

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

DISSERTATION

Charakterisierung der Mikroglia im Glioblastom und deren Interaktion mit
Tumorblutgefäßen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sergej Rot

aus Kostanaj, Kasachstan

Datum der Promotion: 05.12.2014

für meine Familie

INHALTVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG

ABSTRACT

1.	EINLEITUNG.....	13
1.1	Gliome.....	13
1.2	Glioblastoma multiforme.....	14
1.2.1	Neuro – und Histopathologie.....	15
1.2.2	Diagnostik, Therapie und Prognose.....	16
1.3	Mikroglia im ZNS.....	19
1.3.1	Ursprung und Funktion der Mikroglia.....	19
1.3.2	Mikroglia als Modulator der Inflammation.....	21
1.3.3	Mikroglia/Makrophagen in Tumorbilogie.....	23
1.3.4	Zelltypen der perivaskulären Nische im ZNS.....	23
1.4	Mechanismen der Gliom - assoziierten Gefäßneubildung.....	25
1.4.1	Das Prinzip des „angiogenic switch“ – Konzeptes.....	25
1.4.2	Hif-1 α - assoziierte Gefäßneubildung in malignen Gliomen.	27
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	30
2.	MATERIALIEN UND METHODEN.....	32
2.1	Verwendete Puffer und Medien.....	32
2.2	Tierexperimentelles Arbeiten.....	32
2.2.1	Versuchstiere / Zelllinie.....	32
2.2.2	Narkoseverfahren.....	33
2.2.3	Tumorzellimplantation.....	34
2.2.4	Kardiale Perfusion, Entnahme und Fixierung von Mausgehirnen.....	35
2.3	Zellkultur.....	37
2.3.1	Kultivieren der Gliomzellen.....	37
2.3.2	Splitten von Gliomzellen.....	37
2.3.3	Wegfrieren und Auftauen von Gliomzellen.....	38
2.3.4	Vorbereitung der Tumorzellen für Implantation.....	39

2.3.4.1	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer – Zählkammer.....	39
2.4	Aufarbeitung und Analyse der Gehirne.....	40
2.4.1	Herstellung von Gehirnschnitten mittels Kryotomie.....	40
2.4.2	Immunhistochemie.....	40
2.4.2.1	Verwendete Antikörper.....	40
2.4.2.2	Immunfärbung an Kryostatschnitten.....	43
2.4.2.3	Permeabilisierung von Kryostatschnitten mittels ARR (Antigen Retrieval Reagent Universal, R&D).....	44
2.4.2.4	ApopTag® Red (Fluorescein) in Situ – Kit Methode.....	45
2.4.2.5	Darstellung der Mikroglia im Tumor.....	47
2.4.2.6	Analyse der Hif-1 α Expression.....	47
2.4.2.7	Immunhistochemie mit CD31, α SMA und Desmin zur Darstellung von Gefäßendothel und von Perizyten.....	47
2.4.2.8	Experimentelle vierfache Immunfärbung an Kryostatschnitten.....	48
2.5	Konfokalmikroskopie.....	48
2.6	Statistische Auswertung.....	49
3.	ERGEBNISSE.....	50
3.1	Interaktion der Mikroglia/Makrophagen mit Tumorblutgefäßen.....	50
3.1.1	Auswahl des Markers für die Perizyten – Analyse.....	51
3.1.2	Mikroglia/Makrophagen interagieren vorrangig mit Endothelzellen von Tumorblutgefäßen.....	55
3.1.3	Nähere Charakterisierung der Desmin ⁺ - Zellen im GL261 Gliom.....	59
3.1.3.1	Iba-1 ⁺ - Zellen exprimieren Desmin.....	59
3.1.3.2	Tumorzellen exprimieren Desmin.....	61
3.1.3.3	Tumorzellen zeigen Iba-1- und Desminexpression.....	62
3.2	Apoptose im GL261 – Tumorgewebe.....	64
3.2.1	Gesamte apoptotische Aktivität im Tumorareal.....	64
3.2.2	Apoptotische Aktivität der Mikroglia/Makrophagen in GL261 –Tumoren.....	66

3.3	Charakterisierung der hypoxischen Gebiete in GL261 – Tumoren.....	69
3.3.1	Identifizierung hypoxischer Areale im Tumor.....	69
3.3.2	Anstieg der Expression von Hif-1 α mit dem Tumorwachstum.....	70
3.3.3	Unterschiedliche Aktivitätsformen und Expressionsmuster von Iba-1 ⁺ - Zellen im Tumor.....	70
3.3.4	Mikroglia/Makrophagen interagieren mit hypoxischen Tumorzellen.....	72
3.3.5	Gliomzellen exprimieren Hif-1 α in der perivaskulären Nische.....	73
3.3.6	Residente Mikroglia und eingewanderte Makrophagen zeigen eine Hif-1 α - Expression im Tumor.....	74
3.3.7	Einfluss der Hif-1 α - Expression auf apoptotische Aktivität von Mikroglia/Makrophagen.....	76
4.	DISKUSSION.....	77
4.1	Darstellung von Perizyten im Glioblastom.....	77
4.2	Die Rolle der Desminexpression in malignen Gliomen.....	79
4.3	Die neoplastische Transformation im Glioblastom.....	80
4.4	Verteilung und Differenzierung von knochenmarksabstammenden Monozyten im Glioblastom.....	81
4.5	Mikrogliazellen/Makrophagen stehen im engen Kontakt zu den Tumorblutgefäßen.....	82
4.6	Beurteilung apoptotischer Aktivität im Glioblastom.....	84
4.7	Einfluss der Tumorphypoxie auf mikrogliale Aktivität.....	84
5.	VERZEICHNISSE.....	87
5.1	Literaturverzeichnis.....	87
5.2	Abbildungsverzeichnis.....	108
5.3	Tabellenverzeichnis.....	109
	Eidesstattliche Versicherung.....	110
	LEBENS LAUF.....	111
	PUBLIKATIONEN / VORTRÄGE.....	113
	DANKSAGUNG.....	114

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AMCA	aminomethyl coumarin acetate (blue fluorescent dye)
Ang-1	Angiopoietin - 1
Ang-2	Angiopoietin - 2
ARR	Antigen Retrieval Reagent
α SMA	α - smooth muscle actin
BCNU	Carmustin
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMDC	bone marrow derived cells
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C57Bl/6	Charles River 57/Black 6
CBP/p300	transkriptionelle Co – Aktivatoren des Abbaus von HIF-1 α
CCNU	Lomustin
CCT	kranielle Computertomographie
CD	cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF-1	colony-stimulating factor
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (SDF-1-receptor)
Cy3	Cyanine Dyes 3
d	Tag
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Natrium-ethylendiamin-tetraacetat
EGF(R)	endothelial growth factor (receptor)
EPC	endothelial progenitor cells
EPO	Erythropoietin
ErbB	Familie der Tyrosinrezeptorkinasen

F	Faktor
FAS/FASL	death receptor/death receptor ligand
FCS	fetal calf serum
FIH-1	factor inhibiting HIF-1
g	Gramm
G	Gauge (Nadelgröße)
GBM	Glioblastoma multiforme
G-CSF	granulocyte - colony stimulating factor
GFP	green faser protein
GL261	Gliomzelllinie
GLUT-1	Glukose Transporter - 1
Gy	Gray
h	Stunde
HE	Hämatoxylyn/Eosin
HIF	Hypoxia Inducible Factor
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
HSV-T	Herpes Simplex Virus Thymidinkinase
Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IgG	Immunglobulin Klasse G
IL	Interleukin
INF α/γ	Interferon α/γ
KM	Knochenmark / Kontrastmittel
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	monocyte chemotactic protein – 1
MET	proto oncogen
MGMT	Methylguanin-DNA-methyltransferase
min.	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikrometer
mm	Millimeter
MMP-9	Matrixmetalloproteinase - 9
MRT	Magnetresonanztomographie

n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NG2	Nerval/glial antigen 2
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
p	Wahrscheinlichkeit
p53	Protein 53 (tumor suppressor protein)
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus Hydrogenii
PHD	prolyl hydroxylase
PPC	pericyte progenitor cells
P/S	Penicillin/Streptomycin
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDF1α	Stromal Cell Derived Factor-1 α
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
T	Tumor
Tab.	Tabelle
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
To-Pro-3	carbocyanine monomer nucleic acid stain
v.a.	vor allem
VEGF(R)	vascular endothelial growth factor (receptor)
VHL	von-Hippel-Lindau
VSMC	vascular smooth muscle cells
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

ZUSAMMENFASSUNG

Glioblastoma multiforme (GBM) ist ein primärer bösartiger Hirntumor bei Erwachsenen. Das Tumorparenchym enthält verschiedene Zelltypen, darunter ein Drittel Mikroglia/Makrophagen. In den Untersuchungen haben wir uns mit der Interaktion von Mikroglia/Makrophagen mit Blutgefäßen befasst und die Lokalisierung von Mikroglia/Makrophagen in bestimmten Bereichen des Tumors angeschaut, um ihre mögliche Rolle in der Tumurvaskularisation zu definieren.

Wir verwendeten ein syngenes Tumor – Mausmodell vom Glioblastoma multiforme. Dabei wurden GL261 – Tumorzellen in die Gehirne von C57/BL6-Mäusen implantiert. Dann wurden die Gehirnschnitte bezüglich der Interaktion der Mikroglia/Makrophagen mit Endothelzellen und/oder Perizyten mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Weiterhin wurden TUNEL – und Hif1 α – positive Zellen analysiert, um die apoptotische Aktivität von Mikroglia/Makrophagen und ihr Verhalten in den hypoxischen Tumorarealen zu beschreiben. Wir fanden, dass bis zu 30% der Blutgefäße von Tumoren mit zwei oder mehr Mikroglia/Makrophagen assoziiert sind. Diese Iba1 – positive Zellen befanden sich überwiegend in Kontakt mit Endothelzellen im Tumorbereich. Außerdem stellten wir auch die Interaktion der Mikroglia/Makrophagen mit Perizyten fest (ca. 20% im Tumorareal). Darüber hinaus zeigten Mikroglia/Makrophagen im hypoxischen Tumorbereich teilweise die Expression von Hif1 α . Überraschenderweise zeigten die Analysen der TUNEL – Färbung nur wenige apoptotische Zellen im Tumor an. Die meisten dieser apoptotischen Zellen waren dabei Mikroglia/Makrophagen, die keine Hif1 α – Expression zeigten.

Desmin zeigte sich als nur schwer zu verwendender Marker für die Perizytenanalyse, da auch Desmin⁺ - Zellen detektiert wurden, die keinen Kontakt zu den Endothelzellen der Tumorblutgefäße aufwiesen. Zudem waren diese Zellen zum Teil auch Iba-1⁺. Dabei wurde die zelluläre Transformation von Perizyten in Mikroglia/Makrophagen postuliert. Ferner wurden im Tumor Gliomzellen entdeckt, welche das Protein mesenchymalen Ursprunges Desmin exprimierten. Darüber hinaus erwiesen einige der Gliomzellen die mikroglialen Eigenschaften, wie z.B. die Iba-1 – Expression, was die neue Hypothese der zellulären Fusion zwischen Tumorzellen und Mikroglia/Makrophagen unterstützen würde.

In zukünftigen Studien könnte die detaillierte Untersuchung der Mikroglia/Makrophagen – Gefäß – Interaktion zu einem besseren Verständnis der Rolle der Mikroglia/Makrophagen in der Tumorangio-genese und damit auch für die Progression des Glioms führen.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most malignant primary brain tumor in adults. The tumor compartment contains various cell types, with about one third of microglia/macrophages. In our investigations, we analyzed the interaction of microglia/macrophages with blood vessels and at the localization of microglia/macrophages in specific areas of the tumor to define their putative role for tumor vascularisation.

We used a syngenic tumor mouse model of glioblastoma multiforme. Therefore, we implanted GL261 tumor cells into brains of C57/BL6 mice. Then, we evaluated brain sections for the interaction of microglia/macrophages with endothelial cells and/or pericytes by immunofluorescence stainings. Furthermore, we analyzed TUNEL and Hif1 α positive cells to clarify the apoptotic activity of microglia/macrophages and their appearance in hypoxic areas of the tumor.

We found that up to 30% of the tumor blood vessels are associated with two or more microglia/macrophages. These Iba1 positive cells are predominantly contacting endothelial cells but in the intratumoral area we detected also interaction of microglia/macrophages and pericytes (approx. 20%). In addition, microglia/macrophages in the hypoxic tumor area partly showed expression of Hif1 α . Most of the hypoxic microglia/macrophages are located in the perivascular niche or around Hif1 α positive tumor cells. Surprisingly, the analyses of TUNEL staining showed only a few apoptotic cells in the tumor area. And most of these apoptotic cells were microglia/macrophages, which did not express Hif1 α .

Desmin proved to be a difficult-to-use marker for analysis of pericytes, as well as desmin⁺ - cells were detected which had no contact with the endothelial cells of tumor blood vessels. In addition, these cells were also partly Iba-1⁺. The cellular transformation of pericytes in microglia / macrophages has been postulated. Furthermore, glioma cells were detected in the tumor expressing the protein of mesenchymal origin desmin. Some of the glioma cells demonstrated the microglial characteristics, such as the Iba-1 - expression, which would support the new hypothesis of cellular fusion between tumor cells and microglia / macrophages.

In future studies, the detailed investigation of the microglia/macrophages and vessel interaction could lead to a better understanding of the role of microglia/macrophages on tumor angiogenesis.

1. EINLEITUNG

1.1 Gliome

Gliome gehören zu den primären Hirntumoren, da sie am häufigsten aus Gliazellen, dem Stütz- und Nährgewebe der Nervenzellen (Neuroglia), entstehen. Gliome sind am häufigsten vorkommende neuroepitheliale Tumore des ZNS. Sie machen etwa 30-40% der intrakraniellen Tumore aus. Die Inzidenz von primären Hirntumoren in den USA wird auf 10 von 100 000 Einwohnern pro Jahr und eine geschlechtsspezifische Verteilung von 6 : 4 (männlich zu weiblich) geschätzt. Gliome sind typische Tumore des mittleren Alters, mit einem Gipfel zwischen 40 und 65 Jahren [1].

Entsprechend ihrer zytogenetischen Herkunft werden den Gliomen Astrozytome, Oligodendrogliome, Ependymome sowie Mischtumore zugerechnet. Nach der Klassifizierung der World Health Organisation (WHO) werden sie anhand ihres Differenzierungsgrades bzw. ihrer Malignität in vier Grade eingeteilt (Tab. 1) [2; 3].

Tabelle 1: Zusammenfassung der WHO – Grade von astrozytären Tumoren des zentralen Nervensystems (2007).

WHO - Grad	Dignität	Kommentar	Beispiele
WHO I	gutartig	durch operative Entfernung mögliche Heilung	Kraniopharyngeom, Neurinom, pilozytisches Astrozytom
WHO II	niedrig maligne	häufig infiltratives Wachstum und Rezidive	diffuses Astrozytom, Oligodendrogliom
WHO III	hoch maligne	Überlebenszeit häufig reduziert	Anaplastisches Astrozytom
WHO IV	hoch maligne	deutliche Reduktion der Überlebenszeit	Glioblastom, Medulloblastom

Weitere Möglichkeit der Einteilung von Gliomen erfolgt nach ihrer Lokalisation. So wird zwischen Gliomen des Hirnstammes (pontin) sowie der Region, die über (supratentoriell) oder unter (infratentoriell) dem Tentorium cerebelli (eine querverlaufende Membran zwischen dem Okzipitallappen des Großhirns und dem Kleinhirn) befindet, unterschieden. Maligne Gliome (Grad II-IV) findet man meistens supratentoriell. Dabei ist die Lokalisation des Tumors entscheidend, durch welche Symptomatik die Patienten letztendlich klinisch auffällig werden. Die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors ist der andere Einflussfaktor, welcher das klinische Bild der Patienten beeinflusst: für schnell wachsende Hirntumore sind Hirndruckzeichen typisch (Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Bewusstseinsintrübung), langsam wachsende Tumore manifestieren sich hingegen häufig durch zerebrale Krampfanfälle [4].

1.2 Glioblastoma multiforme

Etwa die Hälfte der Gliome im Erwachsenenalter sind Glioblastome [5]. Die Glioblastome als echte Hirntumore gehen von der Glia des Gehirns aus und sind stets als maligne im Sinne von Grad IV der WHO – Klassifikation (Tab. 1) anzusehen.

Zwei Wege der Entstehung der malignen Hirntumore werden unterschieden. Einerseits wird postuliert, dass sie sich aus gutartigen Vorformen entwickeln (sekundäre Glioblastome), andererseits, dass sie als primär maligne Tumore innerhalb des Gehirns wachsen [4; 6] (Abb. 1).

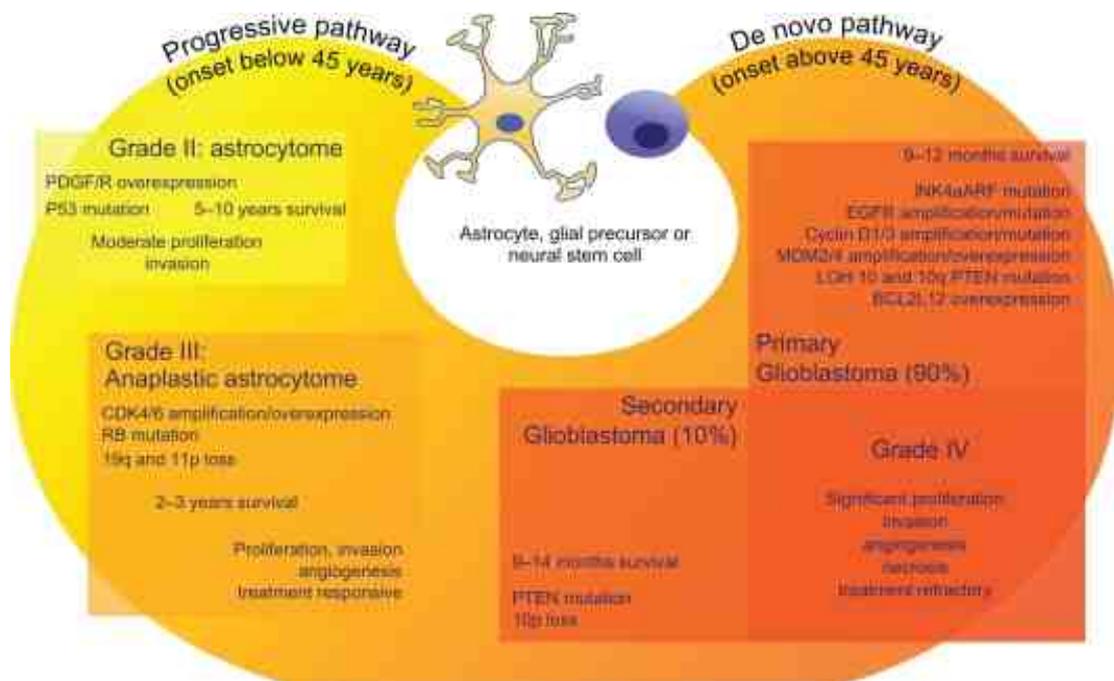


Abb. 1: Darstellung der chromosomalen und genetischen Abberationen in Glioblastoma multiforme. Die Abbildung zeigt die Beziehungen zwischen Überleben, Pathobiologie und molekularen Läsionen, die zur Bildung von primären (de novo) und sekundären (progressiven) Glioblastomen führen. (Bildmaterial aus Nieto-Sampedro M *et al.* Clin Med Insights Oncol, 2011 [7]).

1.2.1 Neuro – und Histopathologie

Die Zusatzbezeichnung Glioblastoma multiforme bezieht sich auf das durch Einblutungen, Nekrosen und pathologisch thrombosierte Gefäße gekennzeichnete „bunte“ Bild der Tumorschnittfläche (Abb. 2).

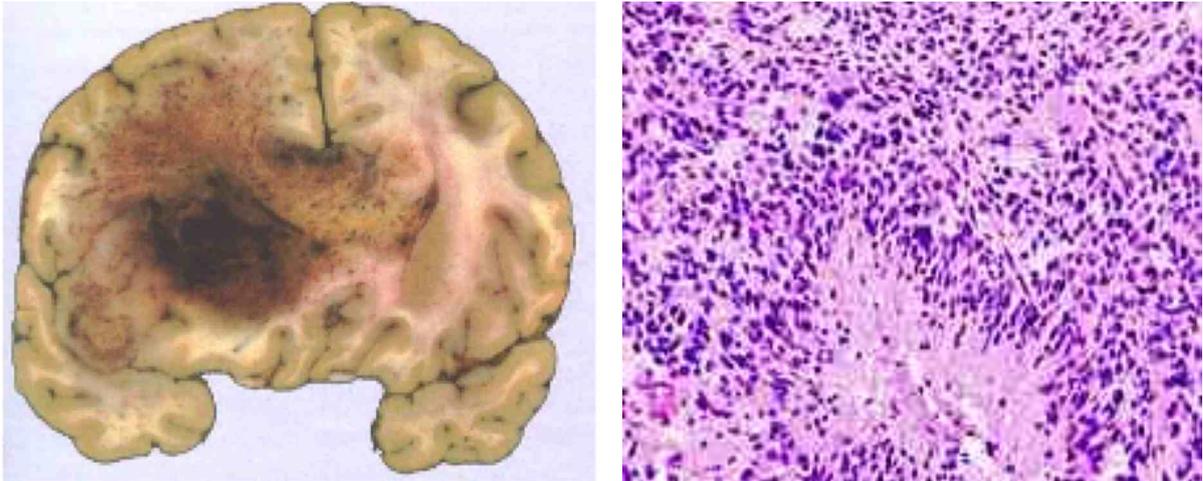


Abb. 2: Makroskopisches und mikroskopisches Präparat des Gehirns mit Glioblastoma multiforme. Makroskopisches Präparat zeigt das hämorrhagische Glioblastom mit Infiltration des Corpus callosum (Bildquelle: Graham DI *et al.* (1997) Greenfields Neuropathology). Histopathologisches Bild zeigt Pseudopalisaden um ein nekrotisches Areal bei einem Glioblastom (HE – Färbung, Bildquelle: de.wikibooks.org).

Histologisch zeigen sich charakteristischerweise ausgeprägte Kern- und Zellpleomorphie, erhöhte Mitose- und Proliferationsrate, strichförmige Nekrosen mit Palisadenstellung von Tumorzellen im Randbereich sowie mikrovaskuläre Proliferation in Form von glomerulumartigen Gefäßknäueln mit weitlumigen, evtl. thrombosierten Tumorgefäßen [8].

Das Glioblastom wächst und metastasiert überwiegend lokal innerhalb des ZNS (z.B. als Schmetterlingsgliom oder bei Befall der Leptomeningen als meningeale Gliomatose). Metastasen außerhalb des ZNS sind extrem selten [9].

1.2.2 Diagnostik, Therapie und Prognose

An erster Stelle in der Diagnostik von Glioblastoma multiforme steht die klinische Untersuchung des Patienten. Neben Allgemeinsymptomatik (siehe 1.1), epileptischen Anfällen, Visusstörungen und Hemiparese sind Gedächtnisdefizite, Sprachstörungen und Persönlichkeitsveränderungen aufgrund der häufigen

Lokalisation des malignen Prozesses in der Temporal- und Frontalregion zu beobachten.

Zur Bekräftigung der Verdachtsdiagnose gelingt der beste diagnostische Nachweis mithilfe der kranialen Computertomographie (CCT) nach Kontrastmittelgabe (KM). Dabei zeigt sich typische KM – Anreicherung mit girlandenartigen Ringstrukturen (ringförmiges Enhancement). In der Magnetresonanztomographie (MRT) lässt sich außerdem in der T2 – gewichteten Sequenz das perifokale Hirnödem deutlich darstellen. Das Erscheinungsbild des Glioblastoms ist aber sehr variabel, sodass eine sichere Diagnose letztendlich nur durch eine neuropathologische Untersuchung des Präparats nach einer stereotaktischen Biopsie möglich ist.

In den letzten Studien wurde belegt, dass die Patienten von einer weitgehenden Tumorresektion wirklich profitieren [10]. Signifikant längeres Überleben für Patienten wurde dabei mittels fluoreszenzgestützter Mikrochirurgie mit 5-Aminolaevulinsäure (5-Ala) zur intravitalem Visualisierung des Tumors erreicht [11]. Aufgrund der Fähigkeit der Gliomzellen zu Migration bzw. Bildung von Mikrosatelliten ist eine vollständige Resektion des Tumors praktisch nicht möglich. Dies stellt den Hauptgrund für eine hohe Rezidivrate dar und erfordert eine weitere Anschlusstherapie. Dabei scheint neben einer Radio- bzw. Chemotherapie (z.B. BCNU, CCNU) eine kombinierte postoperative Strahlentherapie (fraktioniert auf das Tumorgebiet mit Gesamtdosis von etwa 55-60 Gy) mit begleitender Chemotherapie mit alkylierendem Zytostatikum Temozolomid das Überleben der Patienten zu verlängern [9]. Dabei ist der Nachweis des DNA-Reparaturenzyms MGMT (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) von prognostischer Bedeutung, da Temozolomid durch Hemmung dieses Enzyms eine Apoptose in den Tumorzellen induziert [12].

Als supportive Therapie zur Behandlung des perifokalen, vasogenen Ödems, welches die raumfordernde Wirkung des Tumors deutlich verstärken und zu neurologischen Ausfällen bei den Patienten führen kann, wird das Kortikosteroid Dexamethason eingesetzt [13; 14]. Des Weiteren soll eine prophylaktische Antithrombose-therapie mit niedermolekularen Heparinen in der frühen postoperativen Phase eingesetzt werden [15], da Patienten mit malignen Gliomen ein deutlich erhöhtes Risiko für Beinvenenthrombosen und Lungenembolien haben. Da bei etwa 50% der Glioblastom – Patienten im Laufe der Erkrankung epileptische

Krampfanfälle auftreten, wird bereits nach dem ersten aufgetretenen Krampfanfall und gleichzeitigem bildmorphologischem Verdacht auf einen zerebralen malignen Prozess mit einer antikonvulsiven Behandlung begonnen [13].

In den letzten Jahren wurde deutlicher Wissenszuwachs über die molekularen Mechanismen der Entstehung und Progression von malignen Gliomen beobachtet. Somit wurden die Pforten für die neuen Therapieansätze geöffnet.

Zu den neuen Therapieansätzen gehört die Hemmung der Angiogenese durch die Blockade von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) mittels VEGF – neutralisierenden Antikörpers (Bevacizumab). VEGF ist ein Regulator der physiologischen Angiogenese (z.B. während der Embriogenese), ist aber auch in den pathologischen Prozess der Neovaskularisierung in Tumoren involviert [16]. Jüngste Studien haben einige Resistenzmechanismen gegen Anti-VEGF-Therapien, insbesondere bei der Behandlung von Glioblastoma multiforme, gezeigt [17]. Einerseits spielt dabei die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden (MET signaling) in den Tumorzellen, induziert durch Inhibierung von VEGF, andererseits durch die Tumorzellen selbst induzierte Neovaskularisation (vaskuläre Mimikry) eine Rolle [18]. Positive Behandlungsergebnisse wurden durch kombinierte Therapie mit Bevacizumab und Irinotecan erreicht. Einige Phase-I/II-Studien zeigten eine deutliche Erhöhung der sechsmonatigen progressionsfreien Überlebensrate auf bis zu 43 % bei Glioblastomen [19]. Ein anderer Ansatz der spezifischen anti – angiogen gerichteten Therapien stellt die Inhibition des PDGF – Signalweges (Platelet Derived Growth Faktor), der aktueller Gegenstand der Forschung ist [20].

Das weitere Zielmolekül in der Behandlung des Glioblastoms ist EGF (Epidermal Growth Faktor), welches eine deutliche Überexpression in diesem Tumor zeigt [21]. EGF gehört zu der Familie der ErbB – Membran – Rezeptoren (Tyrosinkinaserzeptoren). Durch Blockade des EGF – Rezeptors wird das Zellwachstum gebremst und die Zellapoptose induziert. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (Cetuximab), sowie durch die Anwendung von sogenannten "small molecules" (Gefitinib, Erlotinib) wird spezifisch die Kinasefunktion des EGF – Rezeptors blockiert (Tyrosinkinaseinhibitoren) [22; 23].

Zu den experimentellen Therapiestrategien gehört die sogenannte Immuntherapie. Dabei unterscheidet man die aktive und passive Immuntherapie. Bei der passiven Immuntherapie handelt es sich um die Verwendung von Interferonen, Interleukinen

(z.B. IL-2) und Zytokinen ($TNF\alpha$), die systemisch oder lokal intratumoral appliziert werden [24]. Zur aktiven Immuntherapie gehört die Verwendung von Tumorstimmungsantigenen, die aus patienteneigener, kultivierter Glioblastomzellen hergestellt und anschließend subkutan appliziert werden [25].

Mittels Immuntoxintherapie wird der von der Normalzelle abweichende Aufbau der Tumorzellmembran ausgenutzt, um selektiv die Gliomzellen durch intrazelluläre Aktivierung des an den tumorspezifischen Antikörper gebundenen Toxins zu eliminieren [26]. Die Gentherapie beinhaltet den Versuch, die Zielgene (Suizidgene, z.B. HSV – Thymidinkinase) mit Hilfe von Vektoren (Viruspartikel, z.B. Retro- oder Adenoviren) in Tumorzellen einzubringen [27]. Die Verwendung von multipotenten mesenchymalen Stammzellen scheint dabei eine neue Hoffnung in der Behandlung von Glioblastoma multiforme zu bringen [28].

Grundsätzlich bleiben die Ergebnisse der modereren Therapieansätze weitgehend hinter den Erwartungen zurück. Eine signifikante Änderung des Gesamtüberlebens konnte bisher bei keiner der Therapien nachgewiesen werden. Die Prognose bleibt mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 14,6 Monaten [10] nach Diagnosestellung und Einleitung der multimodalen Therapie weitgehend infaust. Deshalb sind neue Therapieansätze notwendig. Dazu ist es aber erforderlich, die Tumorbiologie besser zu verstehen.

1.3 Mikroglia im ZNS

1.3.1 Ursprung und Funktion der Mikroglia

Die Mikrogliazellen stellen bis zu 20% aller Neuroglia des ZNS dar [29]. Die erstmalige Beschreibung von Mikroglia ist bereits im 19. Jahrhundert durch den Neuropathologen und Psychiater Nissl erfolgt [30]. Aber erst durch del Rio – Hortega, den spanischen Neuroanatomen, konnte eine spezifische Darstellung von Mikroglia (durch Silberkarbonatimprägnation) erreicht werden [31]. Auf seine systematischen Untersuchungen bezüglich des Ursprunges der Mikroglia geht die Vermutung der mesodermalen Herkunft dieser Zellen (aus Pia (Mesoderm) mater)

zurück. Der ontogenetische Ursprung der Mikroglia wird bis heute kontrovers diskutiert. Einige Experten auf diesem Gebiet unterstützen die Hypothese der Rekrutierung der Zellen myeloiden Ursprunges bzw. der Monozyten mit anschließendem Ausbau der Mikrogliapopulation im ZNS. Es existieren zahlreiche Gemeinsamkeiten der Mikroglia mit Monozyten/Makrophagen, wie z.B. Effektorfunktionen (Phagozytose), Produktion von Zytokinen und Chemokinen sowie die Freisetzung von zytotoxischen Sauerstoffradikalen [32; 33]. Eine starke Vaskularisierung des ZNS bildet dabei die Grundlage für die Einwanderung von myeloiden Zellen sowie für eine verbreitete Mikrogliakolonisation [34-36]. Daneben spielt das Gefäßendothel des ZNS eine wichtige Rolle während der Infiltration der Makrophagen durch Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1) als homing – Rezeptoren [37].

Als nächstes wird die Hypothese des neuroektodermalen Ursprunges der Mikroglia postuliert, basierend auf der Detektierung von Mikroglia während der noch avaskulären Phase der embryonalen Entwicklung des ZNS [38]. Anschließend wird die Hypothese der perizytären Transformation in Mikroglia [39] sowie der Ursprung der Mikroglia von den subependymalen, ventrikel – assoziierten Makrophagen [40] diskutiert.

Die Mikrogliazellen werden nach ihrer Morphologie in drei Typen eingeteilt: ansässige ramifizierte, aktivierte und amöboid – phagozytierende Mikroglia [41]. Im perinatalen Gehirn sind die amöboid – phagozytierenden Mikroglia dabei die vorherrschende Form [42]. Während der postnatalen Reifung transformieren die amöboiden Mikroglia in den verzweigten Zelltyp (resting microglia) [42; 43]. Als ansässige ramifizierte Mikroglia überwachen sie ihre Mikroumgebung, dabei passen sie ihre Morphologie und Expressionsmuster ihrer Zelloberflächenmarker entsprechend den Gewebeverhältnissen an [10]. Sie bleiben im sogenannten „Ruhezustand“, bis die Reize aus der pathologisch veränderten Region (z.B. durch Verletzung, Infektion oder neurodegenerativen Prozess) ihre Migration zum Ort der Schädigung (aufgrund chemotaktischen Fähigkeit der Mikroglia) sowie ihre Transformation in eine amöboid – aktivierte bzw. phagozytische Form induzieren [44; 45].

1.3.2 Mikroglia als Modulator der Inflammation

Ähnlich den Makrophagen aus der Peripherie sind Mikroglia in der Lage eine Entzündungsreaktion am Ort der Schädigung im ZNS zu generieren. Dabei tragen verschiedene Zytokine (IFN-gamma, LPS, IL-10) zur Aktivierung von ramifizierten Mikroglia bei (Abb. 3). Es entstehen zwei Phänotypen von aktivierten Mikrogliazellen: der erste Phänotyp (M 1), getriggert durch die Einwirkung pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. IFN-gamma), sorgt für die Modullierung der angeborenen Immunantwort durch darauf folgende eigene Zytokinproduktion (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta). Diese Veränderungen wiederum verstärken die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke, um den Eintritt von löslichen Faktoren und peripheren Immunzellen, einschließlich Makrophagen zu ermöglichen [46]; der entzündungshemmende (anti-inflammatorische) Phänotyp (M 2) steht mehr im Zusammenhang mit einer Feinabstimmung der Entzündung, Aufräumen der Trümmer, die Förderung der Angiogenese, Gewebeumbau und Reparatur [47]. Die autoregulatorischen Prozesse, einschließlich Phagozytose von Zelltrümmern und apoptotischen Zellen, können zur Verschiebung des M 1- in M 2 – Phänotyp führen. Die Signalwege des umgekehrten Überganges des M 2 in M1 - Phänotyp sind noch nicht verstanden.

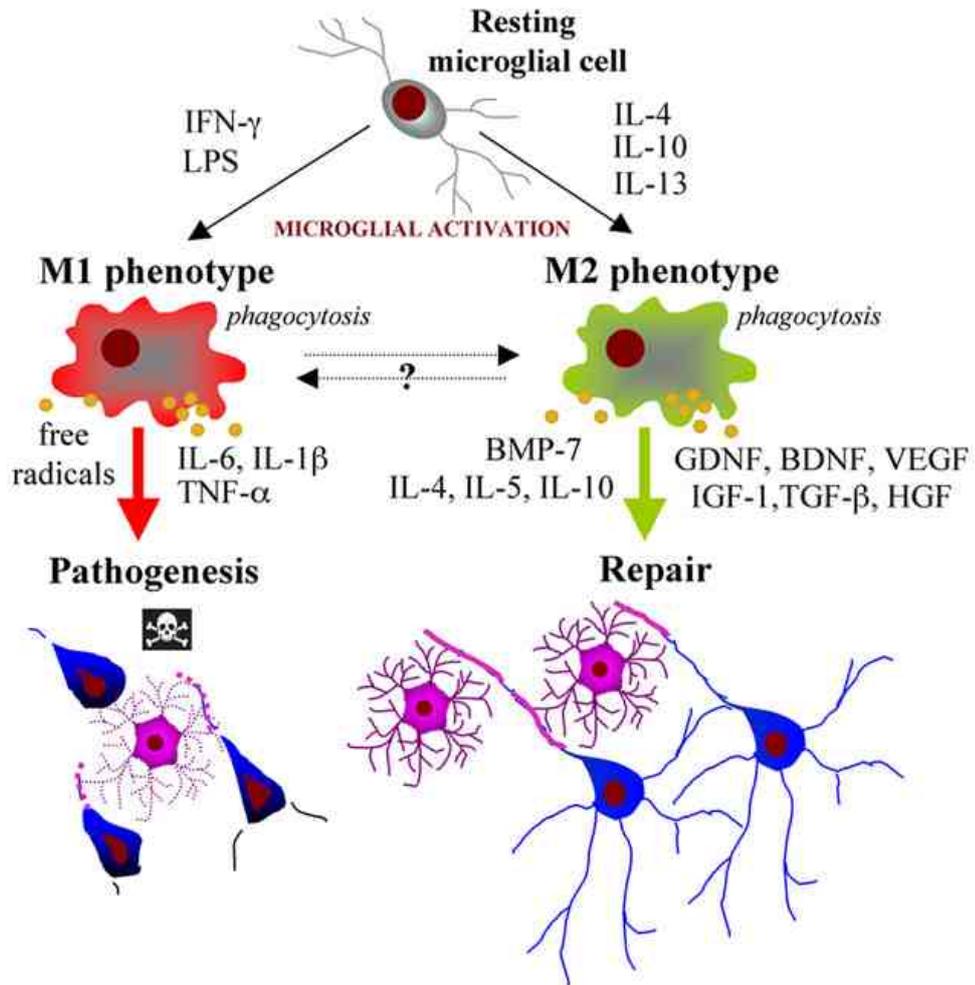


Abb. 3: Darstellung von zwei unterschiedlichen Immunphänotypen der aktivierten Mikroglia als Mediatoren der Inflammation. M1-Zellen setzen pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6, TNF -alpha, IL -1 beta und freie Radikale frei, was zur Verstärkung der neuroinflammatorischen Reaktion beiträgt. Pro-inflammatorische Zytokine wirken zytotoxisch auf Oligodendrozyten und Neuronen und führen zu Demyelinisierung und axonalen Schäden. M2-Zellen setzen neurotrophe Faktoren (bFGF, IGF-1, TGF-beta) frei, welche Neurone in der verletzten Region, teilweise durch Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen der Oligodendrozyten sowie durch Expression von angiogenen Faktoren (VEGF) unterstützen. (Bildmaterial aus Fumagalli M *et al.* *Frontiers in Bioscience*, 2011 [47]).

1.3.3 Mikroglia/Makrophagen in der Tumorbiologie

Infiltrative Astrozytome sind durch das Auftreten einer großen Zahl von Mikroglia / Makrophagen charakterisiert. Ein Drittel aller Zellen in Gliombiopsien exprimieren Mikroglia / Makrophagen – Marker [48]. Aktivierte amöboide Mikroglia sind meist mit hochgradigen malignen Tumoren wie Glioblastoma multiforme assoziiert [49]. Die Mikrogliazellen werden dabei durch Chemokine (z.B. MCP-1) und Wachstumsfaktoren (z. B. CSF-1 und G-CSF) des Tumors angelockt, welche lokal durch tumorassoziierte Astrozyten produziert werden [50-52]. Diese Wachstumsfaktoren induzieren eine starke Proliferation von Mikroglia innerhalb des Tumors. Trotz ihrer Präsenz im Tumor ist die Funktion der Mikroglia / Makrophagen im Glioblastom wahrscheinlich unterdrückt. In einigen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass die tumor – assoziierten Makrophagen (TAMs) zu dem M 2 – Phänotyp der inflammatorischen Zellen gehören (Abb. 4) [53]. Die neuesten Studien berichten über eine wichtige Rolle endogener TGF β 1 und autokriner TGF β Signalwege in der Regulation der mikroglialen Funktionen und in der Neuroinflammation [54]. Zusätzlich sezernieren Mikroglia EGF (endothelial growth factor) und VEGF in Hirntumoren. Basierend auf diesen Erkenntnissen lässt sich vermuten, dass die Anwesenheit der Mikroglia und TAMs im Glioblastom zu einer aktiven Wachstumsförderung, durch die Produktion von angiogenen Faktoren (z.B. VEGF) zur besseren Blutversorgung und damit zur weiteren Tumorausdehnung beitragen könnten [55; 56].

1.3.4 Zelltypen der perivaskulären Nische im ZNS

Als Virchow – Robin Raum, genannt nach dem deutsche Arzt Rudolf Virchow und dem französischen Anatomen Charles-Philippe Robin), wird der mit Liquor ausgefüllte perivaskuläre Spaltraum um die Blutgefäße des zentralen Nervensystems (mit Ausnahme der Kapillaren) definiert. Dieser Raum liegt zwischen der Membrana limitans gliae superficialis und dem Endothel der Blutgefäße. Er stellt einen Teil der Blut-Hirn-Schranke dar und steht mit dem Subarachnoidalraum in Verbindung. Die Virchow – Robin Räume beinhalten die gefäßassoziierten Perizyten und stellen eine Leitstruktur für Makrophagen dar, die in diesen Räumen relativ ungehindert in die

Tiefe des Hirngewebes migrieren können. Der Ursprung der im Virchow – Robin Raum zirkulierenden Makrophagen ist der Gegenstand aktueller Forschung. Einige Arbeiten deuten darauf, dass es sich bei den detektierten Makrophagen um aktivierte Perizyten handelt, welche auch eine Fähigkeit zur Phagozytose besitzen [57; 58].

Allgemein wird angenommen, dass Perizyten die Zellen mesodermalen Ursprungs darstellen [59]. Sie scheinen in das Gewebe während der letzten Stadien der Vaskularisierung zu wandern und nehmen dort ihre charakteristischen Eigenschaften auf. Mesenchymale Vorläuferzellen wandern zu den neu gebildeten Kapillarsprossen und differenzieren sich in Perizyten (Abb. 4).

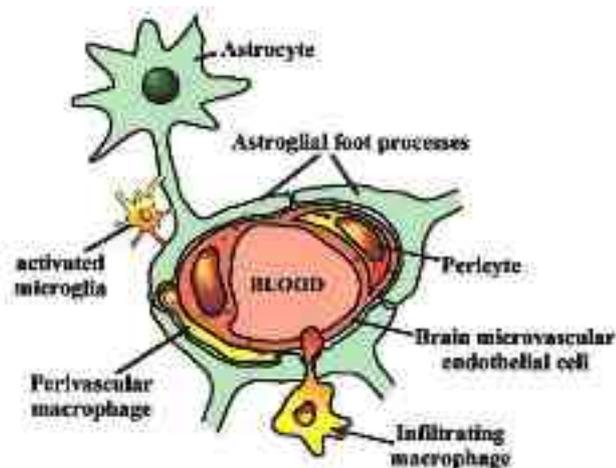


Abb. 4: Vereinfachte schematische Darstellung der Zellen myeloiden Ursprungs in der perivaskulären Nische des ZNS. (Bildmaterial aus Guillemin GJ and Brew BJ. J Leukoc Biol, 2004 [60]).

Es zeigt sich immer deutlicher, dass Perizyten nicht nur eine entscheidende Rolle für die Entwicklung und die Aufrechterhaltung eines funktionierenden Gefäßsystems spielen, sondern auch in pathologisch veränderten Tumorblutgefäßen auftreten. Diese neue Perspektive lässt denken, dass die eigentliche Angiogenese durch das Tumorgeschehen gestört wird. Im Gegenteil findet man im Glioblastom ein funktionierendes Gefäßnetz, welches die Progression des Tumors begünstigt. Es wird somit postuliert, dass sich die Tumorperizyten durch ihre morphologischen und molekularen Veränderungen von den Perizyten im normalen Gewebe unterscheiden

und somit ein zusätzliches therapeutisches Ziel der antiangiogenen Therapie darstellen [18].

Die eigentliche Rolle der Perizyten in der Tumorangio-genese ist weitgehend unklar. Weitere Untersuchungen der Perizytenbiologie sind daher gerechtfertigt, um die Eigenschaften der Tumorperizyten zu definieren und die Mechanismen ihrer Rekrutierung zu identifizieren.

1.4 Mechanismen der Gliom - assoziierten Gefäßneubildung

1.4.1 Das Prinzip des „angiogenic switch“ - Konzeptes

Ein charakteristisches Merkmal der Glioblastome ist ein stark ausgebildetes Gefäßsystem. Prozesse der Gefäßmitnutzung, Angiogenese (Wachstum von Blutgefäßen) und Vaskulogenese (Blutgefäßneubildung) sind in der Vergangenheit intensiv untersucht worden. Seit Kurzem ist jedoch bekannt, dass diese Prozesse nicht die einzigen Mechanismen sind, die eine Neovaskularisation in Gliomen bedingen. Zudem scheint es, als würden diese Prozesse umfangreich und überlappend zusammenwirken [61]. Bisher wurden fünf Mechanismen, die zu einer Neovaskularisation führen, entdeckt (Abb. 5): I. Gefäßmitnutzung, II. Angiogenese, III. Vaskulogenese, IV. vaskuläre Mimikry sowie die kürzlich entdeckte V. Transdifferenzierung der Tumorzellen in die Endothelzellen im Glioblastom [62].

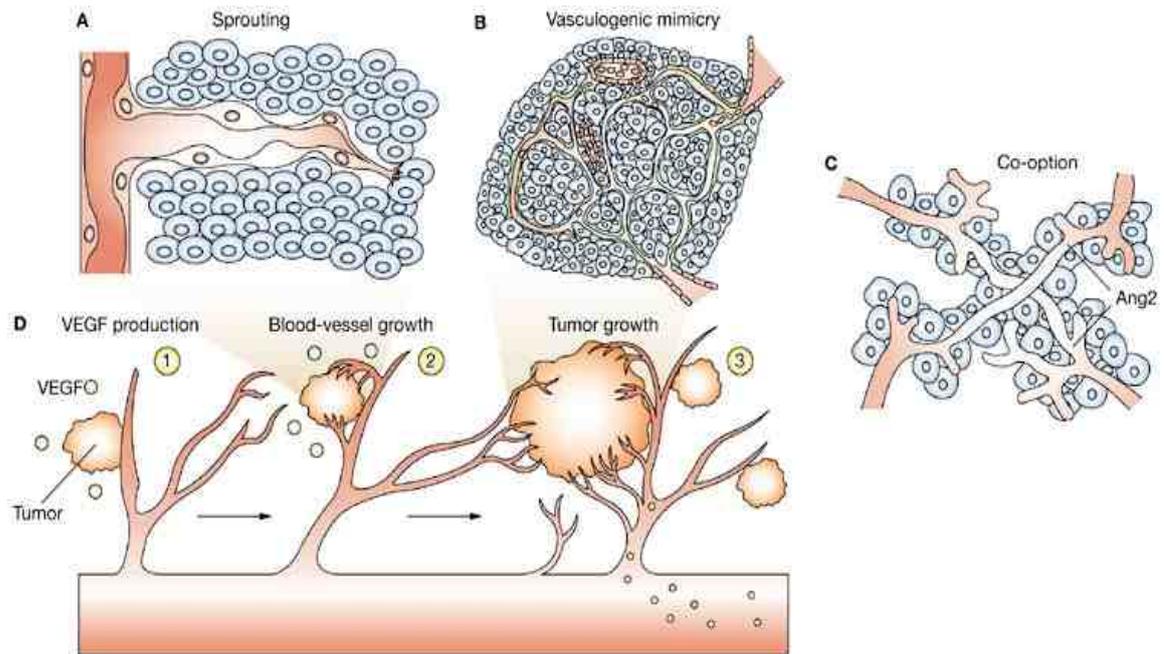


Abb. 5: Mechanismen der Gefäßneubildung in Tumoren. (A) Endothelsprossung stellt den Hauptprozess der Gefäßneubildung. (B) Vaskulogene Mimikry bedeutet, dass nicht-endotheliale Zellen die Funktion von Endothelzellen übernehmen und sich an der Bildung von Blutgefäßen beteiligen. Solcherart gebildete „Mosaikgefäße“ bestehen überwiegend aus Tumorzellen. (C) Tumorzellen verwenden bereits existierende Blutgefäße für die Aufrechterhaltung der Oxygenierung. (D) Tumorgefäßneubildung durch Freisetzung von proangiogenen Faktoren (z.B. VEGF) seitens Tumorzellen mit Endothelaktivierung und anschließender Tumorexansion. (Bildquelle aus Spannuth *at al.* Clinical Practice Oncology, 2008 [63]).

Das Prinzip der „angiogenic switch“ beinhaltet die Hypothese der Balance zwischen den angiogenen Aktivatoren (z.B. VEGF, bFGF, PDGF, TNF-alpha, MMPs, Ang-1) und den angiogenen Inhibitoren (z.B. TIMPs, Ang-2, IL-4, IL-12, INF-alpha). Der Begriff der „angiogenic switch“ bestimmt den Anfangszeitpunkt der nachfolgenden angiogenen Prozesse. Beim Überwiegen der angiogenen Stimulatoren, wie es z.B. in malignen Gliomen der Fall ist, kann somit die Gefäßneubildung ungebremst weiter fortgesetzt werden [64]. Dabei gelten Mikrogliazellen, eingewanderte Makrophagen (durch Bildung von VEGF) sowie Perizyten (PDGF, TGF-beta, MMPs) als Stimulatoren der Neovaskularisation im Glioblastom [65-67].

1.4.2 Hif-1 α - assoziierte Gefäßneubildung in malignen Gliomen

Gliomzellen sind in der Lage, sich an die hypoxischen Bedingungen im Gewebe anzupassen. Dabei wird die Expression von Zielgenen gefördert, welche für den anaeroben Zellstoffwechsel zuständig sind. Als Folge solcher Genaktivierung wird das Überleben der Tumorzellen, Angiogenese, Metastasierung und Invasion begünstigt [68]. Dieser Transkriptionsweg wird überwiegend von den Heterodimeren HIF-1 und HIF-2 vermittelt. Über die Rolle von HIF-2 ist weniger bekannt. Es wird vermutet, dass bei der Überexpression von HIF-2 bzw. seiner α - Untereinheit das Stammzellphänotyp der Gliomzellen gefördert wird [69].

HIF-1 ist ein heterodimerer nuklearer Transkriptionsfaktor, welcher aus zwei Untereinheiten, HIF-1 α und HIF-1 β , besteht. Die HIF-1 α - Untereinheit bestimmt die Aktivität von HIF-1 durch Veränderungen des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe. Unter normoxischen Bedingungen wird die α - Untereinheit durch Ubiquitinierung rasch abgebaut, unter hypoxischen Bedingungen bleibt sie jedoch intakt und bindert an die β - Untereinheit. Als Folge wird HIF-1 im Zellkern verstärkt exprimiert. HIF-1 induziert dabei die Expression vieler Gene, reguliert durch den „hypoxia response element“ (Abb. 6). Dies wiederum führt zur Hochregulierung von proangiogenen Faktoren (z.B. VEGF). Das Resultat dieser Hochregulierung ist die Migration und Proliferation von Endothelzellen als Schlüsselereignis in der angiogenen Kaskade [62].

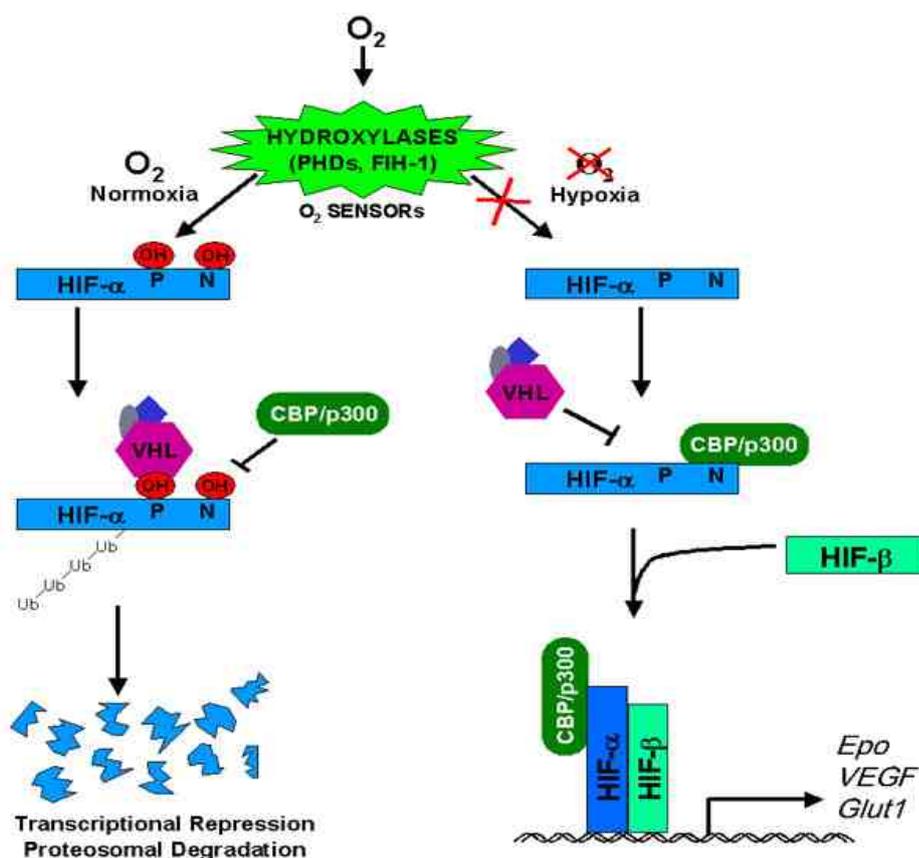


Abb. 6: Schematische Darstellung der Sauerstoff – abhängigen Regulation der Genexpression, vermittelt durch HIF-1 α . PDHs (HIF-Prolyl-Hydroxylasen) und FIH-1 (HIF-Asparaginyl-Hydroxylase bzw. Faktor-HIF-Hemmung) sind Sauerstoff – abhängige Enzyme. VHL (von-Hippel-Lindau-Protein) ist ein Teil des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, welches den proteosomalen Abbau von HIF-1 α fördert (transkriptionelle Co – Aktivatoren: CBP und p300). Epo (Erythropoietin), VEGF und GLUT1 (Glukose Transporter 1) sind HIF – Zielgene. (Bildmaterial aus Peet Laboratory, The University of Adelaide).

Die erhöhte HIF1 α – Aktivität ist in Tumoren mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert. Die Anwesenheit von HIF1 α im Tumor induziert die Expression von SDF1 α in Tumorzellen, was wiederum die Tumorprogression durch Rekrutierung Knochenmark – stammenden Zellen (BMDC) fördert, um die Angiogenese zu stimulieren (Abb. 7). Diese Ergebnisse stellen den molekularen Mechanismus, durch den HIF-1 α zur aggressiven Tumorprogression beiträgt und somit eine rationale Grundlage für zukünftige therapeutische Modalitäten darstellt. Die neuesten Daten zeigen auch den Einfluss von VEGF – Aktivität auf die Invasivität von Tumorzellen.

VEGF verhindert zwar die Tumorzellmigration entlang der Blutgefäße, fördert aber Tumorzellinfiltration in das Hirngewebe. Daher verwenden Tumorzellen die Fähigkeit zur perivaskulären Invasivität als Adaptationsmechanismus, wenn die Angiogenese beeinträchtigt wird.

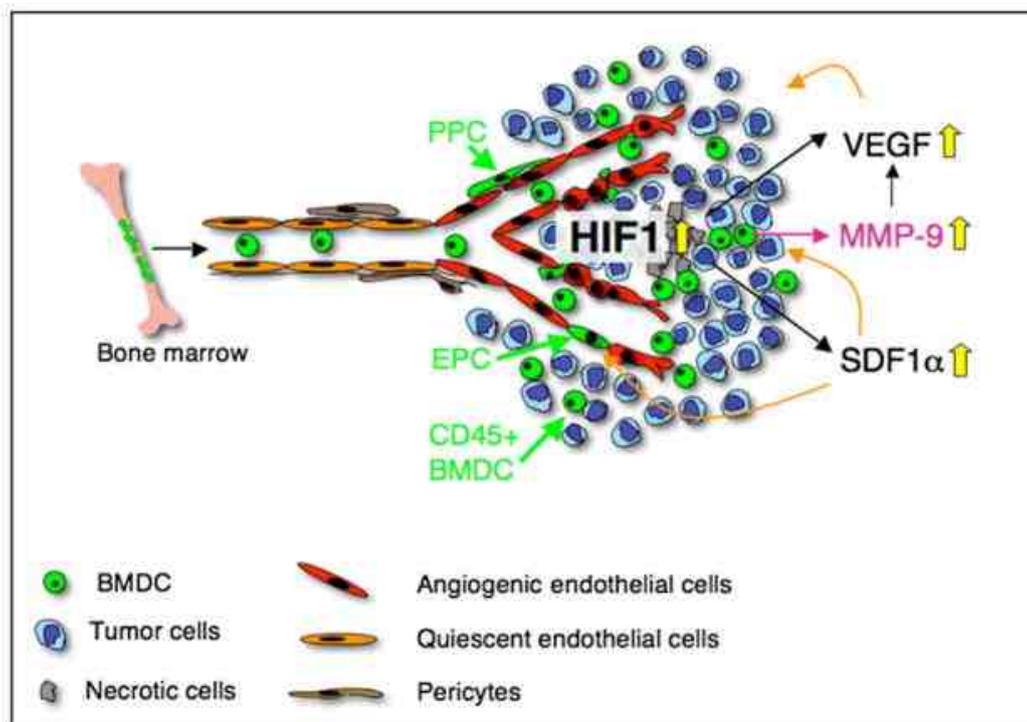


Abb. 7: HIF-1 ist ein wichtiger Regulator der Rekrutierung von Knochenmark – stammenden Zellen (bone marrow derived cells) in Tumoren. Hypoxie erhöht in Tumoren HIF-1-Expression, dadurch folgt die Induktion von VEGF- und SDF1α – Produktion in Tumorzellen. Als Folge dieser Produktion werden BMDC, einschließlich EPC (endothelial progenitor cells), PPC (pericyte progenitor cells) und CD45⁺ Monozyten rekrutiert, um den Gefäßumbau in Glioblastomen zu unterstützen. SDF1α dient als Retentionsfaktor von CXCR4⁺ vaskulären Vorläuferzellen und Monozyten (BMDC) in GBM. HIF1 induziert nicht nur die Transkription von VEGF in GBM, sondern erhöht auch die VEGF – Aktivität durch die Rekrutierung von CD45⁺ BMDC, welche MMP-9 im Tumor sezernieren, was wiederum die Bioverfügbarkeit von VEGF für seinen Rezeptor VEGFR2 erhöht. (Bildquelle aus Du R *et al.* Cancer Cell, 2008 [70]).

Die letzten Untersuchungen haben gezeigt, dass durch die Hemmung von HIF-1α der STAT3 – Signalweg synergisch unterdrückt wird. Als Folge dieser Hemmung wird

die Apoptose im Tumor induziert und VEGF – Expression reduziert, was wiederum den anti – angiogenen Effekt im Tumor hervorruft [71].

Obwohl Hypoxie ein bekannter Induktor der Angiogenese ist, gibt es mittlerweile Beweise, welche zeigen, dass Hypoxie – unabhängige Mechanismen der Gefäßneubildung existieren, einschließlich p53 und Hypoxie – unabhängiger VEGF-vermittelten Neovaskularisierung [55; 72].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Mikroglia / Makrophagen sind meist mit hochgradigen malignen Hirntumoren, wie Glioblastomen, assoziiert und machen dabei ein nicht unwesentlicher Anteil an Zellmasse in solchen Tumoren aus. Als Zellen des körpereigenen Immunsystems haben Mikroglia / Makrophagen eigentlich die Aufgabe, die pathologischen Prozesse zu erkennen und anschließend zu bekämpfen. Trotz ihrer Präsenz im Tumor wird die ungebremste Progression des Glioblastoms beobachtet, womit die schlechte Prognose dieser Erkrankung erklärt werden könnte. Die Beobachtung der Assoziation der Mikroglia / Makrophagen mit Blutgefäßen innerhalb des Tumors wirft zusätzlich Fragen zu allgemeiner Rolle dieser Zellen in Tumorbiologie auf.

In diesem Kontext wurde in der vorliegenden Arbeit die Mikrogliazellen / Makrophagen bezüglich ihrer Interaktion mit Tumorblutgefäßen sowie ihrer Aktivität in einem murinen Gliommodell näher charakterisiert. Syngene immunkompetente C57Bl/6 – Mäuse dienten dabei als Tiermodell. Zunächst wurde geschaut, ob die Mikrogliazellen / Makrophagen in engem Kontakt mit Tumorblutgefäßen stehen bzw. eine Art Interaktion zeigen. Bei positiven Ergebnissen sollte diese Interaktionsart spezifiziert werden, indem die Zellen der perivaskulären Nische, Perizyten / VSMC (vaskular smooth muscle cells) sowie Endothelzellen, zusammen mit Mikrogliazellen / Makrophagen dargestellt und ihre Kontaktstellen analysiert wurden.

Als nächstes wurden hypoxische Gebiete im Tumor, auch während der Tumorprogression, visualisiert und der Bezug der Mikroglia / Makrophagen zu solchen Tumorgebieten wurde evaluiert. Weiterhin sollte ermittelt werden, ob Mikroglia / Makrophagen im Tumorgebiet unter Sauerstoff – armen Konditionen selbst die Expression von HIF - 1 α hochregulieren. Dabei wurde der Bezug der Hypoxie zur apoptotischen Aktivität im Tumor hergestellt: es stellte sich die Frage, ob

und in wiefern die hypoxischen Tumorzellen bzw. hypoxische Mikroglia / Makrophagen apoptotisch sind.

Des Weiteren wurde die Differenzierung der Mikroglia population im Tumorgebiet dargestellt: dabei sollte gezeigt werden, wie sich die BMDC bezüglich ihres Expressionsmusters und ihrer Verteilung im Tumor verhalten. Als letztes erfolgte die Darstellung von Mikroglia / Makrophagen und Gliomzellen, um deren Interaktion zu beurteilen.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Verwendete Puffer und Medien

Tabelle 2: Zusammenfassung der verwendeten Puffer und Medien.

Bezeichnung	Inhalt	Hersteller
PBS	10xPBS 1:10 in Millipore® - Wasser	gibco
DMEM	„Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (Zellkulturmedium)	gibco
DMSO	Dimethylsulfid	Sigma
ARR	10xAntigen Retrieval Reagent-Universal	R&D Systems
Trypsin/EDTA	Trypsin/Natrium-ethylendiamin-tetraacetat	PAA Laboratories
PFA	4% PFA in 1xPBS	Sigma Aldrich
Casein	Milchprotein	Sigma Life Science
Triton X-100	Detergens	Sigma Aldrich

2.2 Tierexperimentelles Arbeiten

2.2.1 Versuchstiere / Zelllinie

In dieser Arbeit wurde für die *in vivo* - Experimente ein syngenes Tumormodell des Glioblastoma multiforme verwendet [73]. Dabei wurden die murinen GL261 – Tumorzellen in die Gehirne von C57Bl/6-Mäusen (Charles River).

Die Mausinzuchtstämme werden seit Jahrzehnten in der immunologischen und onkologischen Forschung verwendet. Da es bereits viele Daten über diese Mausstämme gibt, auf die man bei der Experimentenplanung zurückgreifen kann, ist es möglich, bei der geringeren Tierzahl die experimentellen Fragen zu beantworten.

Tabelle 3: Charakteristika der verwendeten Tierart.

Spezies	Geschlecht	Gewicht	Alter
Mus musculus	weiblich	20-35 g	8 -12 Wochen

Die Mäuse wurden in einer Tierhalteeinrichtung unter kontrollierten Bedingungen in Makrolonkäfigen des Typs II gehalten, wobei maximal 5 Tiere pro Käfig gesetzt wurden (soziale Anreicherung). Des Weiteren wurden die Käfige mit grober Einstreu bestückt, sowie Nestmaterial, wie Papiertücher und Pappröhren, hinzugefügt. Die Mäuse wurden durch erfahrene und gut ausgebildete Tierpfleger betreut.

Für die Versuchsdurchführung an Tieren wurde die erforderliche Qualifikation (Teilnahme am Tierkudkurs) nachgewiesen. Die Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit der Tierschutzgenehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin, Aktenzeichen GO 152/09.

2.2.2 Narkoseverfahren

Für die intrazerebrale Implantation von Tumorzellen wurden die Mäuse mittels intraperitonealer Injektion von einem Gemisch aus 10% Ketanest® (50mg/ml Ketaminbase), 2% Rompun® (20mg/ml Xylazine-Hydrochlorid) in 0,9% NaCl (1620 µl NaCl + 120 µl Rompun® + 340 µl Ketanest®) narkotisiert. Die Tiere wurden gewogen. 60 µl des Narkosegemisches pro 10 g Körpergewicht der Tiere wurden intraperitoneal mittels einer Insulinspritze (30 G Kanüle) verabreicht. Dabei betrug die Dauer der Narkose im Schnitt bis zu einer Stunde. Die Tiefe der Narkose wurde bei den Tieren durch Prüfung der Reflexe beurteilt (Hinterpfote drücken). Zum Augenschutz während der Sedierung wurde Bepanthen® Augensalbe (Roche, Grenzach- Wyhlen, Deutschland) verwendet.

2.2.3 Tumorzellimplantation

Die stereotaktischen Operationen wurden in den speziellen OP – Räumen des Laboratoriums durchgeführt. Die Instrumente für die Operationen wurden im Autoklav sterilisiert.

Nach Einleitung der Narkose (siehe 2.2.2) wurde die Kopfhaut der Tiere rasiert und mit 70% Iso-Propanol desinfiziert. Der Kopf der Maus wurde anschließend in den stereotaktischen Rahmen eingespannt, dabei musste der Kopf unbeweglich sein.

Für die stereotaktische Tumorimplantation wurde eine Hamilton – Spritze (Hamilton SYR 1µl 7001 KH) verwendet. Nach dem Spülen der Spritze mit Ethanol und anschließend mit Wasser, wurde 1 µl der Tumorzellsuspension (2×10^4 Zellen) aufgezogen und die Spritze in den stereotaktischen Rahmen eingespannt.

Nach Prüfung der Reflexe der Mäuse wurde ein sagittaler Schnitt der Kopfhaut mittels einer OP – Schere von den Augen bis kurz vor die Ohren gesetzt. Als Orientierungspunkt für die Bestimmung des Implantationsortes wurde das Bregma aufgefunden. Als Bregma wird am Schädel derjenige Punkt bezeichnet, an dem die Sutura coronalis (Kranznaht), die das Stirnbein von den Scheitelbeinen trennt, und die Sutura sagittalis (Pfeilnaht), die die beiden Scheitelbeine trennt, zusammentreffen. Das stereotaktische System mit der Hamilton – Spritze wurde nun auf das Bregma geeicht. Anhand eines Atlas für Stereotaxie der Maus wurden die Koordinaten für die Implantation berechnet: vom Bregma 1mm nach vorn und 2 mm nach lateral (rechts). Dieses Areal entspricht grundsätzlich einem stummen Gebiet des Kortex, sodass keine deutlichen neurologischen Ausfälle der Tiere nach dem operativen Eingriff zu erwarten waren.

Als nächstes wurde mit einem sterilen Marker die Stelle für das Bohrloch markiert und mittels einer 23 G – Kanüle durch wiederholte Drehbewegungen die knöcherne Schädeldecke aufgebohrt. Als weiteres wurde die Spitze der Hamilton – Spritze leicht in das Bohrloch eingetaucht, dann 4 mm in die Tiefe und 1 mm zurückgezogen. Nun konnte die vorbereitete Tumorzellsuspension intrazerebral langsam (über ca. 5 min.) eingespritzt werden. Nach dem Einspritzen wurde wiederum 5 min. gewartet, damit die Gliomzellen sich verteilen konnten. Anschließend wurde die Spritze langsam (über ca. 5 min.) herausgezogen. Nach dem Entfernen der Injektionskanüle wurde die Wunde mit steriler NaCl – Lösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH) gespült und mit 70% Iso-Propanol desinfiziert. Die Wunde wurde mittels einer

kontinuierlichen Hautnaht (Ethicon, PROLENE® 4/0, Johnson & Johnson int.) verschlossen. Während der Behandlung wurden ständig die Vitalfunktionen der Maus im Auge behalten.

Nach dem Eingriff wurden die Tiere in Papiertücher eingerollt, um ein Auskühlen zu vermeiden, und in ihre Käfige mit frischer Einstreu und kontrollierter Umgebungstemperatur überführt. Innerhalb einer Stunde wurden die Tiere intensiv überwacht, bis sie aufgewacht waren. Anschließend wurden die Papiertücher entfernt.

Nach der Behandlung mussten die Tiere regelmäßig, hinsichtlich von Wundverhältnissen sowie von Ausfällen aufgrund des Tumorwachstums, kontrolliert werden.

2.2.4 Kardiale Perfusion, Entnahme und Fixierung von Mausgehirnen

Je nach Wachstumsphase des Tumors wurden die tumorhaltigen Gehirne der Mäuse nach 7, 14 sowie nach 21 Tagen des Tumorwachstums explantiert. Dazu wurden die Tiere zunächst narkotisiert (siehe 2.2.2). Dabei war die Überdosierung mit dem Narkosegemisch (80 µl / 10 g Körpergewicht) erforderlich.

Nach dem Überprüfen der Reflexe und ausbleibender Reaktion wurde die Maus an Extremitäten am Styroporbrett unter der Abzughaube fixiert, die Bauchhaut desinfiziert und in der Mittellinie ein Hautschnitt mittels einer Schere gelegt. Die Bauch- und Thoraxwand wurden freigelegt. Ein Querschnitt wurde in der vorderen Bauchwand direkt unterhalb der Rippenbögen gelegt, die Zwerchfellkuppen wurden von unten freigelegt. Das Zwerchfell wurde vom Thorax an seinem vorderen Ansatz vorsichtig gelöst. Die Rippen wurden lateral beidseitig bis oberhalb des Herzens mit der scharfen Schere durchgetrennt. Die gelöste vordere Thoraxwand wurde nun hochgeklappt. Nach der Freilegung des Herzens wurde der rechte Vorhof aufgeschnitten und der große Kreislauf somit eröffnet. Das Tier wurde vorzugsweise auf die rechte Seite gelegt, damit das Blut zur besseren Übersicht aus dem Thorax abfließen konnte. Die vorbereitete mit 4% PFA gefüllte 10 ml – Spritze mit einer 23 G - Kanüle wurde genommen und der linke Ventrikel wurde unter Festhalten des

Herzens (z.B. des rechten Ventrikels) vorsichtig punktiert. Der Inhalt der Spritze wurde langsam injiziert.

Zur Überprüfung des Perfusionserfolges wurde der Ausfluss aus dem rechten Atrium beobachtet: zuerst sollte 1,5 – 2 ml Blut, danach klare PFA – Lösung ausfließen. Bei erfolgreicher Perfusion sollte sich außerdem die Farbe des Darms, der Leber und der Extremitäten verändern (verblassen), das Tier sollte versteifen. Dabei wurden Faszikulationen der Extremitäten sowie des Schwanzes beobachtet, was als ein Zeichen der Gewebeveränderung durch die Einwirkung der PFA – Lösung und somit als Erfolg der Perfusion zu werten war.

Nach der Perfusion wurde der Kopf des Tieres mit der Schere abgetrennt. Die Kopfhaut wurde mittig ausgeschnitten und soweit wie möglich abgezogen. Mit der kleinen Schere wurde die Sutura sagittalis längs durchgeschnitten und der Schädelknochen stückweise mit einer kleinen Pinzette abgebrochen und entfernt. Nach dem Entfernen der oberen Schädeldecke wurden alle sichtbaren Hirnnerven (v.a. I, II, V) durchtrennt und das Gehirn vorsichtig entnommen.

Nach der Entnahme wurde das Gehirn in ein Falcon®-Röhrchen mit ca. 10 ml 4% PFA – Lösung überführt und über 24h bei 8° C gelagert. Anschließend wurde das Gehirn zum Gefrierschutz in eine Reihe von Saccharoselösungen steigender Konzentration überführt: zuerst in eine 10%-, dann 20%- und schließlich 30% - Saccharoselösung über jeweils 24 – 48h.

Nachdem der Fixierungsprozess abgeschlossen war, konnte das Gehirn eingefroren werden. Zur Kryokonservierung wurde der flüssige Stickstoff verwendet. Das fixierte Gehirn wurde im Plastikbecher platziert und der flüssige Stickstoff wurde vorsichtig zugeführt. Nach ca. einer Minute wurde das feste Gehirn aus dem Becher entnommen und in ein 10 ml Falcon®-Röhrchen bis zum nächsten Gebrauch bei -80° C im Tiefkühlfach (Thermo Scientific, Hera Freeze) gelagert.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kultivieren der Gliomzellen

Für die Kultivierung der GL261-Zellen wurde für sie geeignetes Medium (DMEM GlutaMax I) verwendet. Unter sterilen Bedingungen im Zellkulturlabor wurde das Arbeitsmedium für die GL261-Zellen hergestellt: dem Medium (DMEM, gibco by Life technologies) wurden 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin (P/S) (PAA Laboratories, Austria) bei Raumtemperatur hinzugefügt.

Die eingefrorenen GL261-Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und aufgetaut (siehe 2.3.3). Nach dem Resuspendieren der Zellen wurden sie in das vorbereitete Medium überführt und in der Zentrifuge sieben Minuten bei 1300 rpm/min. abzentrifugiert. Das dadurch entstandene zelluläre Pellet am Boden des Falcon® - Gefäßes (Falcon®, Becton Dickinson Europe, France) wurde durch das vorsichtige Absaugen des Mediums freigelegt. Nach dem Resuspendieren des Zellpellets in einem Milliliter des Mediums wurden die GL261-Zellen in die vorbereitete Zellkulturflasche (Becton Dickinson Labware, USA) mit 25 ml Medium vorsichtig pipettiert. Nach dem Mikroskopieren der Tumorzellen wurden die Zellkulturflaschen für 3-4 Tage in den Brutschrank (Thermo Scientific, Heraeus BBD 6220) bei 37° C mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5% CO₂-Anteil gestellt. Danach erfolgte die Beurteilung der GL261-Zelldichte am Boden der Zellkulturflasche unter dem Lichtmikroskop.

2.3.2 Splitten von Gliomzellen

Zur Vermehrung der Tumorzellen wurden sie gesplittet (z.B. 1:5). Die Vorbereitung der Tumorzellen erfolgte wie in 2.3.1. Im Auflichtmikroskop wurde die Konfluenz des adhärenen Monolayers der Tumorzellen beurteilt. Bei einer Konfluenz von 80% bei mittlerer Kulturflaschengröße (entspricht ca. 2×10^6 Zellen) wurden die Gliomzellen gesplittet. Zuerst wurde das Medium (DMEM; 10% FCS; 1% P/S) abgesaugt, anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 5 ml sterilem PBS – Puffer und vorsichtiges Schwenken der Kulturflasche gewaschen. Nach dem erneuten

Absaugen wurde der Monolayer durch Zugabe von 2 – 2,5 ml einer 0,5 % Trypsin/EDTA – Lösung trypsinisiert. Die Kulturflasche wurde dabei vorsichtig geschwenkt, damit alle Zellen von der Lösung bedeckt wurden. Nach einer Minute Inkubationszeit im Brutschrank bei 37° C wurde zum Lösen der adhärenen Zellen vorsichtig gegen die Kulturflasche geschlagen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 ml Medium gestoppt und die gelösten Zellen wurden zum Abzentrifugieren in ein 50 ml Falcon®-Röhrchen überführt (1300 rpm, RT, 7 min.). Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen in entsprechender Menge Medium resuspendiert (z.B. beim Splitten von 1:5 in 5 ml Medium). Danach wurde jeweils 1 ml Zellsuspension in je eine Kulturflasche mit 20 ml Medium vorgelegt. Nach dem Schwenken der Flasche zum gleichmäßigen Verteilen der Zellsuspension wurden sie für 3 – 4 Tage bei 37° C inkubiert.

2.3.3 Wegfrieren und Auftauen von Gliomzellen

Zum Einfrieren wurden die adhärenen Zellen (siehe 2.3.1) trypsinisiert (Inkubation 1 Minute in 0,5 % Trypsin/EDTA – Lösung bei 37° C), zwei-mal in PBS gewaschen und anschließend abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Tumorzellen in 5 ml eiskalter Einfrierlösung (FCS; 10% DMSO) aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und auf 5 Einfrier Röhrchen (Tubes) mit jeweils 1 ml der Zellsuspension verteilt. Aufgrund der ausgeprägten Zelltoxizität der DMSO – Lösung mussten die Tubes sofort in Propanolbehälter (Nalgene Mr. Frosty™ Cryo Freezing Container, USA) (zum langsamen Einfrieren) in Einfrierkontainer bei -80° C überführt werden. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Tumorzellen im flüssigen Stickstoff gelagert.

Im Gegensatz zum langsamen Einfrieren müssen die tiefgefrorenen Zellen aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit gegenüber dem DMSO im Einfriermedium schnell aufgetaut werden. Nach der Entnahme aus dem Stickstofftank wurden die Kryotubes rasch bei 37° C im Wasserbad (Memmert GmbH, Deutschland) erwärmt. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium auf Kulturflaschen verteilt.

2.3.4 Vorbereitung der Tumorzellen für Implantation

Wie in 2.3.1 beschrieben, wurden die Tumorzellen kultiviert. Anschließend wurde die Zellzahl ermittelt (siehe 2.3.4.1). Die Zellzahl wurde durch Verdünnen mit PBS auf 2×10^4 / μl eingestellt. 2×10^4 lebende GL261 – Tumorzellen sollten intrazerebral implantiert werden. Bis zur eigentlichen Implantation wurden die Tumorzellen auf Eis gelegt, da bei solcher Lagerung ein Sterben der Zellen minimiert wird. Grundsätzlich sollte die Implantation zügig erfolgen.

2.3.4.1 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer – Zählkammer

Für die Implantation einer definierten Menge an Tumorzellen musste deren Anzahl bestimmt werden. Die Zellzahlermittlung wurde manuell mittels Lichtmikroskopie in der Neubauer – Zählkammer (neoLab, Heidelberg) durchgeführt. Nach dem Kultivieren der Tumorzellen (siehe 2.3.1) wurden die Zellen trypsinisiert (siehe 2.3.2) und anschließend in PBS 2 – 3-mal gewaschen. Das abzentrifugierte und abpipettierte Zellpellet wurde nun in 1 ml PBS aufgenommen. 10 μl der resuspendierten Zellen wurden in 90 μl Trypan Blau Lösung (2% Trypan Blau, GIBCO™, Invitrogen Corporation, UK) 1:10 verdünnt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach der Formel:

$$\text{Zellzahl / ml} = (\sum n / 2) \times F \times 10^4$$

$\sum n$ – Summe der Zellzahl in zwei Quadranten der Neubauer – Zählkammer

F – Verdünnungsfaktor (1:10)

2.4 Aufarbeitung und Analyse der Gehirne

2.4.1 Herstellung von Gehirnschnitten mittels Kryotomie

Das gefrorene Gewebe wurde aus dem Tiefkühlfach entnommen und in den Innenraum des Kryotoms (Microm, HM560) mit der Innentemperatur von mindestens -16° C für eine halbe Stunde zum Temperatúrausgleich gelegt. Das an die Umgebungstemperatur adaptierte Gehirn wurde nun mit dem Kleinhirn auf dem Präparathalter platziert und mittels TissueFreezing-Mediums® (Leica Microsystems Nussloch GmbH) eingebettet. Nach der Befestigung des eingebetteten Hirngewebes am Kryostat wurden 10 µm dicke Gewebeschnitte für die Fluoreszenzmikroskopie und 20 µm dicke Gewebeschnitte für die Konfokalmikroskopie angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend auf beschichtete Objektträgern (SuperFrost®Plus, R. Langenbrinck, Deutschland) gelegt, um während der Anfärbung eine bessere Haftung zu erreichen. Auf jedem der Objektträger wurden drei Schnitte aus jeweils unterschiedlicher Schnitttiefe des Tumorareals aufgebracht. Die Anwesenheit des Tumorareals in den Schnitten wurde intermittierend während des Schniedens mit Hilfe der Hämatoxylin/Eosin – Färbung (siehe 2.4.2.8) kontrolliert. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Zum Aufbewahren wurden die angefertigten Kryostatschnitte in den Objektträgerboxen (HS, China) bis zum weiteren Gebrauch bei - 20° C aufbewahrt.

2.4.2 Immunhistochemie

2.4.2.1 Verwendete Antikörper

Für die immunhistochemische Untersuchungen wurden folgende primäre und sekundäre Antikörper sowie nukleäre Farbstoffe verwendet (Tab. 4).

Tabelle 4: Primäre Antikörper.

Name	Spezies	Verdünnung	Marker	Hersteller
Anti – Iba1	Ziege	1:100	Mikroglia	Abcam
Anti – Iba1	Kaninchen	1:250	Mikroglia	Wako
Anti – CD31	Ratte	1:50	Gefäßendothel	BD
Anti – Hif1α	Kaninchen	1:100	Hypoxie	Abcam
Anti - αSMA/Cy3	Maus	1:200	Perizyten	Sigma
Anti – Desmin	Kaninchen	1:100	Perizyten	Abcam
Anti – CD34	Kaninchen	1:50	Knochenmark- stammzellen	Santa Cruz
Anti – CD144	Kaninchen	1:200	Endothelzellen	Santa Cruz
Anti – VEGFR3	Kaninchen	1:200	Lymphgefäß- endothel	Santa Cruz
Anti - αSMA	Kaninchen	1:100	Perizyten	Abcam
Anti – NG2	Kaninchen	1:200	Perizyten	Millipore

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper.

Name	Spezies	Verdünnung	Absorption/Emission (nm)	Hersteller
Cy 3	Esel-anti-Ratte IgG	1:200	550/570	Dianova
Cy 3	Esel-anti- Kaninchen IgG	1:200	550/570	Dianova

DyLight 488	Esel-anti-Ziege IgG	1:200	493/518	Jackson Immuno Research
DyLight 488	Esel-anti- Kaninchen IgG	1:200/1:400	493/518	Jackson Immuno Research
DyLight 549	Esel-anti-Ziege IgG	1:200	555/568	Jackson Immuno Research
DyLight 549	Esel-anti- Kaninchen IgG	1:200/1:400	555/568	Jackson Immuno Research
DyLight 649	Esel-anti- Kaninchen IgG	1:200	652/670	Jackson Immuno Research
DyLight 649	Esel-anti-Ziege IgG	1:200	652/670	Jackson Immuno Research
Alexa 350	Esel-anti-Ziege IgG	1:200	346/442	Life Techn.
AMCA	Esel-anti- Kaninchen IgG	1:50	350/450	Dianova
AMCA	Esel-anti-Ziege IgG	1:50	350/450	Dianova

Tabelle 6: Nukleäre Färbungen.

Name	Absorption/Emission (nm)	Funktion	Hersteller
DAPI	365/480	Kerndarstellung	Dianova
To-Pro®-3	642/661	Kerndarstellung	Invitrogen
ApopTag® Red <i>in situ</i>	540/550	Apoptotische Kerne	Millipore
ApopTag® Fluorescein <i>in situ</i>	490/520	Apoptotische Kerne	Millipore
Click-iT®TUNEL Alexa 488	495/519	Apoptotische Kerne	Invitrogen

2.4.2.2 Immunfärbung an Kryostatschnitten

Die Immunfärbung wurde an mit 4% PFA-fixierten, 10 µm bzw. 20 µm dicken Kryostatschnitten durchgeführt, bei der alle Inkubationsschritte in einer Feuchtkammer ohne Lichtexposition erfolgten. Die Negativkontrolle zum Ausschluss unspezifischer Antikörperbindungen erfolgte jeweils durch Zugabe des Sekundärantikörpers ohne Verwendung des Primärantikörpers. Nach der Entnahme der Kryostatschnitte auf speziell beschichteten Objektträgern aus -80 °C Kühlaggregaten wurden diese über 10-15 min. luftgetrocknet. Jeder Schnitt auf dem Objektträger wurde mit dem speziellen Dako – Fettstift umkreist und in PBS, pH 7,4, 10 min. auf einem Schüttler (neoLab®) gewaschen. Danach wurden die Schnitte in einer Lösung (0,5% Casein / PBS) zur Blockierung unspezifischer Antigenbindungsstellen über 30 min. bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Nach dem Blockierungsschritt wurden die Kryostatschnitte mit primären Antikörpern, die entsprechend in einer 0,5% Casein / PBS – Lösung verdünnt wurden (siehe 2.4.2.1), zwei Stunden bei RT inkubiert. Dabei wurden 80 – 100 µl primärer Antikörperlösung auf jeden Schnitt mit einer Pipette (Eppendorf PhysioCare) so aufgetragen, dass es

sich ein dicker Tropfen über dem Kryostatschnitt bildete, ohne die markierte Grenze (durch den Fettstift) zu überschreiten. Nach dem Ausschütteln der primären Antikörperlösung wurden die Schnitte in einer Küvette in 0,5% Casein / PBS – Lösung 5 min. ausgespült. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen wurden die Schnitte zweimal á 5 min. in 0,5% Casein / PBS – Lösung gewaschen. Anschließend wurde die Sekundärantikörperlösung in entsprechender Verdünnung (ca. 80 – 100 µl pro Schnitt) auf die Kryostatschnitte aufgetragen und für eine bis zwei Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde das Sekundärantikörpergemisch ausgeschüttelt. Die Kryostatschnitte wurden mit PBS ausgespült, zweimal mit PBS und einmal mit Millipore® - Wasser (Millipore A10TOC Monitor, SDS 200 Tank and Pump) jeweils 5 min. lang bei RT in einer Küvette auf dem Schüttler und unter Lichtschutz (durch Alufolie) gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellkerne gefärbt (DAPI oder To-Pro®-3). Nach Eindeckung mit DAPI oder PI (bei der Zellkerndarstellung mit To-Pro®-3 (1:10000 in PBS) wurden die gefärbten Kryostatschnitte mit Deckgläschen versehen, ca. 30 min. luftgetrocknet und mittels des durchsichtigen Nagellacks am Rand des Deckgläschen zum Luftausschluss verschlossen. Am gleichen bzw. am nächsten Tag wurden die gefärbten Kryostatschnitte umgehend unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Observer Z.1) untersucht und fotografiert. Die Aufbewahrung der Schnitte erfolgte bis zum weiteren Gebrauch bei 4° C in einer lichtundurchlässigen Box.

2.4.2.3 Permeabilisierung von Kryostatschnitten mittels ARR (Antigen Retrieval Reagent Universal, R&D)

Zur besseren Darstellung der Mikroglia mittels des Primärantikörpers Iba1 aus der Ziege wurde das spezielle wärmeinduzierte Permeabilisierungssystem (ARR) verwendet. Dazu wurde die 10 – fache ARR – Stocklösung in Millipore® - Wasser 1:10 verdünnt. Danach wurde in eine Glasküvette 63 ml Millipore® - Wasser mit 7 ml der verdünnten ARR – Lösung beigemischt. Die Glasküvette mit der hergestellten Lösung wurde in ein größeres, mit einem Drittel Wasser gefülltes Zylinderglas gestellt und auf der Heizplatte platziert. Mit dem in der Glasküvette platzierten Glasthermometer wurde die Temperatur der Lösung überwacht. Beim Erreichen der Temperatur von 94,5° C wurden die Objektträger mit vorher luftgetrockneten

Kryostatschnitten darauf in die Lösung eingetaucht und 30 Sekunden lang gekocht. Danach wurden die Kryostatschnitte sofort in die Blocklösung (0,5% Casein / PBS) für 30 min. überführt. Anschließend wurde das in 2.4.2.2 beschriebene Protokoll zum Anfärben von Kryostatschnitten verwendet.

2.4.2.4 ApopTag® Red (Fluorescein) *in situ* – Kit Methode

Die ApopTag® – Technologie zur Darstellung von apoptotischen Zellkernen basiert auf der sogenannten TUNEL – Methode (z.B. Click-iT® TUNEL). Dabei werden die ein – und doppelsträngigen DNA – Brüche (DNA 3´- OH Endigungen) im Kern der apoptotischen Zelle detektiert, bevor noch diese Zelle ein typisches morphologisches Bild der Apoptose zeigt. Die normalen oder proliferativen Zellen haben im Gegensatz zu apoptotischen Zellen eine nicht signifikante Anzahl an solchen DNA 3´- OH Endigungen. Es ist trotzdem wichtig, die mit ApopTag® positiv gefärbten Zellkerne auf ihre Morphologie zu untersuchen, um vor allem nekrotische von den apoptotischen Zellen zu unterscheiden (z.B. Vorhandensein von apoptotischen Körpern, Deletion von einzelnen Zellen bei der Apoptose).

Da die Benutzung von Click-iT® TUNEL ein starkes Hintergrundbild lieferte, wurde die Alternativmethode ApopTag® mit erfolgreicher Darstellung der apoptotischen Zellkerne verwendet.

Das Prinzip dieser Methode (Abb. 8) besteht in einer Bindung von Nukleotidtriphosphaten (dNTP, im Reaktionspuffer) mithilfe von terminaler Desoxynukleotidyl – Transferase (TdT – Enzym) an die 3´- OH Endigungen der ein- und doppelsträngigen DNA einer apoptotischen Zelle (Abb. A und B). Die dNTPs beinhalten das Desoxygenin, an welches der Anti – Desoxygenin – Antikörper bindet (Abb.8, C). Dieser Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Rhodamin oder Fluorescein) conjugiert, was letztendlich die Detektion der Bindungsstellen mittels eines Fluoreszenzmikroskops ermöglicht (Abb. 8, D).



Abb. 8: Darstellung der ApopTag® Methodik (Bildmaterial: www.chemicon.com).

Die mit 4% PFA perfundierten Kryostatsschnitte wurden aus dem Tiefkühlfach entnommen und an der Luft bei RT getrocknet. Danach wurden die Schnitte zweimal in PBS für jeweils 5 min. gewaschen und für 5 min in einer vorgekühlten Ethanol / Essigsäure – Lösung (2:1 miteinander vermengt) bei -20° C in einer Küvette inkubiert. Daraufhin erfolgte wiederholt der zweimalige Waschvorgang in PBS für jeweils 5 min. Als nächstes erfolgte die Inkubation der Kryostatsschnitte im Equilibrationspuffer (einer der Komponenten im ApopTag® Kit) für 10 Sekunden ($75\mu\text{l}$ des Puffers pro Kryostatsschnitt). Nach Ausschütten des Equilibrationspuffers wurde den Kryostatsschnitte das TdT – Enzym beigemischt ($55\mu\text{l}$ des Enzyms pro Kryostatsschnitt) und über einer Stunde bei 37° C in einem Brutschrank inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Kryostatsschnitte aus dem Brutschrank entnommen, die TdT – Enzymlösung ausgeschüttet und die Schnitte in einer Küvette mit dem Stopp / Wasch – Puffer (fertige Lösung im ApopTag® Kit) unter ständiger Bewegung auf dem Schüttler für 10 min. bei RT eingetaucht. In dieser Zeit wurde die benötigte Menge des Anti – Digoxigenin – Konjugates unter Lichtschutz und bei RT aliquotiert. Anschließend wurden die Kryostatsschnitte dreimal für eine Minute in PBS, pH 7,4 gewaschen und mit dem Anti – Digoxigenin – Konjugat für 30 min. unter Lichtprotektion bei RT inkubiert ($65\mu\text{l}$ des Konjugats pro Kryostatsschnitt). Nach dem Auswaschen des Anti – Digoxigenin – Konjugates wurden die Kryostatsschnitte viermal in PBS für jeweils 2 min. gewaschen und die weiteren Primär- bzw. Sekundärantikörper wurden, wie es in 2.4.2.2 beschrieben ist, zugegeben.

2.4.2.5 Darstellung der Mikroglia im Tumor

Zur Darstellung von ansässigen Mikroglia wurde eine Immunfärbung mit anti-Iba1-Antikörper durchgeführt (siehe 2.4.2.1). Um die ansässigen Mikroglia von den aus dem Knochenmark eingewanderten Makrophagen zu unterscheiden, wurden die letzten GFP – markiert (S. Brandenburg, A. Müller).

Die Auswertung der Iba1 – positiven Zellen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie bei 10- und 20-facher Vergrößerung sowie mittels Konfokalmikroskopie (Zeiss, Axio LSM 700) bei 40-facher Vergrößerung.

2.4.2.6 Analyse der Hif-1 α Expression

Hypoxie-induzierter Faktor (HIF) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Versorgung der Zelle mit Sauerstoff reguliert. HIF besteht aus einer labilen α -Untereinheit (drei Isoformen) und einer β -Untereinheit. In dieser Arbeit wurde das Isoenzym Hif-1 α (siehe Tab.1) zur Darstellung von hypoxischen Zellen im Tumor verwendet. Dazu wurden Doppel- (z.B. Iba1 und Hif-1 α) sowie Trippelimmunfärbungen (Iba1, Hif-1 α , ApopTag®) etabliert, um vor allem die Aktivität der Mikroglia im Tumor zu untersuchen. Die Analyse erfolgte sowohl an einem Fluoreszenz- (10- bis 20-fache Vergrößerung), als auch Konfokalmikroskop (40-fache Vergrößerung).

2.4.2.7 Immunhistochemie mit CD31, α SMA und Desmin zur Darstellung von Gefäßendothel und von Perizyten

Die Verwendung von Doppelimmunfärbung mit CD31 und α SMA diene grundsätzlich nicht nur der Darstellung von gefäßassoziierten Zellen, sondern auch der Beurteilung der Gefäßmorphologie und Gefäßreife im Tumor. Diese Gefäßdifferenzierung stellte die Basis für weitere Auswertungen in dieser Arbeit dar (vor allem von gefäßassoziierten Mikroglia/Makrophagen).

Die zusätzliche Darstellung von Desmin im Tumor (Trippelfärbung) diene zur Unterscheidung von unterschiedlichen Typen von Perizyten auf der einen Seite, auf

der anderen Seite von aus der Peripherie eingewanderten mesenchymalen Zellen im Tumor.

Die Analyse und Auswertung von gefäßassoziierten Mikroglia/Makrophagen erfolgte nach Bildaufnahme mittels Fluoreszenzmikroskopie bei 20-facher Vergrößerung mithilfe einer Software zur statistischen Analyse ImageJ (Version 1.47). Die Zählung von Iba1⁺-Zellen erfolgte manuell durch Zellzählung. Die Ergebnisse der Zellzählung wurden mittels Excel-Programm (Microsoft, 2004) statistisch ausgewertet.

2.4.2.8 Experimentelle vierfache Immunfärbung an Kryostatschnitten

Zum Verständnis des komplexen Bildes der Antigenverteilung und der Gewebeverhältnisse im Tumor wurde eine experimentelle vierfache Immunfärbung (Iba1, Desmin, CD31, α SMA) mit konventioneller histologischer Färbung mittels Hämatoxylin / Eosin kombiniert (Abb. 11). Hierzu wurden die luftgetrockneten Kryostatschnitte für drei Minuten in Hämatoxylin – Lösung und nach dem Abspülen für 30 Sekunden in Eosin – Lösung eingetaucht. Danach erfolgte eine Dehydrierung der Gewebeschnitte in aufsteigender Ethanolreihe und eine erneute Rehydrierung in Xylol (Roth). Anschließend wurden die Kryostatschnitte nach dem allgemeinen Protokoll (siehe 2.4.2.2) angefärbt.

2.5 Konfokalmikroskopie

Bei der Analyse der Co-Lokalisation von Mikroglia/Makrophagen mit Endothelzellen bzw. mit Perizyten wurden mit Hilfe eines Konfokalmikroskops pro Schnitt mehrere Bilder vom kompletten Tumorgebiet sowie von der Tumorperipherie (eine Strecke von 100 μ m ab dem Tumorrand) aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit einer 40-fachen Vergrößerung in 10 Schichten (Slices) durchgeführt. Die Bilder der maximalen Projektion wurden in dieser Arbeit präsentiert.

2.6 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwerte mit jeweils Standardabweichung angegeben. Zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurde der ungepaarte doppelseitige t-Test verwendet, wobei die Berechnung mittels Excel (Microsoft) erfolgte. Werte mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Interaktion der Mikroglia/Makrophagen mit Tumorblutgefäßen

Die Vaskularisierung und das invasive Wachstum von Glioblastomen ist das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels zwischen rasch proliferierenden und migrierenden Tumorzellen, stetem Umbau der extrazellulären Matrix des Wirtsgewebes, hypoxischen Konditionen im Tumorgebiet und kontinuierlicher mikrovaskulärer Proliferation. Aktuell wird die Rolle von immunkompetenten Zellen in der Tumorbiologie stark diskutiert. Einige Arbeiten berichten über den Bezug von den Zellen des Immunsystems zur Modulation der Blutgefäßbildung, des Blutgefäßphänotyps sowie der Blutgefäßfunktion [75; 76]. Frühere Studien weisen darauf hin, dass Mikroglia/Makrophagen – System eine wichtige Rolle in der physiologischen sowie in der pathologischen Angiogenese spielen könnte [77; 78]. Dabei wird immer wichtiger die Fähigkeit der Zellen des Immunsystems, zu welchen die Mikrogliazellen ebenfalls gehören, im pathologisch veränderten Gewebe die pro – angiogenen Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) zu produzieren [79]. Das Glioblastom zeichnet sich zusätzlich durch eine starke Hypoxie aus, was die Migration von aktivierten Mikroglia/Makrophagen zu neoplastisch verändertem Gewebe induziert [80]. Es ist beschrieben worden, dass die Zellen des Monozyten/Makrophagen – Systems durch Produktion von angiogenen Wachstumsfaktoren und Matrixmetalloproteasen (MMP) die Angiogeneseaktivität im Tumor verstärken und modulieren können [81; 82].

Bei in dieser Arbeit verwendetem syngenen Tumormodell handelte es sich um Gliome, die durch eine stereotaktische, intrazerebrale Implantation muriner GL261 – Zelllinie in die Wirtshirne von C57BL/6 – Mäusen induziert worden waren. Nach der Entnahme der PFA – fixierten Hirngewebe wurden die Explantate eingefroren. Anschließend wurden Kryoschnitte angefertigt. Nach der immunhistochemischen Aufbereitung der Hirnschnitte mit darauf folgender Identifizierung des Tumoreals wurden die Grenzen des Tumors festgelegt. Als Rand des Tumors wurde die Grenze entlang der letzten großen akkumulierenden Gliomzellkerne, betrachtet im DAPI – Kanal, bestimmt. Als direkte Tumorperipherie wurde der Bereich von 100 µm ab dem

Tumorrand bis in das Hirnparenchym, entlang des kompletten Tumorgewebes ebenso im DAPI – Kanal definiert. Solche Aufteilung des Tumorimplantationsgebiets wurde in unserer Arbeitsgruppe als Standard für alle Experimente festgelegt. Diese Aufteilung könnte außerdem zum Verständnis des Wachstumsmusters des Glioms beitragen.

In den früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde bereits festgestellt, dass bis zu einem Fünftel aller Tumorblutgefäße mit zwei oder mehreren Mikrogliazellen/Makrophagen assoziiert waren. Im Zuge dieser Arbeit soll nun diese Assoziation näher analysiert werden.

Um die Rolle der Mikroglia in einem komplexen System mit Schwerpunkt der direkten mikroglialen Gefäßinteraktion zu untersuchen, wurden die relevanten Bestandteile der Gefäßarchitektur, wie Endothelzellen und Perizyten, dargestellt.

3.1.1 Auswahl des Markers für die Perizyten – Analyse

Um eine genauere Charakterisierung der Mikroglia – Tumorgefäß – Interaktion durchführen zu können, musste zuerst geklärt werden, welcher Perizyten – Marker verwendet werden soll. Denn vorrangig sollte ermittelt werden, ob Mikroglia eher mit Endothelzellen oder Perizyten in Kontakt stehen. Die Gefäßendothelzellen wurden stets mit CD31 als Marker dargestellt. Zur Visualisierung von gefäßassoziierten Perizyten im Tumorgewebe wurden zwei Marker α SMA und Desmin miteinander verglichen. Der Marker α SMA zeigte eine strenge Assoziation mit der Gefäßwand (Abb. 9 A). Somit eignete sich dieser Marker zur Darstellung von gefäßassoziierten Perizyten. Im Vergleich zur Normalanatomie der Gefäßwand fanden sich bei den Tumorblutgefäßen deutlich hypertrophierte Perizyten, teilweise ohne engen Kontakt zum Gefäßendothel.

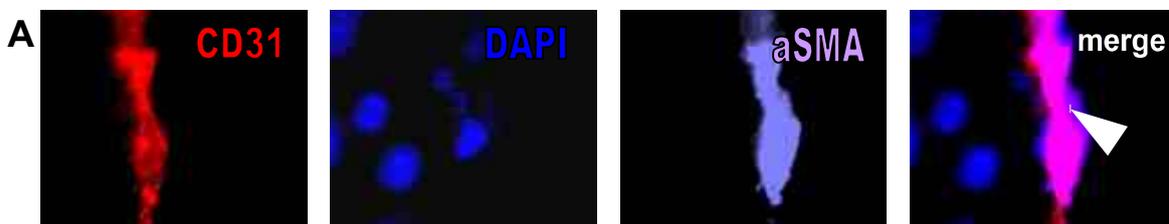
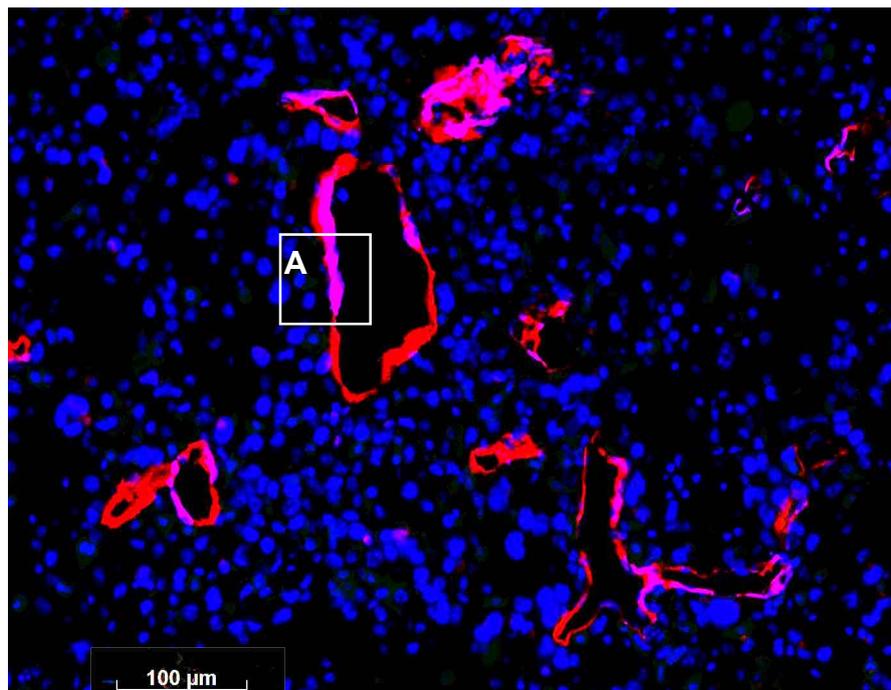


Abb. 9: α SMA⁺ - Zellen sind streng mit Tumorblutgefäßen assoziiert. α SMA⁺ - Zellen zeigten im Tumorgewebe engen Kontakt mit Endothelzellen (A). Tag 21 nach der GL261-Implantation.

Als nächster potentieller Marker zur Darstellung von Perizyten wurde Desmin getestet. Wie erwartet, standen Desmin⁺ - Zellen in Kontakt mit Blutgefäßen (Abb. 10 B). Die gefäßassoziierten Desmin⁺ - Zellen fanden sich in der unmittelbaren Nähe zu den Gefäßendothelzellen und zeigten ein typisches histologisches Muster von Desmin mit prolongierten, ausgezogenen Ausläufern. Da Desmin zu den Intermediärfilamenten Typ III gehört, handelt es sich bei diesem Protein um ein seilartiges Filament, welches durch spezifische Proteine zu größeren Bündeln verbunden ist [83]. Überraschend, dass einzelne Desmin⁺ - Zellen im Tumorgewebe ohne Kontakt zu Blutgefäßen detektiert wurden (Abb. 10 A). Die detektierten Desmin⁺ - Zellen ohne Kontakt zu Blutgefäßen zeigten aber eine ganz andere Form

der Desminproduktion. Diese morphologisch kugelförmige Desmin⁺ - Zellen sind nur im Tumorgewebe anzutreffen.

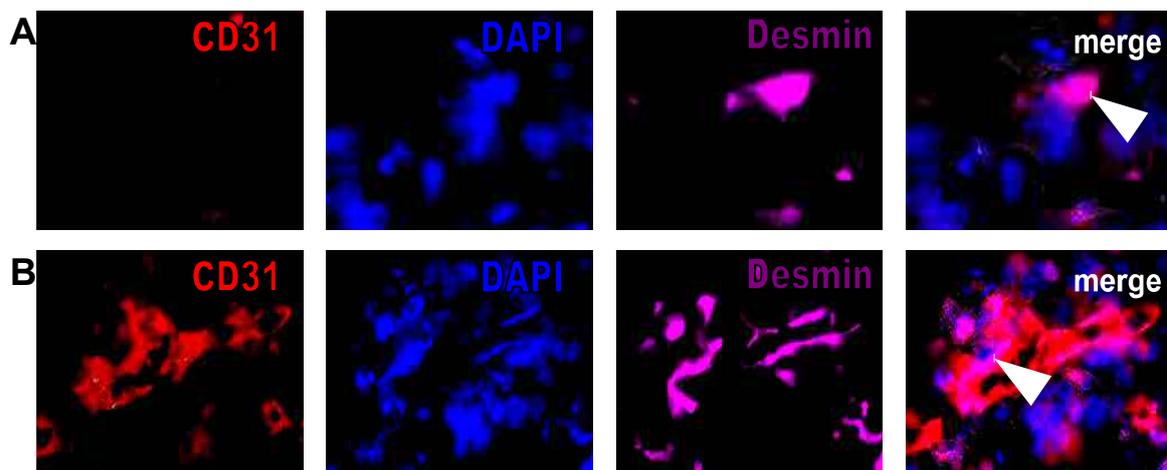
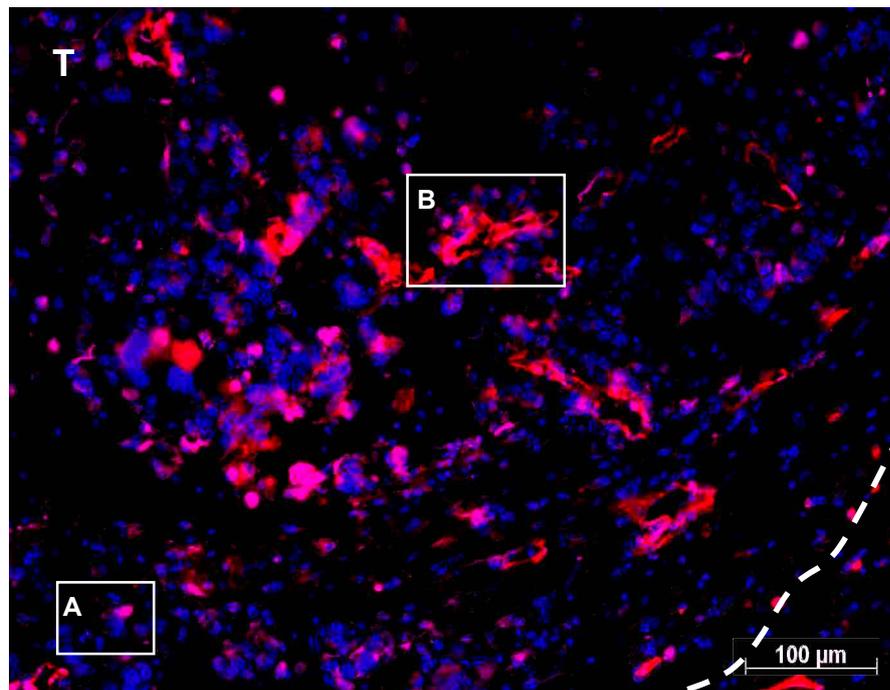


Abb. 10: Desmin⁺ – Zellen sind im Tumorgewebe sowohl in Kontakt mit Blutgefäßen als auch vereinzelt zu finden. Isoliert vorliegende Desmin⁺ – Zellen (A, Pfeil). Ein Teil der Desmin – positiven Zellen waren mit Tumorblutgefäßen assoziiert (B, Pfeil). Tumor (T), Tumorgrenze (gestrichelte Linie). Tumorprogression, Tag 21.

Zur Unterscheidung zwischen einzelnen Populationen von Perizyten im Tumorgewebe wurde eine kombinierte vierfache Immunfluoreszenzfärbung etabliert

Diese Co – Färbung beider Perizytenmarker machte deutlich, dass es sowohl α SMA⁺ - Zellen als auch α SMA⁺ Desmin⁺ doppelt gefärbte Zellen gibt (Abb. 11).

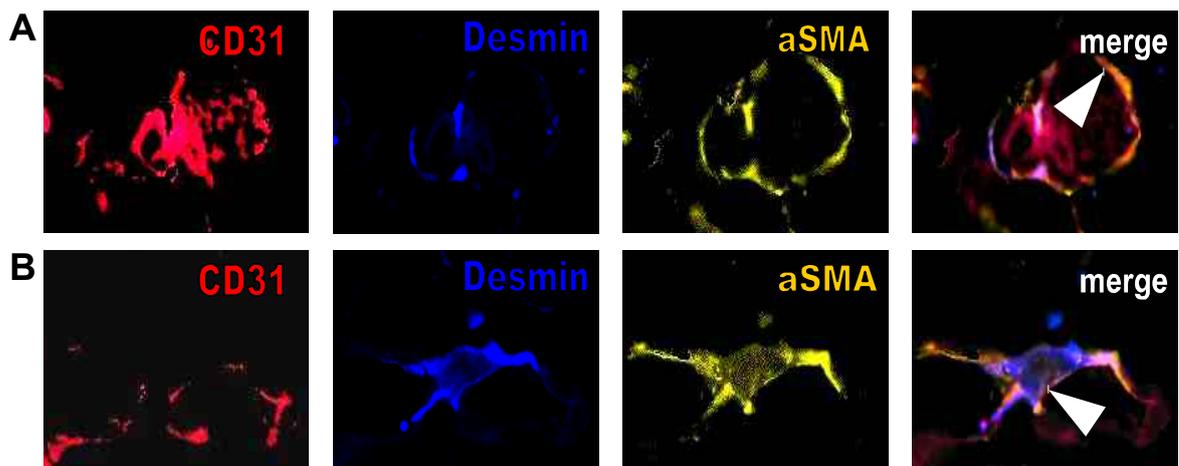
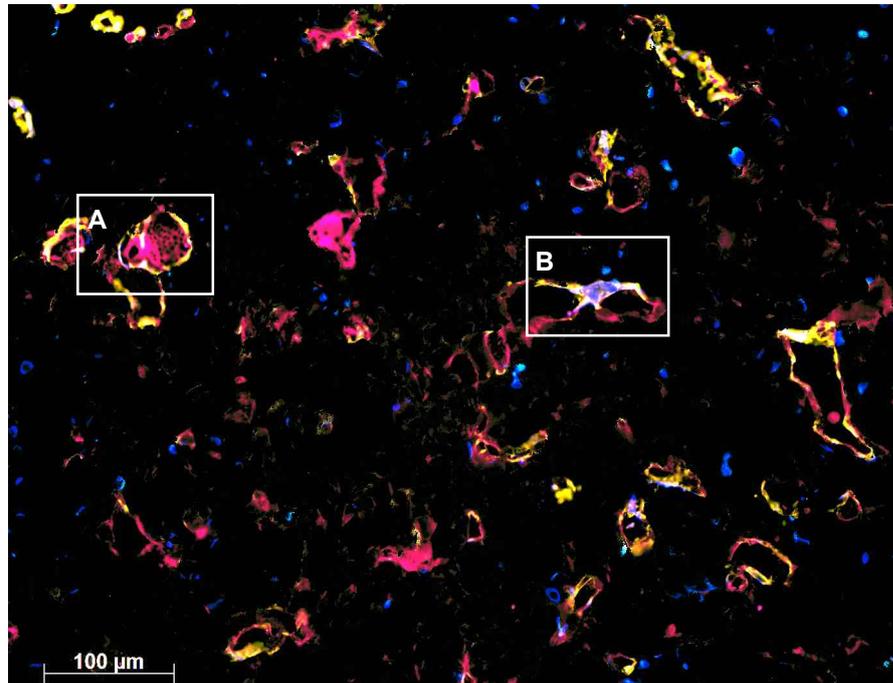


Abb. 11: Darstellung von zwei wesentlichen Populationen der Perizyten im Glioblastom. Die α SMA⁺ – Zellen waren ausschließlich mit Blutgefäßen assoziiert (A, Pfeil). Ein Teil von α SMA⁺ – Zellen zeigte eine Desminexpression (B, Pfeil). Tumorwachstum, Tag 21.

Aufgrund des unerwarteten Expressionsmusters wurde Desmin für die Darstellung der Perizyten ausgeschlossen, da es fraglich war, worum es sich bei den Desmin⁺-Zellen ohne Kontakt zu Blutgefäßen handelt (Abb. 10 A).

3.1.2 Mikroglia/Makrophagen interagieren vorrangig mit Endothelzellen von Tumorblutgefäßen

Zur Untersuchung von der Interaktion der Mikroglia/Makrophagen mit Zellen der Gefäßwand im Tumor wurden Mikroglia/Makrophagen via Iba-1, das Gefäßendothel via CD31 und die Perizyten via α SMA gemeinsam dargestellt (Abb. 12). Es zeigte sich eine stark verzweigte Architektur der Makrogefäße im Tumor (Abb. 12). Das Gefäßendothel stellte sich ummantelt durch eine diskontinuierliche Zellschicht von Perizyten dar (Abb. 12 B, linker Pfeil). Die Mikroglia/Makrophagen befanden sich sowohl mit Endothelzellen als auch mit Perizyten in Kontakt (Abb. 12 A und B, Pfeile).

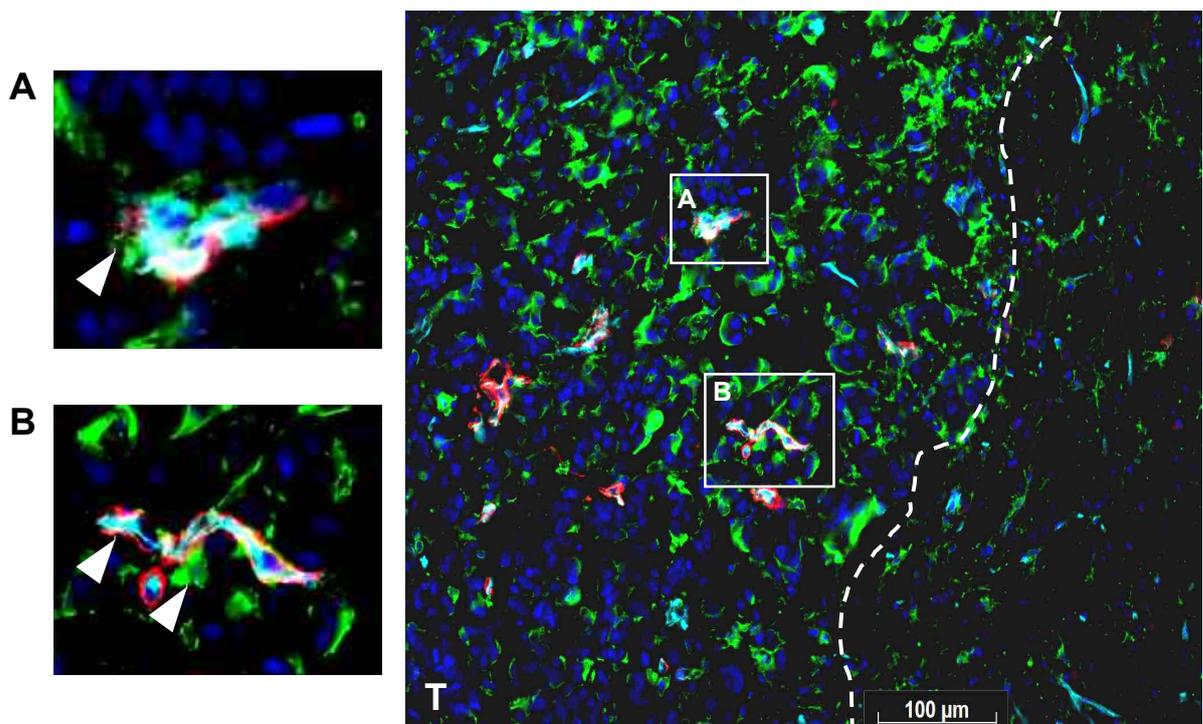


Abb. 12: Darstellung von Kontaktstellen der Mikroglia/Makrophagen mit der Tumorgefäßwand. Ein Teil der Mikroglia war mit Endothelzellen (A), der andere Teil mit Perizyten (B, rechter Pfeil) assoziiert. Die Ummantelung des Endothels durch Perizyten (B, linker Pfeil). Tumor (T), Tumorrand (gestrichelte Linie). Tumorprogression, Tag 21.

Mit der Konfokalmikroskopie konnten die Kontaktstellen zwischen Mikroglia/Makrophagen und Zellen der Gefäßwand noch näher verdeutlicht werden (Abb. 13).

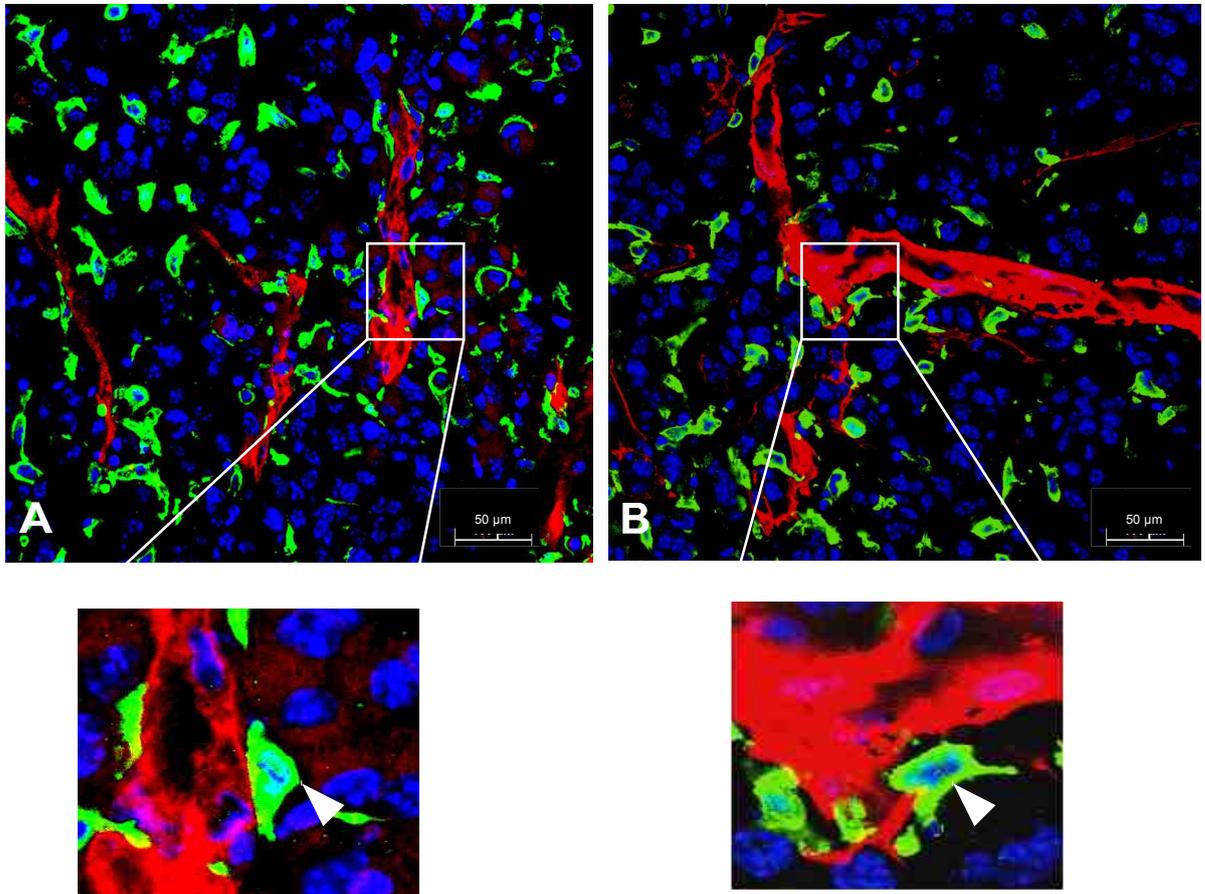


Abb. 13: Darstellung der Assoziation von Mikroglia/Makrophagen mit Endothelzellen (A) und Perizyten (B) in GL261-Tumoren mittels Konfokalmikroskopie. (A) Mikrogliazellen/Makrophagen gefärbt mit Iba-1⁺ (grün) zeigten Kontakt mit CD31⁺ - Endothelzellen (rot) des Tumors. (B) Zudem konnten Mikroglia/Makrophagen identifiziert werden, die direkt mit Perizyten (αSMA, rot) assoziiert waren. Kontaktierende Mikrogliazellen/Makrophagen sind mit Pfeilen markiert. To – Pro (blau) Tumorwachstum, Tag 21.

Für die statistische Auswertung der Assoziationsrate der Mikroglia/Makrophagen mit den Zellen der Gefäßwand wurde die kombinierte Immunfluoreszenzfärbung Iba-1,

CD31, α SMA verwendet. Zu jedem Zeitpunkt des Tumorwachstums von 7, 14 und 21 Tagen wurden vier Mausgehirne (n=4) analysiert. Bei der Auswertung wurden nur die Makrogefäße berücksichtigt, deren Gefäßwand beide Zellpopulationen Endothelzellen und Perizyten aufwies. Für die Analyse wurden folgende Gruppen herangezogen: I. Mikroglia/Makrophagen, die nur mit Endothelzellen assoziiert waren, II. Mikroglia/Makrophagen, die nur mit Perizyten in Kontakt standen und III. Mikroglia/Makrophagen, die mit beiden Zellpopulationen interagierten.

Es wurden alle Mikroglia/Makrophagen gezählt, die mit vorher definierten Tumorblutgefäßen (siehe oben) in Kontakt standen und dann die prozentualen Anteile dieser ermittelt.

Die Auswertung der Untersuchungen zeigte, dass die Mikroglia/Makrophagen im Tumorareal vorrangig mit Endothelzellen in Kontakt standen (Abb. 14 A). Im zeitlichen Verlauf zeigte sich dabei keine wesentliche Änderung der mikroglialen Assoziationsrate mit Endothelzellen. Der Anteil mikroglialer Assoziation mit Perizyten fiel wesentlich geringer aus (Abb. 14 A).

Im Tumorrandgebiet wurden insgesamt nur wenige Makrogefäße mit α SMA⁺ - Zellen detektiert. Im Gegensatz zum Tumorareal zeigte sich im Tumorrand bei 7 Tage Tumoren eine hohe Assoziationsrate von Mikroglia/Makrophagen zu Perizyten, die mit der Tumorprogression abnahm (Abb. 14 B). Die Assoziation von Mikroglia/Makrophagen mit Gefäßendothelzellen nahm im zeitlichen Verlauf dagegen leicht zu. Am Tag 14 nach der Implantation zeigten die Mikroglia/Makrophagen eher Kontakt mit Endothelzellen. Die Interaktion von Mikroglia/Makrophagen mit Perizyten und Endothelzellen war im Tumorrandgebiet am Tag 21 des Tumorwachstums ausgeglichen (Abb. 14 B).

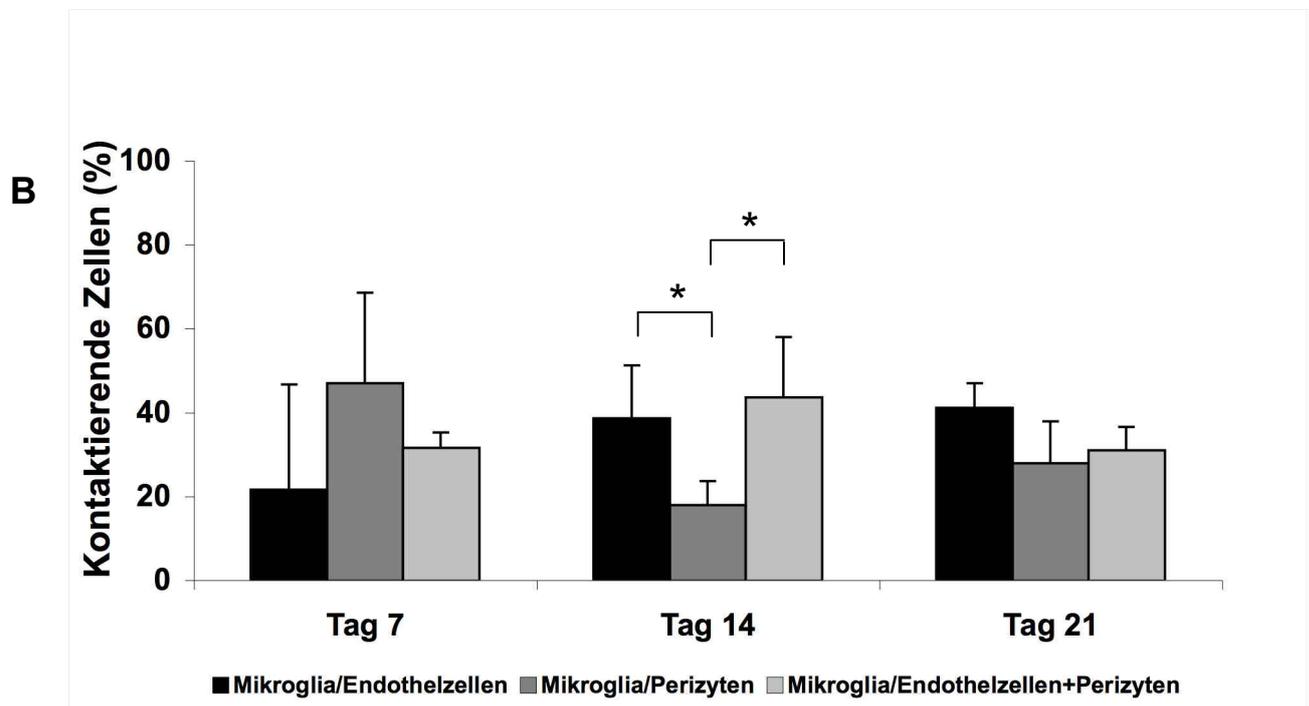
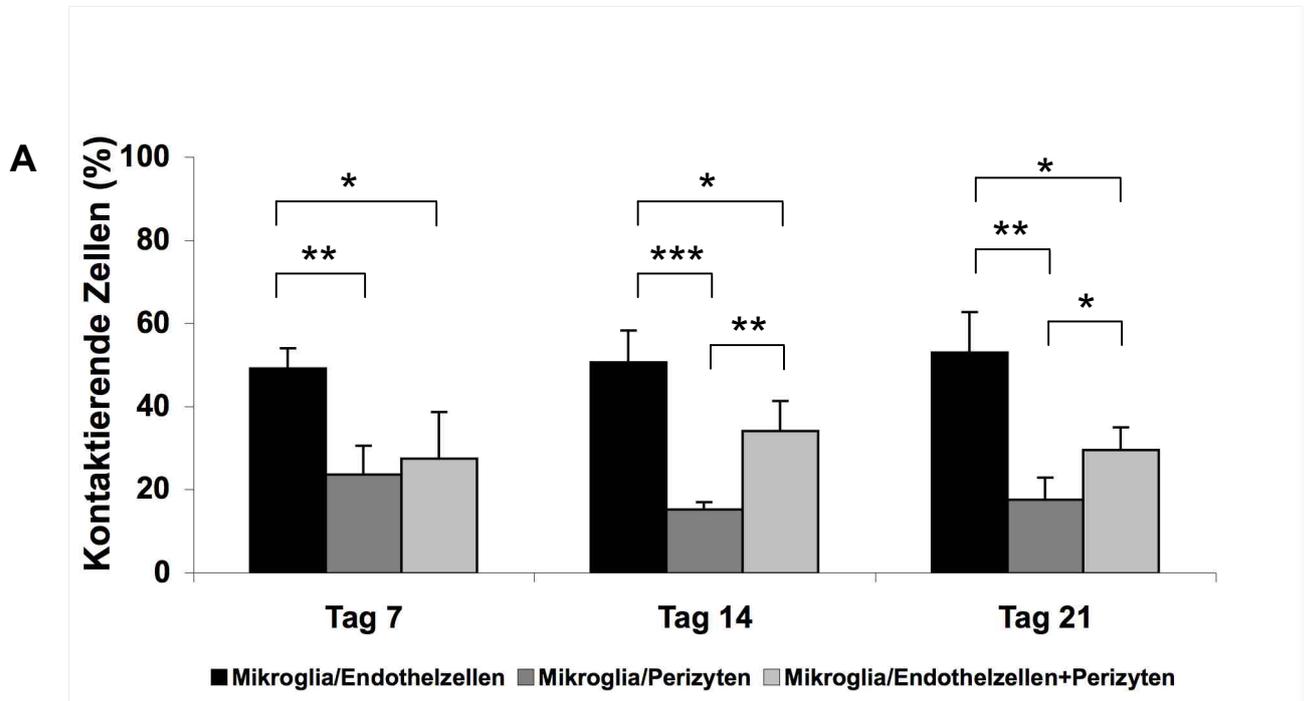


Abb. 14: Gefäß – assoziierte Mikroglia/Makrophagen in Abhängigkeit vom Zelltyp der Gefäßwand und der Tumorprogression. (A) Mikroglia/Makrophagen interagierten im Tumorareal vorrangig mit Gefäßendothelzellen. (B) Im Tumorrandgebiet waren Mikroglia/Makrophagen vorrangig mit Perizyten assoziiert (Tag 7). In Abhängigkeit von der Tumorprogression interagierten Mikroglia/Makrophagen zunehmend mit Gefäßendothelzellen (n=4). (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

3.1.3 Nähere Charakterisierung der Desmin⁺ - Zellen im GL261 Gliom

Da bei der Markersuche für Perizyten festgestellt wurde, dass Desmin⁺ - Zellen nicht nur in Kontakt mit Blutgefäßen gefunden wurden, sollten diese Zellen näher untersucht werden.

3.1.3.1 Iba-1⁺ - Zellen exprimieren Desmin

Es wurde eine vierfache Immunfluoreszenzfärbung etabliert und dabei konnten Desmin⁺ - Zellen identifiziert werden, die zum einen ein mikrogliales Expressionsprofil (Abb. 15 A, Pfeil) und zum anderen eine isolierte zelluläre Desminexpression ohne jeglichen Kontakt zu Blutgefäßen in Form einer eher kugeligen Struktur zeigten (Abb. 15, Pfeil). Einige Iba-1⁺ Desmin⁺ - Zellen zeigten engen Kontakt mit Tumorgefäßen (Abb. 15 A).

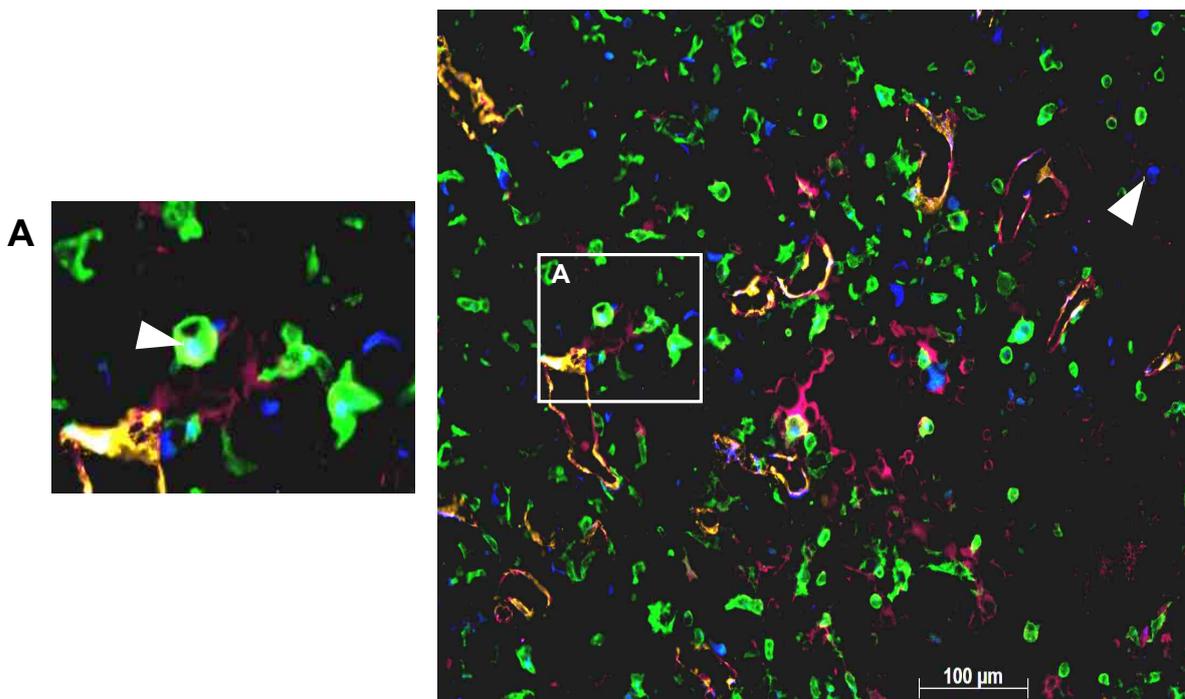


Abb. 15: Iba-1⁺ - Zellen exprimieren Desmin. (A) Detektierung von Iba-1⁺ Desmin⁺ - Zellen ohne Kontakt zu den Blutgefäßen (Pfeil). αSMA (orange), CD31 (magenta), Desmin (blau), Iba-1 (grün). Tumorprogression, Tag 21.

Um zu ermitteln, ob die residenten Mikroglia oder die eingewanderten Makrophagen Desmin exprimieren, wurden Gefrierhirnschnitte von Mäusen analysiert, deren Knochenmark nach einer Bestrahlung durch GFP⁺ - Blutzellen rekonstruiert wurde (experimentelle Durchführung: Annett Müller, Susan Brandenburg). Diese Mäuse erhielten ebenfalls GL261 Tumorzellen und wurden am Tag 21 des Tumorzellwachstums aus dem Versuch genommen. Da die in das Hirnparenchym eingewanderten Blutzellen (Monozyten) die Eigenschaft besitzen, das mikrogliale Antigen Iba-1 zu produzieren, ist es schwierig, diese von den residenten Mikroglia zu unterscheiden [58; 84]. Aufgrund der GFP – Markierung konnten nun die eingewanderten Monozyten/Makrophagen von den hirnsässigen Mikrogliazellen unterschieden werden. Überraschend zeigte sich keine monozytäre Desminproduktion im Tumorgebiet (Abb. 16 B, Pfeile). Die GFP⁺ Iba-1⁺ - Zellen konnten detektiert werden (Abb. 16 A, Pfeil). Dies bedeutet, dass entweder die Mikroglia Desmin exprimieren oder aber Perizyten mikrogliale Eigenschaften aufnehmen.

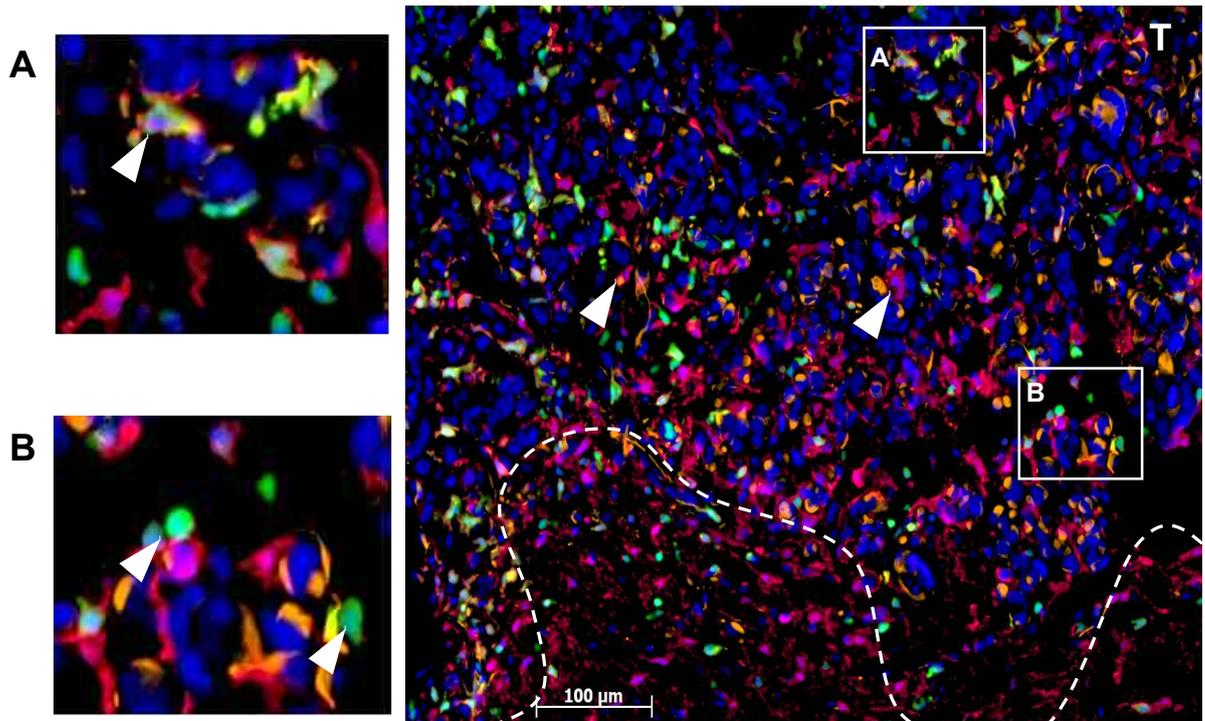


Abb. 16: Übersichtsbild der eingewanderten Zellen aus dem Knochenmark (GFP – transfizierte Monozyten, grün). Es fand sich eine große Anzahl an ansässigen aktivierten Mikroglia im Tumor mit und ohne Desminexpression (Pfeile im Übersichtsbild). (A) Einige GFP⁺ - Zellen exprimierten Iba-1 (Pfeil). (B) Die meisten Monozyten waren nur GFP markiert (Pfeile). DAPI (blau), Desmin (orange), Iba-1 (magenta). Tumor (T), Tumorrand (gestrichelte Linie). Tumorprogression, Tag 21 nach der Implantation.

3.1.3.2 Tumorzellen exprimieren Desmin

Interessant erschien die Detektierung der isolierten zellulären Desminexpression. Um zu ermitteln, ob GL261 Tumorzellen für Desmin positiv sind, wurden mit GFP – stabil transfizierte Gliomzellen ins Mausgehirn implantiert und am Tag 21 des Tumorwachstums mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Die entsprechenden Hirngefrierschnitte wurden von Kati Turkowski zur Verfügung gestellt. Die Färbung ergab, dass tatsächlich die Gliomzellen Expression von Desmin zeigten (Abb. 17). Das Gliomzellen – assoziierte Desmin zeigte ein nur für den Tumor spezifisches kugelig konfiguriertes intrazelluläres Verteilungsmuster (Abb. 17 A).

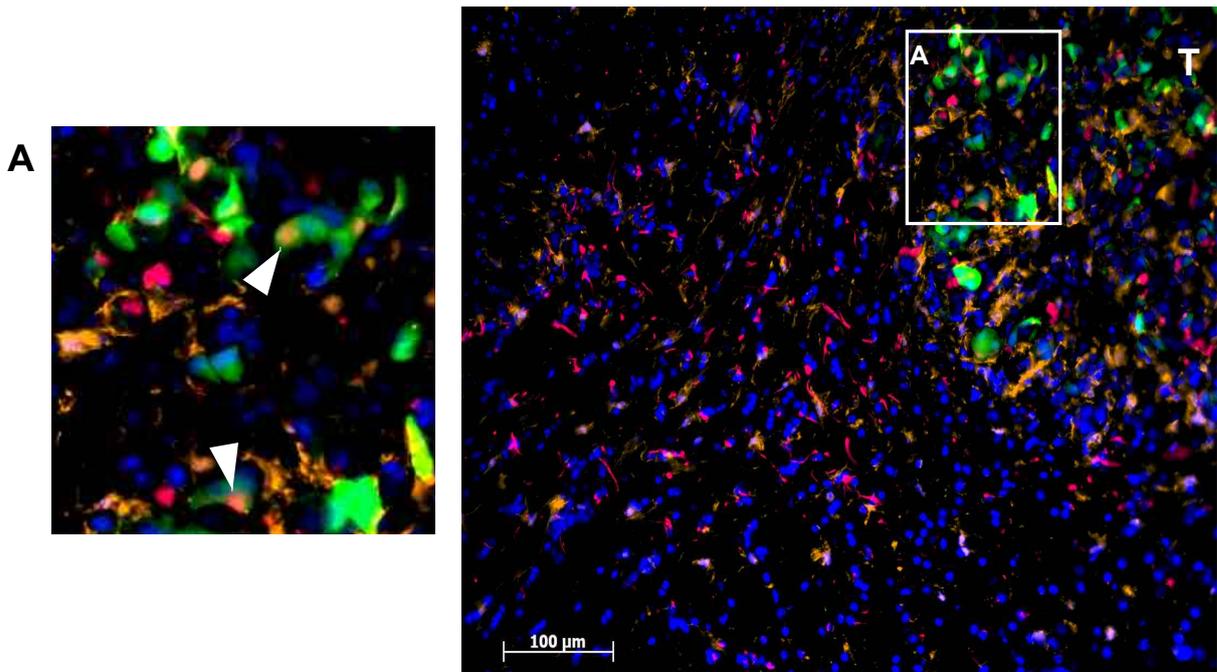


Abb. 17: GFP – transfizierte Gliomzellen zeigen Desminexpression. Ein auffallend großer Anteil der Gliomzellen exprimierten Desmin, welches kugelförmig um die Tumorzellkerne akkumuliert war (Pfeile). Desmin (magenta), Iba-1 (orange), DAPI (blau). Tumor (T), Tumorrand (gestrichelte Linie). Tumorprogression, Tag 21 post implantationem. GFP – Transfektion (Turkowski, K.).

3.1.3.3 Tumorzellen zeigen Iba-1- und Desminexpression

Eine auffallende Beobachtung erschien die Koexpression von Iba-1 seitens Gliomzellen. Einige von Iba-1⁺ GFP⁺ - Tumorzellen zeigten Desminexpression (Abb. 18 A, Pfeil).

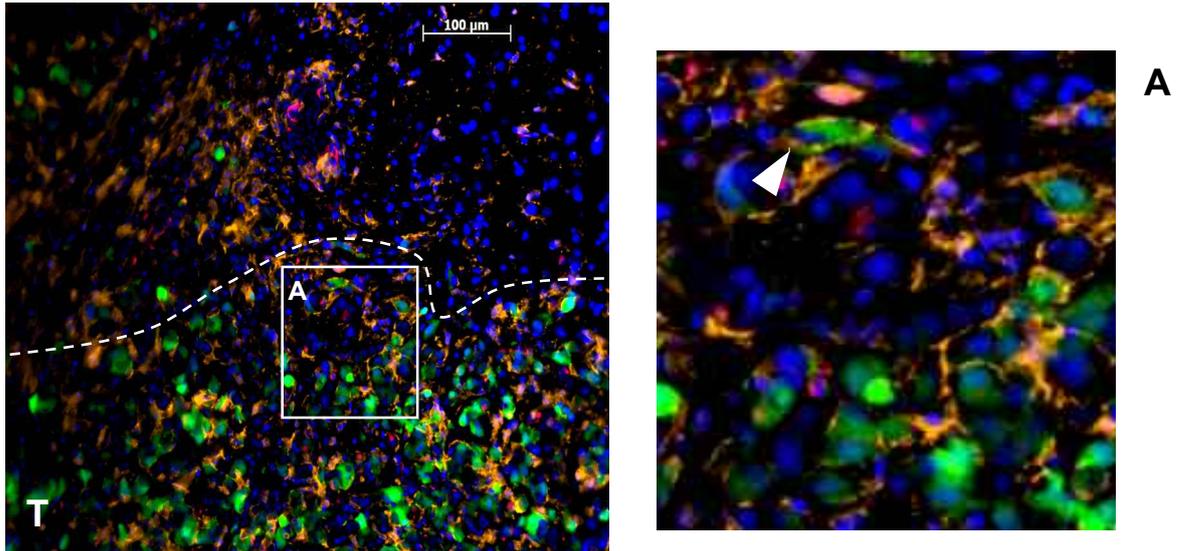


Abb. 18: GFP – transfizierte Gliomzellen zeigen Iba-1- und Desminexpression. (A) Einige der Iba-1⁺ GFP⁺ - Gliomzellen exprimierten zusätzlich Desmin (Pfeil). Desmin (magenta), Iba-1 (orange), DAPI (blau). Tumor (T), Tumorrund (gestrichelte Linie). Tumorprogression, Tag 21. GFP – Transfektion (Turkowski, K.).

In der experimentellen, kombinierten Immunfluoreszenz- und immunhistochemischen Färbung wurde der Nachweis von Desmin – produzierenden Tumorzellen ohne (Abb. 19 A, Pfeil links) und mit Kontakt zu den Blutgefäßen (Abb. 19 A, Pfeil rechts oben) sowie von Iba-1⁺ Desmin⁺ - Zellen morphologisch bestätigt (Abb. 19 A, Pfeil rechts unten). In dieser Kombinationsfärbung ist das Hirngewebe zusätzlich immunhistochemisch mit Eosin/Hämatoxylin bearbeitet worden. Die Immunfluoreszenzmethode konnte somit durch die standard – histologische Färbung ergänzt werden und die umfassend abgebildeten Gewebeverhältnisse näher untersucht werden. Dabei konnte die Tumorzellmorphologie mit pleomorphem Kernbild und häufigen Mitosen nachvollziehbar dargestellt werden. Die Zellkerne einiger Iba-1⁺ Desmin⁺ - Zellen zeigten eine typische Tumorzellkernmorphologie (Abb. 19 A).

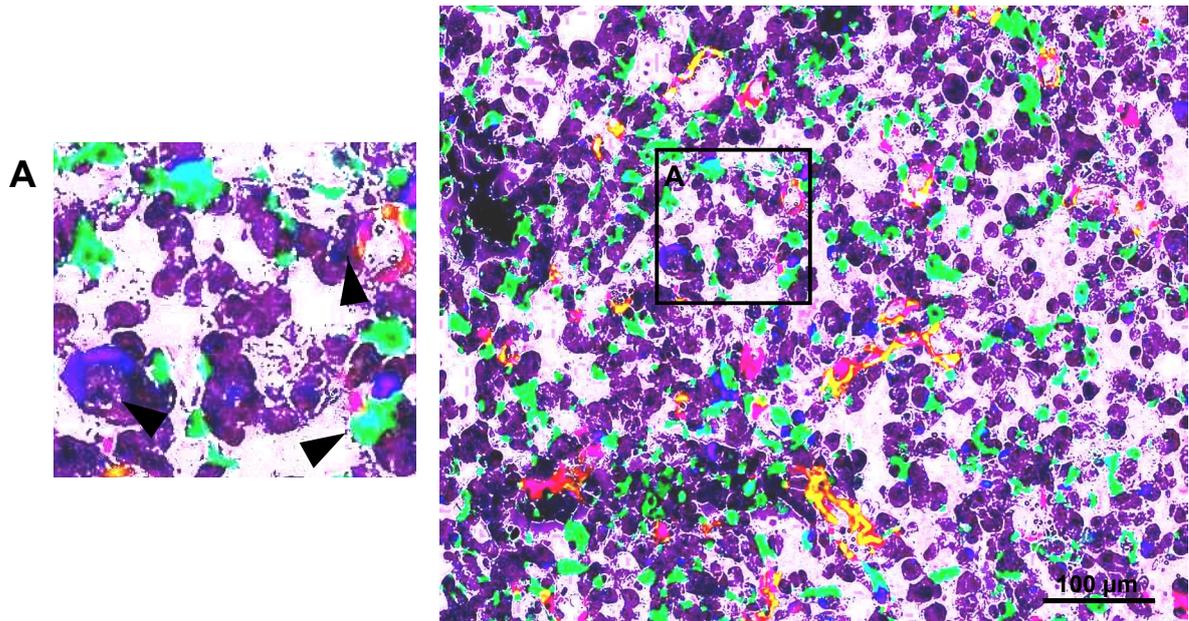


Abb. 19: Tumorzellen (große violette Kerne) mit Desminexpression ohne (A, Pfeil links) und mit (A, Pfeil rechts oben) Kontakt zu Blutgefäßen. (A) Einige von Desmin⁺ - Zellen exprimierten Iba-1 (unterer rechter Pfeil). Experimentelle kombinierte vierfache Immunfluoreszenz – und immunhistochemische Färbung (Eosin/Hämatoxylin). CD31 (rot), αSMA (orange), Zellkerne (violett), Iba-1 (grün), Desmin (blau). Tumorstadium, Tag 21.

3.2 Apoptose im GL261 - Tumorgewebe

3.2.1 Gesamte apoptotische Aktivität im Tumoreal

Es ist bekannt, dass Glioblastome sich durch nekrotische Bereiche auszeichnen [85; 86]. Hinsichtlich der apoptotischen Aktivität gibt es bisher zahlreiche Untersuchungen zur Induktion der Apoptose im Glioblastom [87-89]. In den aktuellen Publikationen wird die Frage der apoptotischen Dysfunktion im Tumor in den Raum gestellt, was zur Induktion der Tumorigenese und der Proliferation sowie zur Resistenz gegenüber der Chemo- und Radiotherapie beitragen kann [90; 91]. Eine Quantifizierung der apoptotischen Aktivität im Glioblastom ist bisher noch nicht beschrieben worden. In unserem Tumormodell sollte daher ermittelt werden, wie viele Zellen im Tumorbereich apoptotisch sind. Es wurde eine sehr geringe Anzahl an apoptotischen Zellen im Tumorbereich detektiert (Abb. 20). Hingegen wurden auf der

kontralateralen Seite der Mausgehirne keine apoptotischen Zellen gefunden (nicht dargestellt), sodass die apoptotische Aktivität tumorspezifisch zu sein scheint.

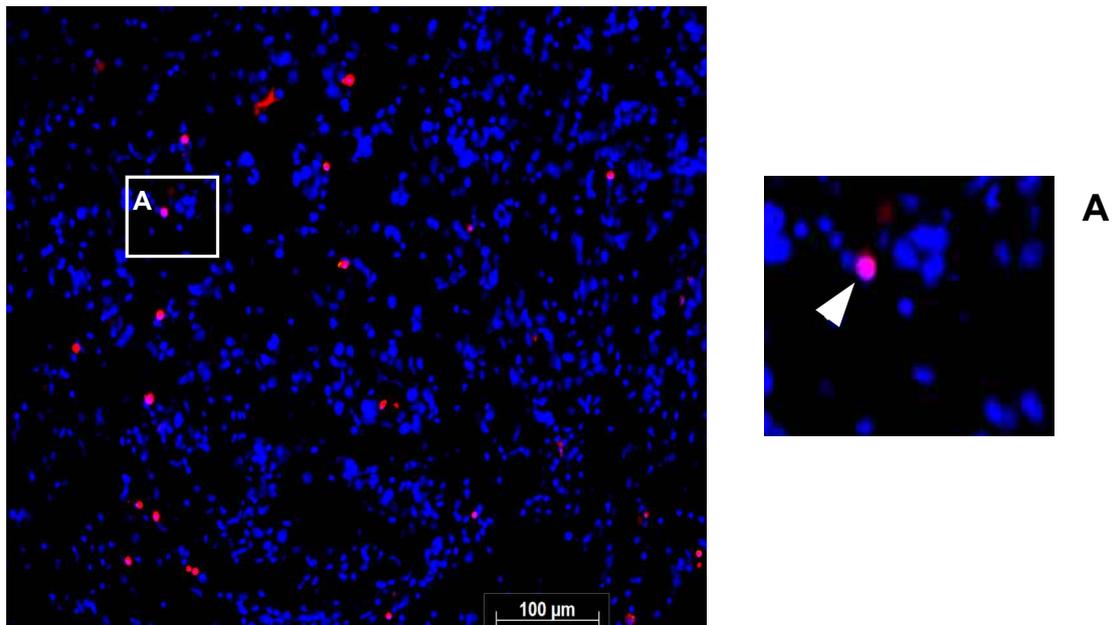


Abb. 20: Apoptotische Kerne im Tumorbereich. Eine niedrige Anzahl an apoptotischen Kernen (A, Pfeil) konnte im GI261-Tumor festgestellt werden. 21 Tage nach der Tumorimplantation. DAPI (blau), ApopTag (rot).

Die höchste apoptotische Aktivität wurde im initialen Stadium des Tumorwachstums am Tag 7 detektiert (Abb. 21). Die quantitative Bestimmung ergab insgesamt eine Abnahme der Anzahl von apoptotischen Zellnuclei in Bezug auf die zeitliche Progression des Tumors. Zudem konnte festgestellt werden, dass die höchste apoptotische Aktivität direkt im Tumorgewebe anzutreffen ist, während im Tumorrand weniger apoptotische Zellen zu finden waren.

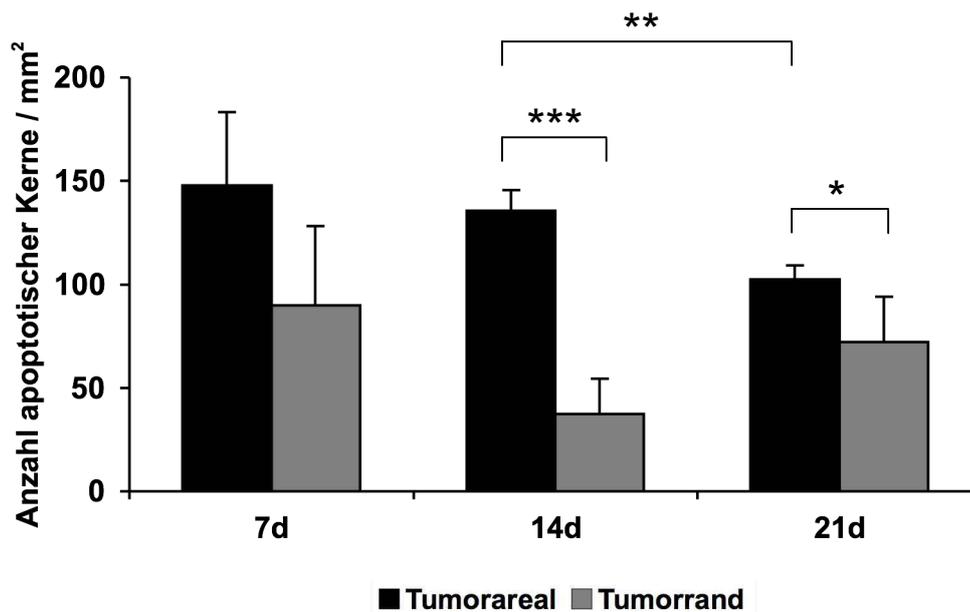


Abb. 21: Quantitative Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellkerne im Tumorareal und im Tumorrand. Apoptotische Zellkerne nahmen mit Tumorprogression ab. Es wurden apoptotische Zellkerne pro mm² im Tumor und Tumorrand zu drei verschiedenen Zeitpunkten des Tumorwachstums bestimmt. Im Tumor selbst wurden zu jedem Zeitpunkt mehr apoptotische Zellen als im Tumorrand gefunden. (n=4), (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

3.2.2 Apoptotische Aktivität der Mikroglia/Makrophagen in GL261 – Tumoren

Um nun genauer zu definieren, welche Zellen apoptotische Aktivität aufweisen, wurden die Mikroglia/Makrophagen hinsichtlich dieser Eigenschaft analysiert. Dies erschien deshalb von Bedeutung, da Mikrogliazellen/Makrophagen zwar das Tumorareal infiltrieren, jedoch die Progression des Tumors nicht ausreichend inhibieren können. Somit sollte geklärt werden, ob insbesondere Mikrogliazellen/Makrophagen in den programmierten Zelltod gehen und deshalb nicht gegen den Tumor ankämpfen können. Generell konnte eine niedrige Anzahl apoptotischer Mikroglia/Makrophagen im Tumor zu jedem Zeitpunkt des Tumorwachstums festgestellt werden (Abb. 22). Die Zahl der apoptotischen

Mikrogliazellen/Makrophagen im Tumor blieb im zeitlichen Verlauf immer konstant. In der Tumorperipherie wurde eine deutlich geringere Anzahl apoptotischer Mikroglia/Makrophagen am Tag 14 detektiert (Abb. 23). Nur ca. 2-10% aller Mikroglia/Makrophagen zeigten apoptotische Aktivität, was einen sehr geringen Anteil darstellte (Abb. 24). Somit ist die apoptotische Aktivität der Mikroglia/Makrophagen offensichtlich nicht dafür verantwortlich, dass das Tumorwachstum im Glioblastom nicht suffizient inhibiert wird und dadurch eine hohe Progressionsrate zeigt.

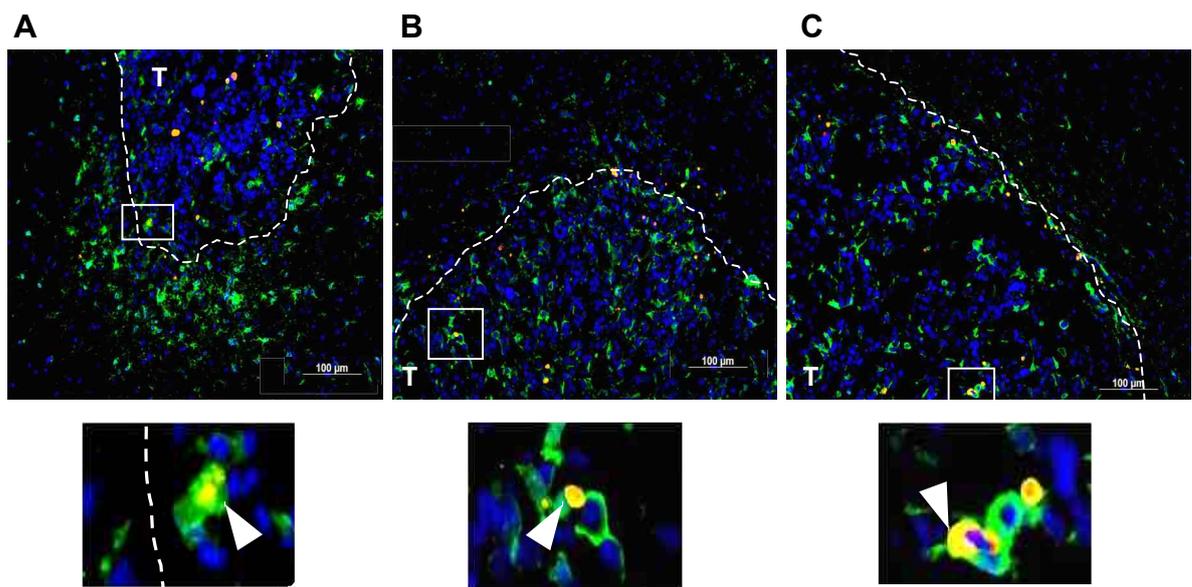


Abb. 22: Apoptotische Aktivität in GL261 – Tumoren in Abhängigkeit vom Tumorwachstum. (A) Tag 7; (B) Tag 14; (C) Tag 21. Eine niedrige Anzahl von apoptotischen Mikroglia/Makrophagen (Pfeile) konnte zu jedem Zeitpunkt des Tumorwachstums beobachtet werden. Iba-1 (grün), ApopTag (orange). DAPI (blau). Tumor (T), Tumorrand (gestrichelte Linie).

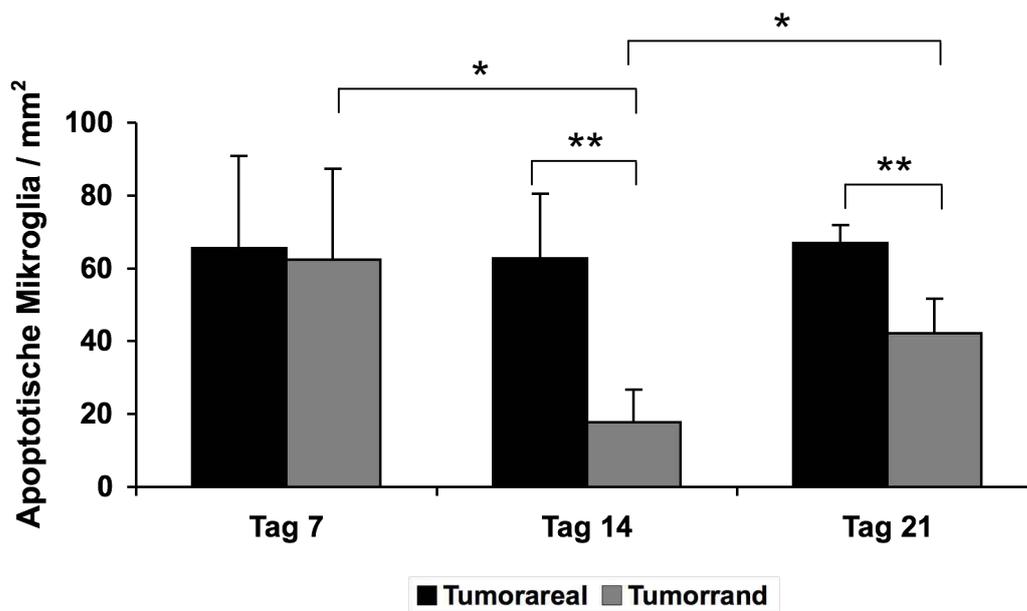


Abb. 23: Anzahl apoptotischer Mikroglia/Makrophagen pro mm² im Tumor und Tumorrand zu drei verschiedenen Zeitpunkten des Tumorwachstums (Tag 7, Tag 14 und Tag 21). Die Anzahl der apoptotischen Mikroglia/Makrophagen änderte sich im zeitlichen Verlauf im Tumorareal nicht, in der Tumorperipherie zeigte sich die reduzierte Anzahl von apoptotischen Mikroglia/Makrophagen am Tag 14 nach Implantation. (n=4), (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

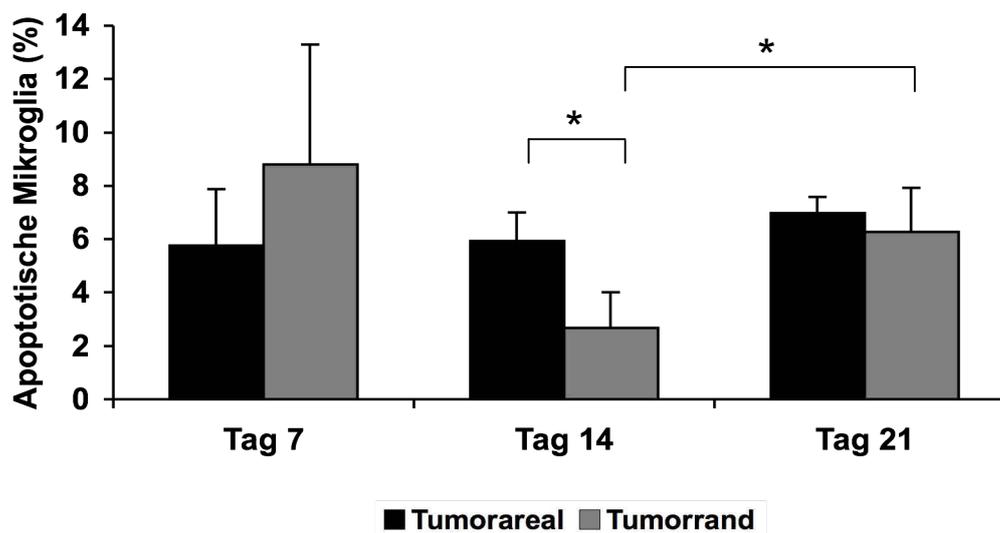


Abb. 24: Ermittlung und Vergleich im zeitlichen Verlauf des Anteils an apoptotischen Mikroglia/Makrophagen innerhalb der gesamten Mikroglia/Makrophagen-Population pro mm² im Tumorareal und Tumorrand. Mikroglia zeigte insgesamt eine niedrige apoptotische Aktivität. (n=4), (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

3.3 Charakterisierung der hypoxischen Gebiete in GL261 – Tumoren

In diesem Teil sollte überprüft werden, ob die mikroglialen Zellen zu den Tumorbereichen rekrutiert werden, die sich durch Hypoxie auszeichnen. Weiterhin soll auf der zellulären Ebene gezeigt werden, ob eine Interaktion zwischen hypoxischen Tumorzellen und Mikrogliazellen/Makrophagen stattfindet.

3.3.1 Identifizierung hypoxischer Areale im Tumor

Zur Untersuchung des Expressionsmusters von Hif-1 α in Gliomzellen wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem monoklonalen Hif-1 α - Antikörper durchgeführt, die Zellkerne wurden mittels DAPI dargestellt. Es zeigte sich eine ausgeprägte perinukleäre Anreicherung vom Hif-1 α - Antikörper in Gliomzellen (Abb.25). Außerdem konnte das ungleichmäßige Expressionsmuster von Hif-1 α im Tumor festgestellt werden (Abb. 26). Die stärkste Expression von Hif-1 α fand sich am Tumorrand und um die nekrotischen Areale im Tumor.

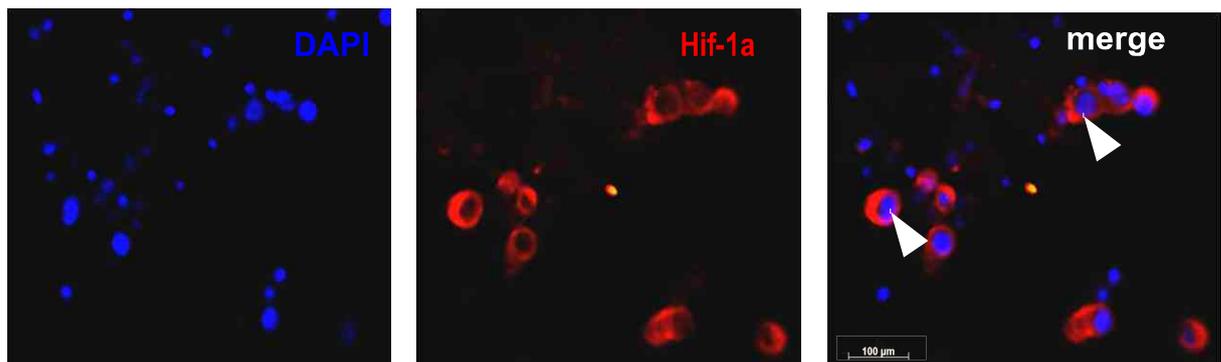


Abb. 25: Darstellung von hypoxischen Gliomzellen (Pfeile) am Rand des Tumors, 21 Tage nach der Implantation. Man sieht eine starke perinukleäre Expression von Hif-1 α (rot). DAPI (blau).

3.3.2 Anstieg der Expression von Hif-1 α mit dem Tumorwachstum

Für die Expressionsanalyse von Hif-1 α wurden nach der Gehirnentnahme Kryoschnitte von vier Mausgehirnen pro Zeiteinheit angefertigt. Die Schnitte wurden mit anti-Iba-1, anti-Hif-1 α sowie mit DAPI gefärbt. In jedem der vier entnommenen Gehirne pro Versuchsgruppe fand sich das ähnliche Expressionsmuster sowohl von Hif-1 α als auch von Iba-1. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an hypoxischen Gliomzellen sowie Mikrogliazellen/Makrophagen als auch die Expressionsstärke von Hif-1 α dieser Zellen in Abhängigkeit vom Tumorwachstum kontinuierlich anstiegen (Abb. 18).

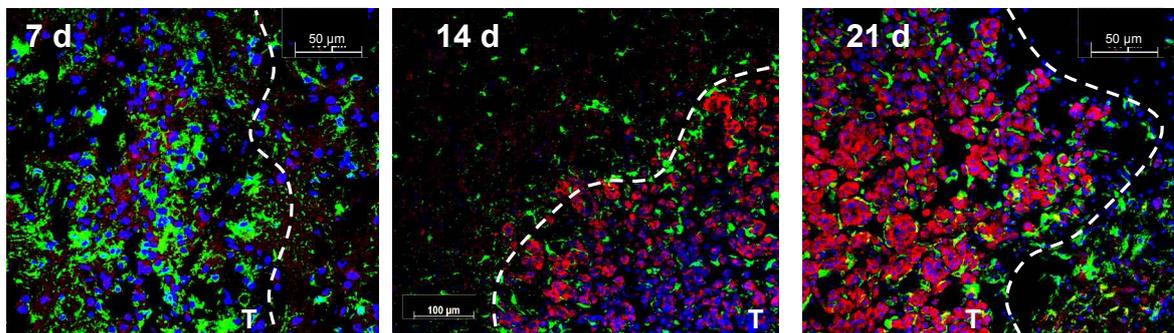


Abb. 26: Übersicht von hypoxischen Arealen im Tumor im zeitlichen Verlauf. Mit dem Tumorwachstum stieg sowohl die Anzahl an hypoxischen Zellen (einschließlich Mikroglia/Makrophagen) im Tumor als auch die Stärke der Expression von Hif-1 α (rot) der einzelnen Zelle. 7, 14 und 21 Tage nach Implantation. Iba-1 (grün), To-Pro-3 (blau). Tumorgrenze (gestrichelte Linie). Konfokalmikroskopie.

3.3.3 Unterschiedliche Aktivitätsformen und Expressionsmuster von Iba-1⁺ - Zellen im Tumor

Um das Hif-1 α Expressionsmuster der Mikroglia/Makrophagen näher zu untersuchen, wurden die Bilder mit Doppelimmunfluoreszenzfärbung in relevanten Tumorgebieten angefertigt und die Morphologie der Mikroglia/Makrophagen präzise dargestellt (Abb. 27 A). Zum einen konnten hypoxische Gliomzellen ringförmig umschlossen von Iba-1⁺-Zellen beobachtet werden (Abb. 27 B). Zum anderen fand

sich eine mikrogliale $\text{Hif-1}\alpha^-$ - Zellpopulation, welche sich in Assotiation mit Gliomzellen befand (Abb. 27 C). Zuletzt konnten $\text{Hif-1}\alpha^+ \text{Iba-1}^+$ - Zellen detektiert werden (Abb. 27 D).

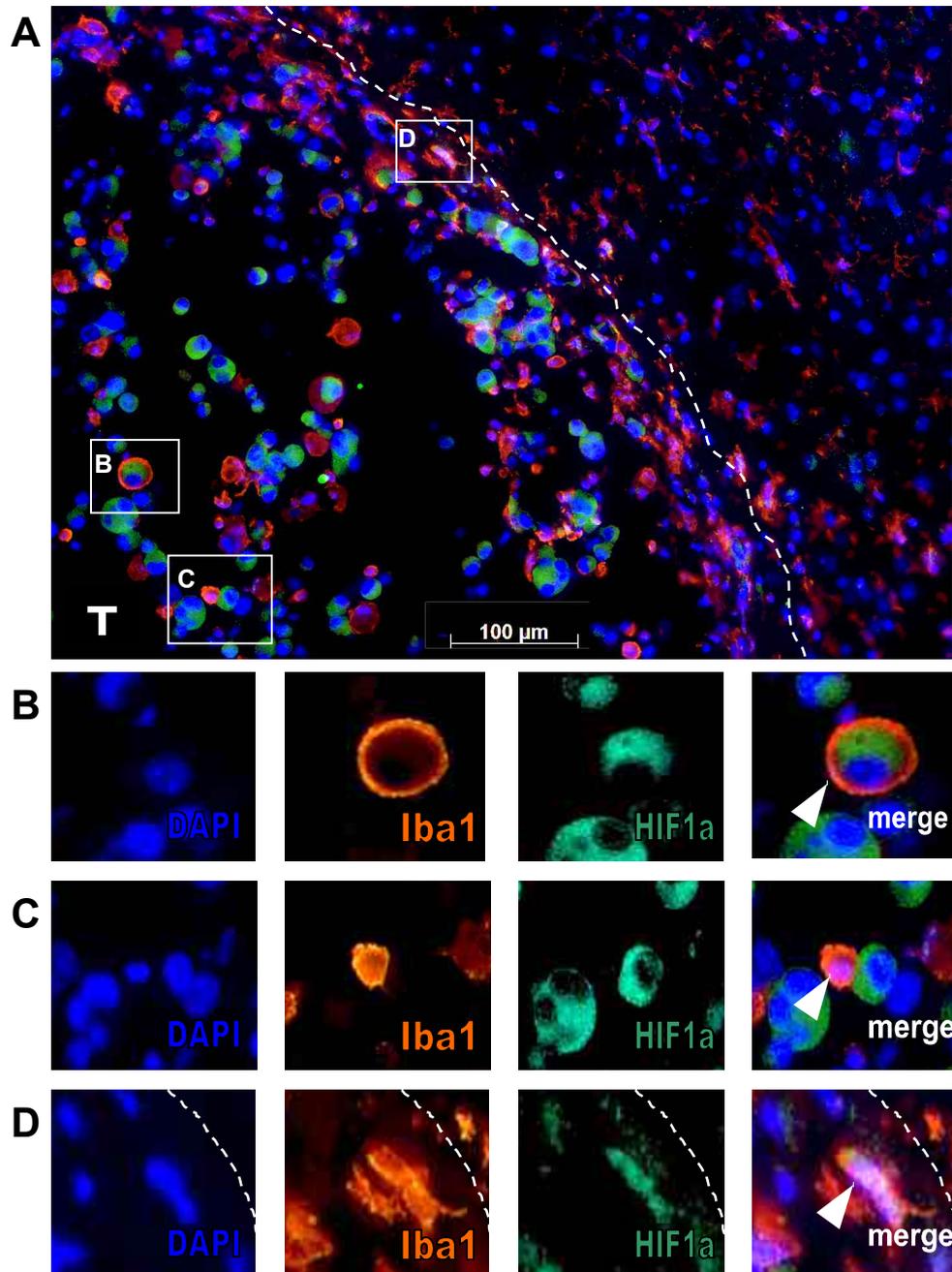


Abb. 27: Aktivitätsformen von Mikroglia/Makrophagen im Tumor. (A) Übersichtsbild des Tumorareals und des Tumorrandes. Starke Expression von $\text{Hif-1}\alpha$ am Tumorrang; (B) Das Bild der Phagozytose der anhand ihrer Kernmorphologie identifizierten hypoxischen Gliomzelle durch Mikrogliazelle/Makrophage mit ringförmigem Iba-1^+ – Expressionsmuster (Pfeil); (C) Eine aktivierte amöbide Form von $\text{Hif-1}\alpha^+$ - Mikrogliazelle/Makrophage (Pfeil)

wurde im direkten Kontakt mit einer hypoxischen Gliomzelle dargestellt. (D) Eine direkt am Rand des Tumors gelegene Mikrogliazelle (bzw. Makrophage) wurde mit Koexpression Iba-1⁺ Hif-1 α ⁺ detektiert (Pfeil). DAPI (blau), Hif-1 α (grün), Iba-1 (orange). T (Tumor). 21 Tage nach der Tumorimplantation.

3.3.4 Mikroglia/Makrophagen interagieren mit hypoxischen Tumorzellen

Die Konfokalmikroskopie diente zur näheren Betrachtung der Interaktion von Mikrogliazellen/Makrophagen mit hypoxischen Gliomzellen (Abb. 28). Es zeigte sich, dass Mikroglia/Makrophagen in engem Kontakt mit Tumorzellen standen. Es fanden sich hypoxische Gliomzellen, welche mit mehreren Mikroglia/Makrophagen assoziiert waren. Ebenso fanden sich einige Mikrogliazellen/Makrophagen, die mit mehreren Tumorzellen in Kontakt standen (Abb. 28, Pfeile). Bei diesen mikroglialen Zellpopulationen handelte es sich sowohl um hypoxische Mikrogliazellen/Makrophagen als auch um Mikroglia/Makrophagen ohne Hif-1 α - Expression.

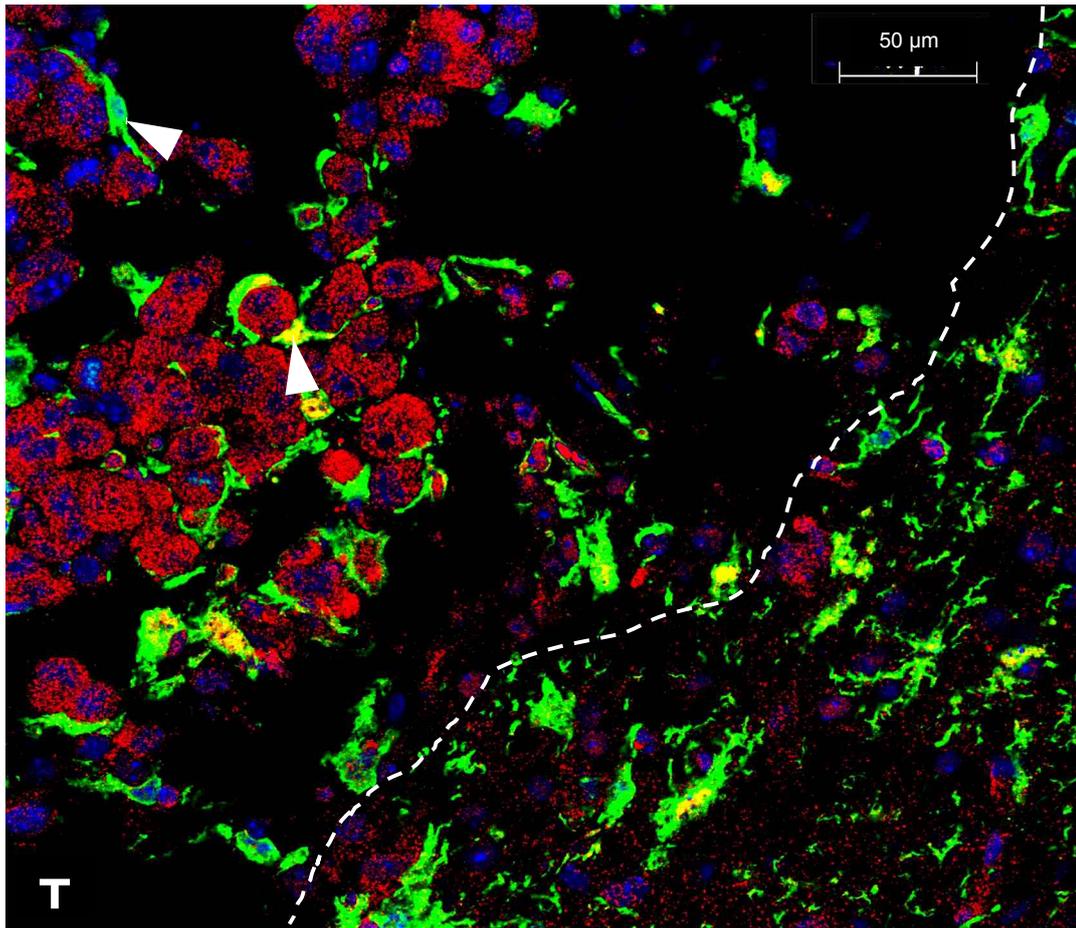


Abb. 28: Veranschaulichung der Interaktion von Mikroglia/Makrophagen mit hypoxischen Gliomzellen im Maustumormodell. Darstellung von Mikroglia/Makrophagen, welche direkt mit hypoxischen Tumorzellen in Kontakt standen (Pfeile). Die mikrogliale Expression von Hif-1 α war dabei nicht obligat (Iba-1⁺ Hif-1 α ⁺ - Mikroglia/Makrophage mit gelbem Punkt perinukleär). Iba-1 (grün), Hif-1 α (rot), To-Pro-3 (blau). Tumorgrenze (gestrichelte Linie). 21. Tag nach Implantation. Konfokalmikroskopisches Bild.

3.3.5 Gliomzellen exprimieren Hif-1 α in der perivaskulären Nische

Zur Evaluierung der Hif-1 α ⁺ Gliomzellen wurden zusätzlich die Gefäße mittels CD31 dargestellt. Erstaunlicher Weise konnten diese hypoxischen Tumorzellen zum Teil in der perivaskulären Nische gefunden werden (Abb. 29). Dies wurde nicht erwartet, da davon auszugehen ist, dass Zellen in Gefäßnähe gut mit Sauerstoff versorgt sein sollten.

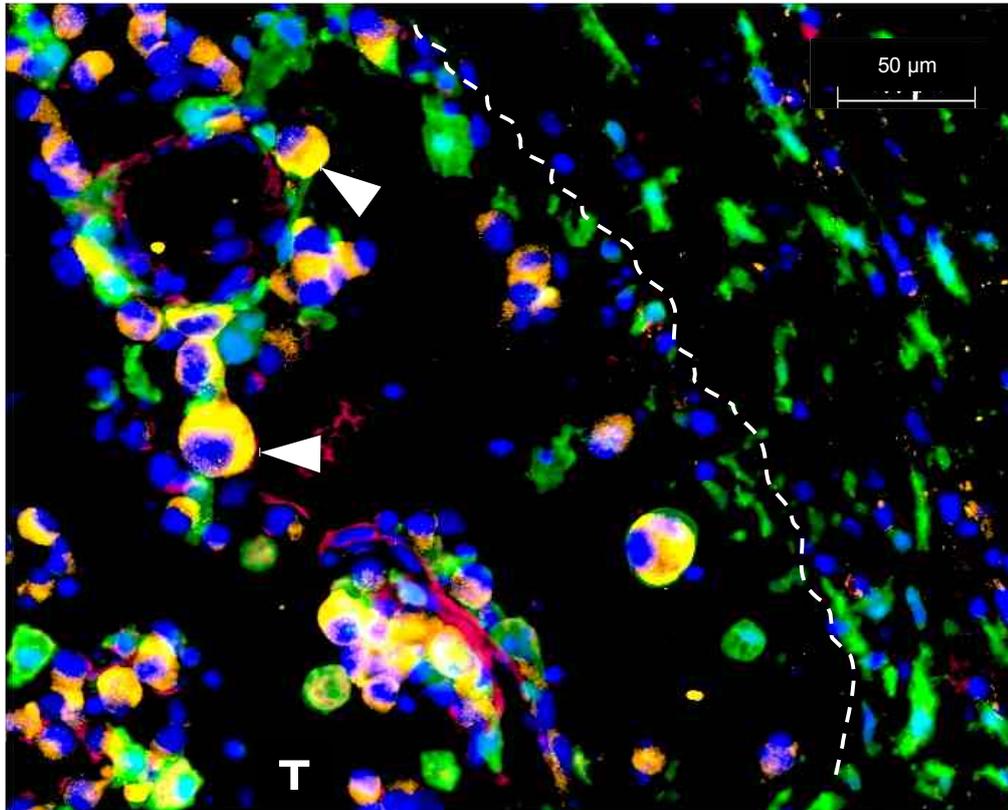


Abb. 29: Detektierung von gefäßassoziierten hypoxischen Gliomzellen. Perivaskuläre Ansammlung von Hif-1 α ⁺- Tumorellen (Pfeile). Die hypoxischen Gliomzellen sind ebenfalls mit Gefäßen assoziiert. CD31 (rot), Iba-1 (grün), Hif-1 α (orange), DAPI (blau). Tumorrand (gestrichelte Linie), Tumor (T). 21 Tage nach der Tumorumplantation.

3.3.6 Residente Mikroglia und eingewanderte Makrophagen zeigen eine Hif-1 α - Expression im Tumor

Um den Anteil an eingewanderten Blutmonozyten im Tumor zu ermitteln, wurde das Hirngewebe von den Mäusen analysiert, deren Knochenmark nach einer Bestrahlung durch GFP – markierten Knochenmarkszellen rekonstruiert wurde (experimentelle Durchführung: Annett Müller, Susan Brandenburg). Die eingewanderten Blutzellen konnten nun anhand der GFP – Markierung von den hirransässigen Zellen unterschieden werden.

Es zeigte sich eine deutliche Infiltration mit Blutmakrophagen im Tumor (Abb. 30 A). Neben hypoxischen Mikroglia (Abb. 30 B) fanden sich zum Teil Iba-1⁺ Hif-1α⁺ Blutmakrophagen (Abb. 30 C).

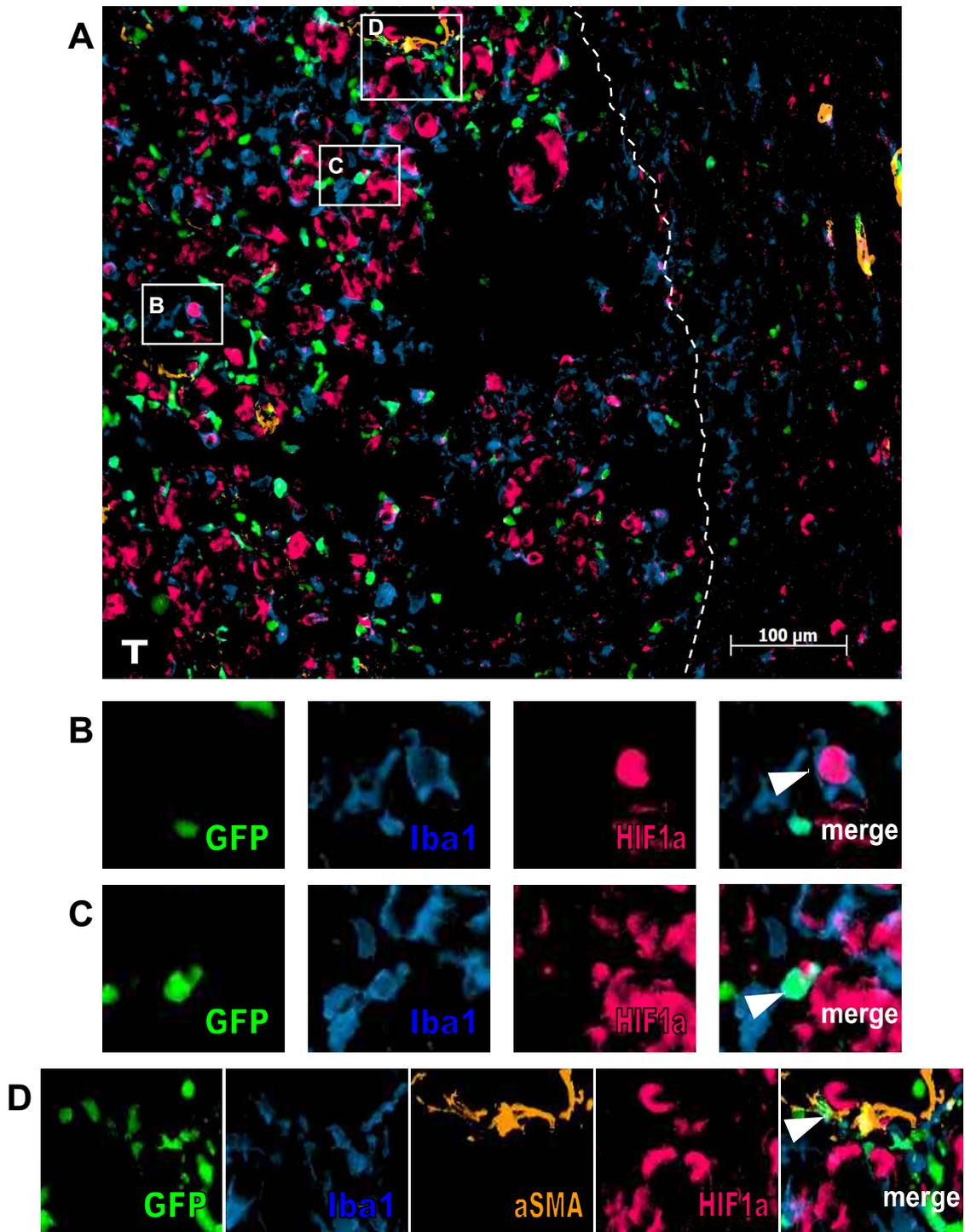


Abb. 30: Hypoxische Mikroglia und Makrophagen im Tumor (A). (B) Ein großer Anteil der aktivierten residenten Mikroglia zeigte Hif-1α - Expression; (C) Ein Teil der GFP – markierten Makrophagen zeigte Expression von Iba-1 und Hif-1α. (D) Das Bild des

gefäßassoziierten Monozyten (Pfeil). Iba-1 (cyan), α SMA (orange), Hif-1 α (magenta). 21 Tage nach der Tumorimplantation.

3.3.7 Einfluss der Hif-1 α - Expression auf apoptotische Aktivität von Mikroglia/Makrophagen

Um die Frage zu beantworten, ob hypoxische Konditionen im Tumor einen Einfluss auf die apoptotische Aktivität von Mikroglia/Makrophagen haben, wurden Gefrierschnitte von den Mäusen mit Darstellung von Apoptose und Hypoxie analysiert (Abb. 31).

Wie in der Abbildung 31 A dargestellt, konnten die Iba-1⁺ Hif-1 α ⁺ - Zellen ohne Anzeichen der apoptotischen Aktivität detektiert werden. Im Unterschied dazu zeigten die apoptotischen Mikrogliazellen/Makrophagen keine Expression von Hif-1 α (Abb. 31 B).

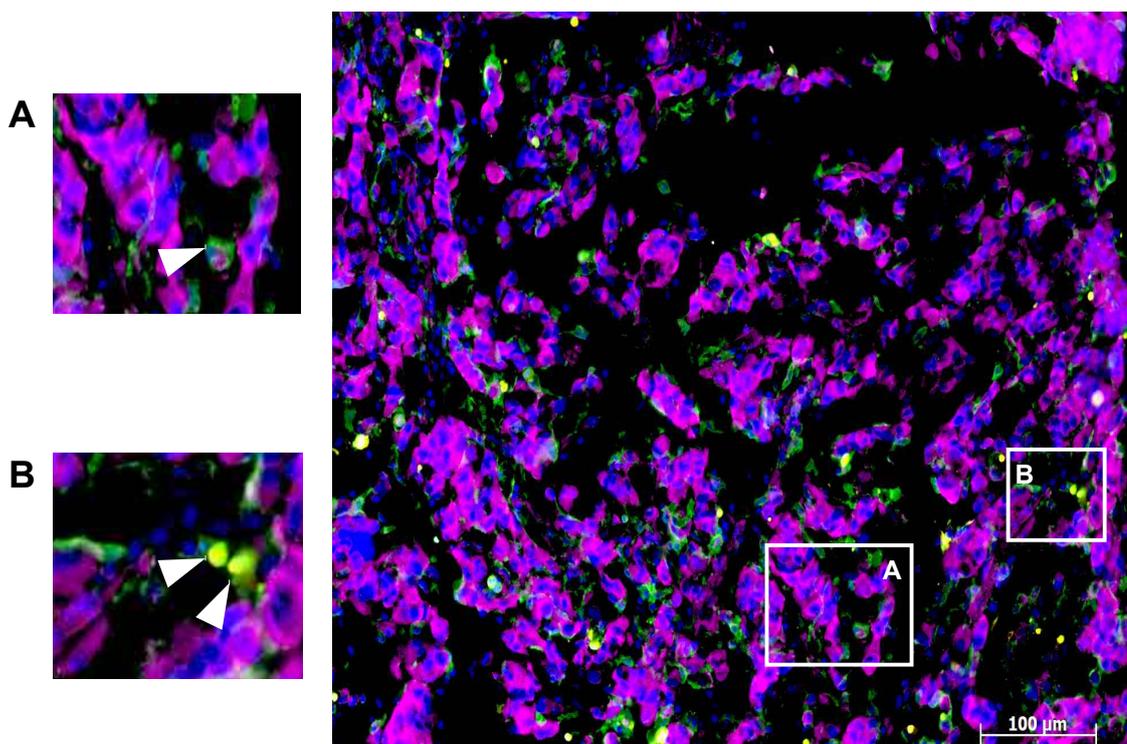


Abb. 31: Hypoxische und apoptotische Aktivität im Tumor. (A) Iba-1⁺ Hif-1 α ⁺ - Zelle zeigte keine apoptotische Aktivität (Pfeil); (B) Apoptotische Mikrogliazellen/Makrophagen waren negativ für Hif-1 α (Pfeile). 21 Tage nach der Tumorimplantation.

4. DISKUSSION

Die neuesten Erkenntnisse über die Rolle von Mikroglia/Makrophagen in Gliomen beruhen auf der allgemeinen Beobachtung, dass die Infiltrationsrate der mikroglialen Zellpopulation mit dem Malignitätsgrad des Hirntumors zunimmt [92]. Einerseits besagen die neu aufgestellten Postulate von dem Einfluss der Mikroglia/Makrophagen auf die Migration von Gliomzellen durch Produktion von spezifischen Matrixmetalloproteasen (MMP-9) [93; 94]. Des Weiteren soll Mikroglia/Makrophagen durch die Sekretion von VEGF zur Neovaskularisierung im Tumor, durch Expression von EGF zur Proliferation von Gliomzellen beitragen [95; 96]. Somit könnten Mikroglia/Makrophagen eine rasche Progression des Tumorstwachstums induzieren und einen potentiellen Modulator für die Angiogenese an der Tumor-Gefäß-Schnittstelle darstellen. Andererseits wurde es über die Induktion der Apoptose von Mikroglia/Makrophagen durch FAS- / FASL – Expression im erkrankten Hirnparenchym berichtet [97]. Dies deutet darauf hin, dass die Vermehrung und somit die Infiltration der Mikroglia/Makrophagen ins geschädigte Gebiet im ZNS durch eigene Apoptose limitiert ist. Diese Beobachtungen machen es notwendig, anhand eines Tumormodells die Mikroglia/Makrophagen in möglichst vielen Aspekten zu charakterisieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur die residenten Mikroglia, auch die eingewanderten Makrophagen im Tumorgebiet vorzufinden waren, Mikroglia/Makrophagen mit Tumorblutgefäßen interagierten und mit Gliomzellen in Kontakt standen. Desweiteren konnten die hypoxischen Bedingungen im Tumor sowie die Hif-1 α - Expression von Mikroglia/Makrophagen veranschaulicht werden.

4.1 Darstellung von Perizyten im Glioblastom

Es gibt eine Hypothese, welche besagt, dass im Tumor drei Typen von Perizyten existieren [98]. Für die spezifische Darstellung von Perizyten im Glioblastom standen mehrere primäre Antikörper zur Verfügung: anti – α SMA (α smooth muscle actin), anti – Desmin und anti – NG2 (chondroitin sulfate proteoglycan) [99; 100]. Da NG2 auch von den Gliomzellen produziert wird [101], was die experimentelle

Immunfärbung im vorliegenden Mausmodell Gl261 gezeigt hat, wurde auf die Verwendung dieses Antikörpers verzichtet. Dank strenger Assoziation mit den Gefäßen erschien die Verwendung des anti – α SMA - Antikörpers als einzige spezifische Immunfärbung für die Perizyten. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von kombinierten Immunfärbungen zwei Typen von Perizyten identifiziert: die α SMA⁺ - und die α SMA⁺/Desmin⁺ - Zellen (Abb. 11). Aufgrund des disseminierten Expressionsprofils des Desmin – Antigens im Glioblastom war die separate Visualisierung von Perizyten mit Hilfe des anti – Desmin – Antikörpers allein nicht möglich (Abb. 18).

Das α SMA wird auch von den glatten Muskelzellen der Gefäßwand produziert (VSMC, vascular smooth muscle cells) [102; 103]. Morphologisch betrachtet, erscheinen Perizyten und VSMC sehr ähnlich [104-106]. Eine sichere Differenzierung zwischen diesen beiden Zellpopulationen ist bis jetzt nicht gegeben [107]. Einige Publikationen berichten über die Fähigkeit von Perizyten und VSMC ineinander zu differenzieren [108]. Außerdem scheint die Verteilung von Perizyten und VSMC in den verschiedenen Gefäßbetten unterschiedlich zu sein [109-111]. Aufgrund dieser Tatsachen wurden in der vorliegenden Arbeit für die Auswertung von gefäßassoziierten Zellen die Perizyten und die VSMC als eine Zellgruppe betrachtet und evaluiert. Die angiogenen, schnell wachsenden Blutgefäße unterscheiden sich qualitativ von den ruhenden Blutgefäßen. Während der physiologischen Angiogenese reifen die neuen Blutgefäße schnell. Sie sind durch ein stabiles Netzwerk charakterisiert, welches unter anderem mit Hilfe von Zellen in der perivaskulären Nische, wie Perizyten/VSMC, ausgebildet wird. Durch ständiges Verlangen des wachsenden Tumors nach der Blutversorgung kommt es zu der kontinuierlichen Induktion der Neoangiogenese. Somit kommt es zu keiner physiologischen Reifung der tumorassoziierten Blutgefäße [112]. Diese Blutgefäße zeichnen sich durch eine ungeordnete Architektur aus und bilden ein chaotisches Netz aus allen Gefäßtypen, verursacht durch Überexpression von VEGF [113; 114]. Perizyten sind Zellen mesenchymalen Ursprunges mit unterschiedlichen Funktionen. Über die Struktur und Funktion von gefäßassoziierten Perizyten in Tumoren ist immer noch wenig bekannt [115; 116]. In neuesten Studien wurde gezeigt, dass die humanen mesenchymalen Stammzellen im Glioblastom in die Gefäßwand eingebaut werden und sich eher zu den Perizyten entwickeln [117]. Im gesunden Organismus

tragen die Perizyten z.B. zur postnatalen Entwicklung des Gefäßsystems, zu seiner Erneuerung und Stabilisierung bei [118; 119]. Es gibt Hinweise, dass Perizyten sich aus den Progenitorzellen des Knochenmarks entwickeln könnten [108; 120-122]. Außerdem zeigen Perizyten eine phänotypische Plastizität, d.h. sie können zu anderen Zelltypen differenzieren [123-125]. Interessant ist es, dass im aktivierten Zustand, hervorgerufen durch eine Noxe, Perizyten hypertrophieren können und zur Migration fähig sind [126-128]. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass gefäßassoziierte Perizyten/VSMC im Tumor hypertrophiert sind und ein diskontinuierliches Verteilungsprofil längs der Makrogefäße zeigen. Diese Beobachtung korreliert mit starker, „glomerulärer“ Gefäßproliferation im Glioblastom, was in der Literatur als „angiogenic switch“ bezeichnet wird [107; 129; 130]. Dabei zeigte sich die auffallend starke Akkumulation von Mikrogliazellen/Makrophagen um die Tumorblutgefäße (Abb. 9).

4.2 Die Rolle der Desminexpression in malignen Gliomen

In früheren Studien wurde die Annahme der Expression von den Intermediärfilamenten des nicht glialen Ursprunges in Gliomen kontrovers diskutiert [131; 132]. In vielen Arbeiten wurde der anti – Desmin – Antikörper zur Darstellung von Perizyten in Gliomen verwendet [133]. Jedoch konnte nun in dieser Arbeit gezeigt werden, dass dieses Antigen nicht spezifisch für die Visualisierung von gefäßassoziierten Perizyten ist. Während das perizytäre Expressionsprofil dieses Proteins mit deutlicher Identifizierung des Zytoskeletts in unmittelbarer Nähe zu den Blutgefäßen einem konventionellen Verteilungsmuster entsprach, zeigte sich die Desminexpression in ihrer nicht erwarteten Form auch bei den anderen Zellpopulationen im Tumor.

Überraschend erwies sich die Detektierung von Desmin⁺ - Zellen ohne Kontakt zu den Blutgefäßen (Abb. 15, Pfeil im Übersichtsbild). Wie es sich im Laufe der weiteren Untersuchungen herausgestellt hat, handelte es sich dabei um die Gliomzellen, welche das Desmin lokal exprimierten (Abb. 17, 18). Diese Beobachtung korreliert mit beschriebener protektiver Wirkung von zellulären Autophagosom – resistenten mutierten Desmineinschlüssen, welche eine Autophagie in der Tumorzelle induzieren

können und in dieser Weise das Überleben von Tumorzellen durch Bereitstellen von zellulären Bausteinen begünstigen [134]. Andererseits könnten solche Autophagie – resistenten Desmineinschlüsse das Überleben von Tumorzellen in Lysosomen der Zellen des Immunsystems unterstützen [135-140].

Des Weiteren wurden die amöbioden Iba-1⁺/Desmin⁺ - Zellen im gleichen Tumor mit und ohne Kontakt zu den Blutgefäßen beobachtet (Abb. 19). Diese Zellen könnten die mobilisierten Perizyten darstellen, welche nun die Rolle der Mikroglia übernehmen [123; 128; 141-145]. Der Sinn solcher zellulären Transformation könnte in der Unterstützung der Phagozytose im Tumor liegen [146] (Abb. 27 B) oder in der Rekrutierung von Perizyten sowie in der Ausnutzung ihrer Fähigkeit zur mikroglialen Transformation seitens der Gliomzellen, um die Produktion von angiogenen Faktoren (VEGF, MMP-9) anzutreiben [147].

4.3 Die neoplastische Transformation im Glioblastom

Die neuesten Studien haben eine Hypothese der zellulären Fusion zwischen Tumorzellen und Mikroglia aufgestellt [135]. In einigen Arbeiten wurde die Existenz von neoplastischen Zellen mit mesenchymalen/monozytären Eigenschaften vermutet [148]. Diese neoplastischen Makrophagen zeigen oft die höchste Invasivität und tragen zur metastatischen Ausbreitung des Tumors bei [149; 150]. Der mögliche Mechanismus solcher Fusion könnte durch oxydativen Stress, chronische Entzündung sowie durch die hypoxischen Konditionen im Tumor erklärt werden [151]. Dabei können entweder die Gliomzellen von der Mikroglia phagozytiert werden und im Phagosom weiter existieren oder die Tumorzellen phagozytieren die geschwächten Mikrogliazellen mit gestörter mitochondrialen Funktion [135]. Die Störung der mitochondrialen Funktion im hypoxisch/entzündlich veränderten Gewebe könnte das Überleben von Tumorzellen begünstigen [152]. Im verwendeten Tumormodell der Gli261 – Zelllinie wurde die Möglichkeit der Existenz solcher neoplastischen Mikrogliazellen gezeigt (Abb. 28).

Eine weitere Hypothese besagt, dass die Gliomstammzellen sich in die perivaskuläre Nische einnisten können und sogar in die Gefäßwand eingebaut werden [61; 153]. Somit könnten sie die weitere Neoangiogenese vor Ort induzieren. Bis jetzt wird

diese Hypothese kontrovers diskutiert [154; 155]. In Abbildung 29 konnte nun eine direkte Nähe, teilweise ein Kontakt von Gliomzellen zum Endothel gezeigt werden.

4.4 Verteilung und Differenzierung von knochenmarksabstammenden Monozyten im Glioblastom

In den früheren Publikationen wurde postuliert, dass es sich bei den ins geschädigte Hirnparenchym durch die zerstörte Blut – Hirn – Schranke einwandernden und zu Mikroglia bzw. zu Perizyten sich transformierenden Blutzellen um Monozyten handelt [58; 84]. Allerdings wurde in vielen Experimenten mit Tiermodellen zu Pathologien des Gehirns eine Ganzkörperbestrahlung der Mäuse durchgeführt, wobei die Blut – Hirn – Schranke partiell zerstört wird. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass es bei ZNS Pathologien ohne vorherige Bestrahlung zu keiner Monozytenrekrutierung aus dem Knochenmark kommt [156-158]. Für Tumore des ZNS ist jedoch nicht bekannt, ob diese zu einer Rekrutierung der peripheren Monozyten führen.

Die Unterscheidung von verschiedenen Arten der Makrophagen im Gehirn ist von essentieller Bedeutung. Die eingewanderten Monozyten und Mikroglia unterscheiden sich wesentlich in ihrer Genexpression und Funktion [60; 159-164]. In Abbildung 16 wird deutlich, dass eine große Population von eingewanderten Monozyten (GFP – markiert) im Tumor detektiert werden kann. Dabei verwendeten wir ebenso das Modell der Ganzkörperbestrahlung der Mäuse, sodass die Detektierung von vielen GFP⁺-Zellen im Gliom mit aktueller Literatur vereinbar ist [58; 84]. Weiterhin konnte die unmittelbare Nähe von eingewanderten Monozyten zu der extraluminalen Seite der Blutgefäße gezeigt werden (Abb. 30 D). Dies ist das morphologische Korrelat für den Prozess der Einwanderung der monozytären Zelllinie aus der Peripherie in das Tumorparenchym. Diese Tatsache spricht für eine Beeinträchtigung der Blut – Hirn – Schranke im Glioblastom. Des Weiteren kann in Abbildung 16 entnommen werden, dass einige der eingewanderten Monozyten das mikrogliale Antigen Iba-1 exprimieren. Diese Beobachtung würde das Postulat der monozytären Differenzierung in Mikroglia im Tumor bekräftigen [58; 84]. Als nächstes fiel es auf, dass die GFP⁺ - markierten Monozyten keine Desminexpression zeigen (Abb. 16). Somit wird die postulierte monozytäre Differenzierung in die Perizyten im Tumor in

Frage gestellt. Die knochenmarksabstammenden Progenitorzellen (hMSC, human mesenchymal stem cells) könnten diese Funktion übernehmen [117; 165].

Eine weitere Funktion der eingewanderten Makrophagen könnte in der zusätzlichen Induktion und in der Unterstützung der Angiogenese im Tumor liegen [66].

4.5 Mikrogliazellen/Makrophagen stehen im engen Kontakt zu den Tumorblutgefäßen

In der Arbeit von Rymo im Maus – Retinamodell wurde gezeigt, dass der direkte Zell – zu – Zell – Kontakt zwischen Mikroglia und Endothelzellen für die Stimulation der Angiogenese nicht notwendig ist, sondern lediglich die mikrogliale Expression von löslichen Faktoren [78]. Die Nähe der Mikroglia zu den wachsenden Gefäßverzweigungen wurde durch Sekretion von den Mediatoren der so genannten endothelialen „Tip“ – Zellen (endothelial tip cells) erklärt [166-169]. Die direkte Interaktion der Mikroglia/Makrophagen mit Tumorblutgefäßen wurde daher nicht näher untersucht. Jedoch konnte nun in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Mikroglia/Makrophagen nicht nur mit Endothelzellen, sondern zum relevanten Teil auch mit den anderen gefäßwandbildenden Zellen, den Perizyten, interagieren (Abb. 12, 13).

Durch folgende Überlegungen wird auf die Frage eingegangen, ob es sich bei den gefäßassoziierten Iba-1⁺ - Zellen um Mikroglia handelt. Es ist bekannt, dass Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) nicht nur für Mikroglia spezifisch ist, sondern auch für die Makrophagenpopulation. In den aktivierten Mikroglia/Makrophagen wird dieses Molekül hochreguliert [170-172]. Die hypoxischen sowie inflammatorischen Konditionen im Glioblastom sorgen für die Aktivierung dieser Zellen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die eingewanderten Monozyten das mikrogliale Antigen Iba-1 produzieren und sich häufig um die Blutgefäße aufhalten (Abb. 30) [141]. In früheren Studien wurde gezeigt, dass die hochregulierte Expression von Iba-1 die Proliferation von VSMC moduliert sowie ihre Migration stimuliert [173-175]. Wie bereits erwähnt, wurden die hypertrophierten gefäßassoziierten Perizyten/VSMC im hier verwendeten G1261 – Tumormodell detektiert (Abb. 9). Die andere, Desmin⁺ monozytäre Population der Perizyten

scheint von der Gefäßwand ins Tumorparenchym zu migrieren (Abb. 15, 16). Dies würde die Beobachtung der Iba-1 - induzierten Stimulation der Migration von Perizyten/VSMC bekräftigen. Wie oben beschrieben, besitzen die Perizyten die Fähigkeit, sich in andere Zelltypen zu differenzieren. Die detektierten Desmin⁺/Iba-1⁺ - Zellen könnten somit das Bild der perizytären Transformation in Mikroglia/Makrophagen – Population darstellen (Abb. 15).

Bei der Auswertung von gefäßassoziierten Iba-1⁺ - Zellen wurden sowohl im Tumor als auch in der direkten Peripherie nur die reifen Blutgefäße in Betracht gezogen, die mit zwei oder mehreren Iba-1⁺-Zellen assoziiert waren. Die Reife eines Blutgefäßes wird dadurch definiert, dass die Endothelzellen durch kontinuierliche Schicht von glatten Muskelzellen (VSMC) bzw. von Perizyten stabilisiert werden [176]. Die reifen Blutgefäße im Tumor im Rahmen der Neovaskularisierung enthalten die unterbrochene Perizyten-/ glatte Muskelzellenschicht. Die Perizyten erscheinen dabei hypertrophiert mit deutlicher Identifizierung des Zellkörpers bzw. der Zellausläufer als Ausdruck der aktiven Proliferation dieser Zellpopulation [177] (Abb. 9). Im Tumor fand sich eine große Zahl der CD31⁺ / α SMA⁺ Blutgefäße, welche stetig mit mehreren Iba-1⁺-Zellen assoziiert waren (Abb. 12). Diese Beobachtung spricht für eine überwiegend im Tumor voranschreitende Neoangiogenese. Durch das diskontinuierliche Expressionsmuster von α SMA der reifen Tumorblutgefäße wurde eine stärkere Assoziation von Iba-1⁺- Zellen mit Endothelzellen als mit Perizyten festgestellt (Abb. 14 A und B). Die Untersuchung der Dynamik der mikroglialen Einwanderung in das Tumorparenchym und des Verhaltens der Mikroglia/Makrophagen an der Tumor - Gefäßschnittstelle zeigte, dass bereits ab dem frühen bis ins späte Stadium des Tumorwachstums trotz der raschen Progression des Glioblastoms die Mikroglia/Makrophagen eine konstante Assoziationsrate mit Endothelzellen der Tumorblutgefäße aufweisen (Abb. 14 A). Die Assoziation bzw. Interaktion von Mikroglia/Makrophagen mit Endothelzellen kann somit als spezifisch für diese Tumorentität interpretiert werden. Daher ist diese Tatsache ein Indiz dafür, dass bereits im Anfangsstadium der Tumorigenese die Mikroglia/Makrophagen in den Prozess der Neoangiogenese involviert zu sein scheinen.

Im Gegensatz dazu wurden viele unreife Blutgefäße in der Tumorperipherie detektiert, die selten mit zwei oder mehreren Iba-1⁺-Zellen assoziiert waren; die

Anzahl der reifen Blutgefäße fiel deutlich geringer aus (Abb. 12). Im gesunden Hirnparenchym sind die meisten Blutgefäße reif, was der Vergleich mit der kontralateralen Seite des Maushirns zeigte (hier nicht dargestellt). Wie in der Arbeit von Naito *et al.* gezeigt wurde, könnten die Tumorzellen dabei die extrazelluläre Matrix von reifen Blutgefäßen als Schiene zur weiteren Infiltration ins gesunde Hirnparenchym benutzen [178].

4.6 Beurteilung apoptotischer Aktivität im Glioblastom

Einer der Gründe für ausgeprägte Malignität des Glioblastoms kann mitunter durch generelle Beobachtung seiner geringen apoptotischen Aktivität erklärt werden (Abb. 20). Mit dem Tumorwachstum sank sogar die Anzahl apoptotischer Zellkerne im Glioblastom (Abb. 21). Etwa die Hälfte aller apoptotischen Zellen im Tumor exprimierten Iba-1 (Abb. 23). Einerseits sind Mikrogliazellen durch Sekretion zellschädigender Substanzen, wie NO und Cathepsin B, zur Induktion einer Apoptose in Gliomzellen fähig [179]. In diesem Kontext scheint die mikrogliale Expression von zellschädigenden Substanzen im Glioblastom inhibiert zu sein. Andererseits sind Mikroglia als Zellen der Immunabwehr zu einer aktiven Phagozytose entweder von abgestorbenen Zellresten oder von apoptotischen Zellen bzw. von aktiven Tumorzellen fähig (Abb. 27 B) [180]. Diese Tatsache könnte die Anwesenheit von apoptotischen Mikroglia/Makrophagen im Tumor vortäuschen. Für die spezifisch induzierte Apoptose in den Iba-1⁺-Zellen spricht aber eine konstante Anzahl apoptotischer Mikroglia/Makrophagen während des Tumorwachstums (Abb. 22 und 24).

4.7 Einfluss der Tumorphypoxie auf mikrogliale Aktivität

Glioblastome zeichnen sich durch starke Hypoxie aus [181]. Die Tumorphypoxie wurde mit einer schlechten klinischen Antwort auf Bestrahlungen oder die Chemotherapie korreliert [182-184]. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der durch Hypoxie sowie durch genetische Instabilität im Glioblastom induziert wird, ist HIF-1

mit seiner regulatorischen Untereinheit Hif-1 α [185]. Außerdem ist Hif-1 α ein Schlüsselfaktor für die Rekrutierung und Mobilisierung von knochenmarksabstammenden Zellen im Tumor, welche zur Induktion der Angiogenese fähig sind [66; 186; 81]. So wurden in der Abb. 30 die eingewanderten Monozyten mit dem mikroglialen Expressionsprofil dargestellt, welche in hypoxischen Bedingungen selbst die Hif-1 α - Expression zeigten.

In den aktuellen Studien wird die Rolle von Hif-1 α in der tumorassoziierten Angiogenese sowie der Einsatz seiner Inhibitoren in der Behandlung von Tumoren diskutiert [187; 186; 135; 188]. Der Einfluss der hypoxischen Konditionen auf mikrogliale Aktivität im Glioblastom wurde bisher nicht beschrieben.

In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass während des Tumorwachstums die Expression von Hif-1 α im Glioblastom stets ansteigt (Abb. 26). Trotz der intensiven Hif-1 α - Expression im Glioblastom konnten im Tumor perinekrotische sowie randständige Areale mit besonders starker Hypoxie detektiert werden (hier nicht dargestellt). Interessanterweise fanden sich im Tumor nicht nur die hypoxischen Gliomzellen, sondern auch die Hif-1 α ⁺- Mikroglia (Abb. 27 D). Interessant erschien auch die Beobachtung, dass diese hypoxischen Mikrogliazellen nur im Tumor bzw. in der nächsten Umgebung des Tumors gefunden wurden (Abb. 27, 28). Somit lässt sich schlussfolgern, dass die hypoxischen Bedingungen im Glioblastom in ihrer maximalen Intensität loko-regionaler Natur sind, wobei die nächste Umgebung als Rekrutierungsfläche in den Prozess des hypoxischen Wechsels bereits involviert ist. Dabei fanden sich die hypoxischen Gliomzellen sowohl in der direkten Umgebung als auch weit entfernt von den Blutgefäßen im Tumorareal (Abb. 29). Diese Beobachtung würden die Ergebnisse der Arbeit von Evans *et al.* über gefäßunabhängige disseminierte Verteilung des Sauerstoffpartialdruckes in Hirntumoren bekräftigen [189]. Außerdem zeigten sich Mikrogliazellen/Makrophagen, welche mit hypoxischen Gliomzellen in direktem Kontakt standen ohne Anzeichen der induzierten Phagozytose (Abb. 28). Der Mechanismus dieser Interaktion ist noch unklar.

Überraschenderweise wurden in einer Kombinationsfärbung die hypoxischen Mikrogliazellen/Makrophagen ohne Anzeichen einer apoptotischen Aktivität detektiert und umgekehrt die apoptotischen Mikrogliazellen/Makrophagen zeigten keine Hif-1 α - Expression. Der ähnliche Zusammenhang zwischen Apoptose und Hypoxie wurde

in der Arbeit von Kilic-Eren *et al.* in Rhabdomyosarkomen und Ewing – Sarkomen beschrieben [190].

5. VERZEICHNISSE

5.1 Literaturverzeichnis

1. Zülch KJ. Brain Tumors. Their biology and pathology. Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag, 1986.
2. Feiden S, Feiden W. WHO classification of tumours of the CNS: revised edition of 2007 with critical comments on the typing und grading of common-type diffuse gliomas. Pathologe 2008 Nov;29(6):411-21.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol. 2007 Aug;114(2):97-109.
4. Schirmer M. Neurochirurgie. 10. Auflage. Urban & Fischer Verlag 2005;220-1.
5. Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R. Gliomas in adults. Dtsch Arztebl Int 2010;107(45):799–808.
6. Dropcho EJ, Soong SJ. The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. Neurology. 1996 Sep; 47(3):684-90.
7. Nieto-Sampedro M, Valle-Argos B, Gómez-Nicola D, Fernández-Mayoralas A, Nieto-Díaz M. Inhibitors of Glioma Growth that Reveal the Tumour to the Immune System. Clin Med Insights Oncol. 2011;5:265-314.
8. Hölper BM, Soldner F, Behr R. Kompendium Neurochirurgie. proINN Verlag, Rosenheim, 2006.

9. Blume C, von Lehe M, van Landeghem F, Greschus S, Boström J. Extracranial glioblastoma with synchronous metastases in the lung, pulmonary lymph nodes, vertebrae, cervical muscles and epidural space in a young patient - case report and review of literature. *BMC Res Notes*. 2013 Jul 25;6:290.
10. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al*. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):987–96.
11. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, *et al*. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006;7(5):392–401.
12. Ochs K, Kaina B. Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res* 2000;60(20):5815-24.
13. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, *et al*. O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status can change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications. *Neuro Oncol* 2010;12(3):283–8.
14. Batchelor TT, Byrne TN. Supportive care of brain tumor patients. *Hematol Oncol Clin North Am* 2006;20(6):1337–61.
15. Galicich JH, French LA, Melby JC. Use of dexamethasone in treatment of cerebral edema associated with brain tumors. *J Lancet* 1961;81:46–53.
16. Hamilton MG, Hull RD, Pineo GF. Prophylaxis of venous thromboembolism in brain tumor patients. *J Neurooncol* 1994;22(2):111–26.
17. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003 Jun;9(6):669-76.

18. Soda Y, Myskiw C, Rommel A, Verma IM. Mechanisms of neovascularization and resistance to anti-angiogenic therapies in glioblastoma multiforme. *J Mol Med (Berl)* 2013 Apr;91(4):439-48.
19. de Groot JF, Yung WK. Bevacizumab and Irinotecan in the treatment of recurrent malignant gliomas. *Cancer J* 2008;14(5):279–85.
20. Kwon HJ, Kim GE, Lee YT, *et al.* Inhibition of platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase and downstream signaling pathways by Compound C. *Cell Signal* 2013 Apr;25(4):883-97.
21. Talasila KM, Soentgerath A, Euskirchen P, *et al.* EGFR wild-type amplification and activation promote invasion and development of glioblastoma independent of angiogenesis. *Acta Neuropathol.* 2013 May;125(5):683-98.
22. Rich JN, Rasheed BK, Yan H. EGFR mutations and sensitivity to Gefitinib. *N.Engl. J. Med.* 2004 Sep;351(12):1260-661.
23. Eller JL, Longo SL, Hicklin DJ, Canute GW. Activity of antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 against glioblastoma multiforme. *Neurosurgery.* 2002;51:1005-13.
24. Grauer OM, Wesseling P, Adema GJ. Immunotherapy of diffuse gliomas: biological background, current status and future developments. *Brain Pathol* 2009; 19(4):674–93.
25. Schneider T, Gerhards R, Kirches E, Firsching R. Preliminary results of active specific immunization with modified tumor cell vaccine in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2001;53(1):39–46.
26. Hall WA. Targeted toxin therapy for malignant astrocytoma. *Neurosurgery* 2000;46(3):544–51.

27. Weber F, Schackert G, Burger KJ, Floeth FW. Somatic gene therapy of glioblastoma. *Dtsch Arztebl* 2000;97(18):A1228–32.
28. Altaner C, Altanerova V. Stem cell based glioblastoma gene therapy. *Neoplasma*. 2012;59(6):756-60.
29. Streit WJ, Kincaid-Colton CA. The brain's immune system. *Sci Am* 1995;273(5):54-5, 58-61.
30. Nissl F. Ueber einige Beziehungen zwischen Nervenzellerkrankungen und gliösen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen. *Arch Psych* 1899;32:1–21.
31. Del Rio-Hortega P. Microglia. In *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. (W. Penfield, ed.), vol. 2, New York, NY, USA, P. B. Hoeber, 1932;481–534.
32. Hausler KG, Prinz M, Nolte C, *et al.* Interferon differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur J Neurosci U. K.* 2002;16: 2113–22.
33. Nguyen KB, Pender MP. Phagocytosis of apoptotic lymphocytes by oligodendrocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* 1998;95:40 – 46.
34. Chugani DC, Kedersha NL, Rome LH. Vault immunofluorescence in the brain: new insights regarding the origin of microglia. *J Neurosci* 1991;11:256–68.
35. Ling EA, Penney D, Leblond CP. Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the “ameboid cells” present in the corpus callosum of postnatal rats. *J Comp Neurol* 1980;193:631–57.

36. Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 1985;15:313–26.
37. Dalmau I, Vela JM, Gonzalez B, Castellano B. Expression of LFA-1 and ICAM-1 in the developing rat brain: a potential mechanism for the recruitment of microglial cell precursors. *Brain Res Dev Brain Res* 1997;103:163–70.
38. Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 1999;117:145–52.
39. Baron M, Gallego A. The relation of the microglia with the pericytes in the cat cerebral cortex. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1972;128:42–57.
40. Lewis PD. The fate of the subependymal cells in the adult rat brain, with a note on the origin of microglia. *Brain* 1968;97:721–38.
41. Ling EA, Wong WC. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 1993;7:9–18.
42. Hess DC, Abe T, Hill WD, *et al.* Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol* 2004;186:134–44.
43. Kennedy DW, Abkowitz JL. Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model. *Blood* 1997;90:986–93.
44. Schroeter M, Jander S, Huitinga I, *et al.* Phagocytic response in photochemically induced infarction of rat cerebral cortex. The role of resident microglia. *Stroke* 1997;28:382–6, 11.
45. Zhang SC, Goetz BD, Carre JL, *et al.* Reactive microglia in dysmyelination and demyelination. *Glia* 2001;34:101–9.

46. Lu J, Moochhala S, Kaur C, *et al.* Cellular inflammatory response associated with breakdown of the blood-brain barrier after closed head injury in rats. *J Neurotrauma* 2001;18:399–408.
47. Fumagalli M, Lecca D, Abbracchio MP. Role of purinergic signalling in neuroimmune cells and adult neural progenitors. *Frontiers in Bioscience* 2011 June 1;16:2326-41.
48. Morris CS, Esiri MM. Immunocytochemical study of macrophages and microglial cells and extracellular matrix components in human CNS disease. *J Neurol Sci* 1991;101:47–58.
49. Wierzba-Bobrowicz T, Kuchna I, Matyja E. Reaction of microglial cells in human astrocytomas (preliminary report). *Folia Neuropathol* 1994;32:251–2.
50. Alterman RL, Stanley ER. Colony stimulating factor-1 expression in human glioma. *Mol Chem Neuropathol* 1994;21:177–88.
51. Prat E, Baron P, Meda L, *et al.* The human astrocytoma cell line U373MG produces monocyte chemotactic protein (MCP)-1 upon stimulation with amyloid protein. *Neurosci Lett* 2000;283:177–80.
52. Stan AC, Walter GF, Welte K, Pietsch T. Immunolocalization of granulocyte-colony-stimulating factor in human glial and primitive neuroectodermal tumors. *Int J Cancer* 1994;57:306–12.
53. Sica A, L Rubino, A Mancino, *et al.* Targeting tumour-associated macrophages. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11(9):1219-29.
54. Spittau B, Wullkopf L, Zhou X, *et al.* Endogenous transforming growth factor-beta promotes quiescence of primary microglia in vitro. *Glia* 2013 Feb;61(2):287-300.
55. Urzyncok TA, Alex AF, Engel D, *et al.* Die Rolle VEGF-exprimierender mononukleärer Phagozyten im murinen Modell der Laser-induzierten

- choroidalen Neovaskularisation. Kongressabstract. Retinologische Gesellschaft. 25. Jahrestagung der Retinologischen Gesellschaft. Münster, 01.-02.06.2012. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House, 2012.
56. Carvalho da Fonseca AC, Badie B. Microglia and Macrophages in Malignant Gliomas: Recent Discoveries and Implications for Promising Therapies. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013:264124.
 57. Balin BJ, Broadwell RD, Salzman M, el-Kalliny M. Avenues for entry of peripherally administered protein to the central nervous system in mouse, rat, and squirrel monkey. *J Comp Neurol* 1986 Sep 8;251(2):260-80.
 58. Oehmichen M, Griininger H, Saebisch R und Narita Y. Mikroglia und Pericyten als Transformationsformen der Blut-Monocyten mit erhaltener Proliferationsfihigkeit. *Acta neuropath* 1973;9(23):200-18.
 59. Thomas, WE. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Rev* 1999;31:42–57.
 60. Guillemin GJ and Brew BJ. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 2004;75:388-97.
 61. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, *et al.* Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 2010;468:824–28.
 62. Hardee M, Zagzag D. Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularisation. *Am J Pathol.* 2012 October;181(4):1126–41.
 63. Spannuth WA, Sood AK and Coleman RL. Angiogenesis as a strategic target for ovarian cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology* 2008;5:194-204.
 64. Yue PY, Mak NK, Cheng YK, *et al.* Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: anti-tumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides. *Chin Med* 2007; 2:6.

65. Chantraina CF, Henriet P, Jodele S, *et al.* Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: A new role for metalloproteinases. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER* 2006;42:310-18.
66. Guo F, Lv S, Lou Y, Tu W, Liao W, Wang Y, Deng Z. Bone marrow stromal cells enhance the angiogenesis in ischaemic cortex after stroke: involvement of notch signalling. *Cell Biol Int* 2012 Nov 1;36(11):997-1004.
67. Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest* 2006 Dec;86(12):1221-32.
68. Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev* 2004 Sep 15; 18(18):2183-94.
69. Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland A., Rich JN. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 2009;8:3274–3284.
70. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, *et al.* HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 2008 Mar;13(3):206-20.
71. Carbajo-Pescador S, Ordoñez R, Benet M, *et al.* Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1 α and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells. *Br J Cancer* 2013 Jul 9;109(1):83-91.
72. England B, Huang T, Karsy M. Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumour Biol.* 2013 Aug;34(4):2063-74.

73. Ausman JI, Shapiro WR, Rall DP. Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors: development of an experimental model. *Cancer Res* 1970;30(9): 2394-400.
74. Zurita E, Chagoyen M, Cantero M, *et al.* Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res* 2011 Jun;20(3):481-9.
75. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M, Naldini L. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005;8(3):211-26.
76. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, *et al.* VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124(1):175-89.
77. Jae K Ryu and James G McLarnon. VEGF receptor antagonist Cyclo-VEG1 reduces inflammatory reactivity and vascular leakiness and is neuroprotective against acute excitotoxic striatal insult. *Journal of Neuroinflammation* 2008;5:18.
78. Rymo SF, Gerhardt H, Wolfhagen Sand F, *et al.* A Two-Way Communication between Microglial Cells and Angiogenic Sprouts Regulates Angiogenesis in Aortic Ring Cultures. *PLoS ONE* 2011;6(1).
79. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, *et al.* VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124(1):175-89.
80. Xubu Wang. Hypoxia enhances CXCR4 expression favoring microglia migration via HIF-1a activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008;371:283-88.
81. Du R, Lu KV, Petritsch C, *et al.* HIF1alpha induces the recruitment of bone

marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 2008;13(3):206-20.

82. Ahn GO, Brown JM. Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. *Cancer Cell* 2008;13(3):193-205.
83. Stromer MH, Bendayan M. Arrangement of desmin intermediate filaments in smooth muscle cells as shown by high-resolution immunocytochemistry. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1988;11: 117-125.
84. Fiala, M, Liu Q N, Sayre,J, *et al.* Cyclooxygenase-2-positive macrophages infiltrate the Alzheimer's disease brain and damage the blood-brain barrier. *Eur J Clin Invest* 2002;32:360-71.
85. Martínez-González A, Calvo GF, Pérez Romasanta LA, Pérez-García VM. Hypoxic cell waves around necrotic cores in glioblastoma: a biomathematical model and its therapeutic implications. *Bull Math Biol* 2012 Dec;74(12):2875-96.
86. Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006 Jun;65(6):529-39.
87. Goplen D, Bougnaud S, Rajcevic U, *et al.* α B-crystallin is elevated in highly infiltrative apoptosis-resistant glioblastoma cells. *Am J Pathol* 2010 Oct;177(4):1618-28.
88. Wallace GC 4th, Haar CP, Vandergrift WA 3rd, *et al.* Multi-targeted DATS prevents tumor progression and promotes apoptosis in ectopic glioblastoma xenografts in SCID mice via HDAC inhibition. *J Neurooncol* 2013 Jun 11.
89. Premkumar DR, Jane EP, Foster KA, Pollack IF. Survivin Inhibitor YM-155 sensitizes TRAIL-resistant Glioma Cells to Apoptosis through Mcl-1 Down-regulation and by engaging the mitochondrial death pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2013 Jun 5.

90. Kesari S. Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments. *Semin Oncol* 2011 Dec;38 Suppl 4:S2-10.
91. Jiang YG, Peng Y, Koussougbo KS. Necroptosis: a novel therapeutic target for glioblastoma. *Med Hypotheses* 2011 Mar;76(3):350-2.
92. Rossi ML, Jones NR, Candy E, *et al.* The mononuclear cell infiltrate compared with survival in high-grade astrocytomas. *Acta Neuropathol* 1989;78:189-93.
93. Bettinger I, Thanos S, Paulus W. Microglia promote glioma migration. *Acta Neuropathol* 2002;103:351-5.
94. Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 2003;3:489-501.
95. Lafuente JV, Adan B, Alkiza K, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFR-beta) in human gliomas. *J Mol Neurosci* 1999;13:177-85.
96. Tsai JC, Goldman CK, Gillespie GY. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. *J Neurosurg* 1995;82:864-73.
97. Kohji T, Matsumoto Y. Coexpression of Fas/FasL and Bax on brain and infiltrating T cells in the central nervous system is closely associated with apoptotic cell death during autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2000;106:165-71.
98. Lamanga C and Bergers G. The bone marrow constitutes a reservoir of pericyte progenitors. *Journal of Leukocyte Biology* 2006;80(4):677-81.
99. Chekenya M, Enger PØ, Thorsen F, *et al.* The glial precursor proteoglycan, NG2, is expressed on tumour neovasculature by vascular pericytes in human malignant brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2002 Oct;28(5):367-80.

100. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, *et al.* Role of PDGF-B and PDGFR- β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 1999;126:3047-55
101. Terrile M, Appolloni I, Calzolari F, *et al.* PDGF-B-driven gliomagenesis can occur in the absence of the proteoglycan NG2. *BMC Cancer* 2010;10:550.
102. Skalli O, Pelte M-F, Peclet M-C, *et al.* α -Smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem* 1989;37:315-21.
103. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, *et al.* A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: A new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986;103:2787-96.
104. Sims DE. Recent advances in pericyte biology – Implications for health and disease. *Can J Cardiol* 1991;7:431-43.
105. Nehls V, Drenckhahn D. The versatility of microvascular pericytes: From mesenchyme to smooth muscle? *Histochemistry* 1993;99:1-12.
106. Sims DE. The pericyte – A review. *Tissue Cell* 1986;18:153-74.
107. Wesseling P, Schlingemann RO, Rietveld FJR, *et al.* Early and Extensive Contribution of Pericytes/Vascular Smooth Muscle Cells to Microvascular Proliferation in Glioblastoma Multiforme: An Immuno-light and Immuno-electron Microscopic Study. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1995;54(3):304-10.
108. Rajantie I, Ilmonen M, Alminaitte A, *et al.* Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 2004;104(7):2084-86.
109. Rhodin J. Ultrastructure of mammalian venous capillaries. venules. and small collecting veins. *J Ultrastruct Res* 1968;25:425-500.

110. Meyrick B, Reid L. Ultrastructural features of the distended pulmonary arteries of the normal rat. *Anat Ret* 1979;193:71-98.
111. Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular Research* 1996; 32:687-98.
112. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):401-10.
113. Eichten A, Adler AP, Cooper B, *et al.* Rapid decrease in tumor perfusion following VEGF blockade predicts long-term tumor growth inhibition in preclinical tumor models. *Angiogenesis* 2013 Apr;16(2):429-41.
114. Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, *et al.* Vascular endothelial growth factor acts as a pericyte mitogen under hypoxic conditions. *Lab Invest* 1999;79:501-09.
115. Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, *et al.* Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by pericytes during angiogenesis in tumors and in healing wounds. *Am J Pathol* 1990;136:1393-1405.
116. Schlingemann RO, Rietveld FJ, Kwaspen F, *et al.* Differential expression of markers for endothelial cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation tissue. *Am J Pathol* 1991;138:1335-47.
117. Birnbaum T, Hildebrandt J, Nuebling G, *et al.* Glioblastoma – dependent differentiation and angiogenic potential of human mesenchymal stem cells in vitro. *J Neuroonkol* 2011 Oct;105(1):57-65.
118. Ozerdem U, Stallcup WB. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis* 2003;6(3):241-49.

119. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005;97(6):512-23.
120. Ozerdem U, Alitalo K, Salven P, Li A. Contribution of bone marrow- derived pericyte precursor cells to corneal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(10):3502-06.
121. Ozerdem U, Alitalo K, Salven P, *et al.* Contribution of Bone Marrow–Derived Pericyte Precursor Cells to Corneal Vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3502-06.
122. Rajantie I, Ilmonen M, Alminaitte A, *et al.* Adult bone marrow–derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 2004;104:2084-86.
123. Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, *et al.* Chondrogenic and adipogenic potential of micro- vascular pericytes. *Circulation* 2004;110(15):2226-32.
124. Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, *et al.* Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol* 2004;167(5):935-44.
125. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, *et al.* Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 2007;9(3):255-67.
126. Hayden MR, Karuparthi PR, Habibi J, *et al.* Ultrastructural islet study of early fibrosis in the Ren2 rat model of hypertension. Emerging role of the islet pancreatic pericyte-stellate cell. *JOP* 2007;8(6):725-38.
127. Hayden R, Karuparthi PR, Habibi J, *et al.* Ultrastructure of Islet Microcirculation, Pericytes and the Islet Exocrine Interface in the HIP Rat Model of Diabetes. *Experimental Biology and Medicine* 2008;233:1109-23.

128. Thomas WE. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999 Dec;31(1):42-57.
129. Sundberg C, Nagy JA, Brown LF, *et al.* Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery. *J Pathol* 2001 Mar;158(3):1145-60.
130. Barlow KD, Sanders AM, Soker S, *et al.* Pericytes on the tumor vasculature: jekyll or hyde? *Cancer Microenviron* 2013 Apr;6(1):1-17.
131. Abaza MS, Shaban F, Narayan RK, Atassi MZ. Human glioma associated intermediate filament proteins: over-expression, co-localization and cross-reactivity. *Anticancer Res* 1998 Mar-Apr;18(2B):1333-40.
132. Hirato J, Nakazato Y, Ogawa A. Expression of non-gliial intermediate filament proteins in gliomas. *Clin Neuropathol* 1994 Jan-Feb;13(1):1-11.
133. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial–pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003;314:15–23.
134. Wong E, Tan J, Soong W-E, *et al.* Autophagy-mediated clearance of aggresomes is not a universal phenomenon. *Human Molecular Genetics* 2008;17(16):2570-82.
135. Huysentruyt LC, Akgoc Z and Seyfried TN. Hypothesis: are neoplastic macrophages/microglia present in glioblastoma multiforme? *Asn Neuro* 2011;3(4).
136. Xu Y, Xia X, Pan H. Active autophagy in the tumor microenvironment: A novel mechanism for cancer metastasis. *Oncol Lett* 2013 Feb;5(2):411-416.
137. Liu B, Cheng Y, Liu Q, Bao JK, Yang JM. Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta Pharmacol Sin* 2010 Sep;31(9):1154-64.
138. Zhang X, Chen LX, Ouyang L, Cheng Y, Liu B. Plant natural compounds: targeting pathways of autophagy as anti-cancer therapeutic agents. *Cell Prolif* 2012 Oct;45(5):466-76.

139. Martinez-Outschoorn UE, Trimmer C, Lin Z, Whitaker-Menezes D *et al.* Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: Role of hypoxia, HIF1 induction and NFκB activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle* 2010 Sep 1;9(17):3515-33.
140. Mora R, Régnier-Vigouroux A. Autophagy-driven cell fate decision maker: activated microglia induce specific death of glioma cells by a blockade of basal autophagic flux and secondary apoptosis/necrosis. *Autophagy* 2009 Apr;5(3):419-21.
141. Kaur, C, Hao A J, Wu CH, *et al.* Origin of microglia. *Microsc Res Tech* 2001;54:2-9.
142. Jordan F L, Thomas W E. Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res* 1988;472:165-178.
143. Theele D P, Streit W J. A chronicle of microglial ontogeny. *Glia* 1993;7:5-9.
144. Cuadros M A, Navascues J. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 1998;56:173-189.
145. Dore-Duffy P, Owen C, Balabanov R, *et al.* Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury. *Microvasc Res* 2000;60:55-69.
146. Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 2002;40:133-9.
147. Ryu JK and McLarnon JG. VEGF receptor antagonist Cyclo-VEGI reduces inflammatory reactivity and vascular leakiness and is neuroprotective against acute excitotoxic striatal insult. *Journal of Neuroinflammation* 2008;5:18.
148. Huysentruyt LC, Seyfried TN. Perspectives on the mesenchymal origin of metastatic cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:695-707.

149. Shabo I, Olsson H, Sun XF, Svanvik J. Expression of the macrophage antigen CD163 in rectal cancer cells is associated with early local recurrence and reduced survival time. *Int J Cancer* 2009;125:1826-31.
150. Seyfried TN, Kiebish MA, Marsh J, *et al.* Metabolic management of brain cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1807:577-94.
151. Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab* 2010;7:7.
152. Kiebish MA, Han X, Cheng H, Chuang JH, Seyfried TN. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *J Lipid Res* 2008;49:2545-56.
153. Szala S, Jarosz M. Tumor blood vessels. *Postepy Hig Med Dosw* 2011 Jul 4;65:437-46.
154. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, *et al.* Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 2010 Dec;468(7325):829-33.
155. Rodriguez FJ, Orr BA, Ligon KL, Eberhart CG. Neoplastic cells are a rare component in human glioblastoma microvasculature. *Oncotarget* 2012 Jan;3(1):98-106.
156. Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, *et al.* Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 2007;10(12):1544-53.
157. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 2007;10(12):1538-43.

158. Massengale M, Wagers AJ, Vogel H, Weissman IL. Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain. *J Exp Med* 2005;201(10):1579-89.
159. Stone TW. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* 1993;45:309-79.
160. Brew BJ, Pemberton L, Evans L, *et al.* Quinolinic acid production is related to macrophage tropic isolates of HIV-1. *J Neurovirol* 1995;1:369-74.
161. Owe-Young R, Guillemin GJ, Mukhtar M, *et al.* Kynurenine pathway metabolism in human blood-brain barrier endothelial cells. Vth International Conference of Cerebral Vascular Biology 2003.
162. Espey MG, Chernyshev ON, Reinhard JJ, Namboodiri MA, Colton CA. Activated human microglia produce the excitotoxin quinolinic acid. *Neuroreport* 1997;8:431-34.
163. Alberati-Giani D, Ricciardi-Castagnoli P, Kohler C, Cesura AM. Regulation of the kynurenine metabolic pathway by interferon - in murine cloned macrophages and microglial cells. *J Neurochem* 1996;66:996-1004.
164. Guillemin GJ, Smith DG, Smythe GA, Armati PJ, Brew BJ. Expression of the kynurenine pathway enzymes in human microglia and macrophages. *Adv Exp Med Biol* 2003;527:105-12.
165. Kokovay E, Li L, Cunningham LA. Angiogenic recruitment of pericytes from bone marrow after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006 Apr;26(4):545-55.
166. Roca C and Adams RH. Molecular differentiation and specialisation of vascular beds. *Genes and Development* 2007;21:2511-24.
167. Adams RH and Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007;8:464-78.

168. Suchting S, Freitas C, le Noble F, *et al.* The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2007;104:3225-30.
169. Benedito R, Roca C, Sørensen I, *et al.* The Notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 2009;137:1124-35.
170. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 1998 June;57(1):1–9.
171. Autieri MV. cDNA cloning of human allograft inflammatory factor-1: tissue distribution, cytokine induction, and mRNA expression in injured rat carotid arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 Dec;228(1):29–37.
172. Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, Russell ME. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J Clin Invest* 1995;95(6):2954–62.
173. Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, *et al.* Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem. Biophys Res Commun* 2001;286(2):292–7.
174. Autieri MV, Kelemen SE, Wendt KW. AIF-1 is an actin-polymerizing and Rac1-activating protein that promotes vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res* 2003;92(10):1107–14.
175. Chen X, Kelemen SE, Autieri MV. AIF-1 expression modulates proliferation of human vascular smooth muscle cells by autocrine expression of G-CSF. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;24(7):1217–22.

176. Oliver Müller, Christoph Wagener Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte. 3., komplett aktualisierte und erweiterte Auflage, 2010 Georg Thieme Verlag, ISBN 978-3-13-103513-4;Seite 379.
177. Takeuchi H, Hashimoto N, Kitai R, Kubota T, Kikuta K. Proliferation of vascular smooth muscle cells in glioblastoma multiforme. J Neurosurg 2010 Aug;113(2):218-24.
178. Naito H, Takara K, Wakabayashi T, Kawahara H, Kidoya H, Takakura N. Changes in blood vessel maturation in the fibrous cap of the tumor rim. Cancer Sci 2012 Mar;103(3):433-8.
179. Hwang SY, Yoo BC, Jung JW, Oh ES, Hwang JS, Shin JA, et al. Induction of glioma apoptosis by microglia-secreted molecules: The role of nitric oxide and cathepsin B. Biochim Biophys Acta 2009 Nov;1793(11):1656-68.
180. Chang GH, Barbaro NM, Pieper RO. Phosphatidylserine-dependent phagocytosis of apoptotic glioma cells by normal human microglia, astrocytes, and glioma cells. Neuro Oncol. 2000 Jul;2(3):174-83.
181. Evans SM, Judy KD, Dunphy I, et al. Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. Clin Cancer Res 2004;10(24):8177-84.
182. Fyles AW, Milosevic M, Wong R, Kavanagh MC, Pintilie M, Sun A, Chapman W, Levin W, Manchul L, Keane TJ, Hill RP. Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. Radiother Oncol 1998;48(2):149-56.
183. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, Dammacco F. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. Br J Haematol 1994;87(3):503-8.
184. Höckel M, Schlenger K, Knoop C, Vaupel P. Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: evaluation by computerized O₂ tension measurements. Cancer

Res 1991;51(22):6098-102.

185. Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol* 2005 Oct;15(4):297-310.
186. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res* 2010 May 1;86(2):236-42.
187. Watnick RS. The role of the tumor microenvironment in regulating angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012 Dec 1;2.
188. Kizaka-Kondoh S, Kuchimaru T, Kadonosono T. Pathophysiological response to hypoxia - from the molecular mechanisms of malady to drug discovery: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)-active cells as a target for cancer therapy. *J Pharmacol Sci* 2011;115(4):440-5.
189. Evans SM, Jenkins KW, Jenkins WT, Dilling T, Judy KD, Schrlau A, et al. Imaging and analytical methods as applied to the evaluation of vasculature and hypoxia in human brain tumors. *Radiat Res* 2008 Dec;170(6):677-90.
190. Kilic-Eren M, Boylu T, Tabor V. Targeting PI3K/Akt represses Hypoxia inducible factor-1alpha activation and sensitizes Rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma cells for apoptosis. *Cancer Cell Int* 2013 Apr 16;13(1):36.

5.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Darstellung der chromosomalen und genetischen Abberationen in Glioblastoma multiforme.
- Abb. 2:** Makroskopisches und mikroskopisches Präparat des Gehirns mit Glioblastoma multiforme.
- Abb. 3:** Darstellung von zwei unterschiedlichen Immunphänotypen der aktivierten Mikroglia als Mediatoren der Inflammation.
- Abb. 4:** Vereinfachte schematische Darstellung der Zellen myeloischen Ursprunges in der perivaskulären Nische des ZNS.
- Abb. 5:** Mechanismen der Gefäßneubildung in Tumoren.
- Abb. 6:** Schematische Darstellung der Sauerstoff – abhängigen Regulation der Genexpression, vermittelt durch HIF-1 α .
- Abb. 7:** HIF-1 ist ein wichtiger Regulator der Rekrutierung von Knochenmark – stammenden Zellen (bone marrow derived cells) in Tumoren.
- Abb. 8:** Darstellung der ApopTag® Methodik.
- Abb. 9:** α SMA⁺ - Zellen sind streng mit Tumorblutgefäßen assoziiert.
- Abb. 10:** Desmin⁺ – Zellen sind im Tumorgewebe sowohl in Kontakt mit Blutgefäßen als auch vereinzelt zu finden.
- Abb. 11:** Darstellung von zwei wesentlichen Populationen der Perizyten im Glioblastom.
- Abb. 12:** Darstellung von Kontaktstellen der Mikroglia/Makrophagen mit der Tumorgefäßwand.
- Abb. 13:** Darstellung der Assoziation von Mikroglia/Makrophagen mit Endothelzellen (A) und Perizyten (B) in GL261-Tumoren mittels Konfokalmikroskopie.
- Abb. 14:** Gefäß – assoziierte Mikroglia/Makrophagen in Abhängigkeit vom Zelltyp der Gefäßwand und der Tumorprogression (A und B).
- Abb. 15:** Iba-1⁺ - Zellen exprimieren Desmin.
- Abb. 16:** Übersichtsbild der eingewanderten Zellen aus dem Knochenmark (GFP –transfizierte Monozyten, grün).
- Abb. 17:** GFP – transfizierte Gliomzellen zeigen Desminexpression.
- Abb. 18:** GFP – transfizierte Gliomzellen zeigen Iba-1- und Desminexpression.
- Abb. 19:** Tumorzellen (große violette Kerne) mit Desminexpression ohne (A, Pfeil

links) und mit (A, Pfeil rechts oben) Kontakt zu Blutgefäßen.

- Abb. 20:** Apoptotische Kerne im Tumorbereich.
- Abb. 21:** Quantitative Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellkerne im Tumorareal und im Tumorrand.
- Abb. 22:** Apoptotische Aktivität in GL261 – Tumoren in Abhängigkeit vom Tumorwachstum (A, B und C).
- Abb. 23:** Anzahl apoptotischer Mikroglia/Makrophagen pro mm^2 im Tumor und Tumorrand zu drei verschiedenen Zeitpunkten des Tumorwachstums (Tag 7, Tag 14 und Tag21).
- Abb. 24:** Ermittlung und Vergleich im zeitlichen Verlauf des Anteils an apoptotischen Mikroglia/Makrophagen innerhalb der gesamten Mikroglia/Makrophagen – Population pro mm^2 im Tumorareal und Tumorrand.
- Abb. 25:** Darstellung von hypoxischen Gliomzellen (Pfeile) am Rand des Tumors, 21 Tage nach der Implantation.
- Abb. 26:** Übersicht von hypoxischen Arealen im Tumor im zeitlichen Verlauf.
- Abb. 27:** Aktivitätsformen von Mikroglia/Makrophagen im Tumor (A, B, C und D).
- Abb. 28:** Veranschaulichung der Interaktion von Mikroglia/Makrophagen mit hypoxischen Gliomzellen im Maustumormodell.
- Abb. 29:** Detektierung von gefäßassoziierten hypoxischen Gliomzellen.
- Abb. 30:** Hypoxische Mikroglia und Makrophagen im Tumor (A, B, C und D).
- Abb. 31:** Hypoxische und apoptotische Aktivität im Tumor (A und B).

5.3 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Zusammenfassung der WHO – Grade von astrozytären Tumoren des zentralen Nervensystems (2007).
- Tabelle 2:** Zusammenfassung der verwendeten Puffer und Medien.
- Tabelle 3:** Charakteristika der verwendeten Tierart.
- Tabelle 4:** Primäre Antikörper.
- Tabelle 5:** Sekundäre Antikörper.
- Tabelle 6:** Nukleäre Färbungen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Sergej Rot, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung der Mikroglia im Glioblastom und deren Interaktion mit Tumorblutgefäßen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

Datum

Unterschrift

LEBENS LAUF

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

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

PUBLIKATIONEN

Mitautorschaft in:

Freimann FB, Müller S, Streitberger KJ, Guo J, Rot S, Ghori A, Vajkoczy P, Reiter R, Sack I, Braun J. *MR elastography in a murine stroke model reveals correlation of macroscopic viscoelastic properties of the brain with neuronal density*. NMR Biomed 2013 Nov;26(11):1534-9.

VORTRÄGE

Distribution of microglia cells in the area of glioblastoma and their interaction with tumor blood vessels. YIM (Young Investigators Meeting) SPP1190, Berlin, Mai 25-27, 2011

Characterization of microglia in the perivascular niche of glioblastoma multiforme. Berlin Neuroscience Forum 2012, Liebenwalde, Juli 5-6, 2012

Danksagung

An erster Stelle möchte ich herzlich Herrn Prof. Dr. med. P. Vajkoczy für die Überlassung dieses Themas, für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und seine großzügige Unterstützung während meiner Forschungszeit an seinem Institut für Experimentelle Neurochirurgie danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Susan Brandenburg für die hervorragende Betreuung, stete Präsenz, breite fachliche Unterstützung, für das freundschaftliche Arbeitsklima in unserer Arbeitsgruppe „Mikroglia“ und vor allem für ihre unendliche Geduld.

Ebenso möchte ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger W. Veh für die Einführung in den wissenschaftlichen Alltag und seine lehrreichen Ratschläge danken.

An dieser Stelle möchte ich herzlichst Annett Müller und Kati Turkowski danken, die mir stets freundlich zugewandt und mal am späten Nachmittag mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich bedanke mich bei der ganzen Laborcrew für die reibungslose Gestaltung der Experimente, insbesondere bei Frau Dipl. Biol. Irina Kremenetskaia und Adnan Ghorri.

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie, die mich im außerordentlichen Maß während der Arbeit unterstützt hat.