

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus

**Die Rolle von durch rhGM-CSF aktivierten Makrophagen bei der Immunabwehr von
Glioblastomen im orthotopen C6-Tumormodell der Ratte**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anna Jawork

aus Saaß

Würzburg, November 2020

Referentenblatt

Referent: Prof. Dr. med. Giles Hamilton Vince

Korreferent bzw. Korreferentin: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2022

Die Promovendin ist Ärztin.

Für Elisabeth

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Das Glioblastom.....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Klinik und Diagnostik	1
1.1.3 Pathologie.....	2
1.1.4 Therapie und Prognose	3
1.2 Immunologie des Glioblastoms.....	8
1.3 Das Immunsystem und die Rolle der Makrophagen	8
1.4 Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor	10
1.5 Tiermodell mit orthotoper C6-Sphäroidimplantation.....	11
1.6 Spontane Regression	14
1.7 Zielsetzung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.3 Chemikalien und Lösungen.....	19
2.1.4 Zelllinien und Versuchstiere	22
2.1.5 Antikörper	22
2.2 Zellkultur	23
2.2.1 Auftauen der C6-Zellen	23
2.2.2 Passagieren der C6-Zellen	23
2.2.3 Agarbeschichtung der Zellkulturflaschen und Well-Platten.....	24
2.2.4 Sphäroide ansetzen und Picken	24
2.3 Tierversuch	26
2.3.1 Orthotope Implantation der C6-Sphäroide	26
2.3.2 Magnetresonanztomographische Untersuchungen	27
2.3.3 Volumetrie	27

2.4 Histologie	28
2.4.1 Konventionelle Färbungen	29
2.4.2 Immunhistochemische Färbungen	29
2.4.3 Auswertung.....	30
2.5 Statistik.....	31
3 Ergebnisse.....	32
3.1 Volumetrie.....	32
3.2 Kaplan-Meier-Analyse.....	35
3.3 Histologie	36
4 Diskussion.....	41
4.1 Tiermodell	42
4.2 Glioblastoma multiforme und die Rolle der Makrophagen.....	43
5 Zusammenfassung.....	51
6 Anhang	53
6.1 Veröffentlichungen.....	53
6.2 Abbildungsverzeichnis	54
6.3 Abkürzungsverzeichnis	55
6.4 Literaturverzeichnis	58

1 Einleitung

1.1 Das Glioblastom

1.1.1 Epidemiologie

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste primäre maligne Tumor des Gehirns beim Erwachsenen und macht etwa 50% der Tumoren des zentralen Nervensystems aus. Das GBM wird in der Gruppe der neuroepithelialen Tumoren den astrozytären Tumoren zugeordnet. Astrozytome nehmen mit 86% aller Tumoren des zentralen Nervensystems den größten Teil ein und treten mit einer Inzidenz von 4,8 Fällen pro 100.000 Einwohner auf. Im Verhältnis sind Männer 1,4-fach häufiger betroffen als Frauen. Unter den Astrozytomen sind mit 63% höhergradige Gliome am häufigsten vertreten, zu diesen wird auch das GBM gezählt. Am höchsten ist die Inzidenz in der Bevölkerungsgruppe im Alter über 60 Jahre mit einem Wert von 11,6 pro 100.000 [1]. Das GBM kann entweder *de novo* entstehen, wobei es sich dann um ein primäres GBM handelt, oder es entwickelt sich als sekundäres GBM aus einem niedergradigen Astrozytom. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt beim sekundären GBM bei etwa 45 Jahren, wohingegen sich das primäre GBM bei älteren Patienten ab etwa 62 Jahren manifestiert. Der Krankheitsverlauf ist dann meist rapide. Patienten mit sekundärem GBM zeigen meist eine längere Anamnese, wobei Patienten mit primärem GBM selten länger als sechs Monate über Symptome klagen [2-4].

1.1.2 Klinik und Diagnostik

Typischerweise ist das GBM im Parenchym der Großhirnhemisphären lokalisiert. Bei einer Tumordinfiltration des Balkens bis zur gegenüberliegenden Hemisphäre spricht man vom Schmetterlingsgliom. Beim Befall mehrerer Großhirnlappen handelt es sich um eine *Gliomatosis cerebri* [5, 6]. Die Symptome bleiben zunächst unspezifisch und sind auf die relativ rasche Erhöhung des Hirndruckes zurückzuführen. Typisch dabei sind Kopfschmerzen, Sehstörungen, Übelkeit und Erbrechen. Beim Befall eloquenter Regionen durch den Tumor können auch neurologische Ausfälle wie Gefühlsstörungen, Lähmungen sowie epileptische

Anfälle als Frühsymptome auftreten. Die neurologischen Defizite können je nach Lokalisation des Tumors sämtliche Funktionen des Gehirns betreffen. So werden Patienten z. B. auch durch Gang- oder Sprachstörungen, kognitive Beeinträchtigungen oder Wesensveränderungen auffällig. Meist bestehen die Symptome vor Diagnosestellung nur wenige Wochen bis Monate [3].

Bei der Diagnostik des GBM spielen bildgebende Maßnahmen eine entscheidende Rolle. Zur Anwendung kommen die cranielle Computertomographie (CCT) und die Magnetresonanztomographie (MRT). Beide Verfahren werden mit und ohne Kontrastmittelgabe durchgeführt. Das Tumorgewebe stellt sich im CCT als kontrastmittelaufnehmende Hyperdensität dar. Typisch ist dabei eine girlandenartige Anordnung des kontrastmittelaufnehmenden Bereiches mit zentraler Hypodensität, welche auf eine zentrale Nekrose zurückzuführen ist. Im MRT kann mittels unterschiedlicher Sequenzen (T1-gewichtet, T2-gewichtet, *Fluid Attenuated Inversion Recovery* (FLAIR)) Tumorgewebe vom typischen peritumoralen Ödem abgegrenzt werden [6].

Nach den bildgebenden Maßnahmen erfolgt eine Gewebeentnahme entweder als stereotaktische Biopsie oder während der chirurgischen Resektion. So kann mittels histologischer Untersuchung durch Neuropathologen die Diagnosesicherung erfolgen [7].

1.1.3 Pathologie

Makroskopisch zeichnet sich die Schnittfläche des GBM durch ein sogenanntes „buntes Bild“ aus, bei dem Nekrosen, Einblutungen und solides Tumorgewebe nebeneinander zu sehen sind. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) teilt Gehirntumoren histologisch mit steigender Malignität in Grade von I-IV ein, wobei das GBM dem Grad IV angehört. Grad IV-Tumoren sind gekennzeichnet durch eine hohe Teilungsaktivität der Zellen, Nekrosen im Tumorgewebe, weitreichende Infiltrationen auch von gesundem Gewebe durch Tumorzellen, sowie durch zahlreiche Gefäßneubildungen [8]. Mikroskopisch sind neben polymorphen Zellen zahlreiche Mitosen zu erkennen. Nicht selten treten mehrkernige Riesenzellen auf. Typisch für das GBM ist eine palisadenförmige Anordnung der Tumorzellen um die

Nekrosen herum. Des Weiteren zeichnet sich diese Tumorart durch etliche glomeruloide Gefäßneubildungen aus [5]. Typisch für die Pathogenese des GBM sind das diffuse Wachstum und die weitreichende Invasivität der Tumorzellen. Oft sind diese weit von der Tumormasse entfernt im gesunden Gehirngewebe lokalisiert und stellen nach chirurgischer Resektion den Ausgangspunkt für einen rekurrenten Krankheitsverlauf dar [9]. Gelegentlich lassen sich im Schnittbild primäre von sekundären GBM anhand des Ausmaßes der Nekrosen unterscheiden. Bei der sekundären Form machen Nekrosen etwa ein Zehntel des Tumorgewebes aus. Im Gegensatz dazu weist die primäre Form häufig mehr als die Hälfte nekrotisches Gewebe auf [2, 4].

1.1.4 Therapie und Prognose

Zu Beginn der Therapie steht in der Regel die chirurgische Resektion. Dabei ist neben der maximal möglichen Radikalität für bestmöglichen Funktionserhalt auch die Schonung des umliegenden Hirngewebes wichtig. Aufgrund der weitreichenden Invasivität der Tumorzellen ohne glatte Begrenzung der Tumormasse ist eine radikale Operation aufgrund der Lokalisation im Gehirn nicht möglich. Dies ist ursächlich für das häufige Auftreten von Lokalrezidiven. Hauptmerkmale des Rezidivs in der Bildgebung sind u. a. eine erneute bzw. vergrößerte Kontrastmittelaufnahme, eine Zunahme des intrazerebralen Ödems sowie lokale Auswirkungen durch die Tumormasse, wie z. B. eine Mittellinienverlagerung. Davon schwierig zu unterscheiden ist die Beeinflussung der Therapie auf die Bildgebung, da sowohl die chirurgische Resektion als auch die postoperative Bestrahlung zu diesen Veränderungen führen können [10]. Hilfreich bei der chirurgischen Resektion kann im Vorfeld eine Markierung des Tumorgewebes mittels 5-Aminolävulinolinsäure (5-ALA) sein. Dabei erhält der Patient vor der Operation oral 5-ALA (20mg/kg Körpergewicht), welches im Tumorgewebe zu Porphyrin umgewandelt wird. Unter blauem Licht fluoresziert dieser Stoff im Tumorgewebe rötlich. Dies ermöglicht dem Operateur intraoperativ den Übergang zwischen Tumorgewebe und gesundem Hirngewebe besser zu erkennen. So können die Schäden an nicht betroffenem Hirngewebe möglichst geringgehalten werden. Die präoperative Markierung des Tumorgewebes mit 5-ALA führte zu einer

Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (PFÜ) nach sechs Monaten von 21% auf 41% der Patienten [11]. Der chirurgischen Resektion folgt anschließend eine kombinierte Radiochemotherapie. Der Patient erhält eine Gesamtstrahlendosis von 60Gray (Gy). Diese wird in Dosen von 2Gy an fünf Tagen der Woche über einen Zeitraum von sechs Wochen appliziert. Gleichzeitig erhält der Patient das alkylierende Chemotherapeutikum Temozolomid. Dies nimmt der Patient täglich für die gesamte Dauer der Bestrahlung in einer Dosis von 75mg/m² Körperoberfläche ein. Durch die kombinierte Radiochemotherapie konnte das mediane Überleben im Gegensatz zur alleinigen Strahlentherapie von 12,1 Monaten auf 14,6 Monate verbessert werden [12]. Zusätzlich zeigten Stupp et al. 2009, dass dadurch die Fünfjahresüberlebensrate bei diagnostiziertem GBM von 1,9% auf 9,8% gesteigert werden konnte [13].

Die Diagnose GBM ist trotz Ausschöpfen der möglichen Therapie mit chirurgischer Resektion und anschließender Radiochemotherapie mit einer infausten Prognose verknüpft. Die Fünfjahresüberlebensrate betrug zwischen 1995 und 2002 für höhergradige Gliome in Europa lediglich 4,9% [1]. Für das Outcome des Patienten sind neben dem Karnowsky-Index, dem Alter des Patienten bei Erkrankung sowie der Lokalisation und Größe des Tumors auch das mögliche Ausmaß der chirurgischen Resektion und die nachfolgende Chemotherapie mit Temozolomid von Bedeutung [14, 15].

Zunehmend gewinnen molekulargenetische Untersuchungen der Tumorzellen für eine Einschätzung des Ansprechens auf die Therapie und der Prognose an Bedeutung. Es sind viele genetische Veränderungen der Zellen des GBM bekannt. Zu den häufigsten Veränderungen zählen die Amplifikation des Gens des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), Mutationen u. a. im Retinoblastom-Gen (RB-Gen) und im Tumorprotein 53-Gen (TP53-Gen). Zudem können Deletionen auf den Chromosomen 1, 19, 22 und 10 [16, 17], sowie die Amplifikation des Chromosoms 7 auftreten [16]. So kann bei Mutationen im Tumorsuppressorgen TP53 unabhängig vom Alter des Patienten von einem positiveren Verlauf ausgegangen werden. Im Gegensatz dazu führt der sogenannte *Loss of Heterozygosity* (LOH) des langen Armes des Chromosoms 10 (LOH10q) zu einer schlechteren Prognose [17]. Falls die beiden

Deletionen LOH1p und LOH19q gemeinsam auftreten, kann das für eine günstigere Prognose und eine bessere Wirksamkeit der Chemotherapie bei den jeweiligen Patienten sprechen [17]. Eine weitere häufige Veränderung ist die Mutation im aktiven Zentrum der Isozitatdehydrogenase 1 (IDH1), welche häufig mit der Diagnose eines sekundären GBM assoziiert ist. Diese Mutation tritt vermehrt bei jüngeren Patienten im Alter von 32-41 Jahren mit rekurrentem Glioblastom auf [4, 16, 18]. Inzwischen ist eine Testung des O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gens (MGMT) üblich. Es kodiert für ein Enzym, welches die von Temozolomid erzeugten Schäden der Desoxyribonukleinsäure (DNA) wieder reparieren kann. Falls bei einem Patienten dieses Gen im Rahmen des *Gene-Silencing* methyliert, d. h. ausgeschaltet ist, wird dieser Patient von der kombinierten Radiochemotherapie mit Temozolomid mehr profitieren als von der Bestrahlung alleine [13, 19].

Neben der Standardtherapie mit Chirurgie und Radiochemotherapie sind inzwischen auch andere Therapieansätze in der Erprobung. Dazu zählen Gentherapie, Immuntherapie und Antiangiogenese. Höhergradige Gliome gehören u. a. zu den am besten mit Gefäßen versorgten Tumoren [20, 21]. In höhergradigen Gliomen ist der Wachstumsfaktor für Gefäße, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) [22] und dessen Rezeptor, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (VEGFR 2) [23] stark hochreguliert [21, 23]. Dies stellt einen weiteren Ansatz in der Tumorthherapie dar. In Studien werden Patienten mit rekurrentem GBM mit einem monoklonalen Anti-VEGF-Antikörper (Bevacizumab) behandelt. Die Therapie findet entweder als Monotherapie statt, oder Bevacizumab wird in Kombination mit Irinotecan verabreicht. Es zeigte sich eine Verbesserung des PFÜ, das Gesamtüberleben (GÜ) war dadurch jedoch nicht signifikant verlängert [24-26].

Die Immuntherapie soll die Aufmerksamkeit des Immunsystems des Patienten auf den Tumor lenken. Eine Möglichkeit dafür ist die sogenannte Impfung mit dendritischen Zellen. Dendritische Zellen des Patienten, professionelle antigenpräsentierende Zellen, werden *in vitro* mit Antigenen des Tumortyps konfrontiert. Diese nun mit den Antigenen des Tumors bestückten antigenpräsentierenden Zellen werden dem Patienten wieder infundiert und aktivieren dessen eigene zytotoxischen T-Zellen. So wird das Immunsystem durch

Antigenpräsentation auf den Tumor aufmerksam gemacht und sollte diesen bekämpfen können. Z. B. Sampson et al. konnten so in einer Phase-II-Studie bei Patienten mit GBM durch eine Impfung mit dendritischen Zellen gegen den *Epidermal Growth Factor Receptor Variant III* (EGFRvIII) eine Verlängerung des PFÜ und des GÜ zeigen [27, 28]. Dies sind hoffnungsvolle Ergebnisse, welche einer Überprüfung in weiterführenden, randomisierten Studien bedürfen [28].

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den Patienten mit autologen Tumorzellen zu impfen. Diese werden bei der Operation gewonnen, mit Formalin fixiert, fragmentiert und zentrifugiert. Nachdem die so behandelten Zellen mit Tuberkulinmikropartikeln und löslichem Tuberkulin als Verstärker versetzt wurden, kann der Patient damit geimpft werden. Die Reaktion des Patienten auf die Tuberkulinpartikel der Bacille-Calmette-Guérin-Impfung muss zuvor mittels Mantoux-Hauttest geprüft werden. Muragaki et al. führten dazu bei Glioblastompatienten eine Phase-I/IIa-Studie durch und zeigten eine Verbesserung des PFÜ als auch des GÜ. Es konnte eine direkte Korrelation zwischen der Größe der Hautreaktion beim Mantoux-Test und der Verlängerung sowohl des PFÜ als auch des GÜ festgestellt werden [28, 29].

Einen weiteren Therapieansatz stellt die Gentherapie dar. Als Beispiel wird hier die virusvermittelte Übertragung eines für ein Enzym codierenden Genabschnitts beschrieben. Dabei wird mittels eines Vektors ein codierender Genabschnitt in eine Zelle transferiert. Die Zelle produziert dann das gewünschte Genprodukt oder wird so auf die gewünschte Weise verändert. Als Vektor kommen u. a. genetisch veränderte Viren (z. B. Adenoviren) zur Anwendung. Die Viren der von Chen et al. beschriebenen Methode kodieren für die Herpes simplex-Virus-Thymidinkinase und wurden derart verändert, dass sie von Tumorzellen und Endothelzellen der Tumorgefäße bevorzugt aufgenommen werden. Nach Einbringung der Viren in die Operationshöhle wird dem Patienten eine inaktive Vorstufe eines Herpes-Virostatikums (Valacyclovir) verabreicht. Durch die Herpes simplex-Virus-Thymidinkinase wird dann in den Tumorzellen diese Vorstufe in ein zytotoxisches Nukleotidanalogen umgewandelt, welches in teilungsaktive Zellen eingebaut wird. Dies führt dann bei der Zellteilung der Tumorzellen zur direkten Schädigung der

Zelle, zur Störung der Angiogenese und zur Stimulation des Immunsystems. Gesundes, nicht teilungsaktives Hirngewebe bleibt dabei verschont [28, 30].

Weitere Möglichkeiten sind die Übertragung von Tumorsuppressorgenen und immunmodulatorischen Genen durch Viren, onkolytische Viren, Gentherapie mit Hilfe von Nanotechnologie (Nanopartikel, Liposomen) und Gentherapie mit Hilfe von Stammzellen [31].

Trotz all dieser Versuche das GBM zu bekämpfen, konnte die Prognose nicht entscheidend verbessert werden. Das unterstreicht die Notwendigkeit, neue therapeutische Ansatzpunkte zu finden.

Im März 2020 beschloss der Gemeinsame Bundesausschuss (G-BA) eine Änderung der Richtlinie Methoden vertragsärztliche Versorgung. Seit der Veröffentlichung im Mai 2020 im Bundesanzeiger ist eine Kostenübernahme eines neuen Behandlungsverfahrens, der sogenannten TumortheraPIefelder (TTF) durch die gesetzlichen Krankenkassen möglich [32, 33]. Dabei handelt es sich um elektrische Wechselstromfelder, welche mittels Elektroden über die Kopfhaut auf das Tumorgebiet appliziert werden und so die Zellteilung hemmen können. In einer Phase-III Studie konnte das mediane PFÜ von vier Monate auf knapp sieben Monate gesteigert werden. Das mediane GÜ konnte von 16 Monate auf 21 Monate verbessert werden [34]. Sogar nach inkompletter Resektion des GBM konnte in einem Einzelfallbericht durch die zusätzliche Behandlung mit TTF zur Standardtherapie mit Bestrahlung und Chemotherapie nach etwa sechs Monaten radiologisch kein Tumorgewebe mehr nachgewiesen werden [35]. Bei der von Stupp et al. durchgeführten Studie handelte es sich um eine *Open-Label* Studie. Randomisierte placebokontrollierte Studien dürften sich als schwierig erweisen, da durch das Tragen des Therapiegerätes, der Elektroden und der Notwendigkeit der Kopfrasur die Lebensqualität deutlich eingeschränkt ist [34].

Eine weitere Therapiemöglichkeit könnte der Ansatz darstellen, das Immunsystem, vor allem das angeborene Abwehrsystem mit seinen Immunzellen, zu aktivieren.

1.2 Immunologie des Glioblastoms

Das Gehirn gilt als immunologisch privilegiert [36]. Es zeigt eine reduzierte Immunantwort auf implantiertes Fremdgewebe. Dies lässt sich zum einen durch die Abwesenheit einer adäquaten Versorgung durch lymphatisches Gewebe, andererseits durch die Anwesenheit einer mechanischen Barriere, die Bluthirnschranke, erklären. Begründen lässt sich diese Tatsache eventuell dadurch, dass eine gesteigerte Immunreaktion im Gehirn mit einem nicht kompensierbaren Gewebs- und Funktionsverlust einhergehen würde [37, 38]. Diese Vorstellung war lange konsistent. Inzwischen ist diese strenge Vorstellung des Immunprivilegs etwas aufgelockert. Es wurde gezeigt, dass aktivierte T-Zellen die Bluthirnschranke überwinden können. Auch die Halslymphknoten sind in die Immunreaktion des Gehirns involviert [38].

Gliome entkommen nahezu der Immunantwort des Patienten. Die Unfähigkeit des Immunsystems Glioblastomzellen zu erkennen und zu eliminieren stellt ein zentrales Problem bei der Entwicklung neuer Therapien, z. B. Immuntherapie und Genterapie, dar. Zudem beschreibt dies einen Mechanismus der enormen Malignität dieser Tumorentität. Eine Vielzahl an Mechanismen spielt bei dieser Immunevasion eine Rolle. Zunächst sind Gliome wenig immunogen, d. h. sie exprimieren kaum spezifische Antigene. Zudem sezernieren sie immunsupprimierende Zytokine, welche eine adäquate Immunreaktion verhindern. Eine gewisse Entzündungsreaktion auf Gliome konnte jedoch trotz dieser immunsupprimierenden Umgebung festgestellt werden. Unklar bleibt, ob beispielsweise die Infiltration durch Lymphozyten eine tumorbekämpfende Funktion hat [39].

1.3 Das Immunsystem und die Rolle der Makrophagen

Der Körper verfügt über ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem, welche als unspezifisches und spezifisches Immunsystem bezeichnet werden. Das unspezifische System kann schnell auf Pathogene reagieren und aktiviert dabei das

spezifische System, welches erst einige Tage später seine volle Funktion aufnehmen kann. Somit interagieren beide Systeme sehr eng miteinander. Das unspezifische System umfasst neben Monozyten/Makrophagen, natürlichen Killerzellen und Granulozyten unter anderem auch das Komplementsystem und die Akute-Phase-Proteine. Das spezifische, auch adaptives Immunsystem genannt, setzt sich hauptsächlich aus den T- und B-Lymphozyten und den Antikörpern zusammen. Auch bei der Tumorentstehung und -bekämpfung spielt das Immunsystem mit den Makrophagen als Teil des unspezifischen Systems neben der spezifischen zellulären Abwehr eine große Rolle [40].

Makrophagen haben ihren Ursprung im blutbildenden System. Sie haben mit den anderen Zellen des Blutes eine gemeinsame Vorläufer-Stammzelle, die sog. pluripotente, noch undifferenzierte Stammzelle. Diese ist in der Lage alle Zellen des Blutes zu bilden und entwickelt sich unter verschiedenen Einflussfaktoren primär in zwei unterschiedliche Zellpopulationen, das lymphatische und das myeloische System. Während aus der lymphatischen Stammzelle T- und B- bzw. Plasmazellen hervorgehen, welche dann als Teile des spezifischen Immunsystems fungieren, umfasst das myeloische System mehrere Zelltypen. Es entwickeln sich neben Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten auch Monozyten. Die Monozyten sind die Vorläuferzellen der Makrophagen, welche unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren, u. a. den Zytokinen, entstehen. Die im Blut für einige Tage zirkulierenden Monozyten wandern in das Gewebe aus, differenzieren sich abhängig von der Lokalisation und werden dann als Gewebsmakrophagen bezeichnet. Gemeinsam bilden sie das mononukleäre Phagozytensystem. Zu den Aufgaben der Makrophagen zählen im Rahmen der angeborenen, unspezifischen Immunität neben der Phagozytose von Krankheitserregern und Fremdstoffen auch die Aufbereitung und Präsentation der aufgenommenen Stoffe. So kann über die Antigenpräsentation das spezifische Immunsystem aktiviert und zur Erregerbekämpfung herangezogen werden [41]. Neben der Erregerbekämpfung und -eliminierung sind Makrophagen auch dafür verantwortlich, Zelltrümmer beispielsweise nach Gewebsverletzungen aufzunehmen und abzutransportieren. Auch nekrotisches Tumorgewebe kann von den Makrophagen beseitigt werden [40].

1.4 Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor

Das Glycopeptid *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) ist ein Protein, welches aus 127 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 23Kilodalton (kDa) besteht. Die kodierenden Gene für GM-CSF liegen auf Chromosom 11 und dem langen Arm des Chromosoms 5 [42-45]. Der GM-CSF-Rezeptor wird durch zwei Untereinheiten gebildet, eine α - und eine β -Untereinheit. Die β -Untereinheit des GM-CSF-Rezeptors ist ebenso Teil des Interleukin (IL) -3 Rezeptors und des IL-5 Rezeptors [46-48]. Es handelt sich bei GM-CSF um ein Zytokin, welches eine wichtige Rolle in der Hämatopoese spielt. In Anwesenheit von GM-CSF differenzieren sich Vorläuferzellen der myeloischen Reihe u. a. zu Makrophagen und Granulozyten [45, 49]. Außerdem reguliert GM-CSF auch den Aktivitätsgrad dieser Zellen, fördert ihre Rekrutierung und ihr Überleben. So unterstützt GM-CSF eine notwendige Immunantwort bei Entzündungsreaktionen [48]. Der immunstimulierende Effekt ist nicht nur auf die Aktivierung der Proliferation und Differenzierung von Makrophagen und Granulozyten zurückzuführen. Unter dem Einfluss von GM-CSF wird die primäre Immunantwort auch durch eine verbesserte Funktion der antigenpräsentierenden Makrophagen gesteigert [50]. Es wurde jedoch festgestellt, dass eine Depletion von GM-CSF nicht zu größeren Störungen der Hämatopoese führt [51]. Tiere, welche nicht in der Lage sind, GM-CSF zu produzieren, hatten eine weitestgehend normale Blutbildung. Sie erkrankten jedoch an einer pulmonal-alveolären Proteinose, was auf eine Störung der Funktion der Alveolarmakrophagen hindeutet [48, 51]. Klinische Anwendung findet der rekombinant hergestellte Faktor vor allem im Bereich der Onkologie, z. B. bei Chemotherapie-induzierter Myelosuppression [52]. GM-CSF hat jedoch nicht nur positive Effekte. Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis und Asthma bronchiale exazerbierten bei Patienten unter der Behandlung mit GM-CSF [48].

1.5 Tiermodell mit orthotoper C6-Sphäroidimplantation

In den letzten Jahrzehnten gab es viele Verbesserungen in der Entwicklung von Tiermodellen zur Untersuchung von Gehirntumoren. Dabei kommen chemisch induzierte Tumorzellen, Fremdtransplantate von humanen Tumorzellen auf das Tier, virusinduzierte oder auch gentechnisch erzeugte Tumorzellen zur Anwendung. Alle Modelle haben ihre Vor- und Nachteile. Bisher ist es durch kein Hirntumormodell gelungen, die exakten genetischen und biologischen Zusammenhänge der Tumorentwicklung, des Tumorwachstums und der therapeutischen Möglichkeiten nachzuahmen. Häufig scheitern klinische Studien, welche hoffnungsvolle Ergebnisse im Tiermodell ergaben, in der klinischen Erprobung in Phase-II/III-Studien [53]. Molekulargenetische Untersuchungen bezüglich der genetischen Ausstattung und Veränderungen von Glioblastomzellen können sehr gut in der Zellkultur durchgeführt werden. Um jedoch die komplexen Zusammenhänge des Immunsystems bei der Tumorentwicklung, der Angiogenese und des Tumorwachstums besser verstehen zu können, sind *in vivo* Modelle notwendig. So können die zahlreichen Interaktionen zwischen Tumorzellen und den Zellen des Wirtsorganismus untersucht werden. Inzwischen gibt es eine Vielzahl an Tiermodellen, um eine Reihe an Mechanismen und Faktoren bei Gehirntumoren zu untersuchen. Es werden einige Anforderungen an das Modell gestellt, um dem GBM möglichst nahe zu kommen und für Untersuchungen des GBM aussagekräftig zu sein. Goldbrunner et al. fassen diese notwendigen Anforderungen zusammen [54]:

- Abstammung des Tumors von Gliazellen
- Orthotope Implantation und Wachstum der Tumorzellen
- Vorhersagbarkeit und Reproduzierbarkeit des Tumorwachstums
- Gliomähnliches Wachstum und Blutgefäßversorgung (invasives Wachstum, Veränderungen der Bluthirnschranke, Gefäßneubildungen)
- Ausreichend langes Tumorwachstum, welches Studien zur Therapie ermöglicht und eine Überprüfung der Wirksamkeit zulässt
- Möglichst geringe Beeinflussung durch immunologische Vorgänge
- Möglichkeit zur *in vivo* Überwachung des Tumorwachstums und der Gefäßneubildungen

Größere Herausforderungen unter diesen Kriterien stellen die orthotope Implantation und die *in vivo* Überwachung dar. Es gibt verschiedene Arten, die Tumorzellen im Gehirn zu platzieren. Die Möglichkeit, Tumorzellen als Suspension stereotaktisch zu injizieren, bietet den Vorteil einer definierten Menge an Zellen. Dabei werden die Zellen eher diffus verteilt. Werden für die Implantation von Tumorzellen Sphäroide, kugelige Zellverbände, verwendet, kann die Einsprossung von Gefäßen in ein primär avaskuläres Zellkonglomerat dargestellt werden. Zudem können die Vorgänge an der Hirn-Tumor-Grenze besser untersucht werden [54]. Das Tumormodell mit C6-Sphäroidimplantation ist ein sehr gut etabliertes Tumormodell, welches häufig im Rahmen von Studien für neue Therapieansätze des GBM herangezogen wird. Die verschiedenen Schritte dafür werden in Abbildung 1 dargestellt. Es werden dafür zunächst C6-Zellen in Zellkultur vermehrt (Abbildung 1a). Dabei handelt es sich um Glioblastomzellen von Ratten, welche unter Einfluss von N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff entstanden sind [55]. Durch Agarbeschichtung der Zellkulturflaschen können sich Sphäroide bilden (Abbildung 1b). Diese werden in einer kurzen Operation den Ratten orthotop, d. h. im Gehirngewebe gelegen, implantiert (Abbildung 1c/d). Im Verlauf können wiederholte MRT-Untersuchungen durchgeführt werden (Abbildung 1e/f), um die Entwicklung des Tumorwachstums *in vivo* zu beobachten. Mit diesem Tumormodell sind zahlreiche Untersuchungen der Angiogenese, der Invasion der Tumorzellen ins gesunde Gewebe und neuer Therapieansätze möglich. [56-58]

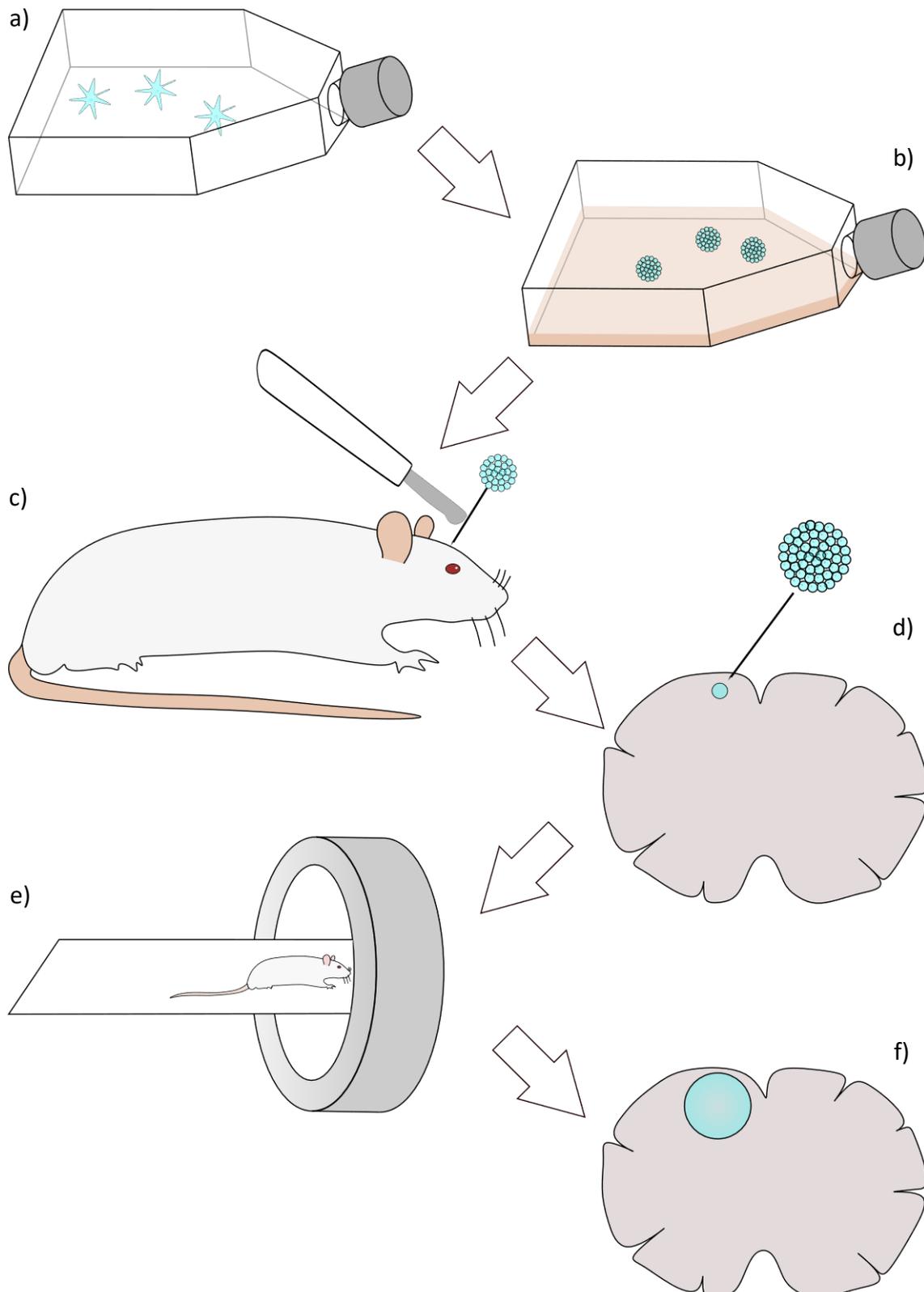


Abbildung 1: Schemazeichnung des Tiermodells mit C6-Sphäroidimplantation a) C6-Zellen in einer Zellkulturflasche b) Bildung von Sphäroiden c) und d) orthotope Sphäroidimplantation e) MRT-Untersuchung f) Tumorzunahme im Verlauf

1.6 Spontane Regression

Es wurden in der Vergangenheit bereits mehrere Einzelfälle einer spontanen Regression von Neoplasien beim Menschen beobachtet. Spontane Regression bedeutet ein totales oder teilweises Verschwinden eines malignen Tumors ohne aktuelle antineoplastische Therapie. Dies ist nicht gleichzusetzen mit der Heilung der systemischen Tumorerkrankung, da die Regression nur teilweise und nicht permanent sein muss. Das Phänomen der spontanen Regression wurde am häufigsten bei folgenden Tumorentitäten beobachtet: Nierenzellkarzinom, Mammakarzinom, Neuroblastom, Melanom, Lymphom und Leukämie. Bis heute sind die Mechanismen, die zur spontanen Regression führen, ungeklärt. Mögliche Faktoren sind hormonelle und immunologische Veränderungen, bakterielle oder virale Infektionserkrankungen, apoptotische und nekrotische Vorgänge im Tumor, chirurgische oder anderweitige Traumen. Kein Mechanismus allein ist verantwortlich für dieses Phänomen [59, 60]. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass es unter Immunsuppression zu vermehrter Ausbildung von Neoplasien kommt, welche sich nach Beendigung der immunsuppressiven Therapie wieder zurückbilden können. Dies lässt vermuten, dass es durchaus endogene Mechanismen zur Tumorbekämpfung gibt. Falls es gelingt, diese Mechanismen besser zu verstehen, könnte das einen großen Fortschritt in der Therapie maligner Erkrankungen bedeuten [59]. Das Phänomen der spontanen Regression konnte 2004 im Tierversuch mit experimentellen Gliomen beobachtet werden [57]. Im Tiermodell zur Beurteilung von Wachstum, Angiogenese und immunologischer Einflüsse des Glioms kam es bei Ratten zur spontanen Regression der Tumoren. Sphäroide aus C6-Zellen wurden ins Gehirn implantiert und das Tumorstadium wurde mittels MRT-gestützter Volumetrie gemessen. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt T-Zellen zuzuschreiben ist, wurden die Daten mit denen thymektomierter Tiere verglichen. Bei beiden Gruppen trat eine Regression ein. Die Wachstumskurven der beiden Gruppen unterschieden sich lediglich im Tumorstadium. Die histologischen Auswertungen führten jedoch dazu, einen weiteren Zelltyp des Immunsystems, die Makrophagen, genauer zu untersuchen [57, 61]. In einer weiteren Serie wurden die Tumorstadiumskurven von Ratten

gemessen, welche durch liposomales Clodronate makrophagendepletiert worden waren. Die Tumorvolumina nahmen rasant zu, viele Tiere mussten aufgrund von Symptomen aus dem Versuch genommen werden und die vorbeschriebene Regression konnte nicht beobachtet werden [62].

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Einflüsse des angeborenen Immunsystems, im speziellen der Makrophagen, auf das Wachstum des GBM näher zu untersuchen. Aufgrund von Vorarbeiten lag die Vermutung nahe, dass die Makrophagen einen nicht unerheblichen Anteil an der Tumorkontrolle und dem Phänomen der spontanen Regression innehaben. Um diese These genauer zu untersuchen, wurde eine Stimulation der Makrophagen mittels rekombinant hergestelltem humanem GM-CSF (rhGM-CSF, Leukine) durchgeführt. Es wurde untersucht, ob die Stimulation der Makrophagen durch GM-CSF das Wachstum experimenteller GBM beeinflussen kann. Möglicherweise stellt dies einen weiteren Schritt dar, nicht nur das Phänomen der spontanen Regression, sondern auch den Einfluss des Immunsystems auf die Entwicklung und die Therapiemöglichkeiten des GBM besser verstehen zu können. Ein Ziel ist es derzeit, das Immunsystem auf den Tumor aufmerksam zu machen, es zu aktivieren und die Bekämpfung des Tumors mit Hilfe der körpereigenen Immunabwehr zu ermöglichen. Die Stimulation des angeborenen Immunsystems könnte dabei einen Aspekt neuer Therapieformen darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Pipetten Discovery	Abimed, Langenfeld
Hautsperrer, biegsam	Aesculap, Tuttlingen
Klammerentferner	Aesculap, Tuttlingen
Pinzetten, fein, anatomisch	Aesculap, Tuttlingen
Bohrer	Aesculap, Tuttlingen
Spülaufsatz	B. Braun, Melsungen
Pasteurpipette	Boeco Germany, Wuppertal
Timer	Hartenstein Würzburg
Feine Lanzette	Hartenstein, Würzburg
Wasserbad WTE var 3185	Hartenstein, Würzburg
Rührplatte Rotamax	Heidolph, Schwabach
Sterilbank	Heraeus Instruments, Hanau
Mikroskop	Hund, Wetzlar
Pipettboy	Integra Biosciences, Fernwald
Kühlschrank	Liebherr, Profiline, Biberach
Heizbecken	Medax, Kiel
Wärmeplatte	Medax, Kiel
Einbettapparat, Cool Unit, TBS 88	Medite, Burgdorf
Einbettapparat, Dispenser Unit, TBS 88	Medite, Burgdorf
pH-Meter	Mettler Toledo, Giessen
Brutschrank	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Schüttler Innova 4230	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Mikroskop BH2-MD0-B10	Olympus, Hamburg

Mikroskop BX 41 mit Kamera und Software Olympus DP Soft	Olympus, Hamburg
Schneidemaschine Slide 2003	Pfm, Köln
Bunsenbrenner	Plein Air international
Rattenspule, 4 Kanal Rattenkopf 123MHz	Rapid Biomedical, Rimpar
Waage	Scaltec, Göttingen
Mikrowelle R-3G17	Sharp, Hamburg
MRT Magnetom Trio A TIM System	Siemens, Erlangen
Einbetteur, Shandon Citadel 1000	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Fixateur	Werkstatt Universität Würzburg
Mikroskop/Stereolupe	Wild, Heerbrugg, Schweiz
pH-Meter WTW pH 525	WTW, Weilheim
OP-Lampe KL 1500 LCD	Zeiss, Jena

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Kanülen	B. Braun, Tuttlingen
Klammergerät	B. Braun, Tuttlingen
Spritzen 10ml, 2ml, 1ml	B. Braun, Tuttlingen
Metallförmchen	Cambridge Instruments, Nußloch
Handschuhe	Cardinal Health, Dublin
Well-Platten, 6-Wells, 24-Wells	Corning , NY USA
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Corning , NY USA
Zellkulturpetrischale 6cm	Corning , NY USA
Knochenwachs	Ethicon, Johnson Johnson, Norderstedt
Reaktionsgefäße (15, 50ml)	Greiner Bio one, Frickenhausen
Färbeschalen, -deckel, -körbchen	Hartenstein, Würzburg
Magnetrührer	Hartenstein, Würzburg

Plastikküvette	Hartenstein, Würzburg
Spatel	Hartenstein, Würzburg
Wattetupfer	Hartenstein, Würzburg
Wiegeschälchen	Hartenstein, Würzburg
Einbettkästchen	Langenbrinck, Emmendingen
Superfrost-Plus Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Messer für Paraffinschnitte, Feather Blades S35	Osaka, Japan
Skalpelle (Größe 10, 15) Feather safety Razor	Osaka, Japan
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Glaspasteurpipetten	Schott, Mainz
Pipetten	Schott, Mainz
Bechergläser	Schott, Mainz; Simax, Selb
Schraubflasche	Simax, Selb
Messzylinder	SUPE rior, Marienfeld, Lauda Königshofen

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Ethanol 50, 70, 80, 96, 100%	Apotheke Universität Würzburg
Scandicain 1%	AstraZeneca, Wedel
Phosphate Buffered Saline, (PBS)	Biochrom, Berlin
Trypsin	Biochrom, Berlin
Ultra Pure Water	Biochrom, Berlin
Cutasept	Bode, Hamburg
Xylazin 2%	cp Pharma, Burgdorf

2 Material und Methoden

Aqua ad injectabilia	Diaco, Naila
Natriumchlorid Lösung 0,9%	Diaco, Naila
Agar Noble	Difco, BD, Becton Dickinson and Company, Heidelberg
GM-CSF, Leukine, Sagramostim	Genzyme, Bayer Healthcare, Seattle WA U. S.
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
Non Essential Aminoacids (NEA)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
Aqua dest.	Hauseigene Herstellung, Universität Würzburg
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Darmstadt
Chloroform	J. T. Baker, Deventer, Holland
Eukitt	Langenbrinck, Emmendingen
Paraffin Surgipath Paraplast	Leica Biosystems, Nußloch
Kontrastmittel Magnograf	Marotrast Jena
Pentobarbital (Nembutal)	Ovation Pharma, Agadir Morocco
Eosin G	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (di NaHPO ₂ 2H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Hämalaun sauer nach Mayer	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Sigma Aldrich, Steinheim
Xylol	Sigma Aldrich, Steinheim

Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Chemical, St. Louis, USA
Citratpuffer	Zytomed, Berlin
Färbe-Kit, Zytochem-Plus HRP KIT, Broad Spectrum	Zytomed, Berlin
Trypsin	Zytomed, Berlin

Zellkulturmedium:

500ml DMEM (1g/l Glucose und Glutamin)

50ml FCS (hitzeinaktiviert)

10ml NEA

2ml Pen/Strep

Agar 1%ig:

1g Agar Noble

20ml Ultra Pure Water

80ml Zellkulturmedium

davon 8ml pro mittlere Flasche oder 0,5ml pro 24 Well Platte

PFA zur Gewebefixierung für Immunhistologie:

Lösung A: 38,8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ ad 1l Aqua. dest.

Lösung B: 15,6g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ad 1l Aqua. dest.

Puffer:

800ml Lösung A

200ml Lösung B

pH-Wert mit 37%iger Salzsäure auf 7,4 einstellen

1:1 mit Aqua dest. verdünnen

2g PFA einwiegen und in 50ml des 0,1M Phosphatpuffer geben

60°C erhitzen, rühren bis Lösung klar ist, abkühlen lassen, filtrieren

pH 7,4 ggf. mit 2N Natriumhydroxid einstellen

1-2 Wochen im Kühlschrank haltbar

Eosin:

10g Eosin

1l Ethanol 70%

beim Umfüllen in Färbeküvette filtrieren, anschließend 2 Tropfen Essigsäure zugeben

Injektionslösungen:

Narkose:

Pentobarbital (Nembutal)

50mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injizieren

GM-CSF:

0,2ml GM-CSF ad

9,8ml NaCl

0,1ml je 100g Körpergewicht subkutan injizieren

2.1.4 Zelllinien und Versuchstiere

C6-Zellen, CLS Cell Lines Service, Eppelheim

Ratten, Typ Sprague-Dawley (SD), Harlan, Niederlande

2.1.5 Antikörper

AK CD8 alpha, eBioscience, Frankfurt, Cat. No. 14-0084

AK CD68, Zytomed, Berlin, Cat. No. 603-2210

AK Ki67, Zytomed, Berlin, Cat. No. RMPD 004

2.2 Zellkultur

2.2.1 Auftauen der C6-Zellen

Alle nachfolgenden Schritte wurden in der Sterilbank durchgeführt. Zunächst wurden die im Kryoröhrchen in Flüssigstickstoff tiefgefrorenen C6-Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend in eine 75cm² Kulturflasche pipettiert. Die Zugabe von 20ml Zellkulturmedium verdünnte das Einfrieremittel DMSO. Die Zellen inkubierten über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Falls nicht gesondert erwähnt, wurden Zellen stets unter diesen Bedingungen kultiviert. Zum vollständigen Entfernen des Einfrieremittels wurde am nächsten Tag das Zellkulturmedium gewechselt.

2.2.2 Passagieren der C6-Zellen

Nach zwei bis drei Tagen war die Zellkulturflasche konfluent, das heißt, die C6-Zellen bedeckten den gesamten Flaschenboden. Die konfluenten Flaschen wurden nun gesplittet bzw. passagiert, zum einen um mehrere Flaschen anzusetzen, zum anderen um ein apoptotisch Werden der zu dicht gewachsenen Zellen zu vermeiden. Dazu wurde erst das komplette Zellkulturmedium mit der Pipette abgenommen. Durch vorsichtige Zugabe von 5ml PBS, kurzes Schwenken und anschließendes Abnehmen wurde das restliche Medium neutralisiert. Daraufhin inkubierten die Zellen mit 3ml Trypsinlösung drei Minuten im Brutschrank, um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen. Dieser Vorgang wurde mikroskopisch kontrolliert. Durch leichtes seitliches Klopfen gegen die Flasche konnten noch anhaftende Zellen vom Boden abgelöst werden. Sobald sich die Zellen vollständig abgelöst hatten, wurden 7ml Medium dazugegeben und mit der Pipette noch vorhandene Zellaggregate resuspendiert. Um die Zellen nun im Verhältnis 1:10 zu splitten, wurde 1ml der Zellsuspension in der Flasche belassen und der Rest verworfen. Im gleichen Schritt konnten bei Bedarf auch mehrere neue Flaschen angesetzt und mit 1ml der Zellsuspension versehen werden. Die Flaschen mit der Zellsuspension wurden zuletzt wieder mit 15 bis 20ml Zellkulturmedium befüllt und im Brutschrank inkubiert. Beschriftet wurden die Flaschen mit Zellart, Passage, Datum und dem Verhältnis, in dem gesplittet worden war. Die Passage der Zelllinie

steigt mit jedem Passagieren um den Wert 1 an. Da die C6-Zellen sehr schnell wuchsen, war es alle 2-3 Tage notwendig, die Zellen im Verhältnis 1:10 oder 1:15 zu splitten.

2.2.3 Agarbeschichtung der Zellkulturflaschen und Well-Platten

Die Zellen heften sich in der Regel am Flaschenboden an und bilden eine Monolayerschicht. Um für den Tierversuch Sphäroide, dreidimensionale kugelartige Zellverbände, herzustellen, wurden die Flaschenböden mit Agar beschichtet [61, 63]. So schlossen sich die Zellen zu avaskulären, ausschließlich aus C6-Zellen bestehenden runden Konglomeraten zusammen. Zunächst wurde 1,0g Agar Noble in 20ml Ultra Pure Water vorsichtig gelöst und anschließend in der Mikrowelle bis zum vollständigen Auflösen des Agarpulvers aufgekocht. Daraufhin wurden 80ml auf 37°C aufgewärmtes Medium dazupipettiert und vorsichtig vermischt. Es wurde beachtet, dass sich im Agar keine Luftblasen bildeten, da sich dort sonst später mehrere Sphäroide anlagern und Konglomerate bilden würden. Mittlere Zellkulturflaschen wurden nun mit der Pipette langsam vom Rand ausgehend mit 8ml Agar beschichtet. Zum Vermeiden von Blasenbildung wurde immer ein kleiner Rest in der Pipette belassen. Die 24-Well wurden mit Hilfe der Multipipette mit 0,5ml Agar pro Well beschichtet. Anschließend härteten die Flaschen über Nacht im Kühlschrank aus. Die beschichteten Flaschen und Well-Platten wurden bis zur Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.2.4 Sphäroide ansetzen und Picken

Eine 100% konfluente mittlere Zellkulturflasche wurde im Verhältnis 1:2 und 1:3 gesplittet. Damit wurden fünf agarbeschichtete mittlere Flaschen angesetzt. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit 5ml PBS kurz gewaschen und anschließend mit 3ml Trypsin zum Ablösen für drei Minuten im Brutschrank inkubiert. Zum Ansetzen der Sphäroide im Verhältnis 1:2 wurden nun 7ml Medium dazugegeben. Je 5ml der entstandenen Zellsuspension wurden vorsichtig in zwei beschichteten Flaschen pipettiert, ohne die Agarbeschichtung zu beschädigen. Um die Sphäroide im Verhältnis 1:3 anzusetzen, wurden auf die 3ml Trypsin-Zellsuspension 6ml Medium gegeben. Nun wurden drei Flaschen mit je 3ml dieser Suspension befüllt. Zu allen

Flaschen wurden je 15ml Zellkulturmedium hinzupipettiert. Diese inkubierten über Nacht im Brutschrank. Am nächsten Tag konnten die Sphäroide gepickt und in agarbeschichtete 24-Well-Platten vereinzelt werden. Dadurch wurde ein Verklumpen der Sphäroide verhindert und sie waren so für die Implantation leicht einzeln aufzunehmen. Zudem wurden für die Implantation mikroskopisch nur nekrosefreie einzelne und gleich große Sphäroide ausgewählt. Die besten Sphäroide entwickelten sich in den 1:2 angesetzten Flaschen. Die zum Picken benötigten Glaspasteurpipetten wurden vorbereitet, indem sie über dem Bunsenbrenner mit Hilfe einer Pinzette um ca. 60° gebogen wurden. Die Sphäroide wurden mit reduziertem Sog der Pipette aus der Zellkulturflasche in eine mit 5ml vorgewärmtem Medium befüllte Petrischale gegeben. Mit schwarzem Hintergrund ließen sich die Sphäroide leichter differenzieren. Diese wurden mit Hilfe der Pasteurpipette und den gebogenen Glaspasteurpipetten vorsichtig angesaugt und in eine beschichtete 24-Well-Platte, die pro Well mit 1,5ml Medium befüllt wurde, überführt. Die 24-Well-Platte wurde nur etwa bis zur Hälfte mit Sphäroiden bestückt. So konnten bei der Implantation längere Wartezeiten der Sphäroide außerhalb des Brutschrankes vermieden werden. Nach dem Picken wurden alle Sphäroide unter dem Mikroskop gemessen, um fehlerhafte und nicht optimal große Sphäroide auszusortieren. Sphäroide, die einen dunklen Kern aufwiesen, waren für die Implantation nicht geeignet, da dies auf eine beginnende Nekrose hindeutete. Über Nacht wuchsen die Sphäroide noch ca. 20-80µm und erreichten somit eine für die Implantation optimale Größe von 200-300µm.[58, 64]

2.3 Tierversuch

Das Versuchsvorhaben nach dem Tierschutzgesetz wurde am 08.11.2010 mit der Nummer 55.2-2531.01-65/10 von der Regierung von Unterfranken genehmigt.

2.3.1 Orthotope Implantation der C6-Sphäroide

Für den Versuch wurden 29 männliche SD-Ratten mit einem Gewicht von 250-300g verwendet, wovon neun Tiere als Kontrollgruppe dienten. Vor der Implantation wurden alle Tiere am Schwanz mit wasserfestem Stift nummeriert und gewogen. Die Implantation der Sphäroide erfolgte wie bei Goldbrunner et al. beschrieben [56-58]. Für die Narkose wurden dem Tier 50mg Pentobarbital pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Das Tier wurde dabei unter einem Tuch fixiert. Durch Abheben eines Beines konnte die Injektion paramedian ca. 1cm proximal des Beinansatzes erfolgen. Dies wurde langsam und nach Aspiration durchgeführt, um Injektion in ein Blutgefäß und Verletzung innerer Strukturen zu vermeiden. Da die Tiere ein sehr ungünstiges Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis haben, wurden sie bis zum Beginn und nach der Operation auf Wärmeplatten gelagert, um eine Auskühlung zu vermeiden. Die Kontrolle der chirurgischen Toleranz erfolgte durch Kneifen mit einer Pinzette zwischen die Zehen. Für die Implantation musste der Schädel des Tieres mittels einer in der Werkstatt der Universitätsklinik speziell dafür angefertigten Kopfhalterung fixiert werden. Die zu operierende Stelle wurde desinfiziert und mit 0,1ml des Lokalanästhetikums Scandicain 1% subkutan infiltriert. Die Kopfhaut des Tieres wurde nach unten gespannt, so dass die Haut mit dem Skalpell von der Stirn bis zum Ohransatz an der Mittellinie ca. 1cm inzidiert werden konnte. Nach Einsetzen des Hautspanners, Inzision des Periosts und Abschieben mit dem Skalpell, wurden das Bregma und die Coronarnaht unter dem Mikroskop dargestellt. Nun wurde mit dem Diamantbohrer (4mm) unter minimaler Spülung paramedian unmittelbar vor der Coronarnaht die Schädelkalotte trepaniert. Die Dura wurde mit dem Skalpell (Größe 15) inzidiert und austretender Liquor mit einem Wattetupfer getrocknet. Währenddessen wurde mit Hilfe der Pasteurpipette und einer gebogenen Glaspipette je ein Sphäroid aus dem Well gepickt und mit möglichst wenig Medium auf die Spitze der Lanzette gegeben. Die mit einem Sphäroid bestückte kleine Lanzette wurde subcortikal ca. 2mm ins Parenchym

eingeführt und in einer Abstreifbewegung wurde der Sphäroid implantiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Stelle trocken ist, um ein Abschwimmen des Sphäroids zu verhindern. Anschließend erfolgte kein weiteres Tupfen, sondern ein sofortiges Verschließen des Bohrloches mittels Knochenwachs. Dies verhinderte ein Aufsaugen bzw. Abschwimmen des Sphäroids. Die Haut wurde mittels Klammernaht verschlossen. Die Tiere wurden bis zum Aufwachen auf Wärmeplatten gelagert und daraufhin in frische Käfige umgesetzt. Alle Tiere waren nach der Implantation aufgewacht und zeigten keine neurologischen Auffälligkeiten. Es erfolgten nun täglich zwei Kontrollen des Zustandes der Tiere. Die Tiere der Versuchsgruppe bekamen zudem jeden zweiten Tag $1\mu\text{g}/100\text{g}$ Körpergewicht GM-CSF subkutan injiziert.

2.3.2 Magnetresonanztomographische Untersuchungen

Die MRT Messungen wurden wie bei Goldbrunner et al. und Vince et al. beschrieben durchgeführt [22, 57]. Bei dem MRT-Gerät handelt es sich um einen 3 Tesla Magnetresonanztomographen der Firma Siemens. Es wurden folgende Messungen durchgeführt: *T1 tse cor* (0,9mm), *cor T2 tse rs* (0,7mm) und *cor T2 ciss 3d* (0,3mm).

An den Tagen 7, 14, 21, 28, 32 und 42 erfolgten die Messungen im MRT. Dazu wurden die Tiere erneut narkotisiert. Anschließend erhielten sie etwa zehn Minuten vor der Messung 0,1ml Kontrastmittel intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden in einer speziellen Spule für Ratten in Bauchlage fixiert. Um die Sauerstoffversorgung der Tiere während der Messung zu sichern, wurde auf freie Atemwege geachtet und am Ende der speziellen Spule über einen angeschlossenen Schlauch 1l/min Sauerstoff insuffliert. Nach der Messung wurden die Tiere bis zum Aufwachen auf Wärmeplatten gelegt.

2.3.3 Volumetrie

Die Auswertung der MRT-Messungen wurde mit den Programmen MRIConvert und MIPAV durchgeführt. Für die Volumetrie wurde die T2 CISS 3D Sequenz verwendet. Die Bilddateien mussten zunächst mit MRIConvert in ein für MIPAV lesbares Format konvertiert werden. So konnten die Untersuchungen mit MIPAV ausgewertet werden, indem in jeder Schicht die Tumorfläche markiert wurde (Abbildung 2). Das

Volumen wurde aus den Flächen und der Anzahl der Schichten berechnet. Die Daten wurden von zwei unabhängigen Personen ausgewertet (Anna Jawork, Nils Timmermann). [58]

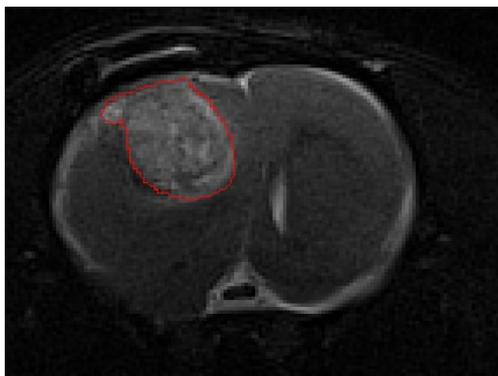


Abbildung 2: Volumetrie, Markierung der Tumorflechte in einer Schicht

2.4 Histologie

Bei jedem MRT-Messtermin wurden zwei Tiere zum Anfertigen von histologischen Schnittpräparaten aus dem Versuch genommen. Sowohl Gehirne als auch Milzen wurden präpariert und anschließend für 24h in der vorbereiteten PFA-Lösung fixiert. Nach 24h wurde das PFA entfernt und entsorgt. Die Organe wurden bis zur Einbettung in Paraffin maximal eine Woche in PBS im Kühlschrank gelagert. Die in PBS gelagerten Präparate wurden zunächst unter fließendem Wasser für 15 Minuten gewaschen, einzeln in beschriftete Einbettkästchen gelegt und anschließend mit Hilfe des Einbetters in aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Dazu wurde das Programm D verwendet, welches die Präparate nacheinander in folgende Substanzen tauchte: Ethanol 50, 70, 80, 96, 100% je 20 Minuten, Ethanol 100%, Ethanol 100%/Chloroform 1:1, Ethanol 100%/Chloroform 1:1, Chloroform, Chloroform je 30 Minuten, Paraffin I 50 Minuten, Paraffin II 30 Minuten. Am nächsten Tag wurden die Organe einzeln in Paraffinblöcke eingebettet. Sie wurden mit der Schnittfläche nach unten auf eine kleine Menge eingegossenes Paraffin gelegt und anschließend komplett mit flüssigem Paraffin bedeckt. Als

Halterung für das Mikrotom dienten die zum Schluss aufgelegten Einbettkästchen. Nach einer Abkühlzeit von mindestens 60 Minuten konnten die Blöcke aus den Formen genommen werden.

Alle Schnitte der Paraffinpräparate wurden am Mikrotom mit einer Dicke von 4µm angefertigt und bei Raumtemperatur mindestens 24h getrocknet, bevor Färbungen angefertigt wurden. Die Schnitte wurden erst mit Hilfe eines Pinsels in Aqua dest. mit Raumtemperatur gegeben. Anschließend wurden die Schnitte zum Strecken in Aqua dest. bei 40°C gelegt. Die Schnitte konnten aus dem Wasserbad schräg auf den Objektträger aufgezogen werden. Um Artefakte bei den Färbungen zu verhindern, wurde darauf geachtet, dass sich zwischen Objektträger und Präparat keine Luftblasen bilden.

2.4.1 Konventionelle Färbungen

Von allen Gehirn- und Milzpräparaten wurden Hämalaun-Eosin-Färbungen (HE-Färbung) angefertigt. Dazu wurden die Schnitte zunächst mit Xylol (2x15 Minuten) und in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 70% je 2x2 Minuten, 50% 1x2 Minuten, Aqua dest.) entparaffiniert. Nach zehn Minuten Färben mit Hämalaunlösung und ebenso langem Wässern unter fließendem Leitungswasser erfolgte für fünf Minuten das Gegenfärben mit 2%iger Eosinlösung. Nun wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe (50% 1x2 Minuten, 70%, 96%, 100% je 2x2 Minuten) und Xylol (2x10 Minuten) entwässert und zum Konservieren mit Eukitt und Deckgläschen eingedeckt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Präparate nicht trocknen und bis zum Eindecken in Xylol stehen bleiben. Eingedeckt musste das Eukitt mindestens 30 Minuten trocknen. Dies ermöglichte eine Lagerung der Schnitte in einer Mappe bei Raumtemperatur.

2.4.2 Immunhistochemische Färbungen

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Paraffinschnitte wie für die konventionelle Färbungen entparaffiniert. Um die Antigene zu demaskieren, wurden die Schnitte in der Mikrowelle bei 700W für 15 Minuten in Citratpuffer gekocht. Die Zeit zum Abkühlen betrug etwa 25 Minuten. Nach kurzer Neutralisation des Citratpuffers in PBS wurden die Präparate mit dem PAP-Pen umrandet. Um die

immunhistochemische Färbung nicht zu beeinträchtigen, durften die Schnitte im Verlauf nicht Austrocknen. Die Aktivität der endogenen Peroxidase wurde geblockt (Peroxidase Block, zehn Minuten), ebenso wurden unspezifische Bindungsstellen (Blocking Solution, fünf Minuten) geblockt. Zwischen jedem einzelnen Arbeitsschritt wurden die Präparate zwei Minuten mit PBS auf dem Schüttler gewaschen. Nun konnte der Primärantikörper (30 Minuten) aufgetragen werden. Daraufhin wurden die Schnitte mit Sekundärantikörper und Enzymkonjugat (je 15 Minuten) auf die Färbereaktion mit Diaminobenzidin vorbereitet. Jeweils nach diesen drei Schritten wurden die Präparate je 3x2 Minuten auf dem Schüttler in PBS gewaschen. Anschließend wurde die Färbung mit Diaminobenzidin eingeleitet und während des Vorgangs kontrolliert. Das beste Ergebnis wurde bei einer Zeit von fünf Minuten erreicht. Nachdem der Färbevorgang mit destilliertem Wasser abgestoppt wurde, folgte die Gegenfärbung der Zellkerne für 35 Sekunden mit Hämalaun. Nach zehnminütigem Wässern unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte wie bei den konventionellen Färbungen mit aufsteigender Alkoholreihe, Xylol und Eukitt haltbar gemacht.

Nach dieser Vorgehensweise wurden die Schnitte mit Ki67-Antikörper, einem Proliferationsmarker [65] und Cluster of Differentiation (CD)8-Antikörper für CD8-positive Lymphozyten [66] gefärbt. Bei der Färbung für Makrophagen mit CD68-Antikörper [67] wurde anstelle des Citratpuffers zur Demaskierung der Antigene Trypsinlösung verwendet. Die Schnitte wurden mit der frisch angesetzten Trypsinlösung für 15 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler behandelt.

2.4.3 Auswertung

In der Arbeit wurden zwei zusätzliche Tiere gänzlich von der Auswertung ausgeschlossen, da diese über den gesamten Zeitraum lebten und weder im MRT einen detektierbaren Tumor entwickelten noch in der histologischen Aufarbeitung eine solide Tumormasse nachzuweisen war. Dies schließt die Möglichkeit einer fehlerhaften Implantation der C6-Sphäroide aus.

Die Schnitte wurden bei 100-facher Vergrößerung am Diskussionsmikroskop ausgezählt. Dabei wurden je fünf zusammenhängende Gesichtsfelder ausgezählt

und der Mittelwert gebildet. Am Gehirn wurden ausgehend vom Tumorrand fünf Gesichtsfelder ausgezählt. Bei der Auswertung der Färbung mit dem CD8-Antikörper wurde darauf geachtet, CD8-positive Zellen mit Lymphozytenmorphologie auszuzählen. Ebenso wurden dabei die Makrophagen nach Morphologie und Lokalisation beurteilt [68], da auch Mikroglia durch CD68-Antikörper detektiert werden [69].

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism 4. Zur Anwendung kam der Student's t-Test. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $<0,05$ angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Volumetrie

An Tag 0 wurden in der Versuchsgruppe zwanzig Tieren die vorbereiteten Sphäroide implantiert. An Tag 7 postoperativ fand die erste MRT Messung statt. Zum Zeitpunkt dieser Messung hatten lediglich zwei der zwanzig mit GM-CSF behandelten Tiere einen sichtbaren Tumor entwickelt (10%). Zu den geplanten zwei Tieren musste aufgrund von Narkoseproblemen ein weiteres Tier aus dem Versuch genommen werden. Am zweiten Messtermin, Tag 14 postoperativ, konnte bei 11 von 17 Tieren der Versuchsgruppe im MRT ein solider Tumor gesehen werden (65%). Dabei wurden gemäß Protokoll erneut zwei Tiere aus dem Versuch genommen. An Tag 21 postoperativ waren bei 13 von 15 Tieren Tumoren sichtbar (87%). Bei drei Tieren hatte sich erstmals zu diesem Termin ein detektierbarer Tumor entwickelt. Bei einem Tier dauerte es bis Tag 28 postoperativ, um einen Tumor im MRT ausmachen zu können.

Insgesamt entwickelten sich bei 15 von 20 Tieren (75%) solide Tumoren. Sechs Tiere (30%) zeigten eine Regression. Aufgrund von Symptomen mussten lediglich sieben der zwanzig Tiere (35%) aus dem Versuch genommen werden.

Das Tumorwachstum konnte durch die wiederholten Messungen im MRT im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. In Abbildung 3 wird beispielhaft der Verlauf eines Tieres beschrieben. Postoperativ ließ sich an Tag 7 zunächst die extrakranielle Flüssigkeitsansammlung verursacht durch das Operationstrauma beschreiben. An Tag 14 konnte bereits ein minimales Tumorwachstum mit Kontrastmittelaufnahme am Rand der Operationshöhle festgestellt werden. Die Größenzunahme führte zur verstärkten Ausbildung eines peritumoralen Ödems. An Tag 28 kam es durch den Masseneffekt des Tumors zur Mittellinienverschiebung zur Gegenseite. Zudem wies die zentrale Kontrastmittelaussparung auf bereits nekrotische Veränderungen hin. An den beiden darauffolgenden Messungen nahm das Tumolvolumen ab, das peritumorale Ödem verschwand und die Mittellinienverlagerung war kaum mehr auszumachen. Es verblieb ein kleiner Massendefekt mit nur mehr geringer Kontrastmittelaufnahme. Beschrieben wurden T2-gewichtete MRT-Sequenzen der gleichen Schnittebene.

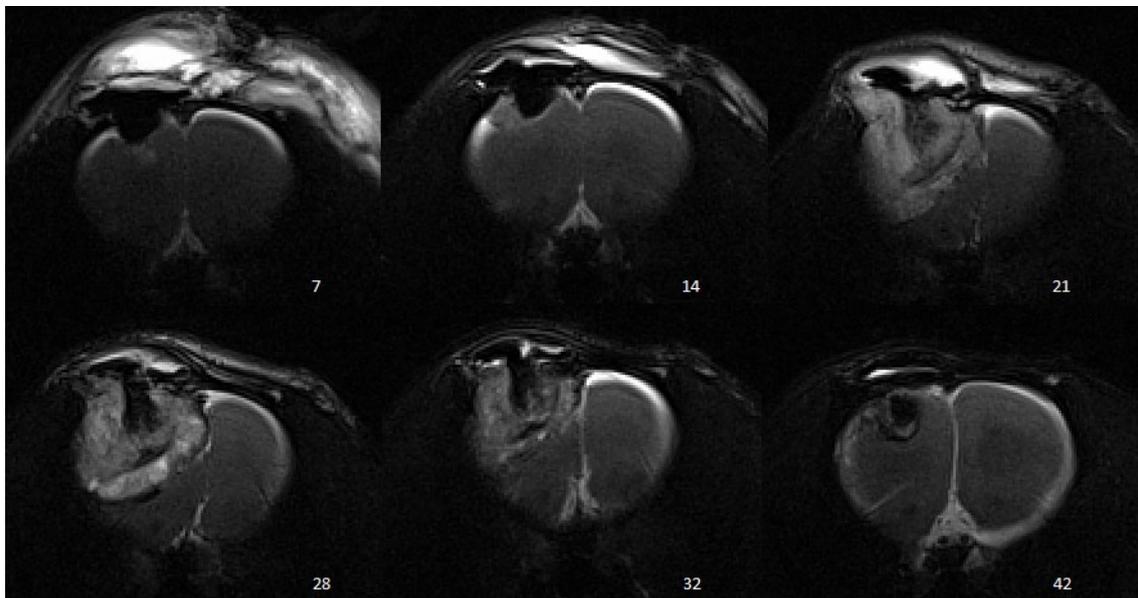


Abbildung 3: MRT-Verlauf des Gehirntumorwachstums eines repräsentativen Versuchstieres 7, 14, 21, 28, 32 und 42 Tage nach Sphäroidimplantation

In der Kontrollgruppe wurden neun Tieren Sphäroide implantiert. Bereits an Tag 7 postoperativ waren bei drei Tieren im MRT kleine Tumoren sichtbar (30%). An Tag 14 war bei allen Tieren der Kontrollgruppe solides Tumorstadium zu verzeichnen. Sechs von neun Tieren wurden aufgrund von Symptomen aus dem Versuch genommen (66%). Drei Tiere dienten der histologischen Aufarbeitung im Verlauf. Lediglich bei einem Tier konnte die vierte MRT-Messung stattfinden, musste dann aber aufgrund von auftretenden Symptomen bei einer sehr großen Tumormasse aus dem Versuch genommen werden. Da an diesem Termin lediglich ein Messwert der Kontrollgruppe vorlag, konnte zu diesem Zeitpunkt kein statistischer Vergleich angestellt werden. In beiden Gruppen nahm das Tumorstadium bis Tag 20 zu. In der Kontrollgruppe wurden die Tiere dann symptomatisch und wurden aus dem Versuch genommen. In der Versuchsgruppe trat dann die Regression ein und das Tumorstadium nahm bis Tag 42 deutlich ab. In der GM-CSF Gruppe entwickelten sich die Tumoren später und erreichten mit einem Median von 134mm^3 ein geringeres Volumen als in der Kontrollgruppe mit 262mm^3 . Bei keinem der Kontrolltiere konnte die zuvor beschriebene Regression beobachtet werden (Abbildung 4).

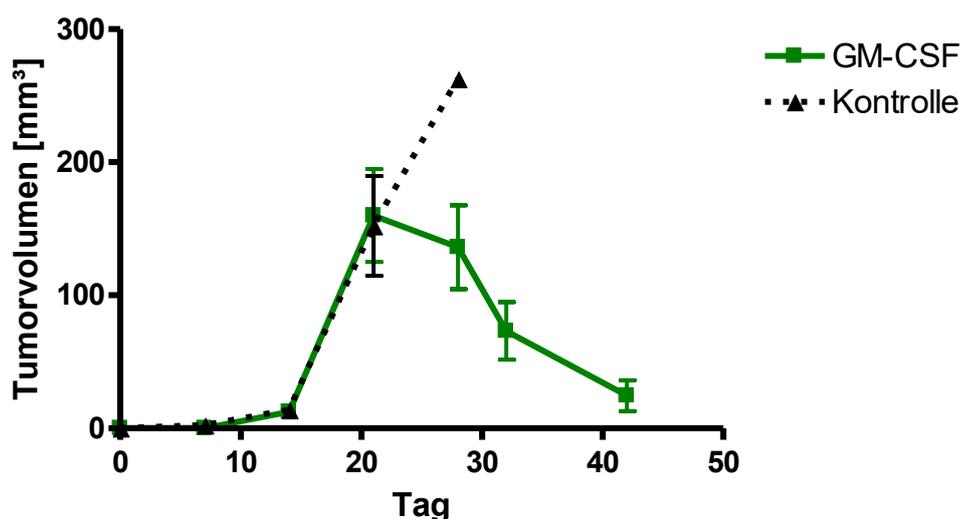


Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf des Tumorstadiums der Kontrollgruppe im Vergleich zur Versuchsgruppe

3.2 Kaplan-Meier-Analyse

Die Überlebenskurven der beiden Gruppen demonstrieren sehr gut den Effekt der Behandlung mit GM-CSF (Abbildung 5). Bis Tag 20 postoperativ unterscheiden sich die Kurven nicht signifikant. Ab diesem Zeitpunkt wurden die nicht behandelten Tiere symptomatisch und aus dem Versuch genommen. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit GM-CSF in der Versuchsgruppe zu einem verbesserten Überleben. Die mediane Überlebenszeit der behandelten Tiere war mit 35 Tagen deutlich länger als die der Kontrollgruppe mit 24 Tagen. Die Kurven der Kaplan-Meier-Analyse waren mit einem p-Wert von 0,034 signifikant unterschiedlich.

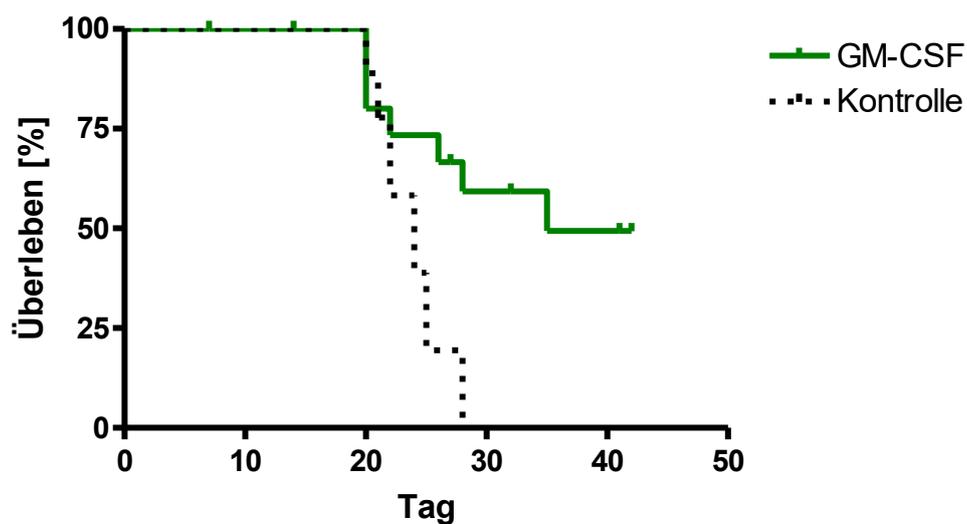


Abbildung 5: Überlebenskurve der Kontrollgruppe im Vergleich zu der mit GM-CSF behandelten Gruppe

3.3 Histologie

In der HE-Färbung konnten die Schnitte hinsichtlich der Tumormorphologie gut beurteilt werden. Es ließen sich allseits die typischen Wachstumsmerkmale des GBM feststellen. Die Sphäroide wurden orthotop implantiert und es zeigte sich meist ein Wachstum der Tumoren in der Großhirnhemisphäre. Teilweise gab es auch extrakranielle Tumoranteile. Es konnte sowohl extrem invasives als auch verdrängendes Wachstum beobachtet werden. Den Eigenschaften des GBM entsprechend konnten zahlreiche, z. T. auch glomeruloide Gefäßneubildungen detektiert werden. Ebenso traten Nekrosebildung sowie die typische palisadenförmige Anordnung der Tumorzellen um die Nekrosestraßen auf (Abbildung 6).

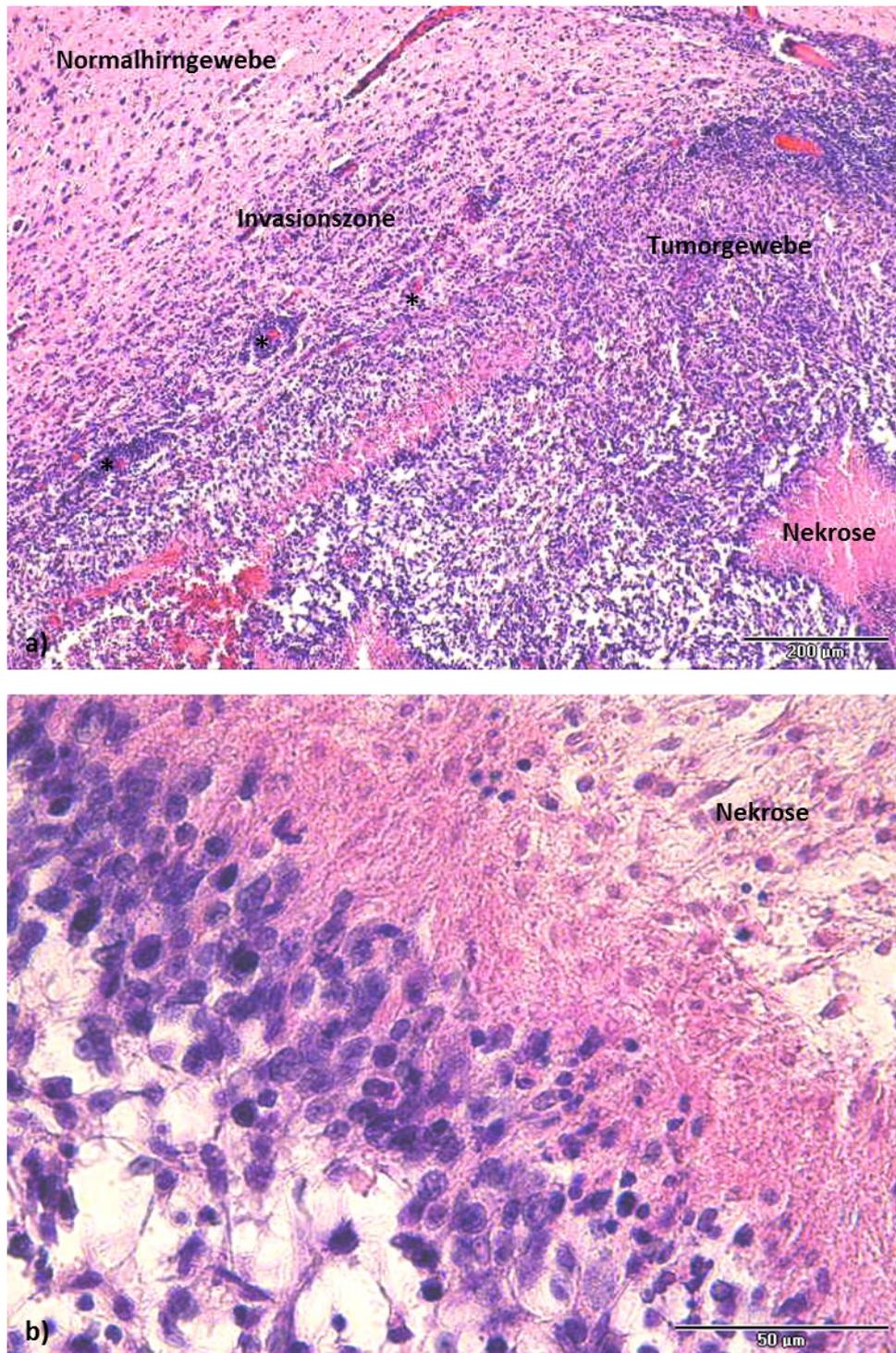


Abbildung 6: HE-Färbung eines repräsentativen C6-Zell-Glioblastoms zum Zeitpunkt $t =$ Tag 32 nach der Sphäroidimplantation. a) 100-fache Vergrößerung. Sichtbar ist der Übergang vom Tumor zum Normalhirngewebe. Außerdem kann man innerhalb des Tumors Blutgefäße (*) und ein Nekroseareal erkennen. b) Übergang vom Tumor zur Nekroseregion in 600-facher Vergrößerung

Wie bereits in den Vorversuchen wurde untersucht, ob CD8-positive Zellen, wie z. B. zytotoxische T-Zellen, einen Einfluss auf das Tumorstadium haben. Es konnte im zeitlichen Verlauf kein signifikanter Unterschied der CD8-positiven Zellen in den Tumoren der beiden Versuchsgruppen festgestellt werden (Abbildung 7).

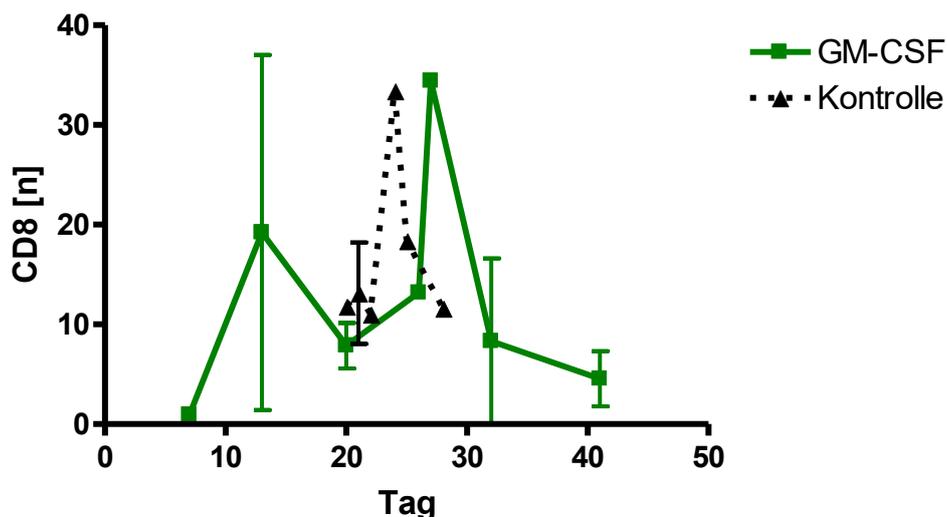


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der CD8-Zellzahl im C6-Zell-Glioblastom

Um den Effekt der Stimulation durch GM-CSF zu bestätigen, wurden mit Hilfe der immunhistochemischen Aufarbeitung durch die CD68-Färbung die Makrophagen sowohl im Tumorgewebe als auch im entsprechenden Milzgewebe als Positiv-Kontrolle ausgezählt. Es konnte in der Anzahl der Makrophagen in der Milz zwischen den durch GM-CSF stimulierten Tieren und den Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

In der CD68-Färbung wurden Makrophagen braun angefärbt. Diese sind hier nicht nur wie typischerweise in der Nekrose lokalisiert, sondern auch zahlreich im soliden Tumorgewebe präsent. Zudem sind viele Makrophagen um Gefäße herum lokalisiert (Abbildung 8).

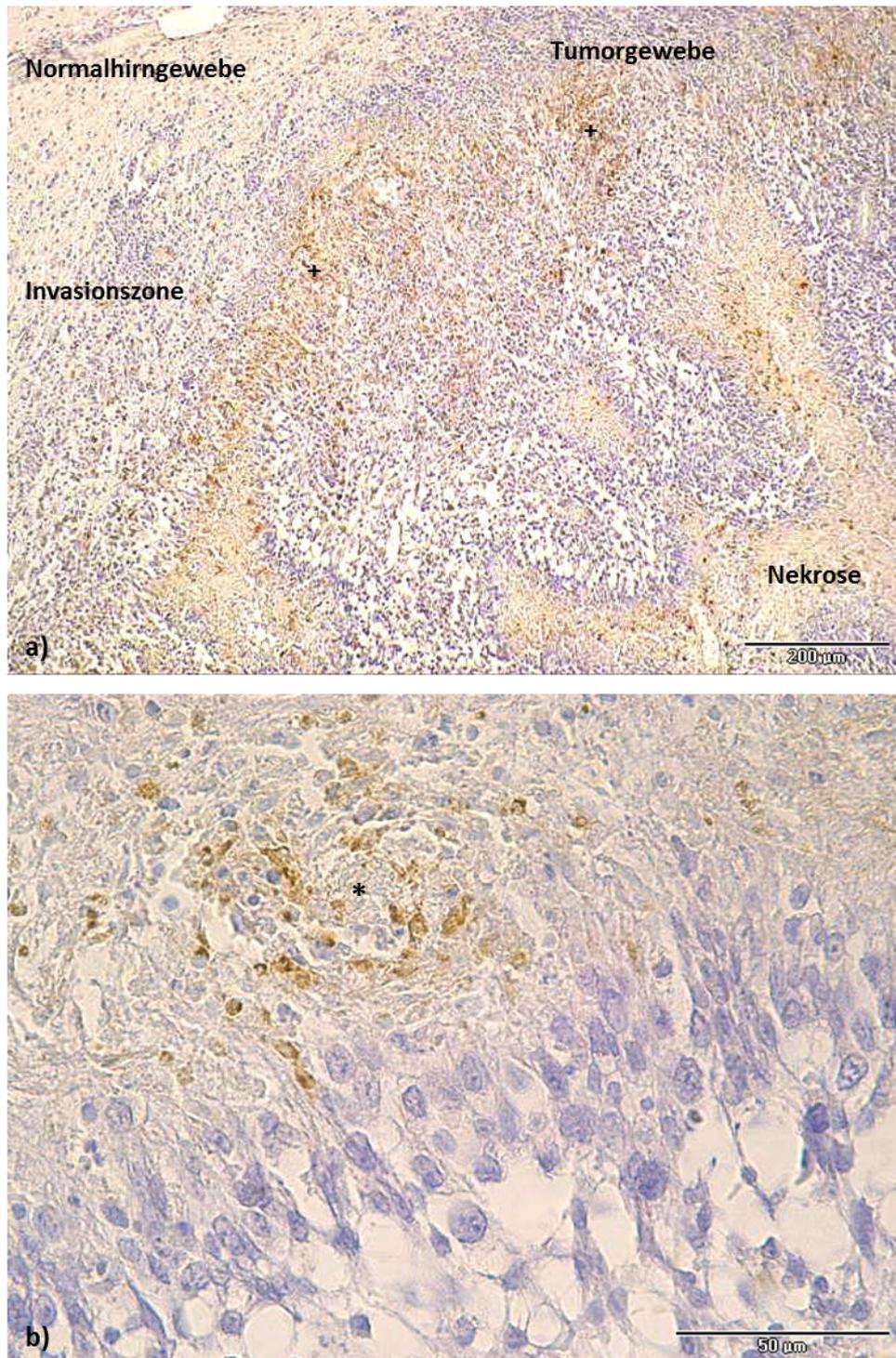


Abbildung 8: CD68-Färbung eines repräsentativen C6-Zell-Glioblastoms zum Zeitpunkt t= Tag 32 nach der Sphäroidimplantation a) 100-fache Vergrößerung. Sichtbar ist die Anordnung der Makrophagen im soliden Tumor (+) b) 600-facher Vergrößerung. Sichtbar ist die Lokalisation der Makrophagen um Gefäße (*) herum

Anhand des zeitlichen Verlaufs der Makrophagenzahl konnte beobachtet werden, dass zum Zeitpunkt des Eintretens der Regression auch die maximale Makrophagenzahl im Tumorgewebe der behandelten Tiere zu finden war (Abbildung 9). Mit abnehmender TumorgroÙe verringerte sich auch die Anzahl der Makrophagen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren in der mit GM-CSF behandelten Gruppe wesentlich mehr Makrophagen im Gehirn lokalisiert. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p=0,0275$).

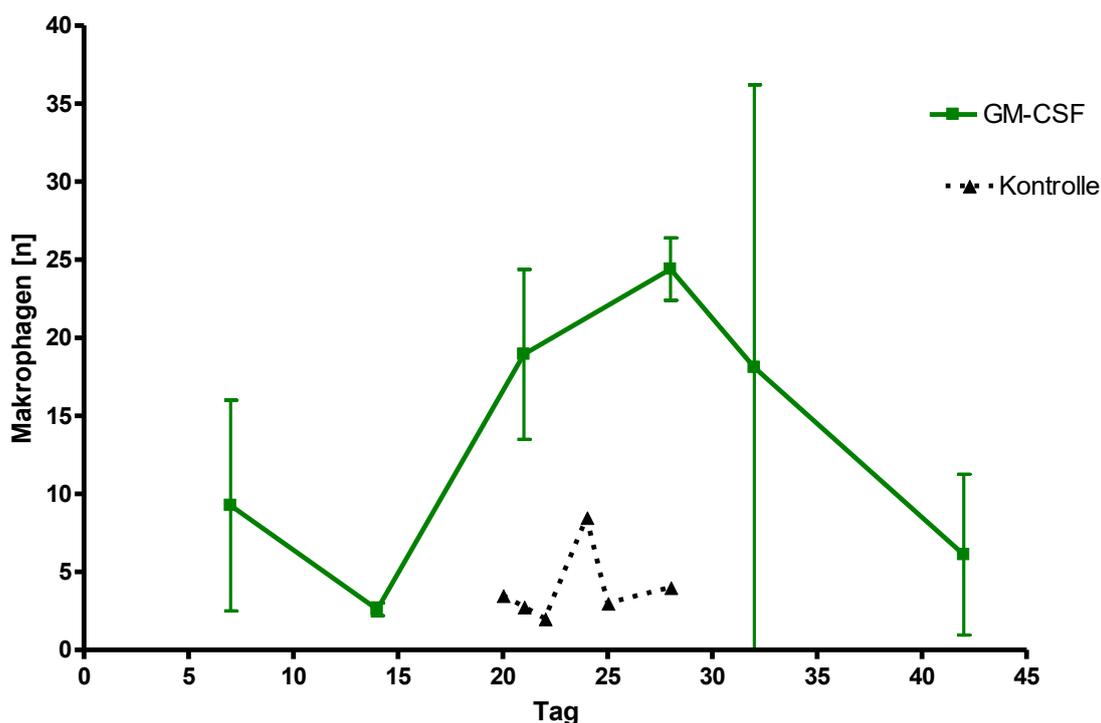


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der Makrophagenzahl im Tumorgewebe

4 Diskussion

Beim Menschen existiert das seltene Phänomen der spontanen Regression von Tumoren [59, 60]. In vorangegangenen Versuchen konnte eine solche Regression auch im Tiermodell gezeigt werden. Sabine Hildebrandt beobachtete im C6-Tiermodell eine Regression experimenteller Gliome bei Ratten [57, 61]. Zunächst konnten die zytotoxischen T-Zellen als Grund für die Regression ausgeschlossen werden. Im Tierversuch trat bei beiden Gruppen eine Regression ein, die Wachstumskurven der Tumoren der thymektomierten Tiere und die der Kontrollgruppe unterschieden sich lediglich im Tumolvolumen [57, 61]. Diese Beobachtung ließ sich durch die hier vorliegenden Untersuchungen bestätigen. Die Anzahl der CD8-positiven Zellen der beiden Gruppen im Gehirn unterschieden sich im zeitlichen Verlauf nicht signifikant. Um zu differenzieren, welche Mechanismen zu der beobachteten Regression geführt hatten, wurde untersucht, ob die Depletion der systemischen Makrophagen durch liposomales Clodronate einen Einfluss darauf haben könnte. In diesem Versuch kam es zu keiner Regression, sondern die Tumorgröße dieser Tiere nahm stark zu und die Tiere mussten aufgrund von Symptomen vorzeitig aus dem Versuch genommen werden [62]. Es wird davon ausgegangen, dass liposomales Clodronate die intakte Bluthirnschranke nicht durchqueren kann [70, 71]. Die Bluthirnschranke ist jedoch durch aggressives Tumorgewebe in der Regel sehr stark alteriert, so dass ein Eindringen von Clodronate in das Hirngewebe und somit eine Depletion auch der Mikroglia nicht ausgeschlossen werden kann [72].

Ausgangspunkt für die hier durchgeführten Versuche ist daher die Annahme, dass Makrophagen eine tumorbekämpfende Rolle spielen könnten. Um nun den Einfluss der Makrophagen genauer zu untersuchen, wurden die Makrophagen durch GM-CSF stimuliert. Die mit GM-CSF behandelten Tiere lebten signifikant länger, die Tumolvolumina blieben kleiner und es konnte die vorbeschriebene Regression der Tumoren beobachtet werden. In der Kontrollgruppe dieser Versuchsreihe konnte dagegen bei keinem Tier eine Tumorregression beobachtet werden. Die Rolle der Makrophagen im GBM ist bisher nur unzureichend geklärt, die vorliegende Arbeit

unterstützt aber die Hypothese einer positiven Rolle der Makrophagen bei der immunologischen Tumorbekämpfung des Organismus.

4.1 Tiermodell

Tiermodelle werden häufig herangezogen, um die genauen strukturellen, zellulären und immunologischen Vorgänge bei der Tumorentstehung und der Tumorentwicklung zu untersuchen. Als Modell für die Untersuchung von Gliomen wurden bisher am häufigsten Ratten verwendet. Inzwischen rückt auch das murine Modell in den Vordergrund, da die Möglichkeiten, genetisch veränderte Zelllinien herzustellen, stetig verbessert werden [73]. In dieser Arbeit wurden als Tiermodell Ratten vom Typ Sprague-Dawley herangezogen, da diese aufgrund des größeren Gehirns im Vergleich zu Mäusen eine exaktere Sphäroidimplantation ermöglichen und besser detektierbare Tumorumfänge entwickeln. Das Tumorstadium kann über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, da Ratten ein längeres Überleben als Mäuse aufweisen [73]. Den Tieren wurden die Sphäroide aus C6-Zellen in einer kurzen Operation in die Großhirnhemisphäre implantiert. Um die *in vivo* Überwachung des Tumorstadiums zu ermöglichen, wurden die Tumorumfänge mittels MRT-Messungen wöchentlich über einen Zeitraum von sechs Wochen bestimmt.

Zur Anwendung kamen C6-Zellen, welche unter Einfluss von N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff in einem Wistarauszuchtstamm entstanden. Zu den Faktoren, welche das Tumorstadium beeinflussen können, gehört unter anderem auch die Tatsache, dass die C6-Zellen nicht exakt syngene mit dem Wirt SD-Ratten sind. Die Zellen könnten im Wirt eine Immunantwort im Sinne einer Abstoßungsreaktion auslösen. Dies kann eine Ursache für die beobachtete Regression der Tumoren in der Versuchsgruppe sein [53, 54, 73].

Bei den verwendeten SD-Ratten handelt es sich um Auszuchtstiere, welche genetisch nicht identisch sind. So bleibt eine unterschiedliche Reaktion der Tiere auf die Implantation der C6-Zellen und die Behandlung mit GM-CSF nicht ausgeschlossen.

Auch Menschen sind genetisch nicht identisch und reagieren unterschiedlich auf verschiedene Therapien. Falls GM-CSF für die Behandlung des Glioblastoms beim Menschen in Betracht käme, müsste dieser Aspekt bedacht werden.

Durch die Operation zur Implantation der C6-Sphäroide wird außerdem ein Trauma, eine Wunde erzeugt. Die Vorgänge, welche im Körper nach einer Gewebsverletzung ablaufen, führen ebenso zu einer Entzündungsreaktion mit einer Aktivierung der Immunzellen [5]. Im vorliegenden Versuch zeigten die mit GM-CSF behandelten Tiere eine Regression der Tumoren. Im Gegensatz dazu konnte bei den Tieren der Kontrollgruppe die vorbeschriebene Regression nicht beobachtet werden. Ebenso konnte bei der Gruppe der makrophagendepletierten Tiere keine Regression nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Makrophagen eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Tumorwachstums spielen. Da eine Regression weder in der Kontrollgruppe noch in der Gruppe der makrophagendepletierten Tiere auftrat, können andere immunologische Reaktionen auf die C6-Zellen vernachlässigt werden.

4.2 Glioblastoma multiforme und die Rolle der Makrophagen

In Gehirntumoren konnte eine hohe Zahl an Makrophagen nachgewiesen werden, welche mit dem Malignitätsgrad ansteigt [39, 69]. Mikroglia und Makrophagen machen mit 5-30% den Hauptteil der die Gliome infiltrierenden Immunzellen aus [74]. Meist wird nicht zwischen Mikroglia und systemischen Makrophagen unterschieden (CD68- und CD11b/c-positiv), weshalb im Folgenden häufig synonym von Mikroglia und Makrophagen gesprochen wird [75-77]. Badie et al. konnten zeigen, dass eine Differenzierung bei den CD11b/c-positiven Zellen mittels Quantifizierung von CD45 realisiert werden kann, da Mikroglia eher niedrige, Makrophagen hingegen hohe Level für CD45 aufweisen [39, 74, 78]. Mikrogliazellen waren im gesamten Gehirn lokalisiert, wobei Zellen mit Eigenschaften der Makrophagen nur auf das Gebiet des Tumors begrenzt gefunden wurden [74]. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob in der Umgebung des Glioms die Expression von CD45 der Mikroglia verändert bzw. erhöht war [79].

Zunächst ging man davon aus, dass eine hohe Anzahl von Mikrogliazellen in Gliomen für deren tumorbekämpfende Aktivität spricht. Neuere Daten weisen aber eher in die Richtung einer immunsuppressiven Rolle in der Gliomumgebung und damit einer Unterstützung des Tumorwachstums [39, 80]. Es gibt viele synergistische Wechselwirkungen zwischen Glioblastomzellen und Mikroglia/Makrophagen, die für das immunsupprimierende Milieu sorgen. Zum einen kann die Produktion von *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) durch Glioblastomzellen zur Herunterregulation von *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Klasse II Molekülen durch Mikrogliazellen in der Gliom-Umgebung führen. Diese Moleküle sind bei der Interaktion von antigenpräsentierenden Zellen und T-Lymphozyten nötig [79, 81-83]. Zum anderen produzieren Glioblastomzellen selbst einige Substanzen mit immunsupprimierender Wirkung. Zu diesen Substanzen gehören zum Beispiel einige Zytokine wie IL-4, IL-6, TGF-β [77, 83, 84] und Prostaglandin-E2 (PG-E2) [79].

Andere Studien deuten darauf hin, dass eine hohe Anzahl an Makrophagen im Tumor tumorbekämpfend wirken kann [85, 86]. Galarneau et al. untersuchten 2007 in einem transgenen Mausmodell den Einfluss von Makrophagen auf das Wachstum von Glioblastomzellen. Es konnte ein um 33% vergrößertes Tumorwachstum bei den makrophagendepletierten Tieren gezeigt werden. Zudem wurde untersucht, ob dieser Effekt durch Beeinflussung der T-Zellen oder der Angiogenese entsteht. Gliomassoziierte Makrophagen können durch die Produktion von Tumornekrosefaktor (TNF) T-Zellen rekrutieren. Allerdings blieb ungeklärt, ob der Einfluss auf das Tumorwachstum durch die Makrophagen allein oder durch die TNF-vermittelte Aktivierung der T-Zellen geschah. Zusätzlich konnte eine um 12% geringere Gefäßdichte der makrophagendepletierten Tiere festgestellt werden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das vermehrte Tumorwachstum auf einer vergrößerten Gefäßversorgung basiert [85]. Diese Befunde wurden von Villeneuve et al. gestützt, die durch die Depletion von Makrophagen ebenfalls keine vermehrte Gefäßversorgung im Tumor feststellen konnten [86].

Die in der Literatur vorliegenden Daten geben einen Hinweis darauf, dass Mikroglia/Makrophagen unterschiedliche Rollen für das Tumorwachstum spielen

könnten. Einerseits stimulieren sie Tumorwachstum und Gefäßproliferation durch Sekretion unterschiedlicher Wachstumsfaktoren wie z. B. EGF und VEGF sowie der oben genannten immunsupprimierenden Substanzen [81]. Zudem können sie durch das Absondern verschiedener proteolytischer Enzyme wie z. B. Matrixmetalloproteasen die Extrazellulärmatrix derart schädigen, dass dem Tumor der Weg zur Invasion ins gesunde Gewebe erleichtert wird [87, 88]. Andererseits kann jedoch eine Depletion von Makrophagen das Tumorwachstum begünstigen [85]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass eine hohe Anzahl an Makrophagen ein prognostisch günstiger Faktor ist und mit verlängertem Überleben der Patienten assoziiert ist [89]. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente bestätigen die Hypothese, dass eine hohe Anzahl an Makrophagen im Tumorgewebe zu reduziertem Tumorwachstum führt und mit einem längeren Überleben assoziiert ist. Im Tumorgewebe der mit GM-CSF behandelten Tiere konnte eine signifikant höhere Makrophagenanzahl nachgewiesen werden als in der Kontrollgruppe. Zudem überlebten die Tiere der Versuchsgruppe signifikant länger als die Tiere der Kontrollgruppe.

Diese unterschiedliche Datenlage kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass Makrophagen in zwei unterschiedlichen Aktivitätszuständen vorliegen können. Beschrieben werden ein M1- und ein M2-Status (Abbildung 10). Der M1-Status beschreibt den klassisch aktivierten Makrophagen, welcher mit Entzündungsreaktionen assoziiert ist [79, 90]. In Anwesenheit verschiedener Zytokine wie GM-CSF und Interferon- γ (INF- γ) wandeln sich Monozyten zu Makrophagen mit M1-Status um. Durch die Expression des *Signal Transducer and Activator of Transcription 1* (STAT1) bekommen M1-Makrophagen antimikrobielle, immunstimulierende und tumorbekämpfende Funktionen [88]. Ein weiterer Faktor, welcher unter anderem zur Aktivierung und Rekrutierung der Mikroglia/Makrophagen beiträgt und von diesen Zellen auch selbst produziert werden kann, ist der Tumornekrosefaktor [86].

Der M2-Status entsteht durch alternative Aktivierung und beschreibt den Makrophagen unter Normbedingungen. Dieser ist unter anderem dafür verantwortlich, überschießende Immunreaktionen zu verhindern und erklärt,

warum der M2-Status eher immunsupprimierend wirkt. Der Wechsel vom M1-Status in den M2-Status wird unter anderem durch verschiedene vom Tumor produzierte Substanzen wie IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β und dem *Macrophage Colony Stimulating Factor* (M-CSF) induziert [90, 91]. Durch die Expression von STAT3 führen M2-Makrophagen Aufgaben wie die Reinigung und Reparatur von Gewebe oder die Unterstützung bei der Angiogenese aus und können so ein Fortschreiten der Tumorerkrankung begünstigen. Dies wird unter anderem durch die Freisetzung von IL-10 und TGF- β vermittelt. IL-10 konnte auch mikroglialen Ursprungs zugeordnet werden [77]. Komohara et al. konnten zeigen, dass von Tumorzellen produziertes M-CSF den Anteil an M2-Mikroglia/Makrophagen erhöhen und Tumorwachstum bzw. -proliferation begünstigen kann. In diesem Zusammenhang konnte in einer anderen Studie durch Blockierung des M2-Zustandes ein verringertes Tumorwachstum nachgewiesen werden [88, 92]. Komohara et al. vermuten außerdem, dass M-CSF auch auf para- und autokrinem Weg das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen fördert. Im GBM sind überwiegend Makrophagen im M2-Status zu finden, welche zum immunsupprimierenden Milieu des GBM beitragen [90].

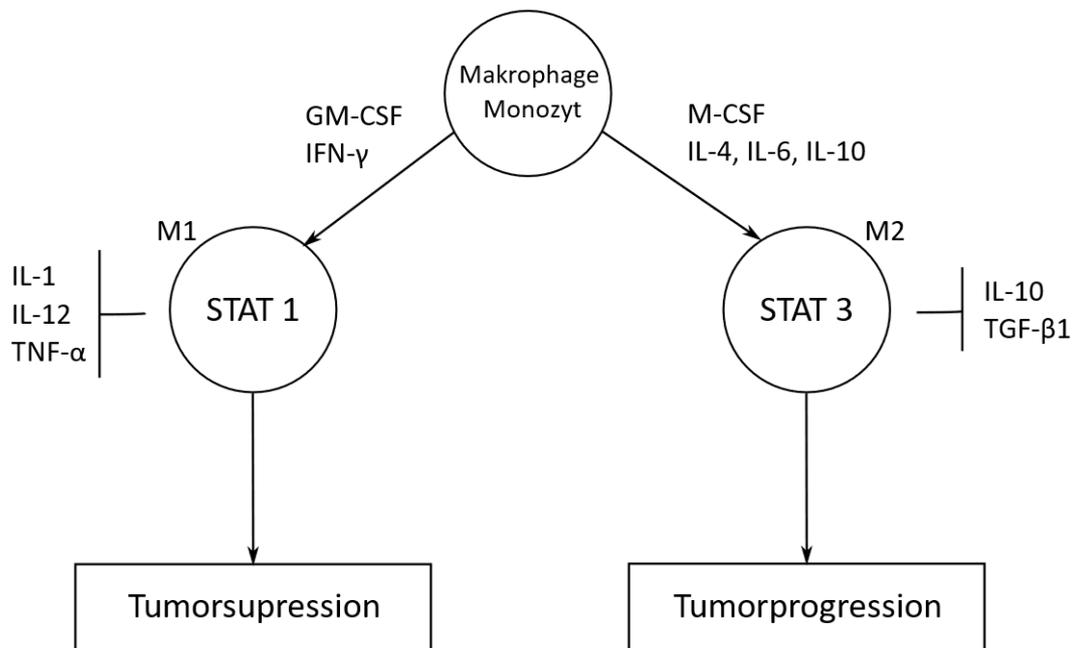


Abbildung 10: Unterschiedliche Aktivierungszustände von Makrophagen [88]

Auch gliomassoziierte Mikroglia ähnelt Makrophagen, die sich im antientzündlichen M2-Status befinden und begünstigt so das Tumorwachstum [90]. Ein hoher Anteil von Mikroglia/Makrophagen im M2-Status, im Vergleich zu der Gesamtzahl der Makrophagen, korreliert mit dem histologischen Malignitätsgrad des Glioms. Fischer und Reichmann zeigten, dass Mikrogliazellen, die *in vitro* mit GM-CSF behandelt wurden, sich vergrößern und dass eine heterogene Zellpopulation entsteht, welche Zellen enthält, die Gewebemakrophagen ähneln [93]. Dies verdeutlicht, dass die Funktion der Mikrogliazellen stark von lokalen Umgebungsfaktoren abhängt, wie z. B. GM-CSF und M-CSF [80, 93]. Es wird außerdem vermutet, dass durch die Expression von Fas-Ligand Mikroglia/Makrophagen zu der immunsupprimierenden Umgebung der Gliome beitragen [88, 94]. Es gibt Hinweise, dass sogenannte Tumorstammzellen eine Hauptursache für die Umprogrammierung der Mikroglia/Makrophagen in den immunsupprimierenden M2-Status darstellen könnten. Bei Tumorstammzellen handelt es sich um eine Population undifferenzierter multipotenter Zellen, welche ein hohes Selbsterneuerungspotential besitzen [95, 96]. Tumorstammzellen produzieren den *Soluble Colony Stimulating Factor* (sCSF), das *Macrophage Inhibitory Cytokine 1* (MIC1) und TGF- β 1. Diese Substanzen sind in der Lage, Mikroglia/Makrophagen in den M2-Status zu polarisieren und die Phagozytose zu blockieren. Die Produktion immunsupprimierender Zytokine wie IL-10 und TGF- β 1 wird induziert. Zudem erfolgt eine gesteigerte Hemmung der Proliferation der T-Zellen [88, 95].

Diese Umwandlung des Makrophagentyps mit einer tumorbekämpfenden Funktion in einen tumorfördernden Typ findet relativ spät während der Entwicklung des Glioms statt. Somit besteht die Möglichkeit, in diesem Zeitraum therapeutisch einzugreifen, um diesen Wechsel zu beeinflussen [88, 97]. Es konnte bereits festgestellt werden, dass beim therapeutischen Angriff dieser tumorassoziierten Makrophagen ein zeitlich versetzter Beginn erfolgreicher ist [92]. Ein Grund dafür könnte sein, dass in der frühen Phase der Gliomentwicklung Makrophagen im M1-Status tumorbekämpfend wirken. In dieser Phase könnte der Patient von der Unterstützung der Makrophagen durch deren Aktivierung mittels GM-CSF

profitieren. Ziel wäre dabei, den M1-Status möglichst lange zu bewahren und den Wechsel in den M2-Status zu verhindern. Erst nach dem Wechsel in den M2-Status ist es von Vorteil, die den Tumor unterstützenden Makrophagen therapeutisch anzugreifen. Ziel könnte sein, selektiv den M2-Status zu inhibieren und im Gegenzug den tumorbekämpfenden M1-Status zu fördern bzw. zu erhalten.

Die Tatsache, dass diese unterschiedlichen Aktivierungszustände der Makrophagen einem zeitlichen Verlauf unterliegen, könnte erklären, weshalb es auch in der mit GM-CSF behandelten Versuchsgruppe Tiere gab, bei denen relativ spät erstmalig Tumorwachstum auftrat. Wenn bei einem neuen Therapieansatz des Glioblastoms Makrophagen generell den Angriffspunkt bilden, müssen diese Tatsache sowie die beiden unterschiedlichen Aktivitätszustände berücksichtigt werden [79, 88, 90].

Nun bleibt zu klären, welchen Status der Makrophagen systemisch verabreichtes GM-CSF fördert. Denn auch die Rolle des GM-CSF bezüglich des Tumorwachstums wird eher dahingehend diskutiert, Tumorprogression zu fördern. Kohanbash et al. beschrieben eine immunsupprimierende Wirkung von GM-CSF. Es fördert bei Zellen der myeloischen Reihe die Expression des IL-4-Rezeptor- α . Die dadurch ausgelöste IL-13-vermittelte Produktion von Arginase führt zu einer Unterdrückung von Immunzellen, einschließlich der T-Zellen, welche den Tumor bekämpfen sollen [98]. Auch Sielska et al. beschreiben eine tumorfördernde Wirkung von GM-CSF. Die Depletion von GM-CSF in Gliomzellen führte im Versuchstier zu einer reduzierten Anzahl an tumorfördernden Makrophagen und störte zudem die Entwicklung des proinvasiven Makrophagentyps. Im Tierversuch überlebten die GM-CSF-depletierten Tiere länger [99]. Dahingegen beschreiben Grabstein et al. eine Förderung der tumorbekämpfenden Eigenschaft der Makrophagen durch GM-CSF *in vitro* und stellten fest, dass diese Makrophagen eine verbesserte Antitumoraktivität haben [100].

Der Effekt auf das Immunsystem bezüglich der Tumorkontrolle von GM-CSF ist zudem dosisabhängig. Hohe systemische Konzentrationen führen zur Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen, welche zum immunsupprimierenden Milieu beitragen und eine Bekämpfung des Tumors durch das Immunsystem stören [101]. Niedrige

Dosen im Rahmen von Impfungen mit Tumorantigenen hingegen stimulierten das Immunsystem und verstärkten die Antitumoraktivität. Um interindividuelle Unterschiede zu reduzieren, fand diese Untersuchung an genetisch identischen Mäusen statt. Ein Erklärungsversuch dafür könnte sein, dass GM-CSF in hoher Konzentration die Ausbildung des M-CSF-Rezeptors reduziert, in niedriger Dosierung aber die Expression des Rezeptors fördert [42, 102]. Beim Menschen jedoch führt eine Behandlung mit einer definierten Menge an GM-CSF zu unterschiedlichen Serumspiegeln [101].

Da es sich bei den Versuchstieren der hier vorliegenden Versuchsserie ebenfalls um genetisch nicht identische Tiere handelt, könnte dies eine Ursache für die unterschiedlichen Behandlungserfolge auch bei diesen Tieren sein. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass GM-CSF problemlos die Bluthirnschranke überqueren kann [103]. Somit bleibt hier zunächst ungeklärt, ob der Effekt allein durch die Aktivierung systemischer Makrophagen hervorgerufen wurde, oder ob ebenso Mikrogliazellen durch die Behandlung mit GM-CSF beeinflusst wurden.

Die Daten der hier durchgeführten Arbeit unterstützen die These, dass GM-CSF eine tumorbekämpfende Wirkung haben könnte. Die Anzahl der Makrophagen im Tumorgewebe war in den behandelten Tieren höher als in der Kontrollgruppe. Der zeitliche Kurvenverlauf der Makrophagenzahl verhielt sich ähnlich dem Kurvenverlauf des Tumolvolumens. Die Makrophagenzahl stieg zunächst an und erreichte am Versuchsende wieder nahezu den Ausgangswert. Somit konnte bestätigt werden, dass GM-CSF die Makrophagenzahl steigerte. Ebenso sprechen diese Ergebnisse dafür, dass GM-CSF einen positiven Effekt in der Bekämpfung des Tumors haben könnte.

Trotz intensiver Forschung und allen Bemühungen die Therapie des GBM zu optimieren, ist die Diagnose mit einer infausten Prognose verknüpft. Das mediane Überleben beträgt bei Ausschöpfen der Standardtherapie knapp 15 Monate, die Fünfjahresüberlebensrate liegt unter 10% [12, 13]. Durch die Forschungen der letzten Jahre konnte die Prognose nicht erheblich verbessert werden. Diese Tatsachen verdeutlichen den immensen Bedarf an neuen Behandlungsstrategien im

Kampf gegen das Glioblastom. Das Immunsystem rückt immer mehr in das Interesse der aktuellen Forschung. Auch die Makrophagen als Vertreter des angeborenen Immunsystems stellen einen neuen, bisher vernachlässigten Ansatz dar. Ziel ist es, die körpereigene Immunabwehr gezielt zur wirkungsvollen Tumorbekämpfung zu aktivieren, ohne dabei die körpereigenen Zellen anzugreifen.

5 Zusammenfassung

Die Immunabwehr des Patienten stellt eine Schlüsselrolle bei der spontanen Tumorregression dar. Bisher zählten zytotoxische CD8-positive T-Zellen und natürliche Killerzellen zu den wichtigsten zellulären Vertretern der Tumorkontrolle. Im Tierversuch konnte jedoch kein signifikanter Einfluss dieser Zellen auf die spontane Regression nachgewiesen werden. Allerdings fand sich eine hohe Anzahl an Makrophagen im Tumorgewebe. In vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich bei der Depletion der Makrophagen mittels Clodronate im Tiermodell der Ratte ein deutlich gesteigertes Tumorwachstum. In der hier durchgeführten Versuchsreihe wurde nun der Einfluss von Makrophagen auf das Tumorwachstum orthotop implantierter C6-Glioblastomsphäroide betrachtet. Dabei wurden die Makrophagen durch den Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (rhGM-CSF, Leukine) aktiviert.

29 SD-Ratten wurden C6-Gliom-Sphäroide orthotop implantiert. 20 der Tiere wurden jeden zweiten Tag mit $1\mu\text{g}/100\text{g}$ Körpergewicht rhGSM-CSF s. c. behandelt. Neun Tiere dienten als Kontrollgruppe. Zur Verlaufsbeurteilung wurden an den Tagen 7, 14, 21, 28, 32 und 42 nach Implantation MRT-Untersuchungen (T1, T2 und 3D CISS-Sequenzen) durchgeführt. Die Tumolvolumina wurden mit Hilfe dieser MRT-Untersuchungen ermittelt. Die histologische Aufarbeitung beinhaltete HE-, CD68-Makrophagen-, CD8-positive T-Zellen- sowie Ki-67 Proliferations- Färbungen in Paraffinschnitten von Gehirn, Tumor und Milz.

In 15 der 20 behandelten Tiere entwickelten sich solide Tumoren. Am Tag 7 konnte lediglich bei zwei Tieren mittels MRT ein minimales Tumorwachstum nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe war bereits bei drei von neun Tieren minimales Tumorwachstum zu verzeichnen. Am Tag 14 zeigten sich bei 11 von 17 (65%) Tieren der Versuchsgruppe solide Tumoren. Drei der verbleibenden 15 Tiere zeigten am Tag 21 erstmalig Tumorwachstum. Im Gegensatz dazu konnte in der Kontrollgruppe bereits an Tag 14 bei allen Tieren ein Tumorwachstum nachgewiesen werden. In der GM-CSF Gruppe entwickelten sich die Tumoren später und erreichten mit einem Median von 134mm^3 ein geringeres Volumen als in der

Kontrollgruppe (262mm³). Das mediane Überleben war mit 35 Tagen in der Gruppe der behandelten Tiere signifikant länger als in der Kontrollgruppe mit 24 Tagen. Zudem wurden in der histologischen Aufarbeitung der Tumoren signifikant mehr Makrophagen im Tumorgewebe nachgewiesen.

Die Stimulation der Makrophagen durch GM-CSF im orthotopen C6-Glioblastommodell der Ratte führte zu einem beachtlich reduzierten und verzögerten Tumorwachstum. Die behandelten Tiere überlebten signifikant länger als die Tiere der Kontrollgruppe. Die aktuelle Datenlage bestätigt die bedeutende Rolle der angeborenen Immunabwehr durch Makrophagen in der Kontrolle des Tumorwachstums bei experimentellen Glioblastomen. Die Aktivierung der Makrophagen hatte einen deutlichen Einfluss auf das Tumorwachstum, wohingegen eine T-Zell-Depletion nur einen geringen Einfluss darauf hatte. Makrophagen als Vertreter des angeborenen Immunsystems wurden bisher in ihrer Rolle der Tumorkontrolle unterschätzt. Es bedarf noch weiterer Untersuchungen, ob die Makrophagen in Zukunft, ohne die körpereigenen Zellen anzugreifen, zur wirkungsvollen Tumorbekämpfung herangezogen werden könnten.

6 Anhang

6.1 Veröffentlichungen

Teile der hier vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- **Jawork A**, Linsenmann T, Hagemann C, Kessler AF, Berg F, Löhr M, Ernestus R-I, Vince GH. *Die Rolle von durch rhGM-CSF aktivierten Makrophagen bei der Immunabwehr von Glioblastomen im orthotopen C6-Tumormodell der Ratte.* Sektionstagung Neuroonkologie 2012, Münster 26.-27.10.2012.
- Linsenmann T, **Jawork A**, Westermaier T, Homola G, Monoranu CM, Vince GH, Kessler AF, Ernestus RI, Lohr M. *Tumor growth under rhGM-CSF application in an orthotopic rodent glioma model.* *Oncology letters.* 2019;17(6):4843-50.
- Lohr M, Linsenmann T, **Jawork A**, Kessler AF, Timmermann N, Homola GA, Ernestus RI, Hagemann C. *Implanting Glioblastoma Spheroids into Rat Brains and Monitoring Tumor Growth by MRI Volumetry.* *Methods in molecular biology.* 2017;1622:149-59.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schemazeichnung des Tiermodells mit C6-Sphäroidimplantation	13
Abbildung 2: Volumetrie, Markierung der Tumorfläche in einer Schicht	28
Abbildung 3: MRT-Verlauf des Gehirntumorwachstums.....	33
Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf des Tumolvolumens	34
Abbildung 5: Überlebenskurve	35
Abbildung 6: HE-Färbung eines repräsentativen C6-Zell-Glioblastoms	37
Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der CD8-Zellzahl im C6-Zell-Glioblastom	38
Abbildung 8: CD68-Färbung eines repräsentativen C6-Zell-Glioblastoms	39
Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der Makrophagenzahl im Tumorgewebe	40
Abbildung 10: Unterschiedliche Aktivierungszustände von Makrophagen.....	46

6.3 Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
CCT	Cranielle Computertomographie
CD	Cluster of Differentiation
di NaHPO ₂ 12H ₂ O	Dinatriumphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFRVIII.....	Epidermal Growth Factor Receptor Variant III
FCS.....	Fetales Kälberserum
FLAIR.....	Fluid Attenuated Inversion Recovery
G-BA	Gemeinsamer Bundesausschuss
GBM.....	Glioblastoma multiforme
GM-CSF.....	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GÜ	Gesamtüberleben
Gy	Gray
HCl.....	Salzsäure
HE-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
IDH1.....	Isozitatdehydrogenase
IL	Interleukin

INF- γ	Interferon- γ
kDa	Kilodalton
LOH	Loss of Heterozygosity
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIC1	Macrophage Inhibitory Cytokine
MRT	Magnetresonanztomographie
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat
NEA	Non Essential Aminoacids
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PFÜ	Progressionsfreies Überleben
PG-E2	Prostaglandin-E2
RB-Gen	Retinoblastom-Gen
rhGM-CSF	Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
sCSF	soluble Colony Stimulating Factor
SD	Sprague-Dawley
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF- β	Transforming Growth Factor- β

TNF	Tumornekrosefaktor
TP53-Gen	Tumorprotein 53-Gen
TTF	Tumortheraiefelder
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vaskular Endothelial Growth Factor Receptor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

6.4 Literaturverzeichnis

1. Crocetti E, Trama A, Stiller C, Caldarella A, Soffiotti R, Jaal J, et al. *Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe*. European journal of cancer. 2012;48(10):1532-42.
2. Scherer HJ. *A Critical Review: The Pathology of Cerebral Gliomas*. Journal of neurology and psychiatry. 1940;3(2):147-77.
3. Tandon PNRR. *Ramamurthi and Tandon's textbook of neurosurgery*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2012.
4. Ohgaki H, Kleihues P. *The definition of primary and secondary glioblastoma*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2013;19(4):764-72.
5. Böcker W, Aguzzi A. *Pathologie*. 4., vollst. überarb. Aufl. ed. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer; 2008. XXX, 1362 S. p.
6. DeAngelis LM. *Brain tumors*. The New England journal of medicine. 2001;344(2):114-23.
7. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) - Herausgegeben von der Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie - Gliome* 01.03.2014 [updated; abgerufen am 28.05.202. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-099l_S2k_Gliome_2015-06-abgelaufen.pdf.
8. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta neuropathologica. 2007;114(2):97-109.
9. Claes A, Idema AJ, Wesseling P. *Diffuse glioma growth: a guerilla war*. Acta neuropathologica. 2007;114(5):443-58.

10. Butowski NA, Sneed PK, Chang SM. *Diagnosis and treatment of recurrent high-grade astrocytoma*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2006;24(8):1273-80.
11. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ, et al. *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial*. The lancet oncology. 2006;7(5):392-401.
12. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. The New England journal of medicine. 2005;352(10):987-96.
13. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*. The lancet oncology. 2009;10(5):459-66.
14. Ahmadloo N, Kani AA, Mohammadianpanah M, Nasrolahi H, Omidvari S, Mosalaei A, et al. *Treatment outcome and prognostic factors of adult glioblastoma multiforme*. Journal of the Egyptian National Cancer Institute. 2013;25(1):21-30.
15. Gerstein J, Franz K, Steinbach JP, Seifert V, Rodel C, Weiss C. *Radiochemotherapy with temozolomide for patients with glioblastoma. Prognostic factors and long-term outcome of unselected patients from a single institution*. Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]. 2011;187(11):722-8.
16. Zhang X, Zhang W, Cao WD, Cheng G, Zhang YQ. *Glioblastoma multiforme: Molecular characterization and current treatment strategy (Review)*. Experimental and therapeutic medicine. 2012;3(1):9-14.

17. Schmidt MC, Antweiler S, Urban N, Mueller W, Kuklik A, Meyer-Puttlitz B, et al. *Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma*. Journal of neuropathology and experimental neurology. 2002;61(4):321-8.
18. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. Science. 2008;321(5897):1807-12.
19. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. The New England journal of medicine. 2005;352(10):997-1003.
20. Plate KH, Breier G, Risau W. *Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis*. Brain pathology. 1994;4(3):207-18.
21. Plate KH, Risau W. *Angiogenesis in malignant gliomas*. Glia. 1995;15(3):339-47.
22. Goldbrunner RH, Bendszus M, Sasaki M, Kraemer T, Plate KH, Roosen K, et al. *Vascular endothelial growth factor-driven glioma growth and vascularization in an orthotopic rat model monitored by magnetic resonance imaging*. Neurosurgery. 2000;47(4):921-9; discussion 9-30.
23. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. *Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo*. Nature. 1992;359(6398):845-8.
24. Wang Y, Jiang T. *Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management*. Cancer letters. 2013;331(2):139-46.
25. Heinzl S. *Erstlinientherapie des Glioblastoms: Bevacizumab verlängert progressionsfreies Überleben*. Dtsch Arztebl International. 2015;112(4):137-.

26. Wick W, Gorlia T, Bendszus M, Taphoorn M, Sahm F, Harting I, et al. *Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma*. The New England journal of medicine. 2017;377(20):1954-63.
27. Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE, Aldape KD, Friedman AH, Friedman HS, et al. *Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010;28(31):4722-9.
28. Marsh JC, Goldfarb J, Shafman TD, Diaz AZ. *Current status of immunotherapy and gene therapy for high-grade gliomas*. Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center. 2013;20(1):43-8.
29. Muragaki Y, Maruyama T, Iseki H, Tanaka M, Shinohara C, Takakura K, et al. *Phase I/IIa trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine concomitant with fractionated radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma*. Clinical article. Journal of neurosurgery. 2011;115(2):248-55.
30. Chen SH, Shine HD, Goodman JC, Grossman RG, Woo SL. *Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994;91(8):3054-7.
31. Kwiatkowska A, Nandhu MS, Behera P, Chiocca EA, Viapiano MS. *Strategies in gene therapy for glioblastoma*. Cancers. 2013;5(4):1271-305.
32. Gemeinsamer Bundesausschuss. *Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Richtlinie Methoden vertragsärztliche Versorgung (MVV-RL): Tumortheraiefelder beim Glioblastom* 20.03.2020 [updated; abgerufen am 23.05.2023]. Available from: https://www.g-ba.de/downloads/39-261-4216/2020-03-20_MVV-RL_TTF-Glioblastom.pdf.

33. BAnz AT 22.05.2020 B2. *Bekanntmachung eines Beschlusses des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Richtlinie Methoden vertragsärztliche Versorgung (MVV-RL):Tumortheraiefelder beim Glioblastom.*
34. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, et al. *Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial.* *Jama.* 2017;318(23):2306-16.
35. Kessler AF, Linsenmann T, Westermaier T, Wolber W, Weiland J, Monoranu CM, et al. *Complete radiological response following subtotal resection in three glioblastoma patients under treatment with Tumor Treating Fields.* *Oncology letters.* 2020;19(1):557-61.
36. Medawar PB. *Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye.* *British journal of experimental pathology.* 1948;29(1):58-69.
37. Bechmann IJr. *Mechanismen des Immunprivilegs im zentralen Nervensystem nach axonaler Läsion.* [S.l.]: [s.n.]; 2001.
38. Gomez GG, Kruse CA. *Mechanisms of malignant glioma immune resistance and sources of immunosuppression.* *Gene therapy & molecular biology.* 2006;10(A):133-46.
39. Badie B, Schartner J. *Role of microglia in glioma biology.* *Microscopy research and technique.* 2001;54(2):106-13.
40. Löffler G. *Biochemie und Pathobiochemie mit 192 Tabellen ; [+ online specials].* 8., vollst. neu bearb. Aufl. ed. Heidelberg: Springer; 2007. XXI, 1263 S. p.
41. Schmidt RF. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie ; mit 77 Tabellen ; [+ IMPP-Fragen Physiologie online].* 30., neu bearb. und aktualisierte Aufl. ed. Heidelberg: Springer; 2007. XXII, 1030 S. p.

42. Rapoport AP, Abboud CN, DiPersio JF. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): receptor biology, signal transduction, and neutrophil activation*. Blood reviews. 1992;6(1):43-57.
43. Barlow DP, Bucan M, Lehrach H, Hogan BL, Gough NM. *Close genetic and physical linkage between the murine haemopoietic growth factor genes GM-CSF and Multi-CSF (IL3)*. The EMBO journal. 1987;6(3):617-23.
44. Yang YC, Kovacic S, Kriz R, Wolf S, Clark SC, Wellems TE, et al. *The human genes for GM-CSF and IL 3 are closely linked in tandem on chromosome 5*. Blood. 1988;71(4):958-61.
45. Burgess AW, Camakaris J, Metcalf D. *Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium*. The Journal of biological chemistry. 1977;252(6):1998-2003.
46. Tavernier J, Devos R, Cornelis S, Tuypens T, Van der Heyden J, Fiers W, et al. *A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alpha chain and a beta chain shared with the receptor for GM-CSF*. Cell. 1991;66(6):1175-84.
47. Kitamura T, Sato N, Arai K, Miyajima A. *Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors*. Cell. 1991;66(6):1165-74.
48. Hamilton JA, Anderson GP. *GM-CSF Biology*. Growth factors. 2004;22(4):225-31.
49. Metcalf D, Johnson GR, Burgess AW. *Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipotential and erythroid precursor cells*. Blood. 1980;55(1):138-47.
50. Morrissey PJ, Bressler L, Park LS, Alpert A, Gillis S. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments the primary antibody response by enhancing*

- the function of antigen-presenting cells.* Journal of immunology. 1987;139(4):1113-9.
51. Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall JA, et al. *Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994;91(12):5592-6.
52. Antman KS, Griffin JD, Elias A, Socinski MA, Ryan L, Cannistra SA, et al. *Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression.* The New England journal of medicine. 1988;319(10):593-8.
53. Huszthy PC, Daphu I, Niclou SP, Stieber D, Nigro JM, Sakariassen PO, et al. *In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives.* Neuro-oncology. 2012;14(8):979-93.
54. Goldbrunner RH, Wagner S, Roosen K, Tonn JC. *Models for assessment of angiogenesis in gliomas.* Journal of neuro-oncology. 2000;50(1-2):53-62.
55. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. *Differentiated rat glial cell strain in tissue culture.* Science. 1968;161(3839):370-1.
56. Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Plate KH, Vince GH, Roosen K, Tonn JC. *Vascularization of human glioma spheroids implanted into rat cortex is conferred by two distinct mechanisms.* Journal of neuroscience research. 1999;55(4):486-95.
57. Vince GH, Bendszus M, Schweitzer T, Goldbrunner RH, Hildebrandt S, Tilgner J, et al. *Spontaneous regression of experimental gliomas--an immunohistochemical and MRI study of the C6 glioma spheroid implantation model.* Experimental neurology. 2004;190(2):478-85.

58. Lohr M, Linsenmann T, Jawork A, Kessler AF, Timmermann N, Homola GA, et al. *Implanting Glioblastoma Spheroids into Rat Brains and Monitoring Tumor Growth by MRI Volumetry*. *Methods in molecular biology*. 2017;1622:149-59.
59. Papac RJ. *Spontaneous regression of cancer*. *Cancer treatment reviews*. 1996;22(6):395-423.
60. Bodey B. *Spontaneous regression of neoplasms: new possibilities for immunotherapy*. *Expert opinion on biological therapy*. 2002;2(5):459-76.
61. Hildebrandt S. *Spontane Regression experimenteller Gliome – Vergleich des Spontanverlaufes intracerebraler Gliome bei immunkompetenten und thymektomierten Ratten anhand immunhistologischer und MRT-Studien im Rahmen der C6- Gliomsphäroidimplantation*. Würzburg 2004.
62. Hagemann C, Varallyay C, Heinrich J, Linsenmann T, Ernestus R-I, Vince GH. *Macrophage-mediated host defense in the C6 experimental glioma implantation model*. *Int J of Mol Med*. 2011;28(Suppl. 1):35.
63. Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. *A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids*. *Cancer research*. 1977;37(10):3639-43.
64. Linsenmann T, Jawork A, Westermaier T, Homola G, Monoranu CM, Vince GH, et al. *Tumor growth under rhGM-CSF application in an orthotopic rodent glioma model*. *Oncology letters*. 2019;17(6):4843-50.
65. Burger PC, Shibata T, Kleihues P. *The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology*. *The American journal of surgical pathology*. 1986;10(9):611-7.
66. Brideau RJ, Carter PB, McMaster WR, Mason DW, Williams AF. *Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies*. *European journal of immunology*. 1980;10(8):609-15.

67. Micklem K, Rigney E, Cordell J, Simmons D, Stross P, Turley H, et al. *A human macrophage-associated antigen (CD68) detected by six different monoclonal antibodies*. British journal of haematology. 1989;73(1):6-11.
68. Milligan CE, Cunningham TJ, Levitt P. *Differential immunochemical markers reveal the normal distribution of brain macrophages and microglia in the developing rat brain*. The Journal of comparative neurology. 1991;314(1):125-35.
69. Roggendorf W, Strupp S, Paulus W. *Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors*. Acta neuropathologica. 1996;92(3):288-93.
70. Fulci G, Dmitrieva N, Gianni D, Fontana EJ, Pan X, Lu Y, et al. *Depletion of peripheral macrophages and brain microglia increases brain tumor titers of oncolytic viruses*. Cancer research. 2007;67(19):9398-406.
71. Van Rooijen N, Sanders A. *Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications*. Journal of immunological methods. 1994;174(1-2):83-93.
72. Kumamaru H, Saiwai H, Kobayakawa K, Kubota K, van Rooijen N, Inoue K, et al. *Liposomal clodronate selectively eliminates microglia from primary astrocyte cultures*. Journal of neuroinflammation. 2012;9:116.
73. Barth RF, Kaur B. *Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas*. Journal of neuro-oncology. 2009;94(3):299-312.
74. Badie B, Schartner JM. *Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas*. Neurosurgery. 2000;46(4):957-61; discussion 61-2.

75. da Fonseca AC, Badie B. *Microglia and macrophages in malignant gliomas: recent discoveries and implications for promising therapies*. Clinical & developmental immunology. 2013;2013:264124.
76. Coniglio SJ, Segall JE. *Review: Molecular mechanism of microglia stimulated glioblastoma invasion*. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology. 2013.
77. Wagner S, Czub S, Greif M, Vince GH, Suss N, Kerkau S, et al. *Microglial/macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas*. International journal of cancer Journal international du cancer. 1999;82(1):12-6.
78. Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dorries R, Butcher GW, ter Meulen V. *Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1991;88(16):7438-42.
79. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. *The brain tumor microenvironment*. Glia. 2011;59(8):1169-80.
80. Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT. *The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology*. Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia. 2010;17(1):6-10.
81. Watters JJ, Schartner JM, Badie B. *Microglia function in brain tumors*. Journal of neuroscience research. 2005;81(3):447-55.
82. Badie B, Bartley B, Schartner J. *Differential expression of MHC class II and B7 costimulatory molecules by microglia in rodent gliomas*. Journal of neuroimmunology. 2002;133(1-2):39-45.
83. Czarniecki CW, Chiu HH, Wong GH, McCabe SM, Palladino MA. *Transforming growth factor-beta 1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells*. Journal of immunology. 1988;140(12):4217-23.

84. Wrann M, Bodmer S, de Martin R, Siepl C, Hofer-Warbinek R, Frei K, et al. *T cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12.5-kd protein closely related to transforming growth factor-beta*. The EMBO journal. 1987;6(6):1633-6.
85. Galarneau H, Villeneuve J, Gowing G, Julien JP, Vallieres L. *Increased glioma growth in mice depleted of macrophages*. Cancer research. 2007;67(18):8874-81.
86. Villeneuve J, Tremblay P, Vallieres L. *Tumor necrosis factor reduces brain tumor growth by enhancing macrophage recruitment and microcyst formation*. Cancer research. 2005;65(9):3928-36.
87. Hagemann C, Anacker J, Ernestus RI, Vince GH. *A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas*. World journal of clinical oncology. 2012;3(5):67-79.
88. Wei J, Gabrusiewicz K, Heimberger A. *The controversial role of microglia in malignant gliomas*. Clinical & developmental immunology. 2013;2013:285246.
89. Beyer C. *Tumor-infiltrierende Lymphozyten beim Glioblastoma multiforme*. Erlangen2010.
90. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. *Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas*. The Journal of pathology. 2008;216(1):15-24.
91. Alterman RL, Stanley ER. *Colony stimulating factor-1 expression in human glioma*. Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and research groups on neurochemistry and cerebrospinal fluid. 1994;21(2-3):177-88.
92. Gabrusiewicz K, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M, Sielska M, Frankowska M, Kaminska B. *Characteristics of the alternative phenotype of*

- microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas*. PloS one. 2011;6(8):e23902.
93. Fischer HG, Reichmann G. *Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation*. Journal of immunology. 2001;166(4):2717-26.
 94. Badie B, Schartner J, Prabakaran S, Paul J, Vorpahl J. *Expression of Fas ligand by microglia: possible role in glioma immune evasion*. Journal of neuroimmunology. 2001;120(1-2):19-24.
 95. Wu A, Wei J, Kong LY, Wang Y, Priebe W, Qiao W, et al. *Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia*. Neuro-oncology. 2010;12(11):1113-25.
 96. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. *Neural stem cells and the origin of gliomas*. The New England journal of medicine. 2005;353(8):811-22.
 97. Kennedy BC, Maier LM, D'Amico R, Mandigo CE, Fontana EJ, Waziri A, et al. *Dynamics of central and peripheral immunomodulation in a murine glioma model*. BMC immunology. 2009;10:11.
 98. Kohanbash G, McKaveney K, Sakaki M, Ueda R, Mintz AH, Amankulor N, et al. *GM-CSF Promotes the Immunosuppressive Activity of Glioma-Infiltrating Myeloid Cells through Interleukin-4 Receptor-alpha*. Cancer research. 2013.
 99. Sielska M, Przanowski P, Wylot B, Gabrusiewicz K, Maleszewska M, Kijewska M, et al. *Distinct roles of CSF family cytokines in macrophage infiltration and activation in glioma progression and injury response*. The Journal of pathology. 2013;230(3):310-21.
 100. Grabstein KH, Urdal DL, Tushinski RJ, Mochizuki DY, Price VL, Cantrell MA, et al. *Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Science. 1986;232(4749):506-8.

101. Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. *High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells.* Cancer research. 2004;64(17):6337-43.
102. Gliniak BC, Rohrschneider LR. *Expression of the M-CSF receptor is controlled posttranscriptionally by the dominant actions of GM-CSF or multi-CSF.* Cell. 1990;63(5):1073-83.
103. McLay RN, Kimura M, Banks WA, Kastin AJ. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor crosses the blood--brain and blood--spinal cord barriers.* Brain : a journal of neurology. 1997;120 (Pt 11):2083-91.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus danke ich für Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit im tumorbiologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg.

Mein hauptsächlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Giles Hamilton Vince, der mir durch Überlassung dieses interessanten Themas und die wissenschaftliche Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Carsten Hagemann für die Begleitung während der gesamten Durchführung dieser Arbeit. Seine zahlreichen Anregungen und die Geduld für meine Fragen und Anliegen waren ein wertvoller Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.

Für die immer freundliche und geduldige Unterstützung bei der Einweisung und Betreuung in die Arbeitsweisen im Labor danke ich in besonderer Weise Frau Stefanie Gerngras und Frau Siglinde Kühnel.

Ein ganz herzliches Dankeschön richte ich an meine Familie Katharina, Erwin und Elisabeth, die mich stets moralisch, finanziell und kulinarisch unterstützt haben. Durch sie wurden mir das Studium und die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Matthias, der nie aufgehört hat, mich für diese Arbeit zu motivieren und liebevoll zu unterstützen.

A herzlichen Vergelt's Gott!