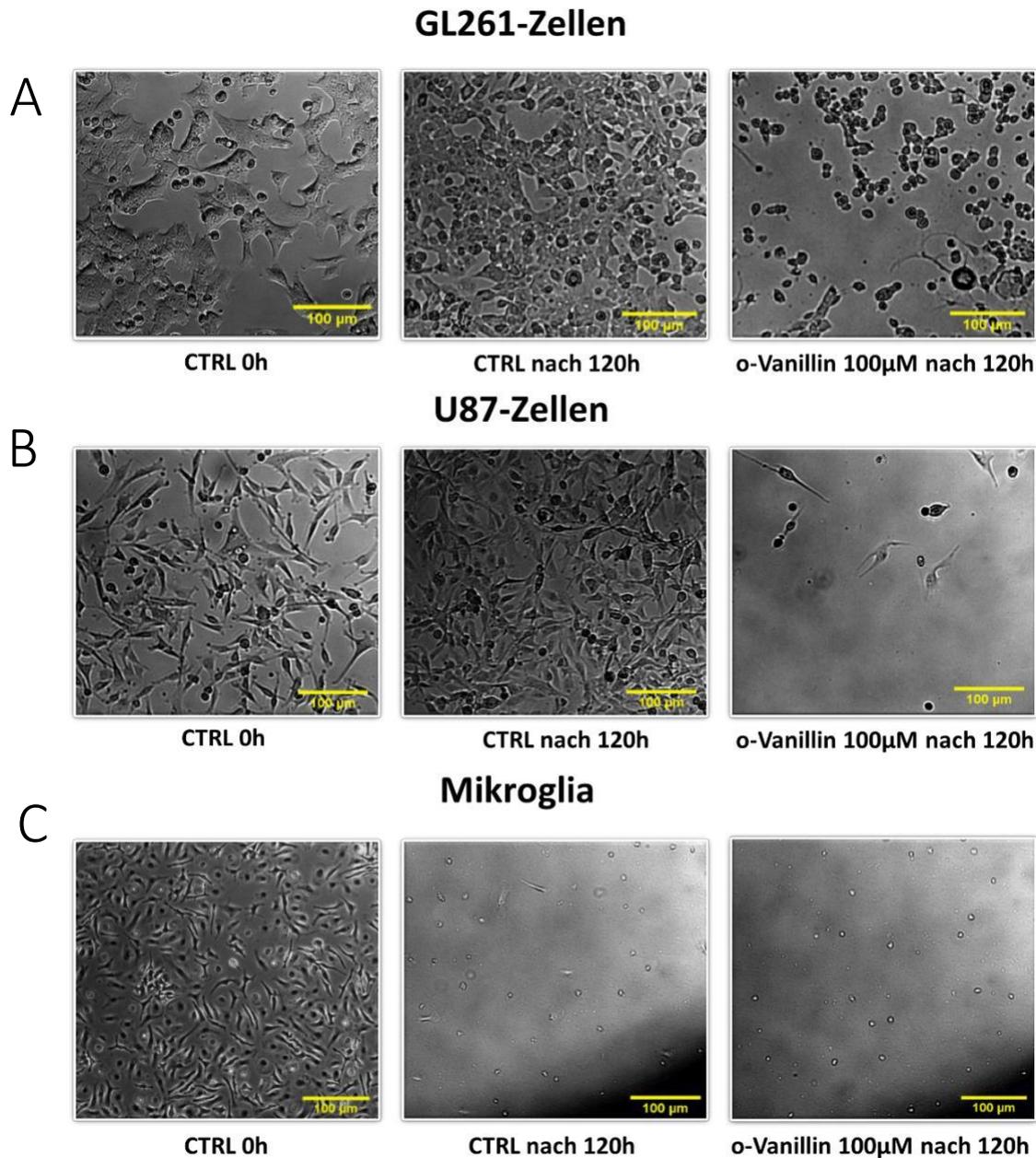


Abbildung 24

Exemplarische mikroskopische Aufnahmen von GL261-Zellen (A), U87-Zellen (B) und Mikroglia (C) nach 120-stündiger Behandlung mit 100 μM o-Vanillin. Von links nach rechts: Kontrollgruppe direkt vor Behandlungsbeginn, Kontrollgruppe nach 120 Stunden und 100 μM o-Vanillin Gruppe nach 120 Stunden Inkubationszeit. Bei den Tumorzellen (A, B) führt die o-Vanillin-Behandlung zu einer deutlichen Veränderung der Morphologie, während die unbehandelte Kontrolle keine offensichtlichen Veränderungen aufwies. Bei den Mikroglia (C), konnte keine Aussage bezüglich der Vanillin-Wirkung getroffen werden, da die Zellen über einen so langen Zeitraum nicht kultiviert werden konnten.

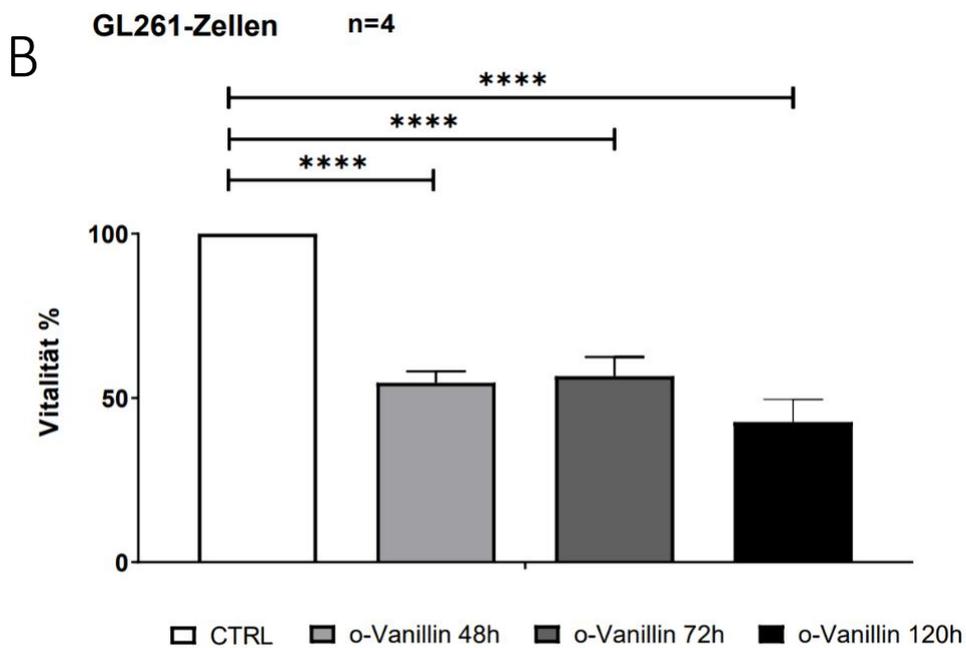
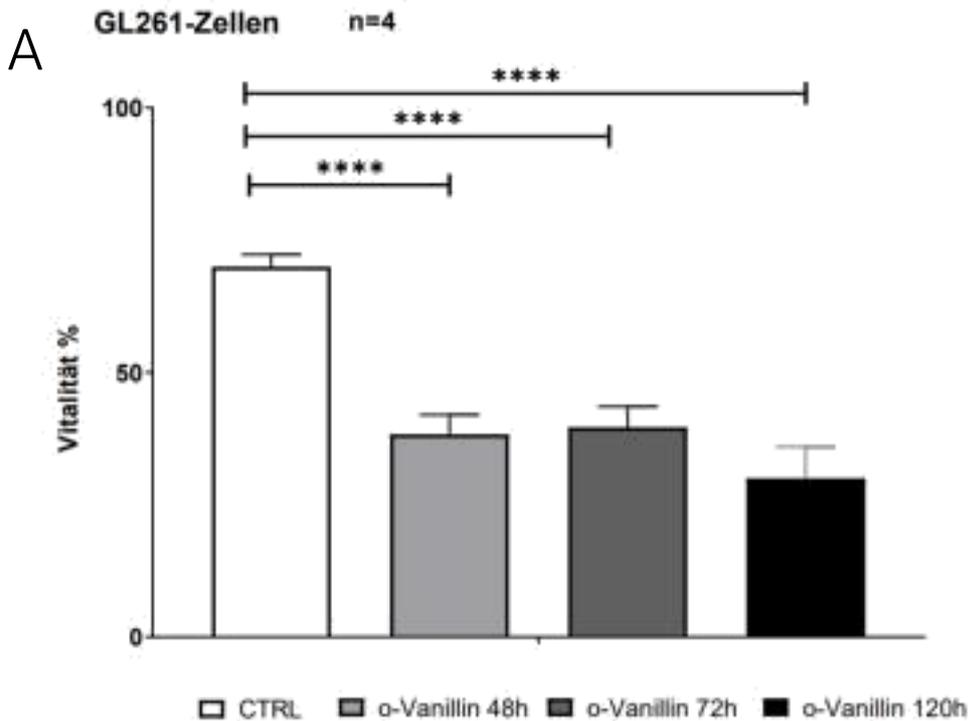


Abbildung 25

Vitalität der GL261-Zellen nach Behandlung mit 100 μ M o-Vanillin für 48, 72 und 120 Stunden. Nach der Färbung der behandelten Zellen mit dem Farbstoff Trypan-Blau wurde der prozentuale Anteil vitaler Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Absolutwerte (A) und die auf den Mittelwert der Negativkontrolle (CTRL) normierten Werte (B). Bei jeder Behandlungsdauer nahm die Vitalität signifikant ab. Die Signifikanzen wurden für (A) ausgerechnet und in (B) übernommen. ****: <0,0001.

Bei den GL261-Zellen war die Abnahme der Vitalität für jede Behandlungsdauer mit 100 μM o-Vanillin signifikant. Sie sank um 45 % nach 48 h, 43 % nach 72 h und 57 % nach 120 h Inkubation. Untereinander waren die o-Vanillin-Behandlungsgruppen nicht signifikant, obwohl die Abnahme der Vitalität nach 120 h o-Vanillin Behandlung am höchsten war (Abbildung 25).

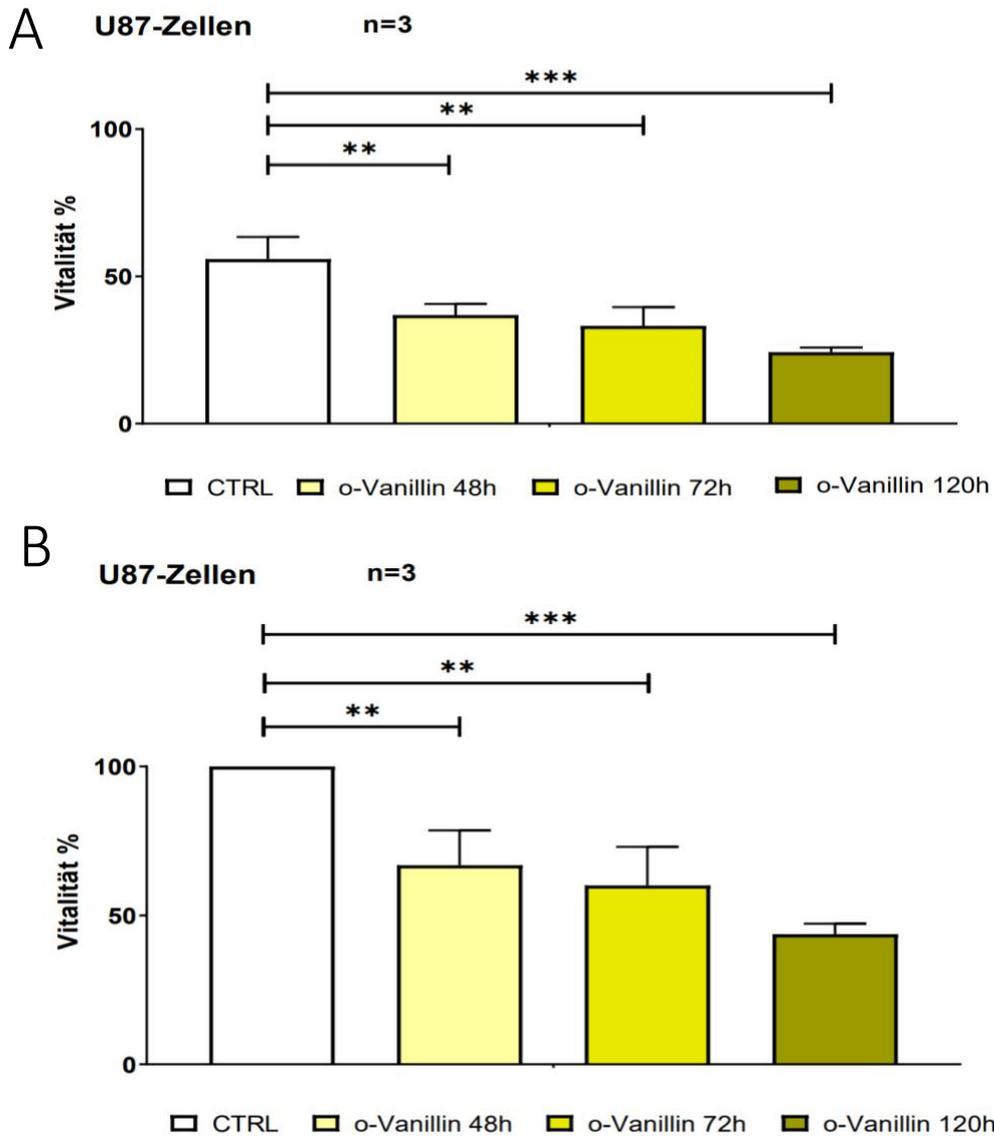


Abbildung 26

U87-Zellvitalität nach der Behandlung mit 100 μM o-Vanillin für 48, 72 und 120 Stunden. Nach Färbung der behandelten Zellen mit dem Farbstoff Trypan-Blau wurde der prozentuelle Anteil vitaler Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Absolutwerte (A) und die auf den Mittelwert der Negativkontrolle (CTRL) normierten Werte (B). Bei jeder Behandlungsdauer nahm die Vitalität signifikant ab. Die Signifikanzen wurden für (A) ausgerechnet und in (B) übernommen. **: $<0,01$, ***: $<0,001$

Bei den U87-Zellen war die Abnahme der Vitalität für jede Behandlungsdauer mit 100 μM o-Vanillin ebenfalls signifikant. Sie sank um 33 % nach 48 h, 40 % nach 72 h und 56 % nach 120 h Inkubation. Obgleich die o-Vanillin Behandlungsgruppen untereinander nicht signifikant unterschiedlich waren, so ist dennoch die Tendenz zu beobachten, dass eine längere Behandlungsdauer mit einer niedrigeren Vitalität einhergeht (Abbildung 26). Im direkten Vergleich der murinen und humanen Tumorzellen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bei den selben Behandlungsbedingungen, womit die Übertragbarkeit der Untersuchungen an murinen Zellen auf menschliche Zellen möglich scheint (Abbildung 27). Da die Vitalität der Tumorzellen mit zunehmender Behandlungszeit abnimmt und präparationsbedingt keine Aussage zur Vitalität der Mikroglia getätigt werden konnte, wird die Wirkung von o-Vanillin in den *ex vivo* Experimenten für alle 3 Behandlungszeiträume (48 h, 72 h und 120 h) untersucht.

GL261-Zellen und U87-Zellen

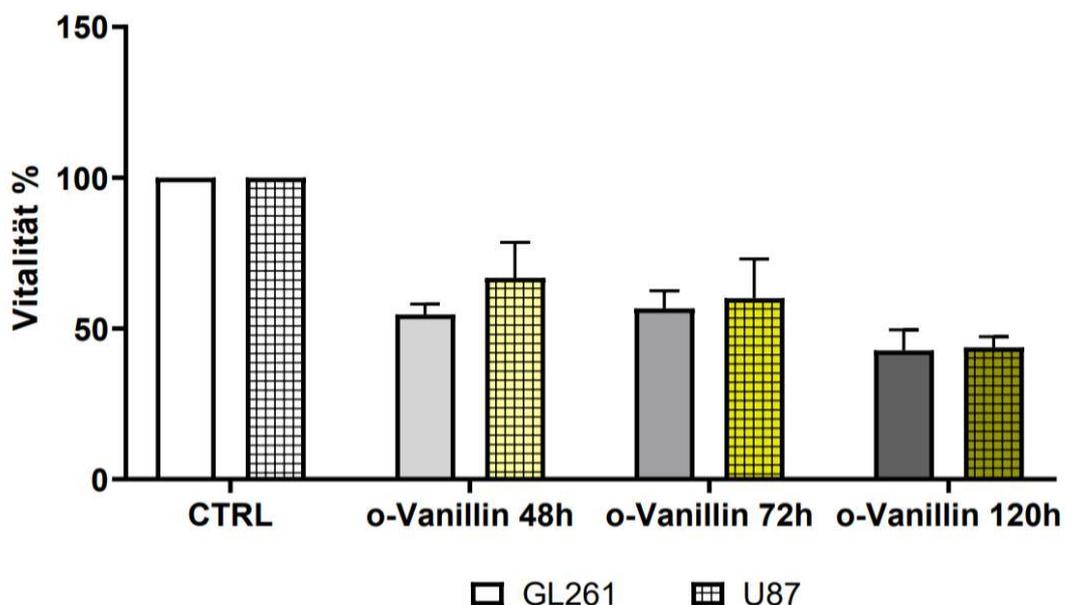


Abbildung 27

Vergleich der Zellvitalität zwischen GL261-Tumorzellen und humanen U87-Tumorzellen nach der Behandlung mit 100 μM o-Vanillin für 48, 72 und 120 Stunden. Es wurden die Mittelwerte normiert auf die jeweiligen Kontrollgruppen abgebildet. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Vitalitätsreduktion zwischen den beiden Tumorzelllinien zu keiner der gemessenen Zeiten. Die bereits ermittelten Signifikanzen innerhalb derselben Zellart wurden nicht dargestellt.

Tumorwachstum in murinen organotypischen Hirnschnitten

Teilergebnisse dieses Kapitels wurden bereits in (1) am 22.04.2020 veröffentlicht. Zwischenzeitlich wurden weitere Versuche durchgeführt, sodass die hier gezeigten Absolutwerte von denen in der Publikation abweichen können. Es handelt sich hierbei um die in Abbildung 31 dargestellten Ergebnisse.

Ziel dieser Experimente war es, die Zusammenwirkung von Tumorzellen, Mikroglia und o-Vanillin in physiologischem Milieu zu untersuchen. Im ersten Teil des Experiments wurde der Einfluss von 100 μ M o-Vanillin auf die inokulierten Tumoren in Anwesenheit von Mikroglia untersucht (Abbildung 29). Insgesamt wurden 5 unabhängige Versuche durchgeführt (Tabelle 20). Abbildung 28 zeigt eine exemplarische 3D-Rekonstruktion eines Hirnschnitts.

Tabelle 20

Anzahl der Tumore für die jeweilige Behandlungsgruppe und den jeweiligen Versuch.

	n_1	n_2	n_3	n_4	n_5
CTRL	5	4	6	5	8
o-Vanillin 48h	3	4	5	12	15
o-Vanillin 72h	3	4	5	8	10
o-Vanillin 120h	3	6	5	3	7

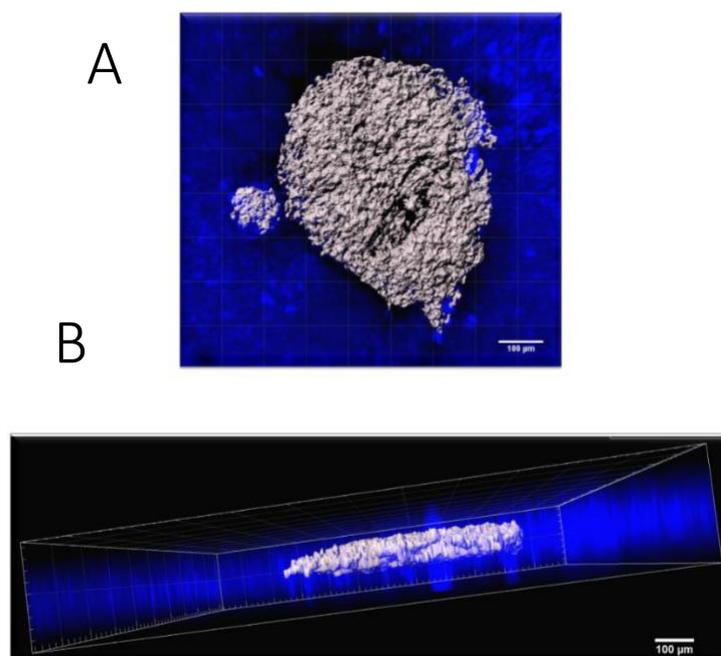


Abbildung 28

3D Rekonstruktion eines in murinem Hirngewebe eingebetteten GL261-Tumors. Das weiße Objekt stellt den mCherry-GL261-Tumor dar, während der blaue Hintergrund die Höchst-Zellkernfärbung vom Hirngewebe repräsentiert. (A) Frontale Ansicht (x-y-Ebene) Der Tumor ist klar abgegrenzt vom umgebenden Gewebe. (B) Horizontale Ansicht (x-z-Ebene). Hier ist zu erkennen, dass der Tumor tatsächlich im Gewebe gewachsen ist und nicht auf der Oberfläche des Hirnschnitts.

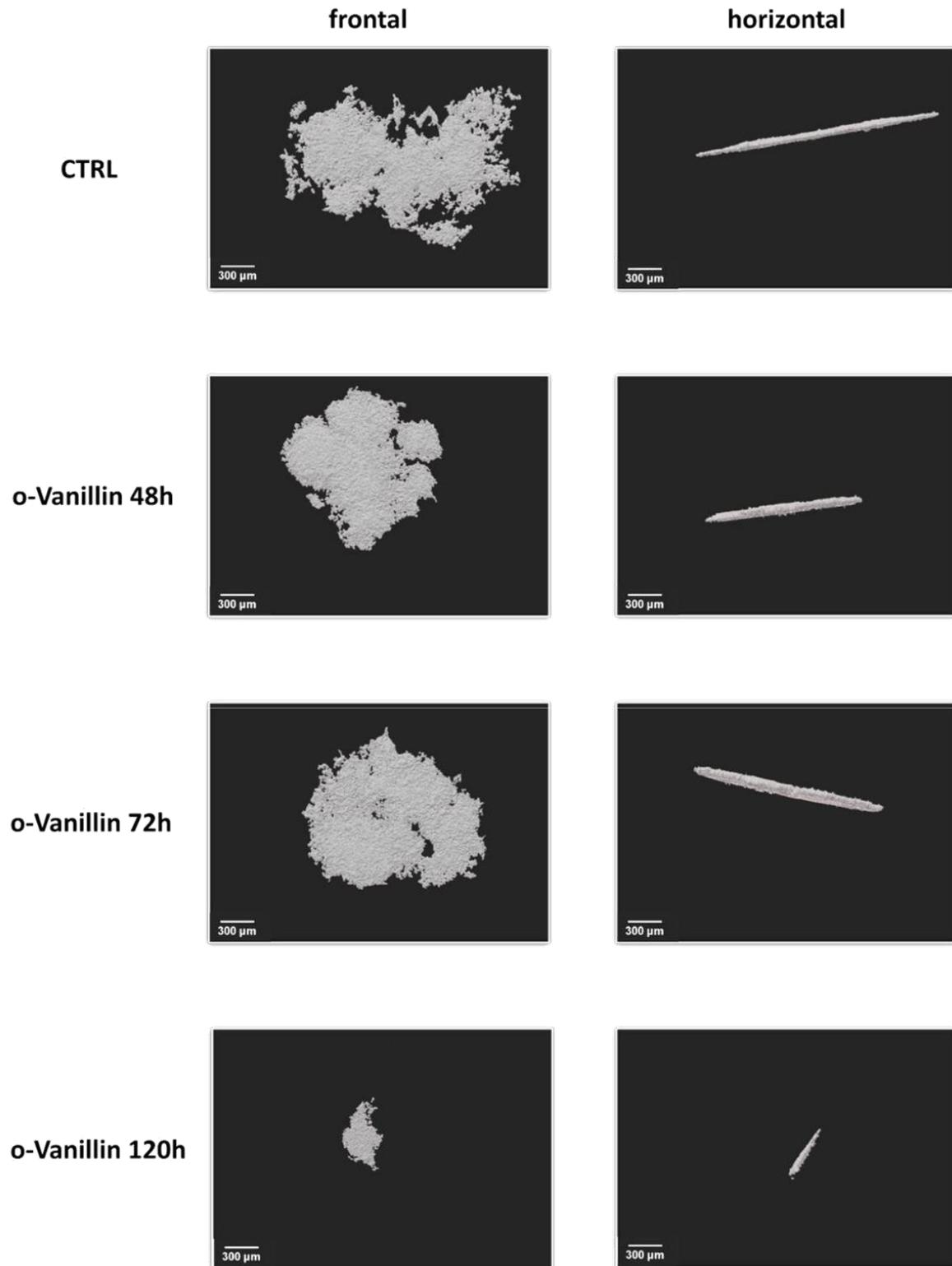


Abbildung 29

Exemplarische 3D-Rekonstruktionen von inokulierten mCherry-GL261-Tumoren in Hirnschnitten für die jeweiligen Behandlungsgruppen. Links wird die frontale Ansicht und rechts die horizontale Ansicht desselben Tumors dargestellt. Man kann eine deutliche Reduktion der Tumorgroße bei Behandlung mit o-Vanillin für 120 Stunden feststellen.

Die Behandlung mit o-Vanillin bewirkte eine Abnahme der Tumoroberfläche im Hirngewebe. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war die Oberfläche 23 % kleiner bei 48 h, 26 % kleiner bei 72 h und 73 % kleiner bei 120 h. Hierbei war die Abnahme der Oberfläche nur bei einer Behandlungsdauer von 120 h signifikant (Abbildung 30).

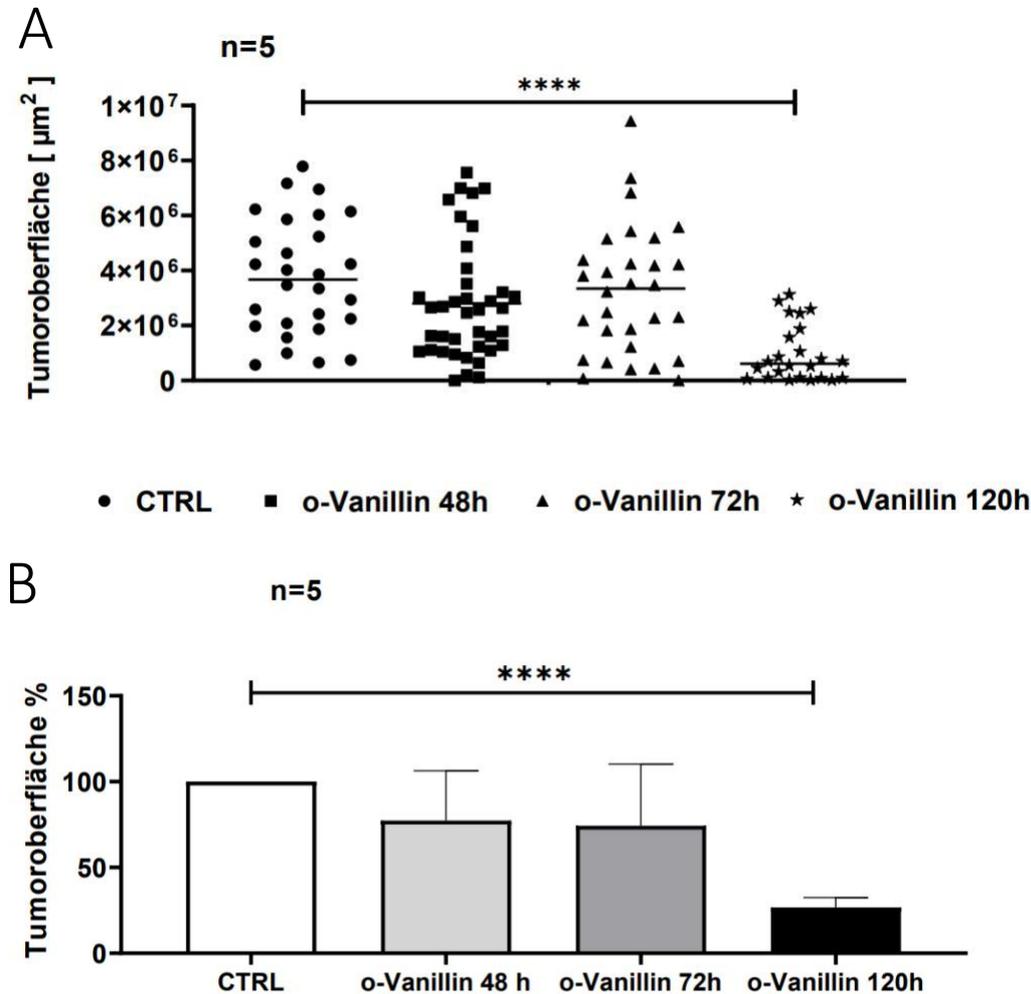


Abbildung 30

Einfluss der 100 μM o-Vanillin-Behandlung auf die Oberfläche von mCherry-GL261-Tumoren im Hirngewebe bei Inkubationszeiten von 48 h, 72 h und 120 h. Dargestellt sind die Absolutwerte (A) und die auf den Mittelwert der Negativkontrolle (CTRL) normierten Werte (B). Die Tumoroberfläche ist nach 120-stündiger Behandlung signifikant reduziert. Die Signifikanzen wurden für (A) ausgerechnet und in (B) übernommen. ****: $<0,0001$.

Die o-Vanillin-Behandlung wirkte sich auch auf das Tumolvolumen aus. Eine signifikante Abnahme um 73 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnte bei einer Behandlungsdauer von 120 h beobachtet werden, jedoch nicht für 48 h und 72 h (Abbildung 31).

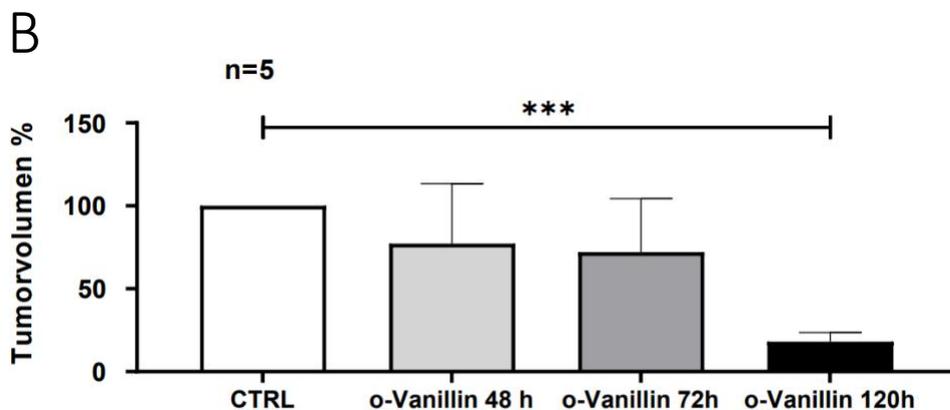
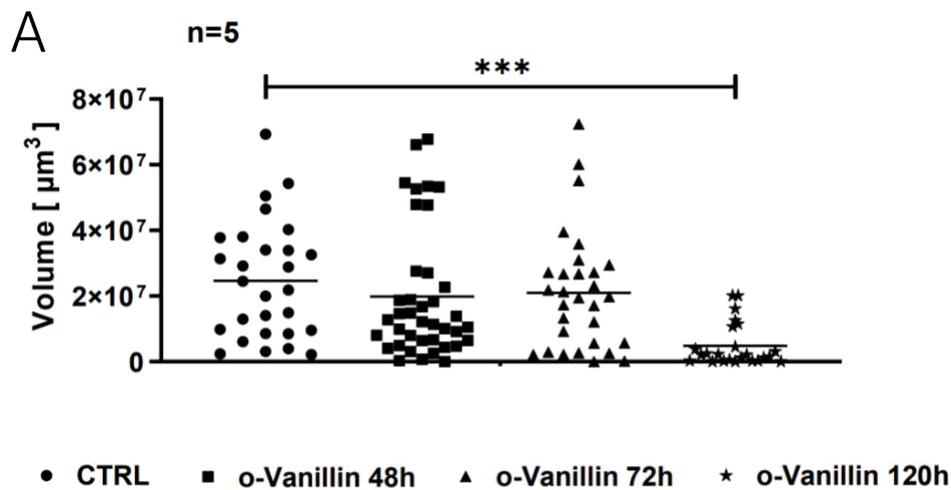


Abbildung 31

Einfluss der $100 \mu\text{M}$ o-Vanillin-Behandlung auf das Volumen von mCherry-GL261-Tumoren im Hirngewebe bei Inkubationszeiten von 48 h, 72 h und 120 h. Dargestellt sind die Absolutwerte (A) und die auf den Mittelwert der Negativkontrolle (CTRL) normierten Werte (B). Das Tumorumvolumen ist nach 120-stündiger Behandlung signifikant reduziert. Die Signifikanzen wurden für (A) ausgerechnet und in (B) übernommen. ***: $<0,001$.

Das Ausmaß der Auswirkung auf das Tumor-Volumen und die Tumoroberfläche ist vergleichbar (Abbildung 32). Lediglich bei der Behandlungsdauer von 120 h ist die Abnahme des Volumens größer, was jedoch durch die Geometrie bedingt sein kann, da das Volumen und die Oberfläche im Allgemeinen in keinem festen Verhältnis zueinander stehen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Behandlung von Hirnschnitten mit inkulierten Tumoren mit $100 \mu\text{M}$ o-Vanillin für 120 Stunden das Wachstum des Tumors einschränkt.

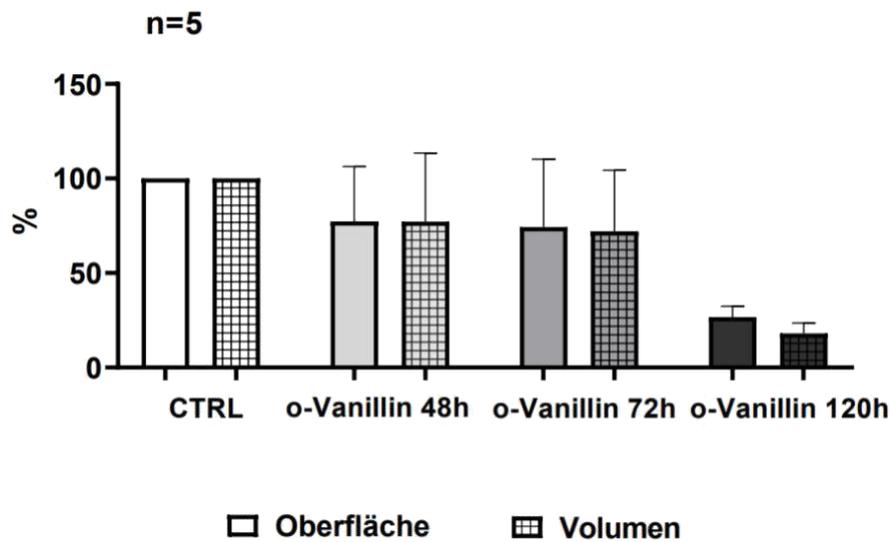


Abbildung 32

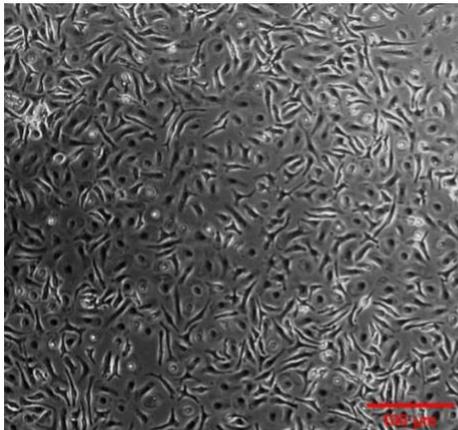
Vergleich von Tumoroberfläche und -volumen. Es wurden die Mittelwerte normiert auf die Kontrollgruppe dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Tumoroberfläche und dem Tumolvolumen in den jeweiligen Behandlungsgruppen.

Tumorwachstum in murinen organotypischen Hirnschnitten nach Mikroglia-Depletion

Teilergebnisse dieses Kapitels wurden bereits in (1) am 22.04.2020 veröffentlicht. Zwischenzeitlich wurden weitere Versuche durchgeführt, sodass die hier gezeigten Absolutwerte von denen in der Publikation abweichen können. Es handelt sich hierbei um die in Abbildung 37 gezeigten Ergebnisse.

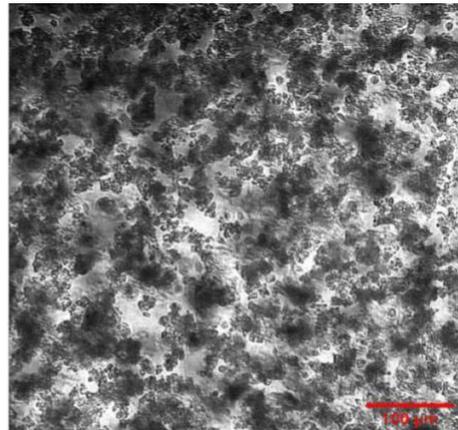
Zur Untersuchung des direkten Einflusses von o-Vanillin auf die GL261-Tumoren wurden die Mikroglia ausgeschaltet. Die Wirksamkeit der Mikroglia-Depletion mit Clodronat-Liposomen wurde vorab in vitro getestet. Hierbei wurden die Mikroglia für 24 Stunden in Kultivierungsmedium mit 10 % Clodronat-Liposomen-Lösung inkubiert. Nach der Behandlung wiesen die Mikroglia eine stark veränderte Morphologie auf und waren auch nicht mehr adhärent (Abbildung 33).

A



**Mikroglia im Kulturmedium 1
nach 24 h**

B



**Mikroglia mit Clodronat-Liposomen
nach 24 h**

Abbildung 33

Exemplarische mikroskopische Aufnahmen von Mikroglia vor (A) und nach (B) 24-stündiger Behandlung mit Clodronat-Liposomen. Die Morphologie der Zellen in (B) ist im Vergleich zu (A) stark verändert und die Zelladhärenz aufgehoben (erkennbar durch die inhomogene Schattierung in (B)), was für eine adäquate Wirkung der Liposomen spricht.

Des Weiteren wurden Gehirnschnitte der MacGreen-Mäuse, welche grün fluoreszierende Mikroglia enthalten, mit Clodronat-Liposomen behandelt und anschließend mit einem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop abgebildet, um so die Wirksamkeit der Clodronat-

Liposomen auch unter *ex-vivo*-Bedingungen zu zeigen (Abbildung 34). Hierbei wiesen mit Clodronat-Liposomen behandelte Hirnschnitte eine niedrigere Signalintensität auf als jene, die reines Kulturmedium erhielten, was auf die Wirksamkeit der Clodronat-Liposomen hindeutet. Exemplarische 3D-Rekonstruktionen von Tumoren für die jeweilige Behandlungsgruppe werden in der Abbildung 35 dargestellt.

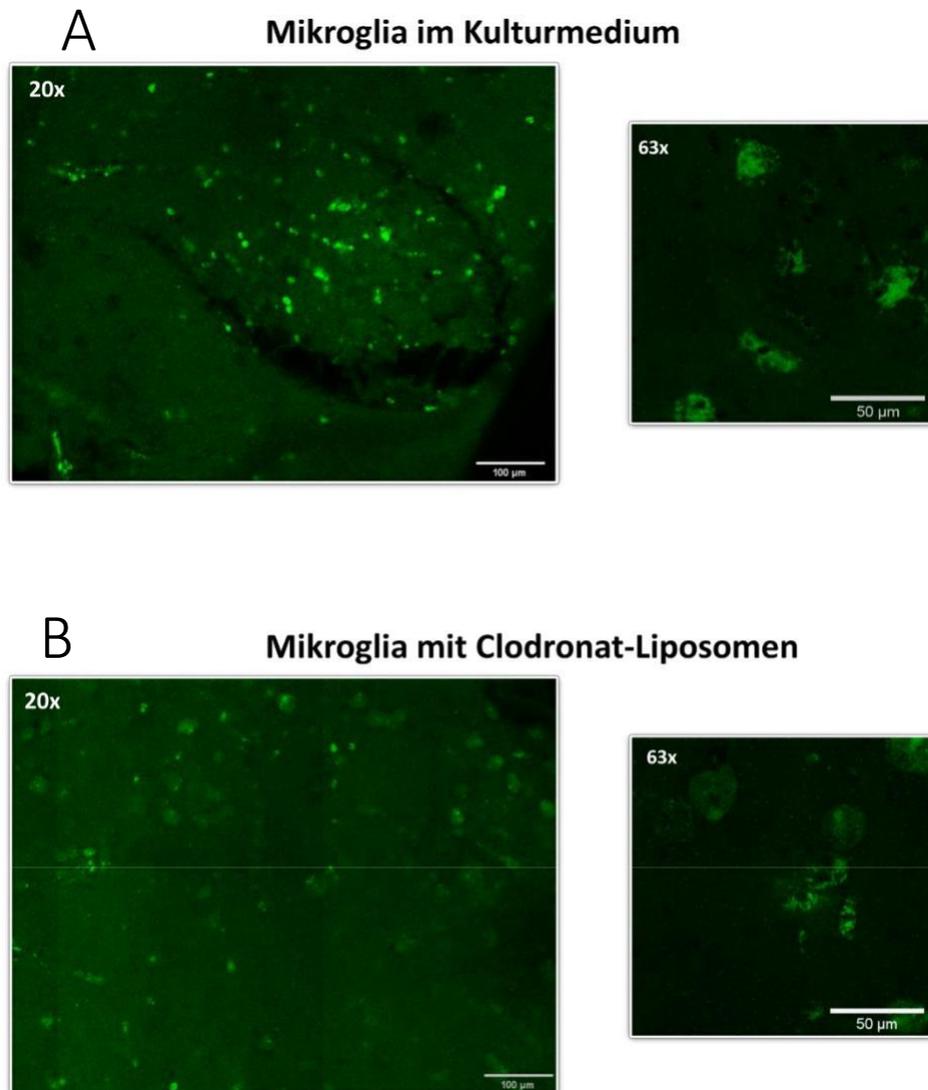


Abbildung 34

Aufnahmen mit dem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop von Gehirnschnitten der MacGreen-Mäuse nach 144-stündiger Kultivierung. Die grün fluoreszierenden Zellen stellen die Mikroglia dar. (A) Die Gehirnschnitte wurden als Kontrollgruppe mit Kulturmedium inkubiert. (B) Die Gehirnschnitte wurden direkt nach Erstellung für 24 Stunden mit den Clodronat-Liposomen behandelt und anschließend 120 Stunden mit dem Kulturmedium inkubiert. Bei denselben Messparametern ist das Fluoreszenzsignal der Zellen in (B) schwächer als in (A). Die Form der Zellen in (B) weicht von der Kontrolle ab.

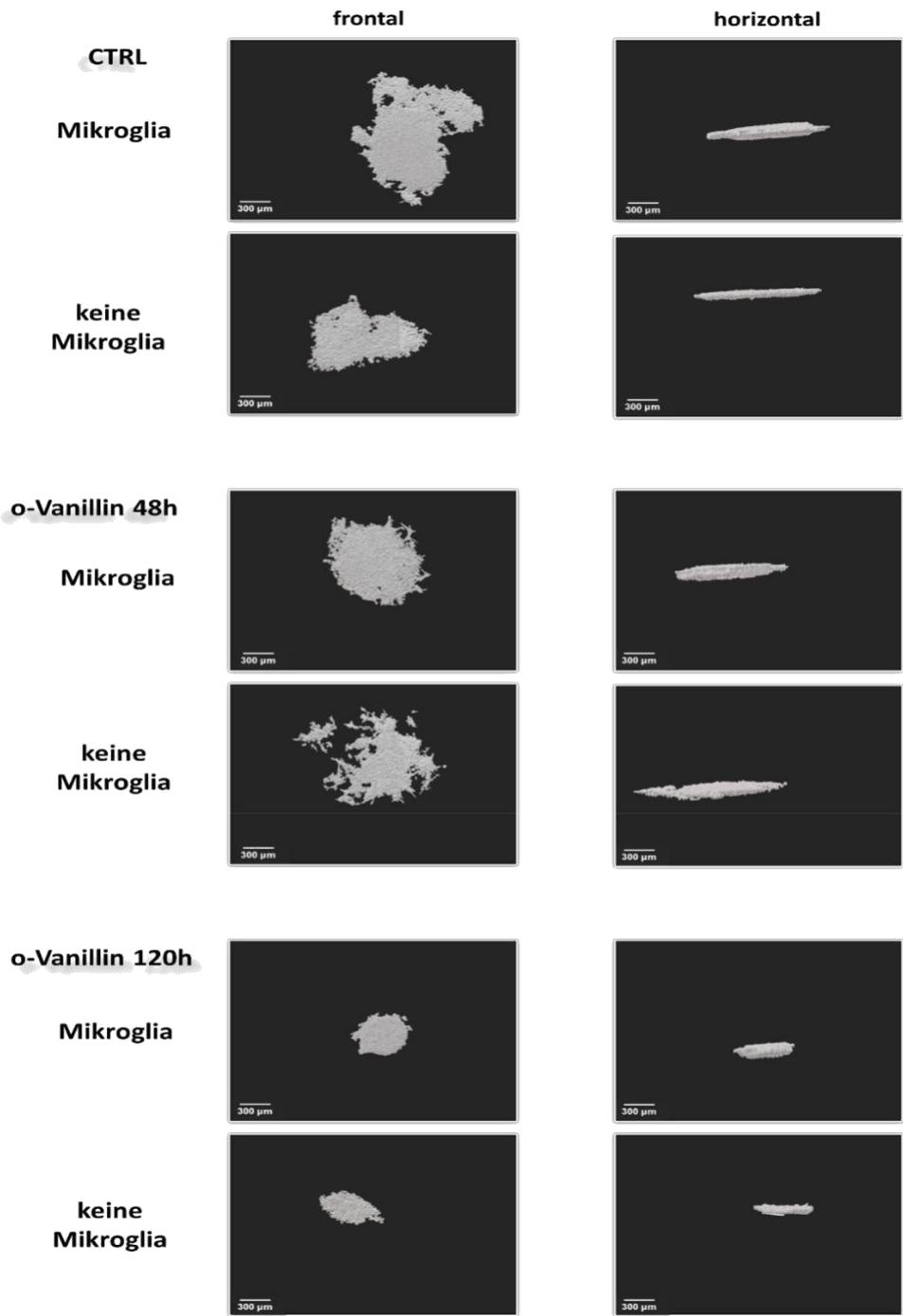


Abbildung 35
 Exemplarische 3D-Rekonstruktionen von Tumoren aus den jeweiligen Behandlungsgruppen mit und ohne Mikroglia. Links wird die frontale Ansicht (x-y Ebene) und rechts die horizontale Ansicht (x-z Ebene) desselben Tumors gezeigt. Man kann eine deutliche Reduktion der TumorgroÙe nach Behandlung mit o-Vanillin für 120 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennen, sowohl mit als auch ohne Mikroglia. Zudem ist in der horizontalen Ansicht ohne Mikroglia zu erkennen, dass der Tumor unter diesen Bedingungen noch kleiner ist als mit Mikroglia.

Folgend wurde der Einfluss von 100 µM o-Vanillin auf die Tumoren in Abwesenheit von Mikroglia untersucht. Insgesamt wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt (Tabelle 21).

Tabelle 21

Anzahl der Tumore in den jeweiligen Behandlungsgruppen und Versuchen. Die Anwesenheit der Mikroglia in den Gehirnschnitten wurde entsprechend mit (-) und (+) Zeichen bezeichnet.

	n_1		n_2		n_3		n_4	
Mikroglia	+	-	+	-	+	-	+	-
CTRL	4	2	3	3	5	3	7	7
o-Vanillin 48 h	3	2	2	2	3	3	7	8
o-Vanillin 120 h	6	5	4	4	5	6	7	8

Auch in diesen Experimenten konnte eine signifikante Reduktion der Tumoroberfläche nur nach 120-stündiger Behandlung mit o-Vanillin beobachtet werden. Allerdings nur bei Abwesenheit von Mikroglia um 45 %. Die Tumoroberfläche war hier im Vergleich mit den Hirnschnitten mit Mikroglia um 29 % signifikant niedriger (Abbildung 36).

Ein ähnlicher Effekt zeichnete sich auch für das Tumolvolumen ab. Hier war eine Abnahme infolge der o-Vanillin-Behandlung nach 120 h sowohl mit als auch ohne Mikroglia zu beobachten, um 50 % beziehungsweise 43%. Die größte Abnahme im Volumen ist zu verzeichnen bei Hirnschnitten ohne Mikroglia nach 120-stündiger o-Vanillin-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Hirnschnitten mit Mikroglia. Somit spielen auch die Mikroglia bei der Tumorentwicklung eine Rolle.

Zu bemerken ist auch, dass das Tumolvolumen bei der Negativkontrolle ohne Mikroglia um 20 % niedriger war im Vergleich zur Negativkontrolle mit Mikroglia, obgleich dieser Effekt nicht signifikant war (Abbildung 37).

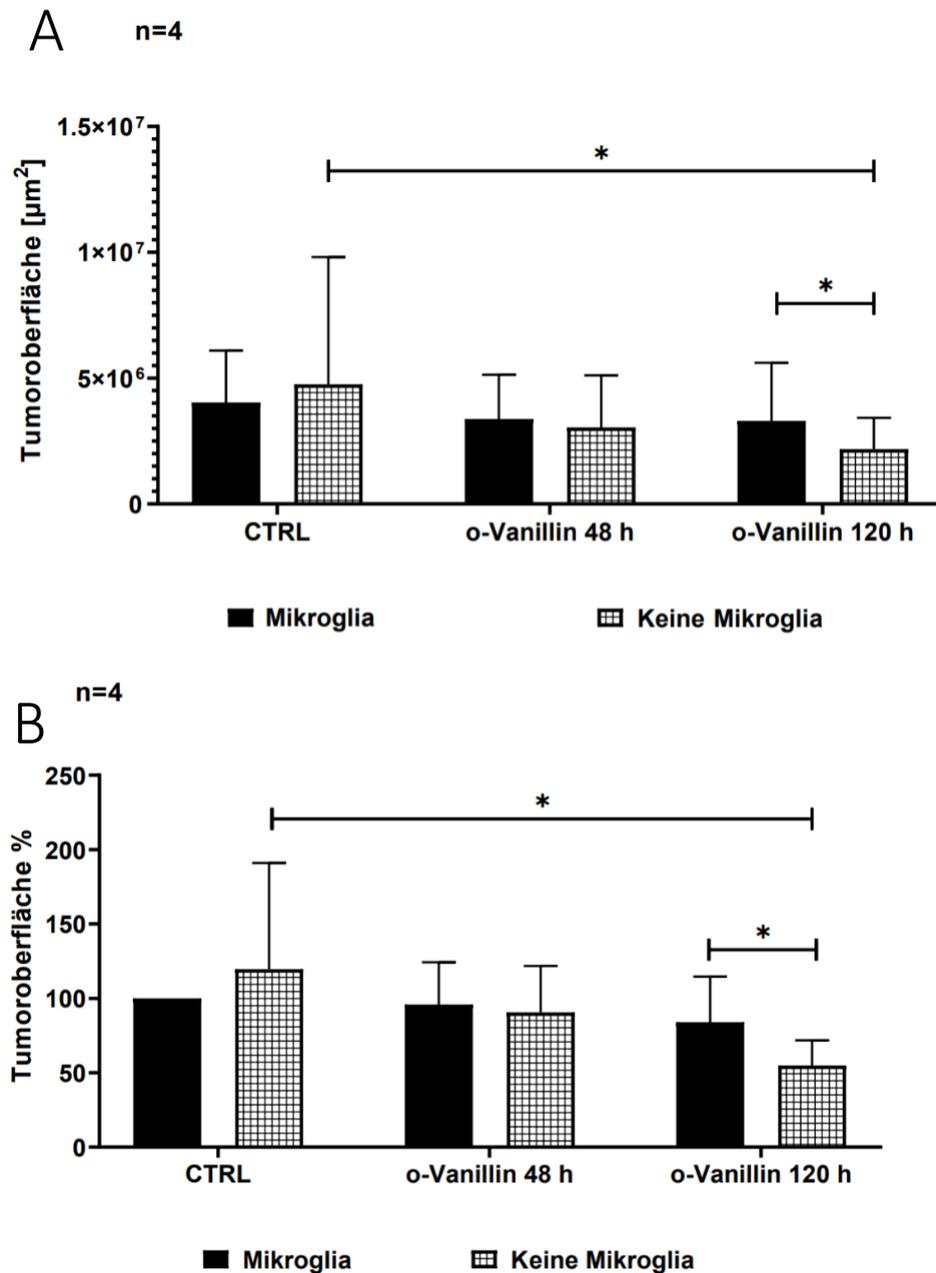


Abbildung 36

Einfluss der 100 μM o-Vanillin-Behandlung auf die Oberfläche von mCherry-GL261-Tumoren im Hirngewebe mit und ohne Mikroglia-Depletion durch Clodronat-Liposomen. Die Inkubationszeiten betragen 48 h und 120 h. Dargestellt sind die Absolutwerte (A) und die auf den Mittelwert der Negativkontrolle mit Mikroglia (CTRL, Mikroglia) normierten Werte (B). Es wurden alle Bedingungen miteinander verglichen. Die Tumoroberfläche war nach 120-stündiger Behandlung nur bei Hirnschnitten ohne Mikroglia im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Einen signifikanten Unterschied gab es auch bei Hirnschnitten mit und ohne Mikroglia nach 120-stündiger Behandlung. Die Tumoroberfläche war bei Abwesenheit der Mikroglia niedriger. Die Signifikanzen wurden für (A) ausgerechnet und in (B) übernommen. *: <0,05.

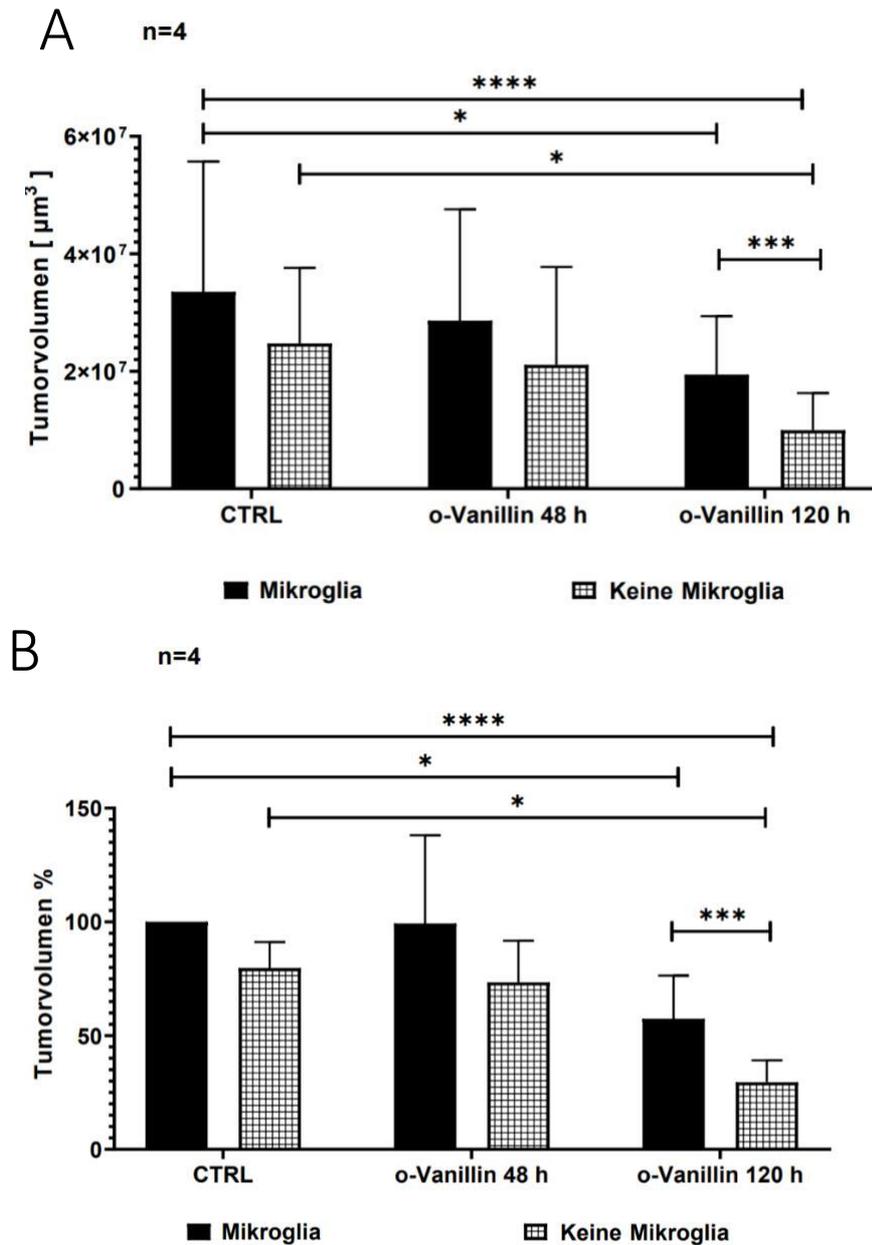


Abbildung 37

Einfluss der 100 μM o-Vanillin-Behandlung auf das Volumen von mCherry-GL261-Tumoren im Hirngewebe mit und ohne Mikroglia-Depletion durch Clodronat-Liposomen. Die Inkubationszeiten betragen 48 h und 120 h. Dargestellt sind die Absolutwerte (A) und die auf den Mittelwert der Negativkontrolle mit Mikroglia (CTRL, Mikroglia) normierten Werte (B). Es wurden alle Bedingungen miteinander verglichen. Das Tumolvolumen war nach 120-stündiger Behandlung mit und ohne Mikroglia signifikant reduziert. Einen weiteren signifikanten Unterschied gab es auch bei Hirnschnitten mit und ohne Mikroglia nach 120-stündiger Behandlung. Das Tumolvolumen war bei Abwesenheit der Mikroglia niedriger. Die größte Volumenabnahme ist zwischen der Negativkontrolle mit Mikroglia und 120-stündiger Behandlung ohne Mikroglia zu verzeichnen. Die Signifikanzen wurden für (A) ausgerechnet und in (B) übernommen. *: <0,05, ***: <0,001, ****<0,0001.

In der Gegenüberstellung der relativen Oberflächen und Volumenänderung sind zwar keine signifikanten Unterschiede zu sehen, jedoch kann damit eine Tendenz veranschaulicht werden: Bei Abwesenheit von Mikroglia ist die Volumen- und Flächenabnahme mehr ausgeprägt als bei Hirnschnitten mit Mikroglia (Abbildung 38).

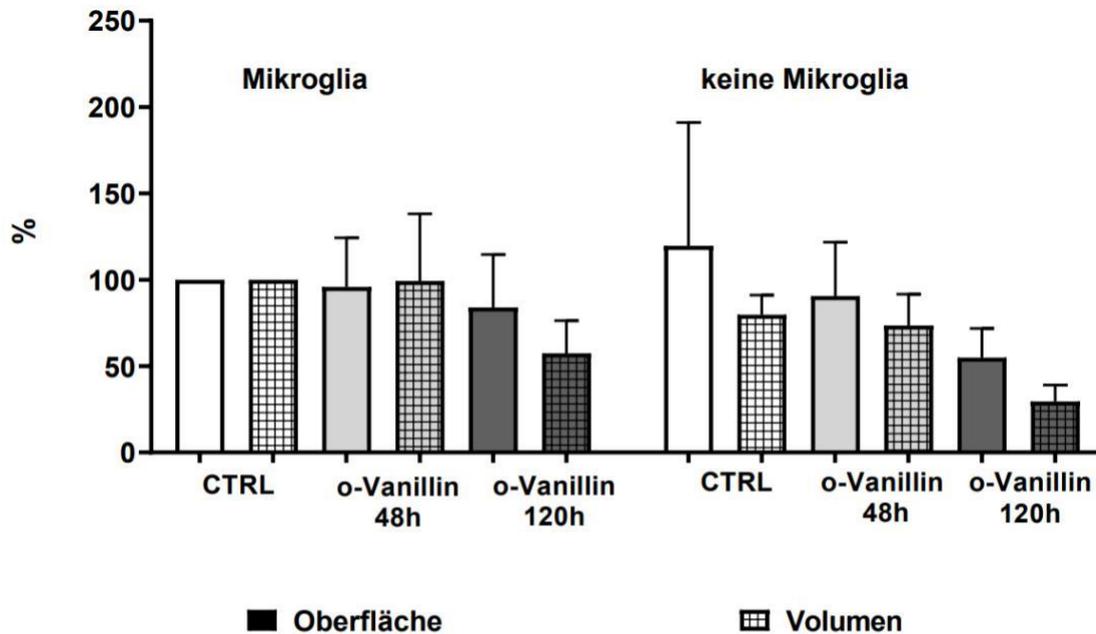


Abbildung 38

Vergleich der relativen Änderung der Tumoroberfläche und des Tumorumens innerhalb der jeweiligen Gruppen mit Mikroglia und ohne. Die Werte für Tumoroberfläche und -volumen wurden auf den Mittelwert der Kontrolle ohne Mikroglia (CTRL, Mikroglia) normiert. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten für Volumen und Oberfläche vorhanden.

Migration von Mikroglia unter dem Einfluss von o-Vanillin

Der chemotaktische Einfluss von o-Vanillin auf die Mikroglia Zellen wurde mithilfe des Boyden-Kammer-Experiments untersucht. Hierbei war insbesondere die Untersuchung der Rolle des in Mikroglia exprimierten Toll-like-Receptor 2 (TLR-2) von Bedeutung. Als positive Kontrolle wurden 100 μM ATP appliziert, um die Zellen unspezifisch zur Migration anzuregen. Als negative Kontrolle (CTRL) wurde das Migrations-Kulturmedium angewandt, welches keinerlei pro-migratorische Wirkung haben sollte. Das o-Vanillin wurde hierbei als potentieller TLR-2-Antagonist mit anti-migratorischer Wirkung bei einer Konzentration von 100 μM verwendet sowie 300 nM eines TLR-2-Agonist mit pro-migratorischer Wirkung. Die Inkubation der Substanzen dauerte 150 Minuten.

Exemplarische Aufnahmen der Zellen auf der Boyden-Kammer-Membran zeigen, dass o-Vanillin alleine zumindest keine pro-migratorische Wirkung hat. Die erhöhte Zellzahl bei ATP und dem TLR-2-Agonisten deuten darauf hin, dass die Methode grundsätzlich funktioniert hat. Das Zusammenspiel von ATP beziehungsweise TLR-2-Agonist und o-Vanillin zeigt auf den ersten Blick kein klares Ergebnis (Abbildung 39).

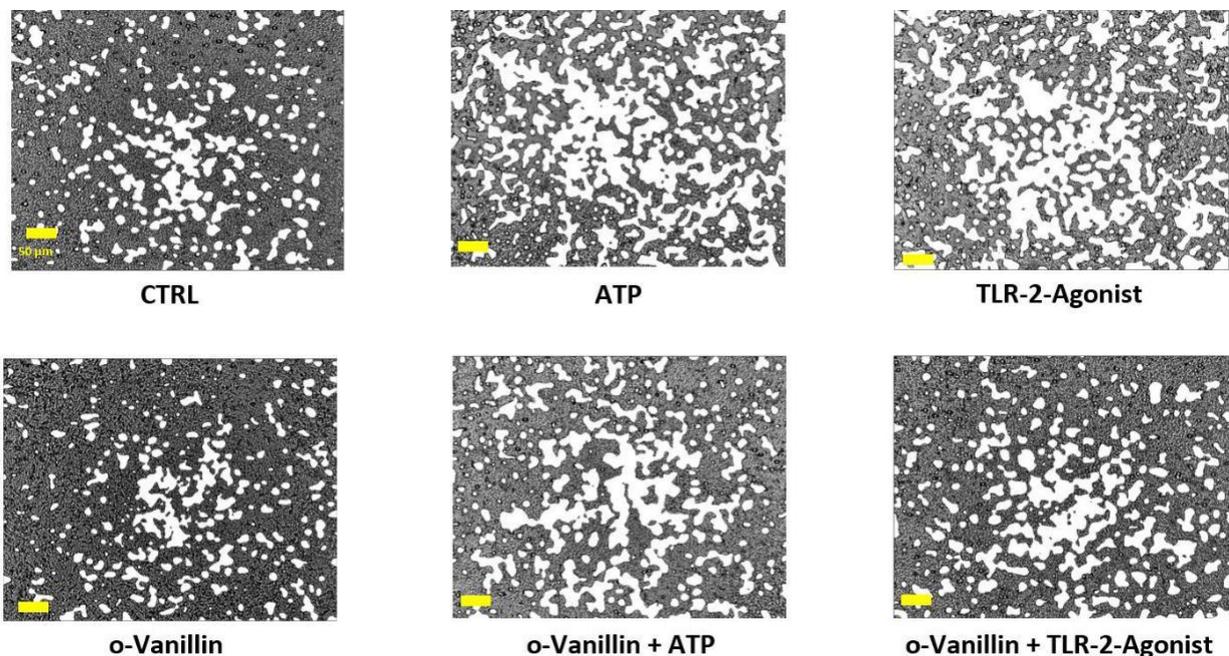


Abbildung 39

Exemplarische mikroskopische Aufnahmen von Boyden-Kammer-Membranen nach 150-minütiger Inkubation mit Testsubstanzen. Gezeigt ist eine Überlagerung des Originalbilds (Hintergrund) mit der extrahierten Zellfläche (weiß). 100 μM o-Vanillin und die Negativkontrolle (CTRL) weisen eine vergleichbar niedrige Zelldichte auf. 100 μM ATP und 300 nM TLR-2-Agonist führen zu einer höheren Zelldichte. Gemeinsame Gabe von o-Vanillin und ATP beziehungsweise TLR-2-Agonist liefert hier keine eindeutige Aussage.

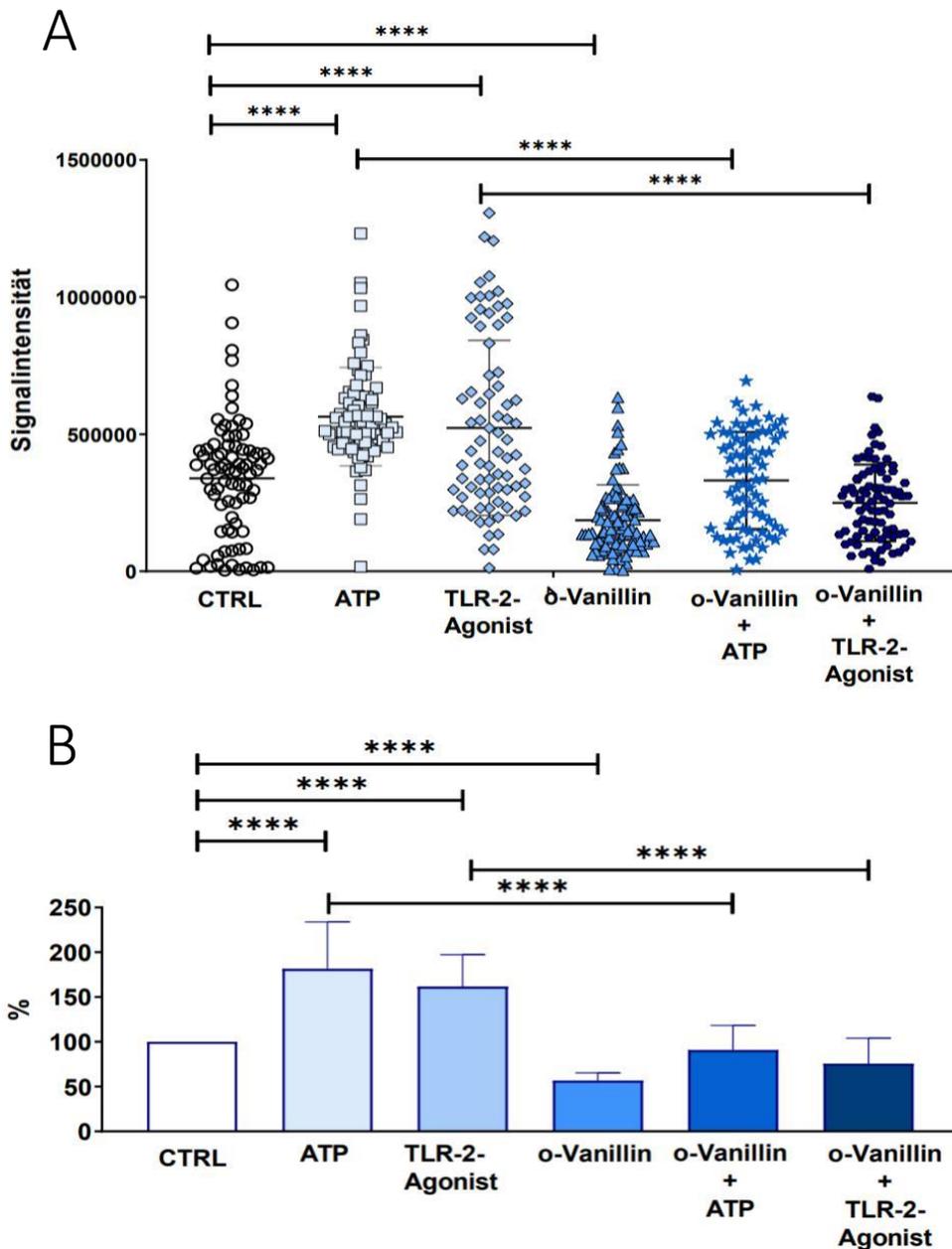


Abbildung 40

Migration von Mikroglia nach 150-minütiger Inkubation mit Testsubstanzen. Es wurden 3 unabhängige Boyden-Kammer-Experimente durchgeführt, bei denen jeweils 8 Wells für eine Bedingung verwendet wurden. Pro Well wurden 4 Bilder aufgenommen. Gezeigt sind Werte die Signalintensität als Maß für die von Zellen eingenommene Fläche im Bild (A) sowie auf den Mittelwert der Negativkontrolle (CTRL) normierte Werte. Unter pro-migratorischen Bedingungen (100 μ M ATP und 300 nM TLR-2-Agonist) waren die Zellzahlen gegenüber der Negativkontrolle signifikant erhöht. Bei alleiniger Behandlung mit 100 μ M o-Vanillin kam es zu einer signifikanten Abnahme gegenüber der Negativkontrolle. Die Signifikanzen wurden für (A) ausgerechnet und in (B) übernommen. ****: <0,0001.

Die pro-migratorischen Substanzen ATP und TLR-2-Agonist allein appliziert führten zu einem deutlichen Anstieg der von Zellen besetzten Fläche um 82 % beziehungsweise 62 % im Vergleich zur Negativkontrolle und den übrigen Behandlungsgruppen. Allein appliziertes o-Vanillin führte zu einem signifikanten Abfall gegenüber der Negativkontrolle. Behandlungsgruppen, die sowohl o-Vanillin als auch pro-migratorische Substanzen enthielten, erzielten keine signifikant höhere Zellzahl als die Negativkontrolle. Für ATP entspricht dies einer Reduktion des migratorischen Effekts um 91 %, für den TLR-2-Agonist um 86 %. Obgleich nicht signifikant, waren die Zellezahlen von ATP und TLR-2-Agonist mit o-Vanillin gegenüber reinem o-Vanillin leicht erhöht um 43 % beziehungsweise 20 % (Abbildung 40). Somit ist o-Vanillin im Stande die Migration der Mikroglia zu unterbinden. An dieser Stelle ist jedoch nicht eindeutig gezeigt, dass o-Vanillin tatsächlich als TLR-2-Antagonist wirkt.

Wechselwirkung von o-Vanillin und Minocyclin

Die Möglichkeit einer synergistischen Wirkung von o-Vanillin und Minocyclin wurde untersucht, um einen weiteren Hinweis darauf zu finden, dass die beobachteten Effekte von o-Vanillin tatsächlich TLR-2-spezifisch sind und nicht auf eine allgemeine Toxizität oder einen anderen unbekanntem Mechanismus zurückzuführen sind. Es wurden die murinen GL261-Zellen untersucht, da sie auch den TLR-2 exprimieren. Hierbei wurde der Stoffwechsel mit dem AlamarBlue-Assay gemessen nach alleiniger Gabe von 10 µM, 100 µM, 1000 µM o-Vanillin und 25 nM Minocyclin sowie der Kombination beider Substanzen für 24 Stunden (Abbildung 41). Die Negativkontrolle (CTRL) war Kulturmedium ohne Zusätze.

Bei alleiniger Gabe bewirkte Minocyclin einen Stoffwechselabfall von 19 %. Bei o-Vanillin betrug er 26 % für 100 µM und 40 % für 1000 µM. Beide Effekte sind bereits bekannt (**Stoffwechsel von Tumorzellen und Mikroglia unter dem Einfluss von o-Vanillin, Abbildung 14**)

Die gleichzeitige Gabe von 25 nM Minocyclin und 100 µM beziehungsweise 1000 µM o-Vanillin führte nur zu einem Stoffwechselabfall um 16 % beziehungsweise 24 % und fiel somit niedriger aus, als bei alleiniger Gabe der jeweiligen Substanzen. Bei 10 µM o-Vanillin konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen alleiniger Gabe und

Kombination mit Minocyclin identifiziert werden. Somit verstärken sich die beiden Substanzen nicht gegenseitig, sondern werden in ihrer Wirkung abgeschwächt.

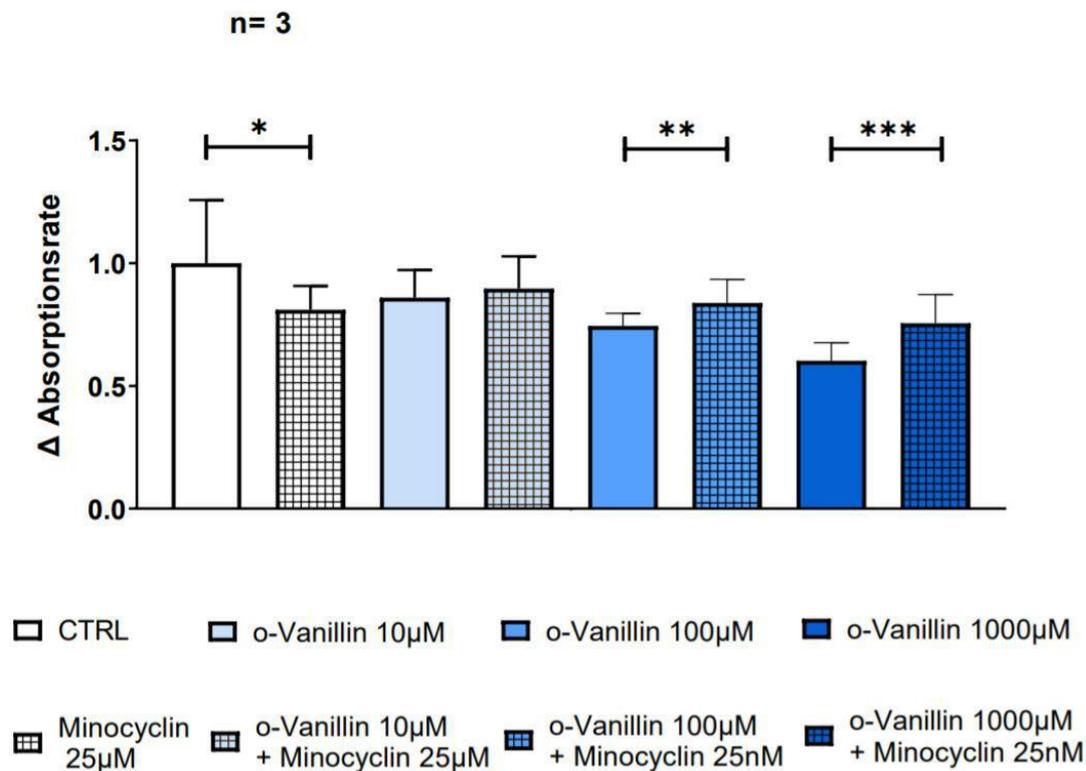


Abbildung 41

Stoffwechsel der GL261-Tumorzellen gemessen mit dem AlamarBlue-Assay. Es wurden einzeln 10 µM, 100 µM und 1000 µM o-Vanillin und 25 nM Minocyclin appliziert. Zusätzlich wurden die jeweiligen o-Vanillin Konzentrationen zusammen mit 25 nM Minocyclin verabreicht. Die Behandlungsdauer betrug 24 Stunden. Gezeigt ist die Absorptionsrate als Maß für den Stoffwechsel der Zellen normiert auf den Mittelwert der Negativkontrolle (CTRL). Einzeln verabreichtes Minocyclin und o-Vanillin (100 µM und 1000 µM) bewirkten einen Stoffwechselabfall. Zusammen mit Minocyclin verabreichtes o-Vanillin führte zu einem geringeren Stoffwechselabfall im Vergleich mit den reinen Substanzen. *: <0,05; **: <0,01, ***: <0,001.

Diskussion

Therapeutische Relevanz des o-Vanillin in der Behandlung von Glioblastoma multiforme

o-Vanillin hat einen zytotoxischen Effekt auf murine und humane Tumorzellen

Um den möglichen Nutzen von o-Vanillin in der Behandlung von aggressiven Hirntumoren zu erörtern, ist die Bestimmung der adäquaten Konzentration von großer Bedeutung. Die geringeren Konzentrationen von 10 μM und 100 μM führten ausschließlich bei den GL261-Zellen zur Reduktion des Stoffwechsels und zeigten keinen negativen Effekt auf die Mikroglia. Paul Triller konnte zudem in (1) zeigen, dass die murinen Oligodendrozyten sowie die murinen Astrozyten ebenfalls keinen Abfall des Stoffwechsels nach 24-stündiger Behandlung mit o-Vanillin bis zu einer Konzentration von 100 μM aufweisen.

Im Hinblick auf die Vitalität wirkten sich 100 μM o-Vanillin unterschiedlich auf Tumorzellen und Mikroglia aus. Die Behandlung der murinen Tumorzellen mit 100 μM o-Vanillin zeigte einen deutlichen, reduzierenden Effekt auf die Vitalität bereits nach 6 Stunden. Die Mikroglia hingegen wurden bei der gleichen Konzentration bis zu 24 Stunden Behandlungsdauer nicht beeinflusst.

Tatsächlich wurde o-Vanillin bereits als potenzielles Therapeutikum für andere Tumorarten in Erwägung gezogen, wie zum Beispiel das maligne Melanom, Brustkrebs und Darmkrebs, mit vielversprechenden Ergebnissen (55-58). Die zytotoxischen Effekte wurden hier sogar erst mit höheren Konzentrationen erzielt, beginnend mit 250 μM für Melanom-Zellen bis zu 5 mM im Brustkrebsmodell (Tabelle 22).

Tabelle 22

Zytotoxische Effekte von o-Vanillin auf verschiedene Tumorzellen. Erstellt anhand von (55-58)

Zelltyp	O-Vanillin	Inkubation	in vivo/vitro	Effekt	Erkrankung	Signal pfad
HT29	1 mM	72 h	in vitro	30% Zelltod	Kolonkarzinom	AP-1
4T1	5 mM	72 h	in vitro	Wachstumsreduktion	Mammakarzinom	PI3K/ Akt
4T1	100 mg/kg	1 Monat	in vivo	Reduktion der Lungenmetastasen	Mammakarzinom	PI3K/ Akt
A549	4 mM	30 min	in vitro	Reduktion der Zellmigration	Lungenkarzinom	PI3K/ Akt
A549	500 nmol/pellet	24 h	in vivo	Reduktion der Angiogenese	Lungenkarzinom	PI3K/ Akt
HeLa	2 mM	30 min	in vitro	Zelltodesrate 28-60%	Zervixkarzinom	NF-kB
A375	250 µM	6 h	in vitro	Reduktion der NF-kB-Aktivität	Melanom	NF-kB

Allerdings wurde in den zitierten Studien der Einfluss von o-Vanillin auf die Vitalität der gesunden Körperzellen nicht überprüft (55-58).

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führte die Erhöhung der o-Vanillin Konzentration auf 1000 µM nicht nur zur Reduktion des Stoffwechsels und der Vitalität der GL261-Zellen, sondern auch der Mikroglia. Dennoch war dieser Effekt bei den Tumorzellen stärker ausgeprägt. Für 100 µM o-Vanillin konnte eine zytotoxische Wirkung auf humane Tumorzellen (U87) erst nach 48-stündiger Behandlung beobachtet werden (**Vitalität von Tumorzellen und Mikroglia unter dem Einfluss von o-Vanillin, Abbildung 23**). Allerdings konnten keine Schlussfolgerungen zur Zellvitalität der murinen Mikroglia bei einer Behandlungsdauer von mehr als 48 Stunden getroffen werden, da schon die unbehandelte Kontrollgruppe die Zellkultur nicht für länger als 24 Stunden überlebt hatte. Es ist bekannt, dass primäre neonatale Mikroglia-Kulturen sehr sensitiv auf die Kultivierungsbedingungen reagieren (64, 65), was unter anderem in Veränderungen im Expressionsmuster bereits 6 Stunden nach der Isolation resultiert (64, 66).

Da es sich jedoch in den *ex vivo* Experimenten dieser Arbeit um ein murines Modell handelte, richtete sich die Auswahl der adäquaten o-Vanillin Konzentration nach den murinen GL261-Zellen.

Da eine o-Vanillin-Konzentration von 10 μM keinen reduzierenden Effekt auf die Vitalität der Tumorzellen bewirkte und 1000 μM o-Vanillin zum Absterben der Mikroglia führte, fiel die Wahl auf 100 μM für *in vitro* und *ex vivo* Experimente. Sie hatte einen signifikanten, reduzierenden Effekt auf die Vitalität und den Stoffwechsel der Tumorzellen und wurde zugleich gut von den Mikroglia vertragen.

Der reduzierende Einfluss von o-Vanillin auf den Stoffwechsel der GL261-Zellen war geringer als auf deren Vitalität. Die abgestorbenen Zellen verlieren die Adhärenz wie in **(Vitalität von Tumorzellen und Mikroglia unter dem Einfluss von o-Vanillin, Abbildung 19)** gezeigt. Sie hätten beim Mediumswechsel ausgewaschen werden können, sodass es bei der Stoffwechselaktivitäts-Messung zur Verfälschung des prozentualen negativen Signals kam. In dem Vitalitäts-Assay werden sowohl die adhärennten als auch die abgestorbenen Zellen aus dem Medium mit berücksichtigt. Das könnte die Abweichung in der Stärke des reduzierenden Effekts im Stoffwechsel- und Vitalitäts-Assay erklären.

Um die Ursache für den Unterschied im Einfluss von o-Vanillin auf die murinen und humanen Tumorzellen zu verstehen, müsste man genauer den Mechanismus der o-Vanillin-induzierten Vitalitätsreduktion und mögliche Resistenzen der beiden Tumorzelllinien gegenüber dieser Substanz ermitteln. Auch die Echtzeit-Überwachung der murinen und humanen Zellen in den Zytotoxizitäts-Experimenten könnte relevante Erkenntnisse zum genauen Zeitpunkt des Wirkungseintritts von o-Vanillin liefern.

Untersuchungen anderer Tumormodelle, wie das Zervix-Karzinom und Melanom, identifizierten den NF- κB -Weg (57, 58) und beim Mamma-Karzinom den PI3-Akt-Weg (56) als einen wichtigen Pfad für den o-Vanillin-induzierten Zelltod. Des Weiteren führt das o-Vanillin zum Absterben von Kolon-Karzinomzellen über den AP-1-Signalweg (55). Die Untersuchung dieser Pfade mithilfe der von den Autoren vorgeschlagenen Assays (55-58), könnte auch im Falle des Glioblastoms zu weiteren Erkenntnissen führen. Die Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose könnte zudem mithilfe eines Annexin-Assays, wie in (55) vorgeschlagen, durchgeführt werden und neue Informationen über molekulare Mechanismen des o-Vanillins liefern.

Schlussendlich könnten Änderungen im Kultivierungsprotokoll, wie eine andere Zusammensetzung des Kulturmediums, vorgenommen werden und so die Vitalität der

Mikroglia verbessern (64, 67), womit die Beurteilung des Einflusses von o-Vanillin über längere Inkubationszeiten möglich würde.

o-Vanillin reduziert das Tumorwachstum in *ex vivo* Experimenten durch Hemmung der Proliferation

Nach Bestimmung der adäquaten o-Vanillin Konzentration *in vitro*, konnte seine Wirkung in *ex vivo* Experimenten untersucht werden. Die 120-stündige Inkubation mit o-Vanillin reduzierte sowohl die Tumoroberfläche als auch das Tumolvolumen deutlich im murinen organotypischen Hirnschnitt-Modell. Hierbei stellte sich die Frage, ob diese Beobachtung auf Proliferationshemmung oder Absterben der Zellen zurückzuführen ist.

Einerseits wurden die zytotoxischen Effekte des o-Vanillins auf die GL261-Zellen *in vitro* in dieser Arbeit demonstriert (**Vitalität von Tumorzellen und Mikroglia unter dem Einfluss von o-Vanillin, Abbildung 25**). Andererseits gibt es Evidenz für die Proliferationshemmung unterschiedlicher Tumorzellen (*in vitro*) durch o-Vanillin (55, 57, 58, 68). Paul Triller hat in (1) zudem gezeigt, dass das o-Vanillin die Tumor-stimulierte Proliferation von Mikroglia hemmt.

Die kürzere Behandlung der Tumoren über 48 Stunden beziehungsweise 72 Stunden in den Hirnschnitten zeigte jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Tumorgöße. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Tatsache sein, dass die 120-stündige Inkubation an dem Tag der Tumorinokulation begann, während das o-Vanillin in der 72-Stunden und 48-Stunden-Gruppe verzögert zugegeben wurde, nachdem sich die Tumorzellen bereits ungehindert entwickeln konnten.

Da die Messung der Tumorgöße in einem organotypischen Hirnschnitt nur Aufschluss darüber gibt, ob die Tumore unter unterschiedlichen Bedingungen, unterschiedlich stark gewachsen sind, ist nicht ausgeschlossen, dass Tumorzellen auch nach 48 und 72 Stunden abgestorben sind. Damit steht die Beobachtung, dass nur bei 120-stündiger Inkubation geringere Tumorgößen gemessen wurden nicht im Widerspruch zu der gemessenen Vitalitätsreduktion von murinen Tumorzellen unter dem Einfluss von o-Vanillin. Zudem war das Tumolvolumen in keinem Experiment größer als das Hineingespritzte Volumen der Zellsuspension ($0.1 \mu\text{l}$ beziehungsweise $10^8 \mu\text{m}^3$).

Schlussendlich konnte gezeigt werden, dass o-Vanillin einen reduzierenden Effekt auf das Tumorwachstum hatte, was auf eine proliferationshemmende Wirkung des o-Vanillin zurückgeführt werden kann. Das schließt zytotoxische Effekte auf die Tumoren schon ab 48-stündiger Inkubation jedoch nicht aus.

Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens von Tumorzellen könnte weitere Hinweise zu dem Wirkungsmechanismus von o-Vanillin liefern. Zusätzlich wäre es hilfreich die Vitalität der Hirnschnitte mithilfe des MMT-Assays oder der Propidium-Iodid-Färbung zu Bestimmung, um potentiell unerwünschte Wirkungen von o-Vanillin auf das gesunde Gewebe zu evaluieren.

Alternativ könnte das Experiment so abgeändert werden, dass die Behandlung mit o-Vanillin für alle Behandlungszeiträume zeitgleich beginnt und gegebenenfalls je nach Behandlungsdauer früher endet.

Beeinflussung der Mikroglia-Aktivierung durch o-Vanillin

o-Vanillin reduziert die TLR-2 und ATP-induzierte Migration der Mikroglia

Durch die Bestimmung der Menge migrierter Mikroglia unter dem Einfluss von o-Vanillin wurde eine mögliche Beteiligung des TLR-2-Mechanismus indirekt für die Tumorzellen evaluiert.

Das o-Vanillin reduziert eigenständig die Migration der Zellen entlang des chemischen Gradienten und übt somit möglicherweise einen antagonistischen Effekt auf den TLR-2-Agonisten aus.

Paul Triller konnte zudem zeigen, dass die Expressionsniveaus der TLR-2-spezifischen Produkte – MMP-14 und MMP-9 – nach Stimulation der Mikroglia mit o-Vanillin deutlich abfallen (1), was die antagonistische Rolle von o-Vanillin im TLR-2-Pfad untermauert.

Die pro-migratorische Wirkung über die Aktivierung von TLR-2 ist ebenfalls bekannt (69, 70)) und basiert auf der Stimulation der freien Motilität der Mikroglia (71).

Der TLR-2-abhängige Weg, der die Freisetzung von NO und F-Aktin zu Folge hat, führte zudem zur gerichteten Migration von Makrophagen in der Leber (72).

In einer anderen Studie scheint dieser Signalweg andererseits keinen großen Einfluss auf die Migration der Mikroglia zu haben (70) mit Ausnahme der pro-migratorischen Eigenschaften von MMP-9, dem Produkt der TLR-2-Signalkaskade.

In (56, 57) konnte gezeigt werden, dass die Migration der Brustkrebs- und Lungenkrebszellen durch das o-Vanillin auf dem PI3-Akt-Weg, aber TLR-2-unabhängig gehemmt wird. Zudem konnte ein weiterer Weg identifiziert werden, der die o-Vanillin induzierte Migration von Melanomzellen hemmt, nämlich die STAT3-induzierte HIF-1 α mRNA Expression (58).

Außerdem hat o-Vanillin die pro-migratorische Wirkung von ATP, einem bekannten Migrationsaktivator in den Mikroglia (73), im Experiment vermindert. Der antagonistische Effekt von o-Vanillin auf die TLR-2-Agonisten und ATP-behandelten Mikroglia war absolut gesehen vergleichbar für diese beiden Substanzen.

Da er jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant stärker für den TLR-2-Agonisten war, kann eine TLR-2-Agonist-induzierte Migration der Mikroglia nicht ausgeschlossen werden.

Der anti-migratorische Effekt in Kombination mit stimulierendem ATP spricht dennoch für eine zusätzliche Beteiligung von anderen Mechanismen als den TLR-2-Pfad. Möglicherweise sind in diesem Fall auch andere Mechanismen von Bedeutung, die das o-Vanillin als lipophiles und die Zellmembran passierendes Molekül (74) für die Migrationsreduktion nutzt.

Das Boyden-Kammer Experiment wurde ausschließlich mit Mikroglia durchgeführt und erklärt nur indirekt die Rolle der TLR-2-Antagonisierung in der Tumorentwicklung. Die Untersuchung des direkten Einflusses von o-Vanillin auf die GL261-Zellen im Kontext der Migration von Tumorzellen könnte durchgeführt werden. Bei der Auswahl der chemotaktischen Substanzen dürfte ATP nicht als positive Kontrolle verwendet werden, da es eine stark zytotoxische Wirkung auf die Tumorzellen aufweist (75). Stattdessen könnte hier der Chemotaxis-Rezeptor CXCR6 in GL261 gezielt durch Stimulation mit dem entsprechenden Ligand CXCL16 aktiviert werden, wie in (76) beschrieben.

Die Untersuchung der Genexpression in Mikroglia und GL261-Zellen könnte möglicherweise weitere Erkenntnisse zum Mechanismus der Migrationshemmung durch o-Vanillin zeigen.

o-Vanillin reduziert das Tumorwachstum *ex vivo* auch Mikroglia-unabhängig

Zusätzlich zu den Migrationsexperimenten wurde die Beeinflussung vom in Mikroglia exprimierten TLR-2 mithilfe von organotypischen Hirnschnitten untersucht.

Der reduzierende Effekt der 120-stündigen o-Vanillin-Behandlung auf die Tumoroberfläche und das Tumolvolumen wurde durch die Depletion von Mikroglia zusätzlich verstärkt. Das bestätigt die Mikroglia-unabhängige Wirkung des o-Vanillins auf die Tumorzellen.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tumoren in Hirnschnitten mit und ohne Mikroglia für die Kontrollgruppe und die 48-Stunden-Inkubations-Gruppe festgestellt werden. Der im vorherigen Hirnschnitt-Experiment bereits beobachtete Effekt von o-Vanillin auf Tumore fällt zudem schwächer aus. **(Tumorwachstum in den murinen organotypischen Hirnschnitten, Abbildung 31)**. Der reduzierende Einfluss des o-Vanillin auf das Tumorwachstum wird dennoch bestätigt.

Der Unterschied in den absoluten Werten ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Protokolle zurückzuführen. Die Kultivierungszeit von Hirnschnitten in dem Mikroglia-Depletion-Modell ist verlängert, was die Vitalität der Gewebe vermindern kann.(77) Die Tumorzellen hingegen wurden in beiden Fällen für exakt 120 Stunden mitkultiviert.

Die Mikroglia ändern in der Tumorumgebung ihren Phänotyp und weisen einen tumorfördernden Effekt auf (78). Die Mikroglia-Depletion mit Clodronat-Liposomen führt zur Reduktion der Tumorgöße (79). Die Tendenz der sinkenden Tumorgößen in den Mikroglia-depletierten Hirnschnitten nach 48- und 72-stündiger Behandlung ist deutlich zu sehen, auch wenn die statistische Analyse keine Signifikanzen hierfür ergeben hat. Möglicherweise wäre eine höhere Anzahl von Versuchen notwendig, um die vermuteten Signifikanzen zu erzielen.

Zur weiteren Evaluation der Rolle von TLR-2 in diesen Experimenten empfiehlt man die Behandlung der Mikroglia-freien Hirnschnitten mit TLR-2-Agonisten, um das Tumorwachstum durch diesen Mechanismus zu stimulieren.

Die *ex vivo* Experimente sind insofern vorteilhaft gegenüber den *in vitro* Experimenten, als dass sie die reale physiologische Umgebung der Tumoren simulieren und im

Vergleich zu den *in vivo* Experimenten tierschonender sind und weniger Tiere geopfert werden müssen.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle ist die manuelle Inokulation der Tumorzellen mithilfe von Hochpräzisionsschrauben. Eine Automatisierung des Vorgangs mit definierter Einspritzgeschwindigkeit könnte diese Fehlerquelle eliminieren.

Erstrebenswert wäre zudem die Echtzeit-Überwachung der Tumorentwicklung in den Hirnschnitten mithilfe einer Kamera über die gesamte Inkubationszeit. So könnte man besser beurteilen, zu welchem Zeitpunkt der o-Vanillin-Effekt auf die Tumorzellen eintritt und wie die Entwicklung der Tumore in Mikroglia-freier Umgebung verläuft. Nicht nur das Wachstum der Tumore würde dadurch sichtbar, sondern auch die Gruppierung und die Ausbreitung der inokulierten Tumorzellen, die noch keine zusammenhängende Tumormasse darstellen.

Beeinflussung der GL261-Zellaktivierung durch o-Vanillin

Durch Untersuchung des Zusammenwirkens von o-Vanillin und Minocyclin beim Senken des Tumor-Stoffwechsels sollten weitere Hinweise auf die Rolle des TLR-2-Rezeptors in GL261-Zellen hinsichtlich der o-Vanillin-Effekte gefunden werden. Hierbei ist Minocyclin dafür bekannt den TLR-2-Pfad zu unterbrechen (46, 80, 81).

Tatsächlich konnte der Stoffwechsel der GL261-Zellen signifikant durch Minocyclin-Behandlung reduziert werden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Literatur (46, 81). Ebenso ist der reduzierende Einfluss von o-Vanillin auf den Stoffwechsel der murinen Tumorzellen in dieser Arbeit nachgewiesen worden (**Stoffwechsel von Tumorzellen und Mikroglia unter dem Einfluss von o-Vanillin, Abbildung 15**)

Die simultane Applikation von Minocyclin und o-Vanillin auf die murinen Tumorzellen reduzierte jedoch signifikant den alleinigen Effekt von o-Vanillin.

Diese Ergebnisse erlauben die Annahme, dass Minocyclin und o-Vanillin entweder kompetitiv als Antagonisten des TLR-2-Pfades wirken oder sich anderweitig in ihrer Wirkung auf den TLR-2-Pfad gegenseitig beeinflussen.

Wenn o-Vanillin ausschließlich über einen TLR-2-unabhängigen Mechanismus agieren würde, gäbe es keinen Einfluss auf die Wirkung von Minocyclin und die Wirkung von o-Vanillin und Minocyclin würden sich summieren. Würde o-Vanillin allgemein, unspezifisch zytotoxisch wirken, gäbe es keinen Unterschied zwischen der Behandlung mit alleinigem o-Vanillin und gleichzeitiger Gabe mit Minocyclin. Die Zellen würden in so einem Fall vom o-Vanillin abgetötet ohne das Minocyclin seine Wirkung entfalten kann. Die Erkenntnisse dieser Arbeit sprechen jedoch dagegen.

Eine mögliche alternative Erklärung für die beobachteten Effekte wären noch unerforschte Wechselwirkungen zwischen o-Vanillin und Minocyclin, die auf der molekularen Ebene stattfinden und keinen direkten Einfluss auf die Zellen haben, sondern nur die effektive Konzentration der Substanzen senken. Dies könnte beispielsweise *in silico* evaluiert werden.

Bisher erforschte Effekte der simultanen Behandlung mit o-Vanillin und Minocyclin sprechen jedoch dafür, dass die Reduktion des Stoffwechsels durch o-Vanillin mit dem TLR-2-Pfad zusammenhängt.

o-Vanillin beeinflusst möglicherweise direkt den TLR-2-Pfad in GL261-Tumoren

Die Beobachtungen aus den Experimenten mit organotypischen Hirnschnitten und Mikroglia-Depletion liefern einen weiteren Hinweis auf die Beeinflussung der murinen Tumorzellen über den TLR-2. Es stellte sich hierbei die Frage, warum die Tumorgröße bei o-Vanillin-Behandlung infolge der Mikroglia-Depletion stärker abnahm.

Es ist bekannt, dass die GL261-Zellen den TLR-2 exprimieren (43). Die Depletion der Mikroglia führt also nicht zum Ausschalten aller TLR-2-Rezeptoren. Tatsächlich würde im Falle einer direkten Wirkung des o-Vanillins über den TLR-2 nach der Depletion der Mikroglia mehr o-Vanillin für die TLR-2 der Tumorzellen zur Verfügung stehen, wodurch der Tumor noch mehr beeinträchtigt würde.

Mit Sicherheit lässt sich sagen, dass das o-Vanillin einen direkten reduzierenden Einfluss auf das Wachstum der Tumorzellen aufweist.

Vorbereitung auf die *in vivo* Experimente mit o-Vanillin

Die richtige o-Vanillin-Konzentration für *in vivo* Experimente muss ermittelt werden

Die Erkenntnisse dieser Arbeit beruhen auf *in vitro* und *ex vivo* Experimenten und stellen eine Vorbereitung auf *in vivo* Experimente im murinen Modell dar. Die richtige Konzentration von o-Vanillin für die *in vivo* Experimente muss noch ermittelt werden.

Die vorgeschlagene Konzentration von 100 mg/kg für die *in vivo* Behandlung vom Mamma-Karzinom in (56) hat in dieser Tumorart die erwarteten Effekte erreicht, ohne die allgemeine Gesundheit und Morphologie der inneren Organe der Mäuse zu beeinflussen.

Zusätzlich sollten auch die murinen und humanen Neuronen der Wirkung von o-Vanillin ausgesetzt werden, um auch hier, ähnlich wie bei den Astrozyten und Oligodendrozyten (1), den ungewollten zytotoxischen Effekt des o-Vanillin auszuschließen.

In Studien zur Therapie von Rückenmarksverletzungen konnte ein neuroprotektiver Einfluss von o-Vanillin auf die neuronalen Zellen beobachtet werden (82). Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Untersuchung des Einflusses von o-Vanillin und dessen Metabolits – Vanillinsäure – auf Reparaturprozesse an den hypoxisch geschädigten Neuronen gezeigt werden (83). Durch die Inaktivierung von dem NF- κ B-Weg scheint o-Vanillin zudem das entzündungsbedingte Absterben der Neuronen zu hemmen (84).

Allerdings gibt es auch Hinweise auf eine neurotoxische Wirkung dieser Substanz, die über weitere Mechanismen – wie Regulation der Kalzium-Wiederaufnahme, Involvierung in die enzymatischen Vorgänge der Plasmamembran sowie Antagonisierung der mitochondrialen Koenzyme - die Apoptose und Nekrose der neuronalen Zellen verursachen könnte (85).

Letztendlich könnte die Untersuchung der Vitalität von humanen Mikroglia und Neuronen unter dem Einfluss von o-Vanillin weitere wichtige Hinweise auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das humane Glioblastom-Modell liefern.

Die pharmakokinetischen Eigenschaften von o-Vanillin müssen untersucht werden

Eine andere wichtige Überlegung ist die Distribution von o-Vanillin in das Gehirn. Die gute Durchgängigkeit der Blut-Hirn-Schranke für o-Vanillin wurde kürzlich *in silico* bestätigt (83). Somit ist eine Voraussetzung für die Behandlung von Hirntumoren mit o-Vanillin erfüllt.

Obwohl o-Vanillin eine hohe orale Bioverfügbarkeit aufweist (56), gibt es auch Hinweise, dass ein Großteil des oral aufgenommen o-Vanillins in der Leber verstoffwechselt wird, was zur Umwandlung in die weniger effektive Vanillinsäure führt (50). Die Distribution von o-Vanillin in seiner ursprünglichen Form stellt somit die Herausforderung für die Entwicklung wirksamer pharmakologischer Präparate dar.

Vor den *in vivo* Experimenten sollte daher die Pharmakokinetik des o-Vanillins im murinem Modell genauer untersucht werden.

Literaturverzeichnis

1. Triller P, Bachorz J, Synowitz M, Kettenmann H, Markovic D. O-Vanillin Attenuates the TLR2 Mediated Tumor-Promoting Phenotype of Microglia. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8).
2. Bertero L, Massa F, Metovic J, Zanetti R, Castellano I, Ricardi U, Papotti M, Cassoni P. Eighth Edition of the UICC Classification of Malignant Tumours: an overview of the changes in the pathological TNM classification criteria-What has changed and why? *Virchows Arch.* 2018;472(4):519-31.
3. Wolfgang Hiddemann CRB, H. Huber. *Die Onkologie.* Heidelberg2004. 2075 p.
4. Haites N. Oncogenes. In: Brenner S, Miller JH, editors. *Encyclopedia of Genetics.* New York: Academic Press; 2001. p. 1370-2.
5. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(4):820-3.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
7. Nygren P. What is cancer chemotherapy? *Acta Oncol.* 2001;40(2-3):166-74.
8. Michael Wannemacher FW, Jürgen Debus. *Strahlentherapie.* 2 ed. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013. 1087 p.
9. Arriagada R, Pellae-Cosset B, Ladron de Guevara JC, el Bakry H, Benna F, Martin M, de Cremoux H, Baldeyrou P, Cerrina ML, Le Chevalier T. Alternating radiotherapy and chemotherapy schedules in limited small cell lung cancer: analysis of local chest recurrences. *Radiother Oncol.* 1991;20(2):91-8.
10. Koo SL, Wang WW, Toh HC. Cancer Immunotherapy - The Target is Precisely on The Cancer and Also Not. *Ann Acad Med Singap.* 2018;47(9):381-7.
11. Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemp Oncol (Pozn).* 2014;18(5):307-12.
12. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109.
13. KGH. Histopathological image of cerebral glioblastoma.: Wikimedia Commons; 2006 [Available from: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glioblastoma_\(3\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glioblastoma_(3).jpg)].
14. Steed TC, Treiber JM, Patel K, Ramakrishnan V, Merk A, Smith AR, Carter BS, Dale AM, Chow LM, Chen CC. Differential localization of glioblastoma subtype: implications on glioblastoma pathogenesis. *Oncotarget.* 2016;7(18):24899-907.

15. Touat M, Idbaih A, Sanson M, Ligon KL. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann Oncol.* 2017;28(7):1457-72.
16. Rao AM, Quddusi A, Shamim MS. The significance of MGMT methylation in Glioblastoma Multiforme prognosis. *J Pak Med Assoc.* 2018;68(7):1137-9.
17. Todorova PK, Fletcher-Sananikone E, Mukherjee B, Kollipara R, Vemireddy V, Xie XJ, Guida PM, Story MD, Hatanpaa K, Habib AA, Kittler R, Bachoo R, Hromas R, Floyd JR, Burma S. Radiation-Induced DNA Damage Cooperates with Heterozygosity of TP53 and PTEN to Generate High-Grade Gliomas. *Cancer Res.* 2019;79(14):3749-61.
18. Rahman M, Dastmalchi F, Karachi A, Mitchell D. The role of CMV in glioblastoma and implications for immunotherapeutic strategies. *Oncoimmunology.* 2019;8(1):e1514921.
19. Dipro S, Al-Otaibi F, Alzahrani A, Ulhaq A, Al Shail E. Turcot syndrome: a synchronous clinical presentation of glioblastoma multiforme and adenocarcinoma of the colon. *Case Rep Oncol Med.* 2012;2012:720273.
20. Förster A, Brehmer S, Seiz-Rosenhagen M, Mildenerger I, Giordano FA, Wenz H, Reuss D, Hänggi D, Groden C. Heterogeneity of glioblastoma with gliomatosis cerebri growth pattern on diffusion and perfusion MRI. *J Neurooncol.* 2019;142(1):103-9.
21. Weller M. Gliome – Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF); 2014 [updated 03.09.2020. 5:[Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-099l_S2k_Gliome_2015-06-abgelaufen.pdf.
22. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-96.
23. Diez BD, Statkevich P, Zhu Y, Abutarif MA, Xuan F, Kantesaria B, Cutler D, Cantillon M, Schwarz M, Pallotta MG, Ottaviano FH. Evaluation of the exposure equivalence of oral versus intravenous temozolomide. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;65(4):727-34.
24. Fabian D, Guillermo Prieto Eibl MDP, Alnahhas I, Sebastian N, Giglio P, Pudevalli V, Gonzalez J, Palmer JD. Treatment of Glioblastoma (GBM) with the Addition of Tumor-Treating Fields (TTF): A Review. *Cancers (Basel).* 2019;11(2).

25. Lassman AB, Joanta-Gomez AE, Pan PC, Wick W. Current usage of tumor treating fields for glioblastoma. *Neuro-Oncology Advances*. 2020;2(1).
26. Witthayanuwat S, Pesee M, Supaadirek C, Supakalin N, Thamronganantasakul K, Krusun S. Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(9):2613-7.
27. Tsang DS, Khan L, Perry JR, Soliman H, Sahgal A, Keith JL, Mainprize TG, Das S, Zhang L, Tsao MN. Survival outcomes in elderly patients with glioblastoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2015;27(3):176-83.
28. Jayamanne D, Wheeler H, Cook R, Teo C, Brazier D, Schembri G, Kastelan M, Guo L, Back MF. Survival improvements with adjuvant therapy in patients with glioblastoma. *ANZ J Surg*. 2018;88(3):196-201.
29. Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. *Curr Med Chem*. 2017;24(27):3002-9.
30. Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol*. 2017;79:619-43.
31. Chitu V, Gokhan Ş, Nandi S, Mehler MF, Stanley ER. Emerging Roles for CSF-1 Receptor and its Ligands in the Nervous System. *Trends Neurosci*. 2016;39(6):378-93.
32. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*. 2016;173(4):649-65.
33. Stratoulis V, Venero JL, Tremblay M, Joseph B. Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *Embo j*. 2019;38(17):e101997.
34. Eggen BJ, Raj D, Hanisch UK, Boddeke HW. Microglial phenotype and adaptation. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8(4):807-23.
35. Lively S, Wong R, Lam D, Schlichter LC. Sex- and Development-Dependent Responses of Rat Microglia to Pro- and Anti-inflammatory Stimulation. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:433.
36. Guneykaya D, Ivanov A, Hernandez DP, Haage V, Wojtas B, Meyer N, Maricos M, Jordan P, Buonfiglioli A, Gielniewski B, Ochocka N, Cömert C, Friedrich C, Artiles LS, Kaminska B, Mertins P, Beule D, Kettenmann H, Wolf SA. Transcriptional and Translational Differences of Microglia from Male and Female Brains. *Cell Rep*. 2018;24(10):2773-83.e6.

37. Müller A, Brandenburg S, Turkowski K, Müller S, Vajkoczy P. Resident microglia, and not peripheral macrophages, are the main source of brain tumor mononuclear cells. *Int J Cancer*. 2015;137(2):278-88.
38. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*. 2016;19(1):20-7.
39. Poniatowski Ł A, Wojdasiewicz P, Krawczyk M, Szukiewicz D, Gasik R, Kubaszewski Ł, Kurkowska-Jastrzębska I. Analysis of the Role of CX3CL1 (Fractalkine) and Its Receptor CX3CR1 in Traumatic Brain and Spinal Cord Injury: Insight into Recent Advances in Actions of Neurochemokine Agents. *Mol Neurobiol*. 2017;54(3):2167-88.
40. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014;5:461.
41. Reuven EM, Fink A, Shai Y. Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: lessons from the TLR family. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(6):1586-93.
42. Mistry P, Laird MH, Schwarz RS, Greene S, Dyson T, Snyder GA, Xiao TS, Chauhan J, Fletcher S, Toshchakov VY, MacKerell AD, Jr., Vogel SN. Inhibition of TLR2 signaling by small molecule inhibitors targeting a pocket within the TLR2 TIR domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(17):5455-60.
43. Grauer OM, Molling JW, Bennink E, Toonen LW, Suttmuller RP, Nierkens S, Adema GJ. TLR ligands in the local treatment of established intracerebral murine gliomas. *J Immunol*. 2008;181(10):6720-9.
44. Malvandi AM, Mehrzad J, Moghaddam MS. Gene Expression Quantification of Toll like Receptors 2, 4 and Co-molecules in Human Glioblastoma Cell Line (U87-MG): Toward a New In vitro Model of Inflammation. *Iran J Basic Med Sci*. 2011;14(5):428-35.
45. Suk K. Minocycline suppresses hypoxic activation of rodent microglia in culture. *Neurosci Lett*. 2004;366(2):167-71.
46. Markovic DS, Vinnakota K, van Rooijen N, Kiwit J, Synowitz M, Glass R, Kettenmann H. Minocycline reduces glioma expansion and invasion by attenuating microglial MT1-MMP expression. *Brain Behav Immun*. 2011;25(4):624-8.
47. Banerjee G, Chattopadhyay P. Vanillin biotechnology: the perspectives and future. *J Sci Food Agric*. 2019;99(2):499-506.
48. Information NCfB. PubChem Compound Summary for CID 1183, Vanillin: PubChem; 2016 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vanillin>. .

49. S. M. Cohen GE, S. Fukushima, N. J. Gooderham, F. P. Guengerich, S. S. Hecht,, I. M. C. M. Rietjens TJR, C. Harman, And S. V. Taylor. GRAS 29 flavoring substances. Food Techonology. 2020.
50. Tai A, Sawano T, Yazama F. Antioxidant properties of ethyl vanillin in vitro and in vivo. Biosci Biotechnol Biochem. 2011;75(12):2346-50.
51. Kim IS, Choi DK, Jung HJ. Neuroprotective effects of vanillyl alcohol in *Gastrodia elata* Blume through suppression of oxidative stress and anti-apoptotic activity in toxin-induced dopaminergic MN9D cells. *Molecules*. 2011;16(7):5349-61.
52. Bezerra DP, Soares AK, de Sousa DP. Overview of the Role of Vanillin on Redox Status and Cancer Development. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:9734816.
53. Abraham DJ, Mehanna AS, Wireko FC, Whitney J, Thomas RP, Orringer EP. Vanillin, a potential agent for the treatment of sickle cell anemia. *Blood*. 1991;77(6):1334-41.
54. Kim SJ, Kim MC, Um JY, Hong SH. The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. *Molecules*. 2010;15(10):7208-17.
55. Ho K, Yazan LS, Ismail N, Ismail M. Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. *Cancer Epidemiol*. 2009;33(2):155-60.
56. Lirdprapamongkol K, Kramb J-P, Suthiphongchai T, Surarit R, Srisomsap C, Dannhardt G, Svasti J. Vanillin Suppresses Metastatic Potential of Human Cancer Cells through PI3K Inhibition and Decreases Angiogenesis in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(8):3055-63.
57. Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Suzuki S, Koizumi K, Prangsaengtong O, Viriyaroj A, Ruchirawat S, Svasti J, Saiki I. Vanillin Enhances TRAIL-Induced Apoptosis in Cancer Cells through Inhibition of NF-kappa B Activation. *In vivo (Athens, Greece)*. 2010;24:501-6.
58. Park EJ, Lee YM, Oh TI, Kim BM, Lim BO, Lim JH. Vanillin Suppresses Cell Motility by Inhibiting STAT3-Mediated HIF-1alpha mRNA Expression in Malignant Melanoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3).
59. Prinz M, Hanisch UK. Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J Neurochem*. 1999;72(5):2215-8.
60. Vinnakota K, Hu F, Ku MC, Georgieva PB, Szulzewsky F, Pohlmann A, Waiczies S, Waiczies H, Niendorf T, Lehnardt S, Hanisch UK, Synowitz M, Markovic D, Wolf SA,

- Glass R, Kettenmann H. Toll-like receptor 2 mediates microglia/brain macrophage MT1-MMP expression and glioma expansion. *Neuro Oncol.* 2013;15(11):1457-68.
61. Sasmono RT, Oceandy D, Pollard JW, Tong W, Pavli P, Wainwright BJ, Ostrowski MC, Himes SR, Hume DA. A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood.* 2003;101(3):1155-63.
62. Maeda T, Inagaki M, Fujita Y, Kimoto T, Tanabe-Fujimura C, Zou K, Liu J, Liu S, Komano H. ATP increases the migration of microglia across the brain endothelial cell monolayer. *Bioscience Reports.* 2016;36(2).
63. Markovic D. The role of microglia in glioma invasiveness. Berlin: Charité - Universitätsmedizin; 2007.
64. Bohlen CJ, Bennett FC, Tucker AF, Collins HY, Mulinyawe SB, Barres BA. Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and Function Revealed by Defined-Medium Cultures. *Neuron.* 2017;94(4):759-73 e8.
65. Bohlen CJ, Bennett FC, Bennett ML. Isolation and Culture of Microglia. *Curr Protoc Immunol.* 2019;125(1):e70.
66. Gosselin D, Skola D, Coufal NG, Holtman IR, Schlachetzki JCM, Sajti E, Jaeger BN, O'Connor C, Fitzpatrick C, Pasillas MP, Pena M, Adair A, Gonda DD, Levy ML, Ransohoff RM, Gage FH, Glass CK. An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science.* 2017;356(6344).
67. Svoboda DS, Barrasa MI, Shu J, Rietjens R, Zhang S, Mitalipova M, Berube P, Fu D, Shultz LD, Bell GW, Jaenisch R. Human iPSC-derived microglia assume a primary microglia-like state after transplantation into the neonatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(50):25293-303.
68. Srinual S, Chanvorachote P, Pongrakhananon V. Suppression of cancer stem-like phenotypes in NCI-H460 lung cancer cells by vanillin through an Akt-dependent pathway. *Int J Oncol.* 2017;50(4):1341-51.
69. Kim C, Cho E-D, Kim H-K, You S, Lee H-J, Hwang D, Lee S-J. β 1-integrin-dependent migration of microglia in response to neuron-released α -synuclein. *Experimental & molecular medicine.* 2014;46(4):e91-e.
70. Qiao H, He X, Zhang Q, Zhang N, Li L, Hui Y, Li W, Wang D, Wu Z. Alpha-synuclein induces microglial cell migration through stimulating HIF-1 α accumulation. *J Neurosci Res.* 2017;95(9):1809-17.

71. Ifuku M, Buonfiglioli A, Jordan P, Lehnardt S, Kettenmann H. TLR2 controls random motility, while TLR7 regulates chemotaxis of microglial cells via distinct pathways. *Brain Behav Immun*. 2016;58:338-47.
72. Wang G, Zhao H, Zheng B, Li D, Yuan Y, Han Q, Tian Z, Zhang J. TLR2 Promotes Monocyte/Macrophage Recruitment Into the Liver and Microabscess Formation to Limit the Spread of *Listeria Monocytogenes*. *Front Immunol*. 2019;10:1388.
73. Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci*. 2001;21(6):1975-82.
74. Shimizu M, Kobayashi Y, Tanaka H, Wariishi H. Transportation mechanism for vanillin uptake through fungal plasma membrane. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;68(5):673-9.
75. Strong AD, Indart MC, Hill NR, Daniels RL. GL261 glioma tumor cells respond to ATP with an intracellular calcium rise and glutamate release. *Mol Cell Biochem*. 2018;446(1-2):53-62.
76. Lepore F, D'Alessandro G, Antonangeli F, Santoro A, Esposito V, Limatola C, Trettel F. CXCL16/CXCR6 Axis Drives Microglia/Macrophages Phenotype in Physiological Conditions and Plays a Crucial Role in Glioma. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2750-.
77. Mewes A, Franke H, Singer D. Organotypic brain slice cultures of adult transgenic P301S mice--a model for tauopathy studies. *PLoS One*. 2012;7(9):e45017-e.
78. Resende FFB, Bai X, Del Bel EA, Kirchhoff F, Scheller A, Titze-de-Almeida R. Evaluation of TgH(CX3CR1-EGFP) mice implanted with mCherry-GL261 cells as an in vivo model for morphometrical analysis of glioma-microglia interaction. *BMC cancer*. 2016;16:72-.
79. Markovic DS, Glass R, Synowitz M, Rooijen N, Kettenmann H. Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64(9):754-62.
80. Kim J, Ochoa M-T, Krutzik SR, Takeuchi O, Uematsu S, Legaspi AJ, Brightbill HD, Holland D, Cunliffe WJ, Akira S, Sieling PA, Godowski PJ, Modlin RL. Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;169(3):1535-41.

81. Hu F, Ku MC, Markovic D, Dzaye O, Lehnardt S, Synowitz M, Wolf SA, Kettenmann H. Glioma-associated microglial MMP9 expression is upregulated by TLR2 signaling and sensitive to minocycline. *Int J Cancer*. 2014;135(11):2569-78.
82. Chen H, Zheng J, Ma J. Vanillin ameliorates changes in HIF-1 α expression and neuronal apoptosis in a rat model of spinal cord injury. *Restor Neurol Neurosci*. 2019;37(1):21-9.
83. Salau VF, Erukainure OL, Ibeji CU, Olasehinde TA, Koorbanally NA, Islam MS. Vanillin and vanillic acid modulate antioxidant defense system via amelioration of metabolic complications linked to Fe(2+)-induced brain tissues damage. *Metab Brain Dis*. 2020;35(5):727-38.
84. Yan X, Liu DF, Zhang XY, Liu D, Xu SY, Chen GX, Huang BX, Ren WZ, Wang W, Fu SP, Liu JX. Vanillin Protects Dopaminergic Neurons against Inflammation-Mediated Cell Death by Inhibiting ERK1/2, P38 and the NF- κ B Signaling Pathway. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2).
85. Hail N, Jr. Mechanisms of vanilloid-induced apoptosis. *Apoptosis*. 2003;8(3):251-62.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julia Bachorz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle von ortho-Vanillin in der Therapie von Glioblastoma multiforme“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Julia Bachorz hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Paul Triller, Julia Bachorz, Michael Synowitz , Helmut Kettenmann und Darko Markovic, O-Vanillin Attenuates the TLR2 Mediated Tumor-Promoting Phenotype of Microglia, International Journal of Molecular Science, 2020

Beitrag im Einzelnen:

1. Durchführung, statistische Analyse und methodologischer Teil (Kapitel 4.9) sowie die korrespondierende Abbildungsbeschriftung (Abbildung 2B) von dem Zytotoxizität-Experiment: Alamar Blue an den GL261-Zellen und Mikroglia.
2. Durchführung, statistische Analyse und methodologischer Teil (Kapiteln 4.11-4.14) sowie die korrespondierende Abbildung (Abbildung 4 AB) samt der Abbildungsbeschriftung (Abbildung 4ABCD) von dem ex vivo Experimenten: organotypische Hirnschnitten-Kultur mit und ohne Mikroglia-Depletion.
3. Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

1. Triller P, Bachorz J, Synowitz M, Kettenmann H, Markovic D. O-Vanillin Attenuates the TLR2 Mediated Tumor-Promoting Phenotype of Microglia. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8).

Danksagung

Diese wissenschaftliche Arbeit hätte in der Form nicht ohne Unterstützung und Engagement von mehreren Beteiligten verfasst werden können.

Ich bedanke mich an dieser Stelle beim Prof. Dr. Helmut Kettenmann für die Möglichkeit, ein Teil seiner Arbeitsgruppe zu werden, sowie für alle wertvollen Hinweise zu den fachlichen und formellen Aspekten dieses Projektes.

Ich bedanke mich vor allem auch bei Dr. Darko Markovic für seine kompetente fachliche Unterstützung bei der Gestaltung und Durchführung dieses Projektes, für die hervorragende Einführung in die Grundlagenforschung und für die Anregungen und stets konstruktive Kritik bei der Zusammenfassung dieser Monographie.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Roman Mannweiler für die Einführung in die Bildverarbeitung und -analyse sowie mehrere hilfreiche Hinweise zu den formellen und sprachlichen Aspekten dieser Dissertation.

Für die allgemeine Einführung in viele Techniken der Grundlagenforschung und in den Umgang mit Tierhaltung bedanke ich mich bei Regina Piske. Für die wertvolle Hinweise zu der Zellkultur-Führung sowie stetige Hilfsbereitschaft bedanke ich mich bei Maren Wendt. Für die exzellente technische Assistenz danke ich Regina Piske, Maren Wendt sowie Nadine Scharek.

Für die Einführung in die konfokale Mikroskopie sowie den Zugang zu den konfokalen Mikroskopen bedanke ich mich bei Dr. Anje Sporbert, Dr. Anca Margineanu und Konstantin Grohmann vom Advanced Light Microscopy am Max-Delbrück-Zentrum für die Molekulare Biologie, Berlin.

Für die weitere Unterstützung bei der Vorbereitung des mündlichen Vortrags bedanke ich mich zudem bei Yi Jen Chang.

Für die mentale Unterstützung danke ich Roman Mannweiler, Yi Jen Chang sowie meinen Eltern Iwona Bachorz und Witold Bachorz.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Paul Triller, Birgit Jarchow, Fatih Yalcin, Ibrahim Efecan Efe, Alice Buonfiglioli, Hannah Hanneke und allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft und kollegiale Atmosphäre.