

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie
(Direktor: Professor Dr. med. Henry W. S. Schroeder)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald
angefertigt am Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie (INP)
in der Abteilung *ZIK plasmatis* „Plasma-Redox-Effekte“

**PSGL-1 und intratumorale Heterogenität Tumor-assoziiertes Makrophagen und
Mikrogliazellen im Glioblastom**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2022

vorgelegt von:
Ispirjan, Mikael
geb. am: 13.04.1996
in: Pasewalk

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. med. Henry W. S. Schroeder
2. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. med. Walter Stummer.
Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum der Neurologie/Neurochirurgie
Tag der Disputation: 17.10.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung	7
1.1 Glioblastom – ein Überblick.....	7
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	7
1.1.2 Symptome und Diagnostik	8
1.1.3 Therapie und Prognose	9
1.2 Intratumorale Heterogenität im Glioblastom.....	11
1.2.1 Intratumorale Heterogenität auf molekulargenetischer Ebene.....	11
1.2.2 Intratumorale Heterogenität auf zellulärer Ebene.....	12
1.3 Neuropathologie des Glioblastoms	13
1.3.1 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM)	13
1.3.2 Bedeutung der Zytokine in der Tumorprogression	18
2 Zielsetzung der Arbeit	19
3 Materialien.....	20
3.1 Verbrauchsmaterialien	20
3.2 Reagenzien & Chemikalien	21
3.3 Puffer und Lösungen.....	22
3.4 Antikörper.....	22
3.5 Laborgeräte	23
3.6 Software und Datenbanken.....	24
4 Methoden	25
4.1 Aufbereitung der primären Glioblastomproben.....	25
4.1.1 Gewebekultur-Überstände.....	28
4.2 Verarbeitung am Gefriermikrotom.....	28
4.3 Autofluoreszenzmessung am Mausgehirn.....	30
4.3.1 Vorfixierung von Mausgehirnen	30
4.3.2 Färbung mit Sudan Schwarz B	30
4.4 Etablierung der Mehrfachfärbung	31
4.4.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung.....	33
4.4.2 Etablierung der Blockierungs-Lösungen	34
4.5 Analyse der Gewebekultur-Überstände	34
4.6 Mikroskopie	35
4.6.1 Immunfluoreszenz.....	35
4.6.2 Immunhistochemie	36

4.7	Bildanalyse mit Harmony.....	37
4.7.1	Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen	37
4.7.2	Analyse immunhistochemischer Färbungen	39
4.7.3	Quantifizierung der Bildanalysen für die graphische Darstellung	40
4.8	Statistik	42
5	Ergebnisse	43
5.1	IHC-Schnitte aus dem Institut für Pathologie	43
5.1.1	Immunhistochemische Auswertung.....	43
5.1.2	Daten-Korrelation der Durchflusszytometrie und Immunhistochemie.....	45
5.2	Etablierungen.....	47
5.2.1	Probenaufarbeitung	47
5.2.2	Vorfixierung des Gewebes für Histologie	48
5.2.3	Der Einfluss von Sudan Schwarz B auf die Autofluoreszenz.....	50
5.2.4	Etablierung der Gewebsblockierung	52
5.3	Intratumorale Heterogenität im Glioblastom.....	53
5.3.1	Expressionsstärke der Antigene	53
5.3.2	Intratumorale Heterogenität der Studienmarker.....	55
5.3.3	Heterogenitäts-Score der Antigene.....	83
5.3.4	Zytokin- und Chemokinexpression im Glioblastom.....	84
5.3.5	Intratumorale Heterogenität der Zytokine und Chemokine im Glioblastom	86
5.3.6	Heterogenitäts-Score der Zytokine und Chemokine	90
6	Diskussion	92
6.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	92
6.2	PSGL-1 Expression im Glioblastom	93
6.3	Bedeutung der intratumoralen Heterogenität im Glioblastom.....	97
6.4	Heterogenität und Polarisationspektren intratumoraler Makrophagen	101
6.5	Limitationen der Arbeit	106
6.6	Fazit	107
7	Zusammenfassung	109
8	Literaturverzeichnis.....	110
9	Appendix	119
10	Danksagung.....	128

Abkürzungsverzeichnis

1X	Einfach konzentriert
°C	Grad Celsius
μ-	Mikro-
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
μm ²	Quadratmikrometer
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AF	<i>Alexa Fluor</i>
Arg1	Arginase-1
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CLS	<i>Confocal laser scanner</i> (engl.: Konfokal-Mikroskop)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CSF1	<i>Colony stimulating factor-1</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (engl. Desoxyribonukleinsäure)
d.h.	Das heißt
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> (lat.: und andere)
GBM	Glioblastoma multiforme
G-CIMP	<i>Glioma CPG island methylator phenotype</i>
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cell</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenz-Intensität
MGMT	O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase (<i>MGMT</i>)-Gen

MRT	Magnetresonanztomographie
min	Minute
ml	Milliliter
ms	Millisekunde
nm	Nanometer
O. C. T	OCT Einbettmedium
OT	Objektträger
PFA	Paraformaldehyd
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (engl.: Phosphat-gepufferte Salzlösung)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	<i>Standard deviation</i> (engl.: Standardabweichung)
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TREM	<i>Triggering Receptor expressed on myeloid cells</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Well, °	Einbuchtung einer Mikrotiterplatte (engl. Schacht)
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Tumoren aller Art, insbesondere Gliome, haben eine ausgeprägte intra -und intertumorale Heterogenität. Das Aufdecken der Zusammenhänge des Tumormikromilieus ist essentiell für das Verständnis des Tumors und seiner Progression. Die meisten Studien mit humanen Tumorproben zeigen genau an diesem Punkt ihre Limitation. Häufig wird ein Tumor nur anhand einer Probe aus einer einzigen Entnahmestelle analysiert und histologisch aufgearbeitet. Die Rückschlüsse, die hieraus gezogen werden, gelten sodann für den gesamten Tumor. Es bleibt jedoch unberücksichtigt, ob der Tumor sich in unterschiedlichen Lokalisationen anders zusammensetzt. Insbesondere im Hinblick auf die neuen Immuntherapien spielt dies eine zentrale Rolle.

Unsere Arbeitsgruppe hat in vorausgehenden Untersuchungen PSGL-1 auf zirkulierenden Monozyten und intratumoralen Makrophagen im Gliom untersucht. Die resultierenden Ergebnisse sind der Grundstein für die Planung und Durchführung dieser Dissertation.

Die vorliegende Dissertation verfolgt das Ziel, die intratumorale Heterogenität von PSGL-1 und zahlreichen anderen Makrophagen-Markern im Gliom zu untersuchen.

1.1 Glioblastom – ein Überblick

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Gliome sind die häufigsten hirneigenen Tumoren. Gliom ist ein Überbegriff für eine Gruppe von Tumoren, die nach ihrer Ursprungszelle differenziert werden können. Dazu zählen Tumoren astrozytären Ursprungs (anaplastisches Astrozytom, Glioblastom), Oligodendrogliome, Ependymome und gemischte Gliome. Mit einem Anteil von 80 % repräsentieren Gliome die Mehrheit primär maligner Neoplasien im Gehirn. [2, 3]

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist als bösartigster und aggressivster Hirntumor gleichzeitig der häufigste primär maligne Hirntumor. Trotz einer niedrigen Inzidenz von vier bis fünf Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner, stellt das Glioblastom durch seine infauste Prognose ein zentrales Gesundheitsproblem dar [4, 5]. Es verursacht ca. 3-4 % der Mortalität aller Krebserkrankungen [6, 7]. Die Entstehung eines Glioblastoms ist grundsätzlich in jedem Alter möglich, wobei die Prävalenz mit steigendem Alter zunimmt. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren [8]. Die Inzidenzrate kulminiert bei einem Erkrankungsalter von 75 bis 84 Jahren [9]. Männer sind 1,6-mal häufiger betroffen als Frauen

und die weiße Bevölkerung ist doppelt so häufig betroffen wie die schwarze Bevölkerung [5, 9]. Das GBM ist mehrheitlich supratentoriell lokalisiert, wobei das Vorkommen im Frontallappen am häufigsten ist. Lokalisationen im Kleinhirn oder Rückenmark stellen eher eine Seltenheit dar. [9-12]

Bisher wurde keine eindeutige Ursache für die Entstehung eines GBM gefunden. Ionisierte Strahlung gilt als bisher einziger etablierter exogener Risikofaktor. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine geringere Anfälligkeit für Allergien mit einem erhöhtem Erkrankungsrisiko einhergeht. [2, 5, 13]

Darüber hinaus zeigte sich, dass Atopiker mit erhöhten IgE-Serumspiegeln anscheinend eine längere Überlebenszeit hatten, als Patienten mit normalen IgE-Spiegeln. Nikotin-, Alkohol- oder Drogenabusus gelten nicht als Risikofaktoren des GBM [14]. Ungefähr 5 % der GBM-Patienten weisen eine positive Familienanamnese auf. Während einige bestimmte vererbare Syndrome, wie z.B. Neurofibromatose, Li-Fraumeni oder Turcot-Syndrom, mit einem erhöhten Gliomrisiko assoziiert sind, sind die meisten familiären Gliome nicht syndromal bedingt. [15, 16]

1.1.2 Symptome und Diagnostik

Aufgrund des schnellen progressiven Wachstums weisen mehr als die Hälfte der Patienten einen kurzen Krankheitsverlauf auf. Zum Teil entwickeln sich die Symptome so rapide, dass sie mit einem Apoplex verwechselt werden könnten. [17]

Die Klinik kann sich sehr variabel äußern und wird vor allem von der Lokalisation des Tumorwachstums im Gehirn bestimmt. Tumoren im Okzipitallappen führen zu visuellen Störungen, wohingegen Tumoren im Temporallappen zu Gedächtnis-, Sprach- und Hörstörungen führen. Frontal gelegene Tumoren können zu Persönlichkeitsstörungen führen. Durch die Tumormasse und das perifokale Ödem steigt der intrakranielle Druck mit resultierenden Kopfschmerzen bei ca. 40-50 % der Patienten. In 20-40 % der Fälle treten zerebrale Anfälle auf. [18, 19]

Als bildgebende Verfahren eignen sich die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT). Als Goldstandard der Diagnostik des GBM hat sich das MRT mit Kontrastmittel etabliert. Dort zeigt sich durch die gesteigerte Vaskularisation typischerweise eine stark inhomogene randständig-ringförmige Kontrastmittel-Aufnahme (**vgl.** Abbildung 1.1). Zentral fällt ein hypodenses nekrotisches Areal auf. Peritumoral zeichnet sich

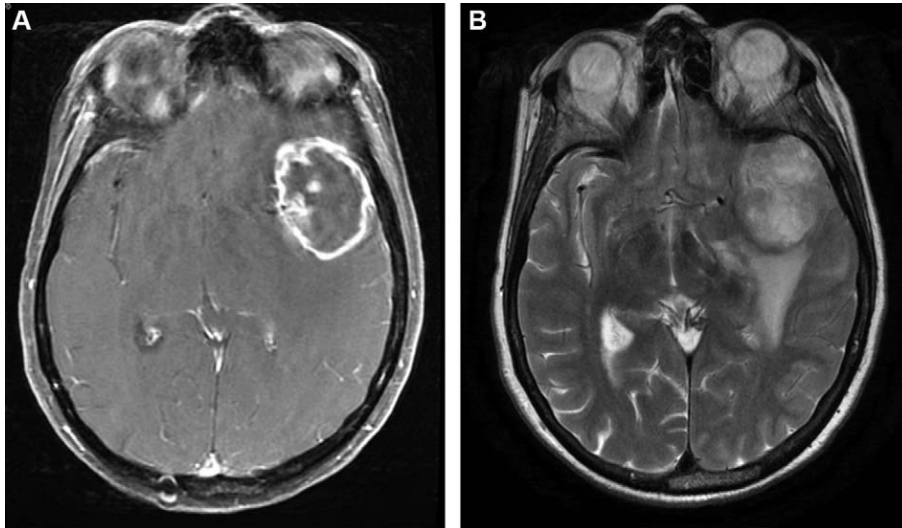


Abbildung 1.1 MRT-Aufnahme eines Glioblastoms. A - Kontrastmittel angereicherte, T1 gewichtete Aufnahme; B - T2 gewichtete Nativ-Aufnahme. Es zeigt sich eine frontotemporal liegende zystische Läsion mit einer typischen ringförmigen Kontrastmittelaufnahme in der T1-Wichtung. In der T2 Wichtung ist das perifokale Ödem dargestellt [1].

häufig ein ausgeprägtes Ödem ab. [1, 20] Multifokale Lokalisationen sind auch möglich [17]. Die präoperative Bildgebung spielt eine essentielle Rolle für die Diagnosestellung und intraoperative Planung.

Die Diagnosesicherung erfolgt durch die Histologie. Die Gliome werden histomorphologisch und seit 2021 insbesondere anhand ihrer molekulargenetischen Alteration in vier WHO-Grade mit 5 Tumor-Typen klassifiziert [21, 22]. Die Unterscheidung der Tumortypen basiert auf Klinik, Molekulargenetik, Lokalisation, Histopathologie und/oder Epigenetik. Hierbei werden die Tumortypen anhand selbiger Parameter in zahlreiche Subtypen differenziert. Die Diagnostik erfolgt an Formalin-fixierten Gewebeproben mithilfe von IHC-Färbungen, FISH, Mikrosatelliten-PCR und Next-Generation-DNA/RNA-Sequenzierungen. Die Reformierung der Kriterien ermöglicht somit die Diagnose eines GBM bei Nachweis eines histopathologischen Merkmals oder einer typischen Molekulargenetik. Daraus resultiert, dass trotz fehlender klassischer Histopathologie wie z.B. mikrovaskuläre Proliferationen und Nekrosen eine GBM-Diagnose gestellt wird, sofern der molekulargenetische Nachweis einer TERT-Promoter-Mutation, EGFR-Amplifikation oder Chromosom 7 bzw. 10 Alteration nachgewiesen wird [22, 23]. Darüber hinaus weist die typische Mikroskopie eines GBM in der Immunfärbung *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) -positive Zellen, die zellmorphologisch überwiegend astrozytären Ursprungs sind, auf [24].

1.1.3 Therapie und Prognose

Als Therapiemöglichkeiten stehen die chirurgische Resektion, Radiotherapie sowie Chemotherapie zur Verfügung [25-27].

Die Neuronavigation ist zu einem allgegenwärtigen Hilfsmittel bei der chirurgischen Behandlung von Hirntumoren geworden [28]. Dabei werden zwei Datensätze eines Patienten möglichst genau aufeinander abgestimmt. Der erste Datensatz ist die präoperative Bildgebung [29]. Der zweite Datensatz kann mittels Laser-Gesichts-Scan im Operationssaal erstellt werden. Dies ermöglicht das intraoperative Monitoring des OP-Gebietes durch einen Zeiger, der mit einer integrierten Infrarotkamera erkannt wird [30]. Somit wird eine radikalere Resektion erreicht und eine verlängerte Überlebenszeit ermöglicht [31, 32]. Die Lebensqualität der Patienten wird, gemessen am Karnofsky-Index, verbessert [33]. Zusätzlich haben sich in der Anwendung von 5-Aminolaevulinsäure zur intraoperativen Anfärbung des Tumorgewebes unter fluoreszierendem Licht ein verlängertes progressionsfreies Überleben und verbesserte Resektionsergebnisse gezeigt [34]. Durch das tief-infiltrative Wachstum des GBM in benachbartes Hirngewebe ist die vollständige chirurgische Resektion nicht möglich [35].

Nach einer postoperativen Strahlentherapie kann das mediane Überleben eines hochgradigen Glioms auf zwölf Monate verlängert werden [36]. Der Therapiestandard wird mit 60 Gy über sechs Wochen mit jeweils 1-2 Gy pro Einzeldosis durchgeführt [27]. In Kombination mit der Strahlentherapie sollte eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden [25]. Als Goldstandard in der adjuvanten Chemotherapie zeigte Temozolomid in randomisierten kontrollierten Studien die beste Wirksamkeit in Bezug auf die progressionsfreie Überlebenszeit [25, 26]. Die Wirksamkeit von Temozolomid beruht auf dem Anfügen von Alkylgruppen an die O6-Position des Guanins der DNS mit folgender Apoptoseinduktion der Tumorzellen [37]. Der MGMT-Status der Patienten beeinflusst das Therapieansprechen mit Temozolomid. Das MGMT-Gen kodiert die Expression des MGMT-DNS-Reparaturproteins, welches Alkyl-Gruppen an der O6-Stelle des Guanins entfernt. Eine hohe MGMT-Expression hat somit ein schlechteres Ansprechen auf Alkylantien wie Temozolomid zur Folge. [38]

MGMT-Promoter-Methylierungen führen zu einer niedrigeren Expression des Reparaturproteins und somit zu einer besseren Therapiewirkung der Alkylantien mit einem besseren Outcome [27, 38, 39]. Die mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt trotz maximaler Tumorresektion und Radiochemotherapie mit Temozolomid nur 14-15 Monate [5, 25].

Seit einigen Jahren gewinnt die Immuntherapie zunehmend an Bedeutung. Der investigative Fokus richtet sich dabei vordergründig auf die T-Zellen. Die populärsten Marker hierfür sind CTLA und PD-1 [40, 41]. Im Glioblastom wurde zuletzt die Wirkung der CD137-Inhibition zur Steigerung der T-Zell-abhängigen Tumorzelltoxizität untersucht [42].

1.2 Intratumorale Heterogenität im Glioblastom

1.2.1 Intratumorale Heterogenität auf molekulargenetischer Ebene

In der neuen WHO-Klassifikation 2021 wird grundsätzlich anhand des IDH-Status zwischen mutierten (IDH_{Mut})-Astrozytomen und Wildtyp (IDH_{wt})-Astrozytomen unterschieden. Das IDH_{wt}-Astrozytom wird als GBM definiert. Entgegen früherer Formulierungen wird ein IDH_{Mut}-Astrozytom nicht mehr als GBM bezeichnet. Neben den IDH-Status finden sich zahlreiche molekulargenetische Charakterisierungen in der Tumortypisierung wieder. Dazu zählen u.a ATRX, EGFR; TERT, CDKN2A/B und Chromosom 7⁺/10⁻ [22, 23, 43].

Genetische Alterationen sind unerlässlich bei der Diagnosestellung von GBM. Als Ausdruck der genetischen intratumoralen Heterogenität können basierend auf den Genexpressionen vier verschiedene GBM-Subtypen unterschieden werden, welche bisher keine Implementierung in die WHO-Klassifikation gefunden haben : Proneurale, neurale, klassische und mesenchymale Subtypen [9, 44-46]. Der proneurale und mesenchymale Subtyp werden in der Literatur am häufigsten beschrieben [47]. Der klassische Subtyp ist charakterisiert durch eine kombinierte Chromosom-7-Amplifikation und Chromosom-10-Verlust sowie eine kombinierte EGFR-Amplifikation und CDKN2A-Deletion. CDKN2A ist ein Vertreter des Retinoblastom-Protein-Signalwegs und hat einen Einfluss auf den TP53-Signalweg (Zellzykluskontrolle). NES als neuronaler Stammzellmarker sowie die Signalwege *Notch* und *Sonic Hedgehog* zeigen im klassischen Subtyp eine hohe Expression. [44]

Der MGMT-Methylierungsstatus gilt als prädiktiver Biomarker des klassischen Subtyps [45]. Der mesenchymale Subtyp wird häufig durch eine niedrige NF1-Genexpression (Neurofibromin-1), eine gesteigerte Aktivität mesenchymaler und astrozytärer Marker wie z.B. CD44 und MERTK (als Zeichen der Dedifferenzierung) sowie eine Überexpression von Genen des TNF-Superfamilie-Signalwegs und des NFκB-Signalwegs (als Zeichen der Nekrotisierung) charakterisiert [44].

Der proneurale Subtyp kann in G-CIMP (*Glioma CPG island methylator phenotype*) und Non-G-CIMP Varianten unterschieden werden [45, 48]. G-CIMP Gliome sind eng mit IDH1-Mutationen assoziiert und weisen ein signifikant besseres Therapieergebnis auf [48]. Der proneurale Subtyp wird durch Alterationen im PDGFRA-Gen sowie IDH1- und TP-53-Mutationen charakterisiert. Darüber hinaus liegen gesteigerte Expressionen oligodendrozytärer Proliferationsgene vor [44]. Im Vergleich zum mesenchymalen Subtyp, der eher eine schlechte Prognose hat, wird der proneurale Subtyp durch das Vorkommen des IDH-Mutationsstatus positiv beeinflusst [47-50].

Der neuronale Subtyp wird durch die Expression von Neuronenmarkern wie NEFL, GABRA1, SYT1 und SLC12A5 charakterisiert, wobei die bisherige Datenlage quantitativ von begrenzter Aussagekraft ist [44]. Der neuronale Subtyp wird verstärkt mit dem Tumorrandgewebe in Verbindung gebracht, in dem auch vermehrt normales Hirngewebe vorliegt [51]. Diese Kontamination könnte erklären, warum charakteristische genetische Alterationen im neuronalen Subtyp fehlen [45]. Das Vorkommen mehrerer Subtypen innerhalb eines Tumors ist als ein wesentliches Zeichen der intratumoralen Heterogenität zu verstehen [46, 52, 53].

Im Allgemeinen haben die genetischen Alterationen Einfluss auf das Tumorverhalten. Während Amplifikationen der EGFR- und PDGFRA-Gene über den Ras-Signalweg Proliferations- und Überlebensreize initiieren, führt die Deletion im NF1-Gen zur fehlenden negativen Regulation des Ras-Signalfads. Deletionen im CDKN2A-Gen führen zur Enthemmung der Proteinase CDK4, wodurch der Zellzyklus nicht mehr im G1-Zellarrest verbleibt und die Tumorentstehung begünstigt wird. CDKN2A ist Bestandteil des TP-53 Signalwegs. Somit führen Mutationen im TP-53 Gen zum gleichen Umstand. [54]

Dies bedeutet unmittelbar ein Einfluss auf die Zellzusammensetzungen im Tumormikromilieu [55]. Die Defizienz des NF1-Gens führt zur gesteigerten Infiltration des Tumors durch Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) [47].

1.2.2 Intratumorale Heterogenität auf zellulärer Ebene

Histologisch lassen sich im GBM drei charakteristische Tumornischen differenzieren, die einer zeitlich- und räumlich-dynamischen Alteration unterliegen: Die perivaskuläre GBM-Nische (PVN), die hypoxische GBM-Nische und die invasive GBM-Nische [56]. Die perivaskuläre Tumornische ist gekennzeichnet durch Tumorzellnester in enger Juxtaposition zu abnormal angiogenetischen Gefäßen [56, 57]. Durch die Sekretion angiogenetischer Wachstumsfaktoren, wie z.B. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), *Fibroblastic growth factor* (FGF) und *Platelet-derived growth factor* (PDGF) wird die vaskuläre Basalmembran beschädigt, die Perizyten abgelöst und die glomerulär-mikrovaskuläre Proliferation getriggert. Die dysfunktionalen Gefäße sind anfällig für erhöhte Permeabilität und Mikrohäorrhagien. Die perivaskuläre GBM-Nische ist geprägt von einer multizellulären Diversität, in der neben neoplastischen Tumorzellen eine Vielzahl nicht-neoplastischer Zellen vorkommen. Am stärksten sind Makrophagen, Neutrophile, Myeloide Suppressorzellen (MDSC) und reaktive Astrozyten vertreten. [56, 58]

Infolge der dysfunktionalen Blut-Hirn-Schranke (BHS) können zirkulierende Immunzellen durch sezernierte Zytokine der Tumorzellen mobilisiert werden. Die rekrutierten Tumor-

assoziierten Makrophagen, Mikrogliazellen und andere nicht-neoplastische Zellen übernehmen immunsuppressive Eigenschaften, sezernieren lösliche Faktoren zur Ausbreitung der Tumorstammzellen (CSC) und zur Etablierung des Tumormilieus. [56, 59, 60]

Die hypoxische GBM-Nische ist charakterisiert durch zentral nekrotisches Gewebe, das zirkulär von Tumorzellen in Form von Pseudopalisaden umgeben wird [61]. Infolge des Sauerstoffmangels sinkt die Proliferationsrate der palisadenförmigen Tumorzellen mit reaktiver Steigerung der VEGF und IL-8 Produktion [62]. Diese Reaktion wird über HIF (*hypoxia-inducible factors*) gesteuert [63, 64]. Es entsteht eine überschießende angiogenetische Reaktion, die mikrovaskuläre Proliferationen zur Folge hat [62]. Durch die Hypoxie werden Gene zur Selbsterneuerung und Dedifferenzierung aktiviert und so Resistenzen gegen Radio -und Chemotherapie gebildet [63, 65].

Die invasive GBM-Nische ist gekennzeichnet durch Tumorzellen, die entweder als Einzelzellen oder über Fasertrakte der weißen Substanz sowie Basalmembranen weitere Strukturen der Hirnsubstanz infiltrieren können [66]. Die Nutzung vorliegender nicht-neoplastischer Gefäßstraßen zur Infiltration der umliegenden Substanz stellt eine große therapeutische Hürde dar, da dies eine komplette chirurgische Resektion unmöglich macht [67]. Mithilfe dieser perivaskulären Invasion entgehen GBM-Zellen antiangiogenetischen Therapieversuchen [68]. Im Maus-Modell wurde gezeigt, dass Astrozyten als Regulatoren und Bestandteil der BHS von Tumorzellen ersetzt werden. Fortan können die GBM-Zellen den Gefäßtonus regulieren und die BHS durchdringen. [69]

1.3 Neuropathologie des Glioblastoms

1.3.1 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM)

Etwa 30-50 % der Zellen im GBM bestehen aus Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) [70-72]. Die meisten Studien deuten darauf hin, dass eine hohe Anzahl von TAM das Tumorwachstum begünstigt und mit einer schlechten Prognose einhergeht [73].

Man unterscheidet mobile, aus dem Blut einwandernde Makrophagen, von ortsständigen Gewebsmakrophagen [55, 72]. Während mobile Makrophagen sich von medullär gebildeten Monozyten ableiten, entwickeln sich die Gewebsmakrophagen während der Embryogenese aus dem Dottersack [74-76]. Die ortsständigen Gewebsmakrophagen des Gehirns werden Mikrogliazellen genannt [77]. Die Gesamt-TAM-Population setzt sich aus ca. 85 % infiltrierenden mobilen Makrophagen und 15 % Mikrogliazellen zusammen. Die infiltrierenden

Makrophagen sind mehrheitlich perivaskulär lokalisiert, wohingegen Mikrogliazellen vornehmlich peritumoral hoch exprimiert sind. [72]

Die Makrophagen können durch verschiedene Reize, wie z.B. Zytokine, *pathogen-associated molecular patterns* oder *damage-associated molecular patterns*, stimuliert werden. Aufgrund der Diversität und Plastizität werden in der Literatur zwei Makrophagen-Phänotypen unterschieden. [78-82]

Der M1-Phänotyp ist charakterisiert durch eine Expression proinflammatorischer Zytokine, Immunstimulation, der Sekretion von Stickstoff- und Sauerstoffintermediaten, der Förderung der T_H1-Immunantwort und einer starken mikrobiziden und anti-tumoralen Aktivität. Der M2-Phänotyp ist antiinflammatorisch, verstärkt an Wundheilungsprozessen, der Förderung der T_H2-Immunantwort, der Bekämpfung parasitärer Infektionen, Immunsuppression, Angiogenese- und Tumorstadiumsprozessen beteiligt. [78]

Je nach Stimulus wird der M2-Phänotyp in M2a, M2b und M2c subklassifiziert [83]. Es wird vermutet, dass vielmehr der Aktivierungsstatus und nicht die große Zellmasse der TAM im Tumormikromilieu eine Rolle spielen könnte [81, 84].

In den folgenden Unterkapiteln werden wichtige Expressionsmarker der TAM etwas ausführlicher vorgestellt.

1.3.1.1 PSGL-1

PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) ist auf den meisten hämatopoetischen Zellen stark exprimiert und spielt eine wesentliche Rolle bei der Zellmigration [85]. Dabei kann PSGL-1 nicht nur an P-Selectin, sondern auch an L-Selectin und E-Selectin binden [86, 87]. Naive T-Zellen exprimieren nicht-Selectin-bindendes PSGL-1 mit der Fähigkeit, Chemokine zu binden. Erst durch die T-Zell-Aktivierung wird eine enzymatische Modifikation in Gang gesetzt, die eine Selectin-Bindung ermöglicht. Myeloische Zellen hingegen exprimieren diese Enzyme konstitutiv. [88-90]

PSGL-1 moduliert auch Signalwege und kann somit in die Zelldifferenzierung eingreifen und die Zellfunktion beeinflussen [91]. Es wurden sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Effekte gezeigt. PSGL-1 löst auf murinen dendritischen Zellen die Sekretion immunsuppressiver Zytokine aus (IL-10, IDO, TGF-β1), induziert regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und inhibiert Effektor-T-Zellen (T_{eff}). Auf Monozyten löst PSGL-1 einen proinflammatorischen Phänotyp mit folgender Sekretion von MCP-1 und TNF-α aus. [92]

Unsere Arbeitsgruppe konnte in früheren Untersuchungen zeigen, dass PSGL-1 auf zirkulierenden Monozyten bei GBM-Patienten reduziert exprimiert wird [93]. In weiteren

unveröffentlichten durchflusszytometrischen Daten konnte unsere AG zudem zeigen, dass PSGL-1 auf TAM im GBM massiv reduziert exprimiert wird (Veröffentlichung ausstehend).

1.3.1.2 CD68

CD68 gehört zur Familie der Lysosomal assoziierten Membran-Proteinen und ist hauptsächlich im lysosomalen Kompartiment der Makrophagen lokalisiert [94]. Bei Aktivierung kann es auch schnell an die Zelloberfläche transportiert und dort exprimiert werden [95]. CD68 ist ein klassischer Marker für die Identifizierung von Makrophagen [96-98]. Allerdings wird CD68 nicht nur auf Makrophagen, sondern auch auf dendritischen Zellen exprimiert [99]. Eine erhöhte CD68 Expression ist mit der Tumorprogression in Gliomen assoziiert [100].

1.3.1.3 CD163

CD163 gehört zur SCRC-Familie (*Scavenger receptor cysteine rich*) Klasse B [101]. Im Gegensatz zu CD68 ist CD163 ein Makrophagen-spezifischer Marker [96, 102]. In histologischen Färbungen konnten mit CD163 mehr Makrophagen angefärbt werden als mit CD68 [103]. Viele Autoren bezeichnen CD163 als einen Marker des M2-Phänotyps, da es durch M-CSF und IL-10 hochreguliert und durch INF- γ sowie LPS supprimiert wird [98, 101, 104, 105]. Diese Annahme wird jedoch angezweifelt, da CD163⁺ Makrophagen auch M1-spezifische Transkriptionsfaktoren exprimieren können und in bestimmten Situationen M1-typische Marker, wie z.B. IL-12 und iNOS sezernieren können [103, 106, 107]. Anhand der TCGA-Datenbankanalyse konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte CD163-Expression mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert ist [101]. Die CD163-Expression auf Mikrogliazellen korreliert positiv mit der histologischen Malignität des Glioms [71].

1.3.1.4 MHC-II

MHC-II, auch HLA-DR genannt, gehört zu den Markern, die bei einer klassischen Aktivierung durch LPS oder INF- γ von Makrophagen exprimiert werden [108]. Es wird zu den proinflammatorischen Markern der Makrophagen gezählt und somit verstärkt auf dem M1-Phänotyp exprimiert [109]. Die Hauptfunktion von MHC-II besteht in der Antigenpräsentation [110, 111]. MHC-II wird unter anderem auf dendritischen Zellen exprimiert [99]. Die sogenannten Gliom-assoziierten Mikrogliazellen scheinen MHC-II in einem geringeren Ausmaß zu exprimieren als Mikrogliazellen in nicht-neoplastischen ZNS-Erkrankungen, wie z.B. Multipler Sklerose oder Schlaganfall [71]. Schartner et al. stellten in Tierversuchen fest, dass die MHC-II Induktion durch INF- γ oder LPS in malignen Gliomen nur sehr limitiert

möglich ist [112]. Die MHC-II-Immunreaktivität in hochzellulären Bereichen des Glioblastoms mit zahlreichen Immunzellen, die Makrophagenmarker exprimieren, ist reduziert [113].

1.3.1.5 CD16

CD16 (Fc γ RIII) wird in der Regel auf Monozyten exprimiert [114]. In vitro-Studien haben gezeigt, dass CD16⁺ Monozyten nach Migration in dendritische Zellen mit der Möglichkeit zur Stimulation CD4⁺ T-Zellen umgewandelt werden können [115, 116]. Weiterhin wird CD16 auf Makrophagen exprimiert und zur Identifizierung des M1-Phänotyps genutzt. CD16-Makrophagen exprimieren stattdessen vermehrt CD163. [117]

1.3.1.6 CCR7

Der CC Chemokin Rezeptor 7 (CCR7) wird in der Regel auf verschiedenen Subtypen von Immunzellen exprimiert, die zu und innerhalb von lymphoiden Organen migrieren [118]. CCR7 wird mit dem M1-Phänotyp der TAM assoziiert, kann aber auch auf M2-Makrophagen exprimiert werden [98, 119, 120]. Martinez et al. zeigten in einer Transkriptionsprofil-Analyse, dass Makrophagen des M1-Phänotyps CCR7 in einem 107:1 Verhältnis gegenüber Makrophagen des M2-Phänotyps exprimieren [119]. In gleicher Weise können INF- γ und LPS sowohl in Makrophagen als auch in dendritischen Zellen die CCR7-Expression steigern [121]. Sogar Tumorzellen sind in der Lage CCR7 zu exprimieren [122]. Zheng et al. zeigten in vitro, dass CCR7-vermittelt die Invasion, Migration und epithelial-mesenchymale Transition von Tumorzellen gesteigert wird [123].

1.3.1.7 iNOS

Infolge der Aktivierung der T_H1-vermittelten Immunantwort durch INF- γ oder LPS wird die iNOS-Expression gesteigert und die Makrophagen-Polarisation zum M1-Phänotyp angeregt [101, 124]. Arginin wird im Anschluss enzymatisch zum toxisch wirksamen Metabolit NO (Stickstoffmonoxid) umgewandelt [124]. Arg1 und iNOS stehen in Konkurrenz um Arginin als Metaboliten für ihren Stoffwechsel und können sich gegenseitig kompetitiv inhibieren [125-127].

1.3.1.8 CD204

CD204 gehört zur Familie der *Scavenger*-Rezeptoren und ist in der Lage, Liganden zu binden und zu internalisieren, darunter apoptotische Zellen oder chemisch modifizierte Moleküle [128]. Neben CD163 und CD206 gehört CD204 zu M2-typischen Makrophagen-Markern. Im gesunden Hirn liegt eine niedrige CD204-Expression vor. In fortgeschrittenen Stadien maligner Gliome liegt ein vermehrter Wechsel zum M2-Phänotyp vor und die Expression von CD163

und CD204 ist gesteigert. Erhöhte CD204-Expression auf TAM war mit einer schlechteren Prognose assoziiert. CD204⁺ TAM neigen dazu, sich in perivaskulären Bereichen, pseudopalisierenden Nekrosen und perinekrotischen Bereichen zu sammeln. [111, 129]

1.3.1.9 CD206

CD206, auch Mannose Rezeptor C Typ 1 genannt, ist hauptsächlich auf der Oberfläche von Makrophagen und unreifen dendritischen Zellen exprimiert. CD206 wird den alternativ aktivierten Makrophagen, dem M2-Phänotyp, zugeordnet und daher zur Identifikation dieser Zellpopulation genutzt. Gabrusiewicz et al. stellten fest, dass die CD206-Expression auf MDSCs und Makrophagen deutlich stärker als auf Mikrogliazellen war. [120] Der Expressionsgehalt des CD206 auf TAM stieg mit dem Malignitätsgrad der Gliome an. Folglich zeigen WHO IV-Gliome, Glioblastome, die höchste Expression. Die CD206-Expression kann durch Hypoxie gesteigert und durch IL-6 induziert werden. [130].

1.3.1.10 CSF1-R

Der Rezeptor zum Zytokin, *Colony Stimulating Factor 1* (CSF1), spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Differenzierung und Funktion von Makrophagen und ist häufig auf TAM überexprimiert [131]. Bei Experimenten an murinen Proben wurde gezeigt, dass selektive CSF1-R-Hemmung zur Eliminierung von 99 % der residenten Mikrogliazellen führt [76]. Die Gesamtzahl der TAM-Population bleibt nach der CSF1-R Hemmung jedoch unverändert, was zu der Annahme führte, dass TAM eine CSF1-Unabhängigkeit entwickeln [84]. Die Aktivierung des CSF1-R durch sein Zytokin führt zu Polarisation der Makrophagen in dem immunsuppressiven, antiinflammatorischen M2-Typ. Darüber hinaus wird CSF1-R auch auf anderen Zellen des Tumormikromilieus exprimiert, wie z.B. dendritischen Zellen, Neutrophilen und MDSCs. [131]

Die intratumorale Präsenz von CSF1-R auf TAM korreliert mit einer schlechteren Prognose in diversen Tumorarten [132].

1.3.1.11 Arg1

Arg1 (Arginase) ist ein intrazelluläres Enzym des M2-Phänotyps [101, 133]. Es wird neben der Expression auf TAM auch auf MDSCs exprimiert [134]. Analog zum Metabolismus des M1-Phänotyps wird die Aminosäure Arginin durch das Enzym Arg1 in Ornithin umgewandelt [124]. Im Anschluss wird Ornithin in Polyamine (Spermin, Spermidin, Putrescin) und Prolin verstoffwechselt. Diese Endprodukte spielen eine wichtige Rolle bei der Kollagenproduktion, Fibrosierung und Proliferations- sowie Regenerationsvorgängen. [124]

Eine erhöhte Arg1-Expression ist mit einem verstärkten Tumorwachstum assoziiert [108, 135]. Gleichzeitig wird Arginin als Quelle der NO-Produktion den konkurrierenden Enzymen entzogen, wodurch die Immunreaktion und Zytotoxizität abgeschwächt wird [136]. Niedrige Arginin-Spiegel führen zu einer dysfunktionellen T-Zell-Reaktion [134].

1.3.2 Bedeutung der Zytokine in der Tumorprogression

Im Tumormikromilieu befinden sich eine Vielzahl nicht-neoplastischer Zellen, darunter Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen. Jede dieser Zellarten sezerniert Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine, die in der Lage sind, das lokale Tumormikromilieu, in dem neoplastische Zellen proliferieren und wachsen, zu verändern. [133] Die Zytokine und Chemokine können das Immunsystem über eine T_H1-vermittelte Immunantwort proinflammatorisch aktivieren und anti-tumoral wirken. Oppositär können sie gleichzeitig immunsupprimierend und pro-tumoral agieren. Bereits polarisierte Makrophagen können durch Zytokine wieder in einen anderen Phänotyp umgewandelt werden. [137] Beispielhaft zeigt sich die unterschiedliche Wirkungsweise in Bezug auf TAM, wie bereits unter 1.3.1 beschrieben.

Häufig untersuchte Zytokine, wie TNF- α und IL-6, sind bekannt für ihre proinflammatorische Wirkungsweise [111, 138, 139]. Sie sind in hohen Spiegeln bei neuroinflammatorischen Erkrankungen aufzufinden [138]. Allerdings ist in einigen Studien beschrieben worden, dass IL-6 mit einer verstärkten GBM-Invasivität korreliert und eine M2-Phänotypisierung bei Makrophagen und Mikrogliazellen induziert [130, 140-142]. Weniger untersucht sind die TREM-1- und TREM-2-Marker (*Triggering receptor expressed on myeloid cells*). Sie können sowohl in löslicher Form als auch als Rezeptoren auf Makrophagen und Mikrogliazellen exprimiert werden [143]. TREM-2 wird von migrierenden und infiltrierenden Makrophagen exprimiert. Alternative, über IL-4 getriggerte, Makrophagen-Aktivierung induziert die TREM-2 Expression. Die TREM-2 Expression hingegen wird durch LPS und INF- γ aufgehoben. [144] Antiinflammatorisch wirksame Zytokine wie VEGF, IL-10 und TGF- β 1 werden von M2-Phänotyp Makrophagen sezerniert [111, 119, 137]. TGF- β 1 steigert die Invasivität von Gliom-Stammzellen und inhibiert die Mikrogliazell-Aktivierung [145, 146]. VEGF ist wichtig für den Umbau des Gewebes und die Angiogenese [147]. CCL-2 spielt eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung von Makrophagen und Mikrogliazellen [133]. CCL-2 gehört durch die Steigerung der CD206-Expression auf Makrophagen und die Induktion des M2-Phänotyps ebenfalls zu den antiinflammatorisch wirksamen Zytokinen [148].

2 Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn der vorliegenden Dissertation soll untersucht werden, ob eine durchflusszytometrisch reduzierte PSGL-1 Expression aus zurückliegenden Projekten unserer Arbeitsgruppe, immunhistochemisch validiert werden kann. Entgegen der Erwartung korrelierten die immunhistochemischen Daten kaum mit den durchflusszytometrischen Ergebnissen. Da die Tumorproben für Durchflusszytometrie und Immunhistochemie von unterschiedlichen Tumoranteilen stammen, stellte sich die Frage nach der intratumoralen Heterogenität der PSGL-1 Expression und anderer TAM-Marker oder Zytokine im Glioblastom. Das Ziel der Arbeit ist die Ermittlung der Ausprägung der intratumoralen Heterogenität für verschiedene Antigene der TAM mit besonderem Augenmerk auf die PSGL-1 Expression. Die intratumorale Heterogenität ist eine Säule für das Verständnis des Tumormikromilieus und stellt einen wesentlichen Faktor für die Entwicklung individuell-basierter Therapieverfahren dar.

Es wird postuliert, dass:

1. Die Expression von PSGL-1 und anderen Makrophagen-Markern sowie entsprechend sekretierter Zytokine einer intratumoralen Heterogenität unterliegen.
2. Insgesamt eine antiinflammatorische Lage im GBM vorherrscht.

3 Materialien

3.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
24-well Platte	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
96-well- U Mikrotiterplatte	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Deckgläser 24x50mm	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Handschuhe	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
<i>Hydrophobic pen</i>	Dako, Glostrup, Dänemark
Isotherm Dewar Transportgefäß	Reiss Laborbedarf, Mainz, Deutschland
Kryoboxen	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Kryotom Desinfektionsmittel	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Kryotom Klinge/Messer	Feather, Osaka, Japan
Messbecher	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Mikroskopische Objektträger	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Objektträgermappe	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Objektträgerkasten	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Petrischalen, 35x10mm	<i>Falcon</i> „ <i>Easy Grip</i> “, BD, Franklin Lakes, USA
Pinzetten	BRAUN Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Pinsel	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Präpariernadel	BRAUN Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Präzisionstücher (<i>Kimwipes</i>)	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitze; bis 10; 200; 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 0,5; 1,5; 2ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,7ml	Costar, Corning, USA
Reaktionsgefäß 5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 15ml, 50ml	<i>Falcon</i> , Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Rotilabo-Aluminiumfolie	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Skalpell	BRAUN Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Stanze	Pfm medical, Köln, Deutschland

Tissue-Box

Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland

Wasserbad

Memmert, Schwabach, Deutschland

3.2 Reagenzien & Chemikalien

Material

3-Aminopropyl-triethoxysilan (APES)

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Aceton

Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland

BSA (Bovines Serum Albumin)

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Cryo-Gel, Surgipath

Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland

Dulbeccos's phosphate-buffered saline

Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland

Eselblut-Serum

Abcam, Camebridge, Vereinigtes Königreich

Ethanol (absolut)

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Fluoromount Aqueous Mounting Medium

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Flüssiger Stickstoff

Linde AG, Pullach, Deutschland

Mounting Medium

Ibidi, Martinsried, Deutschland

Mounting Medium for cryotomy O.C.T compound

VWR International, Darmstadt, Deutschland

NaCl 0,9 % Fresenius Spüllösung

Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

Neuroinflammation Panel-1

BioLegend, London, Vereinigtes Königreich

Methanol

Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland

Paraformaldehyd

Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland

Penicillin

Sigm-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Poly-L-Lysin

Merck, Darmstadt, Deutschland

Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI)

PanBiotech, Aidenbach, Deutschland

Saccharose

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Silan (APES)

Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Streptomycin

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tissue Tek O.C.T Compound (Tissue Tek)

Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande

Ziegenblut-Serum

Abcam, Camebridge, Vereinigtes Königreich

3.3 Puffer und Lösungen

0,25X Triton	250 µl 100 % Triton in 99,75 ml ddH ₂ O
1 % BSA	1 g BSA in 100 ml 1X PBS
4 % PFA	4 g PFA in 100 ml 1X PBS bei 70 °C gelöst
70 % Ethanol	66,5 g Ethanol 96 % in 33,5 g ddH ₂ O
1:1 Methanol/Aceton	Methanol: Aceton im Verhältnis 1:1
R0F-Medium	RPMI-1640, 0,1 mg/l Penicillin, 100 U/l Streptomycin
Sudan Black B 0,3 %	300 mg in 100 ml 70 %-igem Ethanol

3.4 Antikörper

Primärantikörper

Maus Anti-Arg1 (MAB4975)	Novus Biologicals, Littleton, USA
Maus Anti-CCR7 (MAB197-100)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Maus Anti-CD16 (sc-20052)	SantaCruz, Heidelberg, Deutschland
Maus Anti-CD163 (NB110-59935)	Novus Biologicals, Littleton, USA
Maus Anti-CD68 (Ab955)	Abcam, Camebdrige, Vereinigtes Königreich
Maus Anti-CD204 (KAL-KT022)	CosmoBio, Carlsbad, USA
Maus Anti-CD206 (H00004360-M02)	Novus Biologicals, Littleton, USA
Maus Anti-GFAP (MAB2594)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Maus Anti-iNOS (MAB9501)	Novus Biologicals, Littleton, USA
Maus Anti-MCP1 (MCA5981GA)	BioRad Antibodies, Puchheim, Deutschland
Maus Anti-PSGL-1 (NBP2-53344)	Novus Biologicals, Littleton, USA
Maus Anti-PSGL-1 (MAB9961)	R&D Systems, Minneapolis, USA (für Exp. genutzt)
Kaninchen Anti-Arg1 (Ab211961)	Abcam, Camebridge, Vereinigtes Königreich
Kaninchen Anti-CCR7 (NBP2-31088)	Novus Biologicals, Littleton, USA
Kaninchen Anti-CD68 (HPA048982)	Atlas Antibodies, Bromma, Schweden
Kaninchen Anti-CD163 (NBP1-30147)	Novus Biologicals, Littleton, USA
Kaninchen Anti-CD204 (NBP1-88125)	Novus Biologicals, Littleton, USA
Kaninchen Anti-CD206 (NBP1-90020)	Novus Biologicals, Littleton, USA
Kaninchen Anti-CSF1R (Ab183315)	Abcam, Camebridge, Vereinigtes Königreich
Kaninchen Anti-GFAP (Ab33922)	Abcam, Camebridge, Vereinigtes Königreich
Kaninchen Anti-iNOS (NBP1-33779)	Novus Biologicals, Littleton, USA

Kaninchen Anti-MHC-II (Abkralo511)	Abcam, Camebridge, Vereinigtes Königreich
Ratte Anti-CD16 (ABIN2478680)	Antibodies-Online, Aachen, Deutschland
Ratte Anti-GFAP (13-0300)	Invitrogen Antibodies, Waltham, USA
Ratte Anti-MHC-II (MCA71R)	BioRad Antibodies, Puchheim, Deutschland

Sekundärantikörper

Ziege Anti-Maus AF488 (A32723)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Ziege Anti-Kaninchen AF647 (A32733)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Ziege Anti-Ratte AF594 (150160)	Abcam, Camebridge, Vereinigtes Königreich

3.5 Laborgeräte

Autoklav	Systec, Linden, Deutschland
Cryotome-Leica CM1950	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
<i>CytoFLEX S</i> Durchflusszytometer	Beckman-Coulter, Brea, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Telstar Igloo, Terrassa, Spanien
Gefrierschrank <i>HERAfreeze</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Biberbach an der Riß, Deutschland
Magnetrührer MR Hei-Mix L	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Micro Centrifuge	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Operetta</i> CLS	Perkin Elmer, Waltham, USA
<i>Pipetboy</i> Pipettierhilfe	Integra, Biebertal, Deutschland
Pipetten <i>Research Plus</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
<i>Vortex-Genie 2</i> Reagenzglasschüttler	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zellkulturinkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
<i>Zeiss</i> Mikroskop (Axiovert 40 CFL)	Carl Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Ziegra Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen, Deutschland

3.6 Software und Datenbanken

EndNote x9

Thomson Reuters, Toronto, Kanada

Harmony 4.9

Perkin Elmer, Waltham, USA

Microsoft Office suite 2016

Microsoft, Redmond, USA

Prism 9

Graph Pad Software, La Jolla, USA

Scholar

Google, Mountain View, USA

4 Methoden

4.1 Aufbereitung der primären Glioblastomproben

Von den insgesamt 16 Patienten mit radiologischem Verdacht auf ein Glioblastom konnten elf Patienten in die vorliegende Dissertation eingeschlossen werden. Die anderen fünf Patienten wurden im Rahmen des Etablierungsverfahrens der Methodik für die Einbettung und Immunfluoreszenzfärbung anders behandelt und waren somit nicht verwertbar (Abbildung 4.1). Die untersuchten Gliome entstammen Patienten unterschiedlichen Alters und Geschlechtes, die aufgrund der Verdachtsdiagnose einer neuroepithelialen Neoplasie in der neurochirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Greifswald operiert wurden.

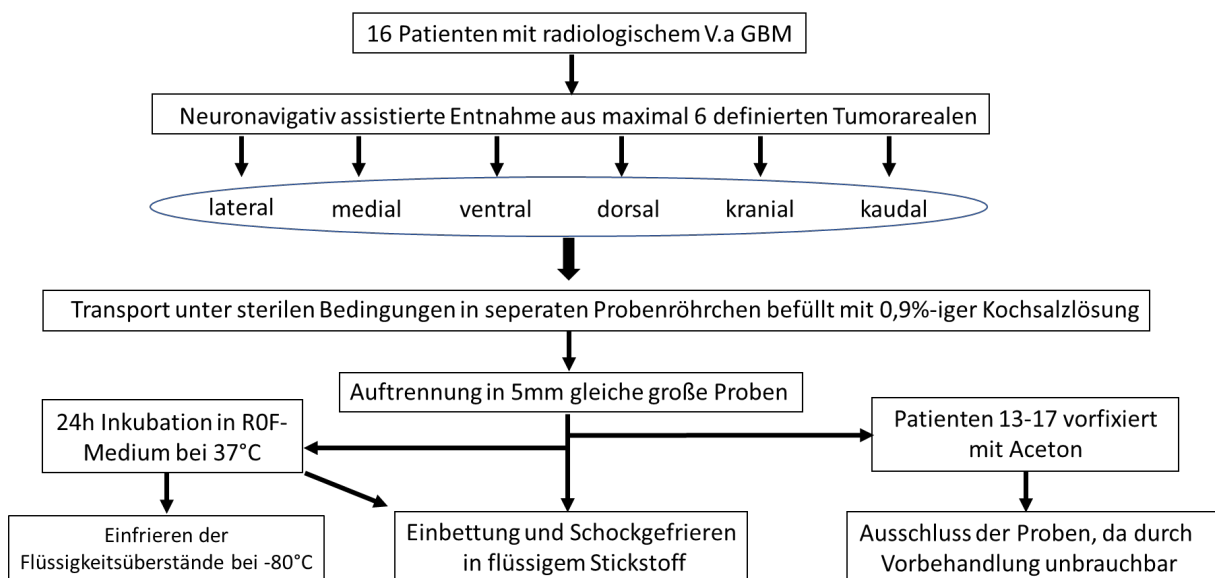


Abbildung 4.1 Ablauf zur Generierung von Tumorproben

Die Hirntumoren wurden unter Zuhilfenahme einer Neuronavigation genau lokalisiert. Anhand der intraoperativen Neuronavigation wurden sechs verschiedene Areale definiert: lateral, medial, ventral, dorsal, kranial und kaudal. Je Tumor wurden, abhängig von der Operabilität, ca. drei bis fünf Proben pro Patienten von diesen Arealen entnommen. Diese wurden intraoperativ mit einer Tumorfasszange entfernt. Es war darauf zu achten, dass das entnommene Gewebe ausschließlich aus dem vitalen Tumorrand stammt. Die nekrotisch-zystischen, zentraler gelegenen Areale wurden ausgespart. Falls die Proben dennoch nekrotische Areale enthielten, wurden diese bei der Verarbeitung entfernt. Zur histologischen Diagnosesicherung wurden Proben an das Institut für Pathologie der Universität Greifswald gereicht. Hier wurde

die Diagnose eines Glioblastoma multiforme bestätigt. Die entnommenen Proben des Tumors wurden unter sterilen Bedingungen in 0,9 %-iger Kochsalzlösung bei Raumtemperatur in die Labore des ZIK *plasmatis* überführt und weiterverarbeitet. In Tabelle 4.1 sind die Proben in einer Übersicht dargestellt. Begonnen wurde die Nummerierung bei Patient 8, auf Grund der Fortführung des Vorgängerprojektes. Der Tumor des Patienten 10 wurde nicht für die vorliegende Doktorarbeit genutzt.

Tabelle 4.1 Probenübersicht.

Patienten	Tumorareale					
	Medial	Lateral	Ventral	Dorsal	Kranial	kaudal
8	x	x	x	x		
9	x	x	x	x		
11	x		x		x	
12	x	x	x			
13		x	x	x		
14		x			x	x
15		x	x	x	x	
16		x	x	x	x	
17	x	x	x		x	
18	x	x	x		x	x
19	x	x	x		x	
20	x	x	x	x		x
21	x	x	x	x	x	
22	x	x	x			x
23	x	x		x		
24	x	x	x	x		

Zunächst wurden Kryoschälchen (10 mm x 10 mm x 5 mm) zur Hälfte mit Tissue Tek Einbettmedium befüllt. Die Tumorproben wurden in sterilen Petrischalen (35 mm x 10 mm) (Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.A) mit einem Skalpell in ca. 5 mm gleich große Stücke geschnitten (Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.B). Als Orientierung galt hier eine Stanze mit 5 mm Durchmesser. Es wurde, je nach Konsistenz des

Gewebes, vor dem Überführen ins Einbettmedium mit Präzisionstüchern abgetupft (Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.C).

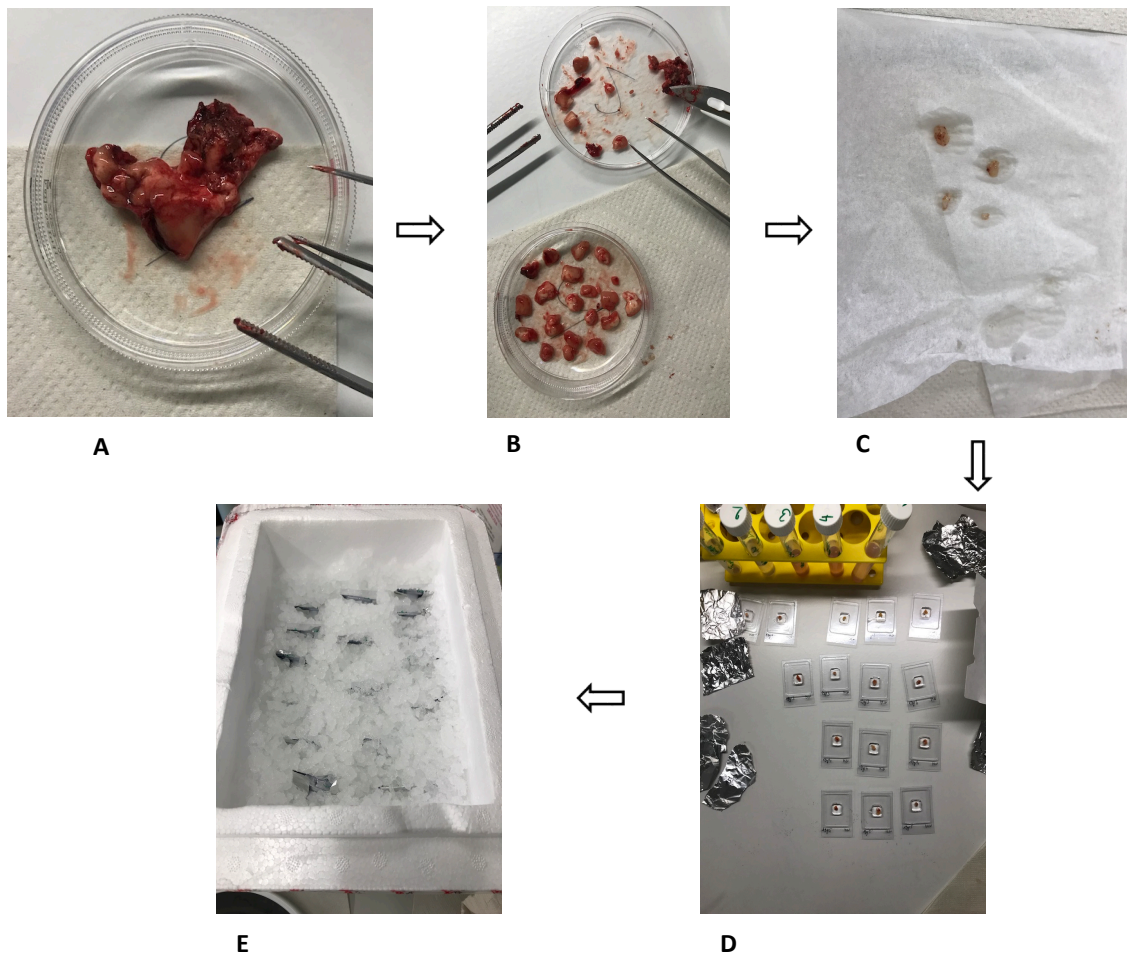


Abbildung 4.2 Flusschema zur Verarbeitung von Glioblastomproben.

A: Ablegen der entfernten Tumormasse aus der 0,9 %-igen Kochsalzlösung in einer sterilen Petrischale nach ggf. vorherigen groben abtupfen mit Zellstoff.

B: Zerkleinerung der Tumormasse mit einer anatomischen Pinzette und einem Skalpell. Zur Größenorientierung galt eine 5 mm Stanze.

C: Feste beziehungsweise solide Proben wurde nach Zerkleinerung erneut auf Präzisionstüchern abgetupft. Bei flüssigeren Proben wurde auf diesen Schritt verzichtet.

D: Einbettung der geteilten Proben in Tissue Tek Einbettmedium befüllten Kryoschälchen mit anschließendem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff

E: Umwickeln der gefrorenen Proben in Aluminiumfolie und Transport in einer Styroporbox mit Eis

Bei flüssigerem Gewebe wurde darauf verzichtet, da die Proben sonst zu stark am Papier hafteten und dadurch Gewebe verloren ging. Nun wurde das Schälchen bis zum Rand mit dem Tissue Tek bedeckt (Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.). Für den Fall, dass die Probe innerhalb des Einbettmediums nach oben trieb oder an den Rand schwamm, wurde die Position mit einer Pinzette und Präpariernadel nach zentral korrigiert. Es wurde dabei darauf geachtet, dass keine Luftblasen im Tissue Tek verbleiben. Rückständige Luftblasen können beim Einfrieren größere Blasen bilden und dadurch das Gewebe verdrängen, wodurch die

Schnittqualität deutlich sinkt. Durch einen Knick am Rand der Kryoschalen konnten diese mit einer anatomischen Pinzette gegriffen werden und in den Flüssigstickstoff gehalten werden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Schale langsam an den Flüssigkeitsspiegel des Stickstoffs angelegt wurde, ohne es dabei einzutauchen. Durch zu schnelles Eintauchen wurden die Proben rissig und brachen beim Schneiden ab. Nachdem die Farbe des Mediums von transparent auf weiß umgeschlagen war, wurden die Proben mit Alufolie umwickelt, um das Herausfallen zu verhindern. Der Transport zum Tiefkühlschrank erfolgte in einer mit Eis gefüllten Styroporbox (Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.E). Anschließend wurden die Proben in Kryoboxen bei -80 °C gelagert. Der genauere Ablauf und der Vergleich zwischen unterschiedlichen Einbettmedien sowie die Auswirkungen einer Fixierung des Gewebes vor dem Einbetten und Einfrieren werden im Ergebnisteil unter den Punkten 5.1 und 5.2 genauer beschrieben.

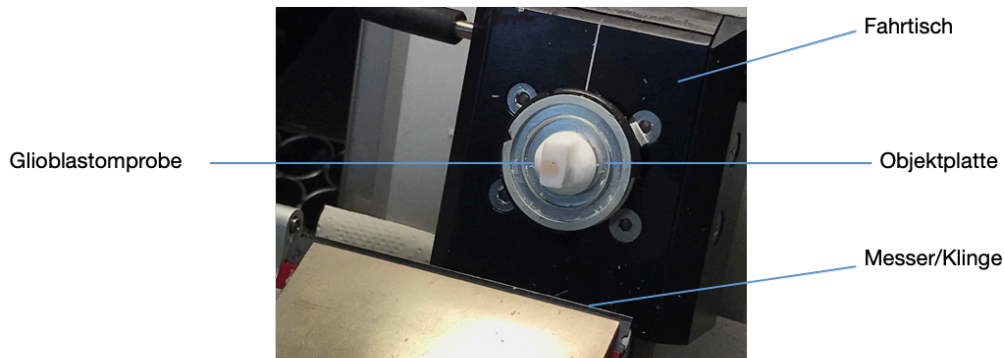
4.1.1 Gewebekultur-Überstände

Ein Teil der 5 mm großen Tumorproben jedes Patienten wurde zunächst in 24°-Platten, befüllt mit R0F-Medium, 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Tumorproben aus dem Medium entfernt und, wie unter 4.1 erläutert, eingefroren. Jeweils 1 ml der Flüssigkeitsüberstände wurden in *Eppendorfgefäße* überführt und zunächst bei 1000 G für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurden $2 \times 200\text{ }\mu\text{l}$ jedes *Eppendorfgefäßes* in zwei Wells einer 96°-Rundbodenplatte pipettiert. Beim Pipettieren wurde darauf geachtet, keine Zellfragmente vom Grund des zentrifugierten *Eppendorfgefäßes* mitzuführen. Die generierten Gewebekultur-Überstände in den 96°-Platten wurden bis zur Messung bei -80 °C eingefroren.

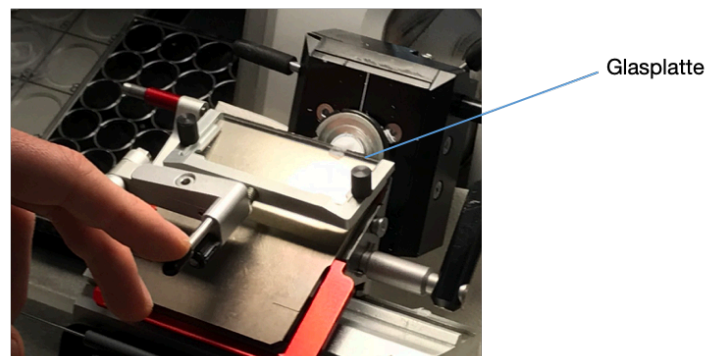
4.2 Verarbeitung am Gefriermikrotom

Nach dem Entfernen der Proben aus dem -80 °C Tiefkühler wurden die Proben im Gefriermikrotom zur Temperaturanpassung gelagert. Die Temperatur des Gefriermikrotoms wurde auf -21 °C eingestellt. Nach ca. 5-10 min wurden die Proben aus dem Schälchen rausgedrückt und mit zwei Tropfen Tissue Tek auf der Objektplatte fixiert. Anschließend wurde die Probe auf dem Fahrtisch des Gefriermikrotoms mit der schmalen Seite nach vorne positioniert (**Abbildung 4.3A**). Das Gefriermikrotom wurde zunächst auf den Modus „*Trim*“ mit einer Schnittdicke von $40\text{ }\mu\text{m}$ eingestellt. Mit dieser Einstellung wurde so lange geschnitten, bis die Probe durch das Tissue Tek durchschimmerte. Daraufhin wurde auf den Modus „*Smooth*“ mit einer Schnittdicke von $5\text{ }\mu\text{m}$ gewechselt. Nun wurde bei der Schnittführung an dem Handrad des Gefriermikrotoms darauf geachtet, dass die Rotation langsam erfolgt. Zu

schnelle Rotationen führten zu Artefakten. Gleichzeitig wurde vor jedem Schnitt das Glasplättchen runtergeklappt, sodass der Schnitt zwischen Messer und Glas geführt werden konnte (**Abbildung 4.3B**). Dies verhinderte ein Aufrollen der Probe. Anschließend wurde das Glasplättchen hochgeklappt und der Schnitt konnte durch den Superfrost Plus-Objektträger aufgenommen werden. Bei den Glasplättchen wurde darauf geachtet, dass sie keine Beschädigungen in Form von Absplitterungen oder Rissen zeigten.



A: Positionierung der Probe auf der Objektplatte



B: Schnittführung

Abbildung 4.3 Schneidevorgang am Gefriermikrotom

A: Fixierung der Probe auf der Objektplatte mit zwei Tropfen Tissue Tek. Ausrichtung der schmalen Seite nach vorne.

B: Vor dem Bewegen des Fahrtisches wurde die Glasplatte heruntergeklappt, um den Schnitt dort entlang zu führen. Im Anschluss wurde der Schnitt mit Superfrost Plus OT aufgenommen.

Diese Objektträger zeichnen sich dadurch aus, dass sie mit positiven Ladungen beschichtet sind. Dadurch können die negativen Ladungen der DNA besser auf dem Objektträger haften. Vergleichsweise wurden auch Schnitte auf unbeschichteten *Superfrost* Objektträgern angefertigt. Es zeigte sich, dass sich das Gewebe bereits nach dem zweiten Waschen in PBS vom Objektträger löste. Somit war entweder gar kein Gewebe mehr vorhanden oder nur noch partiell. Es bot sich an, pro Objektträger nur drei bis maximal vier Schnitte zu platzieren, um genügend Platz für erfolgreiche Färbungen sicher zu stellen. Nach Anfertigung der Schnitte

wurden die Objektträger ca. 15 min bei Raumtemperatur getrocknet, um eine optimale Adhärenz des Gewebes auf dem Objektträger zu gewährleisten. Bis zur Färbung wurden die Objektträger im histologischen Präparatekasten bei -80 °C längerfristig gelagert. Für kurzfristige Lagerungen, wenige Tage, konnten die Objektträger auch bei -20 °C gelagert werden.

4.3 Autofluoreszenzmessung am Mausgehirn

Zur Autofluoreszenzmessung wurden Gehirne von unbehandelten Mäusen genommen. Die Proben wurden mit einer Stanze (Durchmesser 5 mm) in gleich große Stücke geteilt. Anschließend wurden die Gehirne in Tissue Tek eingebettet und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte im -80°C Gefrierschrank. Die Etablierung des Schneideverfahrens wurde in erster Linie an den Maushirnen erarbeitet. Die Vorgehensweise zur Anfertigung der Schnitte wurde in 4.2 erläutert. Aufgrund von Artefakten in den Schnitten der Maushirne wurde anschließend untersucht, ob eine Fixierung des Gewebes vor dem Einbetten und Einfrieren eine positive Wirkung auf die Schnittqualität ausübt. Zur Untersuchung, welche Wirkung eine Fixierung des Gewebes auf die Hintergrundfluoreszenz hat, wurden einige gängige Fixierungsmittel miteinander verglichen, nämlich i) 4% PFA, ii) Aceton, iii) Methanol und iv) Aceton-Methanol im 1:1 Gemisch.

4.3.1 Vorfixierung von Mausgehirnen

Der Ablauf der Fixierung vor dem Gefrieren war identisch. Die Mausgehirne wurden nach chirurgischer Entnahme in ein *Eppendorfgesäß* (1,7 ml) überführt und 24 Stunden mit 1 ml 4 %-igem PFA oder Aceton fixiert. Anschließend folgte eine 24-stündige Dehydrierung auf einem Shaker in 30%-iger Saccharose-Lösung bei 4 °C, bis die Proben auf den Boden des *Eppendorfgesäßes* abgesunken waren [149]. Danach wurden die fixierten Mausgehirne in Tissue Tek eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte im -80 °C Gefrierfach.

4.3.2 Färbung mit Sudan Schwarz B

Die angefertigten Objektträger wurden nach ihrer Entnahme aus dem -80 °C Tiefkühlschrank für 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut. Auf einem Objektträger befanden sich vier Schnitte aus einer Probe. Im Folgenden wurden die Schnitte auf den Objektträgern für 15 min bei Raumtemperatur mit einem der vier Fixative aus 4.3.1 fixiert, unabhängig davon, ob sie bereits vor der Einbettung fixiert wurden oder nicht. Anschließend wurden die Objektträger dreimal

für je 10 min in 1X PBS gewaschen. Für jeden Waschschriff wurde das PBS ausgetauscht. Zur Permeabilisation der Zellmembran wurde pro Schnitt 50 µl 0,25 %-iges Triton X-100 pipettiert und für 2 min auf einer mit Alufolie bedeckten Eisbox belassen. Im Anschluss erfolgten wieder zwei Waschschriffe in frischem 1X PBS für je 10 min. Die überstehende Flüssigkeit auf dem OT wurde nach dem Waschen mit Präzisionstüchern entfernt. Für jedes Fixativ wurde eine Behandlung mit *Sudan Black B* (SBB) und eine Kontrolle mit PBS angefertigt. Zur Beurteilung des Einflusses von SBB auf die Zellkernfärbung mit DAPI wurde eine Kontrolle ohne Zellkernfärbung mitgeführt. Die **Abbildung 4.4** zeigt die Anordnung der Schnitte mit ihrer jeweiligen Behandlung. Für die SBB Behandlung wurden ca. 100 µl pro Schnitt pipettiert und in einer Feuchtkammer für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Kontrolle wurden stattdessen 100 µl PBS pipettiert. Es folgten zwei weitere Waschschriffe für 5 min in 1X PBS. Zum Schluss wurden auf zwei Schnitte 50 µl einer 10 µM DAPI-Lösung pipettiert und für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Mit einer letzten Waschphase von 10 min war die Färbung beendet. Die Objektträger wurden mit zwei Tropfen *Fluoromount Medium* überzogen und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Messung der Objektträger erfolgte wie in 4.6.1 beschrieben.

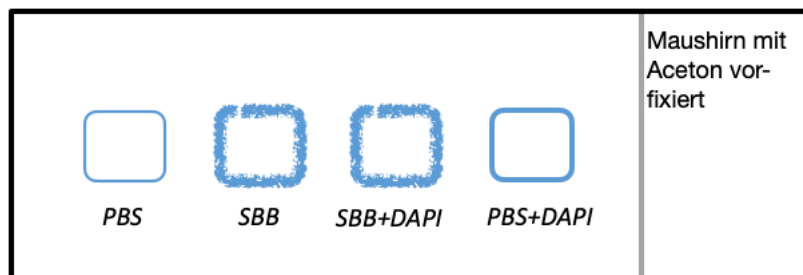


Abbildung 4.4 Anordnung der Schnitte auf dem Objektträger am Beispiel des Fixativs Aceton. Die Unterschriften kennzeichnen die jeweilige Behandlungsform. DAPI = Zellkernfärbung; PBS = *phosphate-buffered saline*; SBB = *Sudan Black B*

4.4 Etablierung der Mehrfachfärbung

Nach ausgiebiger Recherche der Literatur wurden Antigene ausgesucht, die bei Immunzellen des Glioblastoms im Vordergrund stehen. Das Ziel bestand darin, drei Antigene und den Zellkern gleichzeitig zu färben. Aufgrund der höheren Sensitivität in der Antikörperfärbung wurde die indirekte Immunfluoreszenz verwendet. Indirekte Immunfluoreszenz bedeutet, dass zunächst ein unkonjugierter primärer Antikörper einer Spezies (Maus, Ratte oder Kaninchen) auf dem Schnitt inkubiert wird. In der zweiten Phase wird ein Fluorochrom-konjugierter Sekundärantikörper, der gegen die Spezies gerichtet ist, inkubiert. Die folgende Abbildung 4.5 zeigt eine schematische Darstellung einer Färbung.

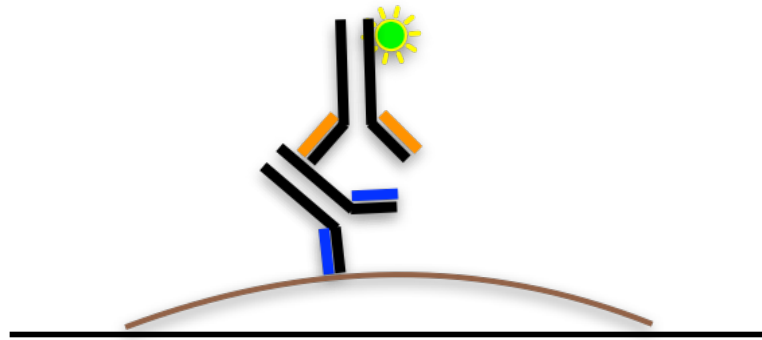


Abbildung 4.5 Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz. Braun = Gewebe, Blau = primärer Antikörper, orange = sekundärer Antikörper mit Fluorochrom konjugiert (gelbgrün)

Für das gleichzeitige Färben von drei Antigenen wurden nur Antikörper berücksichtigt, die bereits in anderen Publikationen erfolgreich getestet wurden. Um die idealen Antikörperzusammenstellungen zu finden, wurden möglichst mehrere Klone der ausgesuchten Antigene bestellt. In einem Screening-Verfahren wurden dann alle Antikörper auf Glioblastom-Gefrierschnitten getestet. In

Tabelle 4.2 wurden die positiv getesteten Antikörper als Mehrfachfärbungen zusammengefügt. Im Tabellenkopf befinden sich die Sekundärantikörper mit konjugiertem Fluorochrom. In den zugehörigen Spalten befinden sich die Primärantikörper gegen die sie gerichtet sind. Der Antikörper zu MCP-1 konnte nicht etabliert werden und wird in den folgenden Experimenten nicht weiter berücksichtigt.

Tabelle 4.2 Färbepanel für die Fluoreszenzfärbung von Glioblastomproben.

	Zellkern	Ziege Anti-Maus-AF488	Ziege Anti-Ratte-AF594	Ziege Anti-Kaninchen-AF647
Färbung 1	DAPI	CD206 (H00004360-M02)	CD16 (ABIN2478680)	CD163 (NBP1-30147)
Färbung 2	DAPI	CD68 (Ab955)	MHC-II (MCA71R)	CD204 (NBP1-88125)
Färbung 3	DAPI	<i>MCP1</i> (MCA5981GA)	-	CCR7 (NBP2-31088)
Färbung 4	DAPI	PSGL-1 (MAB9961)	-	CSF1R (Ab183315)

Mastermix 5	DAPI	iNOS (MAB9501)	GFAP (13-0300)	Arg1 (Ab211961)
-------------	------	-------------------	-------------------	--------------------

Pro Tumorareal eines Patienten wurde eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, bei welcher der Primärantikörper weggelassen und nur mit Sekundärantikörper gefärbt wurde. Hierdurch konnte begutachtet werden, ob die Sekundärantikörper den zugehörigen Primärantikörper binden und damit das gesuchte Antigen und ob sie Strukturen des Hirngewebes binden. Bedeutend im Vergleich von positiver Färbung mit negativer Kontrolle war zum einen die Fluoreszenzintensität und zum anderen die Art bzw. Struktur der Färbung. Dabei war bei den Sekundärantikörpern der gewählte Fluoreszenzkanal zu berücksichtigen. Der Kanal im Wellenlängenbereich um die 520 nm (grün) wies stets höhere Signale auf, die mit der Autofluoreszenz des Gewebes in diesem Wellenlängenbereich (bei gleichzeitiger Anregung bei 475 nm) zusammenhing.

4.4.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Bevor mit der Färbung begonnen werden konnte, sollten Objektträger, die bei -80 °C gelagert wurden, ungefähr 10 min bei Raumtemperatur auftauen. Im Anschluss wurden die Schnitte mit eiskaltem Aceton (-20 °C) 5 min fixiert. Es folgten vier Waschschritte. Einfaches Spülen in 1X PBS und je dreimal 5 min Waschen in 1X PBS. Durch sanftes Abklopfen trockneten die Objektträger. Eine vollständige Austrocknung sollte vermieden werden. Anschließend wurde mit 50 µl 0,25 %-iger Triton-X100 Lösung für 2 min permeabilisiert. Dieser Schritt ermöglichte eine bessere Durchlässigkeit der Antikörper bzw. des Zellkernfarbstoffs DAPI nach intrazellulär. Nach wiederholtem Spülen in 1X PBS und zweimaligem Waschen für je 5 min, wurden die Objektträger mit Präzisionstüchern vorsichtig am Rand der Probe getrocknet. Während der Waschzeit wurden die Antikörper-Lösungen in 1 %-igem BSA hergestellt. Hierbei wurde pro Antikörper 200 ng je Färbung verwendet. Nachdem die Objektträger getrocknet waren, wurden die Proben mit einem hydrophoben Stift umrandet. Das verhinderte das Zerfließen der Antikörper auf daneben liegenden Schnitten. Pro Schnitt wurden 50 µl der Antikörper-Lösung pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Objektträger zunächst einmal in 1X PBS gespült und je dreimal in 1X PBS für 5 min gewaschen. Währenddessen wurden die Sekundärantikörper-Lösungen hergestellt. Dabei wurden die Sekundärantikörper nach Herstellerangaben verdünnt. Die Verdünnung erfolgt in einem 1:1 Gemisch aus 1 % BSA und 10 µM DAPI. Nach Trocknen der Objektträger wurden 50µl der Sekundärantikörper-Lösung pro Schnitt pipettiert und für eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss folgte wiederholt ein Spülen und dreimaliges Waschen für je 5 min in 1X PBS. Als letzten Schritt wurde *Fluoromount Medium* auf den Objektträger pipettiert. Hierbei wurde darauf geachtet, das Medium nicht tropfenweise zu proportionieren, sondern als einen länglichen Streifen entlang der Längskante des Objektträgers zu verteilen. Dies verhinderte die Bläschenbildung. Nun wurde das Deckgläschen an der Kante des Mediumstreifens positioniert und mit Zeigefinger und Daumen führend runtergedrückt. Die gefärbten Objektträger wurden direkt im Anschluss gemessen.

4.4.2 Etablierung der Blockierungs-Lösungen

Die sogenannten *blocking buffer* oder *blocking solutions* dienen zur Absättigung freier Bindungsstellen, die sonst während des Färbeprozesses unspezifische Bindungen zeigen könnten. Für die geplanten Experimente wurden drei verschiedene *blocking-solutions* getestet. Gegenübergestellt wurden 10 %-iges Ziegenblut-Serum, 10%-iges Eselblut-Serum ein 1:1 Gemisch aus beiden in PBS sowie 1% BSA. Der Ablauf der Färbung ist dem Abschnitt 4.4.1 zu entnehmen. Vor der Inkubation des Primärantikörpers wurden die Schnitte jeweils mit 50 µl einer Blockierungslösung bedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden sie zweimal 5 min in 1X PBS gewaschen und mit dem Primärantikörper über Nacht inkubiert. Pro Lösung wurden n = 2 Durchgänge mit je einer Kontrolle durchgeführt.

4.5 Analyse der Gewebekultur-Überstände

Die Analyse der Flüssigkeitsüberstände des inkubierten Gewebes wurde mit einem *bead*-basierten Assay (BioLegend) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Es wurde ein vordefiniertes Neuroinflammationspanel mit elf Analyten genutzt. *Bead*-basierte Immunoassays nutzen die gleichen Grundprinzipien wie *Sandwich-Immunoassays*. Hierbei wird ein löslicher Analyt zwischen zwei Antikörpern eingefangen. Der *capture-bead* bindet den jeweiligen Analyten. Daraufhin erfolgt die Zugabe von biotinylierten Detektions-Antikörpern. Das *Sandwich* aus *capture-bead* – Zytokin – Detektions-Antikörper wird anschließend mit Zugabe von Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) anhand des Fluoreszenzsignales gemessen. Die Überstände der Glioblastom-Proben wurden mit *beads* inkubiert und die mittlere Fluoreszenzintensität jeder *Bead*-Population (die einen einzelnen Analyten repräsentieren) mit Durchflusszytometrie (*CytoFLEX S*) bestimmt. Die Gesamt-Analytenkonzentrationen in Pikogramm pro Milliliter wurden gegen einen bekannten Standard und unter Verwendung einer 5-log-Anpassung mit spezieller Software (VigeneTech) berechnet.

4.6 Mikroskopie

4.6.1 Immunfluoreszenz

Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem *high-content imaging* Gerät (CLS) durchgeführt. Die Objektträger wurden in einem 4-fach Halter fixiert und in das Gerät gefahren. Zur Messung der unterschiedlichen Fluoreszenzkanäle mussten diese eingestellt werden. Die Anregungswellenlängen waren 365nm (DAPI), 475nm (AF488), 550nm (AF594) und 630nm (AF647). Zunächst wurde nur der stets hell-gefärbte DAPI-Kanal als Zellkernfärbung ausgewählt und folgende Einstellungen vorgenommen: Belichtungszeit = 80 ms, Laserintensität = 80 %. Hiermit wurde ein Übersichtsbild mithilfe des *1,25X* Objektivs vom kompletten Objektträger angefertigt, um die Gewebsschnitte zügig finden zu können. Um einen möglichst großen Ausschnitt des OT zu erhalten, wurde auf dem Layout mittels Rechtsklick *field centered* rausgenommen und acht *fields of view* (FoV) ausgewählt. Nun wurde eine Messung gestartet. Alle gemessenen FoV wurden ausgewählt und mit Rechtsklick als *background for well* eingestellt. Das Übersichtsbild des OT als Hintergrund im Layout war eingestellt. Somit konnte das Objektiv auf *20X Air* gewechselt werden, ohne dass die vorherige Messung verschwand. Nun konnten die einzelnen FoV, die zum Schnitt gehörten markiert werden. Alle Fluoreszenzkanäle die von Interesse waren, wurden ausgewählt und wie in Tabelle 4.3 beschrieben eingestellt.

Tabelle 4.3 Einstellung der Fluoreszenzkanäle im 20X-Air Objektiv.

	relative Höhe	Belichtungszeit	Laserstärke
DAPI	50 μm	10 ms	10 %
AF488	55 μm	50 ms	50 %
AF594	50 μm	50 ms	50 %
AF647	45 μm	50 ms	40 %
Hellfeld	50 μm	40 ms	20 %

Es war wichtig, die Einstellungen der Expositionszeit und der Laserleistung über alle Messungen konstant zu halten, um die Fluoreszenzintensitäten untereinander vergleichbar machen zu können. Bedingt durch die unterschiedliche Menge des aufgetragenen *Mounting* Mediums, konnte die Fokus-Ebene auch variieren. Um daher den richtigen Fokus für jeden

einzelnen Fluoreszenzkanal zu finden, wurden zehn Ebenen im Abstand von 5 µm für ein FoV aufgenommen. Nachdem der richtige Fokus für alle Kanäle feststand, wurden die Ebenen dementsprechend angepasst und der gesamte Schnitt gemessen.

4.6.2 Immunhistochemie

Für die Messung der nicht-fluoreszierenden immunhistochemischen Färbungen, angefertigt im Institut für Pathologie der Universität Greifswald, wurden drei Kanäle genutzt: Hellfeld, *DAB* und *Tissue Autofluorescence*. Letzterer ist ein selbst angefertigter Kanal, der vor allem die Autofluoreszenz des Hirngewebes aufnimmt, sodass die Detektion des gesamten Schnittes einfacher wird. Der Umgang mit dem Objektträger für die Messung an der Operetta CLS ist aus 4.6.1 zu entnehmen. Das Übersichtsbild wurde zunächst mit dem *1,25X* Objektiv im *DAB* Kanal angefertigt und anschließend als *background for well* eingestellt. Danach wurden die beiden anderen Kanäle hinzugefügt. Da die in dem Institut für Pathologie gefärbten Schnitte sehr groß waren, wurden die Färbungen mit einem *10X* Objektiv, anstatt des sonst genutzten *20X*, aufgenommen. Nach dem Wechsel auf das *10X* Objektiv wurden der Fokus und die Messparameter für die drei ausgewählten Kanäle, wie in 2.5.1 beschrieben, bestimmt. Tabelle 4.4 zeigt die Messeinstellungen. Schließlich konnte, nachdem alle zum Gewebe zugehörigen FoV markiert wurden, der Schnitt aufgenommen werden. Es wurden insgesamt 26 Patienten gemessen. Davon waren fünf Patienten „gesunde Kontrollen“ aus Sektionsfällen des Instituts für Pathologie. Von jedem Patienten wurden insgesamt drei Färbungen gemacht, pro Objektträger ein Schnitt mit einer Färbung. Zielantigene waren CD68, CD163 und PSGL-1.

Tabelle 4.4 Einstellung der Kanäle für die Messung immunhistochemischer Schnitte.

	relative Höhe	Belichtungszeit	Laserleistung
DAB	0 µm	5 ms	5 %
TAF	30 µm	100 ms	50 %
Hellfeld	2 µm	20 ms	50 %

4.7 Bildanalyse mit Harmony

4.7.1 Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen

Die Bildanalyse erfolgte mit der Software *Harmony* von PerkinElmer. Dadurch konnten gleichartige Analyse-Strategien zur Auswertung einer Vielzahl von Bildern genutzt werden, sodass sie in der Quantifizierung untereinander vergleichbar waren. Da die Schnitte der einzelnen Proben den verschiedenen Glioblastom-Patienten sehr unterschiedlich waren und auch die Färbungen sich unterschieden, wurde die geschriebene Analyse über mehrere Proben entwickelt und angepasst. Im Folgenden wird die Herangehensweise zum Schreiben der Analyse von Immunfluoreszenz-Bildern beispielhaft an einer Probe gezeigt. Um die Größe des Schnittes zu berechnen, wurden die einzelnen Kanäle (DAPI, AF488, AF594, AF647) unter dem Reiter *calculate image* auf den Mittelwert normiert. Im Anschluss wurde das berechnete Bild, wie in Abbildung 4.6 abgebildet, unter dem Reiter *filter image* geglättet (*smoothed*). Dadurch konnten Schmutzpartikel, die im Rahmen des Färbeprozesses z.B. durch Salze entstanden, herausgefiltert werden. Über den Reiter *find image region* wurde anschließend, wie in Abbildung 4.7 dargestellt der Gewebeschnitt anhand der Intensitätsunterschiede segmentiert (rot). Über die Unterpunkte *threshold* und *area* wurden die Einstellungen verfeinert.

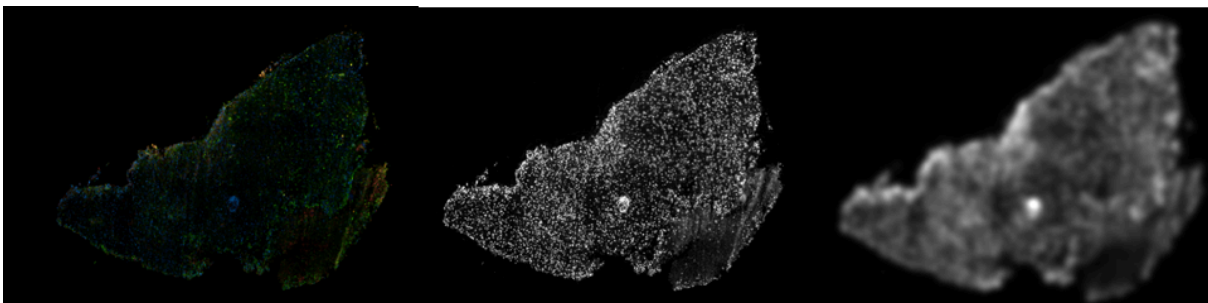


Abbildung 4.6 Kalkulieren und Filtern des gefärbten Schnittes. Das linke Bild zeigt das ursprünglich gemessene IF-Bild. Das mittlere Bild zeigt die Normierung aller gemessenen Kanäle auf dem Mittelwert. Das rechte Bild zeigt die Filterung.

Um die errechneten Areale als Zahlenwerte herausgeben zu lassen, wurden unter *calculate morphology properties* die Zielwerte von Interesse bestimmt, z.B. *area in μm^2* . Die Ermittlung der Analyse der Antigenfärbungen einzelner Zellen erfolgte anhand eines FoV. Hierfür waren das Finden und Erkennen der Zellkerne essentiell. Dies wurde über den Reiter *find cells* definiert. Abbildung 4.8 zeigt die Erkennung von ungefähr 400 Zellkernen in einem FoV.

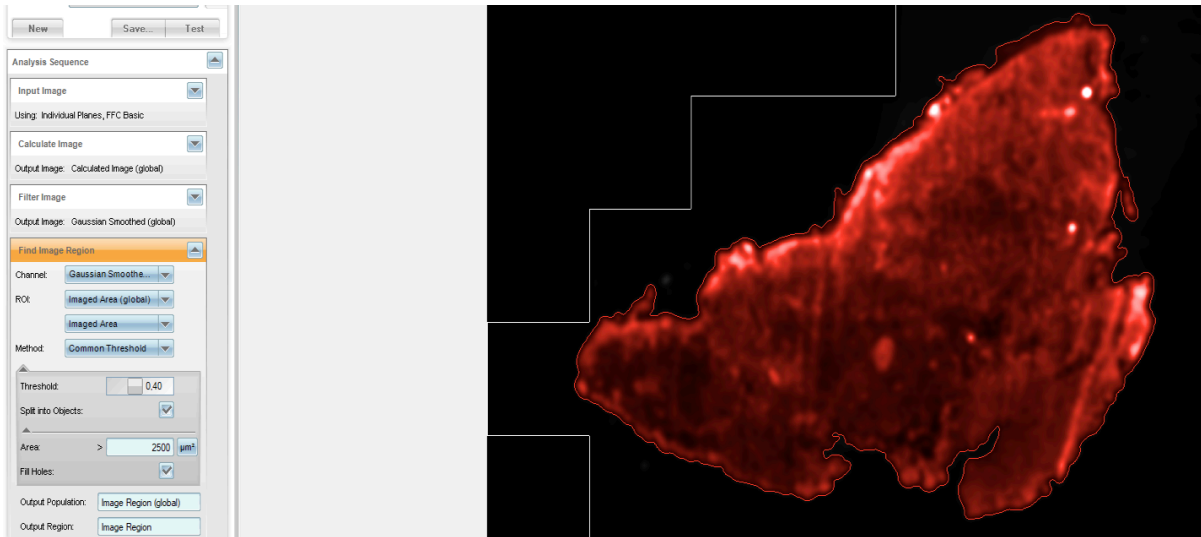


Abbildung 4.7 Find image region. Anhand von Intensitätsunterschieden zwischen gefärbten und ungefärbten Arealen Färbung wird der Gewebeschnitt mittels Software segmentiert (rot).

Population: Cells		Value					
Property	Mean	CV %	StdDev	Median	Max	Min	Sum
Number of Objects	400						
Area [µm²]	126.458	61.3148	77.5376	107.273	588.569	40.0484	50583.3
Area [px²]	353.655	61.3148	216.843	300	1646	112	141462
Intensity DAPI Sliding Parabola	1475.97	47.1853	696.439	1390.15	5154.36	308.229	590386

Abbildung 4.8 Finden der Zellkerne. Alle erkannten Zellkerne, die einen Intensitätsschwellenwert überschreiten, werden farblich markiert. Zu große Zellkernagglomerate sowie Zellkerne mit zu niedriger Intensität werden ausgeschlossen und bleiben unmarkiert.

Die Zellkerne wurden über den DAPI-Kanal definiert. Dabei wurden zu große und zusammenhängende Agglomerate von Zellkernen ausgeschlossen. Häufig war dies der Fall bei Tumorproben mit einer hohen Tumorzelldichte, wodurch die Permeabilisation nur bedingt erfolgreich war. Daher war davon auszugehen, dass es sich dabei um Tumorzellkerne handelte.

Zellkerne die eine zu geringe Farbeintensität aufwiesen wurden nicht erkannt und somit nicht berücksichtigt. Darüber hinaus wurden Zellkerne, die zunächst zusammenhängend erkannt wurden, gesplittet. Um die Fluoreszenzintensitäten der Antigenfärbungen zu ermittelt, wurde um den Zellkern herum eine Region definiert, in der die Färbung in der Zellmembran zu erwarten war. Unter dem Reiter *select cell region* wurde um die definierten Zellkerne ein Ring nach außen und nach innen definiert. Der Ring nach außen spiegelte die Zellmembran wider mit dem ggf. gefärbten Antigen. Die Abbildung 4.9 zeigt die markierten Zellkerne mit definierten Zellgrenzen nach außen und innen. Im Anschluss wurden für jeden Fluoreszenzkanal (AF488, AF594, AF647) die Intensitätswerte, die innerhalb der Ring-Region lagen, quantifiziert. Ausgegebene Parameter waren Median, Mittelwert, Summe und die Standardabweichung der Fluoreszenzintensitäten.

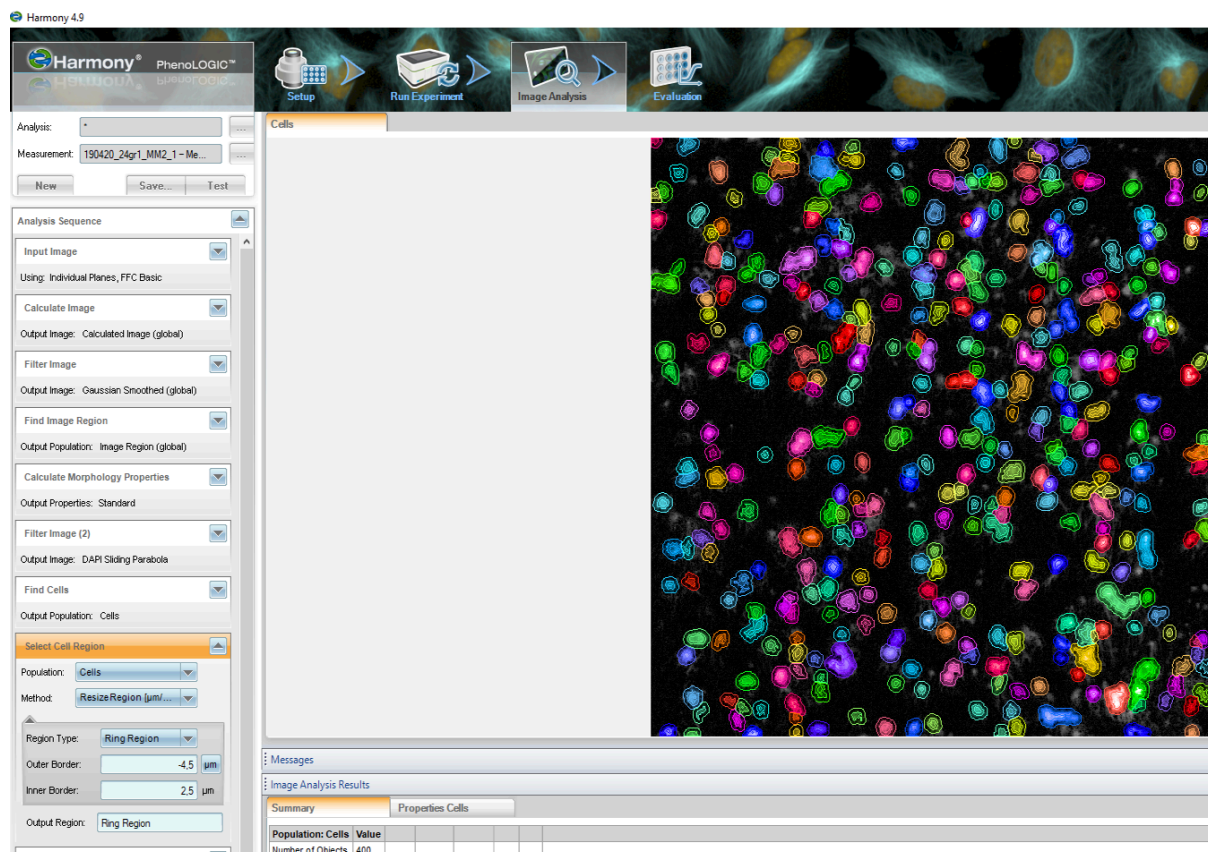


Abbildung 4.9 Definieren einer Zellregion für die Antigenintensitäten. Die farblich markierten Strukturen kennzeichnen die Zellkerne. Die äußerste Linie kennzeichnet den äußeren Ring für die Zellmembran und der innere Ring liegt innerhalb der Zellkerne.

4.7.2 Analyse immunhistochemischer Färbungen

Das aufgenommene Bild wurde zunächst im DAB-Kanal über den Reiter *filter image* invertiert. Im Folgenden waren die Zellkerne hell und das restliche Gewebe dunkel. Positive gefärbte Zellen waren durch ihre höheren Pixel-Intensitäten von den ungefärbten Zellen abzugrenzen.

Auf Grundlage des *tissue autofluorescence*-Kanals wurde die Größe des Gewebes auf dem Objektträger berechnet. Dafür wurde dieser Kanal über eine Formel normalisiert. Hierüber wurde dann unter dem Reiter *find image region* ein Schwellenwert (*threshold*) bestimmt, über dem alle Punkte erfasst wurden. Somit konnten Gewebsartefakte, die keine Zellen enthielten, ausgespart werden. Ähnlich wie im ersten Schritt beschrieben, wurde der Hellfeld-Kanal invertiert. Anschließend wurden die invertierten Hellfeld- und DAB-Kanäle unter dem Reiter *calculate image* zu einem Kanal fusioniert. Unter dem Reiter *find cells* wurden die Zellkerne detektiert. Hierbei wurde jede Zelle als positiv erkannt, die eine deutlich höhere Intensität als das umgebende Gewebe hatte und eine Größe $>50 \mu\text{m}^2$ erreichte. Schließlich wurden als Parameter Mittelwert, Median, Summe und Standardabweichung der relativen Intensitäten quantifiziert. Da die Größe des gesamten Schnittes berechnet wurde, konnte die Anzahl der positiven Zellen pro mm^2 ermittelt werden.

4.7.3 Quantifizierung der Bildanalysen für die graphische Darstellung

Für die Darstellung der quantitativen Antigenexpression wurden die medianen Fluoreszenzintensitäten (MFI) gewählt, da diese gegenüber Ausreißern nicht anfällig sind. Die positiven Färbungen wurden auf die negativen Kontrollen normiert (*fold change* = FC), damit eine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob sich die Färbung von der Kontrolle quantitativ unterscheidet, d.h., ob es eine Expression des Studienmarkers gab oder nicht. Zur Ermittlung der FC-Werte wurden nach **Formel 5.1** die MFI-Werte der Färbung durch die MFI-Werte der Negativ-Kontrolle (Ctrl) dividiert. Somit ergab sich für jedes Areal ein FC-Wert. Für jeden Marker wurden dann die Werte aller 42 Proben zusammengetragen.

$$(5.1) \quad FC = \frac{MFI(\text{Färbung})}{MFI(\text{Ctrl})}$$

Für die Darstellungen der intratumoralen Heterogenität wurden die MFI-Werte der Antigene zunächst auf ihre Negativ-Kontrolle durch Subtraktion normiert. Anschließend erfolgte die Normierung auf den Mittelwert der Subtraktionen aller Areale eines Patienten durch Division (**Formel 5.2**).

$$(5.2) \quad x = \frac{MFI(\text{Färbung}) - MFI(\text{Ctrl})}{\bar{x}(MFI(\text{Färbung}) - MFI(\text{Ctrl}))}$$

Falls die Subtraktion oberhalb des Bruchstrichs einen negativen Wert ergab, also die Intensitätswerte der Kontrolle höhere Werte hatten als die Werte der eigentlichen Färbung, wurde die Zahl oberhalb des Bruchstrichs „1“ gleichgesetzt. Die Division durch den Mittelwert ergab somit sehr kleine Zahlen nahe „0“. Hierbei war davon auszugehen, dass der Studienmarker in dem Schnitt des Areal nicht oder nur sehr gering exprimiert war. Die errechneten Werte aus der **Formel 5.2** für alle Werte mit $x < 1$ wurden nun in die Formel (5.3) eingesetzt.

$$(5.3) \quad \text{Score} = 0 - \left(\frac{1}{x < 1} \right) \times 100$$

Die Werte für $x > 1$ wurden nicht in die Formel (5.3) eingesetzt, sondern direkt mit 100 multipliziert. Die Begründung hierfür lag darin, dass die Werte $x < 1$ aussagen, dass der Marker geringer exprimiert ist als im Mittel. Der Wert $x = 1$ stellt den Mittelwert da, also die durchschnittliche Expression. Die Werte $x > 1$ stellen eine stärkere Expression dar. Somit konnte die Heterogenität der quantitativen Analyse der Studienmarker grafisch abgebildet werden.

Für die errechneten Werte, die in (5.2) sehr kleine Zahlen nahe „0“ erhielten, wurden demzufolge in der Formel (5.3) eingesetzt. Dabei war zu beachten, dass je stärker die Zahl sich an „0“ näherte, desto höhere negative Zahlen resultierten aus der Formel. Dies konnte die Aussage unterstreichen, dass die Expression sehr stark vom Durchschnitt abwich. In dem Fall bedeutete das eine sehr niedrige Expression.

Aufgrund der Übersichtlichkeit der Abbildungen unter 5.3.2 wurden alle Zahlenwerte $x < -500$ mit „-500“ gleichgesetzt. Die Aussage blieb die gleiche.

Es lässt sich schlussfolgern, dass die Werte >100 eine höhere Expression und die Werte <100 eine niedrigere Expression als der Mittelwert = 100 repräsentieren. Somit lässt sich sagen, je weiter ein Punkt in den Abbildungen unter 5.3.2 vom Mittelwert 100 beziehungsweise -100 entfernt liegt, desto größer ist die Heterogenität seiner Expression in ein und demselben Tumor. Für eine bessere Differenzierung und weitere Quantifizierung wurde innerhalb der Abbildungen ein Score erstellt. Lagen die Punkte *unter* einer arbiträren Grenze von +/- 150, wurden 5 Heterogenitätspunkte vergeben (*Bereich S2 und S3*). Lagen die Punkte *über* der Grenze, wurden 10 Heterogenitätspunkte vergeben (*Bereich S1 und S4*).

4.7.3.1 Berechnung und Darstellung der soluten Analyten der Gewebekultur-Überstände

Aus den 11 Patienten wurden 39 Tumorareale gesammelt. Aus den multiplen 4-32 Replikaten pro Tumorareal wurde der Mittelwert gebildet. Somit lag pro Tumorareal jedes Patienten je ein Wert vor. Die beschriebene Quantifizierungsmethode für die Immunfluoreszenz-Methode wurde ebenso für die Überstandsanalysen genutzt. Es gab hierbei jedoch zwei Unterschiede. Bei den Überstandsanalysen wurden mittlere Fluoreszenzintensitäten statt mediane Fluoreszenzintensitäten verwendet. Außerdem wurden die Fluoreszenzintensitätswerte an einen Standard angepasst, womit sich die erneute Normierung auf die Kontrolle erübrigte. Für die Darstellung der Gesamtexpression kam somit nicht die **Formel 5.1** zum Einsatz, sondern die bereits angepassten Fluoreszenzintensitätswerte. Die **Formel 5.2** und **5.3** kam für die Darstellung der intratumoralen Heterogenität zum Einsatz. Vom Patienten 23 lag nur ein Tumorareal vor. Daher wurde dieser für die Heterogenitätsdarstellung nicht berücksichtigt.

4.8 Statistik

Für die Visualisierung und die statistische Auswertung wurde *prism* (*GraphPad Software*) genutzt. Die Formatierung der Rohdaten erfolgte zuvor mit Excel (*Microsoft Office*). Für die statistische Analyse der immunhistochemischen Färbungen wurden zwei Testverfahren verwendet. Die statistische Auswertung der Tumorpatienten vs. Kontrollpatienten erfolgte über einen Zweistichproben-t-Test. Beim Vergleich der drei Antigene CD68, PSGL-1 und CD163 untereinander, wurde der *Wilcoxon matched pairs signed rank test* angewandt. Hierbei wurden selektiv zwei Antigene miteinander verglichen und der Test dreimal durchgeführt. Der Alpha-Fehlerkumulierung durch wiederholtes Testen einer Stichprobe wurde mit der *Bonferroni-Korrektur* entgegengewirkt. Die unterschiedlichen Signifikanzlevel wurden folgendermaßen definiert: * $\alpha = 0,05$; ** $\alpha = 0,01$, *** $\alpha = 0,001$, **** $\alpha = 0,0001$. Im Rahmen der Experimente mit den Gewebeproben aus den unterschiedlichen Tumorarealen eines Patienten konnten keine statistischen Tests durchgeführt werden. Da es nicht möglich war, von jedem Patienten exakt die gleichen Tumorareale zu reseziieren und nur ein Färbedurchgang stattfand ($n = 1$), wurde auf die statistische Testung verzichtet. Im Gegenzug zeigen die Heterogenitätsabbildungen die signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorarealen, was der Fokus dieser Dissertation war.

5 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Dissertation gliedert sich in drei Abschnitte. Aufbauend auf einem Vorgängerprojekt befasst sich der erste Abschnitt mit der Auswertung und Einordnung gesammelter Daten histologischer GBM-Proben. Anhand der daraus abgeleiteten Hypothese wird im zweiten Abschnitt die Methodenetablierung zur Datenerhebung vorgestellt. Der dritte Abschnitt legt die Auswertung der durchgeführten IF-Färbungen und Überstandsanalysen dar.

5.1 IHC-Schnitte aus dem Institut für Pathologie

Die Dissertation des Vorgängerprojektes (Frederik Kinnen) befasste sich mit Markern auf Makrophagen und anderen Immunzellen im peripheren Blut. Anhand dieser Marker wurden mittels intraoperativer Biopsien aus den gleichen Tumoren immunhistologische Färbungen und FACS-Analysen angefertigt. Diese Färbungen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Hierbei wurde die Eigenschaft der Pixel-Intensitäten genutzt, um gefärbte Zellen von ungefärbten Zellen (positiv vs. negativ) zu unterscheiden. Durch die erfolgte Quantifizierung der IHC-Schnitte konnten die durchflusszytometrischen Daten aus dem peripheren Blut mit den intratumoralen Verhältnissen des Glioblastoms verglichen werden. Untersucht wurde, ob Unterschiede hinsichtlich der Expression der Oberflächenantigene zwischen peripherem Blut und intratumoral existieren. Folgende Antigene wurden verglichen: CD68, PSGL-1 und CD163. Die Ergebnisse aus den durchflusszytometrischen Daten der intratumoralen Proben bilden die Grundlage für das vorliegende Projekt.

5.1.1 Immunhistochemische Auswertung

Zunächst wurde die durchschnittliche Expression des Antigens auf dem IHC-Schnitt ermittelt. Da pro Objektträger nur ein Antigen gefärbt wurde, erfolgte die Beurteilung der Antigene getrennt. (Abbildung 5.1)

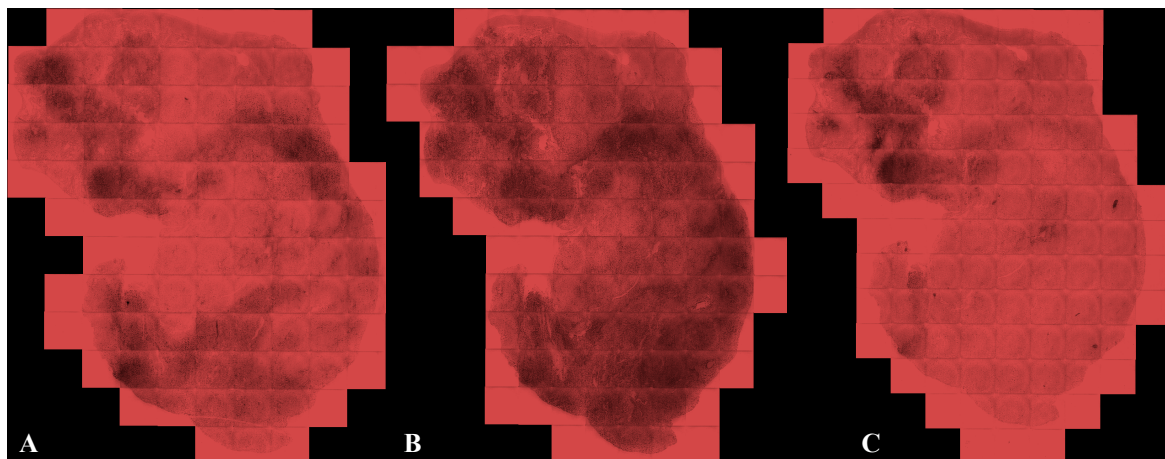


Abbildung 5.1 Immunhistochemische Schnitte des Patienten 21 gemessen mit einem Fluoreszenzmikroskop. Die Aufnahme zeigt eine Messung im DAB-Kanal. Die dunklen Areale sind Bereiche mit hoher Antigenexpression des gefärbten Studienmarkers. Patient 21 ist ein Beispiel für eine verhältnismäßig hohe Expression aller 3 Marker. A = CD68; B = CD163; C = PSGL-1.

Die Biopsien der verschiedenen Glioblastome waren jeweils unterschiedlich groß. Folglich waren auch die histologischen Gewebsschnitte von variabler Größe. Um die Anzahl der positiven Zellen nicht nur bei den Tumorpatienten ($n = 21$), sondern auch gegenüber den Kontrollen der gesunden Patienten ($n = 5$) vergleichbar machen zu können, wurden diese auf die Größe des Schnitts gemittelt. Als gesunde Patienten galten tumorfreie Sektionsfälle aus der Pathologie. In Abbildung 5.2 wird deutlich, dass CD163 signifikant am stärksten exprimiert war. Es wurden die Färbungen der 21 Tumorpatienten den Färbungen der Kontroll-Patienten als Boxplot gegenübergestellt.

Die höheren Zellzahlen der Antigene im Glioblastomgewebe wiesen auf eine stärkere Makrophagendichte und Expression hin. Gegenüber der Kontrolle bestand im Median eine ca. 16-fach höhere Anzahl an CD163⁺ Zellen. Die CD68⁺ Zellen waren in den Tumorproben ca. um das 7-fache hochreguliert.

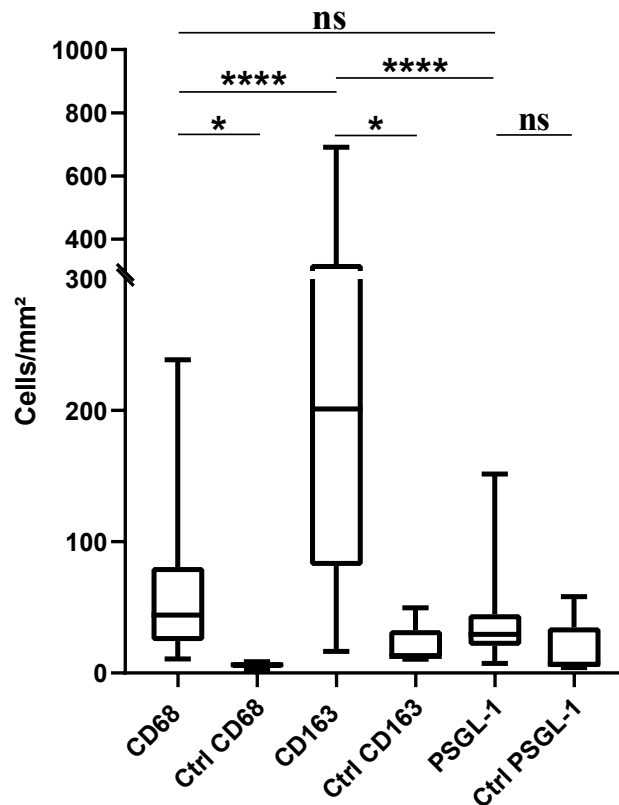


Abbildung 5.2 Graphische Übersicht der durchschnittlichen Expression der Oberflächenantigene CD68, PSGL-1 und CD163. Den positiven Färbungen aus Proben von Glioblastompatienten (n = 21) wurden Proben von Sektionsfällen (n = 5) ohne Malignome gegenübergestellt. Die Quantifizierung erfolgte mit *Harmony 4.9* anhand der medianen Pixelintensitäten (MFI) pro μm^2 der gesamten berechneten Schnittgröße. Beim Vergleich der Tumorpatienten mit den Kontrollpatienten wurde ein nichtparametrischer T-Test durchgeführt. Beim Vergleich der drei Antigene untereinander, wurde ein *Wilcoxon matched pairs signed rank test* mit *Bonferroni*-Korrektur durchgeführt. * $\alpha = 0,05$; **** $\alpha = 0,0001$; ns = nicht signifikant.

Beide Resultate waren hochsignifikant. Bei PSGL-1 zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine dezente Erhöhung der Zellzahl, jedoch ohne statistische Signifikanz. Beim Vergleich der Antigene untereinander zeigte sich für CD163 die signifikant stärkste Expression. Im Gegensatz dazu zeigten CD68 und PSGL-1 verglichen miteinander keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsstärke. CD163 war im Glioblastom unter den untersuchten Antigenen am stärksten exprimiert. CD68 zeigte eine höhere Expression im Tumor als im gesunden Gewebe. Die PSGL-1-Expression war im Vergleich zur der von CD163 deutlich reduziert und gegenüber der CD68-Expression tendenziell aber nicht signifikant vermindert.

5.1.2 Daten-Korrelation der Durchflusszytometrie und Immunhistochemie

In der Abbildung 5.3 wurden die durchflusszytometrisch ermittelten Werte aus den Tumorseiten für die Anzahl positiver Zellen mit den immunhistochemischen Daten korreliert. Als Graphentyp wurde ein Scatterplot gewählt, um herauszufinden, ob eine Beziehung zwischen den durchflusszytometrischen und histologischen Daten aus den jeweiligen Tumorseiten

vorliegt. Auf der x-Achse sind die FACS Daten als Prozent-positive (Anzahl positiv gefärbter Zellen aus der Gesamtheit aller Zellen) aufgetragen. Auf der y-Achse ist das Verhältnis der positiv gefärbten Zellzahl pro mm² Gewebe aufgetragen.

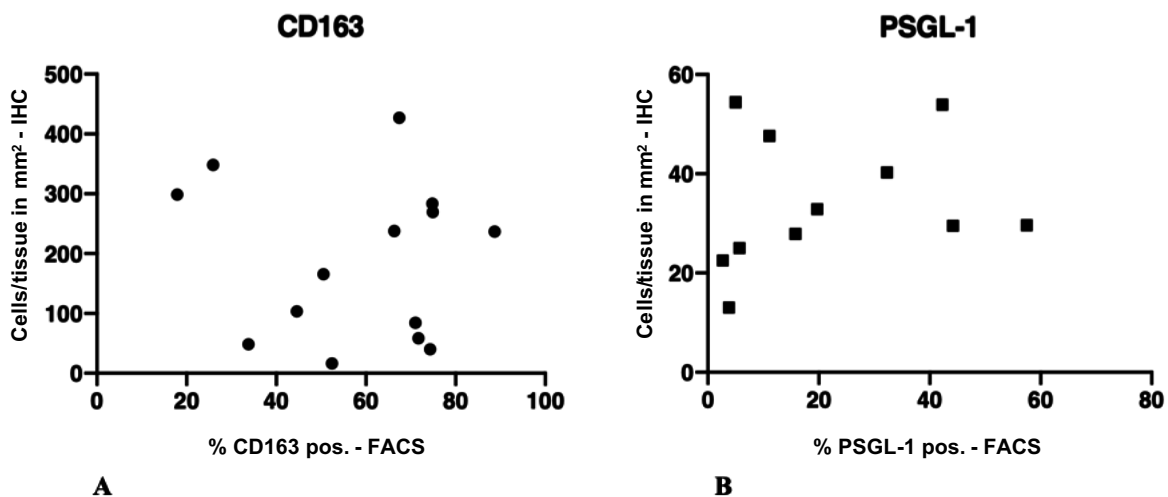


Abbildung 5.3 Korrelation der Antigene aus den IHC-Färbungen mit den durchflusszytometrischen Daten des Tumor-FACS aus dem Vorgängerprojekt. A = CD163 mit n = 14 Patienten; B = PSGL-1 mit n = 11 Patienten.

Die Skalierung beider Graphen unterscheidet sich auf der y-Achse sehr stark. Grund hierfür war, wie schon in Abbildung 5.2 gezeigt, dass die Expression der CD163⁺ Zellen im Gewebe deutlich stärker war als die der PSGL-1⁺ Zellen. Bei Betrachtung der Datenpunkte fällt auf, dass in Abbildung 5.3A n = 14 Datenpunkte vorliegen, wohingegen in Abbildung 5.3B nur n = 11 Datenpunkte dargestellt sind, obwohl in Abbildung 5.2 n = 21 Datenpunkte gemessen wurden. Die Diskrepanz in der Patientenzahl kam durch die fehlende Durchführung beider Methoden (FACS sowie IHC) bei einigen Patienten zustande. Dadurch, dass die FACS und IHC mit Tumorproben aus intratumoral unterschiedlichen Arealen durchgeführt wurde, lässt sich die teils deutliche Divergenz der Ergebnisse für beide Methoden erklären. Während die Datenpunkte für CD163 im Streudiagramm eher eine Tendenz nach rechts-oben und somit also eine hohe Expression aufweisen, zeigten die Werte für CD162 eher eine Tendenz nach links-mittig. Die Mehrzahl der Werte für CD162 zeigten im FACS eine Expression unter 20 Prozent. Gleichermäßen wiesen die Daten der histologischen Analyse überwiegend eine Zellzahl von ≤ 30 pro mm² auf. Folglich ließ sich ableiten, dass die FACS-Daten und die histologischen Daten keine Korrelation zeigten ($p > 0,05$). Entweder war die Expression im FACS oder in der IHC abweichend hoch bzw. niedrig. Besonders unter dem Gesichtspunkt, dass das gewonnene Material für die Aufarbeitung des Gewebes aus unterschiedlichen Arealen stammte, stellen

diese Ergebnisse eine gute Grundlage dar, diese Heterogenität im vorliegenden Projekt genauer zu untersuchen.

5.2 Etablierungen

5.2.1 Probenaufarbeitung

Die Etablierung des Verarbeitungsprozesses von Gewebe, beginnend mit der Gewebeentnahme bis zur histologischen Färbung, wurde an Maushirnen getestet. Nach der Entnahme wurde die optimale Herangehensweise zur Zerkleinerung des Gewebes und zur Einbettung im Gefriermedium getestet, um eine möglichst hochwertige Schnittqualität zu ermöglichen. Das Gewebe wurde nach der Entnahme mit einem Skalpell in ca. 5 mm große Proben zerkleinert. Im Vergleich dazu zeigte die Anwendung einer Stanze schlechtere Ergebnisse, da das Gewebe häufig in dieser haften blieb und durch die Präparation an der Stanze ein Teil des Hirngewebes aufgrund der flüssig-klebrigen Konsistenz verloren ging. Bezüglich der Einbettmedien ergaben sich signifikante Unterschiede. Für die Einbettung von Hirngewebe zeigten folgende Einbettmedien eine gute Schnittqualität: *O.C.T Compound Einbettmedium (VWR)* und *Tissue Tek O.C.T Compound (Sakura Finetek)*. Das *Cryo-Gel (Leica Surgipath)* zeigte schlechte Ergebnisse hinsichtlich der Schnittqualität, da das Hirngewebe häufig Artefakte bildete (Tabelle 5.1). Das Medium wurde nach dem Gefrieren porös und die gelartige Konsistenz erschwerte den Schneideprozess.

Tabelle 5.1 Vergleich der Einbettmedien. „-“ = nicht vorhanden; „+“ = leicht; „++“ = mittel; „+++“ = stark.

	Medium 1	Medium 2	Medium 3
Name	<i>O.C.T Compound Einbettmedium</i>	<i>Tissue Tek O.C.T Compound</i>	<i>Cryo-Gel</i>
Hersteller	<i>VWR</i>	<i>Sakura Finetek</i>	<i>Leica Surgipath</i>
Brüchigkeit	-	-	+++
Bläschenbildung	+	+	+++

5.2.2 Vorfixierung des Gewebes für Histologie

Grundsätzlich ist bei der Verarbeitung von Gewebe für die Immunfluoreszenz zu entscheiden, ob es vor dem Einfrieren fixiert werden sollte oder nicht. Anhand von Versuchen an Maushirnen wurde gezeigt, dass es weitreichende Unterschiede zwischen einer PFA-Vorfixierung und einer Vorfixierung mit Aceton gibt. Dabei wurde zur Beurteilung der Auswirkung der jeweiligen Fixierung nach den folgenden Kriterien unterschieden: Hintergrundfluoreszenz (Autofluoreszenz), Schneidbarkeit und Schnittqualität des Gewebes sowie Anfärbbarkeit der Antigene. Die Fixative haben die Eigenschaft, das Gewebe zu verfestigen, dies stellt vor allem bei flüssigerem Tumorgewebe eine nützliche Eigenschaft dar. Es zeigte sich, dass durch eine Fixierung des Gewebes vor dem Einfrieren eine bessere Schneidbarkeit und Schnittqualität erreicht wird.

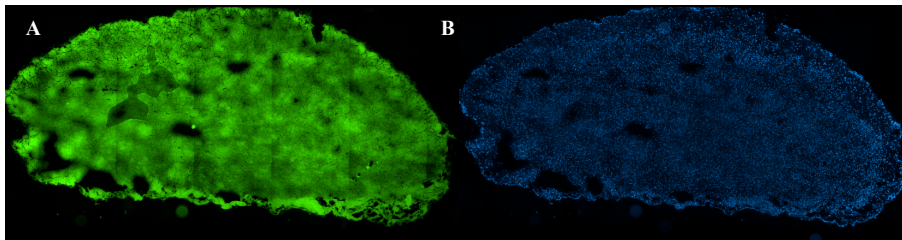


Abbildung 5.4 Hintergrundfluoreszenz eines PFA-vorfixierten Maushirns im AF488 Kanal (A) und DAPI (B). Das Gewebe wurde weder mit einem primären noch mit einem sekundären Antikörper gefärbt. Es zeigt ausschließlich die autofluoreszierenden Eigenschaften des Gewebes im AF488 Kanal, links. Rechts sind die Zellkerne abgebildet.

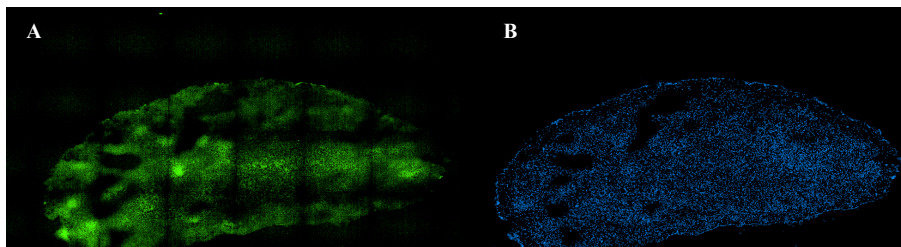


Abbildung 5.5 Hintergrundfluoreszenz eines Aceton-vorfixierten Maushirns im AF488 Kanal (A) und DAPI (B). Das Gewebe wurde weder mit einem primären noch mit einem sekundären Antikörper gefärbt. Es zeigt ausschließlich die autofluoreszierenden Eigenschaften des Gewebes im AF488 Kanal, links. Rechts sind die Zellkerne abgebildet.

Den deutlichen Anstieg der Hintergrundfluoreszenz durch die Fixierung mit PFA zeigt die Abbildung 5.4 im Vergleich zu einer reduzierten Hintergrundfluoreszenz bei einer Fixierung mit Aceton in Abbildung 5.5. Die Anfärbbarkeit der Antigene unterschied sich bei Aceton und PFA. Bei PFA war die Anfärbbarkeit des Gewebes erhalten, jedoch durch die Maskierung der Epitope abgeschwächt. Dies beeinträchtigte gemeinsam mit der erhöhten Hintergrundfluoreszenz die Qualität der Immunfluoreszenzfärbung.

Mithilfe von Aceton wurde gleichzeitig die Lipidmembran der Nervenzellen und der Zellkernmembran permeabilisiert. Dadurch wurde die DNA aus dem Zellkern gelöst und war somit in der Zellkernfärbung mit DAPI kaum bzw. sehr begrenzt nachweisbar. Die Fluoreszenzintensität der Zellkerne lag hier ungefähr bei 1200 und damit deutlich unter dem durchschnittlichen Wert von 20000. Die Zellkerne waren somit nicht mehr eindeutig abgrenzbar und die Zellen als solche nicht gut zu identifizieren.

Die parallel zu den Maushirn-Experimenten gesammelten Glioblastomgewebe wurden nach dem aktuellen Kenntnisstand der Etablierung eingebettet.

Die Patientenprobe 12, die im Rahmen des Etablierungsverfahrens in PFA eingebettet wurde, konnte für die Immunfluoreszenz genutzt werden.

Die Patientenproben 13, 14, 15, 16 und 17, die im Rahmen des Etablierungsverfahrens in Aceton vorfixiert wurden, konnten demzufolge für die Immunfluoreszenzfärbung nicht mehr verwendet werden. Die verzerrte Zellkernfärbung und die niedrige MFI durch die herausgelöste DNA, wie in Abbildung 5.6, machte es unmöglich, die Zellen in der Analyse eindeutig als solche zu identifizieren.

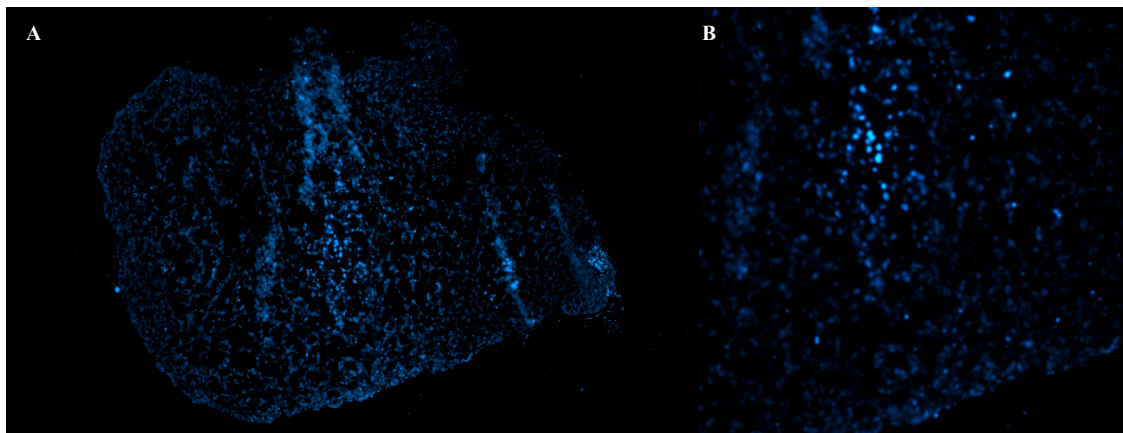


Abbildung 5.6 Aceton-vorfixiertes Glioblastomgewebe am Beispiel von Patient 14-kaudal. Die sich andeutenden Zellkerne hatten eine durchschnittliche MFI von < 1000 . Darüber hinaus wurden die Zellmembranproteine verändert, sodass die Antigenfärbung nicht möglich war. A= Übersichtsaufnahme; B = Aufnahme in 20x Vergrößerung;

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Nachteile einer Vorfixierung des Gewebes überwiegen. Die etwas höhere Schnittqualität und bessere Gewebemorphologie, die für die Immunhistochemie bedeutsam war, konnte für die Immunfluoreszenz aufgrund der Ausrichtung auf die einzelnen Zellen eher vernachlässigt werden. Eine Vorfixierung ist demzufolge für Gefrierschnitte bei Glioblastomgeweben nicht zu empfehlen.

Daher wurden die Proben 18 bis 24 unbehandelt schockgefroren. Die Zusammenfassung wird in Tabelle 5.2 Vergleich verschiedener Fixationsmethoden. „-“ = nicht möglich; „+“ = leicht; „++“ = mittel; „+++“ = stark.dargestellt.

Tabelle 5.2 Vergleich verschiedener Fixationsmethoden. „-“ = nicht möglich; „+“ = leicht; „++“ = mittel; „+++“ = stark.

	Keine Vorfixierung	PFA	Aceton
Schnittqualität	++	+++	++
Autofluoreszenz	++	+++	+
Anfärbarkeit der Antigene	+++	+	-
Anfärbarkeit der Zellkerne	++	+++	-

5.2.3 Der Einfluss von Sudan Schwarz B auf die Autofluoreszenz

Die Hintergrundfluoreszenz bei der Fixierung mit PFA kommt durch die Reaktion der Aldehyd-Gruppen mit den Aminosäuren der Zelloberflächenproteine zu Stande. Es kommt zur Bildung von Schiff'schen Basen. Diese haben besonders im Erregungsspektrum um 488 nm fluoreszierende Eigenschaften. Das Gewebe fluoresziert ohne Fixierung und Hinzugabe von Farbstoffen, wenn es bei einer Wellenlänge von 480 nm angeregt wird (Abbildung 5.4). In dem Experiment wurde untersucht, wie sich PFA-vorfixiertes Gewebe verhält, wenn es nach dem Schneiden und Waschen mit einem anderen Fixativ, wie z.B. einem Gemisch aus Aceton-Methanol (50:50), erneut fixiert wurde. Es zeigte sich, dass die Hintergrund-Fluoreszenzintensitäten des Gewebes sanken. Als dritte Vergleichsgruppe wurde unbehandeltes Maushirngewebe verwendet, welches nach dem Schneiden und Waschen mit Methanol fixiert wurde. In Abbildung 5.7 ist deutlich zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensitäten in den AF488- und AF594-Kanälen deutlich geringer sind als die im PFA-fixierten Gewebe. Die vierte Vergleichsgruppe stellte die Aceton-vorfixierte Gruppe dar. Die Fixierungszeiten und die Behandlung entsprachen der von PFA. Die Aceton-fixierten Schnitte zeigten zusammen mit Methanol die geringsten Hintergrundfluoreszenzintensitäten. Darüber hinaus war auffällig, dass die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellkernfärbung (DAPI) bei Aceton sehr niedrig war. Durch Sudan Schwarz B bestand die Möglichkeit, die Hintergrundfluoreszenz des Gewebes zu senken (Abbildung 5.7). In diesem Zusammenhang wurde die Wirkung von Sudan Schwarz B

(SBB) auf die Hintergrundfluoreszenz bei vier verschiedenen Vorbehandlungen untersucht. Bei allen vier Gruppen wurde der Effekt von SBB im Vergleich zu PBS dargestellt. Nachweislich konnte Sudan Schwarz B die MFI im Wellenlängenbereich des AF488-Kanals deutlich senken. Der größte Unterschied zeigte sich bei PFA. Die Senkung im Bereich des AF594-Kanals war eher mäßig und wurde nur bei vorangegangener PFA-Fixierung erkennbar. Im Fluoreszenzbereich des AF647-Kanals zeigte sich jedoch über alle Fixative ein Anstieg der MFI. Sudan Schwarz B autofluoresziert im Bereich von ca. 630 nm.

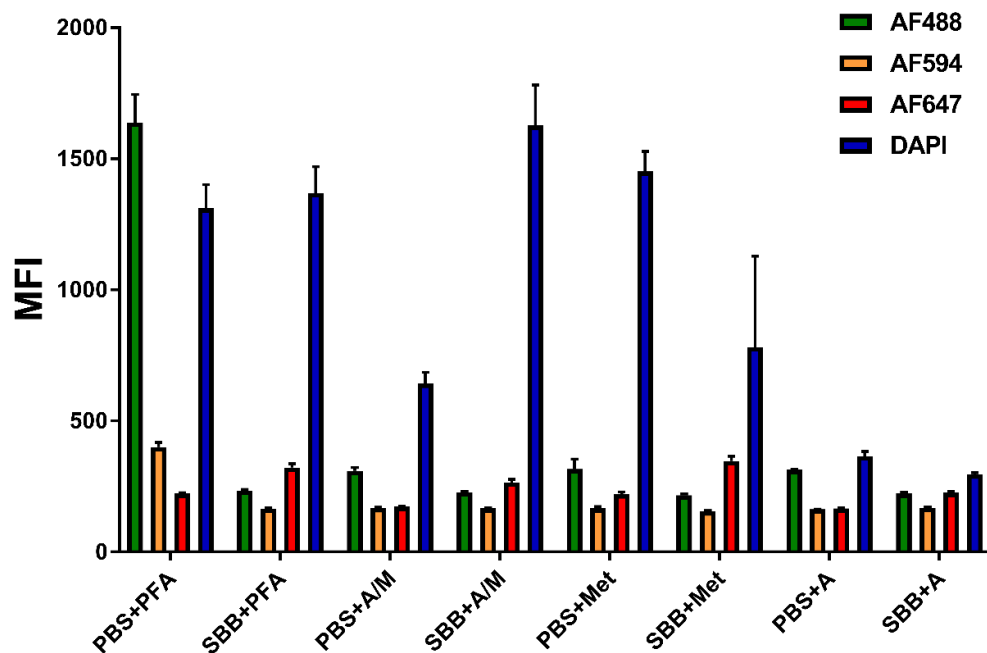


Abbildung 5.7 Zusammenfassung quantifizierter Hintergrundfluoreszenzdaten verschiedener Fixierungsmittel am Mausgehirn. Gegenüberstellung der verschiedenen Fixierungsmittel: Paraformaldehyd (PFA), Methanol (Met), Aceton (A) und Aceton/Methanol 50:50 (A/M). Verglichen wurden die MFI über dem gesamten Schnitt. Um den Sudan Schwarz B (SBB)-Effekt auf die unterschiedlichen Fixierungsmittel zu veranschaulichen, wurde als Kontrolle eine PBS-Behandlung mitgeführt. Auf der y-Achse sind die medianen Fluoreszenzintensitäten über dem gesamten Schnitt aufgetragen. Auf der x-Achse die verschiedenen Behandlungen.

Folglich zeigte PFA eine starke Hintergrundfluoreszenz, vor allem im Anregungsspektrum von 475 nm. Die niedrigsten Hintergrundfluoreszenzintensitäten fanden sich bei einer Aceton- oder Methanol-Fixierung. Aceton beschädigte die Zellkerne durch Permeabilisation der Kernmembran. Durch Sudan Schwarz B konnte man die Autofluoreszenzeigenschaften von PFA gut kompensieren. Qualitativ vergleichbare Ergebnisse erforderten bei einer Vorfixierung durch PFA die Behandlung mit SBB, die im Vergleich zu anderen Fixativen einen zusätzlichen Behandlungsschritt darstellte. Daher wäre die Nutzung von PFA zur Vorfixierung hier nicht gerechtfertigt gewesen.

5.2.4 Etablierung der Gewebsblockierung

Bei der Färbung mit Antikörpern muss unterschieden werden, ob es sich um eine spezifische Färbung handelt und die Zielstruktur gebunden wurde oder ob die Antikörper mit anderen Epitopen bzw. unspezifisch an Fc-Rezeptoren von Antikörpern kreuzreagiert haben. Um die Gefahr der Kreuzreaktion und der damit verbundenen unspezifischen Färbung zu minimieren, wurde das Gewebe vorab eine Stunde mit der jeweiligen Blockierungslösung behandelt. Dadurch sollten unspezifische Bindungsstellen abgesättigt und so die Zahl unspezifischer Färbungen gesenkt werden. In der Literatur wird üblicherweise entweder das Serum der Spezies, des Sekundärantikörpers oder Bovines Serum Albumin (BSA) gewählt. Im Rahmen der Etablierung des Färbeprozesses wurden die Blockierungsmittel auf ihre Wirksamkeit getestet und miteinander verglichen. Es wurde eine Kontrollfärbung durchgeführt, bei der das Gewebe ohne Blockierung gefärbt wurde. Abbildung 5.8 zeigt den Vergleich zwischen den verschiedenen Blockierungsmitteln. Dabei ist in beiden Abbildungen weder beim Ziegenblut-Serum (NGS), noch beim Eselblut-Serum (NDS) eine Veränderung der MFI im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen.

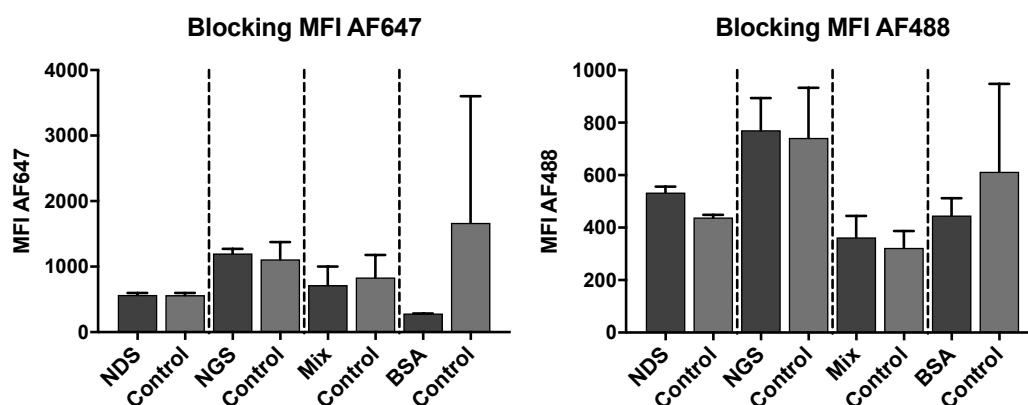


Abbildung 5.8 Vergleich verschiedener Lösungen nach Wirksamkeit der Blockierung des Glioblastomgewebes anhand der MFI. NDS und NGS zeigten weder isoliert noch in der Mischung einen wesentlichen Einfluss auf die MFI. BSA zeigte eine Reduktion der MFI. A = Wirkung im AF488-Kanal; B = Wirkung im AF647-Kanal. NDS = Ziegenblut-Serum; NGS = Eselblut-Serum; Mix = 1:1 Mischung aus NGS und NDS; BSA = Bovines Serum Albumin

Zum Teil gab es sogar höhere Fluoreszenzintensitäten als bei der Kontrollfärbung. Auch die Mischung der beiden Seren änderte die Fluoreszenzintensität nicht. Einzig das BSA zeigt einen Unterschied zur Kontrollfärbung ohne Blockierung. Hier war die Fluoreszenzintensität geringer als bei der Kontrolle. Die Ergebnisse der Etablierungsverfahren sind in der **Tabelle 5.3** zusammengefasst.

Tabelle 5.3 Zusammenfassung der wichtigsten Erkenntnisse der Etablierungsversuche.

	Empfehlung	Keine Empfehlung
Objektträger	Superfrost Plus	Superfrost
Einbettmedium	Tissue Tek (Sakura, Finetek)	Cryo-Gel (Leica, Surgipath)
Fixierungsmittel	Aceton, PFA	Vorfixierung: Aceton, PFA
Mounting-Medium	Mounting Medium (Thermo Fisher)	Mounting Medium (Ibidi)

5.3 Intratumorale Heterogenität im Glioblastom

Auf Grundlage der unterschiedlichen Expression der Antigene in der Vergleichsanalyse zwischen FACS und IHC wurden nun in unterschiedlichen Arealen innerhalb eines Glioblastoms die intratumorale Heterogenität untersucht. Hierfür wurden intraoperativ Proben aus bis zu sechs definierten Tumorarealen entnommen und mittels Immunfluoreszenz untersucht.

5.3.1 Expressionsstärke der Antigene

Wie in 4.7.1 beschrieben, wurden zunächst alle Zellen in einem Schnitt über die Zellkernfärbung DAPI identifiziert. Anschließend wurde für jeden Zellkern eine umgebende Region definiert, in der die Antigenfärbung zu erwarten wäre. Die daraus gemessenen Fluoreszenzintensitäten ergaben die Grundlage für die Quantifizierung der IF-Färbung. In Abbildung 5.9 wurden die FC der MFI auf der y-Achse für jeden Patienten und die dazugehörigen Areale übereinander aufgetragen. Von $n = 11$ Patienten wurden $n = 42$ Proben berücksichtigt.

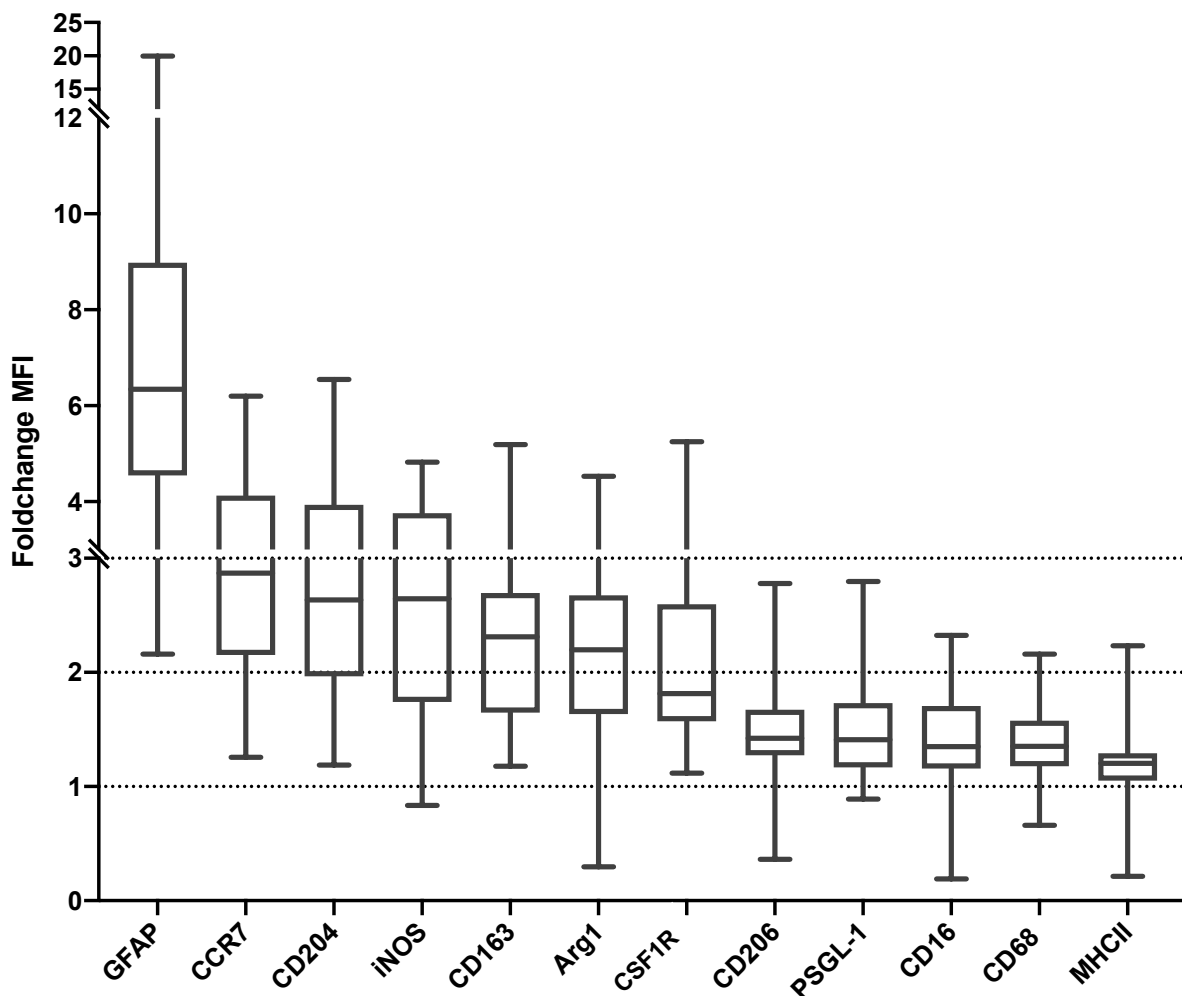


Abbildung 5.9 Quantitative Darstellung der Antigenexpression. Die Auswertung der n = 42 Patientenproben erfolgte anhand von *Harmony 4.9*. Membranfärbungen um oder unter dem Zellkern wurden gemessen und als MFI ausgegeben. Die MFI-Werte wurden normiert auf die mitgeführte Negativ-Kontrolle, bei der der primäre Antikörper weggelassen wurde. Die Antigene sind von links nach rechts abfallend nach Expressionsstärke dargestellt.

In der Boxplot-Darstellung (Abbildung 5.9) wird auf der linken Seite der am stärksten exprimierte Studienmarker dargestellt. GFAP hatte als Tumormarker mit einem medianen FC von 6,3 und einer Spannweite von 2,1 bis 19,9 die höchste Expression über alle Färbungen hinweg. Das bedeutete im Schnitt eine ca. 6,3-fach höhere Fluoreszenzintensität gegenüber der Negativ-Kontrolle. Die weiteren Studienmarker wurden von links nach rechts abfallend anhand ihrer Expressionsstärke aufgetragen. Eine mittlere Expressionsstärke zeigte sich vergleichsweise für CCR7, CD204, Arg1, iNOS, CD163 und CSF1R. Die medianen FC-Werte gegenüber der Kontrollfärbung reichten hier von 1,8 bis 2,8. Zu der letzten Gruppe gehörten MHC-II, CD16, CD206, CD68 und PSGL-1 mit der verhältnismäßig niedrigsten Expressionsstärke. Der mediane FC erstreckte sich von 1,2 bis 1,5. Der Interquartilabstand der Boxes war bei den niedrig exprimierten Antigenen (CD206, PSGL-1, CD16, CD68, MHC-II) bedeutend kleiner als bei den moderat bis stärker exprimierten Antigenen.

5.3.2 Intratumorale Heterogenität der Studienmarker

Neben der Quantifizierung der Studienmarker befasste sich diese Arbeit insbesondere mit der Heterogenität der untersuchten Antigene innerhalb der Tumoren. Bei der Quantifizierung in 5.3.1 (vgl. Abbildung 5.9) konzentrierten sich die Ergebnisse ausschließlich auf die Expressionsstärke, unabhängig davon, aus welcher Tumorregion die Probe stammt. Im folgenden Abschnitt wurde ein Schwerpunkt auf die Unterschiede der Expression hinsichtlich der Tumoreale gelegt. Dabei wurde jeder Studienmarker zur Übersichtlichkeit einzeln dargestellt. Um eine Aussage über die Ausprägung der intratumoralen Heterogenität zu treffen, wurden die Abbildungen in vier Scoringbereiche (S1 bis S4) unterteilt. Lagen Tumoreale im S1- oder S4-Bereich, somit außerhalb der arbiträr gesetzten Grenzen (150/-150), sprach dies für eine stärkere intratumorale Heterogenität und wurde mit 10 Scoringpunkten bewertet. Lagen die Tumoreale in dem S2- oder S3-Bereich, nahe dem Mittelwert (100/-100), sprach dies für eine niedrige intratumorale Heterogenität und wurde mit 5 Scoringpunkten bewertet.

5.3.2.1 PSGL-1

PSGL-1 spielte als Studienmarker aus vorausgehenden Projekten auch in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle. Im Folgenden wird PSGL-1 nach seiner intratumoralen Heterogenität beurteilt. Die Datenerhebung für die Darstellung der intratumoralen Heterogenität erfolgte nach dem in 4.7.3 erläuterten Prinzip. PSGL-1 zeigte, verglichen mit den anderen Antigenen, eine insgesamt niedrige Expression im Glioblastom (Abbildung 5.9). Es stellte sich hingegen eine verhältnismäßig hohe intratumorale Heterogenität dar (Abbildung 5.10). Die ausgeprägte intratumorale Heterogenität ließ sich anhand der Verteilung der gesamten Tumoreale in den vordefinierten Scoringbereichen S1 bis S4 veranschaulichen. Es lagen 58 % aller Tumoreale außerhalb der arbiträren Grenzen (150/-150). Außerdem war die PSGL-1 Expression häufiger reduziert gegenüber dem intratumoralen Mittelwert des zugehörigen Patienten. Verdeutlicht wurde dies durch die stärkere Verteilung der Tumoreale in den S3- und S4-Scoringbereichen (Werte \leq -100). Insbesondere bei Patient 18 fiel eine interessante Verteilung der Tumoreale auf. Die PSGL-1-Expression war in vier der fünf Tumoreale reduziert, in den *medialen* und *kranialen* Tumorealen nur knapp unter dem Mittelwert, in dem *lateralen* und *kaudalen* Tumoreal stärker. Ausschließlich *ventral* zeigte sich eine stark erhöhte PSGL-1-Expression.

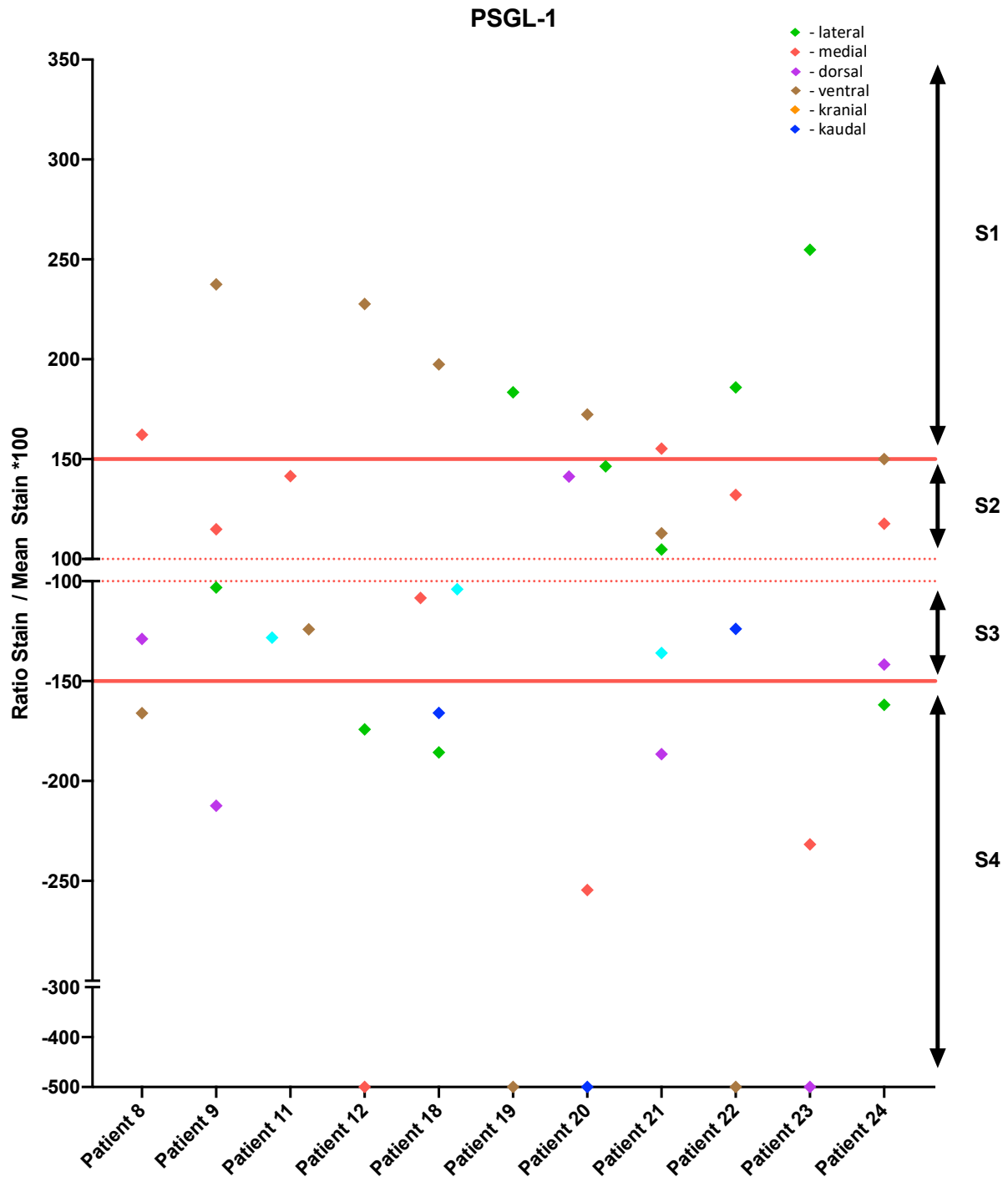


Abbildung 5.10 Intratumorale Heterogenität des Antigens PSGL-1 über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der $n = 11$ Patienten und der $i = 41$ Patientenproben. Bei Patient 8 lateral wurde PSGL-1 nicht gefärbt. Alle zu einem Patienten gehörigen Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung auf die Negativ-Kontrolle und dem normalisierten Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie ($y = 100/-100$); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichgesetzt. Die zwei roten Linien ($y = 150/-150$) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 (S2, S3) oder 10 Punkte (S1, S4) für die Heterogenität vergeben.

Die Abbildung 5.11A zeigt den Ausschnitt einer IF-Färbung mit hoher PSGL-1-Expression. Dem gegenübergestellt ist in Abbildung 5.11B ein Ausschnitt mit verhältnismäßig niedrigerer PSGL-1 Expression.

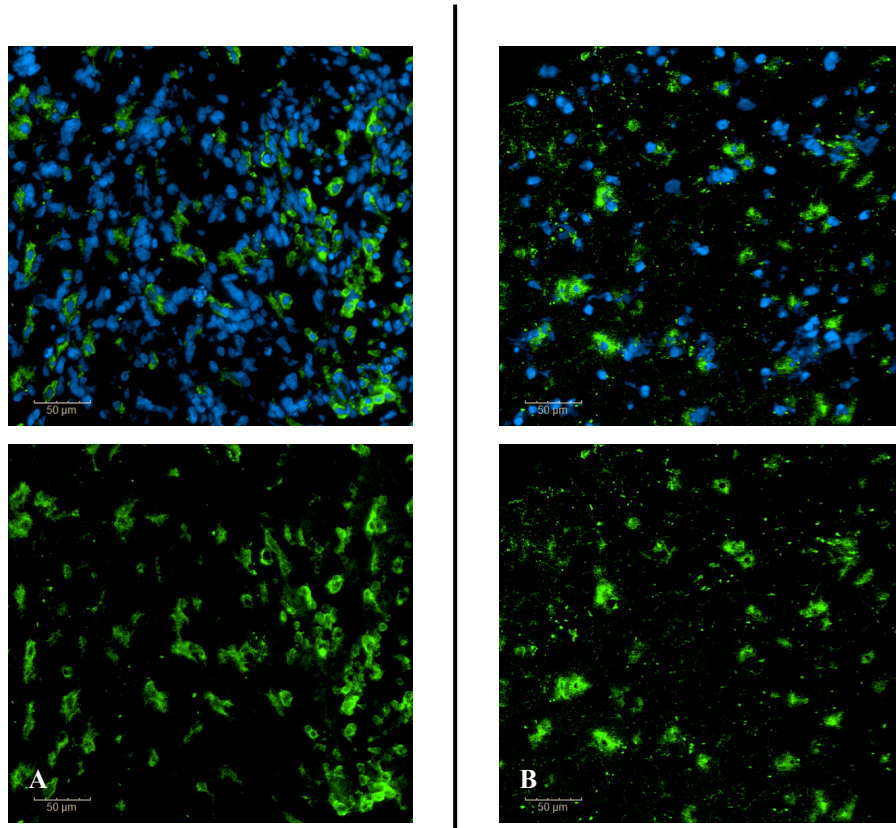


Abbildung 5.11 PSGL-1-Expression bei Patient 12 lateral (A) und Patient 21 dorsal (B) in 20x Vergrößerung. A: medial erhöhte PSGL-1-Expression im AF488-Kanal (grün) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; B: dorsal erniedrigte PSGL-1-Expression im AF488-Kanal oben mit DAPI; unten ohne DAPI; Dazugehörige Negativkontrollen befinden sich im Anhang (Appendix Abb. S4).

5.3.2.2 CD68

Der gut untersuchte Makrophagenmarker CD68 zeigte analog zu PSGL-1 in der Gesamtheit eine niedrige Expression. Die Ermittlung der Daten für die Heterogenitätsdarstellung (Abbildung 5.12) erfolgte nach dem in 4.7.3 erläuterten Prinzip.

Im Hinblick auf die intratumorale Heterogenität wies CD68 eine vergleichsweise höhere intratumorale Heterogenität auf. Es zeigten sich 50 % aller gemessenen Tumorareale außerhalb der arbiträren Grenzen, in den Scoringbereichen S1 und S4. Insgesamt wiesen mehr Tumorareale eine stärkere Expression als im Mittel (24/42 Arealen >100) auf. Zum Beispiel lagen bei Patient 20 fünf Tumorareale als Proben vor. CD68 war in absteigender Reihenfolge in folgenden Bereichen exprimiert: *lateral* > *ventral* und *dorsal* > *medial* (deutlich reduziert) > *kaudal* (nahezu nicht nachweisbar).

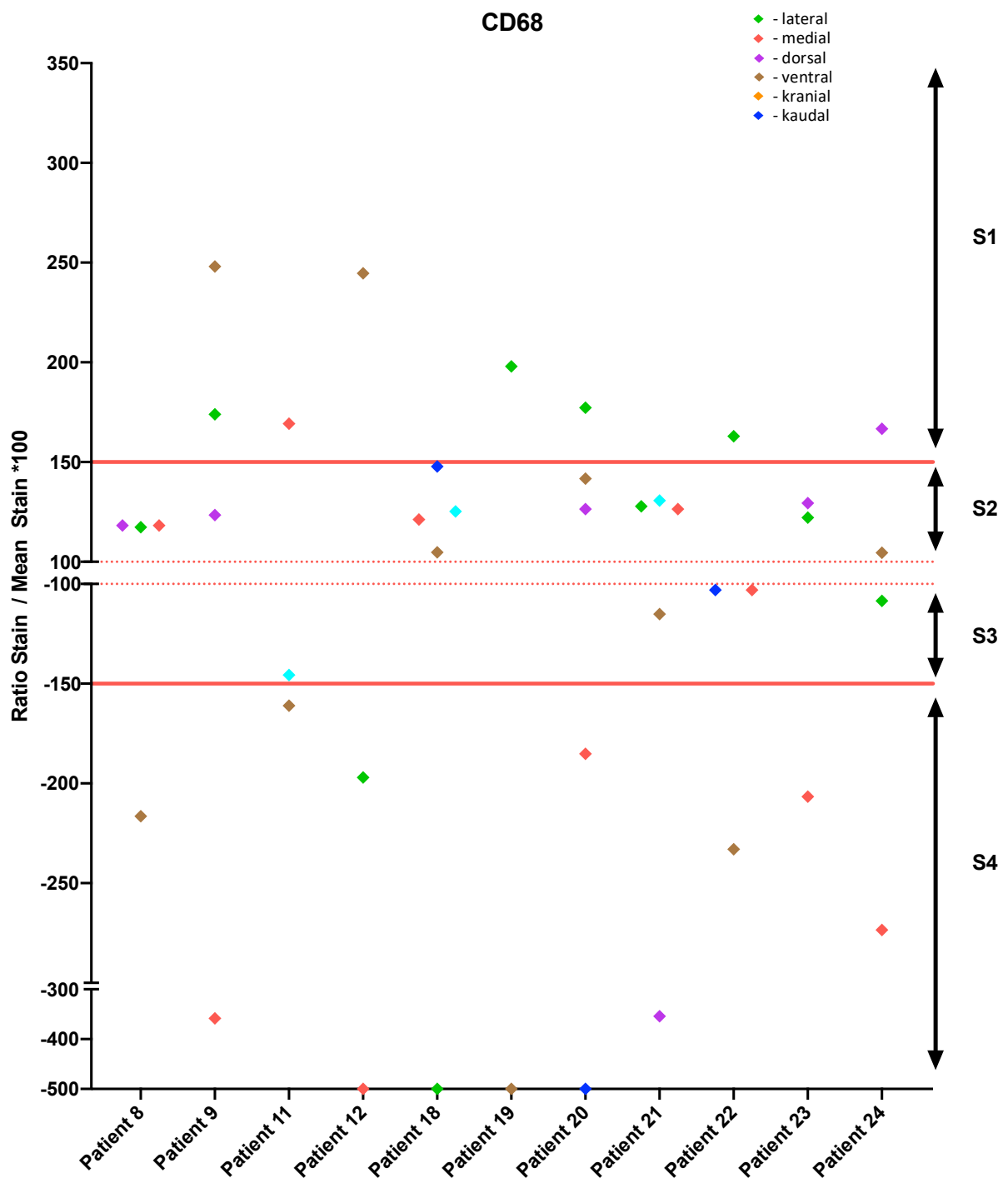


Abbildung 5.12 Intratumorale Heterogenität des Antigens CD68 über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der n = 11 Patienten und der i = 42 Patientenproben. Alle zu einem Patienten gehörigen Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung auf die Negativ-Kontrolle und dem normalisierten Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie ($y = 100/-100$); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichgesetzt. Die zwei roten Linien ($y = 150/-150$) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 (S2, S3) oder 10 Punkte (S1, S4) für die Heterogenität vergeben.

Die intratumorale Heterogenität zeigte interindividuell deutliche Unterschiede. Bei den Patienten 8, 18, 21 und 23 lagen die CD68-Expressionsstärken weitestgehend nahe beieinander. Im Gegensatz dazu wiesen die Patienten 9, 12, 20 und 24 bedeutend größere Unterschiede in den CD68-Expressionsstärken auf. Als Besonderheit zeigte sich in Abbildung 5.13A eine erhöhte CD68-Expression, die palisadenförmig ein Nekrose-Areal umgibt. In diesem Nekrose-Areal befand sich außerdem eine hohe CD204 Expression (Abbildung 5.13B).

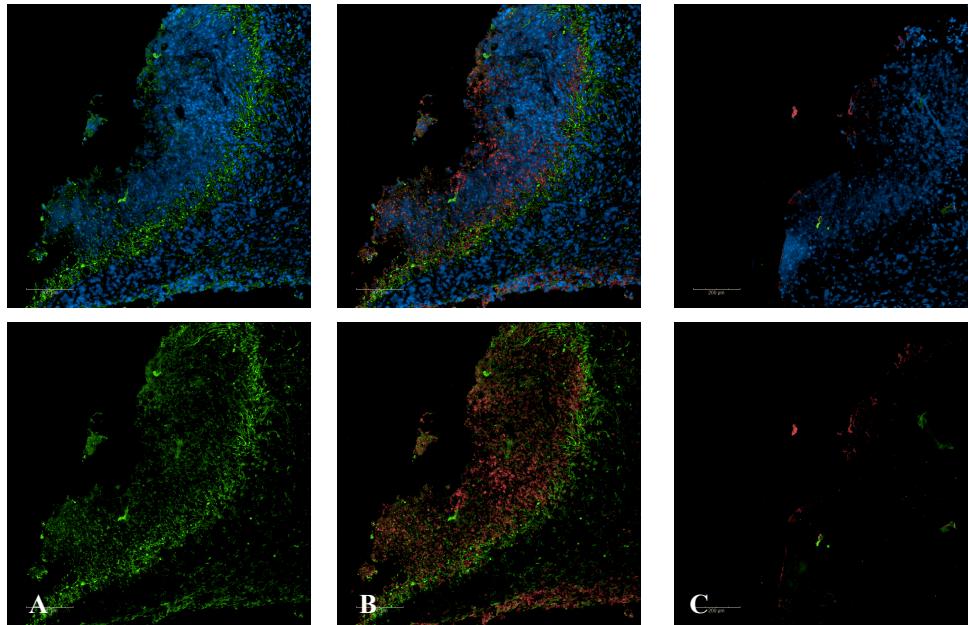


Abbildung 5.13 Palisadenförmige Expression CD68⁺Zellen um ein Nekrose Areal mit CD204-Expression im Patienten 20 lateral. A: palisadenförmige CD68-Expression im AF488-Kanal um ein Areal mit nekrotischen Zellkernen oben mit DAPI, unten ohne; B: Zusammengefügtes Bild aus CD68-(AF488)- und CD204-(AF647)-Koexpression zeigte eine starke CD204-Expression innerhalb des Nekrose Areals. C: Negativ-Kontrolle ohne primär Antikörper.

Die Abbildung 5.14A veranschaulicht einen Ausschnitt der Probe des Patienten 21 (kranial) mit einer hohen CD68 Expression. Dem gegenübergestellt zeigt die Abbildung 5.14B einen Ausschnitt des Patienten 18 (medial) mit einer geringen CD68-Expression. Interessanterweise lag häufig keine vollumfängliche Membranfärbung vor. Die Zellmembranen wurden teilweise nur zur Hälfte angefärbt. Zum Vergleich wurde die Abbildung 5.14C als Negativ-Kontrolle gegenübergestellt.

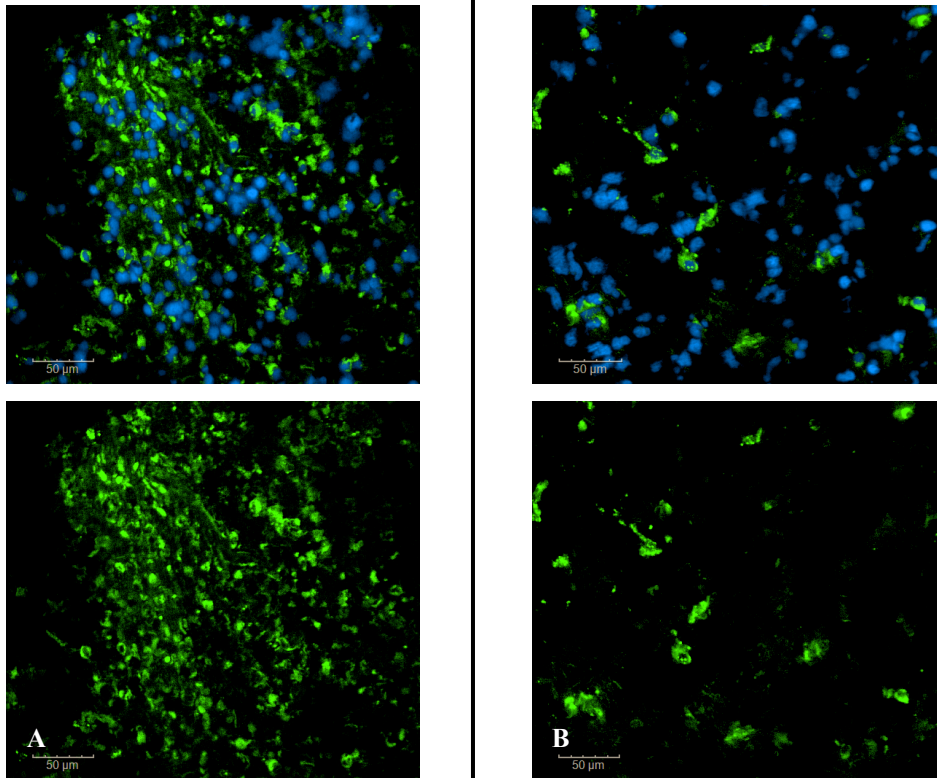


Abbildung 5.14 CD68-Expression bei Patient 21 kranial (A) und Patient 18 medial (B) in 20x Vergrößerung. A: kranial erhöhte CD68-Expression im AF488-Kanal oben mit DAPI; unten ohne DAPI; B: medial erniedrigte CD68-Expression im AF488-Kanal oben mit DAPI; unten ohne DAPI; Dazugehörige Negativkontrollen befinden sich im Anhang (Appendix Abb. S5).

5.3.2.3 CD16

CD16 gehörte zu der Gruppe der Antigene, die eine vergleichsweise niedrige Gesamtexpression zeigten (Abbildung 5.9). Aus denselben Daten wurde nun die Ausprägung der intratumoralen Heterogenität dargestellt. Die Ermittlung der Daten für die Heterogenitätsdarstellung (Abbildung 5.15) erfolgte nach dem in 4.7.3 erläuterten Prinzip. Auch hierbei zeigte sich eine überwiegend reduzierte Expression von CD16. Das war anhand des vermehrten Anteils der Tumorareale im Abschnitt S3 (8/42) und S4 (17/42) erkennbar, von denen sechs Areale auf der x-Achse lagen. Von den restlichen 17 Arealen verteilten sich 11/42 im S1- und 6/42 im S2-Abschnitt. Aufgrund des überwiegend hohen Anteils der Tumorareale in den Abschnitten S1 und S4 (28/42), in denen 10 Scorepunkte für die Heterogenität vergeben wurden, konnte hier von einer ausgesprochen starken Heterogenität des Antigens ausgegangen werden.

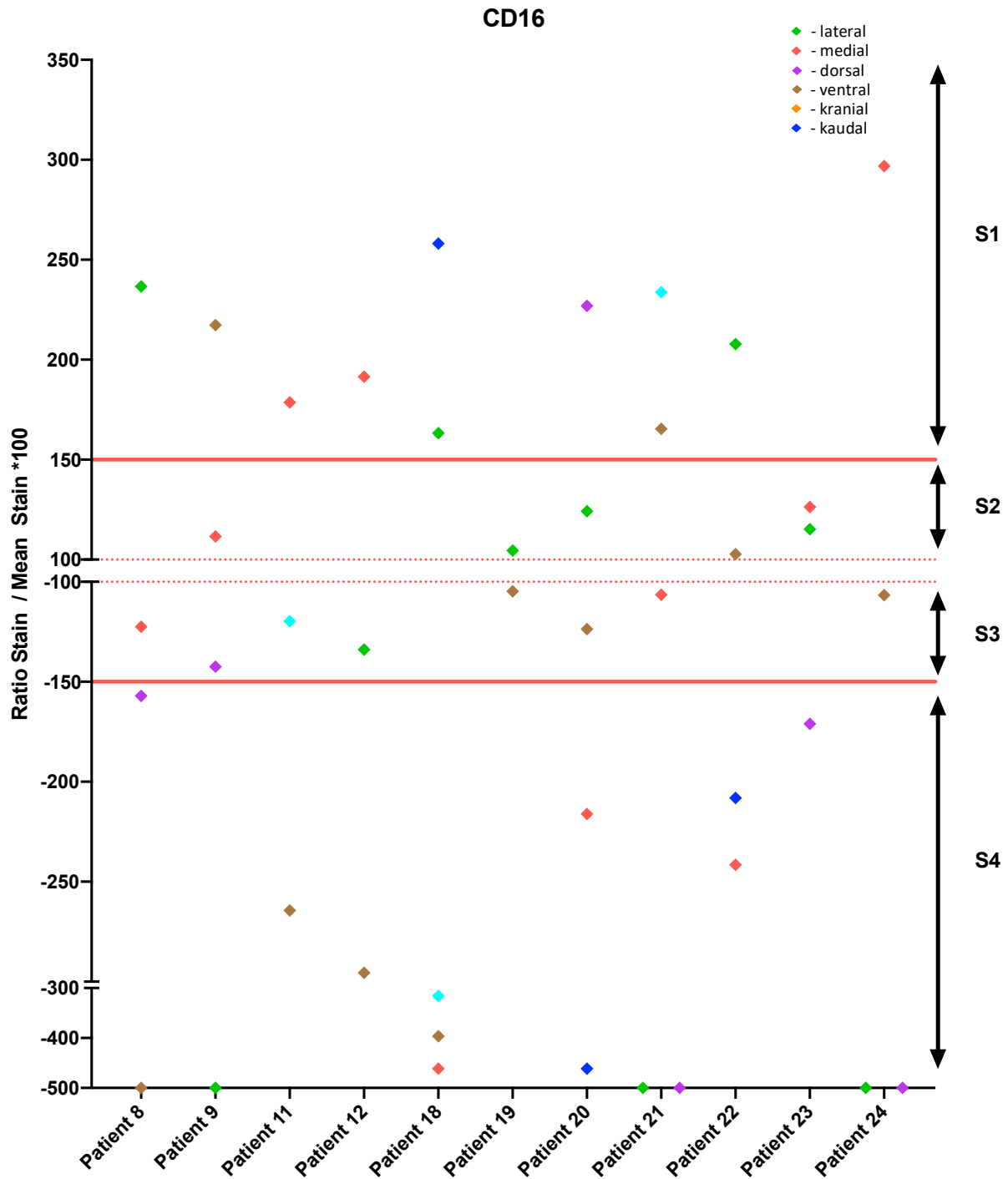


Abbildung 5.15 Intratumorale Heterogenität des Antigens CD16 über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der n = 11 Patienten und der i = 42 Patientenproben. Alle zu einem Patienten gehörigen Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung auf die Negativ-Kontrolle und dem normalisierten Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie ($y = 100/-100$); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichgesetzt. Die zwei roten Linien ($y = 150/-150$) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 (S2, S3) oder 10 Punkte (S1, S4) für die Heterogenität vergeben.

Beispielsweise an den vorliegenden intratumoralen Verhältnissen des Patienten 18 zeigte sich, dass die Expression von CD16 enorm vom Mittelwert abweicht. In allen fünf Arealen lag entweder eine starke Überexpression (kaudal und lateral) oder eine reduzierte Expression (medial, kaudal und ventral) des Antigens vor. Neben der niedrigen Gesamtexpression wies CD16 eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität auf. In der Abbildung 5.16A wird ein Ausschnitt des Patienten 22 (lateral) mit einem verhältnismäßig hohen Anteil CD16-positiver Zellen veranschaulicht. Im Gegensatz dazu zeigte das mediale Tumorareal des Patienten 22 eine deutlich niedrigere CD16-Expression (Abbildung 5.16B).

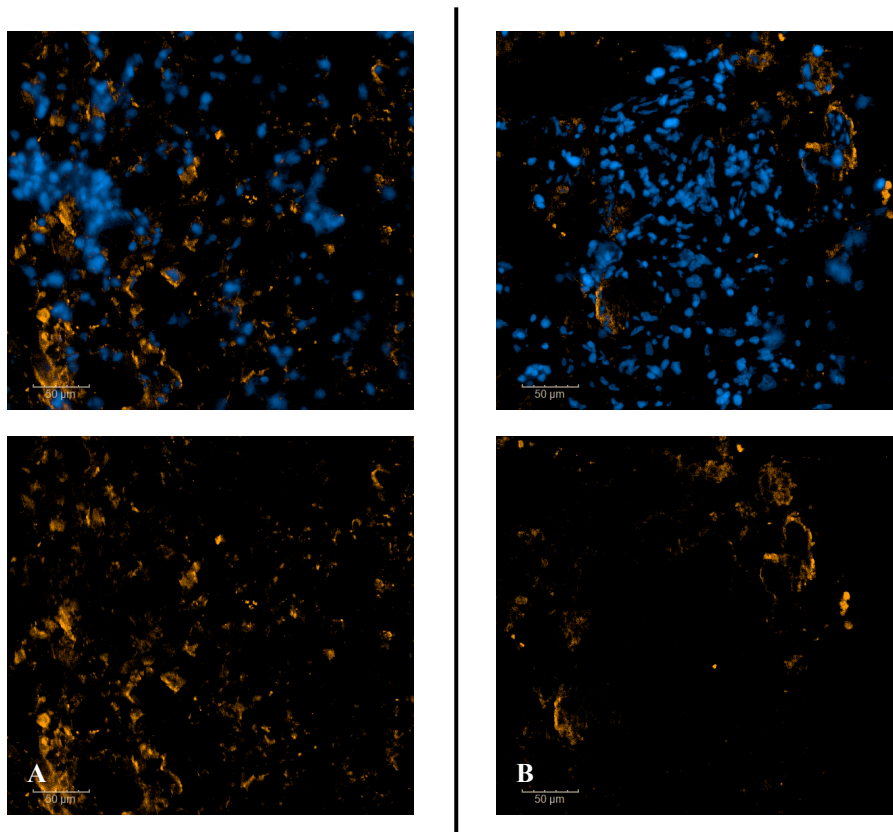


Abbildung 5.16 CD16-Expression bei Patient 22 lateral (A) und medial (B) in 20x Vergrößerung. A: medial erhöhte CD16-Expression im AF594-Kanal (orange) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; B: medial erniedrigte CD16-Expression im AF594-Kanal (orange) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; Dazugehörige negative Kontrolle, ohne Primärantikörper, befinden sich im Anhang (Appendix Abb. S6).

5.3.2.4 MHC-II

MHC-II hatte in der Gesamtübersicht aller Antigene die niedrigste Expression aufzuweisen (Abbildung 5.9). Die Datenerhebung für die Darstellung der intratumoralen Heterogenität erfolgte nach dem in 4.7.3 erläuterten Prinzip (Abbildung 5.17). Bei der Distribution der Tumorareale auf die Scoringbereiche S1 - S4 stellte sich bei MHC-II das häufigste Vorkommen im S4-Bereich dar. Von diesen 14 Patientenarealen lagen 50 % auf der x-Achse. Es konnte hierbei davon

ausgegangen werden, dass die Expression im Vergleich zum Mittelwert sehr niedrig war. Verhältnismäßig wenige Areale lagen im S3-Bereich mit einer leichten Reduktion der MHC-II Expression. Ein Areal lag dabei auf dem Mittelwert. Bei der Überexpression des MHC-II ließ sich feststellen, dass mit 11 Patientenarealen etwas häufiger eine mäßige Erhöhung der MHC-II Expression resultierte. Die restlichen neun Areale im S1-Bereich zeigten eine deutlich stärkere Heterogenität. Demzufolge war MHC-II insgesamt etwas häufiger in der Expression gegenüber dem Mittelwert reduziert. Die MHC-II-Expression wies eine stark ausgeprägte intratumorale Heterogenität auf. Innerhalb eines Patienten lagen die MHC-II-Expressionsstärken zumeist weit voneinander entfernt. Hinweisgebend dafür war u.a die Betrachtung der Verteilung der Probenareale in den Scoringbereichen S2/S3 und S1/S4. Nur 19 Probenareale lagen im S2/S3-Scoringbereich, wohingegen 23 Areale im S1/S4-Scoringbereich lokalisiert waren. Patient 21 stellte eher eine Ausnahme für eine geringe Heterogenitätsausprägung dar. Es zeigte sich bei MHC-II somit die niedrigste Expression unter allen untersuchten Antigenen kombiniert mit einer stark ausgeprägte intratumoralen Heterogenität.

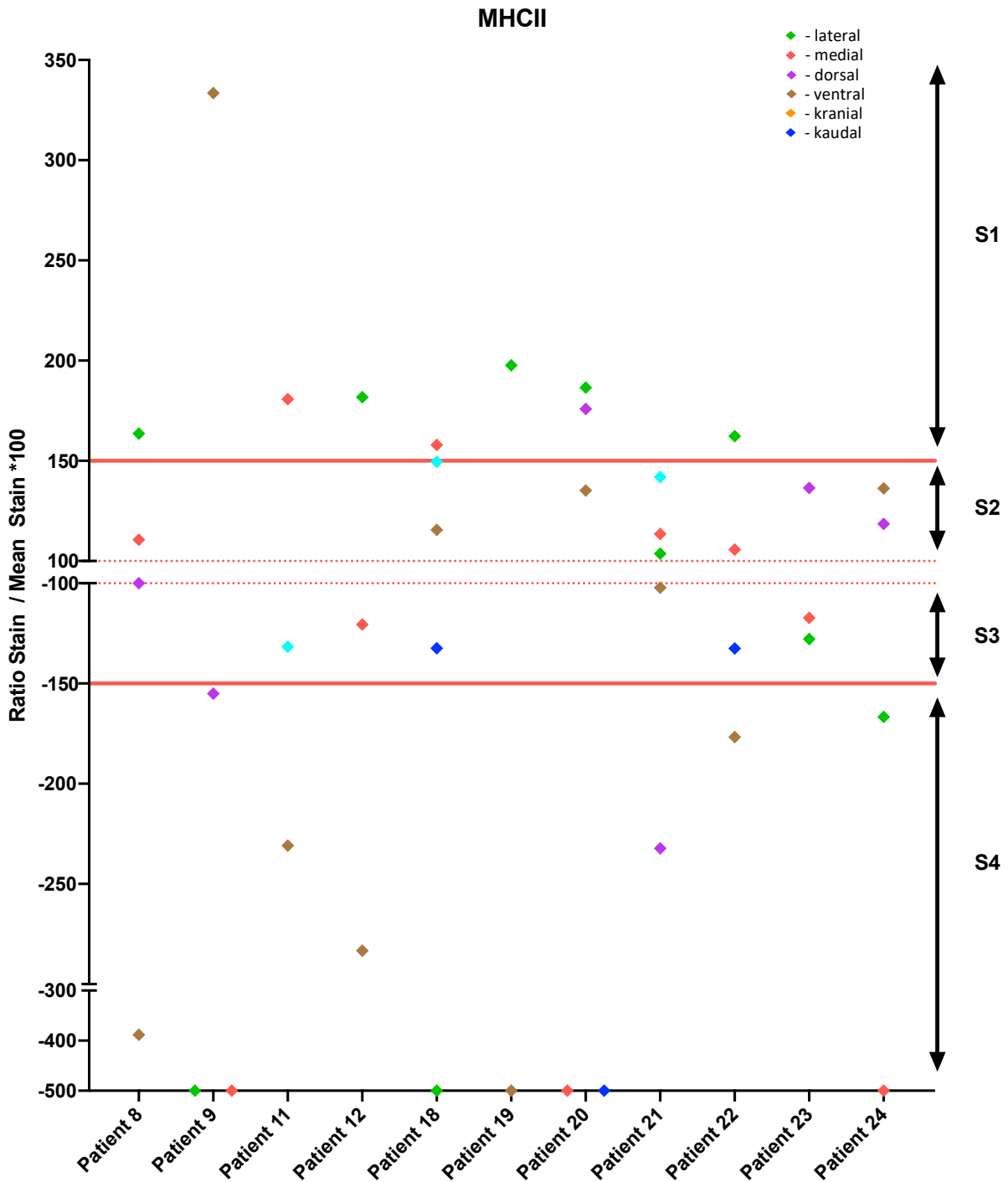


Abbildung 5.17 Intratumorale Heterogenität des Antigens MHC-II über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der n = 11 Patienten und der i = 42 Patientenproben. Alle zu einem Patienten gehörigen Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung auf die Negativ-Kontrolle und dem normalisierten Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie ($y = 100/-100$); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichsetzt. Die zwei roten Linien ($y = 150/-150$) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 (S2, S3) oder 10 Punkte (S1, S4) für die Heterogenität vergeben.

In der Abbildung 5.18 wird ein Areal mit einer erhöhten MHC-II Expression (**A**) einem Areal mit niedriger MHC-II Expression (**B**) gegenübergestellt.

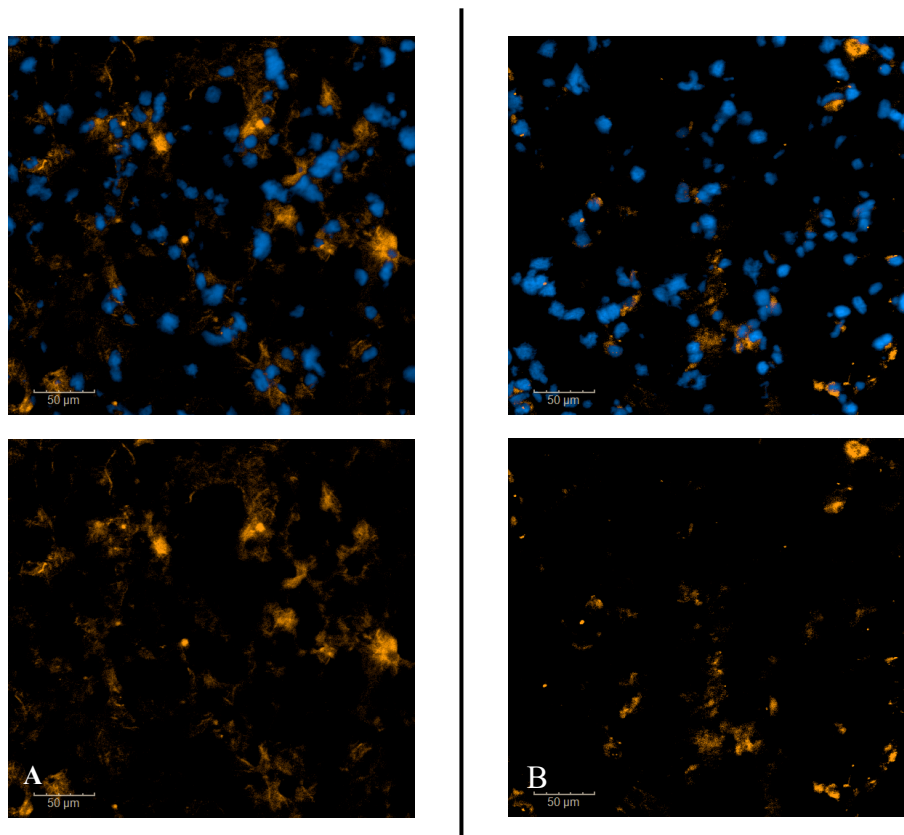


Abbildung 5.18 MHC-II-Expression bei Patient 23 dorsal (A) und Patient 18 medial (B). A: dorsal erhöhte MHC-II-Expression im AF594-Kanal (orange) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; B: medial reduzierte MHC-II-Expression im AF594-Kanal (orange) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; Dazugehörige negative Kontrolle, ohne Primärantikörper, befinden sich im Anhang (Appendix Abb. S7).

5.3.2.5 CD206

Für die Darstellung der intratumoralen Heterogenität des Antigens CD206 (Abbildung 5.19), wurde die gleiche Berechnung vorgenommen wie unter 4.7.3 erläutert. CD206 gehörte zu den Antigenen mit einer niedrigen Expression im Glioblastom (Abbildung 5.9).

Hierbei fällt besonders auf, dass mehr Punkte in den Bereich S4 (11 Datenpunkte), als in den Bereich S1 (8 Datenpunkte) fielen (Abbildung 5.19). Insgesamt war CD206 somit in der Expression häufiger reduziert als erhöht. In den Bereichen S2 und S3 bestand ein ausgeglichenes Verhältnis.

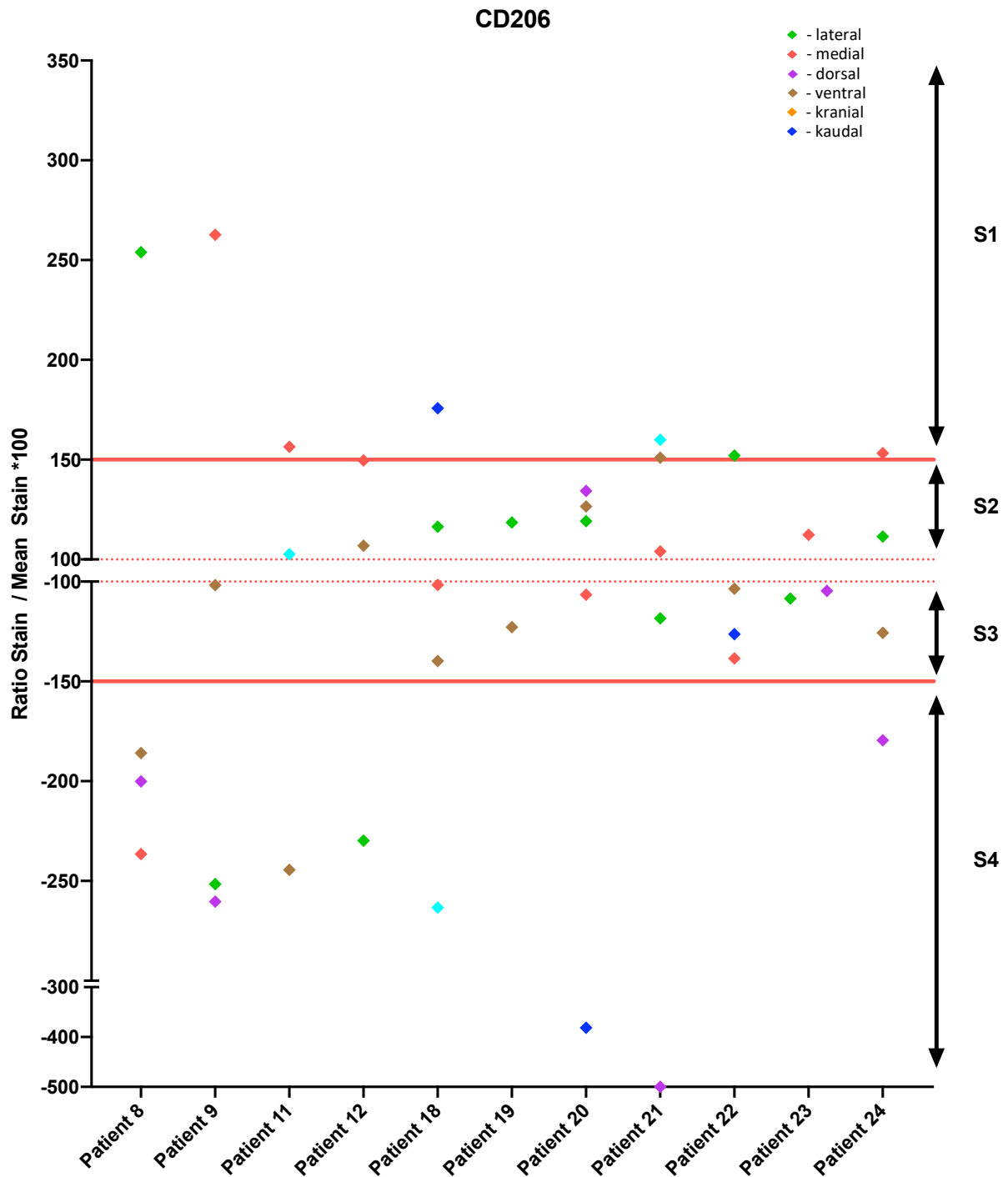


Abbildung 5.19 Intratumorale Heterogenität des Antigens CD206 über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der $n = 11$ Patienten und der $i = 42$ Patientenproben. Alle zu einem Patienten gehörigen Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung auf die Negativ-Kontrolle und dem normalisierten Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie ($y = 100/-100$); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichsetzt. Die zwei roten Linien ($y = 150/-150$) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 (S2, S3) oder 10 Punkte (S1, S4) für die Heterogenität vergeben.

Durch das häufigere Vorkommen der Tumorareale innerhalb der Scoringbereiche S2 und S3 war hier von einer moderaten intratumoralen Heterogenität auszugehen. In der **Abbildung 5.20** werden beispielhaft links (A) eine gesteigerte und rechts (B) eine reduzierte CD206-Expression dargestellt. Wird die Verteilung der Tumorareale innerhalb eines Patienten betrachtet gab es zwei Auffälligkeiten. Bei Patient 8 waren 75 % der Areale in ihrer Expression niedriger als im Durchschnitt und lagen im S4-Bereich. Ausschließlich lateral war eine hohe CD206-Expression vorzufinden. Ein ähnliches 3:1-Verhältnis spiegelte sich bei Patient 22 wider. Hier waren die Relationen zueinander viel geringer ausgeprägt. Zusammenfassend zeigte sich bei CD206 eine niedrige bis moderate Gesamtexpression und eine moderate intratumorale Heterogenität.

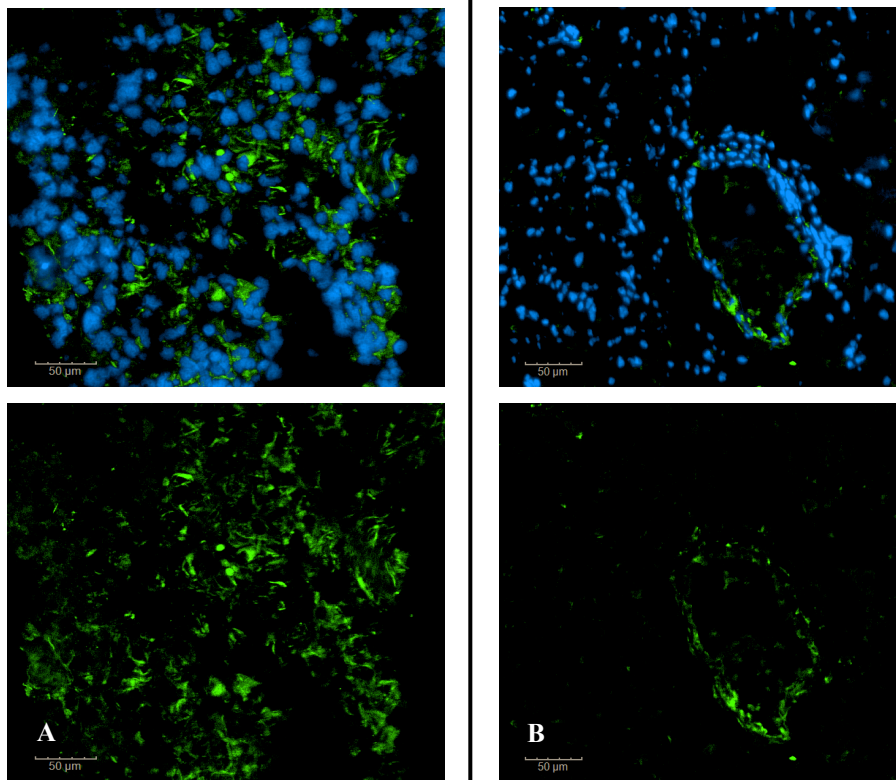


Abbildung 5.20 CD206-Expression bei Patient 9 medial (A) und Patient 8 medial (B) in 20x Vergrößerung. A: medial erhöhte CD206-Expression im AF488-Kanal (grün) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; B: medial erniedrigte CD206-Expression im AF488 Kanal (grün) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; dazugehörige negative Kontrolle ohne Primärantikörper befinden sich im Anhang (Appendix Abb. S8).

5.3.2.6 Colony Stimulating Factor-1 Receptor (CSF1R)

CSF1R zeigte in der Gesamtübersicht der Antigenexpressionen eine moderate Expressionsstärke (Abbildung 5.9). Im Folgenden wurde die intratumorale Heterogenität des Antigens untersucht. Die Datenerhebung für die Darstellung der intratumoralen Heterogenität erfolgte nach dem in 4.7.3 erläuterten Prinzip (Abbildung 5.21). Insgesamt waren mehr

Datenpunkte im Vergleich zum Mittelwert reduziert exprimiert. 22 Tumorareale lagen unter dem Mittelwert und 19 Tumorareale über dem Mittelwert. Aufgetrennt nach Scoringbereichen lagen die meisten Tumorareale (je 13) im S2- und S3-Bereich und zeigten somit eine geringe Abweichung der Expressionsstärke vom Mittelwert. Von den neun Tumorarealen, die im S4-Bereich lagen, befand sich ein Tumorareal auf der x-Achse. In diesem Tumorareal des Patienten 21 war die CSF1R-Expression im Vergleich zum Mittelwert sehr gering. Insgesamt ließ sich feststellen, dass CSF1R analog zu CD206 eine moderate Heterogenität aufwies, da die Mehrheit der Tumorareale innerhalb der arbiträren Grenzen um den Mittelwert lag (26/42). Zwischen den Patienten zeigten sich interindividuelle Unterschiede. Patient 22 wies in 75 % der Tumorareale eine reduzierte CSF1R-Expression auf. Im Gegensatz dazu wies Patient 24 in 75 % der Tumorarealen eine erhöhte CSF1R-Expression auf.

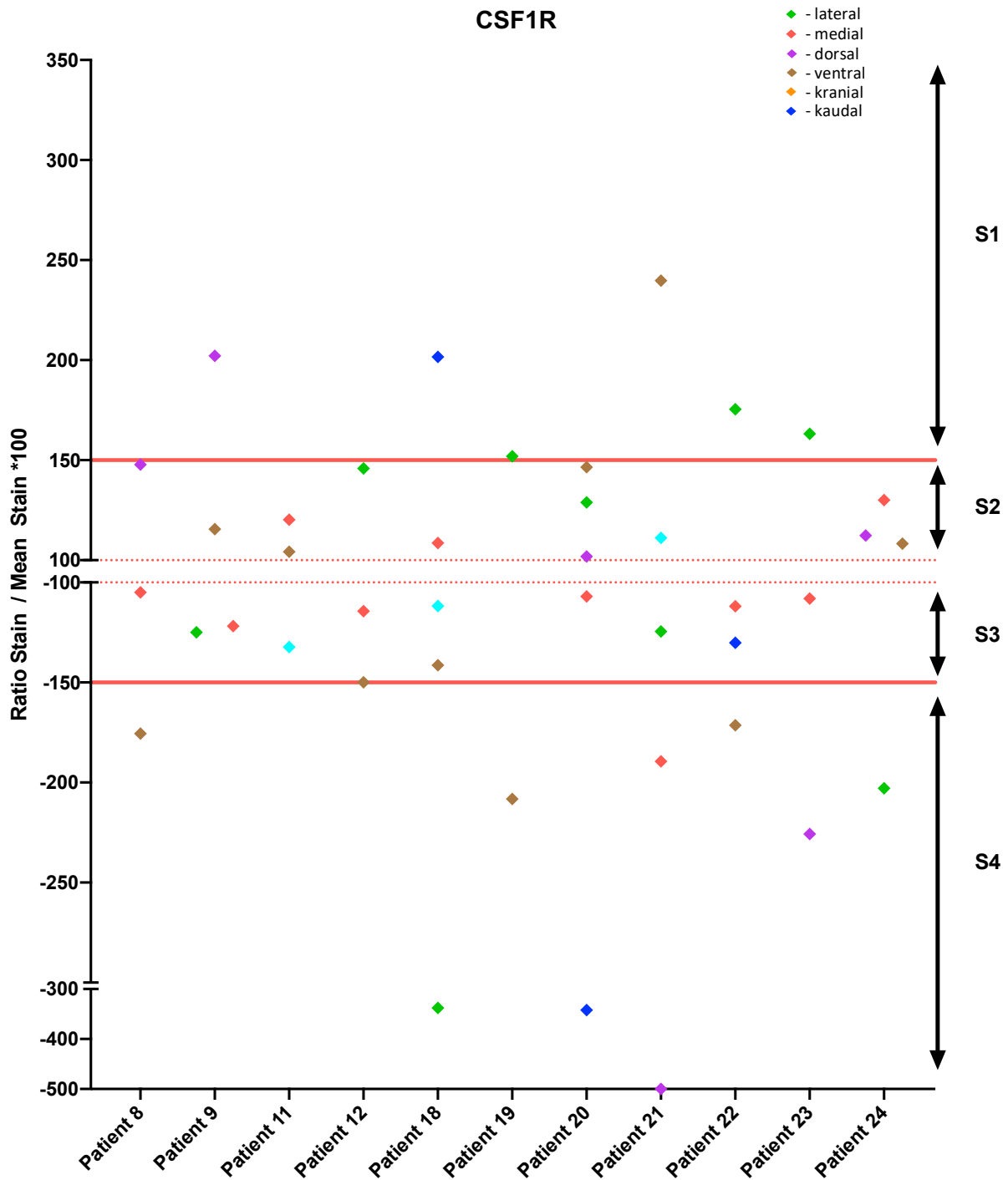


Abbildung 5.21 Intratumorale Heterogenität des Antigens CSF1R über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der n = 11 Patienten und der i = 41 Patientenproben. Bei Patient 8 lateral wurde CSF1R nicht gefärbt. Alle zu einem Patienten gehörigen Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung auf die Negativ-Kontrolle und dem normalisierten Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie ($y = 100/-100$); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichgesetzt. Die zwei roten Linien ($y = 150/-150$) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 (S2, S3) oder 10 Punkte (S1, S4) für die Heterogenität vergeben.

In der Abbildung 5.22A wird der Ausschnitt des Patienten 18 (kaudal) einer erhöhten CSF1R-Expression gezeigt. Eine wesentlich geringere Intensität stellte sich im Ausschnitt der Abbildung 5.22B des Patienten 18 (ventral) dar.

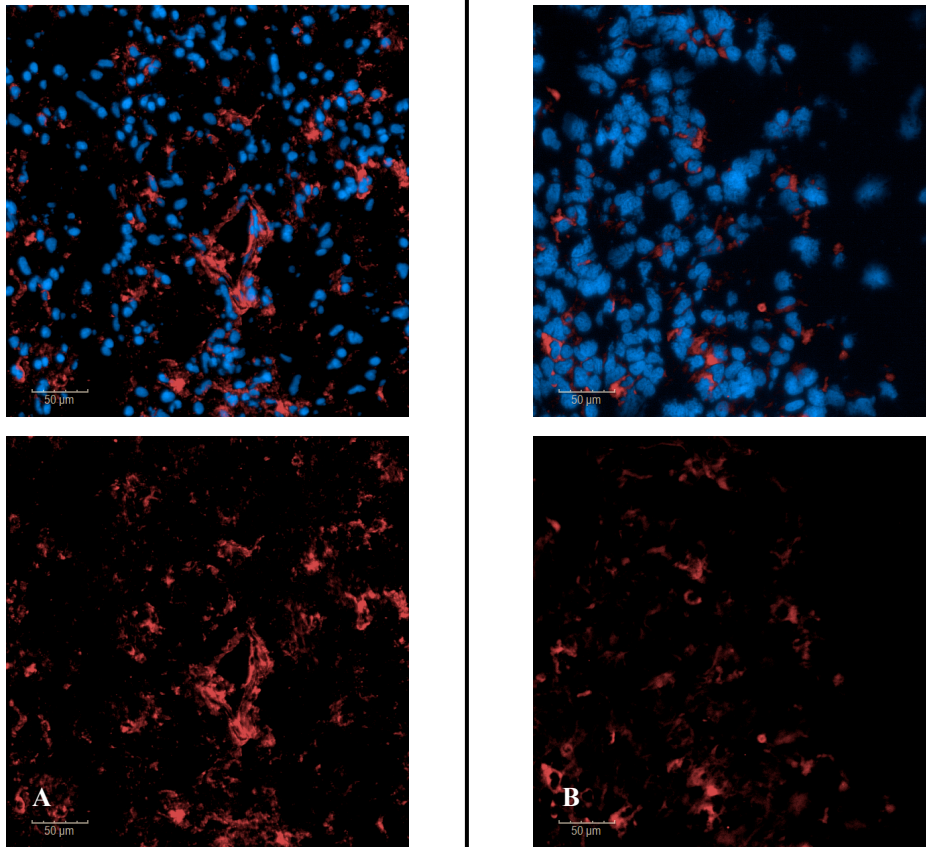


Abbildung 5.22 CSF1R-Expression bei Patient 18 kaudal (A) und ventral (B) in 20x Vergrößerung. A: kaudal erhöhte CSF1R-Expression im AF647-Kanal (rot) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; B: ventral erniedrigte CSF1R-Expression im AF647-Kanal oben mit DAPI; unten ohne DAPI; Dazugehörige Negativ-Kontrollen befinden sich im Anhang (Appendix Abb. S9).

5.3.2.7 CD163

CD163 zeigte eine moderate Expression in den IF-Färbungen im Glioblastom (Abbildung 5.9). Die Datenerhebung für die Darstellung der intratumoralen Heterogenität erfolgte nach dem in 4.7.3 erläuterten Prinzip. Bei CD163 wies eine moderate Ausprägung der intratumoralen Heterogenität auf (**Abbildung 5.23**). Weniger als die Hälfte (18/42) aller Tumorproben lagen außerhalb der arbiträren Grenzen. Je 21 Proben befanden sich bezüglich ihrer Expressionsstärke über bzw. unter dem Mittelwert. Die intratumorale Heterogenität war interindividuell unterschiedlich stark ausgeprägt. Eine deutliche intratumorale Heterogenität zeigten z.B. Patienten 21 und 22. Im Gegensatz dazu war die intratumorale Heterogenität bei den Patienten 11 und 24 gering ausgeprägt. CD163 zeigte somit eine moderat-hohe Gesamtexpressionsstärke und eine moderat-niedrige intratumorale Heterogenität.

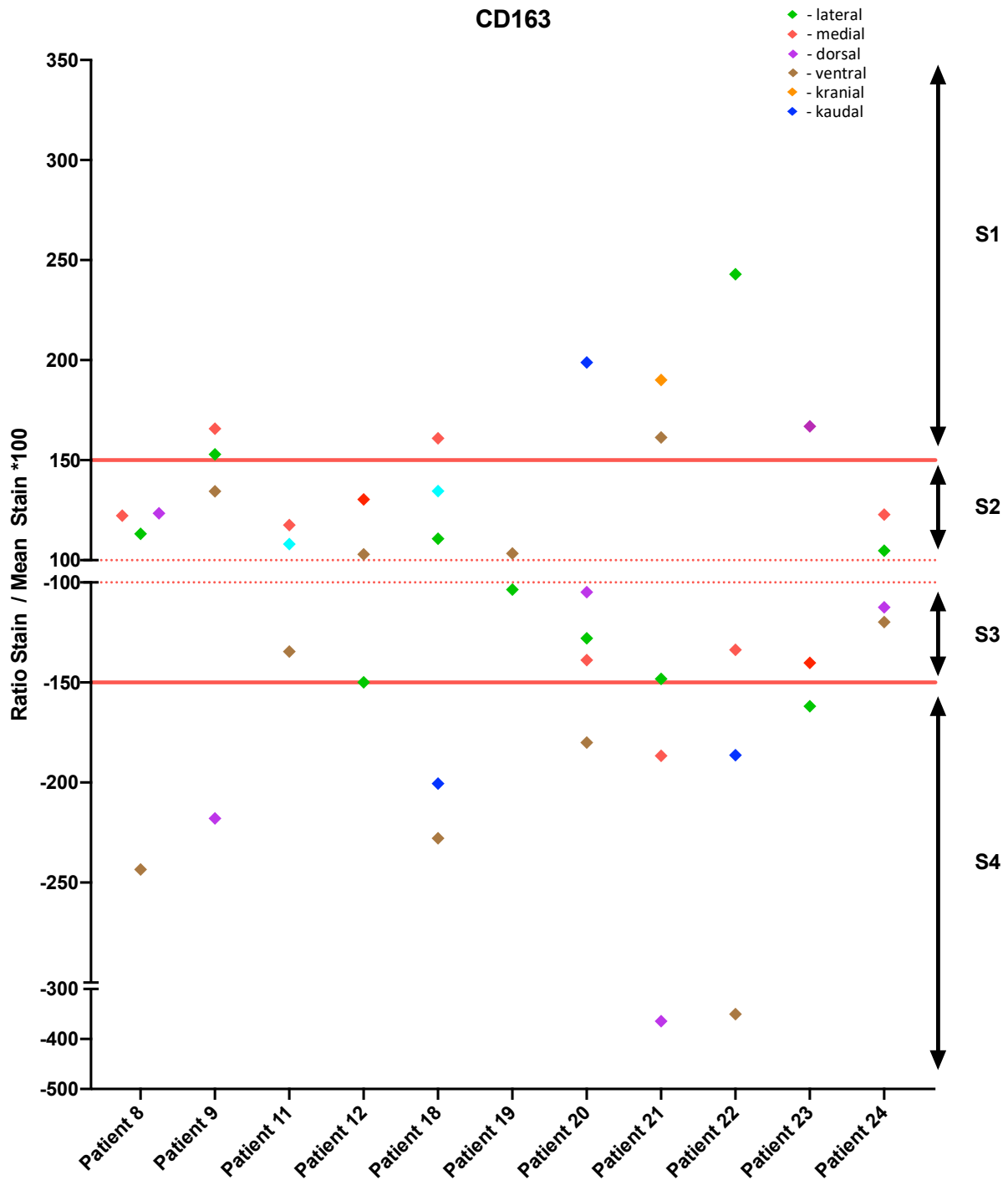


Abbildung 5.23 Intratumorale Heterogenität des Antigens CD163 über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der n = 11 Patienten und der i = 42 Patientenproben. Alle zu einem Patienten gehörigen Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung auf die Negativ-Kontrolle und dem normalisierten Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie (y = 100/-100); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichsetzt. Die zwei roten Linien (y = 150/-150) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 (S2, S3) oder 10 Punkte (S1, S4) für die Heterogenität vergeben.

Die Abbildung 5.24A zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus der Probe des Patienten 20 (lateral). Die Abbildung illustriert eine gesteigerte CD163-Expression. Dem gegenübergestellt spiegelt die Abbildung 5.24B mit einem Bildausschnitt des Patienten 11 medial eine reduzierte CD163-Expression wider.

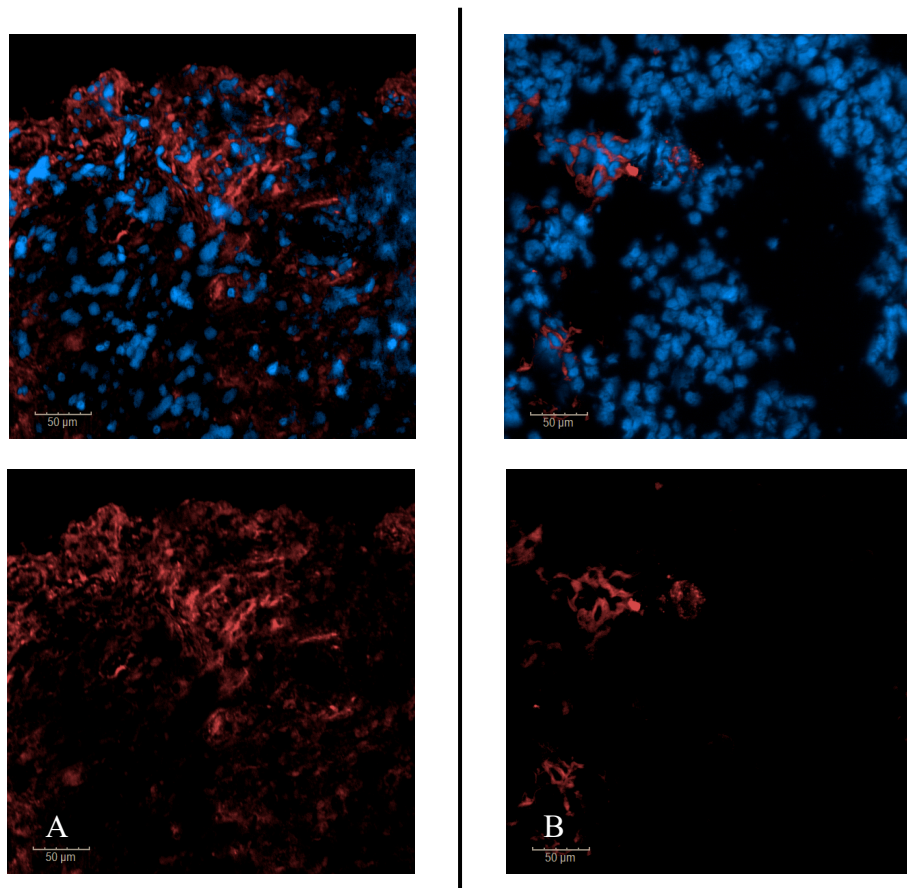


Abbildung 5.24 CD163-Expression bei Patient 20 lateral (A) und Patient 11 medial (B). A: lateral erhöhte CD163-Expression im AF647-Kanal (rot) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; B: ventral erniedrigte CD163-Expression im AF647-Kanal (rot) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; Die dazugehörige Negativ-Kontrolle, ohne Primärantikörper, befindet sich im Anhang (Appendix Abb. S10).

5.3.2.8 CD204

CD204 hatte in der Gesamtübersicht aller Antigene die drittstärkste Expression aufzuweisen (Abbildung 5.9). Die Datenerhebung für die Darstellung der intratumoralen Heterogenität erfolgte nach dem in 4.7.3 erläuterten Prinzip (Abbildung 5.25).

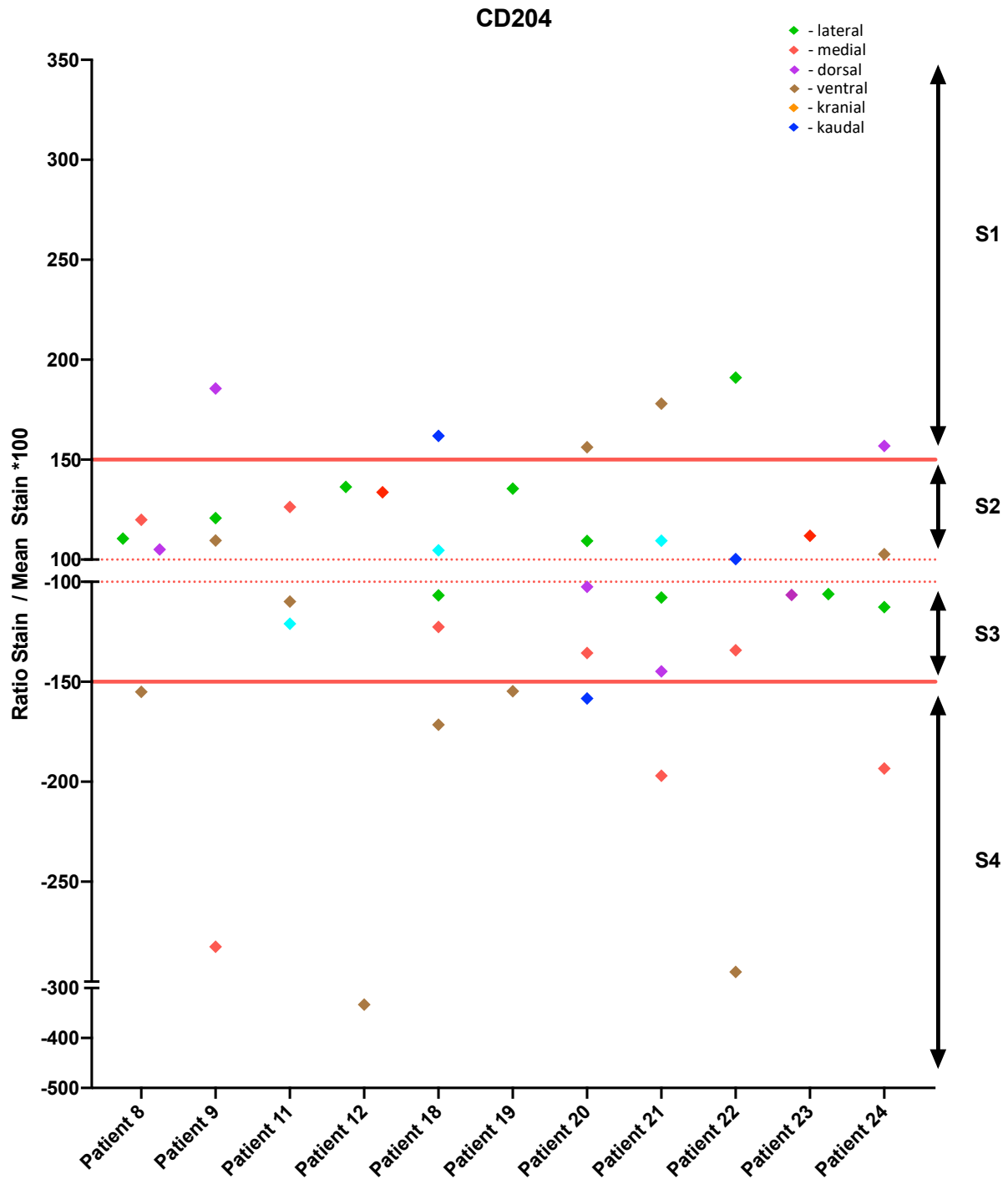


Abbildung 5.25 Intratumorale Heterogenität des Antigens CD204 über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der n = 11 Patienten und der i = 42 Patientenproben. Alle zu einem Patienten gehörigen Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung auf die Negativ-Kontrolle und dem normalisierten Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie ($y = 100/-100$); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichgesetzt. Die zwei roten Linien ($y = 150/-150$) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 (S2, S3) oder 10 Punkte (S1, S4) für die Heterogenität vergeben.

Die Tumorareale der Patienten verteilten sich in ihrer CD204-Expression insgesamt relativ gleichmäßig auf S1, S2 und S3, S4. Je 21 von 42 Arealen waren über bzw. unter dem Mittelwert. Hierbei waren 15 Areale mäßig erhöht und damit in dem Bereich S2. Sechs Areale waren stärker gesteigert in ihrer CD204-Expression (S1). Ähnlich wie bei CD163 befand sich hier kein Areal auf der x-Achse. Es zeigte sich bei CD204 nur eine geringe Ausprägung der intratumoralen Heterogenität. Deutlich mehr als die Hälfte (27 von 42) der Tumorareale waren innerhalb der arbiträren Grenzen im S2/S3-Bereich lokalisiert, wie z.B. an den Proben der Patienten 8, 18, 20 und 23 erkennbar ist. Der Bildausschnitt des Patienten 21 (kranial) (**Abbildung 5.26A**) veranschaulicht eine sehr hohe CD204-Expression. Dabei konnten die CD204⁺ Zellen in verschiedene Expressionsstärken ihrer Färbeintensität unterteilt werden. Im Kontrast dazu stellt **Abbildung 5.26B** einen Ausschnitt des Patienten 20 (kaudal) mit einer stark reduzierten CD204 Expression dar. Häufig lagen die CD204-gefärbten Zellen mit verhältnismäßig kleinen Zellkernen vor.

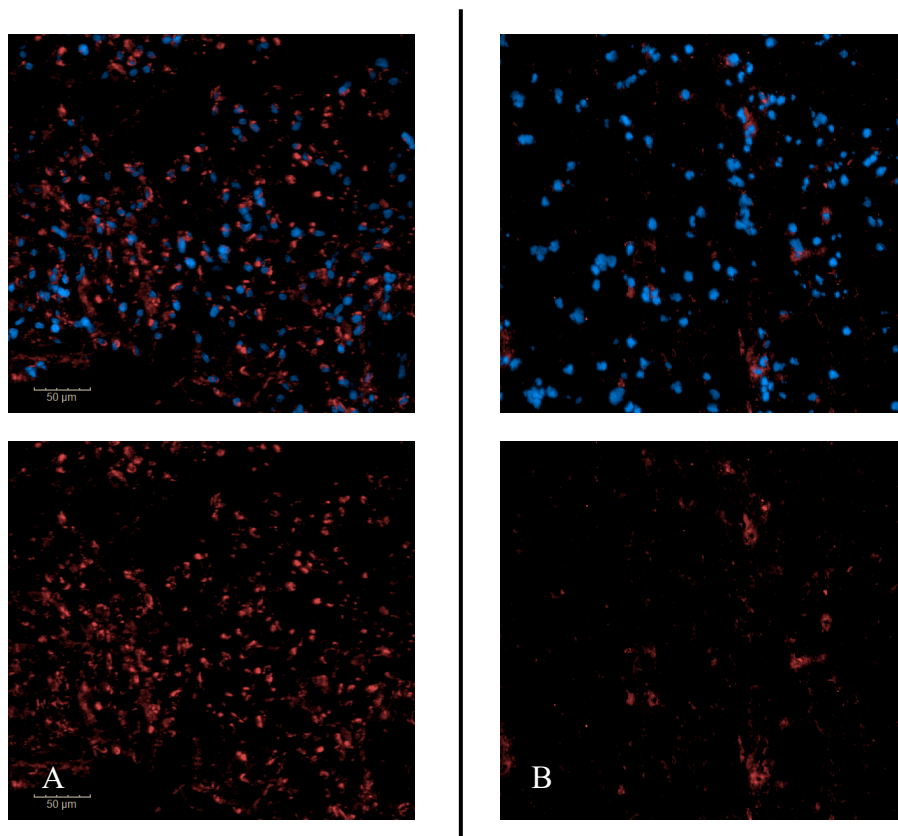


Abbildung 5.26 CD204-Expression bei Patient 21 kranial (A) und Patient 20 kaudal (B). A: kranial erhöhte CD204-Expression im AF647-Kanal (rot) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; B: kaudal erniedrigte CD204-Expression im AF647-Kanal (rot) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; Die dazugehörige Negativ-Kontrolle, ohne Primärantikörper, befindet sich im Anhang (Appendix Abb. S11).

5.3.2.9 CCR7

CCR7 zeigte in der Gesamtübersicht aller Antigene, nach GFAP, die zweitstärkste Expression (Abbildung 5.9). Die Datenerhebung für die Darstellung der intratumoralen Heterogenität erfolgte nach dem in 4.7.3 erläuterten Prinzip (Abbildung 5.27). Die Heterogenitätsdarstellung des Antigens CCR7 zeigt auf den ersten Blick eine ähnliche Verteilung wie schon bei CD163 und CD204. Mit ca. 66 % lag die Mehrheit der Areale in den Bereichen S2 (14 Areale) und S3 (14 Areale), d.h. knapp über bzw. knapp unter dem Mittelwert. 28 der 42 Tumorproben lagen innerhalb der arbiträren Grenzen und spiegeln die insgesamt gering ausgeprägte intratumorale Heterogenität wider. Allerdings gab es auch Ausnahmen, Patient 21 zeigte eine starke intratumorale Heterogenität. Vor dem Hintergrund, dass CCR7 ohnehin das am zweitstärksten exprimierte Antigen in der Quantifizierung war, ließ sich eine konstant hohe Expression mit folglich niedriger Heterogenität schlussfolgern. Es gab neun Patientenareale, bei denen die Expression stark gegenüber dem Mittelwert reduziert war. Eines dieser Areale (Patient 9 - dorsal) lag auf der x-Achse. Hier kann man davon ausgehen, dass CCR7 kaum exprimiert war. In sechs Tumorarealen der Patienten zeigte sich eine stark gesteigerte CCR7-Expression und somit eine Lokalisation im S1-Bereich. Vergleicht man die Patienten 20 und 21, werden Unterschiede in der Heterogenität deutlich. Während bei Patient 20 die CCR7-Expression eher mäßig vom Mittelwert abwich und damit innerhalb der arbiträren Grenzen blieb, zeigten sich starke Unterschiede beim Patienten 21. Hier lagen alle Tumorareale des Patienten in Bezug auf ihre CCR7-Expression weit vom Mittelwert entfernt. Während medial die Expression der CCR7⁺ Zellen gegenüber dem Mittelwert hoch war, waren dorsal kaum CCR7⁺ Zellen nachweisbar.

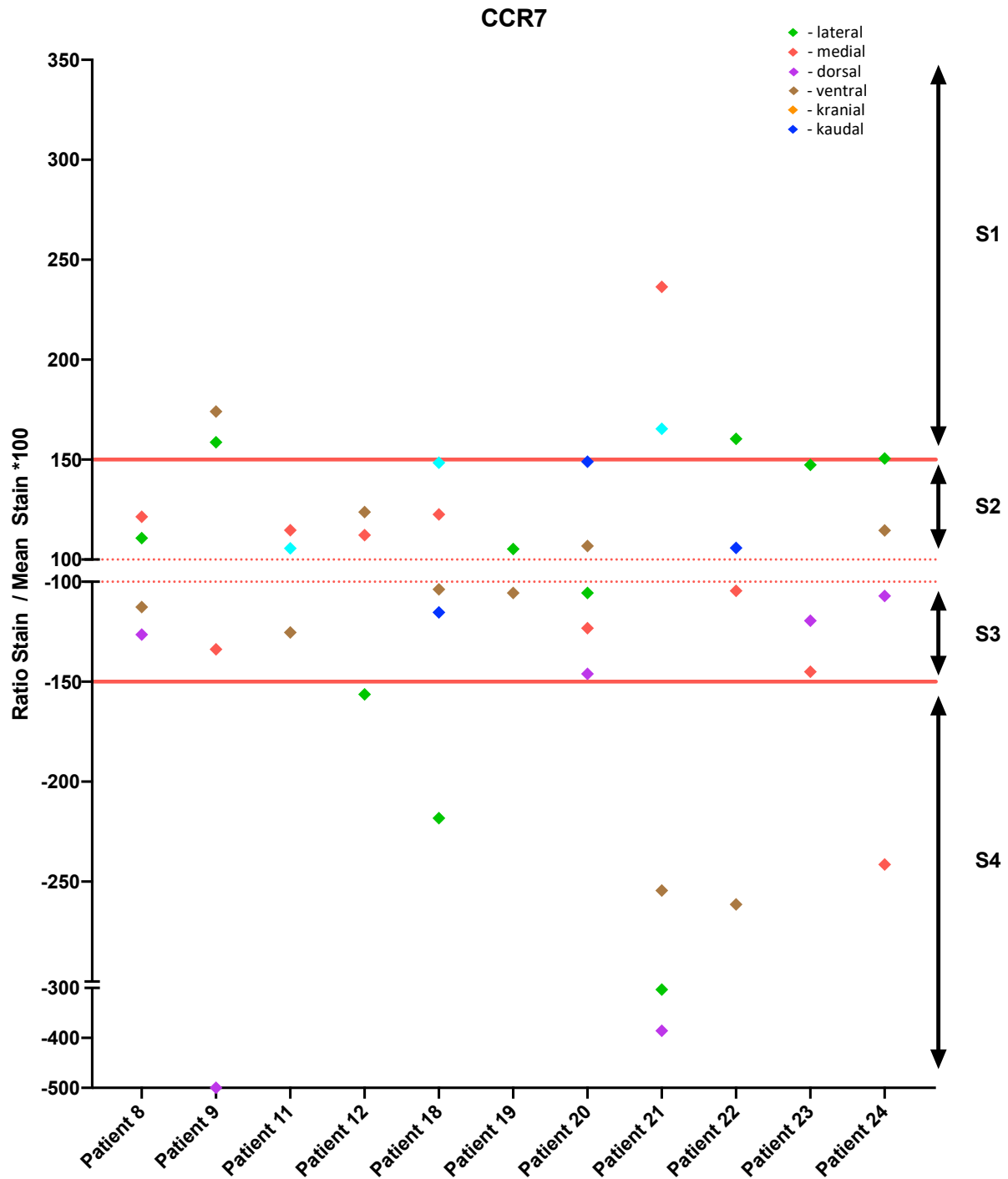


Abbildung 5.27 Intratumorale Heterogenität des Antigens CCR7 über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der n = 11 Patienten und der i = 42 Patientenproben. Alle zu einem Patienten gehörigen Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung auf die Negativ-Kontrolle und dem normalisierten Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie (y = 100/-100); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichgesetzt. Die zwei roten Linien (y = 150/-150) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 (S2, S3) oder 10 Punkte (S1, S4) für die Heterogenität vergeben.

In **Abbildung 5.28A** veranschaulicht der Bildausschnitt ein stark exprimiertes Areal mit zahlreichen CCR7-positiven Zellen des Patienten 21 im lateralen Tumorareal. Dem wurde hier das ventrale Tumorareal desselben Patienten (**Abbildung 5.28B**) mit einer deutlich reduzierten CCR7-Expression gegenübergestellt. In dieser Färbung war auffällig, dass es stellenweise sehr hohe Färbeintensitäten mit zum Teil mehreren eingeschlossenen Zellkernen gab. In weiteren Färbungen zeigte sich, wie auch bei CD204, dass CCR7 in Nekrosearealen exprimiert wurde (Beispiel: Patient 20gr5 lateral).

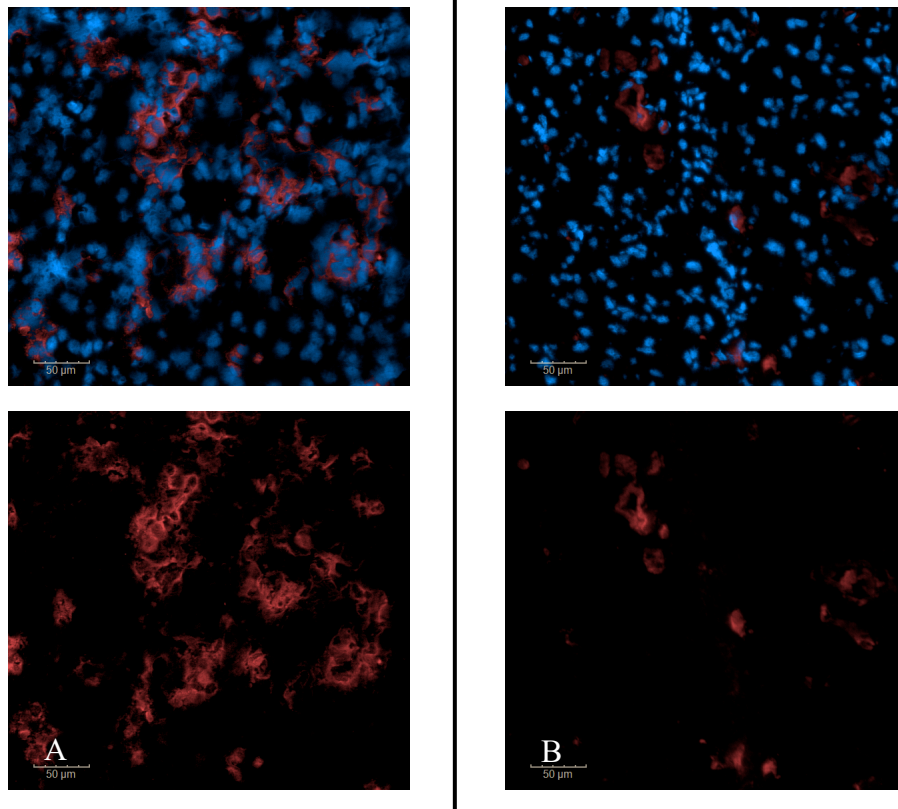


Abbildung 5.28 CCR7-Expression bei Patient 21 lateral (A) und ventral (B). A: lateral erhöhte CCR7-Expression im AF647-Kanal (rot) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; B: ventral erniedrigte CCR7-Expression im AF647-Kanal (rot) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; Die dazugehörige Negativ-Kontrolle, ohne Primäantikörper, befindet sich im Anhang (Appendix Abb. S12).

5.3.2.10 iNOS

iNOS gehörte in der quantitativen Analyse (**Abbildung 5.9**) insgesamt zu den Antigenen mit einer hohen Expressionsstärke. Die Datenerhebung für die Darstellung der intratumoralen Heterogenität erfolgte nach dem in 4.7.3 erläuterten Prinzip (**Abbildung 5.29**). iNOS zeigte insgesamt eine geringe intratumorale Heterogenität. Die überwiegende Zahl der Tumorareale wich nur gering vom Mittelwert ab und lag innerhalb der arbiträren Grenzen. Es lagen 30 Tumorareale (73 %) im S2/S3-Bereich. Lediglich Patienten 12, 21 und 23 zeigten eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität. Mit insgesamt 23 von 41 Tumorproben in den Bereichen S3 und S4 war iNOS etwas häufiger reduziert im Vergleich zum Mittelwert.

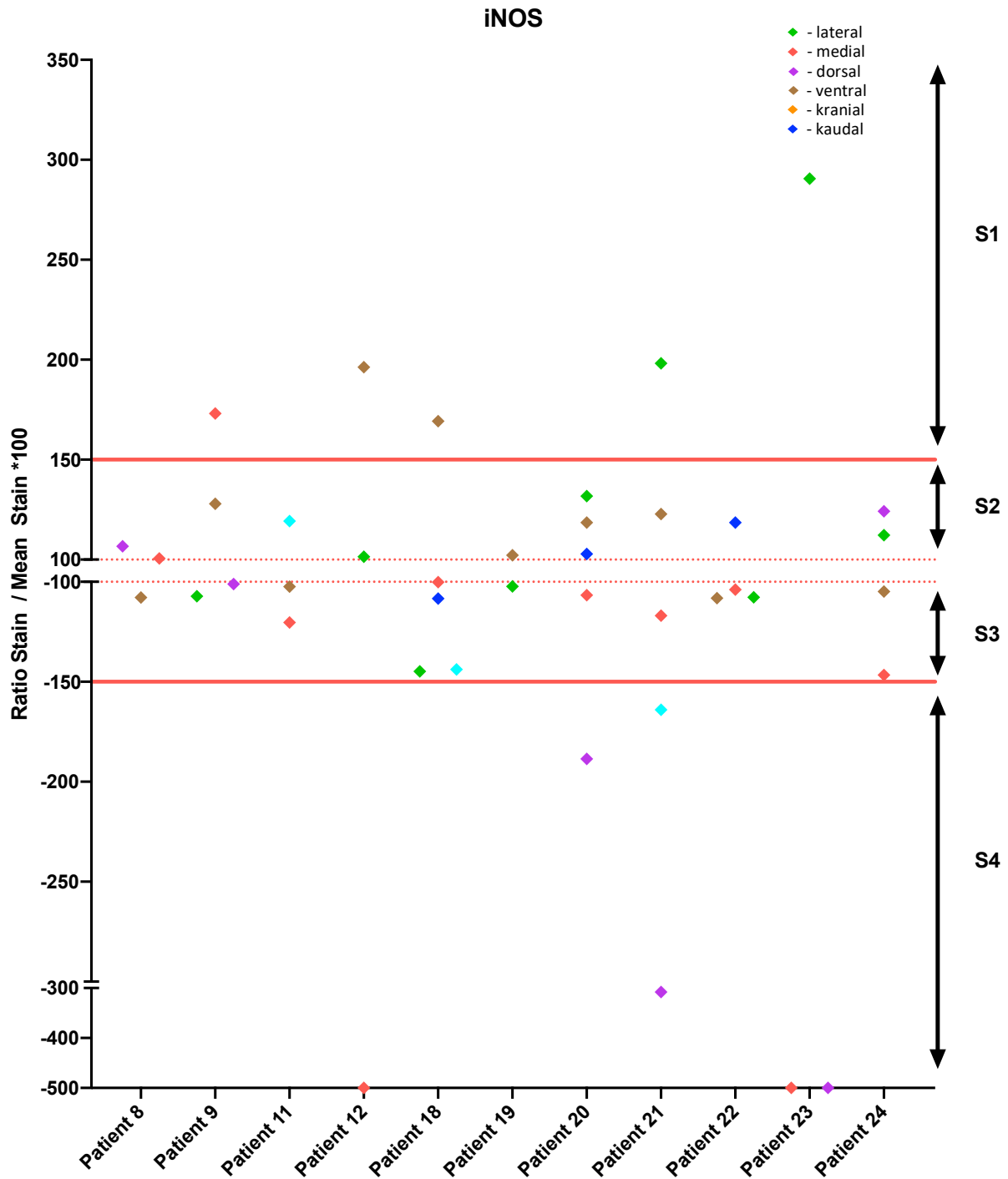


Abbildung 5.29 Intratumorale Heterogenität des Antigens iNOS über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der $n=11$ Patienten und der $i=41$ Patientenproben. Bei Patient 8 lateral wurde iNOS nicht mitgefärbt. Alle zu einem Patienten gehörigen Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung auf die Negativ-Kontrolle und dem normalisierten Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie ($y = 100/-100$); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichsetzt. Die zwei roten Linien ($y = 150/-150$) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 (S2, S3) oder 10 Punkte (S1, S4) für die Heterogenität vergeben.

Beispielhaft illustriert **Abbildung 5.30A** einen Bildausschnitt mit hoher iNOS-Expression des Patienten 21 (lateral). Dem gegenübergestellt zeigt der Bildausschnitt des Patienten 23 (dorsal) eine deutlich reduzierte iNOS-Expression (**Abbildung 5.30B**).

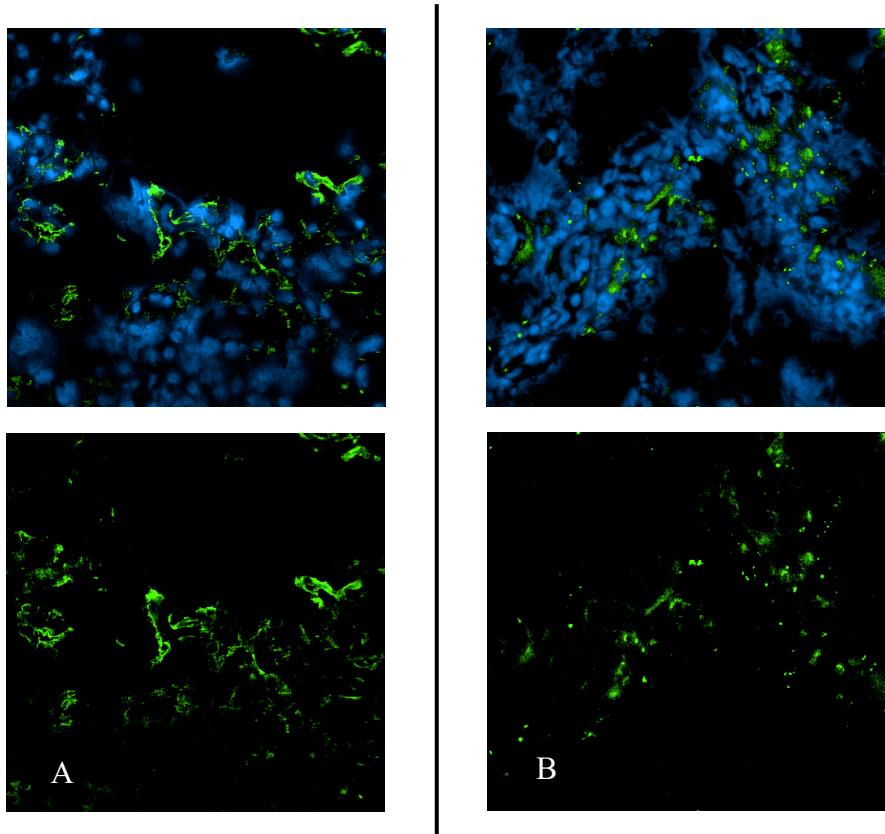


Abbildung 5.30 iNOS-Expression bei Patient 21 lateral (A) und Patient 23 dorsal (B). A: lateral erhöhte iNOS-Expression im AF488-Kanal (grün) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; B: dorsal erniedrigte iNOS-Expression im AF488-Kanal (grün) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; Die dazugehörige Negativ-Kontrolle, ohne Primärantikörper, befindet sich im Anhang (Appendix Abb. S13).

5.3.2.11 Saures Gliafaserprotein (GFAP)

GFAP war in den IF-Färbungen der Glioblastomgewebe mit Abstand am stärksten exprimiert (Abbildung 5.9). Im Folgenden wurde die intratumorale Heterogenität des Antigens GFAP untersucht. Die Datenerhebung für die Darstellung der intratumoralen Heterogenität erfolgte nach dem in 4.7.3 erläuterten Prinzip (Abbildung 5.31). GFAP zeigte in den Verteilungen der Tumoreale insgesamt die niedrigste intratumorale Heterogenität. Es lagen 88 % der Tumoreale im S2- und S3-Bereich um den Mittelwert. Davon lagen sechs Tumoreale fast exakt auf dem Mittelwert. Dabei waren nahezu doppelt so viele Tumoreale in S2 wie in S3. Ausschließlich drei Tumoreale lagen im S4-Bereich. Es befand sich kein Datenpunkt auf der x-Achse. GFAP war in allen Tumorealen über die Gesamtheit der Patienten hinweg konstant hoch exprimiert ohne starke Abweichungen nach oben oder unten.

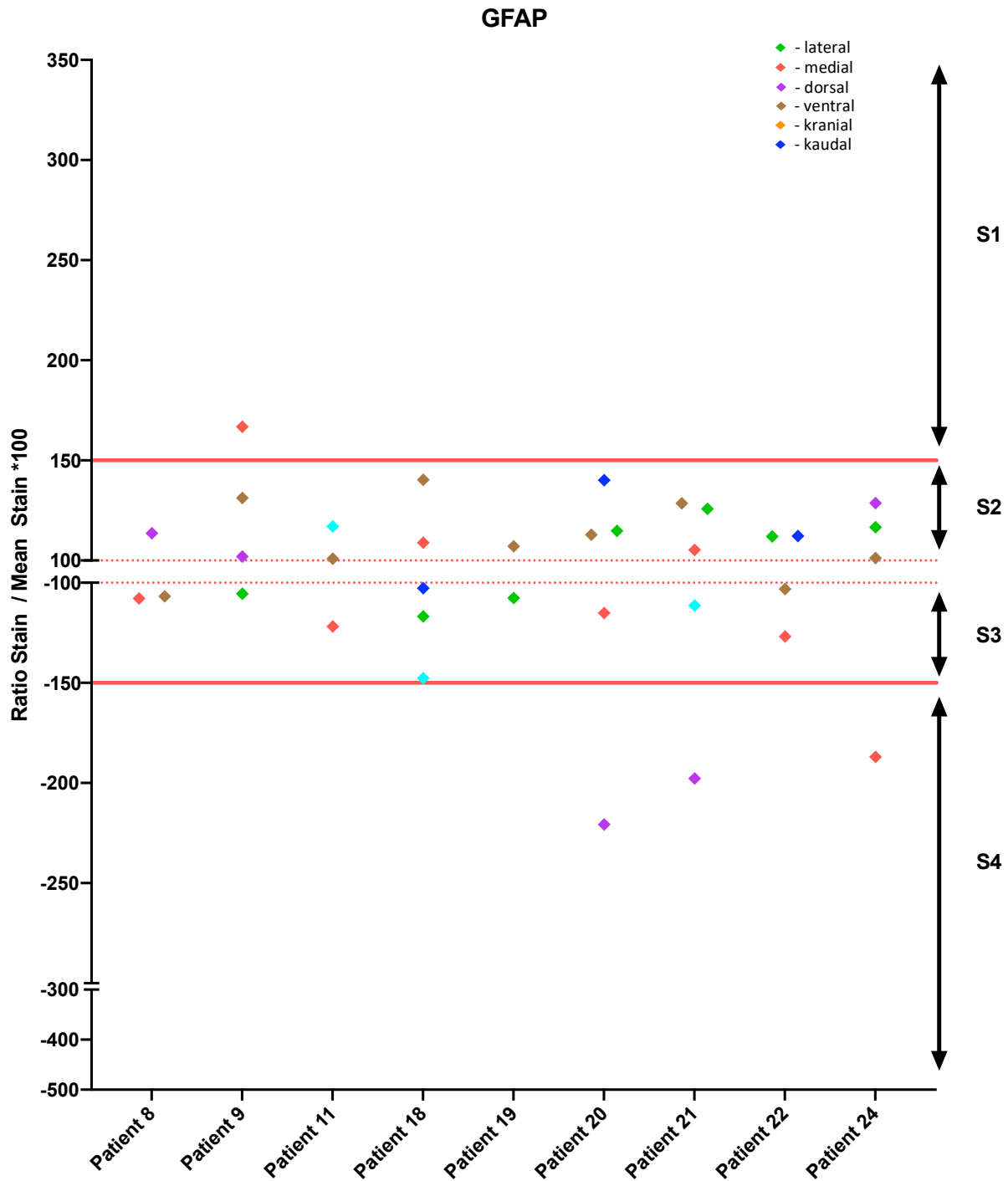


Abbildung 5.31 Intratumorale Heterogenität des Antigens GFAP über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der n = 11 Patienten und der i = 35 Patientenproben. Bei Patient 8 *lateral*, 12 und 23 wurde GFAP nicht mitgefärbt. Alle zu einem Patienten gehörigen Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung auf die Negativ-Kontrolle und dem normalisierten Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie (y = 100/-100); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichgesetzt. Die zwei roten Linien (y = 150/-150) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 (S2, S3) oder 10 Punkte (S1, S4) für die Heterogenität vergeben.

Die **Abbildung 5.32** illustriert die Unterschiede für eine hohe (Patient 21 lateral (A)) und eine niedrige GFAP-Expression (Patient 21 dorsal (B)). Bei GFAP wurden in den Färbungen häufig Zellfortsätze aus oberen oder unteren Schichten ohne angeschnittenen Zellkern mitgefärbt. Dadurch entstand häufig eine derart dichte Färbungscharakteristik.

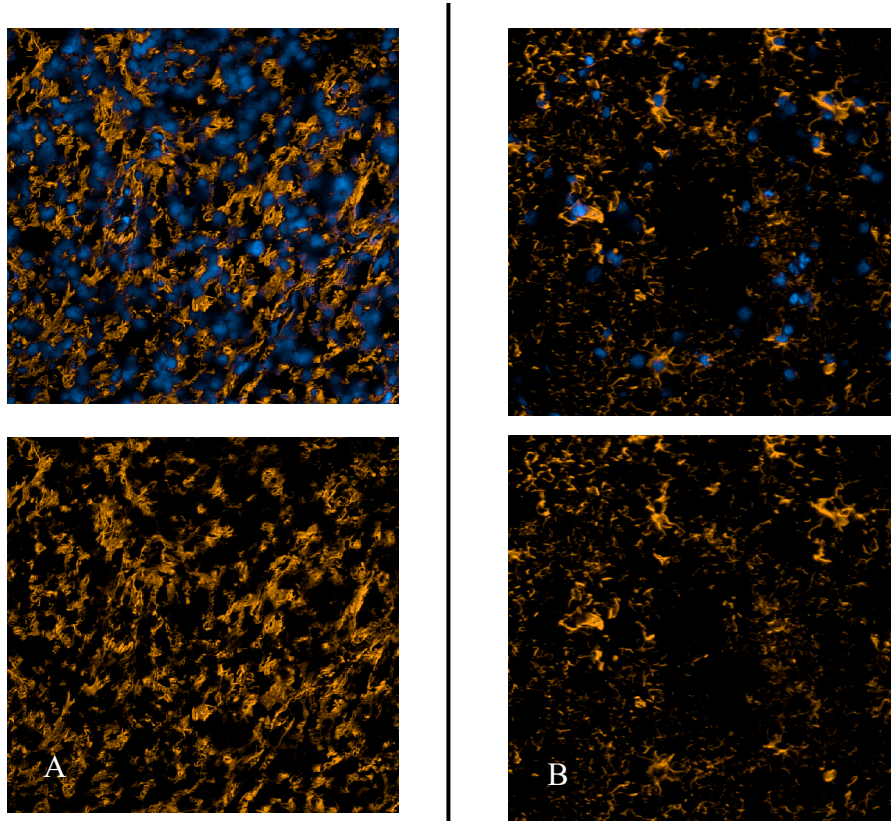


Abbildung 5.32 GFAP-Expression bei Patient 21 lateral (A) und Patient 21 dorsal (B). A: lateral erhöhte GFAP-Expression im AF594-Kanal (orange) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; B: dorsal erniedrigte GFAP-Expression im AF594-Kanal (orange) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; Die dazugehörige Negativ-Kontrolle, ohne Primärantikörper, befindet sich im Anhang (Appendix Abb. S14).

5.3.2.12 Arginase-1 (*Arg1*)

Arg1 gehörte zu den Antigenen mit einer relativ hohen Expression in der Gesamtheit aller gemessenen Patienten (Abbildung 5.9). Die Datenerhebung für die Darstellung der intratumoralen Heterogenität erfolgte nach dem in 4.7.3 erläuterten Prinzip (Abbildung 5.33). Ähnlich wie iNOS und GFAP wies auch *Arg1* eine geringe intratumorale Heterogenität auf. Es befanden sich 83 % der Tumoreale der Patienten mit einer geringen Abweichung vom Mittelwert in den Bereichen S2 und S3. Davon waren 19 Tumoreale im Bereich S2 und zeigten eine etwas erhöhte *Arg1*-Expression und 15 Tumoreale im Bereich S3 mit einer reduzierten *Arg1*-Expression. Drei Tumoreale hatten eine stark reduzierte *Arg1*-Expression, wohingegen weitere drei Tumoreale eine stark erhöhte *Arg1*-Expression aufzeigten. *Arg1* war somit insgesamt etwas häufiger (54 %) stärker exprimiert im Vergleich zum Mittelwert. Darüber hinaus lag aufgrund des hohen Anteils der Tumoreale innerhalb der arbiträren Grenzen eine geringe intratumorale Heterogenität vor.

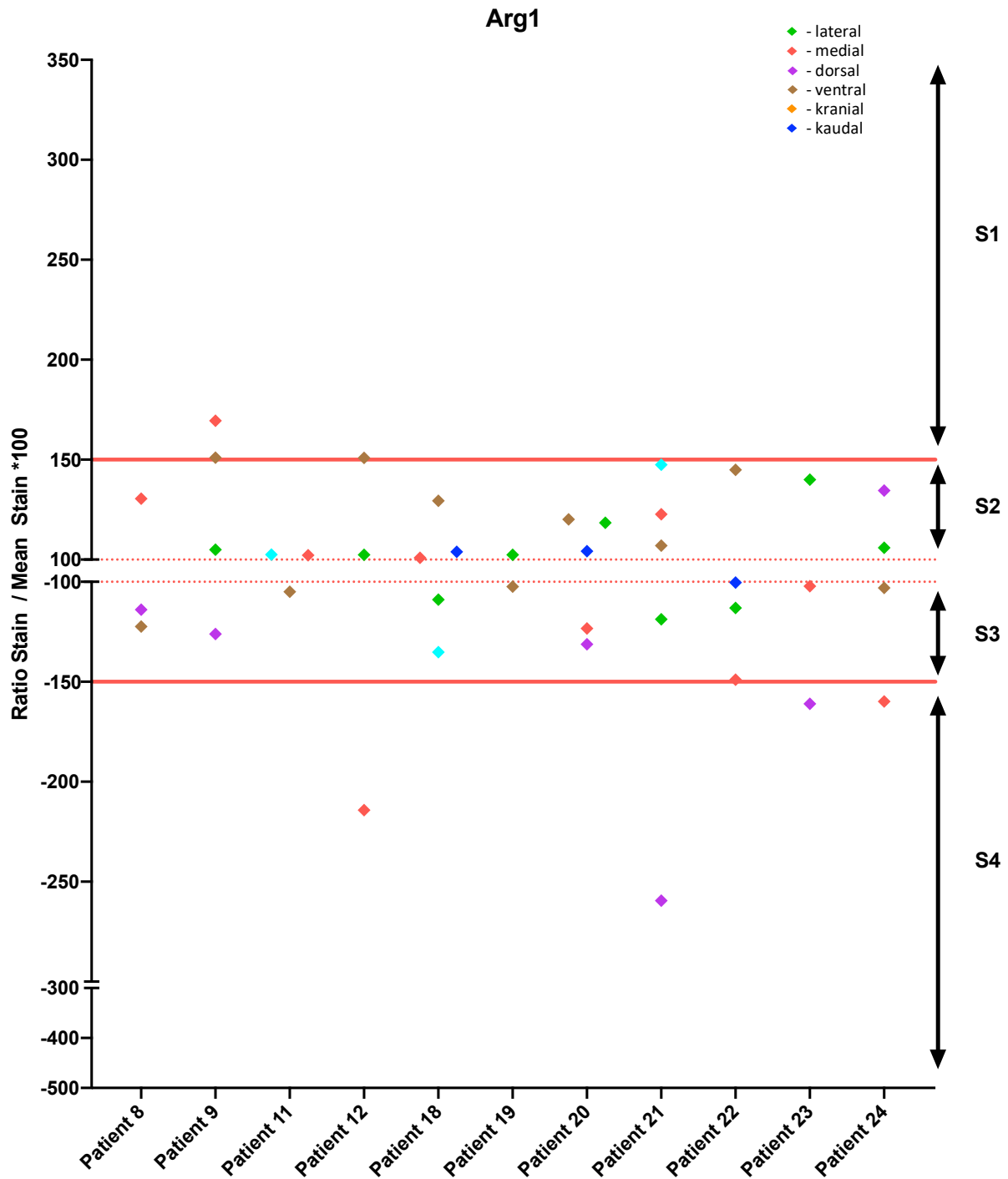


Abbildung 5.33 Intratumorale Heterogenität des Antigens Arg1 über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der $n = 11$ Patienten und der $i = 42$ Patientenproben. Alle zu einem Patienten gehörigen Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung auf die Negativ-Kontrolle und dem normalisierten Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie ($y = 100/-100$); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichgesetzt. Die zwei roten Linien ($y = 150/-150$) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 (S2, S3) oder 10 Punkte (S1, S4) für die Heterogenität vergeben.

Der Bildausschnitt des Patienten 12 (medial) (**Abbildung 5.34A**) illustriert beispielhaft eine gesteigerte Arg1-Expression im Glioblastom. Im Vergleich dazu ist in **Abbildung 5.34B** ein Bildausschnitt des Patienten 18 (kaudal) mit einer reduzierten Arg1-Expression zu sehen.

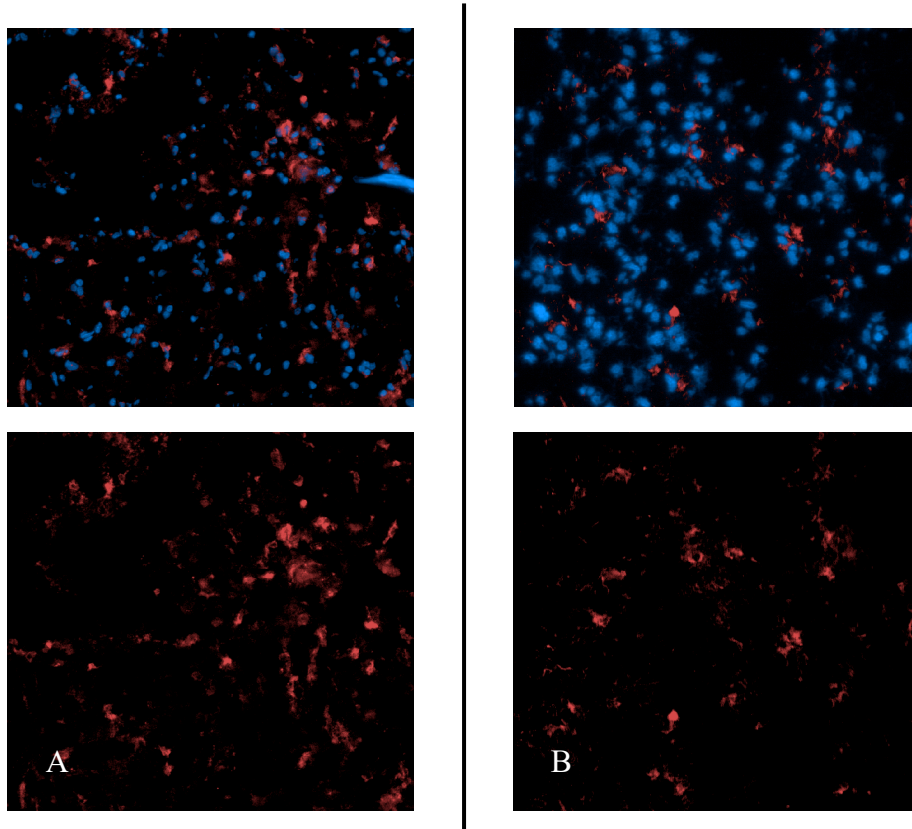


Abbildung 5.34 Arg1-Expression bei Patient 12 medial (A) und Patient 18 kaudal (B). A: medial erhöhte Arg1-Expression im AF647-Kanal (rot) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; B: kaudal erniedrigte Arg1-Expression im AF647-Kanal (rot) oben mit DAPI (blau); unten ohne DAPI; Die dazugehörige Negativ-Kontrolle, ohne Primärantikörper, befindet sich im Anhang (Appendix Abb. S15).

5.3.3 Heterogenitäts-Score der Antigene

Aus den Heterogenitätsgraphen der Abbildungen unter 5.3.2 wurden je nach Verteilung der Tumoreareale von S1 bis S4, Scoringpunkte vergeben. Lagen die Tumoreareale in ihrer Expression außerhalb der arbiträren Grenzen 150/-150, wurden 10 Punkte vergeben. Lagen die Tumoreareale innerhalb dieser arbiträren Grenzen und damit näher am Mittelwert, wurden 5 Punkte vergeben. Im Anschluss wurde die Summe aus den Punkten eines Antigens über alle Patienten und Tumoreareale gebildet. Da bei einigen Antigenen, wie z.B. GFAP, iNOS, Arg1, CSF1R, und PSGL-1 weniger Färbungen vorlagen als bei den übrigen Antigenen, wurde die ermittelte Summe durch die Anzahl der Färbungen normiert und auf der y-Achse aufgetragen (**Abbildung 5.35**).

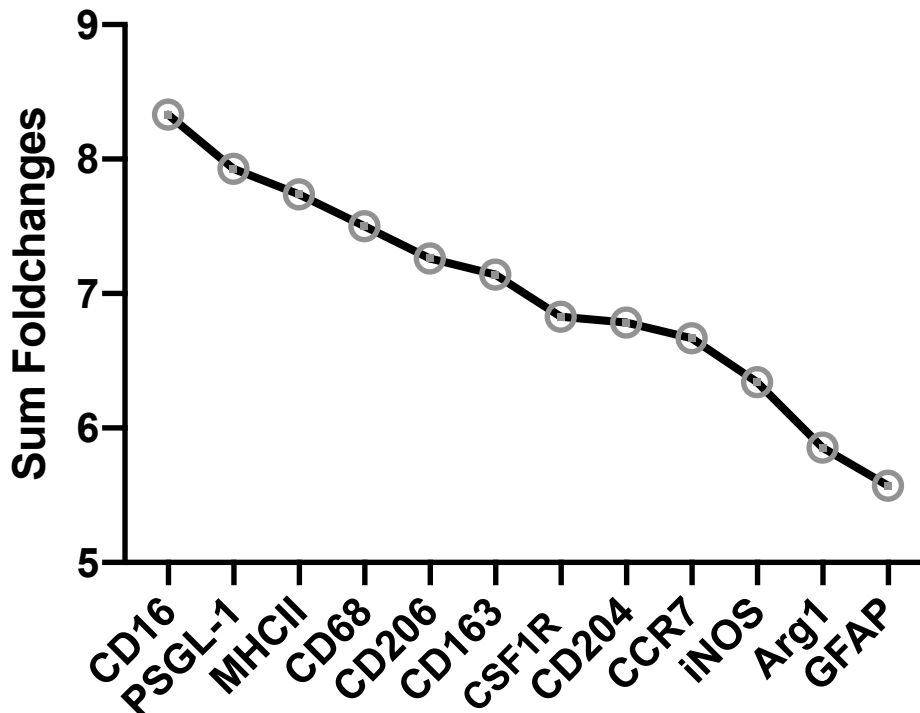


Abbildung 5.35 Summierter Heterogenitäts-Score aller Tumorareale der (n = 11) Patienten. Von links nach rechts absteigend nach der Stärke der Heterogenität aufgetragen. Ermittlung des „Sum-Scores“ anhand der Punkte aus der Heterogenitätsdarstellung (S1-4) und normiert auf die Anzahl der Färbungen.

Die Antigene mit der stärksten Heterogenität wurden von links nach rechts absteigend sortiert. Die Antigene PSGL-1, CD16, MHC-II und CD68 mit der schwächsten gemessenen Gesamtexpression im Glioblastom (Abbildung 5.9), zeigten die insgesamt stärkste intratumorale Heterogenität über alle Tumorareale. CD16 hatte durchschnittlich 8,3 von maximal 10 Heterogenitätspunkten. Die nachfolgenden Antigene CD163, CSF1R, CD206 und CD204 gehörten zur Gruppe der moderat bis hoch exprimierten Antigene in der Gesamtexpression. Sie hatten ungefähr das gleiche Ausmaß an intratumoraler Heterogenität, jedoch zeigte sich mit steigender Gesamtexpression eine erniedrigte intratumorale Heterogenität. CCR7 als zweitstärkstes exprimiertes Antigen über alle Glioblastomfärbungen wies eine 20 % geringere intratumorale Heterogenität auf als CD16. GFAP, als das am insgesamt stärksten exprimierte Antigen, zeigte die niedrigste intratumorale Heterogenität. Resümierend lässt sich eine nahezu negativ-lineares Verhältnis der intratumoralen Heterogenität und der Expressionsstärke feststellen.

5.3.4 Zytokin- und Chemokinexpression im Glioblastom

Neben den Antigenen auf der Zelloberfläche der Neuronen und Tumorzellen wurden auch die Zytokine/Chemokine im Glioblastom untersucht. Zytokine spielen eine wesentliche Rolle im

Tumormikromilieu für die Differenzierung der Tumorzellen und Immunzellen in pro-tumorale oder anti-tumorale Phänotypen. Die durchflusszytometrisch ermittelten Fluoreszenzintensitäten wurden in Abbildung 5.36 graphisch über ein Box-Whisker-Plot dargestellt. In der logarithmisch skalierten Darstellung der MFI wurde die Expressionsstärke von links nach rechts absteigend abgebildet.

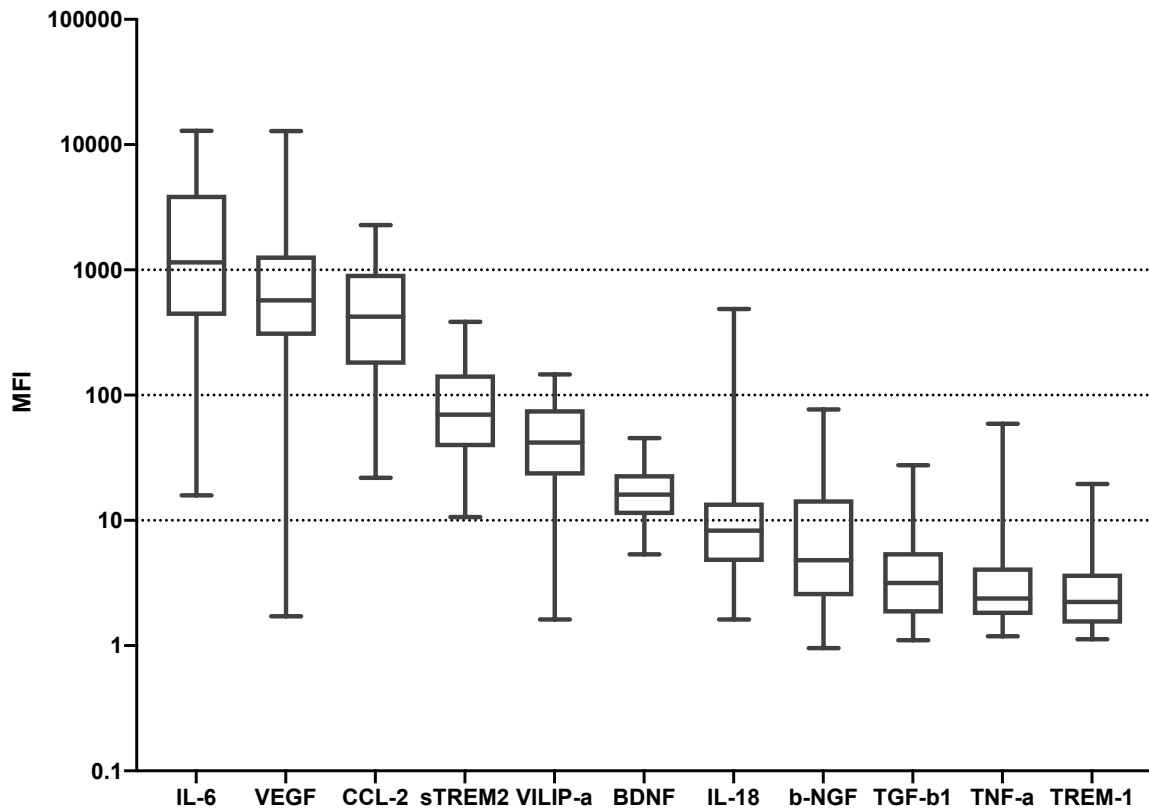


Abbildung 5.36 Quantitative Darstellung der Zytokinexpression. Die Auswertung der n = 11 Patienten mit i = 39 Tumorarealen erfolgte durchflusszytometrisch. Die erfassten mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) wurden von links nach rechts absteigend sortiert.

Das insgesamt am stärksten exprimierte Zytokin war Interleukin 6 (IL-6). Der Median der MFI lag bei 1150. Die Spannweite reichte hierbei von 16 bis 12800. Interindividuell bzw. intratumoral lag eine große Expressionsvariabilität vor. Eine deutlich größere Expressionsvariabilität fand sich bei VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Der Medianwert lag bei 570. Im Gegensatz dazu erreichten die minimalen Expressionswerte Fluoreszenzintensitäten von < 2. Die Zytokine ließen sich, ebenso wie die Antigene, anhand der Expressionsstärken grob in drei Kategorien gliedern. IL-6, VEGF und CCL-2 gehörten unter den gemessenen Zytokinen zur Kategorie mit der höchsten Expression im Glioblastom. Zur Kategorie der moderaten Zytokinexpression gehörten sTREM-2, VILIP-a, BDNF und IL-18. Die Kategorie mit der niedrigsten Zytokinexpression bildeten β -NGF, TGF- β 1, TNF- α und TREM-1. Es fiel auf, dass mit sinkender Expressionsstärke die Spannweite zwischen minimaler und maximaler Expression kleiner wird. Der Interquartilabstand der Boxes war bei den niedrig

exprimierten Zytokinen, wie TREM-1 und TNF- α , geringer als bei den hoch exprimierten Zytokinen, wie IL-6 und VEGF.

5.3.5 Intratumorale Heterogenität der Zytokine und Chemokine im Glioblastom

Die intratumorale Heterogenität war das zentrale Element dieser Arbeit. Neben der Gesamtexpression der Zytokine wurde - ähnlich wie bei den Antigenen - die intratumorale Heterogenität untersucht. Die Berechnung aus den ermittelten Daten wurde unter 4.7.3.1 erläutert.

5.3.5.1 Interleukin 6

Interleukin 6 (IL-6) war das am stärkste exprimierte Zytokin über alle gemessenen Patientenareale (Abbildung 5.36). Beurteilt nach den Expressionsunterschieden zeigte IL-6 eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität (**Appendix** Abbildung S1-A). Es befanden sich 74 % der Tumoreale außerhalb der arbiträren Grenzen in den Scoringbereichen S1 und S4. IL-6 war verhältnismäßig häufiger reduziert exprimiert mit insgesamt 22 von 35 Tumorealen unterhalb des Mittelwertes. Die intratumorale Heterogenität variierte zwischen den Patienten. Die Expressionsunterschiede waren bei den Patienten 18, 20, 21 und 24 am ausgeprägtesten. Im Vergleich dazu zeigten die Patienten 8 und 9 eine geringere intratumorale Heterogenität. Insgesamt verhielt sich die IL-6-Expression im Glioblastom äußerst heterogen.

5.3.5.2 Vascular endothelial growth factor

Der Vascular endothelial growth factor (VEGF) war das Zytokin mit der zweithöchsten Expression (Abbildung 5.36). Beurteilt nach den Expressionsunterschieden zeigte VEGF eine moderate intratumorale Heterogenität (**Appendix** Abbildung S1-B). 20 der 35 Tumoreale befanden sich außerhalb der arbiträren Grenzen in den Scoringbereichen S1 und S4. Ähnlich wie IL-6 war VEGF im Vergleich zum Mittelwert etwas häufiger reduziert exprimiert (19/35 Tumorealen in S3 und S4).

Die intratumorale Heterogenität zeigte starke individuelle Unterschiede. Während *Patient 24* eher eine Sonderstellung einnahm und die Tumoreale hier nur gering vom Mittelwert abwichen, zeigte die überwiegende Mehrheit der restlichen Patienten eine starke Abweichung vom Mittelwert. Insgesamt wies VEGF eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität auf.

5.3.5.3 CC-Chemokin Ligand 2

CC-Chemokin-Ligand 2 (CCL-2) zeigte neben IL-6 und VEGF die dritthöchste Expression (Abbildung 5.36). Beurteilt nach den Expressionsunterschieden erwies CCL-2 eine moderate intratumorale Heterogenität (**Appendix** Abbildung S1-C) mit 19 der insgesamt 35 Tumoreale

außerhalb der arbiträren Grenzen. In der Gesamtheit war CCL-2 mit 57 % der Tumorareale innerhalb der Scoringbereiche S3/S4 etwas häufiger reduziert exprimiert. Die interindividuelle Variabilität der intratumoralen Heterogenität fiel bei CCL-2 gering aus. Bei Patient 19 wichen beide Tumorareale nur gering vom Mittelwert ab, sodass hier von einer geringeren intratumoralen Heterogenität gesprochen werden kann. Es sollte beachtet werden, dass die Aussagekraft über die intratumorale Heterogenität mit nur zwei Tumorareale limitiert ist. Die restlichen Patienten zeigten geringe intratumorale Expressionsunterschiede. Es lagen meist zwei Tumorareale innerhalb der arbiträren Grenzen und zwei bis drei Tumorareale außerhalb dieser.

5.3.5.4 Soluble Triggering receptor expressed on myeloid cells-2

Der soluble Triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (sTREM-2) war das vierthöchste exprimierte Zytokin und gehört somit zur Kategorie der moderat exprimierten Zytokine (Abbildung 5.36). Über die Gesamtheit aller Patienten beziehungsweise Tumorareale hinweg zeigte sTREM-2 eine verhältnismäßig geringe intratumorale Heterogenität (**Appendix** Abbildung S1-D) 13 von 35 Tumorarealen (37 %) lagen außerhalb der arbiträren Grenzen in den Scoringbereichen S1/S4. Vor dem Hintergrund der intratumoralen Heterogenität stellten sich interindividuell jedoch Unterschiede dar. Insgesamt lagen die Tumorareale der Patienten mehrheitlich innerhalb der arbiträren Grenzen. Bei den Patienten 8, 9 und 24 befanden sich alle Tumorareale in den Scoringbereichen S2 und S3. In diesen Patienten lag eine sehr niedrige intratumorale Heterogenität vor. Im Gegensatz dazu gab es ebenso Patienten mit starken intratumoralen Expressionsvariabilitäten. Bei den Patienten 18, 20 und 22 lagen die Expressionsstärken von sTREM-2 weit auseinander. Hier lag eine ausgeprägtere intratumorale Heterogenität vor.

5.3.5.5 Visinin like Protein

Das Visinin like Protein (VILIP-a) zählte zur Kategorie der moderat exprimierten Zytokine im Glioblastom (Abbildung 5.36). Insgesamt zeigte VILIP-a eine niedrige intratumorale Heterogenität (**Appendix** Abbildung S2-A). 16 der 35 Tumorareale befanden sich außerhalb der arbiträren Grenzen. Erneut zeigten die Patienten 8, 9 und 24 eine geringe Abweichung ihrer Expressionsstärken in den einzelnen Tumorarealen vom Mittelwert. Alle Datenpunkte dieser Patienten befanden sich in den Scoringbereichen S2 und S3. Wie auch bei den vorigen Zytokinen, zeigten die Patienten 18 und 22 eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität mit deutlichen Expressionsabweichungen vom Mittelwert.

5.3.5.6 Brain derived neurotrophic factor

BDNF gehört zur Kategorie der Zytokine mit einer medianen Zytokinexpression. Anhand der kurzen Spannweite der Whisker fiel eine geringe Streuung der Expressionswerte um den Median auf. Sowohl Minimum als auch Maximum lagen nah beieinander (Abbildung 5.36). BDNF zeigte darüber hinaus eine sehr niedrige intratumorale Heterogenität (**Appendix** Abbildung S2-B). 27 von 35 (77 %) Tumorarealen lagen innerhalb der arbiträren Grenzen. Nur insgesamt acht Tumorareale waren in den Scoringbereichen S1 oder S4 lokalisiert. Bei Patient 20 konnte eine etwas ausgeprägtere intratumorale Heterogenität festgestellt werden. Die überwiegende Mehrheit der restlichen Patienten zeigte geringe intratumorale Expressionsunterschiede. Somit erwies BDNF nicht nur die geringste Expressionsvariabilität, sondern auch eine sehr niedrige intratumorale Heterogenität.

5.3.5.7 Interleukin 18

Interleukin 18 (IL-18) gehörte zu den moderat exprimierten Zytokinen im Glioblastom. Trotz des verhältnismäßig geringen Median-Wertes (10) zeigten sich einige Ausreißer nach oben mit MFI-Werten bis 1000 (Abbildung 5.36). Aufgrund der Verteilung von 25 der 35 Tumorarealen (71 %) außerhalb der arbiträren Grenzen - in den Scoringbereichen S1 und S4 - zählte IL-18 zu den Zytokinen mit einer ausgeprägten intratumoralen Heterogenität (**Appendix** Abbildung S2-C). Trotz des Überwiegens von Patienten mit Ausprägung einer hohen intratumoralen Heterogenität, zeigten die Patienten 8 und 24, wie auch zuvor bei anderen Zytokinen (VEGF, TREM-2, VILIP-a, BDNF), eine geringe intratumorale Heterogenität.

5.3.5.8 Beta-Nerve growth factor

Mit einem Median-MFI Wert von kleiner als 10 zählte β -NGF zu den schwach exprimierten Zytokinen im GBM (Abbildung 5.36). Bezogen auf die intratumorale Heterogenität gehörte β -NGF zu den Zytokinen mit der stärksten Ausprägung (**Appendix** Abbildung S2-D). Insgesamt 24 von 35 Tumorarealen lagen außerhalb der arbiträren Grenzen. Nur zehn Tumorareale waren den Scoringbereichen S2 und S3 zuzuordnen. Interindividuell unterschied sich die Ausprägung der intratumoralen Heterogenität. Bei Patient 9 zeigte sich eine sehr geringe Ausprägung durch die Lage von 3/4 Datenpunkten innerhalb der arbiträren Grenzen. Im Gegensatz dazu fanden sich bei den Patienten 20, 21 und 22 sehr stark ausgeprägte intratumorale Expressionsunterschiede.

5.3.5.9 Transforming growth factor beta 1

Der *Transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) war das drittschwächste exprimierte Zytokin in der quantitativen Analyse der GBM (Abbildung 5.36). Anhand der Verteilung aller Tumorareale ließ sich eine geringe intratumorale Heterogenität feststellen (**Appendix** Abbildung S3-A). Darauf wiesen die 24 der insgesamt 35 Tumorareale hin, die innerhalb der arbiträren Grenzen in den Scoringbereichen S2 und S3 lagen. Die intratumorale Heterogenität unterschied sich in der Ausprägung zwischen den verschiedenen Patienten. Eine niedrige Ausprägung zeigte sich bei den Patienten 20, 21, 22 und 24. Hier waren die Expressionsunterschiede der unterschiedlichen Tumorareale so gering, dass 75-80 % Tumorareale innerhalb der Scoringbereiche S2 und S3 lagen. Im Gegensatz dazu lagen 75 % der Tumorareale des Patienten 9 durch die stärkeren Expressionsunterschiede außerhalb der arbiträren Grenzen. TGF- β 1 zeigte, ersichtlich anhand der Überzahl der Datenpunkte über dem Mittelwert (100), als einziges Zytokin häufiger eine stärkere Expression im Vergleich zum Mittelwert.

5.3.5.10 Tumor necrosis factor alpha

Der Tumornekrose Faktor alpha (TNF- α) war das zweitschwächste exprimierte Zytokin in der quantitativen Bestimmung aller GBM Proben (Abbildung 5.36). Auch in der Darstellung der intratumoralen Heterogenität war TNF- α insgesamt häufiger (65 %) im Vergleich zum Mittelwert reduziert (**Appendix** Abbildung S3-B).

In Bezug auf die intratumorale Heterogenität gehörte TNF- α zu den Zytokinen mit einer starken Ausprägung. 21 der 35 Tumorareale befanden sich außerhalb der arbiträren Grenzen in den Scoringbereichen S1 und S4. An zwei Patienten ließ sich die interindividuelle Divergenz der intratumoralen Heterogenität sehr gut veranschaulichen. Während bei Patient 24 alle vier Tumorareale eine Expressionsstärke knapp über bzw. unter dem Mittelwert zeigten, waren die Unterschiede bei Patient 18 sehr groß. Bei Patient 18 fand sich *lateral* eine sehr hohe TNF- α -Expression. *Medial* war die Expression stark reduziert. In den übrigen drei Arealen war TNF- α nahezu nicht messbar.

Bei gesonderter Betrachtung der Tumorareale entlang aller Patienten stellten sich ebenso viele reduzierte wie gesteigerte Expressionen dar.

5.3.5.11 Triggering receptor expressed on myeloid cells 1

TREM-1 zeigte im GBM die niedrigste Expression (Abbildung 5.36). Zudem konnte TREM-1 zu den Zytokinen mit einer geringen intratumoralen Heterogenität gezählt werden. Nur 15 der 35 Tumorareale, und damit weniger als die Hälfte, waren außerhalb der arbiträren Grenzen

lokalisiert (**Appendix** Abbildung S3-C). Wie auch in den zuvor beschriebenen Zytokinen, zählten die Patienten 8, 9 und 24 zu den Beispielen einer niedrigen ausgeprägten intratumoralen Heterogenität. Bei TREM-1 betraf dies auch Patient 18. Alle Tumoreale dieses Patienten zeigten geringe Expressionsunterschiede und lagen innerhalb der Scoringbereiche S2 und S3. Im Gegensatz dazu zeigten die Patienten 20, 21 und 22, wie zuvor für andere Zytokine, eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität mit deutlichen Expressionsunterschieden in den verschiedenen Tumorealen

5.3.6 Heterogenitäts-Score der Zytokine und Chemokine

Aus den Heterogenitätsgraphen der Abbildungen unter 5.3.5 wurden je nach Verteilung der Tumoreale von S1 bis S4 Scoringpunkte vergeben. Lagen die Tumoreale in ihrer Expression außerhalb der arbiträren Grenzen 150/-150, wurden 10 Punkte vergeben. Lagen die Tumoreale innerhalb dieser arbiträren Grenzen und damit näher zum Mittelwert, wurden 5 Punkte vergeben. Im Anschluss wurde die Summe aus den Punkten eines Zytokins über die Gesamtheit aller Tumoreale gebildet. Die Summe wurde hinterher auf die Anzahl der Tumoreale normiert (Abbildung 5.37).

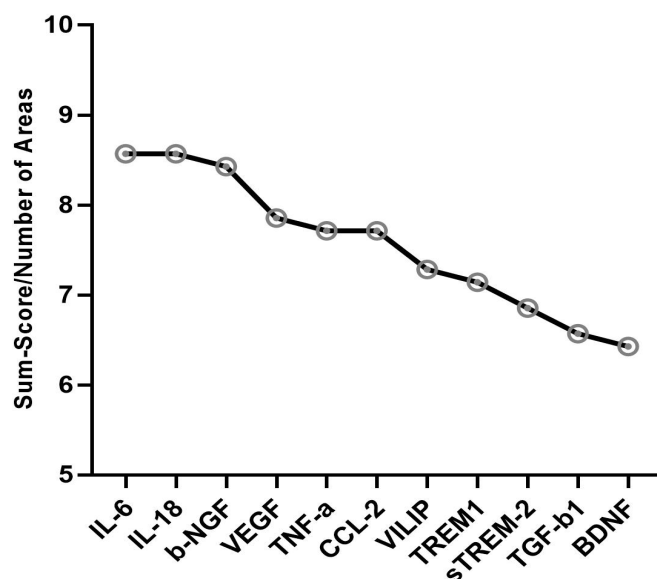


Abbildung 5.37 Summierter Heterogenitäts-Score aller Tumoreale der (n = 10) Patienten. Von links nach rechts absteigend nach der Stärke der Heterogenität aufgetragen. Ermittlung des *Sum-Scores* anhand der Punkte aus der Heterogenitätsdarstellung (S1-4) und normiert auf die Anzahl der Tumoreale.

Die Zytokine ließen sich anhand dieses ermittelten *Sum-Scores* in drei Subgruppen einteilen. Von links nach rechts wurde absteigend nach Ausprägung des intratumoralen Heterogenitätsausmaßes sortiert. Ganz links bilden die Zytokine IL-6, IL-18 und β -NGF die

Subgruppe mit der stärksten intratumoralen Heterogenität mit einem durchschnittlichen Score-Wert von 8,5 der maximal 10 Punkte. Die zweite Subgruppe bilden VEGF, TNF- α und CCL-2 mit einem durchschnittlichen Score-Wert von 7,7 Punkten. Sie spiegeln eine moderate intratumorale Heterogenität wider.

Die letzte Subgruppe mit einer niedrigen intratumoralen Heterogenität bilden die Zytokine VILIP-a, TREM-1, sTREM-2, TGF- β 1 und BDNF. Hier zeigt sich innerhalb der Subgruppe ein linearer Abfall des durchschnittlichen Score-Wertes. Während VILIP-a und TREM-1 einen Wert von 7,2 aufweisen, liegt der Score-Wert von BDNF mit 6,4 deutlich drunter. Hierbei neigten die stärker exprimierten Zytokine wie IL-6 und VEGF zu hohen intratumoralen Heterogenitäten. Allerdings zeigten auch verhältnismäßig niedrig exprimierte Zytokine, wie zum Beispiel β -NGF, TNF- α oder IL-18, hohe intratumorale Heterogenitäten. Daher ließ sich hier zwischen Expressionsstärke und Ausprägungsgrad der intratumoralen Heterogenität kein Zusammenhang feststellen.

6 Diskussion

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit der Studie zur intratumoralen Heterogenität im Glioblastoma multiforme wurde erstmals ein Ansatz zum Verständnis der immunologischen Verhältnisse auf zellulärer Ebene in mehreren Arealen eines Tumors durchgeführt.

Anhand der quantitativen Analyse immunhistologischer Färbungen zeigte sich eine signifikant hohe CD163-Expression. Darüber hinaus fiel eine signifikant niedrigere PSGL-1-Expression im Vergleich zu CD163 und CD68 auf. CD68 zeigte im Tumor eine höhere Expression als bei den gesunden Kontrollpatienten. Auf Grundlage der quantitativen Analyse zeigte sich keine Korrelation zur durchflusszytometrischen Analyse derselben Antigene. Hier ergaben sich folglich erste Hinweise auf eine intratumoralen Heterogenität.

Bei der Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen wies GFAP als Tumormarker, unter den untersuchten Antigenen, die stärkste Expression auf. M2-typische Antigene mit einem antiinflammatorischen Phänotyp, wie z.B. CD204, CD163, Arg1 und CSF1R, zeigten eine vergleichsweise erhöhte Expression in den Glioblastomproben. Die hoch exprimierten Antigene wiesen hingegen eine vergleichsweise niedrige intratumorale Heterogenität auf. GFAP wies die niedrigste intratumorale Heterogenität auf. Im Gegensatz dazu zeigten M1-typische Antigene mit einem proinflammatorischen Phänotyp, wie z.B. PSGL-1, CD16, CD68 und MHC-II, eine niedrige Gesamtexpression. Hier konnte ebenfalls eine begleitende ausgeprägte intratumorale Heterogenität beobachtet werden. Die IF-Analysen bestätigten somit die Auswertungen der IHC. CD163 war hoch exprimiert, wohingegen PSGL-1 und CD68 niedrig exprimiert waren. Für die Untersuchung der Immunzell-Verhältnisse sowie des Immunzell-Milieus wurden zahlreiche Zytokine und Chemokine hinsichtlich ihrer Expressionsstärke und intratumoralen Heterogenität ausgewertet. Im Hinblick auf die Gesamtexpression wurde in drei Kategorien differenziert. IL-6, VEGF und CCL-2 zählten zu den Zytokinen mit der stärksten Expression. VILIP-a, sTREM2, BDNF und IL-18 waren moderat exprimiert. TGF- β 1, β -NGF, TNF- α und TREM1 zeigte die niedrigste Expression unter den untersuchten Zytokinen. Hinsichtlich ihrer intratumoralen Heterogenität zeigten die hoch exprimierten Zytokine eine moderat bis hohe Ausprägung. Ausnahmen stellten hier β -NGF, TNF- α und IL-18 dar, die trotz einer vergleichsweise niedrigen Gesamtexpression eine hohe intratumorale Heterogenität aufwiesen. Die restlichen Zytokine mit einer moderaten bzw. niedrigen Gesamtexpression zeigten eine niedrige intratumorale Heterogenität.

6.2 PSGL-1 Expression im Glioblastom

In zurückliegenden Studien unserer Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass es in der Zirkulation von GBM-Patienten zu einer reduzierten Plättchen-Monozyten-Konjugatbildung kommt, obwohl die Thrombozyten stark aktiviert sind [93]. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine reduzierte Expression von PSGL-1 auf den Monozyten. Plättchen-Monozyten-Konjugate sind in der Lage, zirkulierende Monozyten von einem normalen ($CD14^+/CD16^-$) in einen proinflammatorischen Phänotyp ($CD14^+/CD16^+$) zu verwandeln [150]. Darüber hinaus zeigten neben den Monozyten auch intratumorale Makrophagen durchflusszytometrisch eine reduzierte PSGL-1 Expression (bisher nicht publizierte Daten Frederik Kinnen). De Boeck et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass BMDM (medullär entstandene Makrophagen), die das GBM infiltrieren, eine deutlich niedrigere Expression des PSGL-1-kodierenden Gens *Selplg* aufweisen [151]. Die Immunhistochemische Analyse von $n = 21$ Patienten, von denen elf Patienten im Vorgängerprojekt ebenfalls durchflusszytometrisch ausgewertet wurden, ergab eine nicht signifikant höhere PSGL-1 Expression bei Glioblastom-Patienten im Vergleich zu nicht-neoplastisch veränderten Gehirnen aus Sektionsfällen. Gegenüber dem Makrophagenmarker CD163 war die PSGL-1-Expression hochsignifikant reduziert. Im Vergleich zur CD68-Expression zeigte sich eine tendenziell - aber nicht signifikant - niedrigere PSGL-1 Expression. Dass Makrophagen und Mikrogliazellen einen hohen Anteil ($\sim 30 - 40\%$) an der Tumormasse des Glioblastoms ausmachen, zeigen zuvor auch verschiedene andere Studien [71]. Bezogen auf die hohe Dichte an myeloischen Zellen ist die PSGL-1-Expression jedoch sehr niedrig, womit sich die Aussagen aus dem Vorgängerprojekt validieren ließen. Diese Erkenntnis ließ sich durch IF-Färbungen von weiteren $n = 11$ Patienten reproduzieren. Hierbei gehörte PSGL-1, als einer von 12 weiteren Markern, zur Gruppe der am niedrigsten exprimierten Antigene neben MHC-II, CD16 und CD68. Es ist bekannt, dass PSGL-1 auf zahlreichen verschiedenen Zellarten exprimiert wird, darunter dendritischen Zellen, $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^-$ T-Zellen, Neutrophilen, regulatorischen T-Zellen, hämatopoetischen Stammzellen, Monozyten und Makrophagen [86, 152-155]. Allerdings sollte bedacht werden, dass die PSGL-1-Expression auf T-Zellen zuerst einer posttranslationalen Modifikation bedarf, bevor PSGL-1 Selektine binden kann, um ins Gewebe zu migrieren [155, 156]. Es kann davon ausgegangen werden, dass immunhistochemisch somit weniger PSGL-1-positive T-Zellen detektiert werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte dies bereits zeigen. Während die PSGL-1-Expression in zirkulierenden T-Zellen erhöht war, zeigte sie sich auf tumor-intrinsischen Lymphozyten reduziert. Dies führt zur Annahme, dass weniger PSGL-1⁺ T-Zellen ins Gewebe migrieren. Diese Erkenntnis könnte, neben der intratumoralen Heterogenität, die Diskrepanz

zwischen der durchflusszytometrischen und immunhistochemischen Messung der GBM-Proben erklären. Der hohe Anteil PSGL-1⁺ T-Zellen in der Zirkulation wird durch die Digestion des hoch vaskularisierten Tumorgewebes teilweise miterfasst. Wohingegen die Blutgefäße bei der Immunhistochemie – aufgrund ihres lediglich kleinen Ausschnittes - nur eine untergeordnete Rolle spielen. Es stellt sich die Frage, warum die PSGL-1-Expression trotz der - anhand CD163-positiver Zellen erkennbaren - hohen Makrophagendichte niedrig ist.

Gerade im Hinblick auf die Leukozytenmigration spielt PSGL-1 eine bedeutende Rolle, womit eine hohe Expression im GBM aufgrund des hohen Vorkommens myeloischer Zellen zu erwarten wäre. PSGL-1 exprimierende Zellen können über die Bindung an P-, L- oder E-Selektinen zunächst auf der Endotheloberfläche adhären und schließlich ins Gewebe migrieren [90]. In Tierversuchen haben Hannahan et al. gezeigt, dass Blutgefäße nicht pathologisch veränderter Gehirne kein P-Selektin auf der Endotheloberfläche exprimieren. Im Gegensatz dazu weisen Tumorgefäße maligner Gliome eine hohe P-Selektinexpression auf [157]. Somit wird den Immunzellen der myeloischen und lymphatischen Zellreihe, neben der durchlässigeren BHS, die Infiltration ins Hirngewebe erleichtert. Am murinen Modell konnten Kronenberg et al. zeigen, dass durch Knock-out des PSGL-1 exprimierenden Gens (*Selplg*) die Leukozytenmigration im Gehirn deutlich abnimmt [158]. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der IF-Färbungen festgestellt werden, dass PSGL-1 clusterartig an gefäßförmigen Strukturen verstärkt exprimiert war (Abbildung 6.1). Es entstand der Eindruck, dass die PSGL-1-Dichte mit zunehmender Entfernung von derartigen Strukturen abnahm. Auf Grund der Tatsache, dass kein Gefäßmarker, wie zum Beispiel CD31, mitgefärbt wurde, lässt sich jedoch nicht mit Sicherheit sagen, ob die PSGL-1-expressionsstarken Areale mit vaskulären bzw. perivaskulären Nischen zusammenhängen. Zu ähnlicher Erkenntnis – einer perivaskulärer Akkumulation CD204⁺ und Iba-1⁺ Zellen – kamen Sörensen et al. ebenfalls ohne Anfärbung eines Gefäßmarkers [129]. Dies stellt jedoch keine Legitimation dar von Gefäßanfärbungen abzusehen. Darüber hinaus konnten Laszik et al. anhand von immunhistochemischen Färbungen an humanen pathologisch veränderten Geweben zeigen, dass vaskuläre Endothelien mit PSGL-1 anfärbbar waren [156]. Dies ist nachvollziehbar, da PSGL-1 zur Migration die Selektine bindet, die auf den Endothelien exprimiert werden.

Während der Transmigration der Leukozyten werden die PSGL-1-Proteine aufgrund der Leukozytenpolarisation zur Fortbewegung in das Uropod (Hinterteil der Zelle) verlagert [159]. Die PSGL-1-Expression bleibt jedoch während des gesamten Extravasationsprozesses der Zellen, sowohl intravasal als auch im Zielgewebe, erhalten [156]. Es ist bisher ungeklärt, ob

TAM im Rahmen der Polarisierung und der Veränderung des Rezeptorstatus die PSGL-1-Expression verlieren können.

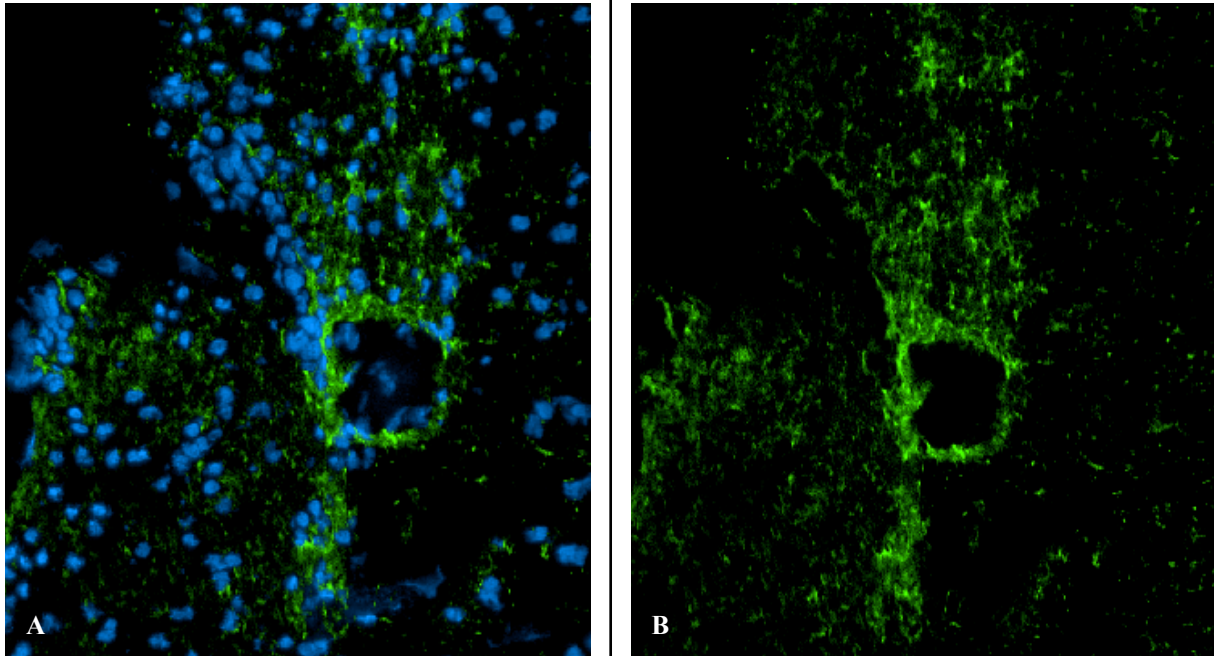


Abbildung 6.1 Clusterartige PSGL-1-Expression des Patienten 8 medial mit DAPI-Zellkernfärbung (A) und ohne (B). Blau = DAPI; Grün = PSGL-1.

Werden hingegen die Daten aus der Durchflusszytometrie mit denen der Immunhistochemie aus den gleichen Patiententumoren miteinander verglichen, muss festgestellt werden, dass sie nicht korrelieren. Hierbei ist zunächst darauf hinzuweisen, dass die Ergebnisse stark von der Qualität des Tumormaterials abhängen. Tumormaterial mit einem hohen Gehalt an Blutgefäßen wird zwangsläufig einen höheren Anteil an lymphatischen und myeloischen Zellen aufweisen als Tumormaterial mit einem hohen Gehalt an Nekrose oder Tumorzellen. Wobei das Vorhandensein von Nekrosen die Durchflusszytometrie vor Schwierigkeiten stellt [160]. Diese Annahme der intratumoralen Heterogenität wird im nachfolgenden Kapitel genauer besprochen. Darüber hinaus wurde das Verhältnis %-positiver Zellen pro Gesamtzellzahl mit der Anzahl positiver Zellen pro mm² Gewebe für die Antigene CD163, PSGL-1 und CD68 verglichen. Die Immunhistochemie betrachtet ausschließlich einen kleinen Ausschnitt aus der gewonnenen Tumorprobe, während die Durchflusszytometrie die gesamte Tumorprobe erfasst. Der Vergleich einer zweidimensionalen Abbildungsanalyse mit einer dreidimensionalen Auswertung kann zu Divergenzen in den Ergebnissen führen [161]. Darüber hinaus wurden für beide Methoden unterschiedliche Anti-PSGL-1-Primär-Antikörper verwendet. Dass die Verwendung verschiedener Klone Auswirkungen auf die Detektion des Zielproteins haben

kann, zeigt die Studie von Parra et al. Hier wurden acht verschiedene Antikörper-Klone zur immunhistochemischen Detektion des PD-L1-Antigens angewendet. Obwohl die meisten Klone vergleichbare Ergebnisse zeigten, waren teilweise deutliche Variationen in der Detektionsfähigkeit vorhanden [162]. Eine ähnliche Studie zur Evaluation der Wirksamkeit unterschiedlicher Anti-PSGL-1-Antikörper-Klone in der IHC oder IF fehlt bis heute. Ursächlich könnte die bisher mangelnde therapeutische Relevanz oder die geringe Nutzung der Immunfärbung des PSGL-1 sein. Die Durchführung der IF-Färbungen mit zwei verschiedenen Anti-PSGL-1-Antikörpern in der vorliegenden Arbeit zeigte die erheblichen Unterschiede in der Farbe -und Detektionsqualität. Während ein Antikörper gute Ergebnisse zeigen konnte, war der zweite Antikörper auf Grund der schlechten Färbungen unbrauchbar. Neben der Qualität der Probe und der gewählten Methodik steht jedoch die Untersuchung des Tumormaterials aus unterschiedlichen Tumorarealen im Vordergrund.

Die proinflammatorische Wirkungsweise des PSGL-1 auf Monozyten und damit die mutmaßliche Erklärung für die reduzierte Expression bei GBM-Patienten erscheint schlüssig, da das GBM für sein immunsuppressives Tumormikromilieu bekannt ist [81, 92, 163]. Die aktuelle Forschung an PSGL-1 auf T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen steht jedoch im Widerspruch zu diesen Erkenntnissen [85, 155, 164, 165]. Es sollte berücksichtigt werden, dass die neuesten Rückschlüsse auf die PSGL-1-Funktion am Mausmodell erfolgt sind. Es gibt Unterschiede zwischen dem murinen und humanen PSGL-1-Protein [155]. Urzainqui et al. zeigten, dass PSGL-1 auf murinen dendritische Zellen immunsuppressive Moleküle wie c-FOS, IDO, IL-10 und TGF- β 1 induziert, sowie die Zahl regulatorischer T-Zellen steigert. PSGL-1-Defizienz zeigte einen gegenteiligen Effekt [166]. Außerdem produzieren T-Zellen von *Selp1g*^{-/-} Mäusen verstärkt die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , INF- γ und IL-2, dies resultierte in einer besseren Tumorkontrolle im Melanom [167]. Im Gegensatz dazu zeigten Yamaoka et al., dass PSGL-1-Defizienz zum Tumorwachstum im murinen Melanom führte [168]. Weiterhin fanden Luo et al. heraus, dass PSGL-1 proinflammatorisches IL-18 über den PI3K-Signalweg induziert [169]. Gleichzeitig kann es die antiinflammatorisch wirksame CSF1-Sekretion über den Syk-Signalweg steigern [170]. Es lässt sich feststellen, dass das immunologische Verhalten im Tumormikromilieu sehr komplex und zum Teil widersprüchlich sein kann. Proteine können sowohl pro -als auch antiinflammatorisch wirksam sein. Aufgrund der insgesamt niedrigen PSGL-1-Expression im GBM könnte von einer eher proinflammatorischen Wirksamkeit auszugehen sein.

6.3 Bedeutung der intratumoralen Heterogenität im Glioblastom

Die fehlende Korrelation zwischen den Ergebnissen der immunhistochemisch und durchflusszytometrisch erhobenen Daten könnte an der Nutzung von Tumorproben aus räumlich unterschiedlichen Tumorearen liegen. Um die Vermutung der intratumoral-räumlichen Unterschiede genauer zu untersuchen, wurden anschließend bei weiteren elf GBM-Patienten Proben aus bis zu sechs Tumorearen anhand von IF-Färbungen untersucht. Die Hauptintention lag in der Veranschaulichung des Tumormikromilieus unter expliziter Betrachtung diverser Makrophagenmarker. Diesen Ansatz der Veranschaulichung der räumlichen Heterogenität innerhalb eines Tumors wurde erstmals in der Studie von Sottoriva et al. aufgenommen [171]. Analog zu der Vorgehensweise der vorliegenden Arbeit haben Sottoriva et al. bis zu sechs Tumorfragmente des soliden Tumorrangewebes unter Aussparung von Nekrosen untersucht. Im Gegensatz zu dieser Arbeit lag der Forschungsschwerpunkt jedoch nicht auf immunhistologischer Ebene, sondern auf der genomischen Analyse auf Einzelzellebene. Dabei konnte gezeigt werden, dass in unterschiedlichen Tumorearen ein und desselben Tumors verschiedene GBM-Subtypen vorlagen [171]. Ein ähnliches Prinzip mit selbiger Erkenntnis verfolgten auch Gill et al., wobei hier das Verhältnis von kontrastmittelanreicherndem Tumorrangewebe zu nicht-kontrastmittelanreicherndem Tumorrangewebe innerhalb eines GBM betrachtet wurde. Hier haben die Autoren sowohl histologische Unterschiede hinsichtlich Immunzellinfiltration und Tumorzellmassen als auch molekulargenetische Unterschiede in Bezug auf GBM-Subtypen gefunden [51]. Diese Erkenntnisse stellen die Erklärungsgrundlage für die intratumorale Heterogenität dar.

Die Erforschung der intratumoralen Heterogenität gewann seit dem letzten Jahrzehnt an Bedeutung. Der Grundstein lag in einer groß angelegten molekulargenetischen Analyse von über 200 GBM durch das „Cancer Genome Atlas Research Network“ [54]. In der Folge wurden auf dessen Basis in anschließenden Studien vier Subtypen definiert und die Relevanz dieser Subtypen für das Glioblastom im Hinblick auf die Pathogenese und die Therapie untersucht [44-47]. Die Auswirkungen der Zusammensetzung unterschiedlicher Makrophagenphänotypen bzw. Makrophagenmarker in bis zu sechs verschiedenen Tumorearen innerhalb eines Tumors wurden bisher nicht untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass hoch exprimierte Makrophagen-Marker eine niedrige intratumorale Heterogenität aufweisen. Das bedeutet, dass Marker mit einer insgesamt hohen Expression im GBM geringe Abweichungen in verschiedenen Tumorearen aufweisen. GFAP als stärkster exprimierter Marker unter den gemessenen Antigenen zeigte die niedrigste intratumorale Heterogenität. Somit war GFAP in den untersuchten Tumorearen der elf Patienten mit verhältnismäßig geringen Abweichungen

exprimiert. In zahlreichen Studien wird gezeigt, dass GFAP von Tumorzellen exprimiert wird [172]. Daher ist nicht überraschend, dass die GFAP-Expression keinen großen Schwankungen unterliegt. Eine hohe Tumorzell-dichte ist in allen Tumorbereichen zu erwarten, da das GBM durch eine hohe Tumormasse charakterisiert ist. Marker mit einer niedrig gemessenen Gesamtexpression, zu denen PSGL-1, CD16, CD68 und MHC-II zählen, fielen durch eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität auf. Dies könnte damit zusammenhängen, dass mehrere GBM-Subtypen gleichzeitig innerhalb eines Tumors vorkommen können, aber ausschließlich der mesenchymale Subtyp durch ein hohes Immunzell-Vorkommen charakterisiert ist [171, 173]. Es sollte bei dieser Studie von Kaffes et al. berücksichtigt werden, dass sowohl T-Zellen als auch TAM gemessen wurden, wobei die TAM nur über Iba-1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*) definiert wurden [173]. Als Limitation der Studie gilt die fehlende Berücksichtigung Iba-1-negativer TAM. Nichtsdestotrotz geht aus der Studie hervor, dass TAM im mesenchymalen Subtyp hochsignifikant am stärksten vertreten sind. Unter der Berücksichtigung, dass innerhalb eines Tumors mehrere Subtypen vorkommen, lässt sich schließen, dass die hohen bzw. niedrigen Expressionsstärken am ehesten Subtyp-spezifisch sind [171, 173]. Aus der Studie von Kaffes et al. lässt sich nicht unmittelbar ableiten, welchen Phänotyp die TAM widerspiegeln. Es ist weiterhin unklar, ob vermehrt antiinflammatorische oder proinflammatorische Makrophagen-Subpopulationen im mesenchymalen GBM-Subtyp vorliegen. Im mesenchymalen GBM-Subtyp spricht eine hohe Immunzell-Dichte für eine vergleichsweise gute Prognose, wohingegen ein erhöhtes Vorkommen des Iba-1 kodierenden Gens (AIF1) im proneuralen GBM-Subtyp mit einer schlechten Prognose korreliert [173]. Allerdings ist das GBM durch ein immunsuppressives Tumormikromilieu charakterisiert, wodurch man von einem verstärkten Vorkommen antiinflammatorischer Makrophagen ausgehen kann [55, 163]. Um die intratumorale Heterogenität und die Expressionsunterschiede der einzelnen Marker besser zu verstehen, sollten sich die histologischen Merkmale des GBM vergegenwärtigt werden. Konkret stehen hier die mikrovaskuläre Proliferation und die Nekrosen im Vordergrund. Aus diesen wurden pathognomonische GBM-Nischen definiert [56]. Dadurch, dass die TAM zu ca. 85 % über die Blutbahn migrieren und nur ca. 15 % residente Makrophagen (Mikroglia) sind, spielt die perivaskuläre Nische eine bedeutende Rolle, denn die Mehrheit der TAM scheint in unmittelbarer Nähe zu Gefäßen liegen [174]. Müller et al. haben in ihrer Studie gezeigt, dass die aus dem Blut stammenden migrierenden Makrophagen verstärkt immunsuppressiv wirksame Zytokine sezernieren. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass TAM in der Lage sind, sowohl proinflammatorische (M1) als auch antiinflammatorische (M2) Gene zu koexprimieren [175]. Diese Erkenntnisse sind kongruent

mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Typische M2-Marker, wie CD163, CD204, CSF1R und Arg1, waren vergleichsweise hoch exprimiert. Angenommen werden kann, dass die Monozyten nach dem Übertritt ins Tumorgewebe nach einem gewissen Zeitraum ihren Phänotyp durch die Interaktion mit neoplastischen Gliomzellen wechseln. Im Verlauf wären somit Makrophagenpopulationen vorhanden, die ausschließlich proinflammatorische Marker exprimieren (M1), die Marker beider Phänotypen koexprimieren und die ausschließlich antiinflammatorische Marker (M2) exprimieren [129, 151]. Dadurch könnte perivaskulär ein minimaler Anteil der Zellen noch proinflammatorisch sein, während der Großteil der Makrophagen bereits in einen veränderten Phänotyp polarisiert sind. Vitale et al. erklären dies durch den hohen Grad an Plastizität der Zellen, auf Reize der Mikroumgebung so schnell zu reagieren und den Phänotypen beziehungsweise das Expressionsprofil zu wechseln [176]. Dies könnte erklären, wie die ausgeprägte intratumorale Heterogenität für proinflammatorische Marker durch die IF-Färbung als Momentaufnahme nachgewiesen werden kann.

Die Dynamik des regional unterschiedlichen Tumormikromilieus wird von zahlreichen Faktoren bestimmt. Dazu gehören die genetische Instabilität der neoplastischen Zellen und das Vorkommen von Wachstumsfaktoren, Nährstoffen und Immunregulatoren [176]. Aufgrund der bedeutenden Relevanz der Zytokine als Kommunikationsmittel wurde in diesem Zusammenhang ebenfalls die Expression und intratumorale Heterogenität von elf Zytokinen untersucht. Ebenso wie die Marker unterlagen die Zytokine auch einer intratumoralen Heterogenität. IL-6 zeigte über die Gesamtheit der gemessenen Proben hinweg die stärkste Expression. Normalerweise ist IL-6 als typisches proinflammatorisches Zytokin bekannt [111, 138]. Ebenso wie TNF- α [139], welches jedoch hier eine insgesamt niedrige Expression zeigte. In der Übersichtsarbeit von Ziegler-Heitbrock et al. wird erläutert, dass nicht-klassische CD16⁺ Monozyten durch eine hohe TNF- α - und IL1-b-Produktion charakterisiert sind [177]. Übereinstimmend zeigte sich in den Ergebnissen dieser Arbeit eine sehr niedrige Gesamtexpression von CD16, womit die niedrige TNF- α Spiegel erklärt werden könnten. Sowohl CD16 als auch TNF- α zeigten synergistisch eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität. Im Tumormikromilieu kann IL-6 auch antiinflammatorisch und tumorsupportiv wirken und die Invasivität des GBM steigern [141, 178]. Aufgrund der ausgeprägten intratumoralen Heterogenität für IL-6 kann von hohen Schwankungen in den verschiedenen Tumorproben ausgegangen werden. In der Studie von De Boeck et al. wird der Einfluss von Zytokinen, hier von speziell aus Gliomzellen stammendem IL-33, auf das Tumormikromilieu und das GBM-Wachstum untersucht. Aus Multiplex-Analysen von Tierversuchen konnten sie zeigen, dass zahlreiche Zytokine, darunter CCL-2, hoch exprimiert im inflammatorischen

Milieu eines rapide progressiven GBM vorkommen. Dies soll auf Gliomzell-Wirtszell-Interaktionen zurückzuführen sein [151]. In unserer Studie zählte CCL-2, neben IL-6 und VEGF, auch zu den am stärksten exprimierten Zytokinen. CCL-2 kann als Parameter für eine verstärkte TAM-Rekrutierung/Invasion gesehen werden [179]. Weiterhin zeigen sie mittels Micro-Array Analysen an 70 humanen GBM-Proben, dass die Makrophagenpolarisation in den M2-Phänotypen und die Rekrutierung tumorassoziierter Makrophagen durch IL-33 induziert wird, womit ein immunsuppressives Tumormilieu geschaffen wird. Demonstriert wird dies in der Studie anhand einer erhöhten CD163- bzw. Arg1-Expression. Analog dazu konnten in unserer Studie ebenfalls eine erhöhte CD163- und Arg1-Expression gezeigt werden. De Boeck et al. haben unter anderem den Einfluss des IL-33 auf die Genexpression sieben verschiedener Mikroglia-Populationen im GBM untersucht. Sie konnten feststellen, dass die Mikroglia-1-Subpopulation am stärksten vertreten und durch eine hohe Expression homöostatischer Gene, wie z.B. *Cx3r1*, *P2ry13* und *Selplg*, gekennzeichnet war. Selbiges Genprofil zeigte die Subpopulation Mikroglia-7. Beide Populationen sind IL-33-unabhängig bzw. aus IL33⁻ Xenograft-Modellen. Die Mikroglia-3/-4 Subpopulation war gekennzeichnet durch eine reduzierte *Selplg*-Genexpression und erhöhte Expression von Zellzyklus-Regulationsgenen/DNA-Replikationsgenen. Die Mikroglia-2-Subpopulation wurde als Gliom-assoziiert beschrieben und hatte einen starken IL-33-Zusammenhang. Diese Population war durch eine hohe CCL-2 Expression und eine Suppression der homöostatischen Gene *Cx3r1*, *P2ry13* und *Selplg* gekennzeichnet [151]. Diese Erkenntnisse bekräftigen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation. Reduzierte *Selplg*-Genexpressionen in Mikroglia-Subpopulationen, z.B. durch IL-33, könnten ein Erklärungsansatz für die intratumorale Heterogenität des PSGL-1 sein. IL-33 ist in der Lage, das PSGL-1 exprimierende Gen zu supprimieren. Gleichzeitig kann IL-33 die CCL-2 Sekretion steigern. Die Ergebnisse einer insgesamt reduzierten PSGL-1-Expression und einer erhöhten CCL-2-Expression konnten in der Dissertation ebenfalls nachgewiesen werden. Die IL-33⁻ Mikroglia-6-Subpopulation war durch eine hohe MHC-Expression charakterisiert [151]. Die Heterogenität der Mikrogliazell-Populationen hat einen wesentlichen Einfluss auf die intratumoral unterschiedlich zu messenden Antigenstärken. Die Regulation dieser Populationen durch Zytokine und Chemokine unterstreicht die Annahme, dass das Tumormikromilieu einer bedeutenden Dynamik unterliegt. Wenngleich es nicht möglich ist, alle bekannten Zytokine gleichzeitig zu messen, zeigt uns die Studie beispielhaft die Komplexität des Tumors sowie die variable Auswirkung bestimmter Zytokine auf verschiedene Zellpopulationen.

6.4 Heterogenität und Polarisationspektren intratumoraler Makrophagen

Als größte nicht-neoplastische Zellpopulation im GBM sind TAM mit ca. 40 %, ein wichtiger Bestandteil des Tumormikromilieus [56, 70, 133]. Sie setzen sich aus residenten Mikrogliazellen und aus dem Blut migrierende Makrophagen zusammen [75]. Die Heterogenität der Makrophagenphänotypen wurde historisch stark vereinfacht in einen proinflammatorischen/antitumoralen M1- und antiinflammatorischen/tumorsupportiven M2-Phänotypen differenziert. RNA-Sequenzierungen konnten zeigen, dass in vivo vielmehr ein dynamisches Mischbild dieser Phänotypen vorliegt, womit die frühere Einteilung überholt scheint [55]. In der vorliegenden Dissertation wurden elf verschiedene Makrophagenmarker hinsichtlich ihrer Expressionsstärke und intratumoralen Heterogenität untersucht. Darunter waren sowohl Antigene, die eher einem antiinflammatorischen Spektrum zugeordnet werden als auch solche, die einem proinflammatorischen Spektrum angehören. Die stärkste Expression unter den Markern lag bei CCR7. CCR7 wird in zahlreichen Studien dem proinflammatorischen M1-Phänotyp zugeordnet [119, 120]. Kwiecien et al. konnten in ihrer Studie zum Lungenkarzinom zeigen, dass drei verschiedene Makrophagenpopulationen auftraten: CCR7⁺/CD163⁺, CCR7_{low}/CD163⁺ und CCR7⁺/CD163_{low}. Im Bereich des Tumors traten überwiegend CCR7_{low}/CD163⁺ (M2) auf, während in gesunden Lungenabschnitten CCR7⁺/CD163_{low} (M1) vorlagen [180]. Im Gegensatz dazu haben Zheng et al. im GBM zeigen können, dass eine hohe CCR7-Expression über TGF-β1 den NFκB-Signalweg aktiviert und somit die Invasivität und Migration der Gliom-Zellen steigert [123]. Diese Hypothese lässt sich teilweise mit den Ergebnissen dieser Dissertation vereinbaren. Die hohe CCR7-Expression ging nicht mit einer hohen TGF-β1 -Expression einher. Ganz im Gegenteil wurde in der vorliegenden Arbeit nur eine insgesamt niedrige TGF-β1 -Gesamtexpression gemessen. Es sollte berücksichtigen, dass die Studie von Zheng et al. in vitro an zwei GBM-Zelllinien erfolgte. Die Übertragbarkeit auf das komplexe Tumormikromilieu ist damit zu hinterfragen. Andererseits sollte beachtet werden, dass die Messung der CCR7-Expression in der vorliegenden Arbeit an IF-Färbungen erfolgte und die Zytokin-Messung am Durchflusszytometer. Die jeweiligen Proben stammen zwar jeweils vom gleichen Patienten und benachbarten Tumorregionen, die Vergleichbarkeit im Hinblick auf die Expressionsstärken zeigt damit jedoch Schwächen. Aufgrund der Diversität der CCR7-Expression in verschiedenen Zellpopulationen lässt sich somit nicht eindeutig sagen, ob die hohe Expression in der vorliegenden Arbeit ausschließlich durch Makrophagen zustande kam. Dies gilt auch für die Frage, ob die Zellen in einem pro- oder antiinflammatorischen Phänotypen vorliegen. Zu weiteren Markern, die eher dem proinflammatorischen Spektrum zugeordnet werden, gehören PSGL-1, MHC-II, CD68, iNOS

und CD16 [92, 109, 117, 124, 181]. PSGL-1 wurde in einem separaten Abschnitt bereits abgehandelt. Hierbei zeigte iNOS eine hohe Expression, während die anderen drei Marker eine niedrige Gesamtexpression aufwiesen. Eyler et al. konnten in ihrer Studie nachweisen, dass Gliom-Stammzellen (CD133⁺) iNOS exprimieren und somit die Proliferation und das Tumorwachstum steigern. Sie zeigten, dass eine hohe iNOS-Expression mit einer geringeren Überlebenszeit korrelierte [182]. Übereinstimmend zeigte sich in der vorliegenden Arbeit die hohe iNOS-Expression auf den IF-Färbungen in Bereichen mit hoher GFAP-Expression. Häufig war aufgrund des hohen GFAP-Gehalts (durch Färbung der Zellfortsätze tieferer Schichten) jedoch schwer zu unterscheiden, ob es sich dabei um eine Koexpression handelte. Bis heute ist es schwierig, Gliom-Stammzellen zu charakterisieren, da für das Glioblastom bisher kein eindeutiger Stammzellmarker etabliert werden konnte [174]. Der genutzte CD133-Marker für die Identifizierung der Stammzellen ist umstritten [183]. Dies sollte bei der Studie von Eyler et al. berücksichtigt werden. Es ist möglich, dass eine Vielzahl von Tumorzellen nicht erfasst wurde und deren iNOS-Expression bzw. Relevanz unklar ist.

CD16 wird vordergründig auf Monozyten, NK-Zellen und Makrophagen exprimiert [184]. Auf Monozyten spricht die CD16-Expression für einen proinflammatorischen Phänotyp [177]. Monozyten differenzieren nach Migration ins Gewebe in Makrophagen. Es gibt bisher keine Studien, die die CD16-Expression auf Makrophagen im GBM untersuchen. Krasnova et al. konnten in ihrer Studie am menschlichen Fettgewebe CD16⁺ Makrophagen nachweisen, die einen proinflammatorischen Phänotyp widerspiegeln [117]. Es wäre ohnehin schwierig, anhand von IF-Färbungen Monozyten im GBM-Gewebe nachzuweisen, da es stark vom Vorkommen von Blutgefäßen abhängig wäre. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine niedrige CD16-Expression vorliegt. Es ist nicht möglich, zu sagen, welche Zellart CD16 exprimiert. Für die Beurteilung der NK-Zellen fehlt CD56 als Marker und für die Monozyten fehlt CD14.

In der Publikation von Chavez-Galan et al. werden iNOS, MHC-II und CD68 zu typischen M1-Markern gezählt [181]. In zahlreichen anderen Studien wird CD68 als Pan-Makrophagen-Marker zur Makrophagen-Identifizierung genutzt, unabhängig des Phänotyps [96-98]. Es wird allerdings darauf hingewiesen, dass sich CD68 nicht so gut dafür eigne, wie z.B. CD163 [103, 178]. Dieser Eindruck wird unter Betrachtung der Ergebnisse der Abbildung 5.1 ebenfalls vermittelt. Die hohe Zelldichte der CD68⁺- und CD163⁺- Zellen ist in den gleichen Bereichen der IHC-Färbung zu erkennen, wobei CD163 deutlich stärker exprimiert ist. Außerdem wird CD68, wie auch bei einigen anderen proinflammatorischen Markern gezeigt wurde, auf Gliom-Zellen exprimiert. Dies lässt sich übereinstimmend an der Abbildung 5.13 bestätigen. In der

Abbildung kann eine pseudopalisadenförmige Anordnung CD68-positiv gefärbter Tumorzellen um ein nekrotisches Areal erkannt werden, womit ein typisches histopathologisches Charakteristikum des GBM ausgeprägt wird [56]. Des Weiteren war dieser Bereich im Serienschnitt durch eine hohe GFAP-Expression charakterisiert. Dieses Färbecharakteristikum haben auch Bergmann et al. in ihrer Studie beschrieben [185]. Passend dazu ist innerhalb des nekrotischen Areals CD204 exprimiert, da CD204-exprimierende Zellen als Mitglieder der Familie der Scavenger-Rezeptoren in der Lage sind, Liganden zu binden und zu internalisieren, darunter apoptotische Zellen, modifizierte Moleküle und Myelin [128, 186].

Im Hinblick auf den Marker MHC-II konnten die Studien von Schartner et al. und Szatmári et al. am murinen Modell zeigen, dass die Expression reduziert ist [112, 187]. Während Szatmári et al. nachweisen konnten, dass die MHC-II-Expression auf den Tumorzellen durch Interferon-gamma (IFN- γ)-Gabe gesteigert werden kann, resultierte bei Schartner et al. trotz LPS und INF- γ kein MHC-II-Anstieg auf Makrophagen und Mikroglia. Es sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass Szatmári et al. nur eine bestimmte Glioblastom-Zelllinie (GI261) als murines Tumormodell untersucht haben. Allgemeine Rückschlüsse auf das humane Glioblastom sind damit eingeschränkt. Nichtsdestotrotz wird anhand beider Studien klar, dass MHC-II im GBM eine reduzierte Expression aufzuweisen scheint – dies kann anhand der vorliegenden Dissertation am humanen GBM bestätigt werden. Zudem wird deutlich, dass auch MHC-II als proinflammatorischer Marker auf Tumorzellen exprimiert werden kann. Sörensen et al. konnten in ihrer Studie am humanen GBM zeigen, dass MHC-II auf M2 (antiinflammatorischen) Makrophagen reduziert exprimiert ist. Allerdings waren MHC-II und CD204 im Durchschnitt bei 44 % (Spannweite: 3 % bis 85 %) der Zellen koexprimiert, womit die Vermutung nahe liegt, dass die Makrophagen einer gewissen Dynamik im Phänotyp unterliegen [129]. In derselben Studie haben die Autoren mithilfe von IF-Färbungen an humanen GBM-Proben demonstriert, dass CD204 (als M2-Marker) mit steigender Malignität des Hirntumors stärker exprimiert wird. Die stärkste Expression findet sich im Glioblastom wieder. Darüber hinaus ist die hohe CD204-Expression mit einer schlechteren Prognose und einer kürzeren Überlebenszeit verbunden. Weiterhin konnten sie für CD204 eine inter- und intratumorale Heterogenität nachweisen. In der Studie wurde zwar nur Tumorzentrum mit Tumorpheripherie verglichen, allerdings wurde dabei schon eine intratumorale Heterogenität des Markers deutlich. In der vorliegenden Dissertation konnte die inter- und intratumorale Heterogenität an bis zu sechs Tumorarealen von n = 11 Patienten deutlich gezeigt werden. Außerdem konnte CD204 als stärkster antiinflammatorischer Marker unter den untersuchten Antigenen nachgewiesen werden. Um

den Zusammenhang der CD204-Expression mit der Überlebenszeit zu korrelieren, wäre in dieser Arbeit eine größere Stichprobe nötig gewesen.

Zu den weiteren antiinflammatorischen Makrophagen-Markern aus der vorliegenden Dissertation gehören CD163, CSF1R, Arg1 und CD206. Für alle genannten Marker wurde in Studien ein M2-Phänotyp beschrieben [101, 120, 131]. Bis auf CD206 zeigten die antiinflammatorischen Marker eine hohe Gesamtexpression. Obwohl beschrieben wurde, dass CD206 durch IL-6 induziert werden kann und in der vorliegenden Arbeit IL-6 die stärkste Expression aufwies, blieb die CD206-Expression verhältnismäßig gering [130]. Zugrunde liegen könnte die IF-Färbung. Es ist denkbar, dass einige Zellen nur eine niedrige MFI hatten und somit durch das algorithmenbasierte Analyseprogramm nicht erkannt wurden bzw. gegen die negative Kontrolle herausgerechnet wurden. Weiterhin postulieren Gabrusiewicz et al., dass CD206 und CD163 in geringerem Ausmaß auf Mikrogliazellen exprimiert werden [120], wodurch ein niedrigeres CD206-Vorkommen zum Teil erklärt werden könnte.

CD163 gehörte in der vorliegenden Dissertation, nach CD204, zum zweitstärksten antiinflammatorischen Makrophagenmarker. Die ausgesprochen hohe CD163-Expression lässt sich teilweise durch die Erkenntnisse aus der Studie von Gabrusiewicz et al. erklären, in der eine gesteigerte CD163-Genexpression in CD14⁺ Monozyten nachgewiesen wird. GBM-Patienten weisen ohnehin eine gesteigerte Monozyten-Zellzahl auf [120]. Nach Migration der Monozyten ins Tumorgewebe durch die gesteigerte Permeabilität der BHS könnten sie somit in den antiinflammatorischen Phänotyp ausdifferenzieren. In den IHC-Färbungen wird die bemerkenswerte Dominanz des CD163-Antigens gegenüber CD68 deutlich. Wie weiter oben bereits beschrieben, zeigen sich Bereiche mit gleichzeitig hoher CD68- und CD163-Zelldichte auf den gefärbten Objektträgern. Man kann somit annehmen, dass die beiden Antigen koexprimiert vorliegen können. Obwohl CD163 in zahlreichen Studien dem antiinflammatorischen Phänotyp zugeordnet wird, demonstrieren einige Autoren die Fähigkeit CD163⁺-Makrophagen, proinflammatorische Zytokine und Antigene zu sezernieren bzw. zu exprimieren [103, 106]. Allerdings beziehen sich diese Studien auf extrakranielle, nicht-maligne Erkrankungen, womit eine Übertragbarkeit auf das GBM anzuzweifeln ist. Darüber hinaus zeigen Auswertungen der TCGA-Datenbank, dass eine hohe CD163-Expression mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert ist [101].

Die ermittelte Steigerung der CSF1R-Expression in dieser Dissertation wird in diversen soliden Tumorarten mit einer schlechten Prognose korreliert [132]. Daher wurden Therapieversuche mit CSF1R-Inhibitoren unter anderem im GBM durchgeführt, um die Polarisation der

Makrophagen in den antiinflammatorischen M2-Typ zu verhindern [131]. Ursächlich für die gescheiterte Studie mit CSF1R-Inhibitoren im GBM könnte unter anderem die intratumorale Heterogenität des CSF1R sein, die anhand dieser Arbeit verdeutlicht werden konnte. Die Differenzierung ist nicht ausschließlich vom CSF1R abhängig, denn auch das Tumormikromilieu mit niedrigem CSF1-Rezeptorvorkommen wird durch antiinflammatorisch polarisierte Makrophagen geprägt.

6.5 Limitationen der Arbeit

Die intratumorale Heterogenität schließt den interindividuellen Vergleich der Patienten aus. Dies begründet sich in den unterschiedlichen intrakraniellen Lokalisationen der Tumoren sowie der fehlenden Möglichkeit, die Tumorproben stets aus exakt demselben Areal zu entnehmen. Darüber hinaus ist bei der Durchführung von Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten die Gewebemorphologie kaum beurteilbar. Zudem spielt die Autofluoreszenz des Hirngewebes eine zentrale Rolle. Die Fixierung mit Aceton senkt zwar die Autofluoreszenz, es kommt aber gleichzeitig auch zur Interaktion mit den Antigenen und Färbungs-Antikörpern, wodurch das Färbeverhalten möglicherweise beeinflusst wird. Die meisten Antikörper sind für Färbungen mit einer PFA-Fixierung ausgelegt.

Bei der systematischen Färbung der zahlreichen Antigene konnten nur maximal drei verschiedene Antigene gleichzeitig angefärbt werden. Dadurch ist die Beurteilbarkeit von Koexpressionen der Antigene nur eingeschränkt bzw. nicht möglich. Um alle Antigene anzufärben, inklusive der Kontrollfärbung, waren sechs Serienschnitte notwendig. Somit lagen der erste und letzte Schnitt 30 µm voneinander entfernt.

Anhand der Färbung in der Analyse konnte nicht beurteilt werden, ob das Antigen von einer Immunzelle oder einer Tumorzelle exprimiert wird. Es konnte zwar der Anteil des Antigens im Gewebe bestimmt werden, allerdings nicht, wie viel davon Tumorzellen beziehungsweise Immunzellen sind. Nach wie vor existiert kein Tumorstammzellmarker für Gliomzellen. Um die quantitative Analyse der zahlreichen Färbungen zwischen den einzelnen Proben vergleichbar machen zu können, wurden alle Färbungen mit der gleichen Analyse ausgewertet. In manchen Fällen konnte bei der Segmentierung der Zellkerne durch die Vielzahl der Zellen eine Überlagerung von Zellkernen - und damit die Zuordnung der Färbung zu mehr als einer Zelle - nicht verhindert werden.

Durch die fehlenden Gefäßmarker, wie zum Beispiel CD31, konnte keine Aussage über die Expression in Abhängigkeit von der Vaskularisation des Gewebes getroffen werden.

Da von jeder Färbung nur ein Replikat vorlag und die Patientenproben biologisch nicht vergleichbar sind, konnte für die Auswertung der intratumoralen Heterogenität keine Statistik durchgeführt werden. Die statistische Auswertung einer einzelnen Färbung würde durch die hohe Zellzahl ohnehin stets statistisch hoch signifikant sein und damit obsolet. Anhand der durchflusszytometrischen Messung der Gewebekultur-Überstände lässt sich nicht beurteilen, welche Zellen das Zytokin sezerniert haben und welche Zielwirkung beabsichtigt wird.

6.6 Fazit

Die vorliegende Dissertation untersucht basierend auf Erkenntnissen aus einem Vorgängerprojekt die intratumorale Heterogenität von PSGL-1 und weiteren Markern tumorassoziierter Makrophagen sowie einem breiten Spektrum von Zytokinen. Hierbei wurden nicht nur Unterschiede hinsichtlich der Methodik von IHC, Durchflusszytometrie sowie IF beleuchtet, sondern auch die Relevanz der Entnahmestelle einer Tumorprobe. Darüber hinaus wurde untersucht, welchem Phänotyp die TAM unterstehen.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Lokalisation der Probeentnahme aus dem Tumor einen wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung des Tumormikromilieus hat. Anhand der Untersuchung von bis zu sechs Tumorproben eines GBM konnte gezeigt werden, dass die Expressionsstärken in den verschiedenen Tumorebenen stark variieren können. Die Ursache liegt hierbei in der Existenz von mehreren Tumorsubtypen innerhalb eines GBM. Während der mesenchymale Subtyp durch eine hohe Immunzellendichte charakterisiert wird und somit eine deutlich höhere Expressionsstärke der TAM-Marker aufweist, zeigt der neurale oder klassische Subtyp ein geringes Immunzellvorkommen mit niedrigeren Expressionsstärken. Diese Erkenntnis konnte erklären, weshalb die Untersuchung derselben Antigene (CD68, CD163, PSGL-1) mithilfe der IHC und FACS innerhalb eines Tumors nicht miteinander korrelierten. Darüber hinaus unterliegen die Entwicklung und die Zusammensetzung des Tumormikromilieus einer komplexen Dynamik, die durch eine Vielzahl verschiedener Zelltypen bestimmt und beeinflusst wird. Als einer der wichtigsten Regulatoren gelten Zytokine, die in der Lage sind, Immunzellen zu rekrutieren, ihren Zellphänotypen zu verändern und somit zu bestimmen, ob das Tumormikromilieu pro- oder antitumoral geprägt ist. Vor dem Hintergrund, dass jede Zelle in der Lage ist, Zytokine zu sezernieren, ist es nicht verwunderlich, dass auch bei den Zytokinen eine intratumorale Heterogenität vorliegt. Nichtsdestotrotz waren die antiinflammatorischen Oberflächenmarker und Zytokine aufgrund des immunsuppressiven Tumormikromilieus am stärksten vertreten. Proinflammatorische Marker, die hohe Expressionen aufwiesen, können unter anderem durch Tumorzellen exprimiert werden und zur Invasivität und Progression des Tumors beitragen.

Die intratumorale Heterogenität ist von entscheidender Bedeutung in Bezug auf die Tumorentstehung, das Tumorwachstum und die Therapieresistenz. Sie zeigt die Limitation vergangener Studien im Hinblick auf die Beurteilung des Tumorverhaltens auf. Aufgrund der hohen Relevanz der GBM-Subtypen sowohl für Prognose als auch die Zusammensetzung des Tumormikromilieus sollte in zukünftigen Studien das GBM sowohl molekulargenetisch als auch immunhistologisch aus mehreren Entnahmestellen aufgearbeitet werden. Studien mit nur

einer Probe pro Tumor sind nicht vertretbar. Durch den hohen Anteil von bis zu 50 % der Gesamtzellzahl stellen TAM ein mögliches Therapieziel dar. Die räumliche und zeitliche intratumorale Heterogenität sollte bei der Entwicklung individualbasierter Therapien stets berücksichtigt werden.

7 Zusammenfassung

Das Glioblastom (WHO Grad IV) ist der häufigste und aggressivste hirneigene Tumor des erwachsenen Menschen. Trotz Standardtherapie, bestehend aus neurochirurgischer Resektion aller im MRT kontrastmittelaufnehmenden Tumoranteile, Radiotherapie und Chemotherapie mit Temozolomid, liegt das mittlere Überleben der Patienten bei nur knapp über einem Jahr.

In früheren Arbeiten unserer Gruppe wurde die PSGL-1-Expression auf Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) mittels FACS und Immunhistochemie (IHC) untersucht. Die FACS- und IHC-Ergebnisse korrelierten nicht miteinander, da die Proben für beide Methoden aus unterschiedlichen Regionen im Tumor stammten. Die vorliegende Studie zielte darauf ab, die intratumorale Heterogenität sowie Phänotypen von TAM und Zytokinen beim GBM mit besonderem Fokus auf der PSGL-1-Expression zu untersuchen. Tumorproben von elf GBM-Patienten wurden zum Zeitpunkt der Erstdiagnose unter neuronavigatorischer Anleitung aus bis zu sechs verschiedenen definierten Regionen pro Tumor des kontrastverstärkten Tumorrandes gewonnen. Anschließend wurden die Proben sofort eingefroren. Insgesamt 12 Antigene wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung (IF) als Komplett-Aufnahmen von Gewebeschnitten mikroskopiert und digital zusammengefügt. Die IF-Analyse erfolgte ausschließlich Algorithmus-basiert. Die Flüssigkeitsüberstände der 24-stündig inkubierten Tumorproben wurden durchflusszytometrisch gemessen. Die Gesamtexpressionsintensitäten sowie die Heterogenität der Expressionen zwischen verschiedenen Regionen eines Tumors wurde formelbasiert quantifiziert. Erwartungsgemäß zeigte sich GFAP als Tumorzellmarker mit dem höchsten Expressionsniveau über alle Patienten und Probenorte hinweg. Ein mittleres Expressionsniveau zeigte sich für CCR7, CD204, Arg1, iNOS, CD163 und CSF1R. MHC-II, CD206, CD16 und CD68 gehörten zu den niedrig exprimierten Antigenen. Interessanterweise zeigten diese niedrig exprimierten Antigene den höchsten Score bei der Bewertung der intratumoralen Heterogenität. Die geringste intratumorale Heterogenität wurde bei der GFAP-Expression gesehen (Score 5,5).

Die vorliegende Studie zeigt eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität der gemeinsamen Oberflächenexpressionsmarker von TAM sowie der Zytokine im GBM. Insbesondere niedrig exprimierte Antigene, wie PSGL-1, weisen eine hohe intratumorale Heterogenität auf. Dennoch haben die TAM einen überwiegend antiinflammatorischen Phänotyp. Dies zeigt, dass immunologische Studien mit einer Probe pro Tumor in ihrer Aussagekraft eher begrenzt sind.

8 Literaturverzeichnis

1. Chen, H., et al., *Glioblastoma multiforme presenting with ischemic stroke: case report and review of the literature*. J Neuroradiol, 2011. **38**(5): p. 304-7.
2. Schwartzbaum, J.A., et al., *Epidemiology and molecular pathology of glioma*. Nat Clin Pract Neurol, 2006. **2**(9): p. 494-503; quiz 1 p following 516.
3. Agnihotri, S., et al., *Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013. **61**(1): p. 25-41.
4. Davis, F.G., et al., *Glioblastoma incidence rate trends in Canada and the United States compared with England, 1995-2015*. Neuro Oncol, 2020. **22**(2): p. 301-302.
5. Wen, P.Y. and S. Kesari, *Malignant gliomas in adults*. N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 492-507.
6. Carlsson, S.K., S.P. Brothers, and C. Wahlestedt, *Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme*. EMBO Mol Med, 2014. **6**(11): p. 1359-70.
7. Razavi, S.M., et al., *Immune Evasion Strategies of Glioblastoma*. Front Surg, 2016. **3**: p. 11.
8. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Epidemiology and etiology of gliomas*. Acta Neuropathol, 2005. **109**(1): p. 93-108.
9. Tamimi, A.F. and M. Juweid, *Epidemiology and Outcome of Glioblastoma*, in *Glioblastoma*, S. De Vleeschouwer, Editor. 2017: Brisbane (AU).
10. Thakkar, J.P., et al., *Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. **23**(10): p. 1985-96.
11. Chakrabarti, I., et al., *A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974-1999*. Cancer, 2005. **104**(12): p. 2798-806.
12. Nakada, M., et al., *Aberrant signaling pathways in glioma*. Cancers (Basel), 2011. **3**(3): p. 3242-78.
13. Wrensch, M., et al., *The molecular epidemiology of gliomas in adults*. Neurosurg Focus, 2005. **19**(5): p. E5.
14. Hochberg, F., et al., *Nonoccupational risk indicators of glioblastoma in adults*. J Neurooncol, 1990. **8**(1): p. 55-60.
15. Sadetzki, S., et al., *Description of selected characteristics of familial glioma patients - results from the Gliogene Consortium*. Eur J Cancer, 2013. **49**(6): p. 1335-45.
16. Malmer, B., et al., *GLIOGENE an International Consortium to Understand Familial Glioma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(9): p. 1730-4.
17. Omuro, A. and L.M. DeAngelis, *Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review*. JAMA, 2013. **310**(17): p. 1842-50.
18. Hanif, F., et al., *Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment*. Asian Pac J Cancer Prev, 2017. **18**(1): p. 3-9.
19. Alexander, B.M. and T.F. Cloughesy, *Adult Glioblastoma*. J Clin Oncol, 2017. **35**(21): p. 2402-2409.
20. Nelson, S.J. and S. Cha, *Imaging glioblastoma multiforme*. Cancer J, 2003. **9**(2): p. 134-45.
21. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 803-20.
22. Louis, D.N., et al., *cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading*. Brain Pathol, 2020. **30**(4): p. 844-856.

23. Brat, D.J., et al., *cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV"*. Acta Neuropathol, 2018. **136**(5): p. 805-810.
24. Ahmadipour, Y., et al., *Does the expression of glial fibrillary acid protein (GFAP) stain in glioblastoma tissue have a prognostic impact on survival?* Neurochirurgie, 2020. **66**(3): p. 150-154.
25. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
26. Stupp, R., 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*. Lancet Oncol, 2009. **10**(5): p. 459-66.
27. Malmstrom, A., et al., *Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(9): p. 916-26.
28. Orringer, D.A., A. Golby, and F. Jolesz, *Neuronavigation in the surgical management of brain tumors: current and future trends*. Expert Rev Med Devices, 2012. **9**(5): p. 491-500.
29. Nimsky, C., et al., *Intraoperative visualization for resection of gliomas: the role of functional neuronavigation and intraoperative 1.5 T MRI*. Neurol Res, 2006. **28**(5): p. 482-7.
30. Ganslandt, O., et al., *Neuronavigation: concept, techniques and applications*. Neurol India, 2002. **50**(3): p. 244-55.
31. Wirtz, C.R., et al., *The benefit of neuronavigation for neurosurgery analyzed by its impact on glioblastoma surgery*. Neurol Res, 2000. **22**(4): p. 354-60.
32. Senft, C., et al., *Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial*. Lancet Oncol, 2011. **12**(11): p. 997-1003.
33. Sang, S., et al., *Clinical Long-Term Follow-Up Evaluation of Functional Neuronavigation in Adult Cerebral Gliomas*. World Neurosurg, 2018. **119**: p. e262-e271.
34. Stummer, W., et al., *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial*. Lancet Oncol, 2006. **7**(5): p. 392-401.
35. Cloughesy, T.F., W.K. Cavenee, and P.S. Mischel, *Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 1-25.
36. Walker, M.D., et al., *Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery*. N Engl J Med, 1980. **303**(23): p. 1323-9.
37. Denny, B.J., et al., *NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA*. Biochemistry, 1994. **33**(31): p. 9045-51.
38. Gerson, S.L., *MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(4): p. 296-307.
39. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
40. Tarhini, A.A. and F. Iqbal, *CTLA-4 blockade: therapeutic potential in cancer treatments*. Onco Targets Ther, 2010. **3**: p. 15-25.
41. Luke, J.J. and P.A. Ott, *PD-1 pathway inhibitors: the next generation of immunotherapy for advanced melanoma*. Oncotarget, 2015. **6**(6): p. 3479-92.
42. Mathewson, N.D., et al., *Inhibitory CD161 receptor identified in glioma-infiltrating T cells by single-cell analysis*. Cell, 2021. **184**(5): p. 1281-1298 e26.

43. Brat, D.J., et al., *cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas*. Acta Neuropathol, 2020. **139**(3): p. 603-608.
44. Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 98-110.
45. Brennan, C.W., et al., *The somatic genomic landscape of glioblastoma*. Cell, 2013. **155**(2): p. 462-77.
46. Patel, A.P., et al., *Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma*. Science, 2014. **344**(6190): p. 1396-401.
47. Wang, Q., et al., *Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment*. Cancer Cell, 2017. **32**(1): p. 42-56 e6.
48. Nounshmehr, H., et al., *Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma*. Cancer Cell, 2010. **17**(5): p. 510-22.
49. Phillips, H.S., et al., *Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 157-73.
50. Huse, J.T., H.S. Phillips, and C.W. Brennan, *Molecular subclassification of diffuse gliomas: seeing order in the chaos*. Glia, 2011. **59**(8): p. 1190-9.
51. Gill, B.J., et al., *MRI-localized biopsies reveal subtype-specific differences in molecular and cellular composition at the margins of glioblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(34): p. 12550-5.
52. Sottoriva, A., C.P. Barnes, and T.A. Graham, *Catch my drift? Making sense of genomic intra-tumour heterogeneity*. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2017. **1867**(2): p. 95-100.
53. Teng, J., et al., *Dissecting inherent intratumor heterogeneity in patient-derived glioblastoma culture models*. Neuro Oncol, 2017. **19**(6): p. 820-832.
54. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.
55. Chen, Z. and D. Hambardzumyan, *Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1004.
56. Hambardzumyan, D. and G. Bergers, *Glioblastoma: Defining Tumor Niches*. Trends Cancer, 2015. **1**(4): p. 252-265.
57. Calabrese, C., et al., *A perivascular niche for brain tumor stem cells*. Cancer Cell, 2007. **11**(1): p. 69-82.
58. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal-redux*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(1): p. 1-11.
59. Feng, X., et al., *Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis*. Oncotarget, 2015. **6**(17): p. 15077-94.
60. Liang, J., et al., *Neutrophils promote the malignant glioma phenotype through S100A4*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(1): p. 187-98.
61. Wippold, F.J., 2nd, et al., *Neuropathology for the neuroradiologist: palisades and pseudopalisades*. AJNR Am J Neuroradiol, 2006. **27**(10): p. 2037-41.
62. Brat, D.J. and E.G. Van Meir, *Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma*. Lab Invest, 2004. **84**(4): p. 397-405.
63. Seidel, S., et al., *A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha*. Brain, 2010. **133**(Pt 4): p. 983-95.

64. Zagzag, D., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion*. *Lab Invest*, 2006. **86**(12): p. 1221-32.
65. Soeda, A., et al., *Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha*. *Oncogene*, 2009. **28**(45): p. 3949-59.
66. Cuddapah, V.A., et al., *A neurocentric perspective on glioma invasion*. *Nat Rev Neurosci*, 2014. **15**(7): p. 455-65.
67. Westphal, M. and K. Lamszus, *The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches*. *Nat Rev Neurosci*, 2011. **12**(9): p. 495-508.
68. Paez-Ribes, M., et al., *Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(3): p. 220-31.
69. Watkins, S., et al., *Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 4196.
70. Morantz, R.A., et al., *Macrophages in experimental and human brain tumors. Part 2: studies of the macrophage content of human brain tumors*. *J Neurosurg*, 1979. **50**(3): p. 305-11.
71. Charles, N.A., et al., *The brain tumor microenvironment*. *Glia*, 2012. **60**(3): p. 502-14.
72. Chen, Z., et al., *Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma*. *Cancer Res*, 2017. **77**(9): p. 2266-2278.
73. Bingle, L., N.J. Brown, and C.E. Lewis, *The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies*. *J Pathol*, 2002. **196**(3): p. 254-65.
74. Ginhoux, F., et al., *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages*. *Science*, 2010. **330**(6005): p. 841-5.
75. Epelman, S., K.J. Lavine, and G.J. Randolph, *Origin and functions of tissue macrophages*. *Immunity*, 2014. **41**(1): p. 21-35.
76. Elmore, M.R., et al., *Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain*. *Neuron*, 2014. **82**(2): p. 380-97.
77. Kettenmann, H., F. Kirchhoff, and A. Verkhratsky, *Microglia: new roles for the synaptic stripper*. *Neuron*, 2013. **77**(1): p. 10-8.
78. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(3): p. 787-95.
79. Mantovani, A., et al., *The origin and function of tumor-associated macrophages*. *Immunol Today*, 1992. **13**(7): p. 265-70.
80. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. *Trends Immunol*, 2002. **23**(11): p. 549-55.
81. Komohara, Y., et al., *Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas*. *J Pathol*, 2008. **216**(1): p. 15-24.
82. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. *Cell*, 2010. **141**(1): p. 39-51.
83. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. *Trends Immunol*, 2004. **25**(12): p. 677-86.
84. Pyonteck, S.M., et al., *CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression*. *Nat Med*, 2013. **19**(10): p. 1264-72.
85. Tinoco, R., et al., *PSGL-1: A New Player in the Immune Checkpoint Landscape*. *Trends Immunol*, 2017. **38**(5): p. 323-335.
86. Spertini, O., et al., *P-selectin glycoprotein ligand 1 is a ligand for L-selectin on neutrophils, monocytes, and CD34+ hematopoietic progenitor cells*. *J Cell Biol*, 1996. **135**(2): p. 523-31.

87. Goetz, D.J., et al., *Isolated P-selectin glycoprotein ligand-1 dynamic adhesion to P- and E-selectin*. J Cell Biol, 1997. **137**(2): p. 509-19.
88. Ley, K. and G.S. Kansas, *Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 325-35.
89. Veerman, K.M., et al., *Interaction of the selectin ligand PSGL-1 with chemokines CCL21 and CCL19 facilitates efficient homing of T cells to secondary lymphoid organs*. Nat Immunol, 2007. **8**(5): p. 532-9.
90. Zarbock, A., et al., *PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(5): p. 1119-24.
91. Tinoco, R. and L.M. Bradley, *Targeting the PSGL-1 pathway for immune modulation*. Immunotherapy, 2017. **9**(10): p. 785-788.
92. Weyrich, A.S., et al., *Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation*. J Clin Invest, 1995. **95**(5): p. 2297-303.
93. Marx, S., et al., *Platelet activation parameters and platelet-leucocyte-conjugate formation in glioblastoma multiforme patients*. Oncotarget, 2018. **9**(40): p. 25860-25876.
94. Holness, C.L. and D.L. Simmons, *Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins*. Blood, 1993. **81**(6): p. 1607-13.
95. Kurushima, H., et al., *Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 104-8.
96. Lau, S.K., P.G. Chu, and L.M. Weiss, *CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples*. Am J Clin Pathol, 2004. **122**(5): p. 794-801.
97. Falini, B., et al., *PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule*. Am J Pathol, 1993. **142**(5): p. 1359-72.
98. Mueller, C.K. and S. Schultze-Mosgau, *Histomorphometric analysis of the phenotypical differentiation of recruited macrophages following subcutaneous implantation of an allogeneous acellular dermal matrix*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2011. **40**(4): p. 401-7.
99. Vakkila, J., et al., *A basis for distinguishing cultured dendritic cells and macrophages in cytopins and fixed sections*. Pediatr Dev Pathol, 2005. **8**(1): p. 43-51.
100. Strojnik, T., et al., *Prognostic impact of CD68 and kallikrein 6 in human glioma*. Anticancer Res, 2009. **29**(8): p. 3269-79.
101. Lisi, L., et al., *Expression of iNOS, CD163 and ARG-1 taken as M1 and M2 markers of microglial polarization in human glioblastoma and the surrounding normal parenchyma*. Neurosci Lett, 2017. **645**: p. 106-112.
102. Nguyen, T.T., et al., *Expression of CD163 (hemoglobin scavenger receptor) in normal tissues, lymphomas, carcinomas, and sarcomas is largely restricted to the monocyte/macrophage lineage*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(5): p. 617-24.
103. Barros, M.H., et al., *Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80908.
104. Buechler, C., et al., *Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 97-103.
105. Sulahian, T.H., et al., *Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155*. Cytokine, 2000. **12**(9): p. 1312-21.
106. Fuentes-Duculan, J., et al., *A subpopulation of CD163-positive macrophages is classically activated in psoriasis*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(10): p. 2412-22.
107. Niedobitek, G., et al., *[Tumor-associated macrophages: Function and differentiation]*. Pathologe, 2015. **36**(5): p. 477-84.

108. Azambuja, J.H., et al., *Arginase-1+ Exosomes from Reprogrammed Macrophages Promote Glioblastoma Progression*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(11).
109. Zhou, W., et al., *Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth*. *Nat Cell Biol*, 2015. **17**(2): p. 170-82.
110. Badie, B., B. Bartley, and J. Schartner, *Differential expression of MHC class II and B7 costimulatory molecules by microglia in rodent gliomas*. *J Neuroimmunol*, 2002. **133**(1-2): p. 39-45.
111. Heusinkveld, M. and S.H. van der Burg, *Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers*. *J Transl Med*, 2011. **9**: p. 216.
112. Schartner, J.M., et al., *Impaired capacity for upregulation of MHC class II in tumor-associated microglia*. *Glia*, 2005. **51**(4): p. 279-85.
113. Tran, C.T., et al., *Differential expression of MHC class II molecules by microglia and neoplastic astroglia: relevance for the escape of astrocytoma cells from immune surveillance*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1998. **24**(4): p. 293-301.
114. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. *Immunity*, 2003. **19**(1): p. 71-82.
115. Randolph, G.J., et al., *The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting*. *J Exp Med*, 2002. **196**(4): p. 517-27.
116. Sanchez-Torres, C., et al., *CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells*. *Int Immunol*, 2001. **13**(12): p. 1571-81.
117. Kralova Lesna, I., et al., *Characterisation and comparison of adipose tissue macrophages from human subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue*. *J Transl Med*, 2016. **14**(1): p. 208.
118. Forster, R., A.C. Davalos-Misnitz, and A. Rot, *CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(5): p. 362-71.
119. Martinez, F.O., et al., *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 7303-11.
120. Gabrusiewicz, K., et al., *Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype*. *JCI Insight*, 2016. **1**(2).
121. Sozzani, S., et al., *Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties*. *J Immunol*, 1998. **161**(3): p. 1083-6.
122. Zlotnik, A., A.M. Burkhardt, and B. Homey, *Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(9): p. 597-606.
123. Zheng, Y., et al., *CCR7 Mediates TGF-beta1-Induced Human Malignant Glioma Invasion, Migration, and Epithelial-Mesenchymal Transition by Activating MMP2/9 Through the Nuclear Factor KappaB Signaling Pathway*. *DNA Cell Biol*, 2017. **36**(10): p. 853-861.
124. Classen, A., J. Lloberas, and A. Celada, *Macrophage activation: classical versus alternative*. *Methods Mol Biol*, 2009. **531**: p. 29-43.
125. Munder, M., et al., *Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells*. *J Immunol*, 1999. **163**(7): p. 3771-7.
126. Mansuy, D. and J.L. Boucher, *Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **37**(8): p. 1105-21.
127. Ash, D.E., *Structure and function of arginases*. *J Nutr*, 2004. **134**(10 Suppl): p. 2760S-2764S; discussion 2765S-2767S.

128. Kelley, J.L., et al., *Scavenger receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease*. Crit Rev Immunol, 2014. **34**(3): p. 241-61.
129. Sorensen, M.D., et al., *Tumour-associated microglia/macrophages predict poor prognosis in high-grade gliomas and correlate with an aggressive tumour subtype*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2018. **44**(2): p. 185-206.
130. Wang, Q., et al., *Vascular niche IL-6 induces alternative macrophage activation in glioblastoma through HIF-2alpha*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 559.
131. Cannarile, M.A., et al., *Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy*. J Immunother Cancer, 2017. **5**(1): p. 53.
132. Zhang, Q.W., et al., *Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50946.
133. Hambardzumyan, D., D.H. Gutmann, and H. Kettenmann, *The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression*. Nat Neurosci, 2016. **19**(1): p. 20-7.
134. Nagaraj, S. and D.I. Gabrilovich, *Myeloid-derived suppressor cells in human cancer*. Cancer J, 2010. **16**(4): p. 348-53.
135. Zhang, I., et al., *Characterization of Arginase Expression in Glioma-Associated Microglia and Macrophages*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0165118.
136. El Kasmi, K.C., et al., *Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens*. Nat Immunol, 2008. **9**(12): p. 1399-406.
137. Stout, R.D., et al., *Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 342-9.
138. Erta, M., A. Quintana, and J. Hidalgo, *Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(9): p. 1254-66.
139. Olmos, G. and J. Llado, *Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 861231.
140. Saijo, K. and C.K. Glass, *Microglial cell origin and phenotypes in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 775-87.
141. Tchirkov, A., et al., *IL-6 gene amplification and expression in human glioblastomas*. Br J Cancer, 2001. **85**(4): p. 518-22.
142. Liu, Q., et al., *IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines*. J Neurooncol, 2010. **100**(2): p. 165-76.
143. DePaula-Silva, A.B., et al., *Differential transcriptional profiles identify microglial- and macrophage-specific gene markers expressed during virus-induced neuroinflammation*. J Neuroinflammation, 2019. **16**(1): p. 152.
144. Turnbull, I.R., et al., *Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3520-4.
145. Ye, X.Z., et al., *Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF-beta1 signaling pathway*. J Immunol, 2012. **189**(1): p. 444-53.
146. Suzumura, A., et al., *Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro*. J Immunol, 1993. **151**(4): p. 2150-8.
147. Wu, W.K., et al., *IL-10 regulation of macrophage VEGF production is dependent on macrophage polarisation and hypoxia*. Immunobiology, 2010. **215**(9-10): p. 796-803.
148. Roca, H., et al., *CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization*. J Biol Chem, 2009. **284**(49): p. 34342-54.
149. Shao, F., et al., *Frozen tissue preparation for high-resolution multiplex histological analyses of human brain specimens*. J Neurooncol, 2017. **135**(1): p. 21-28.

150. Passacquale, G., et al., *Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25595.
151. De Boeck, A., et al., *Glioma-derived IL-33 orchestrates an inflammatory brain tumor microenvironment that accelerates glioma progression*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 4997.
152. Moore, K.L., et al., *Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells*. J Cell Biol, 1992. **118**(2): p. 445-56.
153. Vachino, G., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 is the major counter-receptor for P-selectin on stimulated T cells and is widely distributed in non-functional form on many lymphocytic cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(37): p. 21966-74.
154. Zannettino, A.C., et al., *Primitive human hematopoietic progenitors adhere to P-selectin (CD62P)*. Blood, 1995. **85**(12): p. 3466-77.
155. DeRogatis, J.M., et al., *PSGL-1 Immune Checkpoint Inhibition for CD4(+) T Cell Cancer Immunotherapy*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 636238.
156. Laszik, Z., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells*. Blood, 1996. **88**(8): p. 3010-21.
157. Hallahan, D.E., et al., *X-ray-induced P-selectin localization to the lumen of tumor blood vessels*. Cancer Res, 1998. **58**(22): p. 5216-20.
158. Kronenberg, G., et al., *Distinguishing features of microglia- and monocyte-derived macrophages after stroke*. Acta Neuropathol, 2018. **135**(4): p. 551-568.
159. Lorant, D.E., et al., *Activation of polymorphonuclear leukocytes reduces their adhesion to P-selectin and causes redistribution of ligands for P-selectin on their surfaces*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 171-82.
160. Cordone, I., et al., *Brain stereotactic biopsy flow cytometry for central nervous system lymphoma characterization: advantages and pitfalls*. J Exp Clin Cancer Res, 2016. **35**(1): p. 128.
161. Diederichsen, A.C., et al., *A comparison of flow cytometry and immunohistochemistry in human colorectal cancers*. APMIS, 1998. **106**(5): p. 562-70.
162. Parra, E.R., et al., *Comparison of Different Antibody Clones for Immunohistochemistry Detection of Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) on Non-Small Cell Lung Carcinoma*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2018. **26**(2): p. 83-93.
163. Prośniak, M., et al., *Glioma grade is associated with the accumulation and activity of cells bearing M2 monocyte markers*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(14): p. 3776-86.
164. Nguyen, P., et al., *Targeting Psgl-1, a Novel Macrophage Checkpoint, Repolarizes Suppressive Macrophages, Induces an Inflammatory Tumor Microenvironment, and Suppresses Tumor Growth*. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2020. **8**: p. A513-A513.
165. Nowakowska, D., et al., *PSGL-1 is a novel macrophage checkpoint in immunoncology*. Journal of Clinical Oncology, 2020. **38**(15).
166. Urzainqui, A., et al., *Functional role of P-selectin glycoprotein ligand 1/P-selectin interaction in the generation of tolerogenic dendritic cells*. J Immunol, 2007. **179**(11): p. 7457-65.
167. Tinoco, R., et al., *PSGL-1 Is an Immune Checkpoint Regulator that Promotes T Cell Exhaustion*. Immunity, 2016. **44**(5): p. 1190-203.
168. Yamaoka, T., et al., *The roles of P- and E-selectins and P-selectin glycoprotein ligand-1 in primary and metastatic mouse melanomas*. J Dermatol Sci, 2011. **64**(2): p. 99-107.
169. Luo, J., *PI3K Is a Linker Between L-selectin and PSGL-1 Signaling to IL-18 Transcriptional Activation at the Promoter Level*. Inflammation, 2018. **41**(2): p. 555-561.

170. Ba, X.Q., et al., *Engagement of PSGL-1 upregulates CSF-1 transcription via a mechanism that may involve Syk*. Cell Immunol, 2005. **237**(1): p. 1-6.
171. Sottoriva, A., et al., *Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(10): p. 4009-14.
172. Tichy, J., et al., *Prospective evaluation of serum glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a diagnostic marker for glioblastoma*. J Neurooncol, 2016. **126**(2): p. 361-9.
173. Kaffes, I., et al., *Human Mesenchymal glioblastomas are characterized by an increased immune cell presence compared to Proneural and Classical tumors*. Oncoimmunology, 2019. **8**(11): p. e1655360.
174. Buonfiglioli, A. and D. Hambardzumyan, *Macrophages and microglia: the cerberus of glioblastoma*. Acta Neuropathol Commun, 2021. **9**(1): p. 54.
175. Muller, S., et al., *Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment*. Genome Biol, 2017. **18**(1): p. 234.
176. Vitale, I., et al., *Intratumoral heterogeneity in cancer progression and response to immunotherapy*. Nat Med, 2021. **27**(2): p. 212-224.
177. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
178. Mignogna, C., et al., *A reappraisal of macrophage polarization in glioblastoma: Histopathological and immunohistochemical findings and review of the literature*. Pathol Res Pract, 2016. **212**(6): p. 491-9.
179. Takenaka, M.C., et al., *Author Correction: Control of tumor-associated macrophages and T cells in glioblastoma via AHR and CD39*. Nat Neurosci, 2019. **22**(9): p. 1533.
180. Kwiecien, I., et al., *CD163 and CCR7 as markers for macrophage polarization in lung cancer microenvironment*. Cent Eur J Immunol, 2019. **44**(4): p. 395-402.
181. Chavez-Galan, L., et al., *Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 263.
182. Eyler, C.E., et al., *Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2*. Cell, 2011. **146**(1): p. 53-66.
183. Beier, D., et al., *CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles*. Cancer Res, 2007. **67**(9): p. 4010-5.
184. Zhang, Y., et al., *Crystal structure of the extracellular domain of a human Fc gamma RIII*. Immunity, 2000. **13**(3): p. 387-95.
185. Bergmann, N., et al., *The Intratumoral Heterogeneity Reflects the Intertumoral Subtypes of Glioblastoma Multiforme: A Regional Immunohistochemistry Analysis*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 494.
186. Husemann, J., et al., *Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system*. Glia, 2002. **40**(2): p. 195-205.
187. Szatmari, T., et al., *Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy*. Cancer Sci, 2006. **97**(6): p. 546-53.

9 Appendix

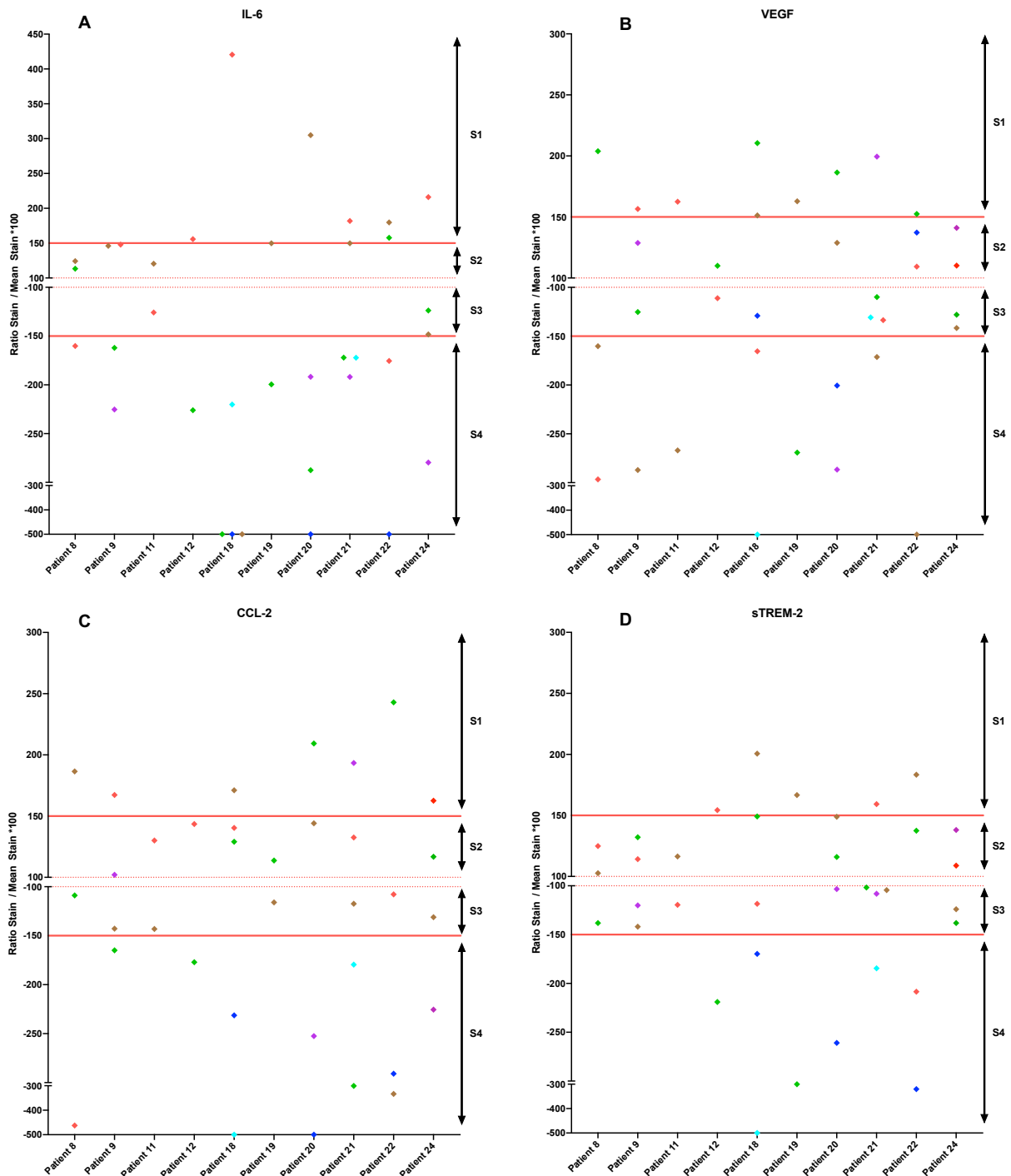


Abbildung S1 Intratumorale Heterogenität der Zytokine (A) IL-6, (B) VEGF, (C) CCL-2 und (D) sTREM-2 über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der $n = 10$ Patienten und der $i = 35$ Patientenproben. Alle zu einem Patienten gehörigen Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung des Tumorareals auf dem Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie ($y = 100/100$); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichgesetzt. Die zwei roten Linien ($y = 150/-150$) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 Punkte für die Bereiche S2 und S3 bzw. 10 Punkte für die Bereiche S1 und S4 für die Heterogenität vergeben.

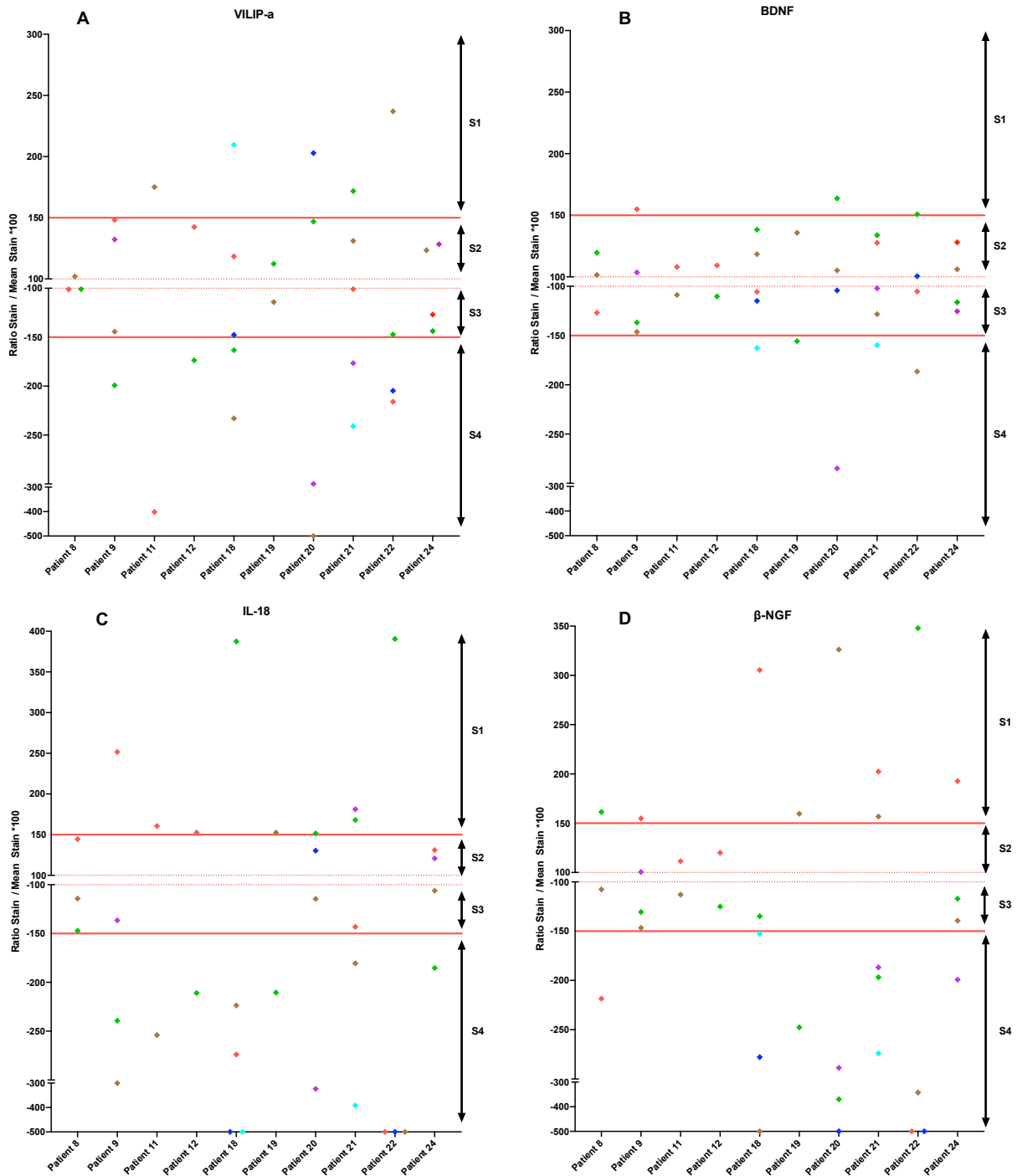


Abbildung S2 Intratumorale Heterogenität der Zytokine (A) VILIP-a, (B) BDNF, (C) IL-18 und (D) β -NGF über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der $n = 10$ Patienten und der $i = 35$ Patientenproben. Alle zu einem Patienten gehörige Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung des Tumoreals auf dem Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie ($y = 100/-100$); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichgesetzt. Die zwei roten Linien ($y = 150/-150$) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 Punkte für die Bereiche S2 und S3 bzw. 10 Punkte für die Bereiche S1 und S4 für die Heterogenität vergeben.

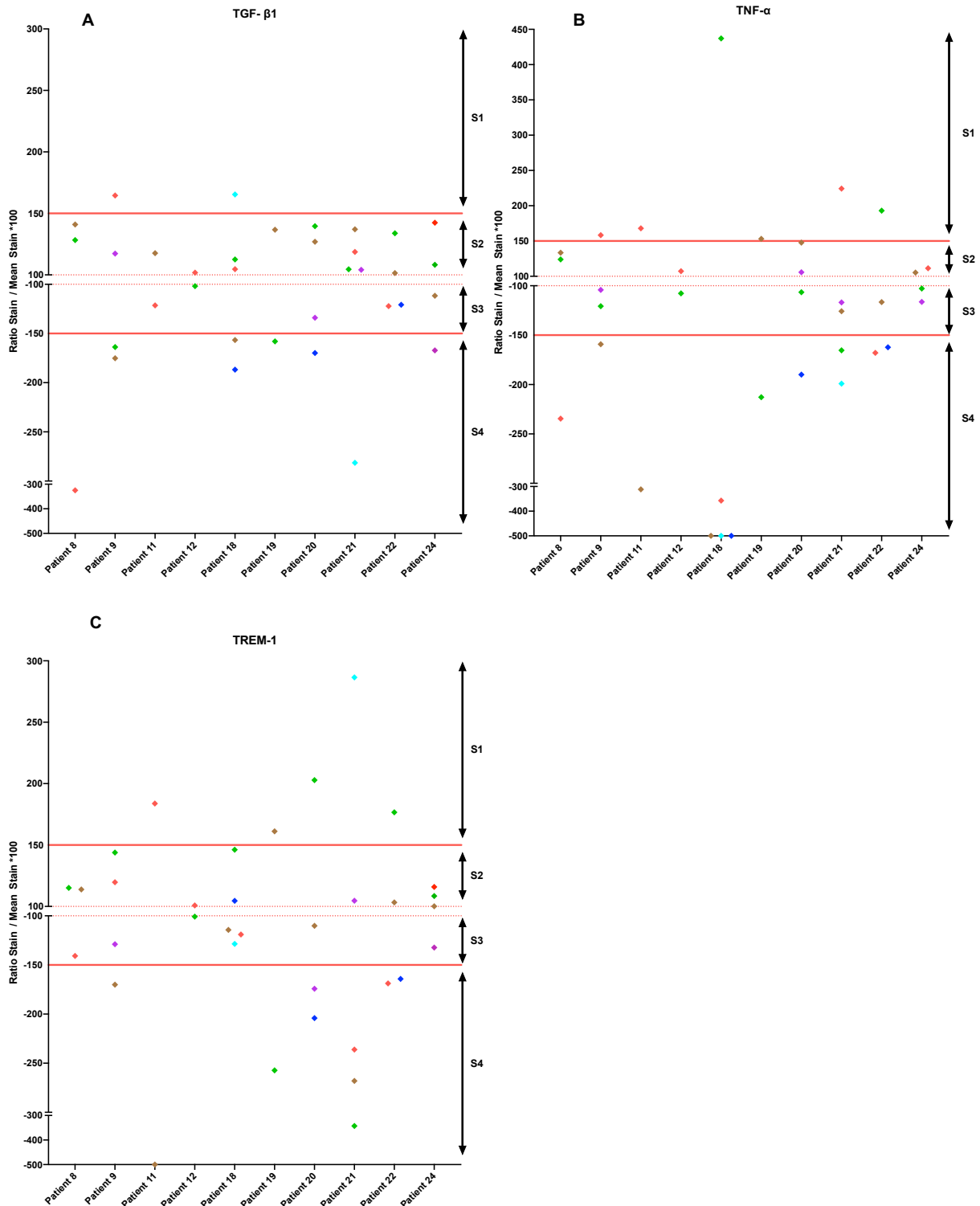


Abbildung S3 Intratumorale Heterogenität der Zytokine (A) TGF-β1, (B) TNF α, (C) TREM-1 über alle Areale nach Patienten sortiert. Grün = lateral; Rot = medial; Lila = dorsal; Braun = ventral; Cyan = kranial; Blau = kaudal. Die farblichen Punkte markieren je ein Areal der n = 10 Patienten und der i = 35 Patientenproben. Alle zu einem Patienten gehörigen Proben werden übereinander aufgetragen. Die Lage eines Punktes ergibt sich aus der Normalisierung des Tumorareals auf dem Mittelwert des zugehörigen Patienten. Der Mittelwert kennzeichnet sich durch die gestrichelte rote Linie (y = 100/-100); Werte die kleiner als -500 waren, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit -500 gleichsetzt. Die zwei roten Linien (y = 150/-150) gliedern als arbiträre Grenzen den Graphen in die Abschnitte S1-S4 für eine schwache bzw. starke Heterogenität. Je nach Lage des Datenpunktes werden 5 Punkte für die Bereiche S2 und S3 bzw. 10 Punkte für die Bereiche S1 und S4 für die Heterogenität vergeben.

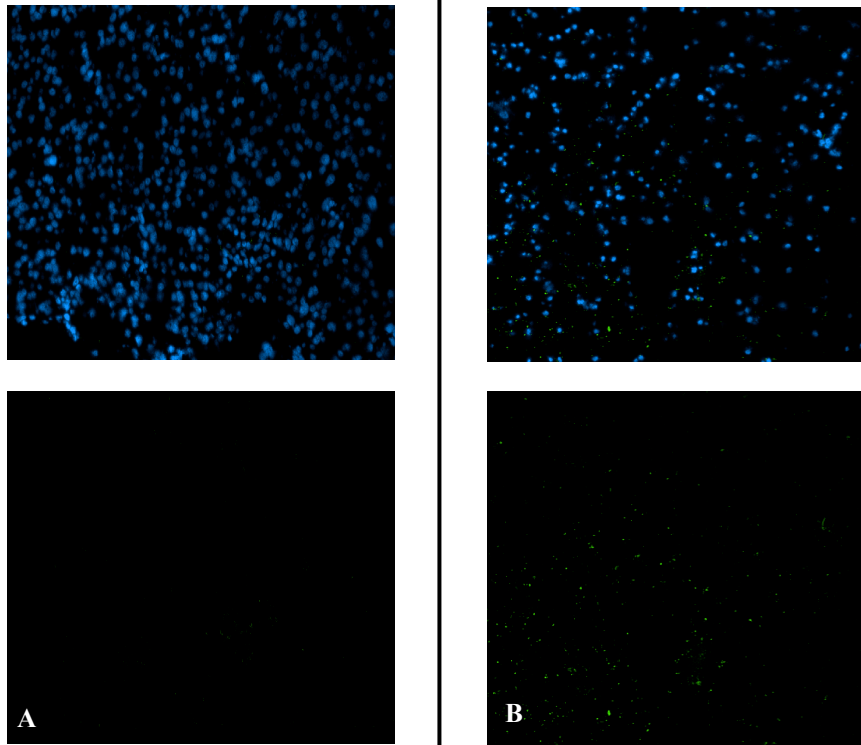


Abbildung S4 Negativ Kontrolle (PSGL-1) der Patienten 12 lateral (A) und Patient 21 dorsal (B) in 20x Vergrößerung. A: lateral DAPI-Färbung (blau) einschließlich AF488-Kanal (grün); unten AF488-Kanal ohne DAPI; B: dorsal DAPI-Färbung einschließlich AF488-Kanal; unten AF488-Kanal ohne DAPI.

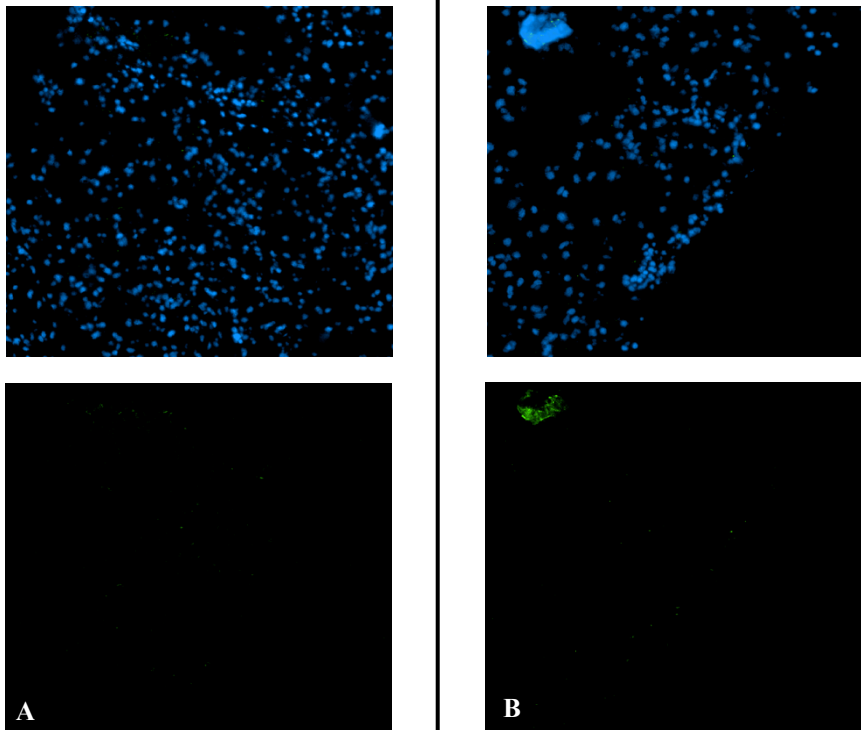


Abbildung S5 Negativ Kontrolle (CD68) der Patienten 21 kranial (A) und Patient 18 medial (B) in 20x Vergrößerung. A: kranial DAPI-Färbung (blau) einschließlich AF488-Kanal (grün); unten AF488-Kanal ohne DAPI; B: medial DAPI-Färbung einschließlich AF488-Kanal; unten AF488-Kanal ohne DAPI.

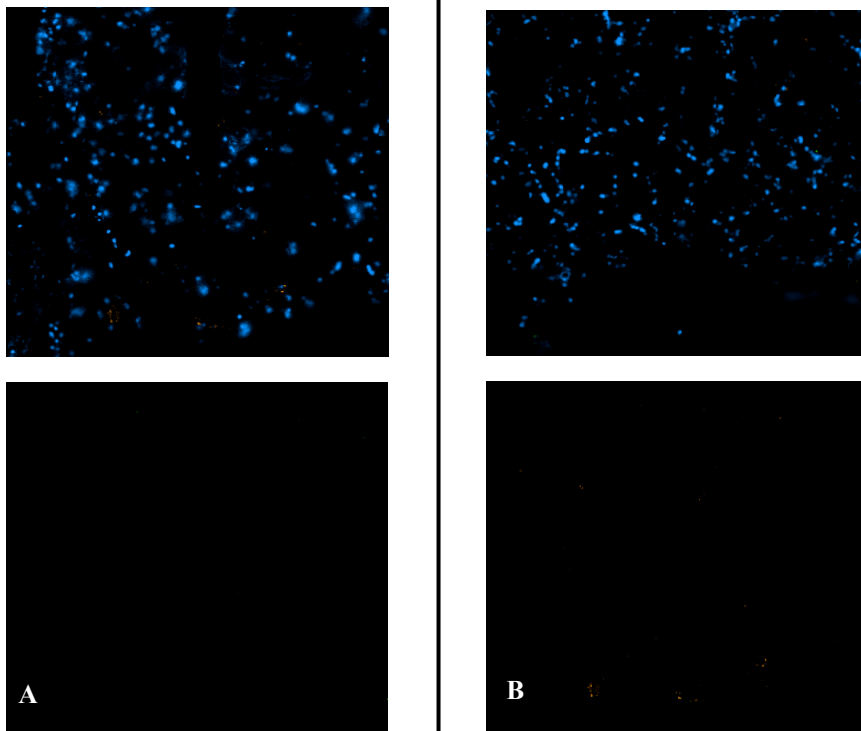


Abbildung S6 Negativ Kontrolle (CD16) der Patienten 22 lateral (A) und Patient 22 medial (B) in 20x Vergrößerung. A: lateral DAPI-Färbung (blau) einschließlich AF594-Kanal (orange); unten AF594-Kanal ohne DAPI; B: medial DAPI-Färbung einschließlich AF594-Kanal; unten AF594-Kanal ohne DAPI.

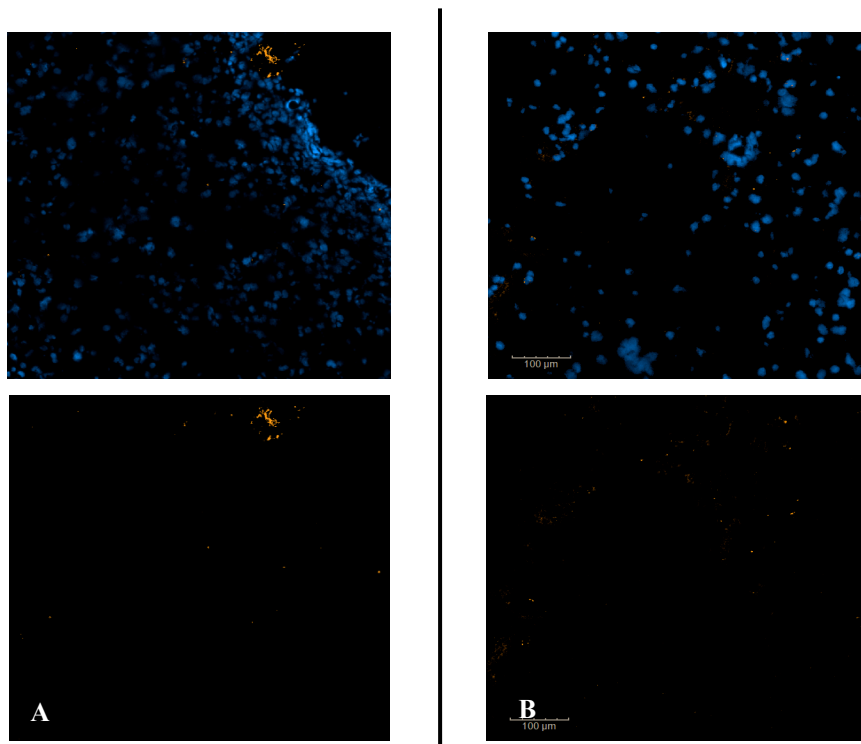


Abbildung S7 Negativ Kontrolle (MHC-II) der Patienten 23 dorsal (A) und Patient 18 medial (B) in 20x Vergrößerung. A: dorsal DAPI-Färbung (blau) einschließlich AF594-Kanal (orange); unten AF594-Kanal ohne DAPI; B: medial DAPI-Färbung einschließlich AF594-Kanal; unten AF594-Kanal ohne DAPI.

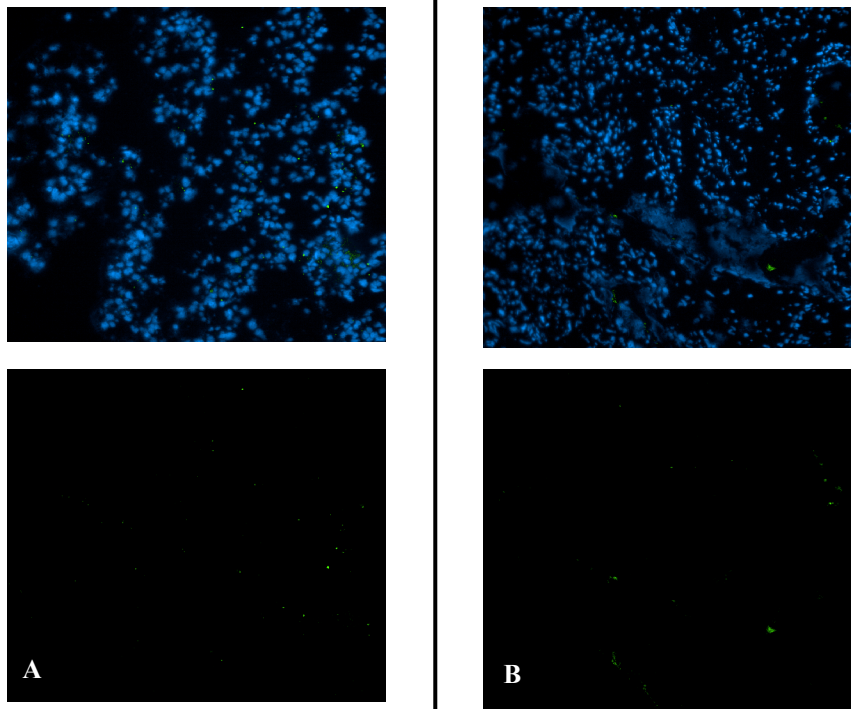


Abbildung S8 Negativ Kontrolle (CD206) der Patienten 9 medial (A) und Patient 8 dorsal (B) in 20x Vergrößerung. A: medial DAPI-Färbung (blau) einschließlich AF488-Kanal (grün); unten AF488-Kanal ohne DAPI; B: dorsal DAPI-Färbung einschließlich AF488-Kanal; unten AF488-Kanal ohne DAPI.

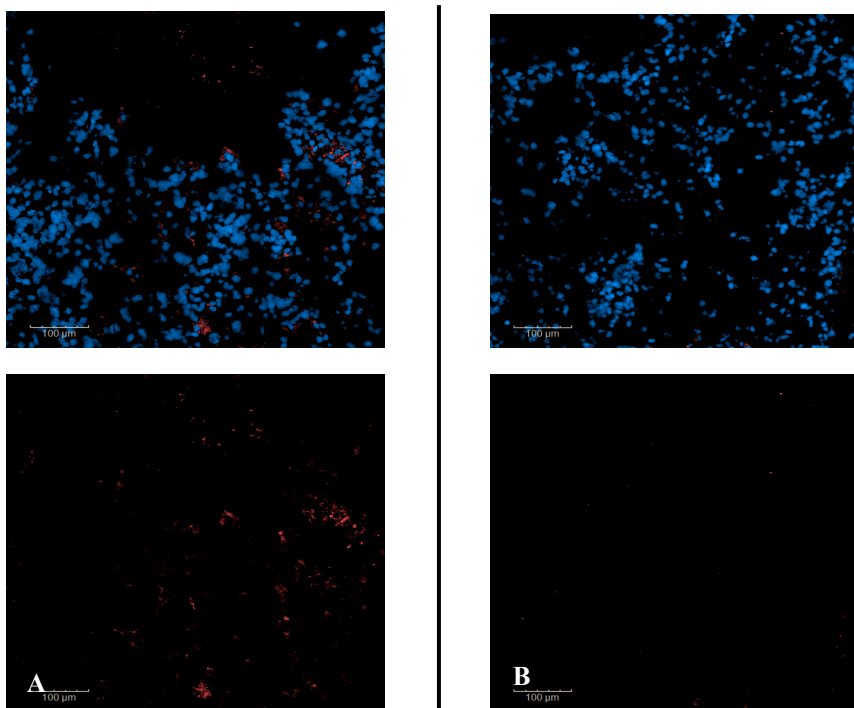


Abbildung S9 Negativ Kontrolle (CSF1R) der Patienten 18 kaudal (A) und Patient 18 ventral (B) in 20x Vergrößerung. A: kaudal DAPI-Färbung (blau) einschließlich AF647-Kanal (rot); unten AF647-Kanal ohne DAPI; B: ventral DAPI-Färbung einschließlich AF488-Kanal; unten AF488-Kanal ohne DAPI.

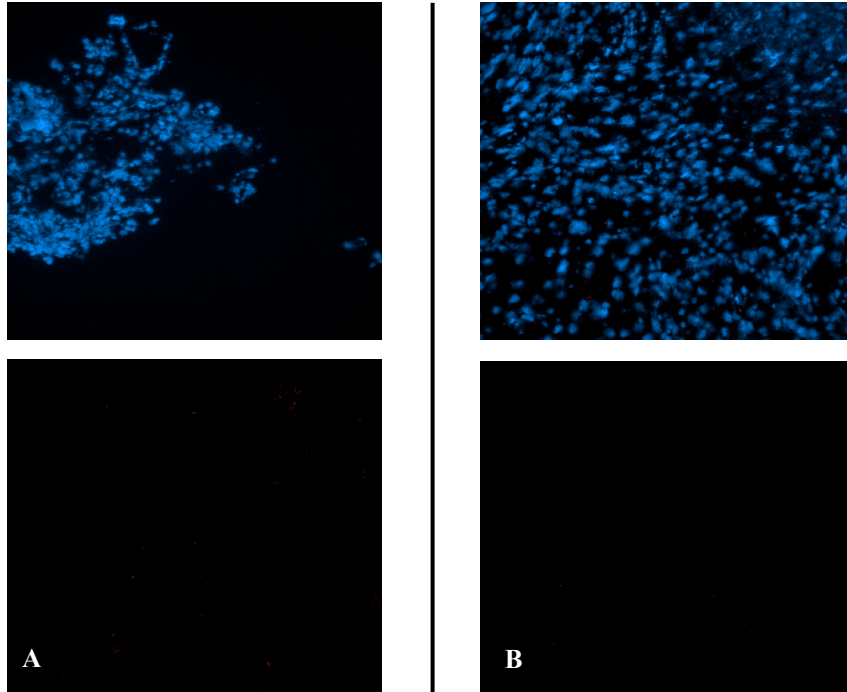


Abbildung S10 Negativ Kontrolle (CD163) der Patienten 20 lateral (A) und Patient 11 medial (B) in 20x Vergrößerung. A: lateral DAPI-Färbung (blau) einschließlich AF647-Kanal (rot); unten AF647-Kanal ohne DAPI; B: medial DAPI-Färbung einschließlich AF488-Kanal; unten AF647-Kanal ohne DAPI.

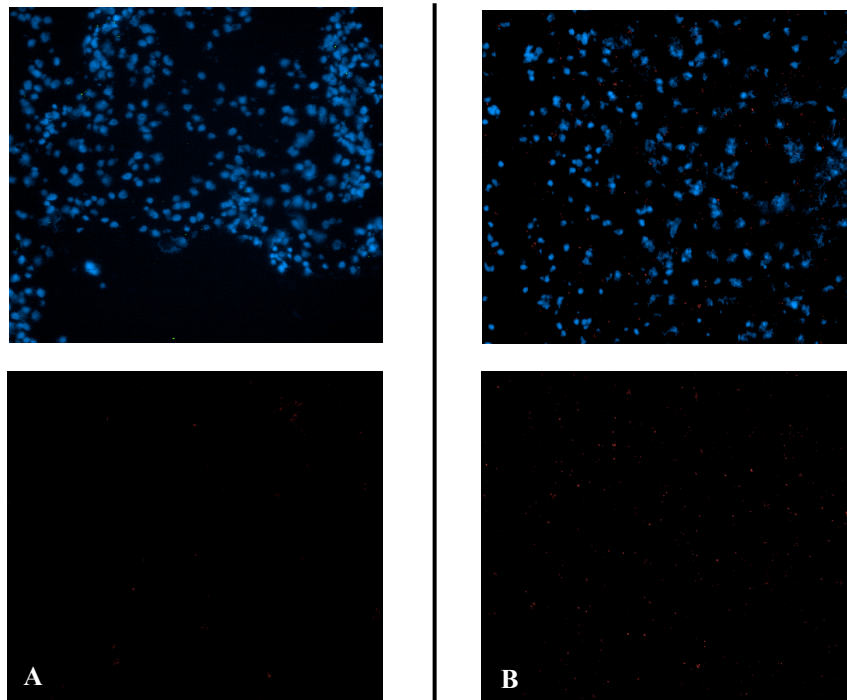


Abbildung S11 Negativ Kontrolle (CD204) der Patienten 21 kranial (A) und Patient 20 kaudal (B) in 20x Vergrößerung. A: kranial DAPI-Färbung (blau) einschließlich AF647-Kanal (rot); unten AF647-Kanal ohne DAPI; B: kaudal DAPI-Färbung einschließlich AF488-Kanal; unten AF647-Kanal ohne DAPI.

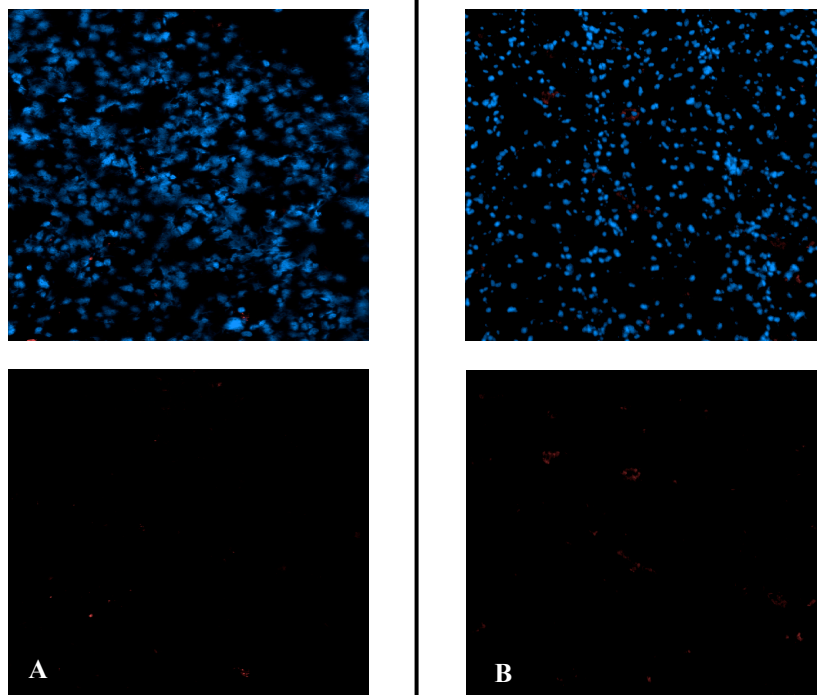


Abbildung S12 Negativ Kontrolle (CCR7) der Patienten 21 lateral (A) und Patient 21 ventral (B) in 20x Vergrößerung. A: lateral DAPI-Färbung (blau) einschließlich AF647-Kanal (rot); unten AF647-Kanal ohne DAPI; B: ventral DAPI-Färbung einschließlich AF488-Kanal; unten AF647-Kanal ohne DAPI.

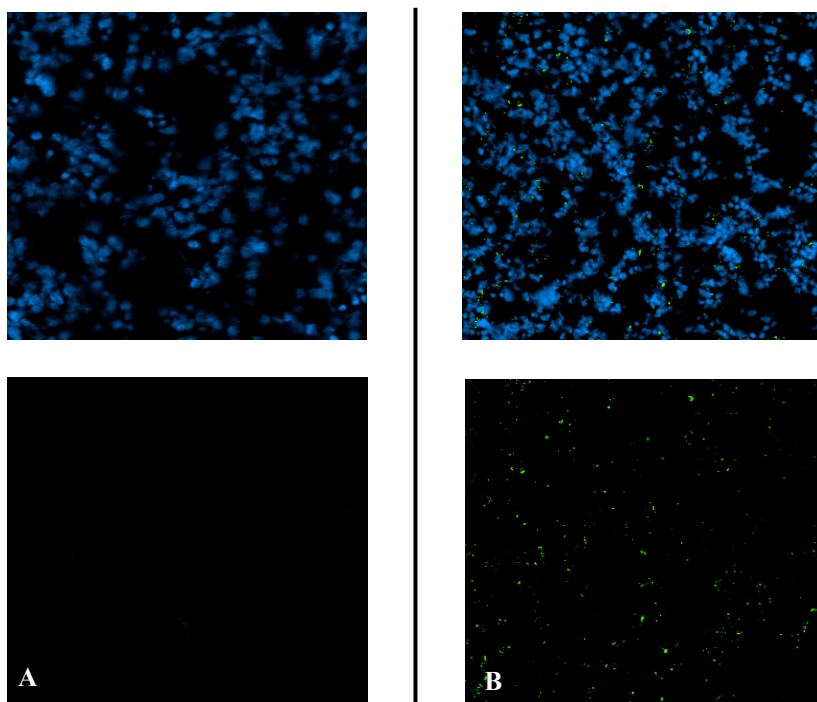


Abbildung S13 Negativ Kontrolle (iNOS) der Patienten 21 lateral (A) und Patient 23 dorsal (B) in 20x Vergrößerung. A: lateral DAPI-Färbung (blau) einschließlich AF488-Kanal (grün); unten AF488-Kanal ohne DAPI; B: dorsal DAPI-Färbung einschließlich AF488-Kanal; unten AF488-Kanal ohne DAPI.

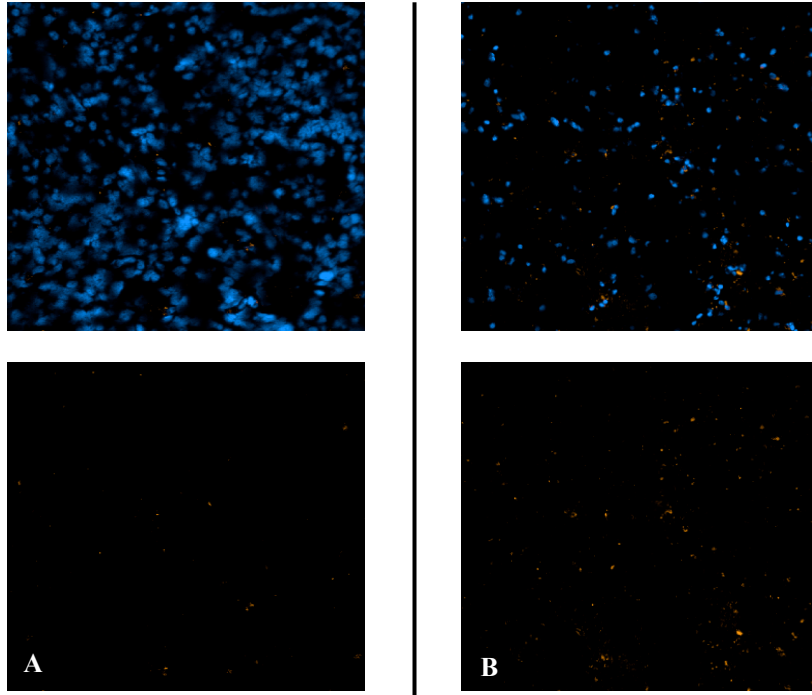


Abbildung S14 Negativ Kontrolle (GFAP) der Patienten 21 lateral (A) und Patient 21 dorsal (B) in 20x Vergrößerung. A: lateral DAPI-Färbung (blau) einschließlich AF594-Kanal (orange); unten AF594-Kanal ohne DAPI; B: dorsal DAPI-Färbung einschließlich AF594-Kanal; unten AF594-Kanal ohne DAPI.

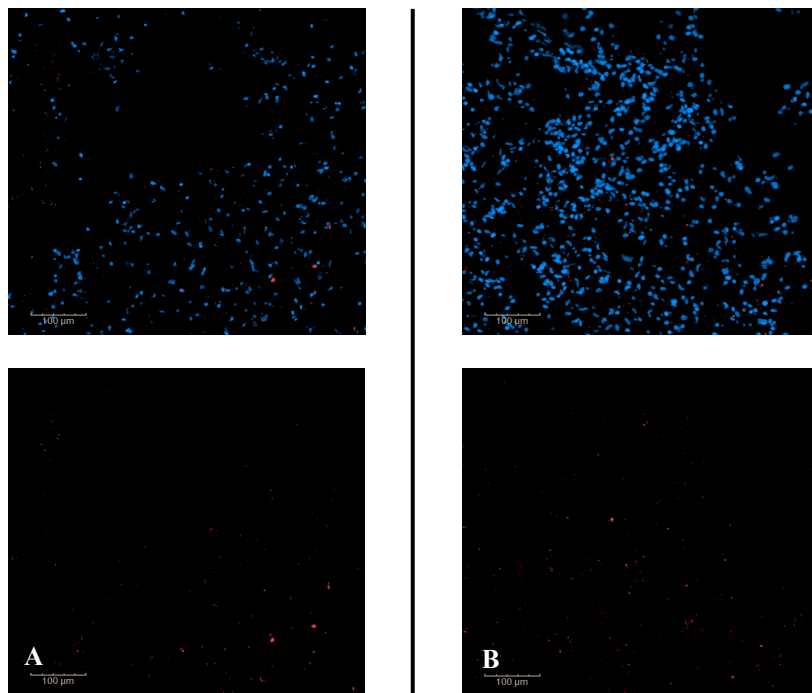


Abbildung S15 Negativ Kontrolle (Arg1) der Patienten 12 medial (A) und Patient 18 kaudal (B) in 20x Vergrößerung. A: medial DAPI-Färbung (blau) einschließlich AF647-Kanal (rot); unten AF647-Kanal ohne DAPI; B: kaudal DAPI-Färbung einschließlich AF488-Kanal; unten AF647-Kanal ohne DAPI.

10 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. H. W. S. Schroeder für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Institut durchzuführen, danken. Darüber hinaus bedanke ich mich für eine zuverlässige Betreuung und stetige Unterstützung während der gesamten Zeit.

Ein großer Dank gilt PD Dr. med. habil Sascha Marx, der mich über die gesamte Zeit herausragend unterstützt, kompetent betreut und für jegliche Art von Problemen einen Lösungsansatz gefunden hat. Insbesondere möchte ich mich dafür bedanken, dass die physische Distanz hierbei zu keiner Zeit eine Rolle gespielt hat.

Ich danke Herrn Dr. S. Bekeschus und seiner Arbeitsgruppe des *Zik Plasmatis* für die Bereitstellung der Labore und Gerätschaften, die hilfsbereite Einarbeitung, den stetigen wissenschaftlichen Austausch sowie die finanzielle Unterstützung.

Ich danke meinen Eltern Arusjak und Samvel, sowie meiner Schwester Tatewik die mich zu jeder Zeit motiviert und ermutigt haben bei jeglicher Schwierigkeit und Talfahrt am Ball zu bleiben.

Des Weiteren danke ich allen, bis jetzt nicht aufgezählten Freunden, die mich über die gesamte Zeit begleitet und motiviert haben. Ganz besonders Lena Bronk.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meiner Freundin Leonie für die liebevolle Unterstützung und Rückhalt in jeglicher Hinsicht.