

Charakterisierung der immunzellulären Mikroumgebung im Glioblastom –
Wechselwirkungen des myeloiden Kompartiments, der CXCR2-CXCL2/IL-8-
Achse und der Einfluss von Dexamethason



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johannes Falter
aus
Mallersdorf-Pfaffenberg

im Jahr
2025

Charakterisierung der immunzellulären Mikroumgebung im Glioblastom –
Wechselwirkungen des myeloiden Kompartiments, der CXCR2-CXCL2/IL-8-
Achse und der Einfluss von Dexamethason



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johannes Falter
aus
Mallersdorf-Pfaffenberg

im Jahr
2025

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

Betreuer: Prof. Dr. Martin Proescholdt

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2025

Il faut imaginer Sisyphe heureux.
Albert Camus

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
a.	Das Glioblastom – Allgemeines	6
b.	Tumorzellen und immunologische Mikroumgebung	8
i.	Neoplastische Zellen: Von der statischen Cancer stem cells (CSC) Hypothese zu fluiden phänotypischen <i>Cell states</i>	8
ii.	Immunologische Tumormikroumgebung im GBM (TiME)	8
iii.	Zonierung des Glioblastoms.....	17
iv.	Einfluss von Dexamethason auf das Glioblastom und TiME	18
v.	CXCR2/IL-8-CXCL2 Achse – Therapieansätze im Glioblastom	21
c.	Fragestellung und Zielsetzung dieser Doktorarbeit	24
2.	Material und Methoden	25
a.	Materialien	25
i.	Laborausstattung, Instrumente und Verbrauchsmaterialien	25
ii.	Software	28
iii.	Reagenzien	29
iv.	Kulturmedien OBSC	32
b.	Zellbiologische Methoden.....	33
i.	Kultivierung von Zelllinien - <i>in vitro</i>	33
ii.	In vitro Zellkultur-Assays	35
c.	Ex vivo Organotypische Rattenhirnschnitt-Co-Kulturen (OBSC)	39
i.	Tiere und Organentnahme	39
ii.	Präparation des Organotypischen Rattenhirnschnittmodells (OBSC).....	39
iii.	Isolierung und Kultivierung von Ratten-Mikroglia	43
iv.	Vitalfärbung Rattenzelllinien	43
v.	Zeitlicher Ablauf von Präparation, Vorbehandlung, Behandlung und Auswertung .	44
vi.	Membranbasierter Proteom Profiler und ELISA	46

vii.	Kyrosektionierung und Immunfluoreszenzfärbung	46
d.	Untersuchungen an retrospektiven humanen Biobank Proben	47
i.	Versuche auf transkriptionaler Ebene.....	47
ii.	Western Blotting.....	51
iii.	Immunfluoreszenz-Färbung von FFPE-Proben	54
e.	Statistische Analysen.....	60
3.	Ergebnisse	61
a.	<i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i>	61
i.	Vorversuche <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i> OBSC: Effekte von IL-17A, IL-22, IL-23 und CCL20 auf drei Rattenzelllinien (S635, 9L und Astrozyten)	61
ii.	<i>Ex vivo</i> OBSC Versuche – Dexamethason, Mikroglia-Depletion, CXCR2-CXCL2-Achse	67
b.	Humane Proben: Einfluss von Dexamethason auf die myeloide Immunzellmikroumgebung und die CXCL2/IL8-CXCR2-Achse bei Glioblastompatienten	
	92	
i.	Klinische Daten, Vergleich der Dex-naiven mit den DEX-behandelten Gruppen ...	92
ii.	Präoperativ verabreichtes Dexamethason führt zu veränderter Genexpression.....	96
iii.	Dexamethasongabe hat Einfluss auf zellulärer Ebene – Immunfluoreszenz-Färbung FFPE.....	108
4.	Diskussion	117
a.	Übersicht	117
b.	Einordnung der <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i> Ergebnisse.....	118
i.	Mikroglia im <i>ex vivo</i> Modell.....	118
ii.	Dexamethasoneinflüsse <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i>	120
iii.	CXCL2-CXCR2-Achse <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i>	121
iv.	Zusammenspiel von Mikroglia, Dexamethason und CXCL2-CXCR2-Achse.....	123
c.	Kontextualisierung der Untersuchungen an humanen GBM- Gewebe	125

i.	Patienten mit Dexamethasongabe vor der ersten Glioblastom-OP zeigen verkürztes Gesamtüberleben in unserer Kohorte	125
ii.	Einflüsse von Dexamethason auf iNOS (M1) und ARG1 (M2) im humanen Glioblastom und humanen cerebralen Melanom und NSCLC Metastasen.....	126
iii.	Einflüsse von Dexamethason auf die CXCL2/IL-8-Achse im humanen Glioblastom (und humanen cerebralen Melanom- und NSCLC Metastasen)	129
iv.	Auswirkungen von Dexamethason auf zellulärer Ebenen (GAMM, Mikroglia, T-Zellen)	132
5.	Zusammenfassung.....	133
6.	Verzeichnisse.....	135
a.	Literaturverzeichnis.....	135
b.	Abbildungsverzeichnis	167
c.	Tabellenverzeichnis.....	170
d.	Abkürzungsverzeichnis	171
7.	Danksagung	175
8.	Lebenslauf	177

1. Einleitung

a. Das Glioblastom – Allgemeines

Das Glioblastom (GBM) ist der häufigste und aggressivste hirneigene Tumor im Erwachsenenalter mit einer Inzidenz von 4/100.000 pro Jahr [1]. Trotz maximaler Therapie ist die Prognose mit einem medianen Gesamtüberleben von nur 15 Monaten sehr eingeschränkt - eine kurative Therapie existiert nicht [1, 2]. Neben der neurochirurgischen Resektion gab es maßgebliche Durchbrüche im Bereich der Weiterbehandlung des GBM, die letztlich Einzug in die Standardbehandlung fanden, mit der adjuvanten Nachbestrahlung im Jahre 1980 [3], der Temozolomid-Chemotherapie im Jahre 2005 [4], und zuletzt 2017 mit der Einführung der Tumor-Therapiefelder (TTF) [5, 6]. Die schlechte Prognose ist bedingt durch das frühe und ausgeprägte Auftreten von teils distanten, meist aber lokalen Rezidiven in der peritumoralen Zone [7].

Zwar konnten kleinere Studien einen Vorteil in der Kombination von Lomustin und Temozolomid bei methyliertem MGMT Promotor zeigen [8] und Immuntherapien in der Frühphase von klinischen Untersuchungen oder in Single-Arm-Studien auf Wirksamkeit hindeuten, in Phase-III-Studien zeigten jedoch Immun-Checkpoint Inhibitoren, Tumorvakzine, CAR-T Therapien und onkolytische Virustherapieansätze als innovative neue Therapieregime der letzten Jahre, die mit bahnbrechenden Erfolgen im Bereich anderer Tumorentitäten eingeführt werden konnten, kein verbessertes Gesamtüberleben im GBM [9, 10]. Das fehlende Ansprechen auf immunologische Targets - insbesondere die richtungsweisende Immun-Checkpoint Inhibition [9, 11, 12] - weist auf eine dringliche Frage hin: Was ist die Grundlage des Versagens onkoimmunologischer Ansätze im GBM? Und spezifisch: Ist das geringe Ansprechen auf immunologische Therapien teils iatrogen mitbedingt? Hierfür muss man einen Schritt zurücktreten und den allgemeinen Ablauf in der Behandlung bzw. der symptomatischen Akutbehandlung des GBM beleuchten, wo zunächst die neurochirurgische Resektion steht. Diese ermöglicht neben einer möglichst vollständigen Entfernung des MRT-kontrastmittelaufnehmenden Tumorgewebes die neuropathologische Diagnose, gefolgt von einer adjuvanten Therapie entsprechend der oben erwähnten drei Pfeiler (Radiotherapie, Chemotherapie und TTF). Allerdings steht bei den meisten Patienten noch vor der chirurgischen Resektion und neuropathologischen Diagnosestellung die symptomatische Anbehandlung des peritumoralen Ödems mit Glukokortikoiden, meist mit Dexamethason. Dieses wird perioperativ in hohen Dosen (6-16 mg täglich) verabreicht [13–15] und stellt mit pleiotropen Effekten ein potentes immunsuppressives synthetisches Steroid dar [16]. Somit kann es

durchaus einen Einfluss auf die immunologische Tumormikroumgebung und daraus resultierend auf nachfolgende Therapieregime haben.

Als ‚Glioblastoma multiforme‘ wurde die Tumorentität erstmalig von Bailey und Cushing (1926) beschrieben [17]. Damals bereits aufgrund des heterogenen makro- und mikroskopischen Erscheinungsbilds als multiform beschrieben, zeigt sich bis heute die neuropathologische Einteilung im Fluss: So wurden mit der WHO ZNS-Tumorklassifikation von 2016 zur Einteilung von Hirntumoren erstmalig phänotypische und molekulargenetische Parameter integriert angewendet [18, 19], während über fast ein Jahrhundert zuvor die Einteilung rein nach morphologischen Kriterien bei der lichtmikroskopischen Untersuchung von Hämatoxylin-Eosin Färbungen und immunhistochemischen Färbungen zur Diagnosestellung angewendet wurden [17].

In der aktuellen WHO-Klassifizierung der Tumoren des Zentralen Nervensystems (ZNS) von 2021 werden zu den diffusen Gliomen im erwachsenen Patienten unter anderem Astrozytome (IDH-mutiert, WHO-Grad 2-4), Oligodendroglome (IDH-mutiert, 1p/19q-codeletiert, WHO Grad 2 und 3) sowie Glioblastome (IDH-Wildtyp, WHO-Grad 4) gezählt und somit mithilfe einer Kombination aus molekularen und histologischen Kriterien definiert [20]. Während in der Vorgängerversion ein IDH-mutierter und nicht 1p/19q kodeletierter Tumor mit entsprechenden histomorphologischen Kennzeichen als sekundäres Glioblastom bezeichnet wurde [18], wird diese Nomenklatur (primäres/sekundäres Glioblastom) in der aktuellen Version verlassen und hier stattdessen mit homozygoter CDKN2A/B Deletion bei IDH-mutiertem und nicht 1p/19q kodeletiertem Gliom ein Astrozytom ZNS-WHO-Grad 4 definiert. Das Glioblastom wird in der neuen Version als ein IDH-Wildtyp Gliom mit histologischen Glioblastommerkmalen (thrombosierte Gefäße, Nekrosen, glomeruloide Gefäßproliferate) oder ein IDH-Wildtyp Gliom ohne histologische Glioblastommerkmale, aber mit TERT-Promotor-Mutation oder EGFR-Genamplifikation +7/-10, definiert. Bei IDH-Wildtyp Gliomen mit Fehlen dieser molekularen Glioblastomkriterien werden diese Tumoren durch Bestimmung weiterer molekulärer Merkmale anderen Entitäten zugeordnet [20].

Als wichtiger prognostischer Faktor wird routinemäßig die Methylierung, also das epigenetische Silencing, des MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase) DNA-Reparaturgens im Glioblastom bestimmt. Der Methylierungsgrad ist in der klinischen Behandlungsentscheidung relevant, da bei hohem Methylierungsgrad ein längeres Überleben bei Behandlung mit dem alkylierenden Chemotherapeutikum Temozolomid gezeigt wurde [21].

b. Tumorzellen und immunologische Mikroumgebung

- i. Neoplastische Zellen: Von der statischen Cancer stem cells (CSC)
Hypothese zu fluiden phänotypischen *Cell states*

Die neoplastischen Zellen des Glioblastoms (GBM) zeichnen sich durch eine erhebliche intra- und interindividuelle Heterogenität aus, die eine der größten therapeutischen Herausforderungen darstellt und grundlegende Fragen zur zellulären Ursprungsart des Tumors offenlässt. Ursprünglich durch die Krebsstammzell-(CSC)-Hypothese erklärt [22], führte die Inkonsistenz geeigneter Marker zu einer wachsenden Skepsis gegenüber einem starren hierarchischen Modell. Neuere hochauflösende Einzelzellanalysen (scRNA-seq) identifizierten stattdessen dynamische und kontinuierliche Zellzustände (z. B. AC-like, MES-like, OPC-like, NPC-like) [23], die in allen Tumoren gleichzeitig auftreten und durch extrinsische Faktoren wie Mikroumgebung, Therapie oder Lokalisation beeinflusst werden [24]. Die Konzepte der proneural-mesenchymalen Transition (PMT) und andere entwicklungsbiologische Modelle beschreiben die Fähigkeit von Tumorzellen, ihren Phänotyp flexibel zu verändern, etwa von einem migratorischen, CSC-ähnlichen proneuralen Typ zu einem resistenten, invasiven mesenchymalen Typ [25–28]. Diese Plastizität unterwandert nicht nur therapeutische Ansätze, sondern stellt auch die CSC-Hierarchie infrage und weist auf die Bedeutung extrinsischer Modulatoren, insbesondere der immunologischen Tumormikroumgebung, für zukünftige Therapiestrategien hin. Ein tiefergehendes Verständnis des Zusammenspiels zwischen *Cell state* der neoplastischen Zelle und entsprechenden Faktoren aus der immunologischen Tumormikroumgebung (TiME) ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

ii. Immunologische Tumormikroumgebung im GBM (TiME)

1. Das ‚immunologisch kalte Glioblastom‘

Die Begrifflichkeit von immunologisch ‚heißen‘ oder ‚kalten‘ Tumoren wurde erstmalig von Camus et al. (2009) im Zusammenhang mit der immunologischen Subklassifizierung von kolorektalen Karzinomen (heiß/variabel/kalt) eingeführt, was in diesem Zusammenhang drei Subgruppen mit deutlich unterschiedlichem Rezidivrisiko abbildete [29]. Mit dem Aufkommen der Immun-Checkpoint Inhibitoren zeigte sich diese Unterteilung als sehr passend, um ein Therapieansprechen über unterschiedliche Tumorentitäten hinweg vorherzusagen, oder als therapeutisches Ziel die immunologische Tumormikroumgebung „aufzuwärmen“, um dann ein Ansprechen zu erzielen [30].

„Heiße Tumoren“ zeichnen sich insbesondere durch eine inflammatorisch ausgerichtete Tumormikroumgebung, reich an tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs), eine PD-L1 Überexpression, aber auch genomische Instabilitäten und eine bereits vorhandene Immunantwort aus. „Kalte Tumoren“ enthalten nur eine sehr geringe Anzahl von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL), die größtenteils dysfunktional oder erschöpft sind, und insgesamt ist ein immunsuppressives Milieu ausgebildet [30].

Immunologisch gesehen ist das Glioblastom - neben seiner privilegierten Lage im Hirnparenchym mit der Abschirmung durch die Blut-Hirn-Schranke - ein kalter Tumor mit einer immunsupprimierenden Tumormikroumgebung, insbesondere vermittelt durch die M2-Polarisierung der Glioblastom-assoziierten Mikroglia/Makrophagen (GAMM), und einer Immunzellkomposition mit nur sehr wenigen und zugleich erschöpften TIL oder inflammatorischen Effektorzellen wie Neutrophilen oder NK-Zellen [31].

González-Tablas Pimenta et al. (2021) schlüsselten die immunzelluläre Zusammensetzung des Glioblastoms an einer Serie von n=44 Patienten mittels FACS-Panel auf, wobei hier 73% der zellulären Zusammensetzung Tumor- oder andere astrozytäre Zellen ausmachten und fast ein Viertel Immunzellen darstellte (s. *Tabelle 1*). GAMM dominierten mit einem Gesamtanteil von 13%, davon v.a. Mikroglia (10%) und aus dem peripheren Knochenmark stammende Makrophagen (BMDM) (3%), wobei diese Zusammensetzung zwischen den einzelnen Patienten eine ausgeprägte Streubreite zeigte [32].

Zellart	Prozentanteil der Gesamtzellen
Tumorzellen/Astrozyten	73% ± 16%
Immunzellen	24% ± 18%
Myeloide Zellen	~45%
GAMM	~13%
Mikroglia	10% ± 11%
BMDM	3% ± 5%
Neutrophile	5% ± 9%
MDSC	4% ± 8%
Lymphoide Zellen	<10%
CD4 ⁺ T-Zellen	0,5% ± 0,7%
CD8 ⁺ T-Zellen	0,6% ± 0,7%
Tregs	0,1% ± 0,2%

B-Zellen	$0,1\% \pm 0,2\%$
NK-Zellen	$0,05\% \pm 0,05\%$

Tabelle 1: Darstellung der zellulären Zusammensetzung der TiME nach González-Tablas Pimenta et al. (2021) [32].

Die eingangs beschriebenen molekularen Subgruppen der neoplastischen Zellen (und damit der Prognose) im GBM im Sinne der *Cell states* sind assoziiert mit unterschiedlichen immunologischen Phänotypen der Tumormikroumgebung, wie zum Beispiel erhöhte CD163⁺ Zellen mit mesenchymalem GBM und schlechterer Prognose [33].

Ein gemischt-myeloid/lymphoider Immunzell-Subtyp wurde in dieser FACS-basierten Studie mit einem deutlich schlechteren Outcome assoziiert [32]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die intratumorale Dichte von GAMM und MDSC in malignen Gliomen am höchsten ist und invers mit dem Patientenüberleben korreliert [34]. Außerdem wurde eine höhere Anzahl von CD4⁺ T-Zellen mit dem Status ‚MGMT-unmethyliert‘, eine niedrigere CD4⁺ Zellzahl mit längerem Überleben, und eine höhere Anzahl von CD8⁺ Zellen mit einer größeren Tumorgröße assoziiert [35].

Weiterhin zeigten sich differentielle Mikroglia und Makrophagenprofile beim Vergleich von IDH-mutierten und IDH-Wildtyp Gliomen [36]. In *low-grade gliomas* (LGG) wurde das Vorhandensein von bone-marrow-derived macrophages (BMDM) mit signifikant schlechterem Überleben korreliert [37]. Anders als in anderen soliden Tumoren sind im Glioblastom (IDHwt) TILs mit schlechter Prognose assoziiert [38].

Ravi et al. (2022) bringen den MES-like Subtyp in örtliche und molekulare Korrelation mit mikroglialen Zellen, die wiederum zu einer T-Zell Erschöpfung über IL-10 Signalisierung führen [39].

Diese Korrelationen aus Genexpression der neoplastischen Zellen und der immunologischen Mikroumgebung beschreibt einmal mehr das Wechselspiel und die bidirektionale Beeinflussung dieser beiden Kompartimente.

2. GAMM (*glioblastoma-associated microglia and macrophages*)

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) sind in einer Vielzahl von Tumorentitäten von besonderem Interesse. Im Kontext von Gliomen oder Glioblastomen wird nomenklatorisch der Begriff „Glioblastom-assoziierte Mikroglia/Makrophagen“ (GAMM) verwendet, da hier die

Unterscheidung zwischen Mikroglia und Makrophagen betont zur Geltung kommt, so dass in dieser Arbeit der Begriff GAMM durchgehend verwendet wird.

Das vorherrschende Immunkompartiment im Glioblastom stellen, wie oben erwähnt, die Glioblastom-assoziierten Mikroglia/Makrophagen (GAMM) – dieses macht bis zu 30% der Tumormasse aus [40].

Ontogenetisch entspringen sowohl Mikroglia als auch Makrophagen aus der myeloiden Zellreihe, wobei die hirn-residente Mikroglia in der frühen Embryogenese das Gehirn besiedelt und aus hämatopoietischen Stammzellen aus dem Dottersack stammt [41, 42], wohingegen Knochenmarksmakrophagen (BMDM, *engl.* bone-marrow derived macrophages) aufgrund von Chemokin-Signaling und Schädigung der Blut-Hirn-Schranke sekundär aus der Peripherie ins Gehirn invadieren können [43].

Abzugrenzen sind hiervon die der myeloiden Zellreihe angehörenden MDSC (myeloid-derived suppressor cells), die aus unreifen myeloiden Zellen des Knochenmarks stammen (s. *Tabelle 2*).

	GAMM	MDSC
Herkunft	- Mikroglia: residente ZNS-Zellen - Makrophagen: Monozyten aus dem Knochenmark	Unreife myeloide Zellen aus dem Knochenmark
Rolle	Phagozytose, Immunmodulation, Zytokinsekretion	Suppression der T-Zell Aktivierung und -Funktion
Subtypen	M1/M2-Spektrum, weitere Subtypisierung	M-MDSC (monozytisch) und PMN-MDSC (granulozytisch)
Marker (human)	z.B. CD11b ⁺ , IBA1 ⁺ , CD68 ⁺ , CD163 ⁺ (M2-like), TMEM119 (Mikroglia)	CD11b ⁺ , HLA-DR ^{low/-} , CD14 ⁺ (M-MDSC), CD15 ⁺ (PMN-MDSC)
Lokalisation	Tumorzentrum/-peripherie	Tumorinfiltrierend, angereichert im Knochenmark
Funktion im GBM	Protumorigen, angiogen, immunsuppressiv	Inhibieren CD8 ⁺ T-Zellen

Tabelle 2: Darstellung der Unterschiede zwischen GAMM und MDSC nach Huang et al. (2023) [44].

Unterschiede zwischen den beiden GAMM-Subpopulationen bestehen bezogen auf die örtliche Verteilung, den Stoffwechsel, immunologische Eigenschaften sowie in Bezug auf das Krankheitsstadium. Einerseits nehmen BMDM bei Extravasation in das Gliom nicht den mikroglialen Phänotyp an, können anhand verschiedener inzwischen bekannter Marker unterschieden werden und zeigen sich eher immunsuppressiv, phagozytierend und mit erhöhtem Citrat-Stoffwechsel [37]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass Gliom-

invadierende BMDM sich lokalisatorisch und anatomisch anders verteilen: während Mikroglia vermehrt im Bereich der peritumoralen Zone zu finden ist, zeigen sich BMDM in perivaskulären Nischen und im Bereich nekrotischer Areale [37, 43, 45]. In longitudinalen Studien zeigte sich in Therapie-naiven Patienten vor allem Tumor-assoziierte Mikroglia, im Rezidiv wurden vermehrt BMDM identifiziert [46].

Ganz allgemein zeigen Makrophagen eine funktionelle Plastizität abhängig von multifaktoriellen Einflüssen. Hier erfolgt klassischerweise eine Einteilung in die M1- und M2-Polarisierung [47, 48]. So werden M1-Makrophagen auch als klassisch aktivierte Makrophagen, induziert über Stimuli wie IFN-gamma und Lipopolysaccharide (LPS), bezeichnet und sezernieren entsprechend pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-alpha, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, die wiederum die Th1-Reaktionen und die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK) fördern [49]. Dieser Polarisierung wird ganz allgemein eine anti-tumorale Immunität zugeschrieben [49]. Getriggert durch Hypoxie, Azidose und von Tumorzellen stammende Faktoren und vermittelt über Faktoren wie IL-4, IL-13 und TGF- β sezernieren alternativ aktivierte Makrophagen (M2-Polarisierung) entzündungshemmende Zytokine wie IL-10 oder TGF- β und spielen eine Rolle in der Wundheilung, der Angiogenese und der Immunsuppression. Diesem Aktivierungszustand wird ganz allgemein Protumorigenität zugeschrieben, im Glioblastom im speziellen Immunevasion und Tumorwachstum [49, 50] (s. *Tabelle 3*).

	M1	M2
Zytokinprofil	Pro-inflammatorisch (TNF- α , IL-12)	Anti-inflammatorisch (z.B. IL-10, TGF- β)
Immunaktivierung	Aktiviert Th1 und NK-Zellen	Supprimiert Th1-Antwort
Tumorimmunität	Anti-tumoral	Pro-tumorigen
Prävalenz im GBM	Niedrig	Hoch

Tabelle 3: Darstellung der Charakteristika der M1/M2-Polarisierung in GAMM nach Ren et al. (2023) [49].

Während die Einteilung entsprechend der M1/M2-Marker weiterhin auch bei Untersuchungen im Glioblastom von großem Nutzen ist, muss gleichzeitig einschränkend die rudimentäre M1/M2 Dichotomie als stark vereinfachendes Konzept im Glioblastom betrachtet werden [51, 52]. Das ist nicht verwunderlich, da die M1/M2-Polarisierung ursprünglich auf eine Infektionsreaktion und *in vitro* definiert wurde, und somit die Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation im Glioblastom nur bedingt möglich ist [53]. Die eindeutige und robuste Zuordnung

von GAMM zum M2-Pol ist aufgrund der Abstufungen und Überschneidungen gescheitert, so dass auch der Versuch, über M2a, M2b und M2c Subkategorisierung dem durchmischten GAMM Phänotypen gerecht zu werden, aufgrund vieler Überschneidungen misslang [54]. So konnte gezeigt werden, dass M1- und M2-Gene in ein und derselben Zelle parallel exprimiert sein können [55] und dass im GBM ein GAMM-Anteil eher einem M0-Phänotyp entsprechen könnte [52]. Darüber hinaus expandieren Mikroglia und Makrophagen nicht klonal, so dass sich, anders als im Th1/Th2 System - an das ja die M1/M2-Systematik angelehnt ist - keine vergleichbaren Subsets ergeben [56]. Und schlussendlich müssen, wie oben bereits erwähnt, Makrophagen und Mikroglia als molekular völlig unterschiedliche Entitäten betrachtet werden, so dass ein darüberliegendes M1/M2-Spektrum dieser Unterscheidung nicht gerecht wird [57].

Da bis vor kurzem die phänotypische und funktionelle Aufteilung zwischen diesen ontogenetisch sehr unterschiedlichen Zellarten (hirn-residente Mikroglia vs. BMDM) innerhalb des GAMM-Kompartiments kaum möglich war, haben ältere Studien die Effekte der GAMM als Ganzes betrachtet (im Sinne der M1/M2-Polarität): hierbei wurden vor allem Tumorfördernde Effekte gezeigt, wo GAMM die Invasion antreiben [58–61], Glioma stem-like cells (GSC) Proliferation [62–65] und GBM Wachstum fördern [58, 65], die Migration [66], Immunsuppression [67] und Tumorprogression [68] antreiben, und insgesamt mit verschlechterter Prognose [69] und mit aggressiveren Tumoren korreliert wurden [70, 71].

Im Gegensatz hierzu jedoch gibt es bei differentieller Betrachtung der GAMM Hinweise darauf, dass Subpopulationen der GAMM zu einer Begrenzung des Tumorwachstums führen können: Beispielsweise wurden in pädiatrischen SHH (Sonic Hedgehog) Medulloblastomen - einer der vier molekularen Hauptsubtypen des Medulloblastoms, definiert durch eine aberrante Aktivierung des Sonic Hedgehog Signalwegs - für die TAM als Ganzes anti-tumorale Effekte beobachtet [72]. Ein höherer mikroglialer Anteil im GAMM-Kompartiment konnte mit verlängertem Gesamtüberleben bei Glioblastompatienten assoziiert werden [73]. Weiterhin konnte im GBM eine Effektorfunktion mit direkter Tumorzellphagozytose durch Mikroglia nach anti-CD47 Blockade gezeigt werden [74]. Darüber hinaus fanden Chen und Kollegen eine Inhibition der Tumorinvasion durch die Mikroglia in einem 3D GBM Gelatin Hydrogel Model [75]. Bis vor kurzem wurde die Mikroglia (als Untergruppe der GAMM) als homogene Gruppe von Zellen betrachtet, die sich durch plastische Anpassung an Cues aus der Mikroumgebung verändern können – diese Ansicht wird immer mehr in Frage gestellt [76]. Anhand Einzelzell-RNA-Sequenzierungen wurden im mikroglialen Kompartiment multiple transkriptionale Phänotypen im humanen ZNS, abhängig von Ort und Aktivierungszustand (entzündetes ZNS

vs. gesundes ZNS), beschrieben [55, 77, 78]. Weiterhin wurde von Ochocka und Kollegen im Jahr 2021 eine unvorhergesehene molekulare Heterogenität im GAMM-Kompartiment und ebenso geschlechterspezifische Unterschiede beschrieben [79]. Die Subphänotypisierung der Mikroglia (als GAMM-Subgruppe) ist also noch nicht abgeschlossen und es bedarf weiterer örtlich-definierter und hochauflöster Untersuchungen.

Obwohl sich hirnresidente Mikroglia und aus dem Knochenmark stammende, in das GBM infiltrierende Makrophagen ontogenetisch und funktionell stark unterscheiden, ist die Differenzierung zwischen diesen GAMM-Untergruppen nach wie vor herausfordernd [80–82]. Traditionellerweise wird Mikroglia von Makrophagen anhand unspezifischer Makrophagenmarker unterschieden. So wird bei Untersuchung von Einzelzellsuspensionen mittels Durchflusszytometrie anhand von CD45 und CD11b das Clustering der CD11b⁺ Zellen in CD45^{high} (Makrophagen) und CD45^{low/intermediate} (Mikroglia) zur Unterscheidung herangezogen [83], was jedoch unspezifisch ist. Auch leukozytäre Zellpopulationen können diese beiden Marker exprimieren [84]. Einen allgemeinen Marker für Mikroglia und Makrophagen in immunhistochemischen Untersuchungen stellt nach wie vor Iba1 dar, wobei dann eine Unterscheidung der beiden Gruppen anhand morphologischer Features erfolgen muss [85]. Auch dieses Vorgehen ist jedoch unspezifisch, da bei Aktivierung die morphologisch für Mikroglia im Ruhezustand typischen verzweigten Zellfortsätze rückgebildet werden, so dass hier die Unterscheidung deutlich erschwert bis unmöglich wird [85]. Darüber hinaus gibt es weitere allgemeine Mikroglia-Makrophagen Marker, die jedoch keine Unterscheidung der beiden Gruppen ermöglichen, wie z.B. CD14, CD68, CD80, CD115, CD206, HLA-DR, F4/80, CSF-1R und CD163. Bei Aktivierung zeigen sich Marker wie Iba1, CD68, CD206 und CD45 hochreguliert [86].

Durch die hoch-dimensional aufgelöste Auswertung von Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten konnten hochspezifische Marker für die mikrogliale Subpopulation identifiziert werden, wobei teilweise eine Expression in Nicht-Makrophagen Zelltypen möglich ist, so dass sich die Spezifität nur bei Betrachtung und Co-Expression mit anderen Makrophagenmarkern ergeben. Humane mikroglia-spezifische Marker beinhalten Tmem119, P2ry12 (Chemotaxis), Hexb, Sall1 (Expression auch in bestimmten neuronalen Populationen), C1q (beteiligt am Synapsenpruning), Gpr34, Olfml3, Mertk (Efferozytose), Pros1, Tyro3 und Tgfbr1 [86, 87].

TMEM119 ist ein spezifischer Marker für reife Mikrogliazellen. Interessanterweise wird dieser Marker - im Gegensatz zu vielen anderen Mikrogliamarkern - bei Mikrogliaaktivierung nicht

herunterreguliert, so dass er sich besonders eignet, um reaktive Mikroglia von infiltrierenden Makrophagen zu unterscheiden [88]. Weiterhin ist die Expression innerhalb des Hirnparenchyms spezifisch für Mikroglia und wird nur an anderen Stellen im menschlichen Körper von nicht-mikroglialen Zellen exprimiert (z.B. Osteoblasten) [84]. Mikroglia-spezifische Marker wie P2ry12 oder Sall1 werden im Vergleich dazu bei Aktivierung herunterreguliert, eignen sich also in vielen Kontexten bei der Untersuchung pathologischer Prozesse weniger gut als Marker [86]. Obwohl TMEM119 inzwischen eine prominente Stellung im Bereich der mikroglia-spezifischen Marker einnimmt, so ist hier die Funktion dieses Typ I Transmembranproteins noch unklar [88]. Limitierend wurden kürzlich auch TMEM119 negative Mikroglia-Subpopulationen identifiziert [89].

GAMM-bezogene therapeutische Ansätze im Glioblastom lassen sich drei Prinzipien zuordnen: a) GAMM-Depletion, b) GAMM-Re-Edukation oder Repolarisierung und c) Ansätze, die spezifisch auf protumorale GAMM-Funktionen abzielen. Bisher wurde eine Vielzahl verschiedener Targets in unterschiedlichen - vor allem präklinischen - Studien untersucht und kürzlich von Tang et al. (2023) zusammengefasst [90]. Prominent ist hierbei der Ansatz abzielend auf den CSF1-Rezeptor, da hier auf alle drei Prinzipien (Depletion, Re-Edukation und Inhibition protumoraler Funktionen) abgezielt wird und sogar eine Phase-II Studie an Rezidiv-Glioblastompatienten von Butowski et al. (2016) durchgeführt wurde. Jedoch zeigte der hier verwendete CSF1-Rezeptor-Antagonist Pexidartinib (PLX3397) - anders als bei präklinischen murinen Modellen - keinen positiven Effekt [91].

Zusammenfassend ist es von großer Wichtigkeit, Makrophagen bzw. Mikroglia isoliert zu betrachten, um die unterschiedlichen pro- und anti-tumorigenen Rollen dieser einzelnen Zellarten örtlich definiert in der Tumormikroumgebung zu verstehen. Die Mikroglia als Teil der GAMM (Glioblastom-assoziierten Mikroglia und Makrophagen) ist in der peritumoralen Zone von besonderem Interesse, da diese möglicherweise einen stärkeren anti-tumorigen Effekt haben als bisher angenommen und beim Therapie-naiven Patienten das Tumorwachstum begrenzen könnten, wobei beim therapierten Patienten (chirurgische Resektion + Radio-Chemotherapie) die dann vorherrschenden BMDM und fehlende Mikroglia ein Rezidiv eher zu begünstigen scheinen. Weiterhin gilt es, Mikroglia-Subtypen zu identifizieren, die in der komplexen Tumor Mikroumgebung besondere Rollen einnehmen.

3. Organotypische Rattenhirnschnitt-Co-Kultur (OBSC) zur Modellierung der immunologischen Tumormikroumgebung (TiME), insbesondere des mikroglialen Kompartiments

Organotypische Hirnschnittkulturen (OBSC) stellen ein 3D *in vitro/ex vivo* Modell dar, das in hohem Maße die Tumormikroumgebung abbildet und phänotypische und funktionelle Signaturen der *in vivo* Situation in einem *ex vivo* Setting replizieren kann [92]. Neben OBSC von Nagern kommen im Bereich der neuroonkologischen Forschung inzwischen auch vermehrt humane OBSC zum Einsatz [93]. Entscheidende Vorteile gegenüber anderen 2D oder 3D *in vitro* Technologien sind der Erhalt der morphologischen Eigenschaften des Gewebes und der 3-dimensionalen Zytoarchitektur (sogar ohne Zusatz von externen Wachstumsfaktoren), die Preservation der neuronalen elektrischen Aktivität und die Abbildung genetischer Signaturen vergleichbar mit der *in vivo* Situation [92]. Darüber hinaus sind OBSC deutlich kostengünstiger als die Untersuchung an *in vivo* Modellen und eine Reduzierung von *in vivo* Modellen verringert die Anzahl der benötigten Tiere, begrenzt die Belastung dieser Tiere, und steht somit im Einklang mit dem 3R-Prinzip (reduce, refine, replace). Aufgrund dieser Vorteile werden OBSC nicht nur in der neuroonkologischen Forschung eingesetzt, sondern auch im Bereich der Neurowissenschaften und Neurophysiologie (wofür die Methode initial konzipiert wurde) [94], zur Schlaganfall- und Schädel-Hirntrauma-Forschung [95], bei degenerativen [96], autoimmunologischen oder demyelinisierenden neurologischen Erkrankungen [97].

Nachteile der OBSC sind die fehlende Integrität von Blutgefäßen und das damit einhergehende Fehlen einer Blut-Hirn-Schranke. Es sind zwar epitheliale Zellen im Grundgerüst vorhanden, jedoch ohne oder mit veränderter Funktion bei fehlender Blutzirkulation. Dies schränkt die Vergleichbarkeit mit der *in vivo* Situation ein.

Zwar muss an dieser Stelle die Unvollständigkeit der immunologischen Tumormikroumgebung, bedingt durch das Ausbleiben von einwandernden Immunzellen aus der zirkulatorischen Peripherie, im OBSC als Nachteil beschrieben werden, jedoch ermöglicht diese Eigenschaft die isolierte Untersuchung des mikroglialen Einflusses aus dem GAMM-Kompartiment und kann somit als Vorteil genutzt werden [98, 99].

Im Bereich der Neuroonkologie hat das OBSC als *ex vivo* Modell inzwischen einen hohen Stellenwert [92]. Neben dem Einsatz im Bereich der Hirnmetastasenforschung zur Untersuchung der Grenzzone [100] wurde im Bereich der hirneigenen Tumoren insbesondere das Migrations- und Invasionsverhalten anhand muriner OBSC untersucht [101, 102].

Die Ausnutzung der immunologischen Situation im OBSC mit dem isolierten Vorhandensein von Mikroglia zur Untersuchung der mikroglialen Rolle beim Auswachsen von Hirntumoren ist bis dato noch nicht erfolgt.

iii. Zonierung des Glioblastoms

Im Glioblastom (GBM) sind verschiedene Zonen beschrieben, die durch eine ausgeprägte metabolische, zelluläre und immunologische Heterogenität gekennzeichnet sind. Von außen nach innen, also vom gesunden Gewebe ausgehend, zeigt sich zunächst die peritumorale Zone mit einzelnen neoplastisch-migratorischen Zellen, gefolgt vom Übergang des GBM-Parenchym-Interfaces zur Zone der zellreichen Pseudopalisaden als Übergang zum nekrotischen Tumorkern mit aufsteigender Hypoxie von außen nach innen [103].

Kürzlich wurde ein gemeinsames Empfehlungspapier zur räumlich kontrollierten und standardisierten Entnahme und Verarbeitung bei der Resektion diffuser Gliome veröffentlicht. Hier wurde die Entnahme von Proben aus den verschiedenen Zonen (Tumorkern, kontrastmittelreichernder Anteil, umliegender nicht kontrastmittelreichernder mutmaßlicher Tumoranteil und das unmittelbar angrenzende makroskopisch unbeeinträchtigte Hirnparenchym (wenn machbar und indiziert)), die präzise Entnahme und Dokumentation innerhalb eines adäquaten neuronavigatorischen Instruments und die Entnahme idealerweise vor dem Debulking zur Vermeidung von Hirnverschiebungen empfohlen [104].

Von besonderem Interesse tritt die peritumorale Zone in Erscheinung, welche das eigentliche postoperative therapeutische Target darstellt, das nach der totalen Resektion eines kontrastmittelreichernden Tumors zu behandeln ist, während bis dato die Mechanismen des Wiederauftretens in diesem Bereich nur unzureichend verstanden sind und therapeutische Ziele in diesem Bereich schwer fassbar bleiben [7]. Andererseits erfordern die Konzepte des nicht kontrastmittelreichernden Tumors (nCET), der FLAIRektomie oder der supramaximalen Resektion ein besseres Verständnis für die chirurgische Ausdehnung zur Miterfassung der peritumoralen Parenchymzone, um den chirurgischen Horizont bei Glioblastom-Resektionen möglicherweise zu erweitern.

Von besonderem Interesse ist in dieser Zone der spatio-temporale Verlauf der Glioblastomausbreitung bzw. der Rezidiv-Entstehung und die damit einhergehende Kippung

der immunologischen Tumormikroumgebung (insbesondere Mikroglia peritumoral) von anti-tumoral zu protumorigen.

iv. Einfluss von Dexamethason auf das Glioblastom und TiME

Im klinischen Alltag wird Dexamethason seit den 1960er Jahren als Teil der standardmäßigen perioperativen Behandlung von Hirntumorpatienten eingesetzt [105], wobei bis heute der Einsatz nicht mit Klasse I Evidenz unterstützt ist, was bedeutet, dass der therapeutische Nutzen nicht mit prospektiv-randomisierten Studien bewiesen wurde [106, 107].

Ein Grund hierfür ist der offensichtliche und sofortig eintretende Nutzen in der symptomatischen Akutbehandlung mit Dexamethason, vermittelt durch eine Verminderung des Glioblastom-assoziierten peritumoralen Hirnödems und konsekutive Verbesserung der teils hohen neurologischen Symptomlast [108–110]. Es weisen jedoch immer mehr Studien sowohl auf perioperative Nebenwirkungen als auch auf längerfristige Auswirkungen, bezogen auf die Weitertherapie, hin. Eine Umfrage im Jahr 2022 zeigte, dass von 80% der befragten Neurochirurgen Dexamethason perioperativ eingesetzt wird und fast die Hälfte Dexamethason niederschwellig unabhängig von der bestehenden Symptomatik bei Patienten einsetzen [13]. Im Kontrast hierzu wurde kürzlich der perioperative Einsatz von hochdosiertem Dexamethason von Experten aus unterschiedlichen Disziplinen infrage gestellt [111].

Pathomechanistisch wirkt Dexamethason als synthetisches langwirksames Kortikosteroid über eine Reduktion der mikrovaskulären Permeabilität über erhöhte Tight Junction Integrität und ZO-1 und Occludin Expression [112], so dass präoperativ das vasogene Tumorödem und damit die Symptomlast offensichtlich reduziert werden kann [113–115]. Weiterhin kann es während der chirurgischen Tumorresektion einer operativ induzierten Hirnschwellung vorbeugen [116]. Postoperativ zeigt Dexamethason eine Linderung von Schmerz- und Übelkeitssymptomen, so dass die postoperative Hospitalisierungszeit etwas kürzer zu sein scheint [117], und der neurologische Performanzstatus zu Beginn der adjuvanten Therapie besser ist [118].

Inzwischen weisen jedoch immer mehr Studien und Analysen auf einen nachteiligen Einfluss von Dexamethason auf das generelle klinische Outcome hin. Zuletzt wurde von Scheffler et al. (2024) in einem systematischen Review und Metaanalyse nach Einschluss von insgesamt 22 retrospektiven Untersuchungen eine höhere Dexamethasondosis mit schlechterem

Gesamtüberleben (hazard ratio 1,62, KI 1,40-1,88) und einem schlechteren progressionsfreien Überleben (HR 1,40, KI 1,23-1,81) assoziiert, was bezogen auf das Gesamtüberleben auch nach Korrektur entsprechend dem klinischen Status nachvollziehbar war (HR 1,52, KI 1,38-1,67) [119]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in einer Metaanalyse von Arora et al. (2024), wobei hier sieben Studien mit gepoolten Daten von insgesamt 1257 Patienten eingeschlossen wurden [120]. Dieser Effekt wird durch eine Reihe weiterer retrospektiver Metaanalysen unterstrichen [121–123]. Limitierend hierbei ist der durchweg retrospektive Charakter der eingeschlossenen Studien mit mittlerer bis niedriger Evidenzstärke für das Gesamtüberleben bzw. das progressionsfreie Überleben, da hierbei per se das Kriterium für die Dexamethasongabe (wie z.B. Tumorgröße, Ödemlast und hohe Symptomlast bei ungünstiger Tumorlokalisierung) ein Confounder für schlechteres Outcome darstellt, welcher retrospektiv nicht kontrolliert werden kann.

Daneben zeigen sich auch mögliche sonstige negative Nebenwirkungen durch die Dexamethasonbehandlung. Beschrieben sind hier postoperative psychiatrische und kognitive Nebenwirkungen [124], verschlechterte höhere neurologische Funktionen bei Rezidiv-Glioblastompatienten [125], negative Einflüsse auf die Wirksamkeit der Radiochemotherapie [126–129], verschlechterte systemische Immunfunktion der Patienten [130] und ein erhöhtes perioperatives Infektionsrisiko [131, 132].

Der Ruf nach einer randomisiert kontrollierten Studie zum Aufwiegen therapeutischer Vorteile und potenzieller Nebenwirkungen wird deshalb immer lauter, insbesondere im Hinblick auf die oben erwähnten Metaanalysen, aber auch bezugnehmend auf unten aufgeführte Veränderungen und Einflüsse von Dexamethason auf das Glioblastom, die entsprechende Mikroumgebung und die immunsuppressiven Wirkkomponenten [133–135].

Mit dem Einsatz von Immuntherapien (u.a. bei Glioblastomen, Melanom- und NSCLC-Metastasen) und anderer mit dem Immunsystem in Zusammenhang stehenden Therapien (z.B. GAMM-targeted therapy oder immunologische Signalweg-Inhibition) ist die Untersuchung einer möglichen therapierelevanten Beeinflussung der immunologischen Tumormikroumgebung durch Dexamethason im Glioblastom und bei zerebral metastasierten Tumorentitäten von hoher klinischer Relevanz [136, 137].

Anhand verschiedener *in vitro* Untersuchungen an Zelllinien zeigte zwar Dexamethason eine teils direkte oder indirekte anti-tumorale Wirkung [138–142]. Gleichzeitig konnten neuere präklinische Studien zeigen, dass Dexamethason die anti-tumorale Immunantwort in Gliomen

inhibiert und somit zu einer protumorigenen Tumormikroumgebung beiträgt, jedoch sind entsprechende Vergleichsuntersuchungen an humanem Gewebematerial von Glioblastompatienten bis dato kaum vorhanden [143]. Mehrere Studien zeigen zwar den Einfluss von Dexamethason auf die systemisch zirkulierenden Zellen oder Interleukine im Serum bei Gliompatienten [130, 144–151]. So fand sich in einer kürzlich erschienen Untersuchung von 169 Blutproben mittels hochdimensionaler Massenzytometrie durch Dexamethason eine Abnahme von CD8+ T-Zellen und Monozyten sowie ein Anstieg von B-Gedächtniszellen im peripheren Blut [152] bei generell vorhandener Lymphozytendepletion in GBM Patienten [153, 154]. Einschränkend konnten jedoch Moyes et al. (2018) auch darlegen, dass die Dexamethason-bedingten Veränderungen im Blut nicht mit den Veränderungen im Glioblastomgewebe korrelieren [155]. Vielmehr zeigten sie, dass sich die Frequenz myeloider Zellen (immunhistochemisch dargestellt mit CD163, CD68, S100A9) in Dexamethason-behandelten Patientenproben signifikant von Dexamethason-naiven Proben unterscheidet [155]. Carenza et al. (2023) konnten einen schädlichen Effekt durch Dexamethason auf die ohnehin bereits funktionell eingeschränkten dendritischen Zellen im Bereich der Gliom-Mikroumgebung feststellen [156].

Untersuchungen auf die Beeinflussung der Wirksamkeit von Immuntherapien weisen auf einen negativen Einfluss durch die Dexamethasonbehandlung hin [157]. Im Mausmodell zeigte sich ein aufgehobener Überlebensvorteil von Immuncheckpoint-Inhibitoren (und onkolytischer Virustherapie) durch T-Zell-Depletion und Blockade der intratumoralen und globalen Immunantwort [158, 159]. Generell zeigte sich in einer Phase-III randomisiert-kontrollierten Studie (RCT) keine Wirksamkeit von Immuntherapien im GBM [9, 11, 12], jedoch in einer Subgruppenanalyse ein Ansprechen bei Dexamethason-naiven Patienten [12]. In einer gescheiterten Phase-II RCT zeigte sich, dass 90% der Ansprechraten in GBM Patienten stattfand, die kein Dexamethason erhalten hatten [160]. Weiterhin verhinderte Dexamethason eine positive Neo-Antigen-spezifische T-Zell Antwort und T-Zell Infiltration in den Tumor [161].

Zusammenfassend sollte bei der Untersuchung der immunologischen Mikroumgebung sowie in Studien zu immunologisch abzielenden Therapien die prätherapeutische Dexamethasongabe bei Glioblastompatienten mit einkalkuliert werden, da in diesem Zusammenhang eine relevante medikamentöse Intervention noch vor neuropathologischer Diagnosesicherung stattfindet. Die immunologischen Auswirkungen der Dexamethasongabe auf das Glioblastom sind nur im Ansatz untersucht und bei weitem noch nicht verstanden, so dass diese Arbeit hier einen Beitrag leisten soll.

v. CXCR2/IL-8-CXCL2 Achse – Therapieansätze im Glioblastom

Chemokine ganz allgemein sind Signalproteine, die unter anderem die Chemotaxis verschiedener Zellgruppen vermitteln. Diese werden in Familien entsprechend ihres konservierten Cystein Motifs im Bereich des N-Terminus eingeteilt, so dass es hier insgesamt vier Gruppen gibt: CCL, CXCL, XCL, CX3CL [162]. Die CXC-Chemokine werden wiederum entsprechend des Vorhandenseins eines N-terminalen ELR-Motifs (Glu-Leu-Arg) in ELR⁺ und ELR⁻ CXC Chemokine unterteilt und spielen eine Rolle in verschiedenen inflammatorischen und Stoffwechselerkrankungen, aber insbesondere auch bei verschiedensten Tumorentitäten [163].

Während CXCL2 neben CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 (=IL-8) und CXCL17 zu den ELR⁺ CXC-Chemokinen gezählt wird, gehören CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14 und CXCL16 zu den ELR⁻ CXC-Chemokinen, wobei vereinfacht erstere eher protumorigene und zweitere eher tumorsuppressive Eigenschaften aufweisen [162].

Neben den 17 CXC Chemokin Liganden existieren sieben CXC Chemokinrezeptoren (CXCR1-7), wobei ELR⁺ CXCL-Liganden an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und/oder CXCR2 binden, welche meist pro-tumorige Signalwege aktivieren [162]. Diese protumorigen Effekte erfolgen einerseits über die Regulation der Angiogenese, andererseits über Recruitment verschiedener Immunzellarten und Regulation von Entzündungskaskaden sowie die Verstärkung der Tumorzellauflauf (Invasion/Migration) [164].

Generell sind Effekte der CXCR2-Liganden auf die Prognose abhängig von der Tumorentität, wobei diese ganz allgemein mit EMT, Angiogenese, Recruitment von Neutrophilen und der Anzahl von M1-Makrophagen assoziiert sind [165, 166].

Neben einer Expression von IL-8 (=CXCL8), CXCL2, CXCR1 und CXCR2 in verschiedenen Glioblastom-Tumorzelllinien zeigt sich in Glioblastompatienten ebenso eine Expression durch Tumorzellen und Endothelzellen [167].

Der CXCR2-Gehalt ist in Gliomgewebe im Vergleich zu normalem Hirngewebe signifikant erhöht und in höhergradigen Gliomen im Vergleich zu niedriggradigen Gliomen sowie im Rezidiv kann eine gesteigerte Sekretion beobachtet werden [168]. Mithilfe von TCGA-Datenbank Analysen zeigte sich, dass höhergradige Gliome verstärkt CXCR2 exprimieren, eine Korrelation mit dem Gesamtüberleben konnte hier jedoch nicht gefunden werden [169].

Widersprüchlich hierzu konnte in einem anderen Kollektiv von 63 Patienten eine prognostische Signifikanz bei niedriggradigen Gliomen gezeigt werden [170]. In einer anderen TCGA Datenbank Untersuchung zeigte sich allerdings ein Zusammenhang aus erhöhter GBM Aggressivität und erhöhter CXCL1 und CXCL2 Expression [171].

Ein relevanter Einfluss der CXCR2-IL-8/CXCL2 Achse wurde insbesondere im Bereich der tumorfördernden Neo-Angiogenese gezeigt. So zeigte sich in Untersuchungen am Glioblastom ein Einfluss des CXCR2 Signalings auf endotheliale Zellen und ein entsprechender Effekt auf die Angiogenese [167].

Der proangiogenetische Effekt von IL-8 wird vornehmlich durch die Bindung an CXCR2, aber auch CXCR1 vermittelt [172]. Neben VEGFA kann IL-8 gleichermaßen die Angiogenese induzieren und ein Fortschreiten eines niedriggradigen Glioms in ein Glioblastom mitbedingen [173].

In vivo und *in vitro* konnte gezeigt werden, dass der IL8/CXCR2 Signalweg in Tumorzellen eine Resistenz gegen anti-angiogenetische Therapien induziert und die Bildung von sogenanntem „*vascular mimicry*“ im Glioblastom durch eine CXCR2 Blockade verringert werden kann [174].

Darüber hinaus wurde IL-8 über CXCR2 eine Schlüsselfunktion in der Vermittlung Glioblastom-induzierter Gefäßpermeabilität zugeschrieben.[175]

Direkte Auswirkungen hat die CXCR2-IL-8/CXCL2 Achse auch isoliert auf die TiME. Durch das Glioblastom sezerniertes CXCL1/2/3 führt über CXCR2 exprimierende PMN-MDSCs zu einer PD-L1 und CTLA-4 Resistenz [176].

Zur Verbesserung der CAR-T-Zell-Therapie konnte über die Modifizierung von IL-8-Rezeptor, CXCR1 und CXCR2 die Persistenz von T-Zellen im Tumormausmodell verbessert werden [177].

Eine Wechselwirkung von durch PDCD10 (programmed cell death receptor 10) vermitteltem CXCL2-CXCR2 Signaling wurde zwischen Glioblastomzellen und GAMM beschrieben, wobei eine CXCR2-Blockade die GAMM Zellmigration aufheben kann [178].

In den meisten Fällen zeigt sich ein enger Zusammenhang zwischen immunologischen und vaskulären Einflüssen von CXCR2-IL8/CXCL2, da immunologische Zellen als Vermittler auftreten und Endothelzellen immunologische Signalwege mitgestalten. In einer ersten Untersuchung von Desbaillets et al. (1997) wurde bereits beschrieben, dass IL-8 früh in der

Astrozytomentwicklung durch inflammatorische Stimuli induziert und später aufgrund von Sauerstoffmangel verstkt exprimiert wird. So fördert es Angiogenese und die Leukozyteninfiltration und Aktivierung gleichermaßen und sequentiell [179]. IL-8 scheint die Tumorzellproliferation und das ‚vascular mimicry‘ zu verstken [180].

Aus Mikroglia/Makrophagen Isolaten aus dem Gliom wurde eine Überexpression proangiogenetischer Moleküle festgestellt, wobei CXCL2 stark hochreguliert war und *in vitro* sogar stärkere angiogenetische Aktivität als VEGF zeigte. Durch eine Mikroglia/Makrophagen Depletion *in vivo* zeigten sich eine deutlich verringerte Gefbdichte und kleinere Tumorvolumina; bemerkenswerterweise frte eine Mikroglia spezifische Depletion zu einer ähnlichen Gefbverringerung wie die Ablation des gesamten myeloiden Kompartiments, so dass speziell residente Mikroglia eine entscheidende modulatorische Rolle in der vaskulären Homostase in Hirntumoren zu spielen scheint und gleichzeitig eine wichtige Quelle von proangiogenetischen Faktoren und Zytokinen darstellt, was wiederum die enge Überlappung aus Angiogenese und immunzellulrer Aktivität verdeutlicht [181].

In Bezug auf die CXCR4-Blockade existieren inzwischen erste klinische Studien im Glioblastom, eine CXCR2-Blockade ist bis dato lediglich am Tiermodell untersucht [182]. Immerhin befinden sich verschiedene Inhibitoren der CXCR2-IL-8/CXCL2 Achse in zahlreichen Phase-I und Phase-II klinischen Studien zu anderen Tumorentitäten (z.B. metastasiertem Melanom: NCT03161431) [183].

In vivo zeigte sich durch CXCR2-Blockade ein 50% reduziertes Gliomvolumen mit verringrigerter Gefbdichte und Akkumulation von Mikroglia/Makrophagen im Mausmodell, wobei die Interaktion dieser myeloiden Zellen mit den Tumorgefben verstkt war. Weiterhin gab es einen direkten Einfluss auf die Proliferation von Gliom- und Endothelzellen *in vitro* [184].

In vitro zeigte die Kombination aus Temozolomid und einem CXCR2-Inhibitor Veränderungen in primären humanen Endothelzellen, wobei CXCR2 auf Genexpressionsebene 5-fach hochreguliert, auf Proteinexpressionslevel jedoch ca. 70% reduziert war [185].

Da eine geringere Infiltration von GAMM in Rezidiv-Glioblastomen gefunden wurde und gleichzeitig eine erhöhte GAMM Infiltration im Primärtumor mit verringertem Gesamtüberleben assoziiert war, wärend Patienten bei Temozolomidtherapie IL-8 exprimierten und Temozolomid die Expression von CXCL2 verstkte, konnte dies in einem Mausmodell mit der Kombinationsbehandlung aus Temozolomid und CXCR2-Blockade mit konsekutiv verbesserten anti-tumoralen Effekten nachvollzogen werden, möglicherweise vermittelt durch Verhinderung von CXCR2-vermittelten Therapieresistenz [186].

Einige Untersuchungen verdeutlichen den Einfluss der CXCR2-IL-8/CXCL2 Achse direkt auf neoplastische, insbesondere auf Tumorstammzellen im Glioblastoma (CSC). Insbesondere scheint CXCL8 (=IL-8) ein Schlüsselfaktor für verstärkte zelluläre Plastizität im Glioblastom zu sein. Neben dem Zusammenhang zwischen IL-8 und Tumorprogression wurde IL-8 Signaling auf epigenetischer Ebene mit erhöhtem Tumorauswachsen in Verbindung gebracht [187].

Die Expression und Sekretion von IL-8 durch mesenchymale GSC aktiviert PI2K/Akt und NF- κ B Signalwege, die die GSC-Proliferation, Überleben und Selbsterneuerung vermittelt. Gleichzeitig wird über CXCR2-JAK2/STAT3 Signaling in GAMM ein M2-Phänotyp über parakrine und zellextrinsische Wege unterhalten [188].

Erhöhte Tumorzellinvasion wurde durch die Stimulation von CSC durch endothelial sezerniertes IL-8 beschrieben, wobei eine IL-8 Blockade *in vitro* die Sphäroidformation und *in vivo* die Tumorbildung einschränkte [189]. IL8-abhängig wurde ein Synergismus zwischen Endothelzellen und CSC gefunden, der die malignen Eigenschaften der CSC steigert [190]. Ebenso wurde *in vitro* eine verminderte Proliferation und Migration von GSCs durch CXCR2-Blockade erreicht [191]. Zur Erhaltung der Stammzelleigenschaften in GSCs schien in einer weiteren Untersuchung mehr die IL-8/CXCR1/STAT3 Signalwege entscheidend zu sein, weniger die CXCR2 Achse [192]. Über ein aberrantes NF- κ B Signaling wurde IL-8 eine zentrale Rolle bei der Gliominvasion zugeschrieben [193].

Allgemein scheint autokrines IL-8 Signaling eine Schlüsselrolle in der Aktivierung eines aggressiven Phänotyps im Glioblastom zu spielen, so dass CXCR1/CXCR2 zentrierte pharmakologische Ansätze denkbar erscheinen [194].

c. Fragestellung und Zielsetzung dieser Doktorarbeit

Ziel dieser Arbeit war es, hypothesen-bildend pro-tumorigene parakrine immunologische Signale bzw. Zytokine zu identifizieren und diese im Kontext mit dem zellulären Hauptkompartiment der immunologischen Tumormikroumgebung im Glioblastom (also dem mikroglialen Kompartiments und allgemein dem GAMM) zu untersuchen. Es sollte dann hypothesen-zentriert der Einfluss von Dexamethasontherapie bei Glioblastompatienten auf das GAMM-Kompartiment und die CXCR2-IL-8/CXCL2 Achse untersucht werden.

Hierfür wurden zunächst *in vitro* Zellkultur-Experimente und *ex vivo* Rattenhirnschnitt-Co-Kultur-Experimente durchgeführt, wodurch ein differentielles Signaling der CXCL2-CXCR2-Achse abhängig von Mikroglia und Dexamethason identifiziert werden konnte. Darüber hinaus

wurden diese Befunde anhand retrospektiv identifizierten Dexamethason-naiven und gematchten Dexamethason-behandelten Patienten aus der prospektiv geführten Regensburger Bioregister-Studie (GlioOutcome) nachvollzogen: Untersuchungen auf Genexpressionsebene, Proteinebene und zellulärer Ebene sollten hier vor allem den Einfluss von Dexamethason auf die Mikroglia-Makrophagen-Ratio, die klassische M1/M2-Ausprägung sowie die Beeinflussung der CXCL2/IL8-CXCR2-Achse zeigen und die Ergebnisse in einen klinischen Kontext gebracht werden.

2. Material und Methoden

a. Materialien

i. Laborausstattung, Instrumente und Verbrauchsmaterialien

Ausstattung, Instrumente, Materialien	Hersteller
Abzugshaube	Renggli Laboratory System, Rotkreuz Schweiz, Schweiz
Autoklav (VE-150)	Systec, Wettenberg, Deutschland
Autoklav (VX-150)	Systec, Linden, Deutschland
Begleitplatte 24-well (Falcon® 35/3504)	Corning, New York, USA
Beurer TL85, Tageslichtlampe, 12.000 Lux, EAN 6970229250293	Beurer GmbH, Ulm, Deutschland
Biologische Sicherheitswerkbank (Hera Safe Class II)	Thermo Fisher, Langenselbold, Deutschland
BioRad Opus 96, Echtezeit-PCR-System (qPCR)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Bio-Vortex (V1)	Kisker-Biotech, Steinfurt, Deutschland
Blotkammer	Renner, Dannstadt, Deutschland
Blottingpapier (703)	VWR International, Vienna, Österreich
Blutgasanalysator (ABL800 Flex)	Radiometer, Brønshøj, Dänemark
BZO-Versiegelungsfolie	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Dampfindikatorband (Comply™)	3M, Saint Paul MN, USA
Deckgläser (13 mm)	Thermo Fisher, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser (Menzel Gläser)	Thermo Fisher, Braunschweig, Deutschland
Digital-pH-Meter (647)	Knick, Berlin, Deutschland
Drucker (DPU-414)	Seiko, Mihamaku Chiba-shi Chiba, Japan
Drucker (P93E)	Mitsubishi, Senai, Malaysia
Einwegbeutel	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einweg-Nitrilhandschuhe (VersaTouch®)	Ansell, Querétaro, Mexico
Elektrophorese-Kammer für PCR	PeQLab, Erlangen, Deutschland
Elektrophorese-Kammer für WB	Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland
Entwickler (M35 X-OMAT Processor)	Kodak, Stuttgart, Deutschland

Flüssigstickstofftank (Thermolyne locator)	Thermo Fisher, Kerper Boulevard Dubuque, USA
Gefrierbehälter (Cryo1°C)	Nalgene, München, Deutschland
Glaszylinder (Duran)	Schott, Wertheim, Deutschland
Heizthermostat	Julabo EM, Seelbach, Deutschland
Hochleistungs-Chemilumineszenzfilm (Hyperfilm™ ECL)	Cytiva Amersham, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich (UK)
Hochtemperatur-Desinfektionsgerät (ED-115)	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Horizontalschüttler (Titramax 1000)	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Horizontalschüttler (WS-10)	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Hypercassette™	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich (UK)
Ibidi 2-Well-Inserts (80209)	Ibidi GmbH, München, Deutschland
IncidineTM OxyWipe S	Ecolab, Monheim am Rhein, Deutschland
Inkubator (Hera cell 150)	Thermo Fisher, Langenselbold, Deutschland
Invertiertes Fluoreszenzmikroskop (IX70)	Olympus, Tokyo, Japan
Kamm (14-well, 1,5mm)	PeQLab, Erlangen, Deutschland
Konstanttemperatur-Wasserbad 37°C (5A)	Julabo, Seelbach, Deutschland
Kryokonservierungsröhrchen (2ml)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Kryostat Leica, CM 1950	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank -20°C (MedLine)	Liebherr, Lienz, Österreich
Kühlschrank 4°C (Glass line)	Liebherr, Lienz, Österreich
Kühlschrank -80°C (Forma 900 Series)	Thermo Fisher, Marietta, USA
Kunststofffolie	A.Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Küvette	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Laborspülmaschine (G7883 CD)	Miele, Gütersloh, Deutschland
Laborwaage	Wägetechnik Dürnberger Acculab, Obertraubling, Deutschland
Liner-Pipette (30-300 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer (MR2002)	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikroröhrchen für die Lagerung (0,5 ml/2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikroröhrchen für die Reaktion (0,5 ml/1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotiterplatte (96-Well, F-Boden, Chimney Well, weiß) (Lumitrac 600)	Greiner Bio-one, Schwerthe, Deutschland
Mikrowellenherd	Privileg, Fürth, Deutschland
Milli-Q-Wassermaschine (Q-POD®; Millipak® Express 40)	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Mini-Wippe	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Monitor (CCTV RMB92)	Rainbow, California, USA
Mx3000P, Echtzeit-PCR-System (qPCR	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Nadel (0,9 x 40mm, 0,7 x 30mm)	Becton Dickinson Microlance, Fraga, Spanien

Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Nikon Eclipse Ti2	Nikon Europe B.V., Niederlande
Nitrocellulose Transfermembran (300 mm x 3 m, Porengröße 0,45µm) (Protran®)	Whatman, Dassel, Deutschland
Objektträger (25 x 75 x 1,0mm) (Superfrost® Plus)	Thermo Fisher, Braunschweig, Deutschland
Parafilm	American National Can, Menasha, USA
Pasteurpipette (150 mm)	John Poulten, Barking Essex, England
Pasteurpipette (230 mm)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR 96-Well Dünnwandplatte (0,2 ml)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
PCR Soft Tube (0,2 ml)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Pinzette	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Pipette (0,5-10 µL; 10-100 µL; 100-1000 µl) (PhysioCare-Konzept)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenrörchen-Reinigungsmaschine	H. Hözel, Hörlkofen, Deutschland
Pipettenspitze (10 µl; 200 µl; 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettensteuerung	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Pipettensteuerung (Accu-jet® pro)	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenstopfmaschine	IsmaTec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz
Präzisionsspenderspitze (4 µl; 10 µl; 50 µl; 100 µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
QIAquant 96, Echtezeit-PCR-System (qPCR)	Qiagen, Venlo, Niederlande
qTOWER iris, Echtzeit-PCR-System (qPCR)	Analytica Jena, Jena, Deutschland
Quecksilber-Hochdruckbrenner (U-RFL-T-200)	Olympus, Tokyo, Japan
Reagenzglasgestell (Rotilabo®)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RNA/DNA-Rechner (GeneQuant II)	Pharmacia Biotech, Darmstadt, Deutschland
RotiColl Sekundenkleber	
SafeSeal-Mikroröhrchen (2ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Saugflasche (Duran)	Schott, Wertheim, Deutschland
Scanner und Drucker (Laser Jet 1536dnf MFP)	HP, Chinden Blvd Boise, Idaho, USA
Scherbeneismaschine (AF-10)	Scotsman, Ipswich, Suffolk, Vereinigtes Königreich (UK)
Schutzbrille	EAC uvex, Fürth, Deutschland
Spritze 1 ml (Plastipak™)	Becton Dickinson, Madrid, Spanien
Stickstoff 95% (+5% Kohlendioxid)	Linde, Unterschleißheim, Deutschland
Thermocycler für PCR (1732-1210)	VWR, Leuven, Belgien
Thermocycler für qPCR (Mx3005pTM)	Stratagene, Foster city, California, USA
Timer	Oregon Scientific, Shenzhen, China
Tissue Ruptor mit disposable probes (Cat-No.: 990890)	Qiagen, Venlo, Niederlande
Trockenschrank (ED-115)	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Ultraviolett-Transilluminator	PeQLab, Erlangen, Deutschland
Vakuum-Exsikkator	VWR, Darmstadt, Deutschland
Vakuumpumpe	CE knf, Freiburg, Deutschland

Varioskan-Flash	Thermo Fisher, Vantaa, Finnland
Vibratom Leica VT1200 S	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Video-Digitalkamera (XC10)	Olympus, Tokyo, Japan
Vollpipetten (5 ml; 10 ml; 20 ml; 25 ml; 50 ml)	Brand, Wertheim, Deutschland
Wattestäbchen (Bel premium)	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Wiederholungspipette (Handy Step® S)	Brand, Wertheim, Deutschland
Wiederholungsspitze (0,2 ml) (Combitips advanced®)	Eppendorf, Berzdorf Wesseling, Deutschland
Zähler	Infactory, Buggingen, Deutschland
Zähler	IVO, Frauenfeld, Schweiz
Zellkultureinsatz, 0,4 µm porig (REF 353090)	Corning, New York, USA
Zellkultureinsatz 35/3097 (8,0 µm Porengröße) (Falcon®)	Corning, New York, USA
Zellkulturflasche T75 (Standard) (CellStar®)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche T75/T175 (Standard/Vent. Cap)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur-Testplatte (6-well, 24-well, 96-well)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatte 6-well, low evaporation (REF 353046)	Corning, New York, USA
Zellsieb (70 µm, 100 µm), Falcon™	Corning, New York, USA
Zentrifuge (5417C)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (ROTINA 420R)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifugenrührchen (15 ml/50 ml) (CentriStar™)	Corning, Reynosa, Tamaulipas, Mexico

Tabelle 4: Ausstattung, Instrumente, Materialien

ii. Software

Software	Firma
Biorender	© 2025 BioRender, USA
FlowJo™ v10.8	BD Life Sciences, Franklin Lakes, NJ, USA
GraphPad Prism 10.4.1	GraphPad Software, USA
ImageJ Fiji	Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. <i>Nature Methods</i> , 9(7), 671–675.
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	Microsoft, USA
MMI Cell Tools Software	MMI, Eching, Deutschland
QuickSpots	Ideal Eyes Systems, Bountiful, UT, USA

Tabelle 5: Verwendete Software.

iii. Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
1x SDS (Natriumdodecylsulfat) Laufpuffer 1 l	Bio-Rad, München, Deutschland
25x Proteaseinhibitor-Cocktail 100 µl	Roche, Mannheim, Deutschland
2-Mercapto-Ethanol 100 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol 70% 1000 ml (Isopropanol)	B Braun, Melsungen, Deutschland
6x Blauer Ladepuffer (Bromphenolblau und Xylencyanol) 5 ml	PeQlab, Erlangen, Deutschland
Accutase™ 100 ml	PAA Laboratories , Cölbe, USA
Acrylamid/Bis-Lösung 30% (37,5:1) 500ml	Bio-Rad, Munich, Deutschland
AEBSF (4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid) 25 mg	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Agarosepulver 500 g	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Anti-CXCL2, PolyklonalerAntikörper (Kat.-Nr.: 500-P104-50UG) (Invitrogen)	Thermo Fisher, Carlsbad, USA
Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) Antikörper (Z0334)	DAKO, Würzburg, Deutschland
Anti-IL-8-Antikörper (Kat.-Nr.: 500-M08-500UG) (Invitrogen)	Thermo Fisher, Carlsbad, USA
Aprotinin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
APS 10% (Ammoniumper-sulfat) 25g	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bio-Rad DCTM Protein Assay, Reagenz A 250ml, Reagenz S 5ml, Reagenz B 1L	Bio-Rad, California, USA
Borsäure 500 g	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromophenolblau 5 g	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA (Rinderserumalbumin) 100 g	PAA, Pasching, Österreich
CCL20 (ASC0217081)	R&D System, Minneapolis, USA
CellBrite® Cytoplasmic Membrane Dye, grün	Biotium, Fremont, CA, USA
Cell Titer-Glo® Lumineszenz-Assay zur Bestimmung der Zelllebensfähigkeit, Cell Titer-Glo® Substrat 1 Fläschchen Pulver, Cell Titer-Glo® Puffer 100 ml	Promega, Madison, USA
Chemilumineszenzsubstrat, SuperSignal™ West Pico PLUS stabil, Peroxidlösung 250 ml, SuperSignal™ West Pico Plus, Luminol/Enhancer-Lösung 250 ml	Thermo Fisher, Rockford, USA
Collagenase IV, 4160 U/ml, #LS004209	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA
CXCL2 murin (Murine MIP-2) (#0516152 D1422)	PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland
Danirixin #HY19768/CS-5465	MedChem Express, New Jersey, USA

DEPC (Diethylpyrocarbonat) Wasser 20 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Dk anti rbt Biotin (0,5 mg/ml) (711-065-152)	Jackson Immuno-Research, Suffolk, England
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 500 ml, NaHCO3 3.7g/L, D-Glucose 4.5 g/L, Low endotoxin	Merck Biochrom, Berlin, Deutschland
DMSO 1000 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNAse I (10 mg/ml, #11284932001)	Merck, Darmstadt, Deutschland
dNTP (Desoxy-Ribonukleosid-Triphosphat)-Mix 1,0 ml (Invitrogen)	Thermo Fisher, Carlsbad, USA
DuoSet ELISA Rat CXCL2/CINC-3	R&D System, Minneapolis, USA
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) 100 g	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA (Ethyleneglykol-Tetraessigsäure)	100g Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Elektrolytlösung (3 mol/L KCl) 200 ml	WTW, Weilheim, Deutschland
Ethanol ≥99.8% 2. 5L	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid-Lösung 1% (10mg/ml) 10ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FBS 500ml	Merck Biochrom, Berlin, Deutschland
Forward/Backward-Primer	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)-Antikörper 10µg/50µl	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
GeneRuler™ DNA-Leiter (50-1050 bp, 0,1 µg/µl, 50 µg)	Fermentas, Carlsbad, USA
Glycerol 100 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin 1 kg	Merck, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O ₂ (30%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hoechst33345 (Bisbenzimid)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hemacolor® Schnellfärbung, Lösung 1 Fixierlösung 100 ml, Lösung 2 Farbreagenz rot 100 ml, Lösung 3 Farbreagenz blau 100 ml	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure) 1000 g	ICN Biomedicals, Aurora, USA
HRP (Meerrettichperoxidase-Konjugate) Antikörper 0,40 mg/ml	Bio Source, Camarillo, USA; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
IL-10, murin (1008110)	PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland
IL17A, murin (5K15L41780)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
IL22, murin (GXC0419101)	R&D System, Minneapolis, USA
IL23, murin (NXJ1220081)	R&D System, Minneapolis, USA
KCl 1 kg	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄ 1 kg	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett 25 g	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin (200 mM) 100 ml	Merck Biochrom, Berlin, Deutschland

Matrigel® (Cultrex® reduzierter Wachstumsfaktor Basalmembran-Extrakt) (3433-005-01), 5 ml	Bio-Techne, Wiesbaden, Deutschland
Mercaptoethanol 250 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol 99,8% 2,5 l	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver 250 g	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ² HPO ₄ 1 kg	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl 1 kg	VWR Chemicals, Leuven, Belgien
Natriumacetatpulver 250 g (EMSURE®)	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumdeoxycholsäure 25 g	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Navarixin (#HY-10198/CS-0609)	MedChem Express, New Jersey, USA
Nonidet P-40 100 ml	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
Normales Eselsserum (60 mg/ml; 017-000-121) 10,0 ml	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Pennsylvania, USA
Papain	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) 500 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, Invitrogen gibco, Paisley, Vereinigtes Königreich (UK)
Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (10.000µ g /ml)100 ml	Merck Biochrom, Berlin, Deutschland
PFA (Paraformaldehyd) 1 kg	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PKH26 (MINI26)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
PKH67 (MINI67)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
PLX5622 (HY-114153/CS-0077157)	MedChem Express, New Jersey, USA
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid) 1 g	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Poly-D-Lysin (PDL) Coating solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau S 10 g	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Primer random 1,0 ml	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteinmarker IV 250 µl (170~130~100~70~55~40~35~25~15~10) kDa	PeQlab, Erlangen, Deutschland
Proteome ProfilerTM - Rat XL Cytokine Array Kit DY994	R&D System, Minneapolis, USA
PVA (Polyvinylalkohol)-DABCO (1,4-Diazobicyclo(2,2,2)-octan)10981-100 ml	Merck, Darmstadt, Deutschland
QuantiFast™ SYBR® Green PCR kit, SYBR® Green PCR master mix (2 x 1,7 ml), HotStarTaq® Plus DNA-Polymerase, QuantiFast SYBR Green PCR-Puffer, dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ROX™ passiver Referenzfarbstoff, RNase-freies H ₂ O (1,9 ml)	Dianova, Hamburg, Deutschland

RNase-freies H ₂ O 1,9 ml	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA, Pasching, Österreich
Rhodamin Red-X konjugierten sekundären Antikörper dk-anti-rb, 711-295-152	Qiagen, Hilden, Deutschland
SDS 10% 250 g	Serva, Heidelberg, Deutschland
Stripping-Puffer 500 ml (Pierce's Restore TM)	ThermoFisher Scientific, Rockford, USA
Super Script® II Reverse Transkriptase-Kit (Invitrogen), Super Script II Reverse Transkriptase 10.000 U, 5x Erststrangpuffer 200 µl, 0,1 M DTT (Dithiothreitol) 500µl	Thermo Fisher, Carlsbad, USA
Taq PCR-Mastermix-Kit, Taq PCR-Mastermix (250 Einheiten; 1,7 ml), RNase-freies H ₂ O (1,9 ml)	Qiagen, Hilden, Deutschland
TissueTek® O.C.T. compound	Sakura Finetek, Torrance, CA, USA
TriplePrep Kit (Kat.- Nr. 28-9425-44)	Cytiva, MA, USA
Tris 1 kg	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton®X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol) 500 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypanblau 0,4% 100 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung 100 ml	Merck Biochrom, Berlin, Deutschland
TWEEN® 20 viskose Flüssigkeit 500 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
unkonjugierter polyklonaler Iba1-Antikörper (PA5-27436)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Wasser 250 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ziege-Anti-Maus-HRP-Antikörper (Kat.-Nr. 115-035-166)	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tabelle 6: Verwendete Reagenzien.

iv. Kulturmedien OBSC

Zellkulturmedien	Hersteller
100 ml Kulturmedium für organotypische Rattenhirnschnitte	
0,8 g MEM Pulver (11700-077)	Life Technologies, Paisley, Vereinigtes Königreich (UK)
AquaDest 44,57 ml	
HBSS 25 ml	Merck Biochrom, Berlin, Deutschland
1,2 ml glucose 10%	B Braun, Melsungen, Deutschland
2 ml L-Glutamin 200mM	Merck Biochrom, Berlin, Deutschland
2 ml Penicillin, 0,05% (v/v) und Streptomycin 25 mM	Merck Biochrom, Berlin, Deutschland
100 µl Ascorbinsäure 4 mM	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

50 µl Mediumsupplemente (ITS, SITE, SPITE, Fatty Acid-Albumin Supplements)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
580 µl Bikarbonat 7,5%	B Braun, Melsungen, Deutschland
500 µl Tris-Base 1 M	Thermo Fisher, Braunschweig, Deutschland
25 ml 5% hitzeinaktivierte Pferdeserum (26050)	Life Technologies, Paisley, Vereinigtes Königreich (UK)
17-22 µl HCl (zur pH-Wert Einstellung)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
520 ml Präparationsmedium für organotypische Rattenhirnchnitte	
0,8 g MEM Pulver (11700-077)	Life Technologies, Paisley, Vereinigtes Königreich (UK)
AquaDest 44,57 ml	
1,2 ml glucose 10%	B Braun, Melsungen, Deutschland
2 ml L-Glutamin 200 mM	Merck Biochrom, Berlin, Deutschland
2 ml Penicillin, 0,05% (v/v) und Streptomycin 25 mM	Merck Biochrom, Berlin, Deutschland
5 ml Tris-Base (1 M)	Thermo Fisher, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 7: Medien für die Herstellung und Kultivierung des organotypischen Rattenhirnschnittmodells (OBSC).

b. Zellbiologische Methoden

i. Kultivierung von Zelllinien - *in vitro*

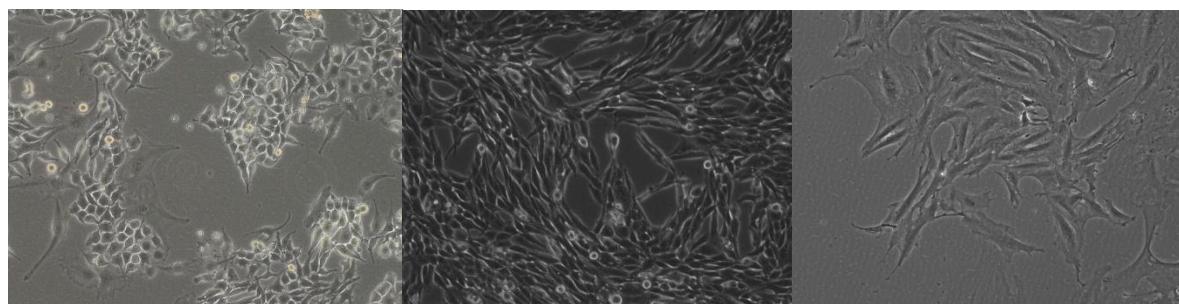


Abbildung 1: Morphologie der 3 verwendeten Ratten-Zelllinien. S635 (links), 9L (mittig), Astrozyten (rechts).

Die S635 Rattenzelllinie und Rattenastrozyten wurden dankenswerterweise von Prof. M. Proescholdt (Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie) zur Verfügung gestellt. Die 9L Gliomzelllinie wurde initial durch wiederholte Gabe von Nitrosoharnstoffen induziert [195], S635 wurde ursprünglich aus durch das Avian Sarcoma Virus (ASV) induzierten Hirntumoren

aus Fischer 344 Ratten gewonnen [196], während die verwendeten archivierte Rattenastrozyten von Neugeborenen Ratten gewonnen worden waren (s. *Abbildung 1*).

Das Kryokonservierungsröhrchen mit den gewünschten Zellen wurde aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und auf Trockeneis transportiert. 2-5 ml Medium wurden im Voraus in ein 50ml Falcon Tube gegeben. Das Kryokonservierungsröhrchen wurde zum Auftauen in einem 37°C warmen Wasserbad geschwenkt, bis ein kleines Stück Eis (etwa 1/3 des Gesamtvolumens) darin verblieb und dann die aufgetaute Zellsuspension in das 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert. 6-10 ml Medium wurden pipettiert und langsam mit der Zellsuspension vermischt, um das DMSO zu verdünnen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1.200 rpm wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 10 ml Medium resuspendiert, und die Zellsuspension in eine Kulturflasche pipettiert. Die Kulturflasche wurde vorsichtig geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Nach Beobachtung unter dem Mikroskop wurde die Kulturflasche bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre in den Inkubator gestellt.

Die Kultivierung der Rattenglioblastomzelllinien und der Astrozyten erfolgte in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's, Medium, NaHCO₃ 3.7g/L, D-Glucose 4.5 g/L, low endotoxin) mit 10% fetalem bovinen Serum (FBS), 2 mM L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂. Das Medium wurde zweimal pro Woche komplett erneuert, um das Wachstum der Zellen bei niedriger und mittlerer Konfluenz zu gewährleisten. Hierzu wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt und anschließend neues Medium hinzugegeben, um ein Ablösen der adhärenten Zellen zu vermeiden. Bei 90%iger Konfluenz erfolgte das Splitten und Passagieren.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90% passagiert: Zunächst wurde das Medium vollständig abgesaugt, ohne die adhärenten Zellen von der Kulturflasche zu lösen. Die Zellen wurden einmal vorsichtig mit 3-5 ml PBS gewaschen, 3-5 ml Trypsin wurden hinzugefügt, so dass der gesamte Boden der Kulturflasche bedeckt war. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 4 Minuten. Anschließend erfolgte die mechanische Ablösung der Zellen durch Klopfen auf die Seite der Kulturflasche. Die vollständige Ablösung aller Zellen wurde unter dem Mikroskop überprüft. Dann wurden 6-10 ml DMEM mit FBS (2-faches Volumen von Trypsin) zum Abstoppen des Trypsins zugegeben und auf- und abpipettiert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. 10-20 ml DMEM mit FCS wurden vorab in die neuen Kulturflaschen gegeben. Nach der Zentrifugation

wurde der Überstand vollständig abgesaugt und das Zellpellet wurde je nach Größe mit 1-5 ml Medium resuspendiert. Ein bestimmtes Volumen der Zellsuspension wurde für Experimente oder kontinuierliche Zellkultur verwendet, je nach Ergebnis der Zellzählung oder des Verhältnisses (1: X). Die Kulturflasche wurde geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Nach der Beobachtung unter dem Mikroskop wurde die Kulturflasche in den Inkubator gestellt.

Zur Zellzählung wurden 40 µl resuspendierte Zellsuspension entnommen und mit 10µl Trypanblau in einem 1,5-ml-Mikroröhrchen vermischt, oder bei höherer Zellzahl zur besseren Zählbarkeit weiter verdünnt. 10 µl der Mischung wurden vollständig in den Spalt zwischen dem Deckglas und der Zählekammer luftblasenfrei gefüllt. Die Zellen in vier Quadranten wurden unter dem Mikroskop mit 10-facher Vergrößerung gezählt. Intensiv gefärbte Zellen wurden als nicht vital deklariert und somit nicht gezählt. Die Zellen wurden unten links gezählt, wenn sie sich auf den Gittern befanden. Die folgenden Formeln können zur Berechnung verwendet werden.

Gesamzellzahl in der Zellsuspension = (Gesamzellzahl durch Zählung ÷ 4 Quadranten) x 1,25
Verdünnungsfaktor x 10^4 x Volumen des resuspendierten Mediums

Zur Kryokonservierung von Zellen wurde das Zellpellet in 90% FCS/10% DMSO resuspendiert und die Zellsuspension in die beschrifteten Kryokonservierungsröhrchen pipettiert. Die Kryokonservierungsröhrchen mit den Zellen wurden in den Gefrierbehälter gegeben und in den -80°C-Kühlschrank überführt. Nach 24 Stunden wurden sie in Flüssigstickstoff für die Langzeitlagerung überführt.

ii. In vitro Zellkultur-Assays

1. Wound Healing Migrationsassay

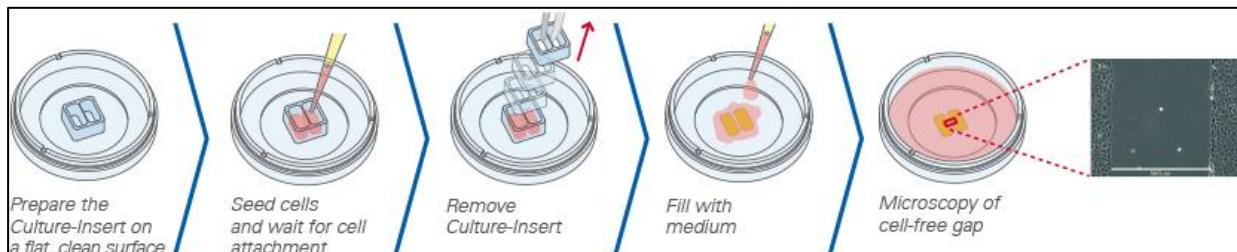


Abbildung 2: Ablauf der Zellaussaat in zweikammrigen Ibidi-Inserts. Bildquelle: <https://ibidi.com/culture-inserts/24-culture-insert-2-well.html> (abgerufen am 10.01.2025)

Zweikammerige Ibidi-Inserts wurden zunächst in 24-Well Platten (pro Well 1 Ibidi-Insert) mit einer sterilen Pinzette mittig eingebracht, so dass diese vollständig anhafteten. Die Zellkultur-Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und die Zellzahl bestimmt und so verdünnt, dass 350.000 Zellen/ml erreicht wurden. Es wurden dann 70 µl der Zellsuspension in jede der zwei Kammern gegeben (24.500 Zellen/Ibidi-Kammerseite) (s. *Abbildung 2*). Nach 24 Stunden wurde eine Konfluenz erreicht, das Medium wurde mit der Pipette aus den Ibidi-Kammern abgenommen, die Ibidi-Inserts entfernt und pro Well wurden 800 µl Kulturmedium +/- Behandlung zugegeben. An drei Stellen (oben/mittig/unten) wurde mit dem Mikroskop nach 24 und 48h fotodokumentiert. Ins zellfreie Areal eingewanderter Zellen wurden gezählt (s. *Abbildung 3*).

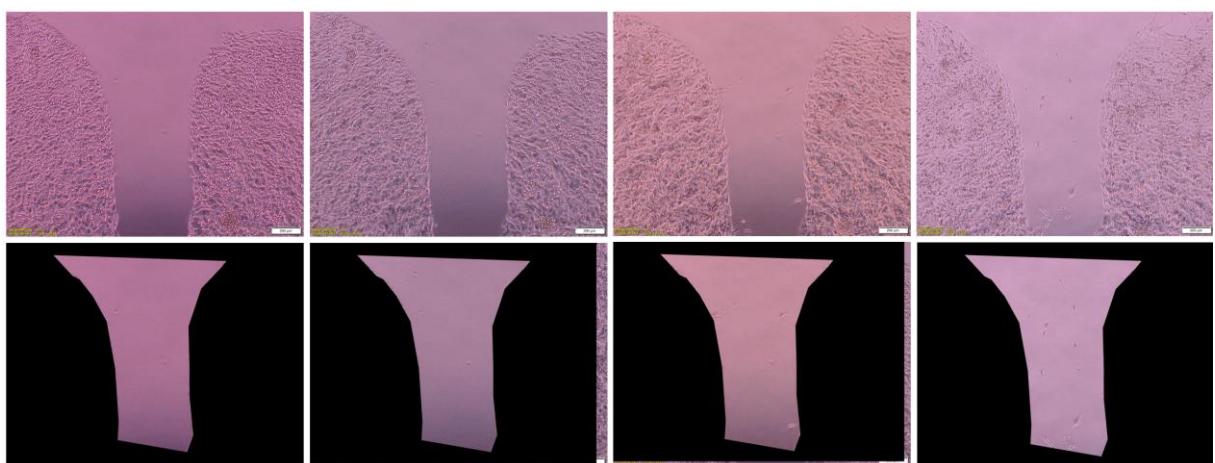


Abbildung 3: Auswertung des Wound Healing Migrationsassays. Exemplarisch 9L Zelllinie und Auswertung der Migration in den oberen Teil des zellfreien Spaltes zu den Zeitpunkten 0 Stunden, 6 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden (v.l.n.r.). Bei allen Zelllinien zeigte sich eine Migration von mehr oder weniger Einzelzellen. Eine flächige Migration des gesamten Zellverbands war nicht zu beobachten. Die Auswertung erfolgte über eine gleichförmige Maske und manuelle Auszählung migrierter Zellen.

2. Transwell Matrikel Invasionsassay

Matrikel wurde am Vortag von -80°C auf 4°C überführt und dann im Anschluss auf Eis langsam aufgetaut. Werkzeuge und Materialien (Inserts, Platten, Pipettenspitzen und Röhrchen) wurden im Vorfeld auf 4°C im Kühlschrank gekühlt, um ein vorzeitiges Gelieren des Matrikels zu verhindern. Bis zum finalen Pipettieren in das Insert wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. An Tag 1 wurde zunächst das Matrikel in sterilem H₂O auf 10 mg/ml verdünnt. Die Einsätze mit 8,0 µm Porengröße wurden in 24-Well Platten mit einer sterilen Pinzette platziert. In jedes Insert wurden dann 50 µl des verdünnten Matrikels pipettiert und gleichmäßig

auf der Membran verteilt. Die mit Matrikel befüllten Inserts und Platten wurden bei 37°C zum Gelieren inkubiert.

Die Zellkultur-Zellen wurden trypsinisiert, einmal mit serumfreiem Medium gewaschen, die Zellzahl bestimmt und eine Suspension mit 1×10^6 Zelle/ml in serumfreiem Medium mit 1% BSA hergestellt. Es erfolgte das Auftragen von 200 µl dieser Zellsuspension auf die Inserts. 600 µl des serumfreien Mediums mit 1% BSA (+/- Behandlung) wurde in den unteren Teil des Wells pipettiert. Die Wells mit den Inserts wurden dann für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Anschließend erfolgte die HE-Schnellfärbung der durch das Matrikel und die Membran an die Unterseite des 8,0 µm porigen Inserts gewanderten Zellen. Hierfür wurde zunächst aus jedem Insert das Matrikel mit Wattestäbchen entfernt. Dann erfolgte das Eintauchen der Inserts in eine Fixierlösung für 1 Minute. Anschließend wurde für 1 Minute in der Eosin- und dann für 1 Minute in der Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Abschließend erfolgte ein Waschschnitt in Leitungswasser und die Überführung der Inserts in eine neue 24-Well Platte, wo die Inserts für 24 Stunde trocknen konnten. Dann erfolgte die Fotodokumentation der gefärbten Zellen und die Auszählung mit einer Mikroskop-eigenen Zählsoftware (s. *Abbildung 4*).

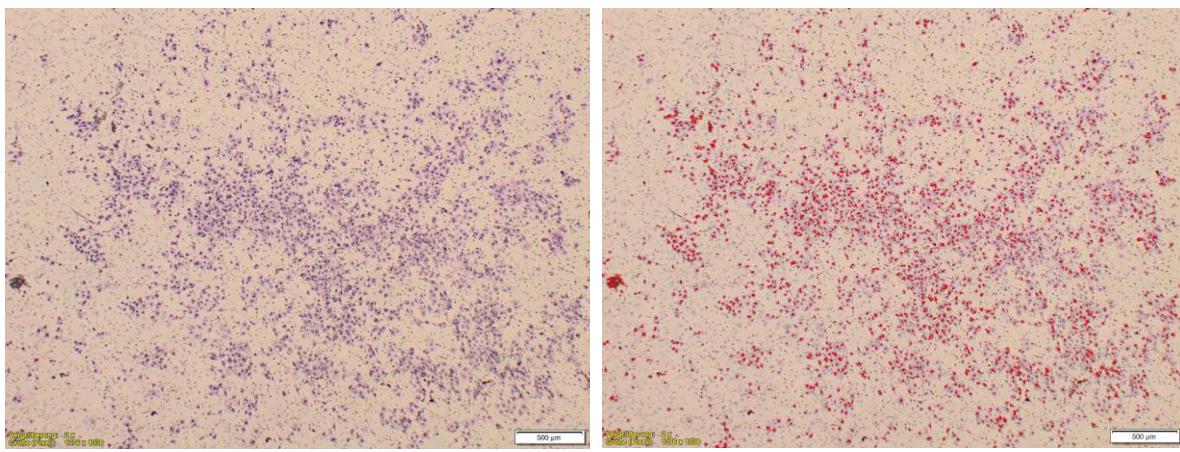


Abbildung 4: Auswertung des Transwell Matrikel Invasionsassays. Exemplarisch S635, 10ng/ml IL-22 Behandlung. Links HE-Färbung der durch das Matrikel invadierten Zellen. Rechts die automatisierte Auszählung der Zellkerne (Markierung mit roter Farbe) zur Auswertung der Invasion.

3. Sphäroidmigrationsassay

Zur Herstellung von sphäroid-artigen Zellkonglomeraten (im Folgenden der einfachheitshalber als ‚Sphäroide‘ bezeichnet) aus den Zellkultur-Zellen erfolgte zunächst die Beschichtung von 96-Well Platten Wells mit Agarose 1%. Hierfür wurde zunächst 1%ige Agarose (1% in PBS) in

der Mikrowelle aufgekocht und davon jeweils 100 µl pro Well zum Auskleiden der Wells pipettiert. Zum Aushärten wurden die Wells für 2 Tage bei 37°C inkubiert.

Auf diese Agarose beschichteten Platten wurden dann Zellkulturzellen - je 4000 Zellen/Well à 100µl/Well Medium +FBS - in einer 96 Well-Platte aufgetragen. Nach 3 Tagen zeigte sich hier eine Zusammenlagerung zu Sphäroiden.

Für die Sphäroid-Migration wurden die Sphäroide in agarosefreie 96-Well U-Boden-Platten übertragen und 7 Tage lang in serumfreiem DMEM-Medium kultiviert. Bilder wurden an Tag 0 und Tag 7 (4-fache Vergrößerung) mit einem inversen Mikroskop (Olympus IX70) aufgenommen, um die zellbedeckte Fläche innerhalb der U-Boden-Vertiefung messen zu können. Die Bilder wurden ausgewertet und die konzentrische Vergrößerung der mit Zellen bedeckten Fläche wurde manuell und verblindet mit ImageJ durchgeführt (s. *Abbildung 5*). Die Überstände wurden gesammelt und bei -20°C gelagert.

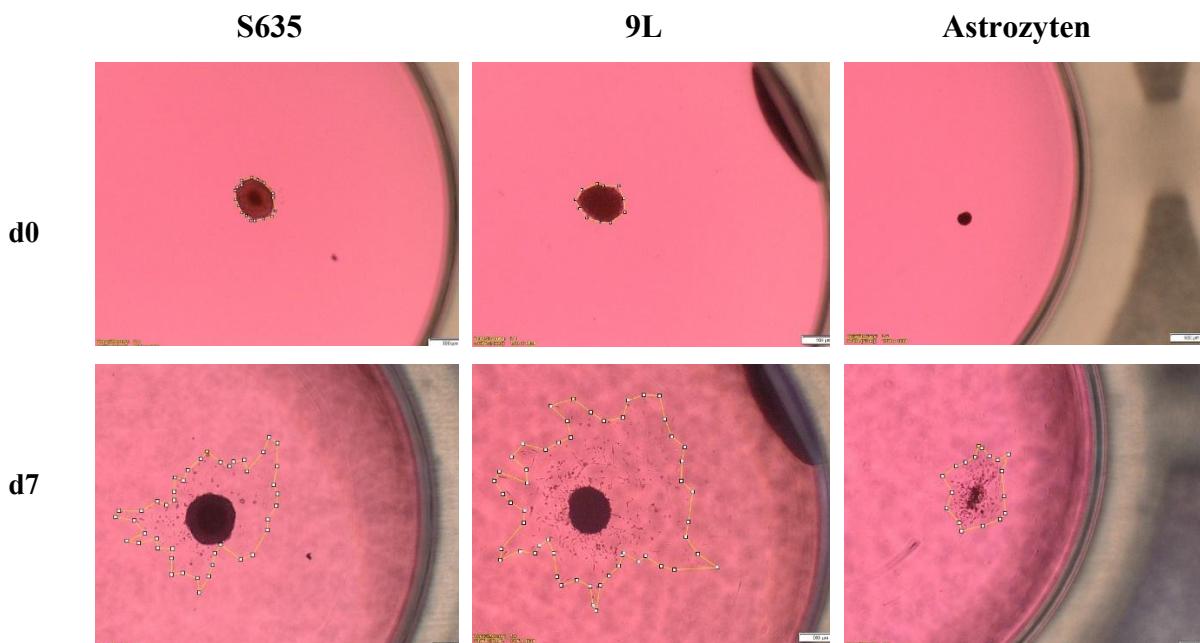


Abbildung 5: Auswertung des Sphäroidmigrationsassays. Flächenmessung an Tag 0 und Tag 7 bei allen drei Zelllinien exemplarisch.

4. ATP-Assay

Wir verwendeten den Cell Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (G7570, Promega, Madison, USA) im Layout einer 96-Well Platte. Cell Titer Glo Buffer und Cell Titer Glo Substrate wurden gemischt, bis das Substrat vollständig im Puffer aufgelöst war. Pro 96-Well-Platte wurden 4000 Zellen mit oder ohne Behandlung in serumfreiem DMEM-Medium für 7 Tage kultiviert. 100 µl/Vertiefung Cell Titer Glo Reagenz wurden pro Vertiefung zugegeben und für

12 Minuten auf eine Schüttelplatte gestellt, um die Zellyse zu induzieren. Danach wurden 150 µl des Überstands in eine 96-Well-Platte (F-Boden/Kaminwell, weiß, Lumitrac 600) pipettiert und mit dem Varioskan Flash (Thermofisher Scientific, Vantaa, Finnland) luminometrisch gemessen.

c. Ex vivo Organotypische Rattenhirnschnitt-Co-Kulturen (OBSC)

i. Tiere und Organentnahme

Für die Vorbereitung der Hirnschnittkulturen wurden Fisher #344 Ratten (Charles River, Deutschland) aus einer hauseigenen Einrichtung bezogen. Die Tiere wurden gemäß den institutionellen Richtlinien mit einem 12-Stunden-Licht/12-Stunden-Dunkel-Zyklus und ad libitum-Zugang zu Futter und Wasser im Haus gehalten.

Für die organotypische Rattenhirnschnitt-Co-Kultur wurden Rattenhirne von 6-14 Tage alten Ratten verwendet. Zunächst erfolgte die Tötung mittels zervikaler Dislokation durch die Anwendung einer großen sterilisierten Schere. Der Kopf wurde sodann mit 70% Isopropanol abgespült und in eine Petrischale transferiert. Hier wurde die Haut entlang der Mittellinie vom Nacken bis zu den Augen mit einer kleinen Schere aufgeschnitten und dann die Haut nach lateral skalpiert. Sodann wurde die Schädeldecke mit einer kleinen Schere geöffnet. Hierfür wurde die Schere am Foramen magnum eingeführt und der weiche Knochen bis zu den Augen aufgeschnitten. Die Schädeldachhälften wurden dann mit einer Pinzette zu beiden Seiten entfernt. Das Gehirn wurde aspetisch mit einem feinen Spatel entfernt und direkt in eiskaltes Präparationsmedium (s. *Tabelle 7*) überführt und restliches Blut dadurch abgespült.

ii. Präparation des Organotypischen Rattenhirnschnittmodells (OBSC)

In Präparationsmedium (s. *Tabelle 7*) und auf Eis erfolgte der zügige Transfer immer zweier Gehirne ins Labor, um diese sofort zu Schnitten weiterverarbeiten zu können und eine zügige Kultivierung zu gewährleisten. Zunächst erfolgte die Abtrennung des Kleinhirns mit einem Skalpell und die Platzierung zweier Gehirne hintereinander in eine kleine Ø 6 cm messende Petrischale. Es erfolgte sodann das Ausgießen der Petri-Schale mit 37°C warmer 5%iger Agarose, so dass die Gehirne vollständig bedeckt waren. Nach Agarosepolymerisation auf Eis wurde überschüssige Agarose an den Seiten des kreisförmigen Agaroseblocks abgetrennt und der Block mit den zwei hintereinanderliegenden in Agarose eingebetteten Gehirnen mit Sekundenkleber auf der Vibratomplatte fixiert. Die Vibratomplatte wurde entsprechend ins

Vibratom eingebracht und mit Präparationsmedium, das auf Eis bei 4°C gehalten wurde, umspült. Sodann wurden die Gehirne mithilfe des Vibratoms (Leica VT1200 S, Frequenzeinstellung 4,8/s, Geschwindigkeitseinstellung 5) in 350 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden einzeln in eine mit Präparationsmedium gefüllte und auf Eis liegende Petrischale mithilfe eines Spatels und eines Pinsels transferiert. Nach Abschluss des Schneidevorgangs der kompletten Gehirne wurden unter dem Binokularmikroskop geeignete Schnitte ausgewählt. Jeder Schnitt wurde in der Mitte durchtrennt, so dass jeweils zwei hippocampale Schnitte je einer Hemisphäre auf einen 0,4 µm porigen Zellkultureinsatz und in 6-Well *low evaporation* eingesetzt werden konnten, so dass diese von unten umspült auf entsprechendem Kulturmedium schwammen (s. Abbildung 6). Für 100 ml Kulturmedium wurden 0,8 g MEM powder (Life Technologies, Paisley, UK, 11700-077), 44,57 ml AquaDest, 25 ml HBSS (Merck Biochrom Berlin), 1,2 ml glucose 10%, 2 ml L-glutamine 200mM, 2 ml Penicillin, 0,05% (v/v) and Streptomycin, 25 mM mix, 100 µl Ascorbinsäure 4 mM, 50 µl Mediumsupplemente (ITS, SITE, SPITE, Fatty Acid-Albumin Supplements, Sigma-Aldrich, St. Louis), 580 µl Bikarbonat 7.5% und 500 µl Tris-Base 1M vermischt und steril-filtriert und dann 25 ml 5% hitzeinaktiviertes Pferdeserum (Life Technologies, 26050) hinzugeführt und schließlich auf einen pH von 7,4 mit HCl adjustiert [197, 198]. Nicht geeignete bzw nicht hippocampale Schnitte wurden entweder verworfen oder zur Mikroglia Isolierung weiterverwendet (s. unten).

Die Schnitte wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, das Medium erstmals nach 24 Stunden gewechselt und im Anschluss alle 72 Stunden ausgetauscht. Nach optionaler Vorbehandlung für bis zu 10 Tage wurde ein Zellkulturzell-Sphäroid aus 4000 vitalgefärbten Zellen im Bereich des hippocampalen Areals mit einer 200 µl Pipettenspitze unter dem Binokularmikroskop platziert. Die Fotodokumentation erfolgte mit dem Mikroskop an Tag 0 und Tag 7 (Olympus IX 70) und die Fluoreszenzintensität-Schwellenwertbestimmung mit ImageJ wurde durchgeführt, um das Ausmaß des Sphäroidauswachsens zu objektivieren. Die Überstände zu den Zeitpunkten des Kulturmediumwechsels wurden gesammelt und bei -80°C für weitere Untersuchungen asserviert. Nach Abschluss des Untersuchungszeitraums wurden die Schnitte in TissueTek® eingebettet und für die Anfertigung von Kryo-Schnitten bei -80°C archiviert (s. Abbildung 7).

Repräsentative Viabilitätsüberprüfungen mit Propidium Iodid (PI) wurden 18 Tage nach Präparation der OBSC angefertigt. Hierfür wurde PI mit einer Konzentration von 1 mg/ml dem Kulturmedium beigefügt und unter dem Mikroskop (Olympus IX 70) evaluiert.

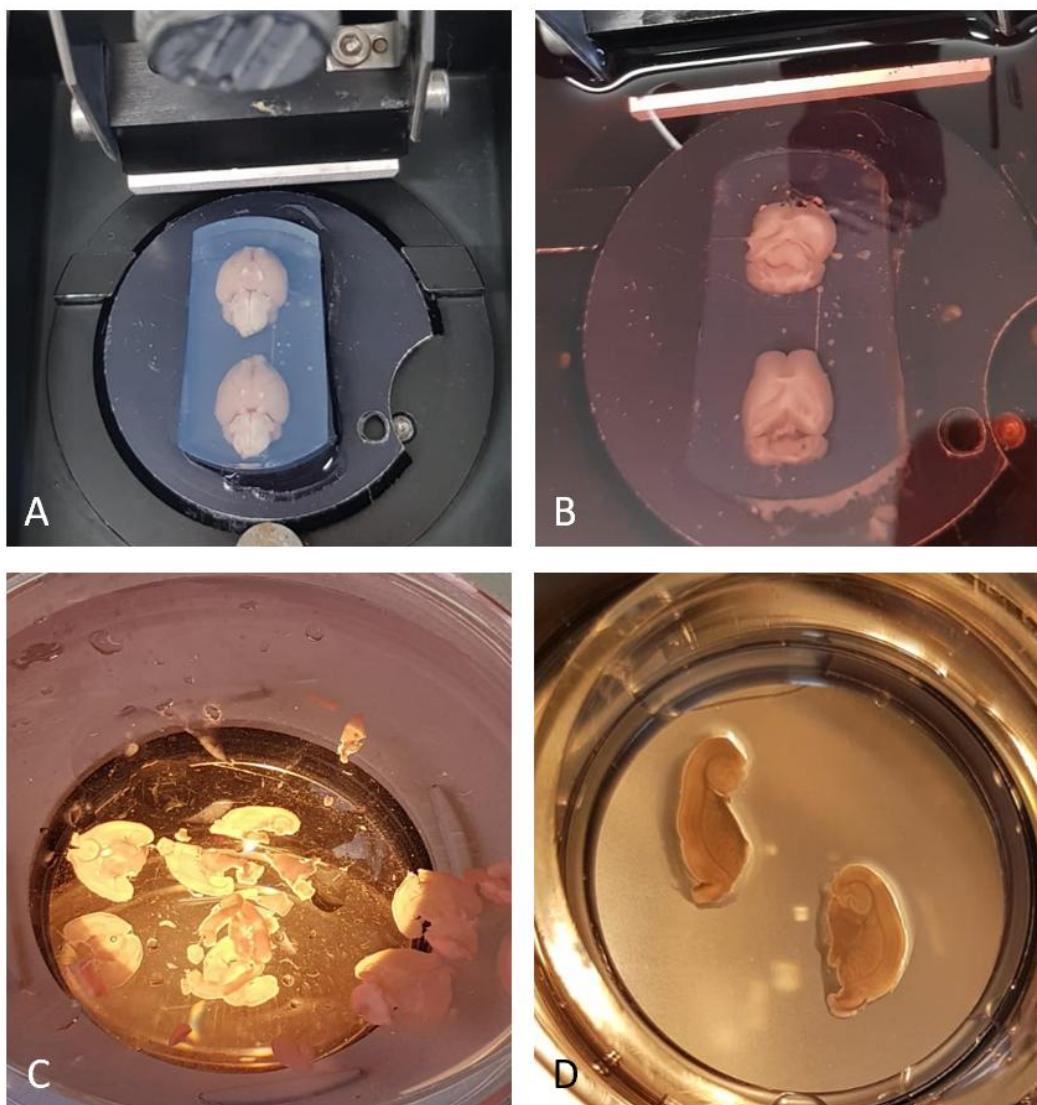


Abbildung 6: Präparation der organotypischen Rattenhirnschnitte (OBSC). Generierung von Rattenhirnschnitten. **A:** In Agarose 5% eingebettete Rattenhirne, **B:** Während des Schneideprozesses, Hirne werden mit 4°C kaltem Präparationsmedium umspült. **C:** In gekühltes Präparationsmedium überführte Rattenhirnschnitte. **D:** Mit Spatel auf 0,4 μ m porige Inserts, die in entsprechenden Wells auf Kulturmedium schwimmen, übertragene Rattenhirnschnitte mit hippocampalem Anschnitt.

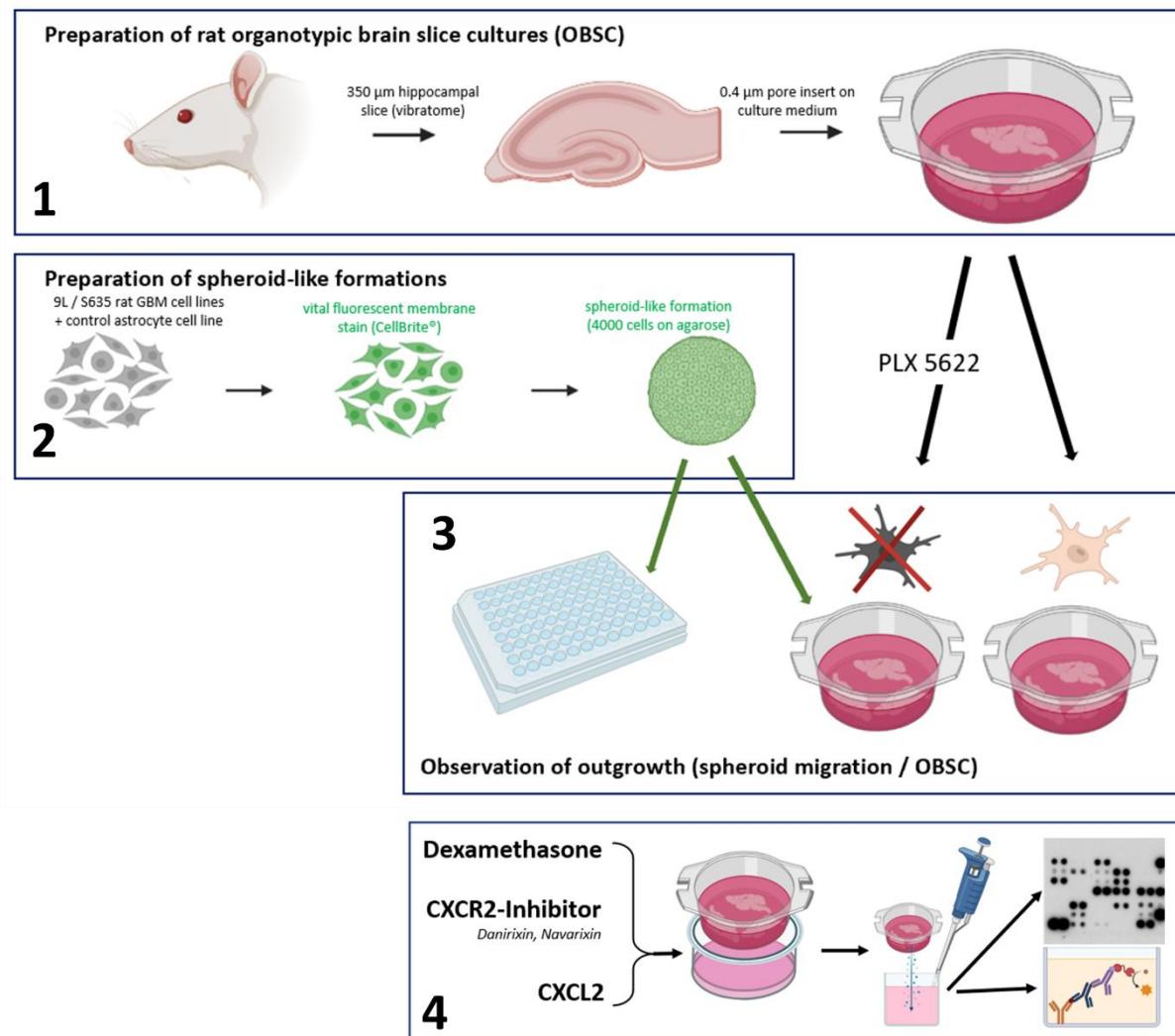


Abbildung 7: Allgemeiner Ablauf der OBSC-Generierung, -Behandlung und Analysen. Gehirne von 6 bis 14 Tage alten Ratten wurde in 350 µm dicke Stücke geschnitten und auf ein spezielles 0,4 µm poriges Insert, das auf einem Kulturmedium schwimmt, aufgebracht (1). Drei verschiedene Rattenzelllinien (9L, S635 und eine Kontroll-Astrozytenlinie) wurden vitalgefärbt (PKH67, CellBrite green), Sphäroide, die jeweils 4000 Zellen enthalten, auf Agarose angefertigt (2) und anschließend auf die Ratten OBSC bzw. zur in vitro Untersuchung mittels Sphäroidmigrationsassay in U-förmige Wells mittels Pipette gebracht. Das Auswachsen wurde nach 7 Tagen gemessen, indem die fluoreszierende Fläche um das eingebrachte Sphäroid gemessen wurde. Zur Mikrogliadepletion wurde eine 2 x 3 Tage dauernde PLX5622-Vorbehandlung der OBSC durchgeführt (3). Ein Membran-basierter semi-quantitativer Proteom Profiler wurde verwendet, um nach differentiellem Zytokin Signaling in den Überständen zu screenen. ELISA wurde durchgeführt, um die CXCL2 Konzentrationen in den Überständen zu quantifizieren (4). (Für die Abbildung wurden Icons aus biorender.com verwendet)

iii. Isolierung und Kultivierung von Ratten-Mikroglia

Rattenhirngewebe, das nicht hippocampal war und für die OBSC nicht verwendet werden konnte, wurde manuell mithilfe zweier Skalpelle zerkleinert und mit einer 10 ml Pipette in ein 50 ml Falcon überführt. Anschließend für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und das verbliebene Pellet mit 1 ml Trypsin-EDTA behandelt und mit einer 1000 µl Pipette auf- auf und abpipettiert, so dass sich das Pellet weiter auflösen konnte. Es folgte eine Inkubation für 5 Minuten im 37°C Wasserbad, danach wurde erneut resuspendiert mit weiteren 5 ml 37°C warmem Kulturmedium (DMEM, 10% FBS, 1% Glutamin, 1% P/S) und erneut auf- und abpipettiert. Anschließend wurde erneut bei 400g für 5 Minuten zentrifugiert. Es wurden 5 ml Kulturmedium in der zuvor mit 10 µl/ml Poly-D-Lysin beschichteten mittleren Kulturflasche (für 1,5 Stunden inkubieren, mit PBS ausspülen und dann trocknen lassen) vorgelegt und das Pellet in 5 ml Kulturmedium mit einer 10 ml Pipette aufgenommen und in die Flasche überführt. Es erfolgte der Mediumwechsel am Folgetag und dann alle 5 Tage. Nach 5-7 Tagen bildeten die Astrozyten Konfluenz und Mikroglia und Oligodendrozyten wuchsen auf der Astrozytenschicht. Es erfolgte die physikalische Ablösung durch Klopfen auf den Flaschenboden. Im Überstand konnten dann vornehmlich mikrogliale Zellen geerntet und erneut auf einer Poly-D-Lysin (PDL)-beschichteten Flasche ausgesät werden. Nach 2 Stunden - nachdem sich die Mikroglia am Boden festgesetzt hatte - wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Am Folgetag erfolgte das Passagieren und die Färbung der Mikroglia zur Re-Population oder weiteren Verwendung (s. vitale Zellfärbung mit PKH67, PKH26 oder CellBrite Grün) mit vorheriger mikroglialer Sphäroidbildung (s. Absätze 2.b.ii.3. und 2.c.iv.).

iv. Vitalfärbung Rattenzelllinien

Es wurden zwei verschiedenen Methoden zur Vitalfärbung lebender Rattenhirnzellen ausgetestet und verwendet:

CellBrite® green: Der zytoplasmatische Membranfärbe-Kit umfasst einen lipophilen Carbocyanin-Farbstoff Neuro-DiO (DiIC₁₈(3)) bei laut Hersteller minimaler Toxizität und ist sehr einfach in der Anwendung bei zuverlässigem Färbeergebnis. Die Zelllinien wurden in Medium mit FBS Serum kultiviert, trypsinisiert und gezählt. 1x10⁶ Zellen/ml in PBS wurden inkubiert und mit 5 µl lipophiler DiO (CellBrite® green #30021, Biotium, Fremont, CA) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und

dann (wie unter 2.b.ii.3 beschrieben) Sphäroide hergestellt. Die Qualität der Färbung wurde im Mikroskop (Olympus IX70) verifiziert.

PKH67/PKH26: PKH67 (grün) oder PKH26 (rot) sind amphiphile Farbstoffe, die verwendet werden, um in bipolare Membranen (wie Zellmembrane) zu interkalieren. Entsprechend dem Herstellerprotokoll ist die Anwendung mit mehr Arbeitsschritten verbunden verglichen mit CellBrite®-Farbstoffen. Zunächst werden die Zellen trypsinisiert und 2×10^6 Zellen bei 400g für 5 Minuten zentrifugiert und mit 500 µl serumfreiem Medium resuspendiert, erneut zentrifugiert und 100 µl einer Diluent C/PKH-Lösung (1,6µl PKH auf 400 µl Diluent C) zugegeben, für 3 Minute inkubiert, mit 1 ml FCS-Medium zum Abstoppen resuspendiert, in ein neues 1,5 ml Eppendorf Cup überführt und insgesamt zweimal mit Serum-Medium gewaschen. Abschließend erfolgt die Zellzählung und dann wie oben beschrieben die Generierung von Sphäroiden (s. Absatz 2.b.ii.3).

v. Zeitlicher Ablauf von Präparation, Vorbehandlung, Behandlung und Auswertung

Nach Anfertigung der OBSC erfolgte die Kultivierung bei 37°C und 5%-CO₂ Atmosphäre. Am Tag nach der Aufbringung der OBSC auf die Zellkultureinsätze erfolgte bereits der erste Medienwechsel. Für die OBSC Mikroglia-Depletion erfolgte die Vorbehandlung mit 2 µM CSF-1R Antagonist PLX5622 in zwei Zyklen für jeweils 3 Tage und einer dazwischenliegenden 2-tägigen Auswaschphase mit Medium ohne PLX5622 (s. *Abbildung 8*) Anschließend erfolgte eine zweitägige Zwischenbehandlung mit Kulturmedium, um PLX5622 aus dem OBSC System zu entfernen. Native OBSC wurden parallel über den gleichen Zeitraum ohne PLX5622-Behandlung kultiviert. An Tag 0 erfolgte die Archivierung der Überstände, die Platzierung der Sphäroide und anschließende das Imaging. Weitere Überstände wurden an Tag 3 und Tag 6 asserviert im Rahmen des Medienwechsels. Für die Behandlungen mit Dexamethason, IL-10, IL-22, Navarixin, Danirixin und CXCL2 wurden diese in entsprechender Dosierung dem Kulturmedium zugesetzt. An Tag 7 erfolgte das abschließende Imaging und das Einbetten der OBSC in TissueTek®, Einfrieren und die Archivierung bei -80°C zur späteren Kryosektionierung (s. *Abbildung 8*).

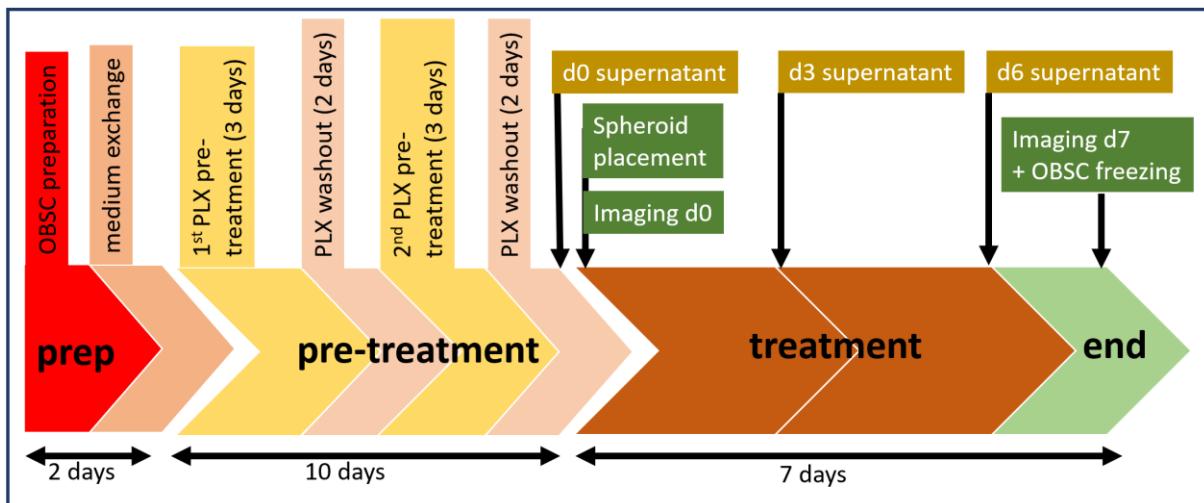


Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf des gesamten Versuchsablauf von Präparation, Vorbehandlung und Behandlung. Die zweitägige Präparation mit Beginn der Inkubation ist gefolgt von einer 10-tägigen Vorbehandlungsphase (mit und ohne PLX5622), gefolgt von der 7-tägigen Behandlungs- und Beobachtungsphase.

Die Auswertung des Auswachsens der Sphäroide erfolgte anhand des in der Ausdehnung zunehmenden Fluoreszenzsignals über die Zeit. Hierfür wurde an Tag 0 direkt nach Aufbringen der Sphäroide sowie an Tag 7 in 4-facher Vergrößerung im Fluoreszenzkanal bei immer gleicher Belichtungsdauer eine Aufnahme mit dem Mikroskop gemacht. Ein für alle Einzel-OBSC fixierter Threshold wurde angewendet und die entsprechend Fluoreszenz-positive Fläche gemessen (s. Abbildung 9).

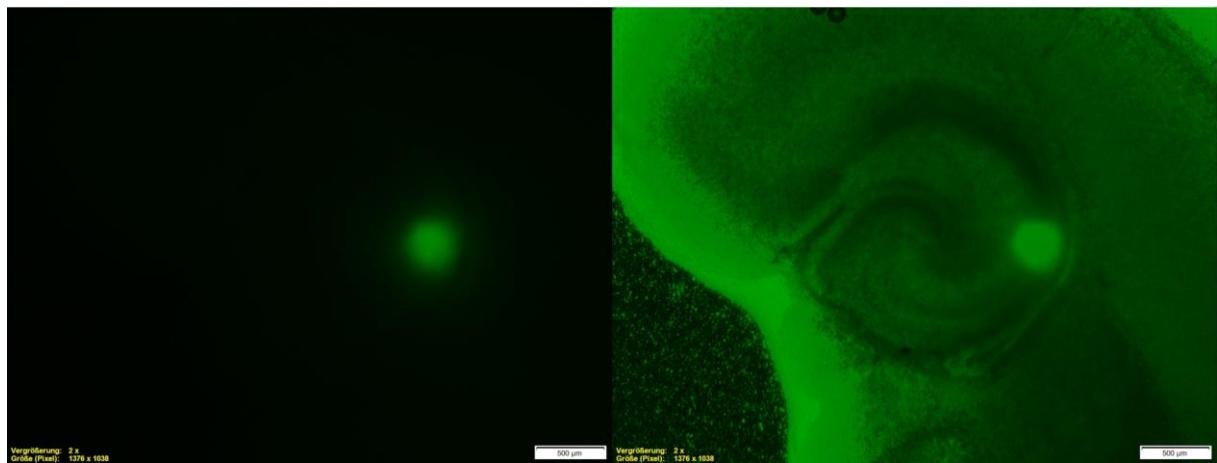


Abbildung 9: Darstellung des Fluoreszenzsignals durch das vitalgefärbte Sphäroid im parahippokampalen Bereich des Rattenhirnschnittes.

vi. Membranbasierter Proteom Profiler und ELISA

Zum Screening nach differentiellem immunologischen Signaling in den 8 Konditionen (OBSC ohne Sphäroid +/- PLX5622-Vorbehandlung, OBSC mit Sphäroid +/- PLX5622-Vorbehandlung, OBSC mit Dexamethason +/- PLX5622-Vorbehandlung, OBSC mit IL-10 +/- PLX5622-Vorbehandlung) führten wir einen semi-quantitativen membranbasierten Proteom-Profiler entsprechend dem Herstellerprotokoll durch (XL rat Cytokine Profiler, Cat: DY994, R&D, Minneapolis, USA).

Für das Screening wurden die Überstände von Tag 3 und Tag 6 von 4 verschiedenen Wiederholungen (je Pool n=8) aus jeder oben erwähnten Kombination jeweils zusammengeführt. Die Auswertung erfolgte mit der QuickSpots Software zur Densitometrie.

Zur Quantifizierung der CXCL2-Konzentration in den einzelnen Wells zu den unterschiedlichen Überstandentnahmepunkten (Tag 0, Tag 3, Tag 6), abhängig von den einzelnen Behandlungen/Vorbehandlungen, führten wir einen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (Rat CXCL2/CINC-3 DuoSet ELISA, Kat: DY525, R&D, Minneapolis, USA) entsprechend dem Protokoll des Herstellers durch.

vii. Kyrosektionierung und Immunfluoreszenzfärbung

Für die GFAP-Färbung verwendeten wir einen unkonjugierten, polyklonalen Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) Antikörper (Z0334, DAKO, Würzburg). Kryoschnitte der in TissueTek® eingebetteten OBSC (7 µm, hergestellt mit Leica, CM 1950; auf Superfrost Plus, Thermo Fisher, Braunschweig) wurden aufgetaut, luftgetrocknet und 10 Minuten in 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert, 3 x 10 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend mit Blocking-Lösung (3% dk Serum/PBS-0,1% Triton®X-100) blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht (1:200) bei 4°C und wurde anschließend 3 x 10 Minuten in PBS gewaschen. Für die GFAP-Färbung verwendeten wir den mit Rhodamin Red-X konjugierten sekundären Antikörper (1:100 in Blocking Solution, donkey-anti-rabbit, 711-295-152 dianova, Hamburg) und inkubierten für 2 Stunden bei Raumtemperatur.

Für die Färbung der Mikroglia verwendeten wir einen unkonjugierten polyklonalen Iba1-Antikörper (PA5-27436, ThermoFisher Scientific). Die Kryoschnitte wurden aufgetaut, an der Luft getrocknet und dann 15 Minuten lang in 4 % Paraformaldehyd fixiert, 3 x 10 Minuten in

PBS gewaschen, anschließend 10 Minuten lang in Triton®X-100 (0,1 % in PBS, Sigma Aldrich) permeabilisiert und anschließend erneut 2 x 10 Minuten in PBS gewaschen. Die Blockierung erfolgte für 1 Stunde mit 2% BSA (Rinderserumalbumin, PAA, Pasching, Österreich). Die Gewebeschnitte wurden mit einem polyklonalen Iba1-Antikörper (1:200) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Objektträger wurden 3 x 10 Minuten in PBS gewaschen, bevor der mit Rhodamin Red-X konjugierte Sekundärantikörper (1:100 in 0,1 % BSA, dk-anti-rb, 711-295-152 dianova, Hamburg) für 2 Stunden bei Raumtemperatur aufgetragen wurde.

Nach der Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurde ein weiterer Waschschritt (2 x 10 Minuten in PBS) durchgeführt, und die Kerne wurden mit Hoechst 33345 (1:20.000, Thermo Fisher Scientific) bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Nach einem weiteren Waschschritt wurde DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan) für das Eindeckeln verwendet (Menzel Gläser, Thermo Fisher, Braunschweig).

Whole Slide Images wurden mit Nikon Eclipse Ti2 (Amstelveen, Niederlande) im Mehrkanalmodus (DAPI-, Cy3-, GFP-Kanäle) bei 20-facher Vergrößerung und MMI CellTools Software (Molecular Machines & Industries, Eching) aufgenommen. Die Datensätze wurden mit ImageJ verarbeitet.

d. Untersuchungen an retrospektiven humanen Biobank Proben

i. Versuche auf transkriptionaler Ebene

1. RNA- und Proteinextraktion aus *fresh frozen* (FF) Biobankproben

Zur parallelen RNA- und Proteinextraktion wurde der TriplePrep Kit (Cat.-Nr. 28-9425-44, Cytiva) verwendet. Hierfür wurden von jeder bei -80°C gelagerten Probe ca. 20 mg Material verwendet und das Protokoll entsprechend der Herstellerempfehlung angewendet. Zunächst erfolgte das Abwiegen der Gewebeproben auf Trockeneis, wobei das abgewogene Stück im Anschluss sofort in den Lysepuffer gegeben wurde, gefolgt von der Homogenisierung des Gewebes im Lysepuffer mittels Tissue Ruptor mit Einweg-Homogenisatoraufsätzen (Qiagen, Cat-No.: 990890). Das Lysat wurde sodann auf die DNA-bindenden Säulen übertragen und bei 11.000g für 1 Minute zentrifugiert. Zur RNA-Isolierung wurden in das durchgeflossene Lysat 350 µl Aceton zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Es erfolgte der Transfer auf die RNA-bindende Säule und die Zentrifugation bei 11.000g für 1 Minute. Der Durchfluss wurde für die Proteinpräzipitation bei Raumtemperatur vorübergehend asserviert.

Die RNA-bindende Säule wurde sodann in ein neues Sammeltube gegeben und 100 µl DNase Reaktionsmix direkt auf die Mitte der Säule pipettiert und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 500 µl Typ 6 Waschpuffer und die Zentrifugation bei 11.000g für 1 Minute, wobei der Durchfluss verworfen wurde. Die Säule wurde sodann in ein neues RNase-freies 1,5 ml Eppendorf Cup transferiert und dann 30 µl des Elutionspuffers Type 9 zugegeben, gefolgt von einer 1-minütigen Zentrifugation bei 11.000g. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, um die Ausbeute zu erhöhen. Die Proben wurden dann auf Eis gelagert.

Zur Proteinpräzipitation wurden zunächst 600 µl Proteinpräzipitationspuffer Type 1 zum entsprechenden Durchfluss gegeben, gut vortexiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Es folgte die Zentrifugation bei 20.800g für 10 Minuten. Der Überstand wurde im Anschluss abgenommen und das Pellet in 1 ml autoklaviertem Aqua Dest. resuspendiert und erneut bei 20.800g für 10 min zentrifugiert. Es folgte die Zugabe von 250 µl 7M Urea-Puffer zum Pellet und Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Pellet resuspendiert und bei -20°C zur Lagerung eingefroren.

2. Bestimmung der RNA Konzentration

Von jeder Probe wurde eine 1:50 verdünnte RNA-Probe (RNA-Probe 2 µl: DEPC-Wasser 98 µl) in eine Präzisionsküvette für die photometrische Messung pipettiert, und die Leerwertreferenz wurde mit DEPC-Wasser eingestellt. Der Arbeitsablauf entsprach dem Protokoll des Herstellers. Die Küvette wurde nach jeder Messung zweimal mit 100 µl Milli-Q-Wasser gespült. Das Verhältnis von A260/A280 sollte zwischen 1,9 und 2,1 liegen, was eine qualitativ hochwertige gereinigte RNA darstellt.

3. Reverse Transkription (RT)

Je nach gemessener RNA-Konzentration wurde das erforderliche Volumen von 1 µg RNA und kompensiertem RNase-freiem Wasser berechnet und auf ein Gesamtvolumen von 10 µl pro Probe pipettiert. 10 µl RNase-freies H₂O wurden als cDNA-Negativkontrolle pipettiert. 3 Reagenzienmischungen wurden entsprechend der Anzahl der Proben und dem Protokoll des Herstellers berechnet und pipettiert.

Nach der Vorbereitung der in *Tabelle 8* aufgeführten Mischungen wurden 2 µl der Mischung ① pipettiert und mit jeweils 10 µl der RNA-Probenlösung in einem RNase-freien PCR-Soft-Tube gemischt. Sie wurden in den VWR-Thermocycler gegeben und das Programm wurde gestartet. Alle Probenmischungen wurden zur Denaturierung 5 Minuten bei 65°C erhitzt. Danach wurden sie 1 Minute auf 4°C abgekühlt, um die Random-Primer mit der Template-RNA zu verbinden. In jedes PCR-Gefäß wurden 6 µl Mischung ② auf- und abpipettiert. Die Temperatur wurde für 2 Minuten auf 25°C erhöht. 2 µl der Mischung ③ wurden in jedes PCR-Gefäß auf- und abpipettiert. Nach weiteren 10 Minuten bei 25°C wurde die reverse Transkriptionsreaktion bei 42°C für 50 Minuten gestartet. Die Reaktion konnte durch Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 70°C für 15 Minuten abgebrochen werden. Alle Probenreaktionsgemische wurden bei 4°C gehalten. Schließlich wurden alle 20 µl cDNA-Probenlösungen und die Negativkontrolle mit 80 µl RNase-freiem H₂O verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

	Reagenz		Reagenz		
x 1µl	dNTP-Mix	x 1µl	Random Primer	2µl/Probe	①
x 4µl	5x First Strand Puffer	x 2 µl	0,1 M DTT	6µl/Probe	②
x 1µl	SuperScript II RT	x 1 µl	RNase-freies Wasser	1 µl/Probe	③

Tabelle 8: Reagenzienmischungen für die Reverse Transkription.

4. PCR – Polymerase-Ketten-Reaktion

Name	Länge	Richtung	Sequenz
ARG1	130bp	forward	5'-TCATCTGGGTGGATGCTCACAC-3'
		reverse	5'-GAGAACATCCTGGCACATCGGGAA-3'
iNOS	136bp	forward	5'-GCTCTACACCTCCAATGTGACC-3'
		reverse	5'-CTGCCGAGATTGAGCCTCATG-3'
CXCL2	127bp	forward	5'-GGCAGAAAGCTTGTCTAACCC-3'
		reverse	5'-CTCCTTCAGGAACAGCCACCAA-3'
IL-8	112bp	forward	5'-GAGAGTGATTGAGAGTGGACCAC-3'
		reverse	5'-CACAAACCTCTGCACCCAGTTT-3'
CXCR2	140bp	forward	5'-TCCGTCACTGATGTCTACCTGC-3'
		reverse	5'-TCCTTCAGGAGTGAGACCACCT-3'
	157bp	forward	5'-CATAGGAAGCTGGGAGCAAG-3'

RPL13A (ribosomales Protein L13)		reverse	5'-GCCCTCCAATCAGTCTTCTG-3'
-------------------------------------	--	---------	----------------------------

Denaturierung	Zyklen	Denaturierung	Anneal/Extend	Lagerung
95°C 10 min	35 / 40	95°C 15 sec	61,5°C 45 sec	10°C ∞

Tabelle 9: Übersicht der Primereigenschaften der fünf untersuchten Gene und des Referenzgens (oben) sowie verwendetes Thermocycler-Reaktionsprogramm (unten).

Zur Herstellung der Primer-Stammlösung wurde ein bestimmtes Volumen an RNase-freiem H₂O gemäß dem Herstellerprotokoll in das Primer-Fläschchen pipettiert (Endkonzentration: 100 pmol/ μ l). Die Primer-Stammlösung wurde für die PCR-Reaktion mit RNase-freiem H₂O auf eine Arbeitslösung von 1:10 weiter verdünnt.

Für die PCR wurde pro Probe 12,5 μ l Taq PCR Mastermix (Qiagen, Kat.-Nr.: 201443) mit 1,0 μ l des Forward-Primers, 1,0 μ l des Reverse-Primers und 8,5 μ l RNase-freies Wasser vorbereitet und mit jeweils 2,0 μ l cDNA-Probe oder Kontrolllösung in einem RNase-freien PCR-Soft-Tube gemischt und eine negative Primerkontrolle (ohne Template-DNA) hinzugefügt. Die Reaktionsabläufe wurden gemäß dem in *Tabelle 9* aufgeführten Programm gestartet im VWR-Thermocycler gestartet. Schließlich wurden 25 μ l spezifische DNA-Proben und die Kontrolle in einem 4°C-Kühlschrank gelagert.

2%iges Agarosegel wurde mit 5 μ l 1%iger Ethidiumbromidlösung versetzt und anschließend in den mit Kämmen versehenen Gelträger gefüllt. Die Affülllinie der Elektrophoresekammer wurde mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt, um sicherzustellen, dass das Gel während der Elektrophorese vollständig untergetaucht war. 6x Ladepuffer 2 μ l wurden pipettiert und mit jeweils 10 μ l spezifischer DNA-Probe oder Kontrolllösung in 0,5 ml-Röhrchen gemischt. 4 μ l DNA-Leiterlösung und alle Probenmischungen wurden vorsichtig in den Boden der Vertiefungen gegeben. Die Elektrophorese wurde bei 80 V für 75 Minuten durchgeführt. Die Auf trennung der DNA-Moleküle konnte als klare Banden unter 230 nm Ultraviolet im Transilluminator sichtbar gemacht werden.

5. qPCR – quantitative Real-Time PCR

Für die quantitative PCR-Untersuchungen wurden verschiedene Real-Time PCR-Thermocycler verwendet: MX3000P von Agilent Technologies, qTOWER iris (Analytik Jena), BioRad Opus

96 (Bio-Rad Laboratories GmbH) oder QIAquant 96 von Qiagen. In der Anwendung war der QuantiFast SYBR Green PCR Kit von Qiagen.

10 µl Ansätze für die verschiedenen Primer (Zielgen und Referenzgen) wurden mit jeweils 5 µl 2x QuantiFast SYBR Green Master Mix, 0,5 µl Forward Primer und 0,5 µl Reverse Primer, 2 µl H₂O und 2 µl cDNA-Probe oder Kalibratorlösung hergestellt und in die PCR-Platte mit 96 Vertiefungen pipettiert. Nach dem Versiegeln mit einer Folie wurde die PCR-Platte mit 96 Vertiefungen 1 Minute lang bei 2500 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die 96-Well-PCR-Platte wurde in den entsprechenden Real-Time PCR-Thermocycler eingesetzt, und die Reaktionsabläufe wurden gemäß des in der Tabelle 9 aufgeführten Programms gestartet.

Für jedes untersuchte Gen und bei allen verwendeten Real-Time PCR-Thermocyclern wurde jeweils eine Standardkurve mit einer Verdünnungsreihe (5x 1:3 Verdünnung) zu Kontrollzwecken der Effizienz mitgeführt. Alle Proben wurden mindestens in zwei separaten Durchläufen mit jeweils zwei Replikaten analysiert. Bei Abweichungen der vier erhaltenen Werte um mehr als 15% zwischen den zwei Durchläufen erfolgte ein dritter Durchlauf mit jeweils zwei Replikaten. Die Mittelwertbildung erfolgte dann unter Ausschluss des abweichenden Wertes der drei Replikate. Bei ‚no C_T‘ wurde C_T=40 eingesetzt.

Die Auswertung erfolgte gemäß der relativen Genexpression mithilfe der 2^{-ΔΔCT}-Methode [199], bei vergleichbarer Effizienz zwischen Zielgen und Referenzgen. Die Angabe der relativen Genexpressionsveränderung erfolgt als

Fold change = 2^{-ΔΔCT}, wobei

-ΔΔC_T = [(C_T Zielgen - C_T Referenzgen)_{Dex-naiv} – (C_T Zielgen – C_T Referenzgen)_{Dex-behandelt}].

ii. Western Blotting

1. Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford dye-binding method)

Die Proteinphase der Proben wurde wie unter Abschnitt 2.d.i.1. beschrieben im Rahmen der RNA-Isolierung gewonnen. Eine Kalibrierungskurve war erforderlich, um die Messwerte der Proben in die entsprechenden Proteinkonzentrationen umzurechnen. Standard-Proteinlösungen konnten durch die 1:2-Serienverdünnung von 2000 µg/ml BSA-Lösung erzielt werden. Die 2000 µg/ml BSA-Lösung wurde durch 150-fache Verdünnung von 30 % BSA hergestellt. Von

jeder Probe wurden 25 µl einer 1:10-Proteinlösung berechnet und pipettiert. Sowohl die Proben- als auch die Standardproteinlösungen wurden mit RIPA-Puffer im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Reagenzien A und S wurden berechnet und im Verhältnis 50:1 entsprechend der Gesamtzahl der zu messenden Wells pipettiert. 17,5 µl Reagenz A+S-Gemisch, 10 µl Standardproteinlösung, Probenproteinlösung oder Milli-Q H₂O als Leerwert und 140 µl Reagenz B wurden in die Wells gegeben. Nach der Inkubation auf dem Horizontalschüttler für 10 Minuten bei Geschwindigkeit 3 wurde jede Probe bei 650 nm mit dem Varioskan Flash photometrisch gemessen. Wenn die Probenproteinkonzentration zu hoch war und den Messbereich überschritt, musste eine 1:20-Verdünnung der Probenproteinlösungen vorgenommen werden. Die verbleibenden Proteinproben sollten aliquotiert und bei -80 °C gelagert werden.

2. SDS-PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese) Gel Präparation

Nachdem die 15%ige Trenngel-Lösung entsprechend dem Herstellerprotokoll pipettiert wurde, wurde die Trenngel-Lösung vortexiert und in den Spalt zwischen den Glasplatten bis zur Markierung gefüllt. Milli-Q H₂O wurde zugegeben, um einen glatten Rand zu erhalten, und es wurde auf die Gelierung gewartet. Milli-Q H₂O wurde entfernt und der Spalt wurde mit saugfähigem Papier getrocknet. Nachdem die 5%ige Stapelgel-Lösung gemäß dem Herstellerprotokoll pipettiert wurde, wurde die Stapelgel-Lösung gevortext und in den Spalt zwischen den Glasplatten gefüllt, um sofort voll zu werden. Es wurden Kämme eingesetzt, um Vertiefungen für das Einfüllen der Proben zu schaffen, und es wurde auf die Gelierung gewartet.

3. Beladen, Elektrophorese, Blotting und Ponceau S staining

Die Elektrophoresekammer und ihr Kühlungssystem wurden während des Gelierens vorbereitet. Alle Reagenzien wurden vor der Verwendung geschüttelt und kurz zentrifugiert. Das erforderliche Volumen von 20 µg pro Probe wurde berechnet und vorbereitet. Ein gleiches Volumen von 5x RSB wurde pipettiert und mit jeder Probe gemischt. 7 µl Markerlösung wurden mit 13 µl 5x RSB gemischt. Nach 5-minütigem Erhitzen in abgekochtem deionisiertem Wasser wurden alle Proben auf Eis gelegt. 1x SDS-Laupuffer wurde bis zur Standardlinie aufgefüllt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden Marker und Proben mit langen Spitzen geladen. In jede der verbleibenden Vertiefungen wurden 10 µl 2xRSB pipettiert. Die Elektrophorese wurde

bei 140 V gestartet und die Proben liefen auf das Trenngel. Die Spannung wurde für die Proteintrennung bis auf 185 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der blaue Streifen bis zum Boden des Trenngels lief. 1 Blatt Nitrocellulosemembran und 2x 5 Blatt Blotting-Papier pro Gel wurden entsprechend der Fläche des Gels vorbereitet. Sie wurden mit Transferpuffer benetzt und in eine Schale gelegt. Es war wichtig, die Nitrocellulosemembranen für das vordere und hintere Gel zu markieren. Die Glasplatten wurden vorsichtig mit einem Spatel voneinander gelöst. Das vordere und hintere Gel wurden mit einem Skalpell geschnitten und bis zu den Nitrocellulosemembranen gelegt. Sie wurden wie ein Sandwich in die Mitte von 2x 5 Blättern Löschpapier geklemmt. Dabei sollte auf die richtige Platzierung, die Strömungsrichtung und darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen dazwischen entstehen. Sie wurden in die Blotkammer gelegt und mit 1 kg Flüssigkeit unter Druck gesetzt, um eine bessere Verbindung herzustellen. Die Stromstärke wurde nach der Formel

$$[\text{Stromstärke (mA)} = \text{Länge (cm)} \times \text{Breite (cm)} \times 2 \text{ Gele} \times \text{Koeffizient } 0,8]$$

berechnet und für 75 Minuten übertragen. Anschließend wurden die Membranen mit Ponceau S angefärbt, um das erfolgreiche Blotting sicherzustellen. Nach der Entwicklung und Aufzeichnung wurde Ponceau S mit deionisiertem Wasser abgespült.

4. Blocken, primärer und sekundärer Antikörper, Entwicklung, Stripping und Lagerung

Antikörper	Klonalität	Erwartete Bande	Verdünnung	Verdünnungspuffer
Anti-CXCL2	Rabbit, polyclonal	11 kDa	1:100	3% Milch PBS-T
Anti-IL-8	Mouse, monoclonal	11 kDa	1:250	3% Milch PBS-T

Tabelle 10: Antikörper im Western Blot.

Die Nitrocellulosemembranen wurden mit PBS-T gewaschen, bis sie farblos waren. Sie wurden in 3%iger Milch/PBS-T-Lösung inkubiert, um die unspezifische Bindung zu blockieren, und 30 Minuten bei entsprechender Leistung geschüttelt. Das Aliquot der primären Antikörperlösung wurde vor der Verwendung kurz zentrifugiert. Die primäre Antikörperlösung in PBS-T wurde berechnet und im richtigen Volumen und Verdünnungsverhältnis pipettiert. Nachdem die

Nitrocellulosemembranen in die verdünnte primäre Antikörperlösung gelegt und in Plastikfolie eingeschweißt wurden, wurden sie über Nacht für die Inkubation bei entsprechender Leistung bei 4°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Membranen dreimal 10 Minuten lang mit dem entsprechenden Volumen an PBS-T gewaschen.

Die Sekundärantikörperlösung in PBS-T wurde berechnet und im richtigen Volumen und Verdünnungsverhältnis pipettiert. Die Membranen wurden in die verdünnte Sekundärantikörperlösung gegeben und für die Inkubation bei Raumtemperatur 1 oder 2 Stunden mit entsprechender Leistung geschüttelt. Die Membranen wurden 3 x 10 Minuten mit PBS-T gewaschen. Das Chemilumineszenz-Substrat (4 ml stabile Peroxidlösung und 4 ml Luminol/Enhancer-Lösung) wurde auf die Membranen pipettiert und anschließend 3 Minuten lang für den Nachweis von HRP inkubiert. Die Membranen wurden unter Verwendung von Röntgenfilmen zu einem geeigneten Zeitpunkt in der Dunkelkammer entwickelt. Die Informationen wurden auf den Filmen markiert. Nach 10-minütigem Waschen der Membranen mit PBS-T wurden die gebundenen spezifischen Antikörper durch 10-minütiges Strippen mit Puffer entfernt. Die oben beschriebenen Verfahren waren auch für den Nachweis anderer Proteine (z. B. GAPDH) geeignet. Schließlich wurden die Membranen versiegelt und mit PBS-T in Plastikfolie aufbewahrt.

iii. Immunfluoreszenz-Färbung von FFPE-Proben

1. Schnitte, Deparaffinisierung und Rehydrierung

Hierfür wurden entsprechend vorhandene FFPE-Blöcke der jeweiligen Patienten verwendet, die durch die Kollegen der Neuropathologie zur Verfügung gestellt wurden. Die FFPE-Blöcke wurden freundlicherweise vom Institut für Neuropathologie am Universitätsklinikum Regensburg mit einem Mikrotom in 5 µm dicke Schnitte geschnitten, jeweils auf ein Glass Slide aufgetragen und uns zur Verfügung gestellt. Die Schnitte auf Glas wurden dann zunächst deparaffinisiert und rehydriert. Zunächst erfolgte die Inkubation der Objektträger bei 37°C über Nacht, gefolgt von einer Xylol- und absteigenden Ethanol-Behandlung in Coplin-Färbegefäß (für bis zu 9 Objektträger) nach folgendem Schema: Xylol 3 x 3 Minuten, 100% Ethanol 2 x 3 Minuten, 95%, 70% und 50% Ethanol jeweils 1 x 3 Minuten mit anschließendem Abspülen unter Leitungswasser. Daraufhin erfolgte die Antigenfreilegung mit Tris/EDTA pH 9,0 Puffer: der Puffer wurde zunächst in der Mikrowelle für 2 Minuten aufgekocht, die Schnitte in den heißen Puffer gestellt, dann kurz aufgekocht und anschließend in der geschlossenen Küvette für

10 Minuten stehen gelassen. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3 Mal durchgeführt, wobei abschließend der Objektträger für 15 Minuten in TBS auf Raumtemperatur abgekühlt wurde.

2. Tageslichtbleaching zur Unterdrückung der Autofluoreszenz

Zur Unterdrückung der Autofluoreszenz bei FFPE-Schnitten erfolgte das Ausbleichen mittels Tageslichtlampe (Beurer TL85, Tageslichtlampe, 12.000 Lux, EAN 6970229250293). Das entsprechende Protokoll wurde am Institut für Neuropathologie etabliert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Hierzu wurde zunächst ein Ausbleichpuffer zur Anwendung an je 12 Schnitten hergestellt mit 150 ml 1X PBS, 27 ml 30% H₂O₂ und 4,8 ml NaOH. Es erfolgte die Bestrahlung mit der Tageslichtlampe für 30 Minuten, dann ein Wechsel des Ausbleichpuffers und eine erneute Bestrahlung für weitere 30 Minuten. Anschließend erfolgte die Inkubation der Objektträger für 2 Minuten in 1X TBS.

3. Immunfluoreszenz-Färbung

Zunächst erfolgte die Inkubation für 2 x 5 Minuten in TBS mit 0,025% Triton®X-100 unter leichten horizontalen Schüttelbewegungen auf dem Rüttelgerät. Dann erfolgte die Blockierung mit 10% Eselserum und 1% BSA in TBS für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Sodann wurde die Blocklösung abgeschüttet und der primäre Antikörper bzw. die IgG Kontrollen in entsprechender Verdünnung in TBS und 1% BSA aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert (s. *Tabelle 11*). Am Folgetag wurde die Lösung mit primärem Antikörper bzw. IgG Kontrolle 2 x 5 Minuten (s. *Tabelle 11*) mit TBS und 0,025% Triton®X-100 inkubiert bzw. abgespült. Es erfolgte dann das oben beschriebene Tageslichtbleaching. Der sekundäre Antikörper wurde in der jeweiligen Verdünnung in 1X TBS und 1% BSA aufgetragen und bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Es erfolgte die dreimalige Inkubation für 5 Minuten bzw. Spülung mit 1X TBS und dann die Zellkernfärbung mit Hoechst33342 (Invitrogen). Anschließend erfolgte das blasenfreie Eindecken mit DABCO (1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan, Roth, #0718). Die eingedeckten Objektträger wurden für 24 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet und dann bei 4°C dunkel gelagert.

Primäre Antikörper	Katalognummer	Firma	Verdünnung
Anti-Iba1 goat recombinant antibody (EPR16588)	ab289874	abcam	1:1000
Anti-CD3 epsilon recombinant monoclonal antibody (SP7) (rabbit)	ab16669	abcam	1:150
TMEM119 monoclonal antibody (CL8714) (mouse/IgG1)	#MA5-35043	Invitrogen	1:100
CXCR2 polyclonal antibody (rabbit/IgG)	#PA5-100951	Invitrogen	1:100
iNOS monoclonal antibody (4E5) (mouse/IgG1)	# MA5-17139	Invitrogen	1:200
CD206 polyclonal antibody (rabbit)	ab64693	abcam	1:200
Sekundäre Antikörper	Katalognummer	Firma	Verdünnung
Donkey Anti-Goat IgG H&L (Cy5®) preadsorbed	ab6566	abcam	1:1000
Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594) preadsorbed	ab150068	abcam	1:1000
Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) preadsorbed	ab150109	Abcam	1:1000
Kernfärbung	Katalognummer	Firma	Verdünnung
Hoechst33342 (Bisbenzimid)	130-111-569	Miltenyi	1:20.000
IgG-Kontrollen (Negativkontrolle)	Katalognummer	Firma	Verdünnung
Rabbit IgG	NI01-100UG	Sigma-Aldrich	1:100 / 1:150 / 1:200
Mouse IgG	PP54-1GKC	Sigma-Aldrich	1:100 / 1:200
Goat IgG	PP40-KC	Sigma-Aldrich	1:1000

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Reagenzien zur Immunfluoreszenzfärbung der FFPE-Schnitte.

4. Imaging mit Nikon Eclipse Ti2

Es erfolgte die Digitalisierung mit einem invertierten Mikroskop (Nikon Eclipse Ti2-E, Nikon Europe B.V., Niederlande) mit motorisierter Plattform und der CellScan® und CellView® Software v6.0 von Molecular Machines & Industries (MMI, Eching, Deutschland). Hierbei wurden BigTiff-Dateien in 20facher Vergrößerung von mindestens zwei Stellen des Gewebeschnitts im Multi-Channel Modus (s. *Tabelle 12*) und automatischem Bild-Stitching angefertigt und zur Auswertung und digitalen Mikroskopie gespeichert. Von jeder Gewebestelle wurden zwischen 20 und 50 Bilder aufgenommen und über die MMI Software zu einer großen Tiff-Datei zusammengefügt, so dass nachträglich großflächige Auswertungen vorgenommen werden konnten.

Filter Cube	Exzitationfilter (EX)	Dichroitischer Spiegel (DM)	Bandpass Filter (BA)
Nikon HQ, DAPI-5060C	377/50 nm	409 nm	447/60 nm
Nikon HQ GFP-3035D	472/30 nm	495 nm	520/35 nm
Nikon HQ mCherry-C Filter Cube	562/40 nm	593 nm	640/75 nm
Nikon HQ Cy5-4040C	628/40 nm	660 nm	692/40 nm

Tabelle 12: Verwendete Filter Cubes zur Darstellung der jeweiligen Kanäle bei 2- bis 4-plex Immunfluoreszenzfärbungen.

5. Digitale Mikroskopie und Auswertung mit ImageJ

Zur Auswertung der T-Zellhäufigkeit in den FFPE-Schnitten zum Gruppenvergleich zwischen Dexamethason-behandelten und Dexamethason-naiven Patienten wurden von den Gewebeschnitten an mindestens drei zufällig ausgewählten Stellen - unter Exklusion von nekrotischen Anteilen - in 20-facher Vergrößerung in zwei Kanälen (Nikon HQ, DAPI-5060C und Nikon HQ mCherry-C Filter Cube) zwischen 20 und 50 Felder aufgenommen und zu jeweils einer großen TIF-Datei zusammengefügt. Als Positivkontrolle diente hier humanes Lymphknotengewebe.

Das archivierte Bildmaterial wurde in ImageJ geöffnet und im jeweiligen Kanal ein Color Thresholding durchgeführt. Das RGB Color Bild wurde dann in den 8-bit Modus konvertiert, um dann über Watershedding sich berührende Partikel bzw. positive Areale aufzutrennen.

Anschließend erfolgte die Zählung positiver Partikel, wobei hier nur 3-250 μm^2 große Partikel in die Zählung eingeschlossen wurden. So wurde über die Kernfärbung (DAPI-Kanal) die Gesamtzahl der Zellkerne und über die CD3-Färbung (mCherry-Kanal) CD3-positive Partikel ermittelt. Somit konnte die im Gewebe vorhandene T-Zellfrequenz ausgelesen werden (s. Abbildung 10).

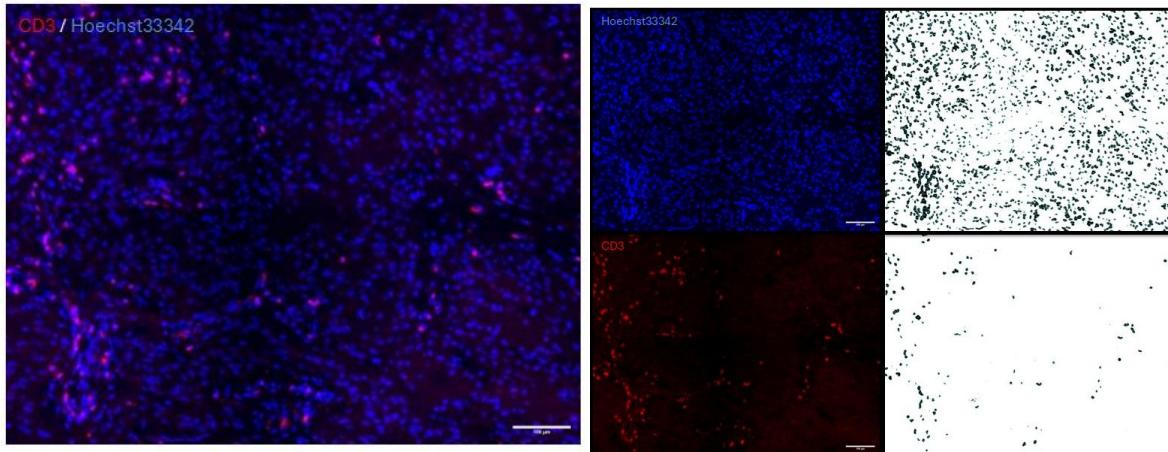


Abbildung 10: Darstellung der Auswertung der T-Zell-Frequenz in FFPE-Schnitten. Overlay des mCherry- und DAPI-Kanals (oben), Einzelkanaldarstellung (unten linke Spalte), Binärdarstellung mit Watershedding und Partikel-Count (unten rechte Spalte). Im Beispiel ergeben sich 2041 Partikel (Zellkerne) im DAPI-Kanal und 138 Partikel (CD3+) im mCherry-Kanal, so dass hier eine CD3 positive Partikelfrequenz von 6,76% im Verhältnis zur Zellkernfrequenz zur Darstellung kommt. Weißer Balken im rechten unteren Bildeck: Skalierung entspricht 100 μm .

Zur Auswertung der GAMM- und CXCR2-Verteilung in den FFPE-Schnitten zum Gruppenvergleich zwischen Dexamethason-behandelten und Dexamethason-naiven Patienten wurden von den Iba1/TMEM119/CXCR2/Hoechst33342-gefärbten Gewebeschnitten einer zufällig ausgewählten Stellen - unter Exklusion von nekrotischen Anteilen - in 20-facher Vergrößerung in allen vier Kanälen (s. Tabelle 12) zwischen 20 und 50 Felder aufgenommen und zu jeweils einer großen TIF-Datei zusammengefügt. Als Positivkontrolle diente hier Tonsillengewebe mit hoher Expression aller drei beteiligten Marker, das uns dankenswerterweise von PD Dr. Katja Evert (Institut für Pathologie, UKR) zur Verfügung gestellt wurde.

Zur Abschätzung des generellen Anteils von Iba1-, TMEM119- und CXCR2-Positivität erfolgte zunächst die Bestimmung der relativen Fläche des Immunfluoreszenz-positiven Areals an der Gesamtfläche mittels ImageJ. Hierfür wurde die Tiff-Datei geöffnet, die Einzelkanäle gesplittet und das 8-bit Bild in ein RGB-Image konvertiert und sodann über Threshold Color anhand der

Intensität ein sinnvoller Schwellenwert bestimmt, der das Hintergrundsignal ausschaltet. Es wurde dann der relative Anteil des positiven Signals vom Gesamtbild bestimmt.

Zur Quantifizierung der GAMM Verteilung (Mikroglia vs. Makrophagen) anhand Iba1- und TMEM119-Positivität erfolgte eine Kolokalisierungsanalyse mittels ImageJ-Plugin JACoP (Just Another Colocalisation Plugin v2.1.4.21/02/03) [200]. Hierzu wurde zunächst die 4-Channel Composite Tiff-Datei in ImageJ importiert. Die Kanäle wurden vereinzelt (Split Channel) und im JACoP Kolokalisierung-Plugin sodann der Cy5-Channel mit dem GFP-Channel kolokalisiert. Es erfolgte ein sorgfältiges manuelles Thresholding zur sinnvollen Abgrenzung des Immunfluoreszenzsignals vom Hintergrund bzw. des Autofluoreszenzsignals, und anhanddessen die Bestimmung des Mander's Coefficient, der auf Hintergrundsignale relativ sensitiv reagiert [201].

Manders-Koeffizienten (Manders-Überlappungskoeffizienten) geben den Grad der Kolokalisierung zwischen zwei Fluoreszenzsignalen in der Fluoreszenzmikroskopie an, um festzustellen, ob sich zwei Marker in denselben räumlichen Arealen der Probe befinden. Mander's Coefficient M1 gibt den Anteil des Gesamtsignals von Kanal 1 (z.B. rot) an, der sich mit dem Signal von Kanal 2 überschneidet (z.B. grün). Folgende Formel wird hier angewendet:

$$M_1 = \frac{\sum I_{coloc,1}}{\sum I_1}$$

I_1 = die Fluoreszenzintensität in Kanal 1, und

$I_{coloc,1}$ = die Intensität in Kanal 1, wo das Signal von Kanal 2 oberhalb einer bestimmten Schwelle vorhanden ist.

Hieraus ergeben sich Werte zwischen 0,0 und 1,0, wobei eine schwache Kolokalisierung bei 0,0-0,5 vorliegt, eine starke Kolokalisierung bei 0,8-1,0 bzw. eine komplett Kolokalisierung bei 1,0 vorliegt [201].

In unserem Fall ergibt sich durch den Mander's Coefficient der Anteil des mit Iba1-Fluoreszenz kolokalisierten TMEM119-Fluoreszenzsignals vom Gesamt-Iba1-Fluoreszenzsignal als mikroglialer Anteil des GAMM.

Analog hierzu erfolgte die Kolokalisierungsanalyse zur Abschätzung der CXCR2-Verteilung auf Iba1 und TMEM119 positiven Zellen/Arealen, es wurde also der Anteil von Iba1-Positivität (bzw. TMEM119-Positivität), der mit CXCR2-Fluoreszenz kolokalisiert ist, vom Gesamt-

CXCR2-Fluoreszenzsignal bestimmt und somit der Grad der CXCR-Positivität auf GAMM (bzw. Mikroglia) vom Gesamt-CXCR2-Gehalt ausgelesen.

Zur Auswertung der myeloiden M1/M2-Spektrum-Verteilung in den FFPE-Schnitten zum Gruppenvergleich zwischen Dexamethason-behandelten und Dexamethason-naiven Patienten wurden von den Iba1/iNOS/CD206/Hoechst33342-gefärbten Gewebeschnitten an zufällig ausgewählten Stellen - unter Exklusion von nekrotischen Anteilen - in 20-facher Vergrößerung in allen vier Kanälen (s. *Tabelle 12*) zwischen 20 und 50 Felder aufgenommen und zu jeweils einer großen TIF-Datei zusammengefügt. Als Positivkontrolle diente hier humanes Bronchusgewebe mit hoher Expression aller drei beteiligten Marker, das uns dankenswerterweise von PD Dr. Katja Evert (Institut für Pathologie, UKR) zur Verfügung gestellt wurde.

Zur Abschätzung des generellen Anteils von iNOS- und CD206-Positivität in den FFPE-Schnitten erfolgte die Bestimmung der relativen Fläche des Immunfluoreszenz-positiven Areals an der Gesamtfläche mittels ImageJ. Hierfür wurde die Tiff-Datei geöffnet, die Einzelkanäle gesplittet und das 8-bit Bild in ein RGB-Image konvertiert und sodann über Threshold Color anhand der Intensität ein sinnvoller Schwellenwert bestimmt, der das Hintergrundsignal ausschaltet. Es wurde dann der relative Anteil des positiven Signals vom Gesamtbild bestimmt.

e. Statistische Analysen

Die *in vitro* und *ex vivo* Experimente und die Analysen wurden in mindestens zwei, wo möglich drei, unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. Statistiken wurden mit GraphPad Prism v.9 (GraphPad Software Inc.) berechnet und statistische Diagramme erstellt. Nicht normal verteilte Datengruppen wurden mit dem Mann-Whitney U Test (zwei Gruppen) oder dem Kruskal-Wallis Test (mehr als zwei unabhängige Gruppen) auf Signifikanz geprüft. Parametrische Tests wurden mit dem Student's t-Test durchgeführt, Vergleiche zwischen mehreren Gruppen erfolgten mit der einfaktoriellen ANOVA oder bei mehreren Parametern mit der zweifaktoriellen ANOVA. Für Mehrfachvergleiche erfolgte je nach Fragestellung oder Abhängigkeit der erhobenen Werte (z.B. Messung an unterschiedlichen Zeitpunkten) eine Auswertung mit Dunnett's Mehrfachvergleichstest, Tukey's Mehrfachvergleichstest oder Šídák's Mehrfachvergleichstest. Paarweise Vergleiche erfolgten mit dem unkorrigierten Fisher's LSD-Test (Least Significant Difference). Einfache lineare Korrelationen wurden mit dem Spearman-Korrelations-Test getestet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p <$

0,0001; „n.s.“ bedeutet ein nicht signifikanter p-Wert. Alle Zahlen sind als Mittelwert, Median oder geometrische Mittel und Standardabweichung oder 95%-Konfidenzintervall angegeben.

3. Ergebnisse

a. *in vitro* und *ex vivo*

i. Vorversuche *in vitro* und *ex vivo* OBSC: Effekte von IL-17A, IL-22, IL-23 und CCL20 auf drei Rattenzelllinien (S635, 9L und Astrozyten)

In einem ersten Set an Vorversuchen - insbesondere zur Etablierung unseres Rattenhirnschnitt-Co-Kultur-Modells (OBSC) - testeten wir zunächst die Anwendung von vier verschiedenen Interleukinen auf das Auswachsen dreier Rattenzellkultur-Zelllinien (9L, S635, Astrozyten). Diese immunologischen Faktoren wurden anhand zweier Kriterien in einer Literaturrecherche ausgewählt: Einerseits sollten sie pro-invasive Eigenschaften in anderen Tumorentitäten zeigen, andererseits eine (erhöhte) Expression im Glioblastom oder im Serum von Glioblastompatienten aufweisen (s. *Tabelle 13*).

IL-22	IL-23	IL-17A	CCL20
Mammakarzinom [202–204]	Magenkarzinom [205]	Glioblastom [206]	Hepatozelluläres Karzinom [207, 208]
Hepatozelluläres Karzinom [209, 210]	Schilddrüsenerkrankung [211]	Magenkarzinom [212, 213]	Eierstock-karzinom [214, 215]
Malignes Melanom [216]	Urothelkarzinom [217]	Plattenepithelkarzinom [218]	Endometrium-karzinom [219]
Plattenepithel-karzinom [220]	Kolorektales Karzinom [221]	Mammakarzinom [222]	Peniskarzinom [223]
Urothelkarzinom [224]			

Tabelle 13: Übersichtstabelle von Tumorentitäten, bei denen jeweils die vier verwendeten Interleukine pro-tumorigene Eigenschaften aufweisen.

Interleukin-22 (IL-22) ist ein Paradebeispiel für die Überlappung von Signalfaktoren für die Geweberegenerierung und Wundheilung mit pro-tumorigenen Kaskaden, so dass Interleukin-22 in einigen Tumorentitäten mit entsprechenden tumor-förderlichen Eigenschaften assoziiert wird [225].

IL-22 ist bei Brustkrebspatienten mit einer erhöhten Infiltration von tumor-assoziierten Makrophagen und einer schlechten Prognose assoziiert [202, 203] und fördert im Mausmodell die Bildung maligner Mammakarzinom-Manifestationen [204]. Beim hepatzellulären Karzinom wird neben erhöhter Migrationsfähigkeit, vermittelt durch IL-22 [210], die Infiltration von tumor-infiltrierenden IL-22⁺ Zellen und erhöhte Serumlevels mit einer ungünstigen Prognose assoziiert [209]. Ebenso zeigten kutane Melanome und orale Plattenepithelkarzinome eine erhöhte Proliferation, Migration und Invasion durch IL-22 [216, 220], sowie eine Assoziation mit einem immunevasiven Subtyp im muskelinvasiven Blasenkarzinom [224]. Gleichzeitig scheint es ein erhöhtes Überleben von Glioblastomzellen zu induzieren [226].

Interleukin-23 (IL-23) wiederum ist ebenfalls mit einer schlechten Prognose beim Blasenkarzinom assoziiert [217], fördert die Migration und Invasion von Magenkarzinomzellen durch EMT [205], ermöglicht die Migration von Schilddrüsenkarzinomzellen [211] und fördert die Absiedelung von kolorektalen Karzinomzellen [221].

IL-17A wiederum zeigt eine EMT-auslösende Wirkung mit Förderung von Migration und Invasion im Magenkarzinom [212, 213], Mammakarzinom [222] und oralen Plattenepithelkarzinom [218], und wurde mit erhöhter Migration und Invasion bei Glioblastomzellen assoziiert [206].

CCL20 fördert Migration und Invasion im Mammakarzinom, Endometrium- und Eierstockkarzinom, sowie im hepatzellulären Karzinom durch EMT-Induktion [207, 208, 214, 215, 219, 223, 227], und zeigt eine verstärkte mikrogliale Migration und Infiltration bei Glioblastomzellen [228].

Im Plasma von Hirntumorpatienten zeigten sich systemisch zirkulierendes IL-17A, IL-23 und CCL20 erhöht [229].

1. Wundheilungsmigrationsassay

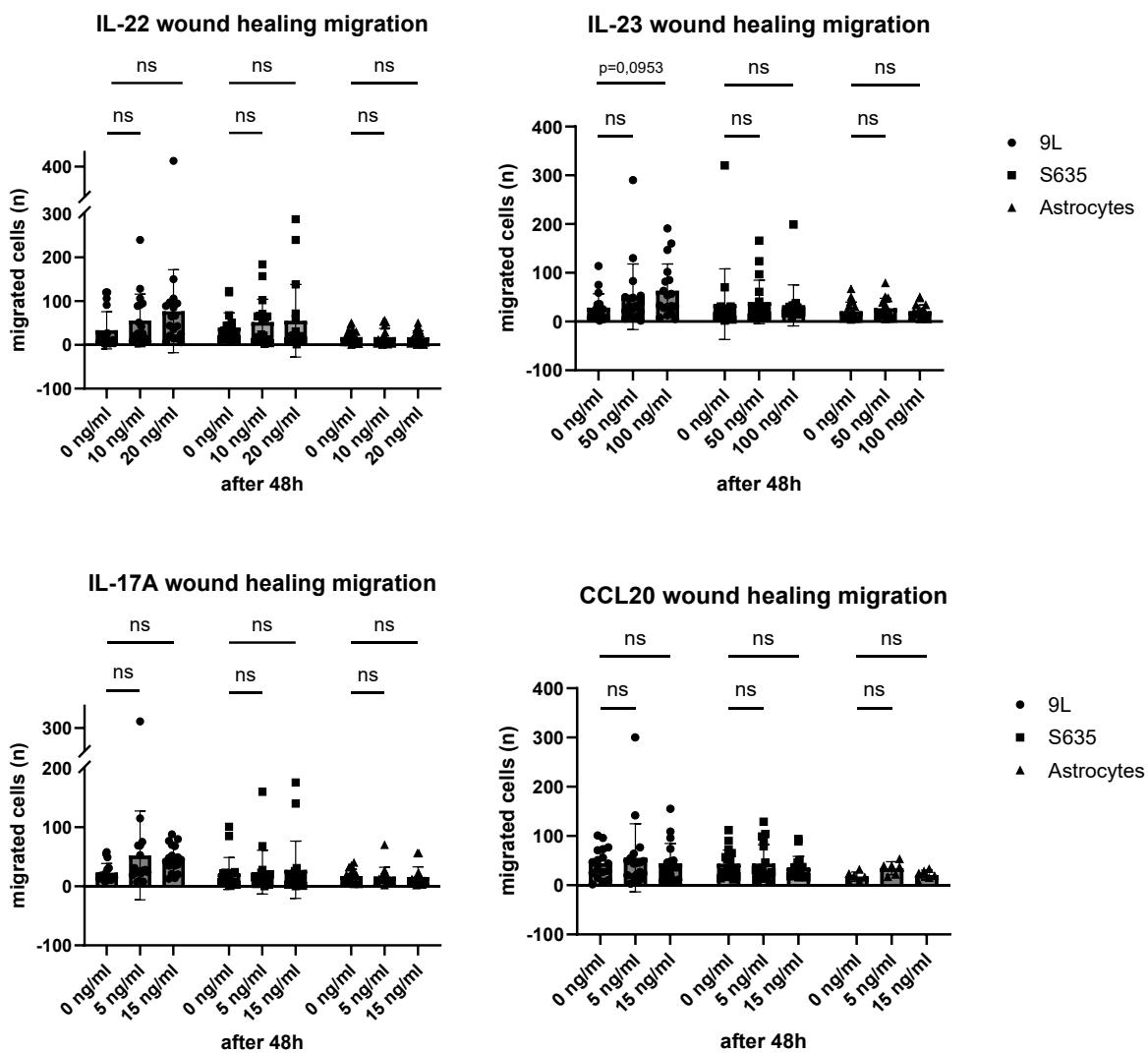


Abbildung 11: Darstellung der Ergebnisse des Wundheilungsmigrationsassay (zweikammriger Ibidi-Assay) für die drei Zelllinien, und IL-22, IL-23, IL-17A und CCL20. In der einfaktoriellen ANOVA zeigt sich durchweg kein Effekt für die Behandlungen innerhalb der einzelnen Zelllinien..

Generell zeigten die drei Rattenzelllinien im Wundheilungsmigrationsassay ein per se geringes Migrationsverhalten in den zellfreien Raum zwischen den konfluenten Zellrasen im zweidimensionalen Raum auf Plastik. Grundsätzlich zeigte sich keine Migration des gesamten Zellverbands, wohl aber ein Auswandern einzelner Zellen aus dem Zellverband in den zellfreien Raum, so dass die Auswertung in der Auszählung der eingewanderten Zellen in einem vorgegebenen Zeitraum von 48 Stunden bestand. Wenn überhaupt zeigte sich nur tendenziell ein erhöhtes Migrationsverhalten von Einzelzellen im Mehrfachvergleich für 9L bei Behandlung mit IL-23 100 ng/ml (s. Abbildung 11).

2. Transwell Matrigel Invasionsassay

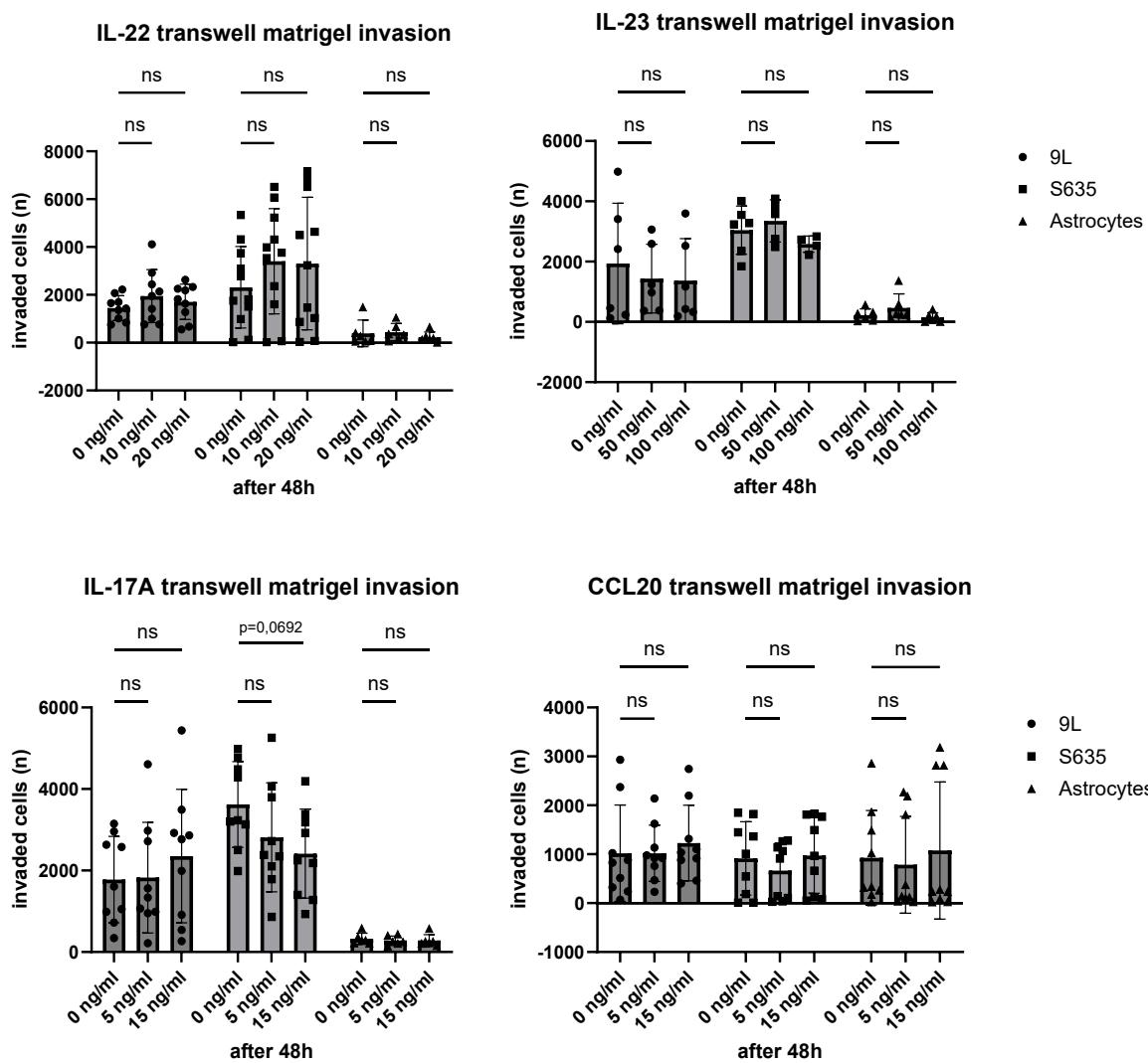


Abbildung 12: Darstellung der Ergebnisse des Transwell Matrigel Invasionsassays für die drei Zelllinien, und IL-22, IL-23, IL-17A und CCL20. In der einfaktoriellen ANOVA zeigt sich durchweg kein Effekt für die Behandlungen innerhalb der einzelnen Zelllinien.

In der Testung des Invasionsverhaltens der einzelnen Zelllinien im *in vitro* Transwell Matrigel Invasionsassay zeigen sich in der einfaktoriellen ANOVA keine Effekte für die Behandlung. Auffällig war die große Streubreite der Einzelansätze speziell für die S635 Zelllinie und teilweise auch die Astrozytenzellen. Eine Tendenz zeigte sich lediglich in einem abnehmenden Invasionsverhalten für die S635 Zelllinie für die Behandlung mit 15 ng/ml IL-17A (s. Abbildung 12).

3. Sphäroidmigrationsassay

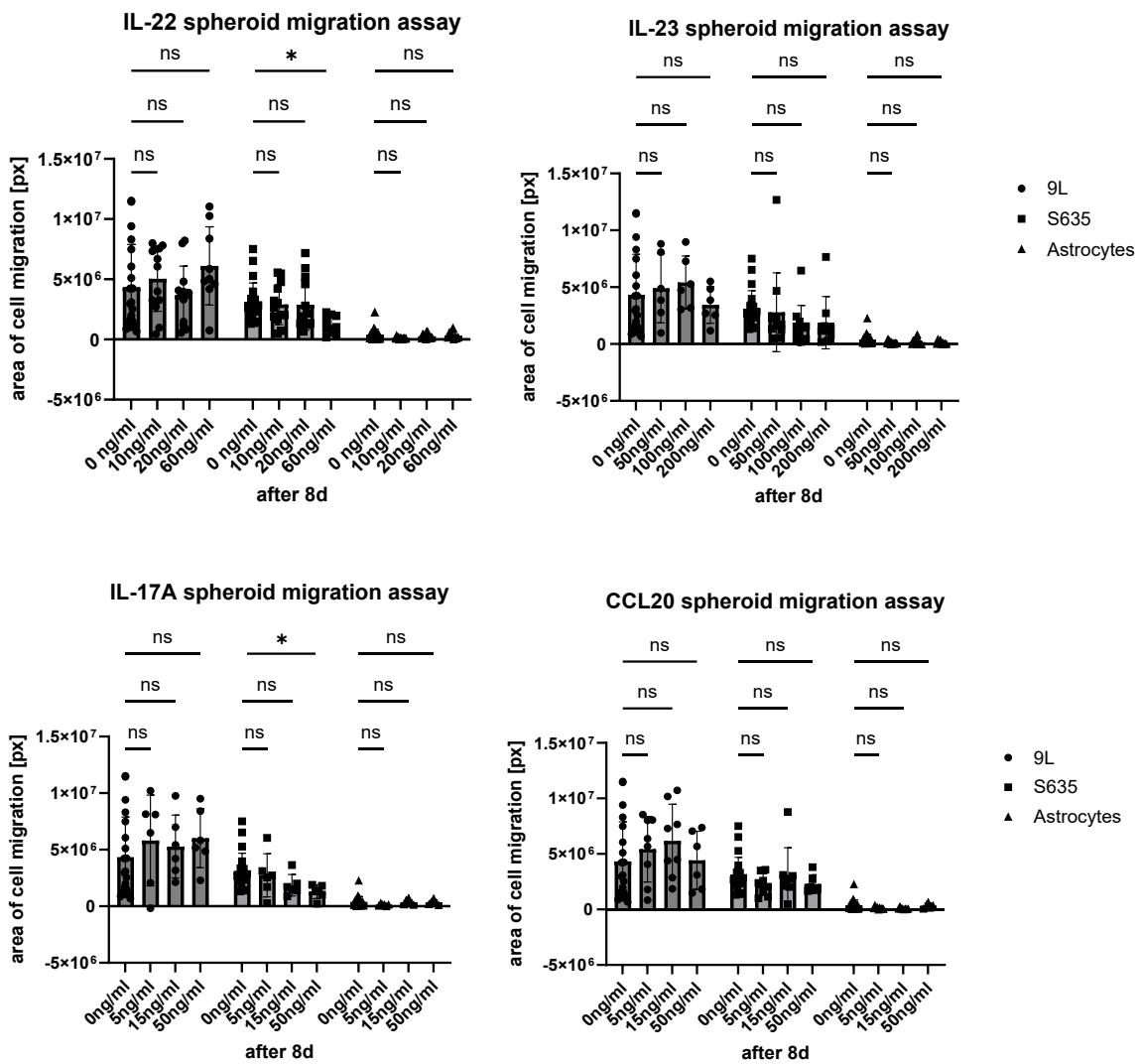


Abbildung 13: Darstellung der Ergebnisse des Sphäroidmigrationsassays für die drei Zelllinien und IL-22, IL-23, IL-17A und CCL20. In der zweifaktoriellen ANOVA zeigt sich nur für die S635 Zelllinie ein Effekt für die Behandlung mit IL-22 $p=0,0397$ und IL-17A $p=0,0431$. Im Dunnett's Mehrfachvergleich findet sich eine Abnahme durch IL-22 (S635), 0 vs. 60 ng/ml $p=0,0164$ und IL-17A (S635), 0 vs. 50 ng/ml $p=0,0303$.

Während sich im Wundheilungsmigrationsassay nach 48-stündiger Beobachtungsdauer für die Zelllinien kein differentielles Migrationsverhalten von Einzelzellen aus dem Verband in den zellfreien Raum zeigte, so zeigte sich das Migrationsverhalten im Sphäroidmigrationsassay bei 8-tägiger Beobachtungsdauer für die S635 Zelllinie signifikant durch IL-22 und IL-17A beeinflusst, mit einem signifikant reduzierten Migrationsverhalten bei den höchsten Konzentrationen von IL-22 bzw. IL-17A (s. Abbildung 13).

Zusammenfassend lässt sich aus unseren umfänglichen *in vitro* Testungen schlussfolgern, dass direkte Effekte durch die angewendeten Interleukine auf unsere drei Zelllinien im Wundheilungsmigrationsassay und Invasionsassay bei jeweils 48-stündiger Beobachtungsdauer nicht gegeben sind, beim Sphäroidmigrationsassay (bei 8-tägiger Beobachtungsdauer) die höchsten Konzentrationen von IL-22 und IL-17A (60ng/ml bzw. 50 ng/ml) zu einem geringeren Ausmigrieren führten.

4. *Ex vivo* OBSC: IL17A, IL22, IL23, CCL20

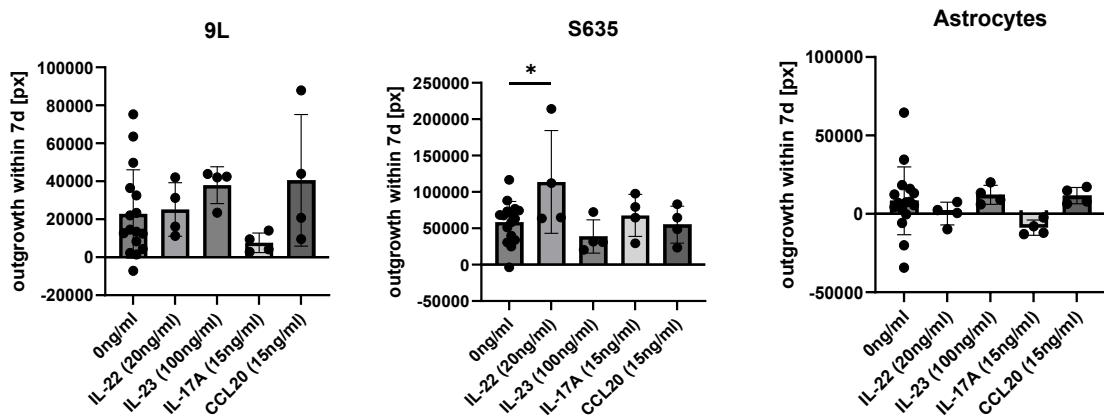


Abbildung 14: Darstellung der Ergebnisse im *ex vivo* OBSC für die drei Zelllinien und IL-22, IL-23, IL-17A und CCL20. Für die S635 Zelllinie zeigt sich in der einfaktoriellen ANOVA kein signifikanter Effekt ($p=0,0511$). In Dunnett's Mehrfachvergleichstest zeigt sich durch Applikation von IL-22 ein signifikant erhöhtes Auswachsen des Sphäroids (adjustiertes $p=0,0333$). Für alle anderen Zytokine zeigt sich in keiner Zelllinie ein signifikanter Unterschied durch die Behandlung.

Das Auswachsen eines Sphäroids im *ex vivo* Rattenhirnschnittmodell (OBSC) - mit erhaltener Zytarchitektur und vorhandenem mikroglialem Immunkompartiment - stellt schlussendlich das Ergebnis aus direkten Einflüssen auf die Zelllinien bezogen auf die Migration und Invasion - entsprechend unserer *in vitro* Ergebnisse nicht gegeben - und indirekte Einflüsse durch Auswirkung der Zytokine auf die zelluläre Sphäroidmikroumgebung dar. In einer Anwendung der vier Interleukine auf alle drei Rattenzelllinien (je Kondition und Zelllinien $n=4$) im Vorversuch wurde zunächst eine breite Streuung in der 9L- und Astrozytenzelllinie sichtbar. Signifikanzen wurden für beide Zelllinien nicht erreicht. Ein signifikant höheres Auswachsen zeigte sich nach Behandlung mit IL-22 für die S635-Zelllinie, die in der Baseline insgesamt ein robusteres und stabileres Auswachsverhalten zeigte (s. Abbildung 14).

ii. *Ex vivo* OBSC Versuche – Dexamethason, Mikroglia-Depletion, CXCR2-CXCL2-Achse

1. Mikrogliadepletion in OBSC mit PLX5622

a) Auswirkungen der PLX5622 Behandlung auf die Astrozyten im OBSC

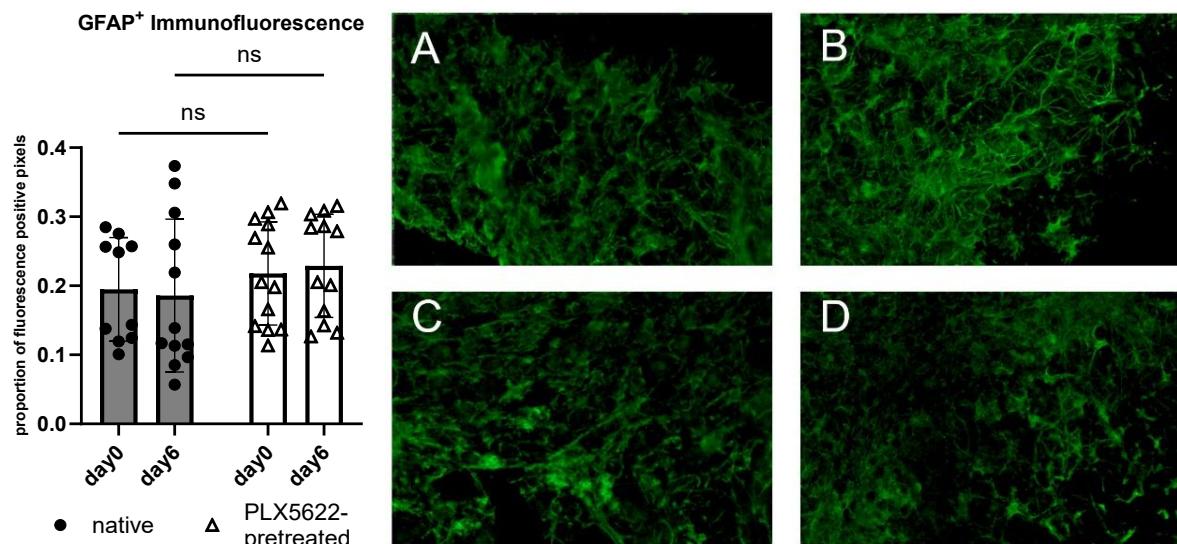


Abbildung 15: Darstellung des Einflusses der PLX5622-Vorbehandlung und Veränderung über die Zeit Tag 0 vs. Tag 6 der GFAP-Positivität auf Kontroll-OBSC. Links: Quantifizierung von GFAP in Kontrollgewebeschnitten ohne Sphäroid (nativ vs. mit PLX5622 vorbehandelt) an Tag 0 (erster Tag nach der Vorbehandlung) und an Tag 6 ohne weitere Behandlung. Es zeigen sich keine Effekte in der zweifaktoriellen ANOVA für die Zeitpunkte (d0 und d6) ($p=0,9690$) oder die Vorbehandlung ($p=0,1936$). Repräsentative Bilder von immunfluoreszenzgefärbten Schnitten A=Tag0/nativ, B=Tag0/PLX5622-behandelt, C=Tag6/nativ, D=Tag6/PLX5622-behandelt. Abbildung adaptiert aus der Publikation von Falter et al. (2023) [230].

Zur Überprüfung von Auswirkungen der Vorbehandlung der Ratten-OBSC mit PLX5622 (s. Methodenteil) auf das astrozytäre Kompartiment des OBSC erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung auf glial fibrillary acidic protein (GFAP) [231] von den bei -80°C kryokonservierten OBSC, die zu Kontrollzwecken nicht mit einem Glioblastom-Rattenzelllinien Sphäroid belegt worden waren. Einerseits wurden OBSC ohne Sphäroide an Tag 0 (also direkt nach der Vorbehandlungsphase mit/ohne PLX5622) kryokonserviert, andererseits wurden OBSC ohne Sphäroid an Tag 6 archiviert. Von diesen in TissueTek konservierten OBSC wurden Kryoschnitte angefertigt und entsprechend anti-GFAP-immunfluoreszenzgefärbt (s. Methoden). Hier zeigten sich keine Effekte, weder innerhalb der

Gruppe zwischen Tag 0 und Tag 6 noch zwischen den Gruppen (native vs. PLX5622-vorbehandelt) (s. Abbildung 15).

b) Vollständigkeit der mikroglialen Depletion und intrinsische Re-Population über die Zeit

Die immunfluoreszierende Iba1⁺-Färbung wurde an den Kontrollschnitten (ohne Sphäroide) durchgeführt, um den Erfolg der Mikroglia-Depletion an den OBSC zu den beiden Zeitpunkten (d0, d6) zu kontrollieren. An Tag 0 und am Tag 6 wurden signifikant weniger Iba1⁺-Zellen in den mit PLX5622 vorbehandelten OBSC gefunden, während im Laufe der Zeit, wenn man Tag 0 und Tag 6 vergleicht, eine gewisse Regeneration der Iba1⁺-Zellen mit einem signifikant höheren Gehalt an Iba1⁺-Zellen an Tag 6 in den mit PLX5622 vorbehandelten OBSC im Vergleich zu den mit PLX5622 vorbehandelten OBSC an Tag 0 festgestellt werden kann. Ein signifikanter Unterschied zwischen der „Mikroglia-depletierten“ Bedingung (PLX5622-behandelt) und den nativen OBSC bleibt jedoch bis Tag 6 erhalten (s. Abbildung 16)

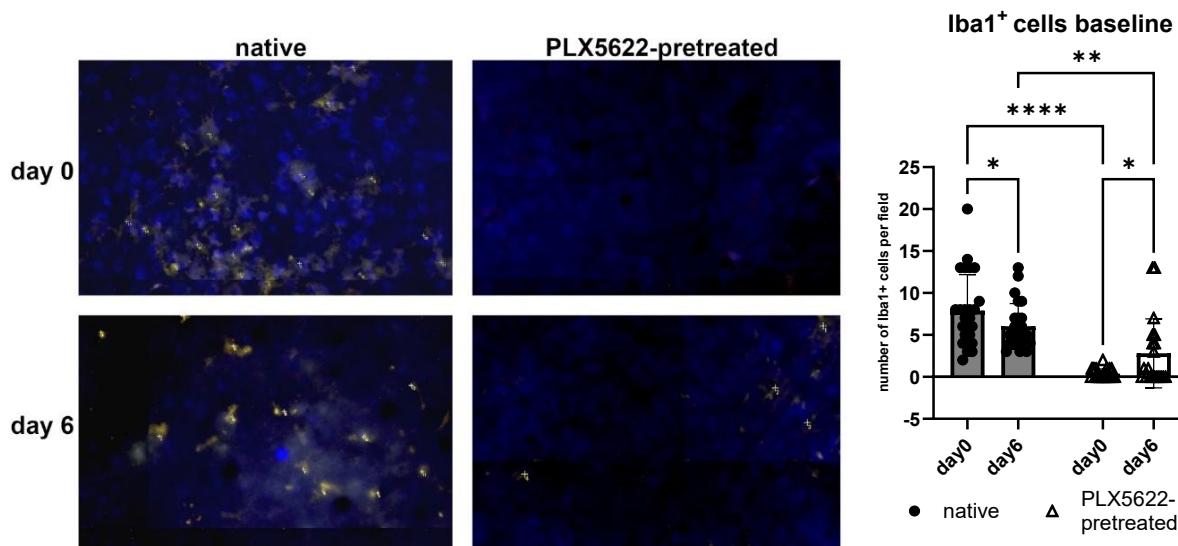


Abbildung 16: Auswirkungen von PLX5622 auf Iba1-positive Zellhäufigkeit. Bei der Iba1-Färbung (blau: Hoechst33342, gelb: Iba1⁺) zeigt sich in der Auswertung der Iba1-positiven Zellhäufigkeit an Tag 0 und Tag 6 für Mikroglia native und PLX5622-vorbehandelte Schnitte in der zweifaktoriellen ANOVA kein signifikanter Effekt für den Faktor Zeitpunkt ($p=0,6539$), ein signifikanter Effekt für PLX5622-Vorbehandlung ($p<0,0001$) und die Interaktion aus Zeitpunkt x Vorbehandlung ($p=0,0018$). Bei paarweisen Vergleichen mittels uncorrected Fisher's LSD zeigt sich für Tag 0 (native vs. PLX5622-pretreated) eine signifikant verminderte Iba1-Zellfrequenz ($p<0,0001$) sowie für Tag 6 (native vs. PLX5622-pretreated) ($p=0,0012$). Eine Abnahme zeigt sich in der Mikroglia nativen Kondition von Tag 0 im Vergleich zu Tag 6 ($p=0,0473$) und in der nativen Kondition eine Zunahme von Tag 0 im Vergleich zu Tag 6 ($p=0,0137$). Abbildung aus der Publikation von Falter et al. (2023) [230].

- c) Mikrogliale Isolierung, vitale Färbung und autologe Re-Population eines Mikrogliasphäroids

Neben der reinen Mikroglia-Depletion wurde im Rahmen der Untersuchung auch die Möglichkeit der mikroglialen Depletion mit anschließender autologer bzw. heterologer Repopulation mit vital gefärbter Mikroglia getestet. Einerseits wurde Mikroglia entweder aus den Resten des Gehirns derselben Ratte (autolog) oder kumuliert aus den Resten aller verbliebenen Rattengehirnüberreste (heterolog) isoliert, vitalgefärbt (PKH26) und entweder in Form einer Zellsuspension auf die Rattenhirnschnitte aufgebracht oder in Form eines Mikroglia-Sphäroids analog zum auf Agarose generierten Tumorsphäroid in der Nähe des Tumorsphäroids auf den OBSC platziert.

Beim Aufbringen der Mikrogliazellsuspension waren die mikroglialen Zellen in Interaktion zu den Glioblastomzelllinienzellen *ex vivo* in räumlicher Interaktion (s. Abbildung 17).

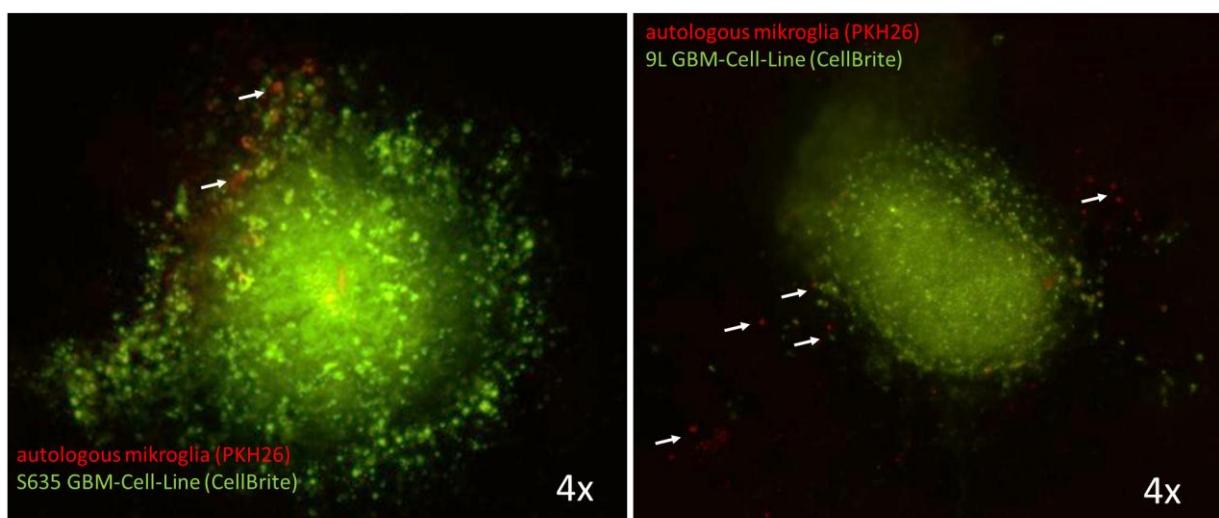


Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopie des Sphäroids im OBSC mit gleichzeitiger Darstellung vitalgefärbter und re-populierter Mikroglia. Nachweis des vitalgefärbten Tumorsphäroids (CellBrite, grün) und mit PKH26 vitalgefärbter Mikrogliazellen (rot, mit weißen Pfeilen markiert) in örtlicher Interaktion nach Wiederaufbringen auf den Mikroglia-depletierten OBSC in 4-facher Vergrößerung im intakten OBSC.

Technisch bedingt zeigten sich die Mikrogliasphäroide nach Inokulation auf dem OBSC mehr oder weniger distant zum Tumorsphäroid, so dass mehr oder weniger bis keine Interaktion bei begrenzter gezielter Migrationsfähigkeit der Mikrogliazellen zu erwarten war. In einer kleinen Serie zeigte sich tendenziell ein verringertes Auswachsen des Tumorsphäroids bei örtlicher

Nähe des Mikrogliasphäroids und ein höheres Auswachsen bei sehr distant aufgebrachten Mikrogliasphäroiden (s. Abbildung 18).

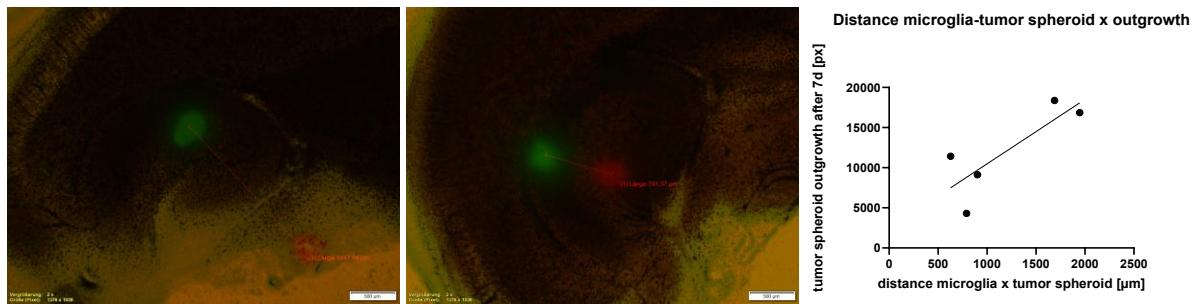


Abbildung 18: Darstellung der vitalgefärbten Zelllinien- und mikroglialen Sphäroide. Links und Mitte: Zellliniensphäroid (grün) und Mikrogliasphäroid (rot) in unterschiedlichem Abstand zueinander. Rechts: Das Auswachsverhalten zeigte sich tendenziell erhöht bei sehr distant aufgebrachten Mikrogliasphäroiden. Bei sehr niedriger Fallzahl ergibt sich im zweiseitigen Spearman-Korrelationstest ein Spearman's $\rho = 0,6000$ ($p = 0,3500$).

Der Ansatz der Mikroglia-Depletion mit anschließender Re-Population wurde im Rahmen dieser Dissertation nicht weiterverfolgt, da es fragestellungsbezogen keinen Mehrwert bei gleichzeitig höherer Artefaktanfälligkeit erbrachte. Es könnte aber im Zusammenhang mit einer zwischenzeitlichen Behandlung der mikroglialen Zellen für zukünftige Untersuchungen und Fragestellungen durchaus interessant sein.

d) Effekte von Mikroglia auf das Auswachsen des Tumorsphäroids

Die Ratten-Glioblastom-Zelllinien S635 und 9L sowie die Kontroll-Astrozyten wurden einer vitalen Fluoreszenzfärbung unterzogen, bevor sie als sphäroidales Konglomerat auf organotypische Hirnschnitt-Kokulturen (OBSC) von Ratten aufgebracht wurden, die mit dem CSF1-Rezeptor-Antagonisten PLX5622 (zur Mikroglia-Depletion) vorbehandelt oder als Kontrolle mit PBS behandelt wurden (native OBSC-Bedingung) [232]. PLX5622 führt zu einer sehr spezifischen Mikroglia-Depletion mit geringen Auswirkungen auf andere Zellen auf den OBSC [233]. Das Wachstum von Sphäroiden wurde mit Hilfe einer Fluoreszenzflächenmessung mittels digitaler Intensitätsschwellenwerte in den OBSC der Ratte nach sieben Tagen bestimmt.

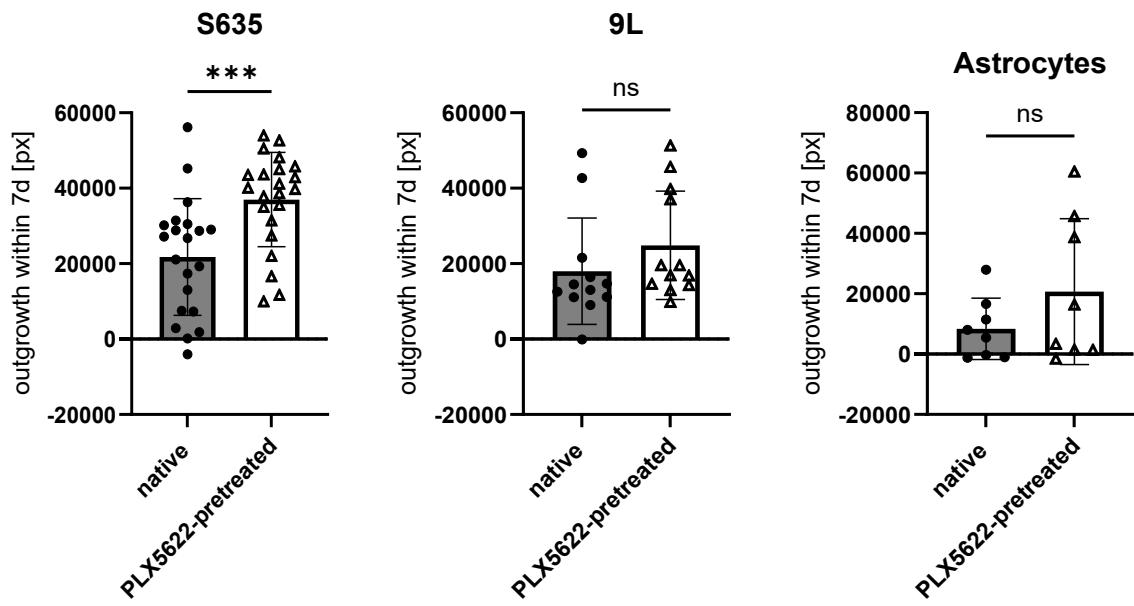


Abbildung 19: Auswirkungen auf das Sphäroidauswachsen durch mikrogliale Depletion. Vergleich des Sphäroidwachstums von S635-, 9L und Ratten-Astrozyten unter nativen OBSC-Bedingungen und unter PLX5622-behandelten Bedingungen ohne jegliche andere Behandlung. Das Sphäroidwachstum war bei der S635-Zelllinie unter den nativen OBSC-Bedingungen signifikant reduziert (ungepaarter t-Test, $p=0,0010$). Bei der 9L-Zelllinie (ungepaarter t-Test, $p=0,2498$) und Astrozyten-Kontrollzelllinie (ungepaarter t-Test, $p=0,4242$) war kein Unterschied zwischen den beiden Bedingungen feststellbar.

Bei der S635-Zelllinie war das Wachstum unter den mit PLX5622 vorbehandelten OBSC-Bedingungen signifikant erhöht, während in der 9L-Zelllinie und der Astrozyten-Kontrollzelllinie kein Unterschied zwischen den beiden Bedingungen feststellbar war (s. Abbildung 19).

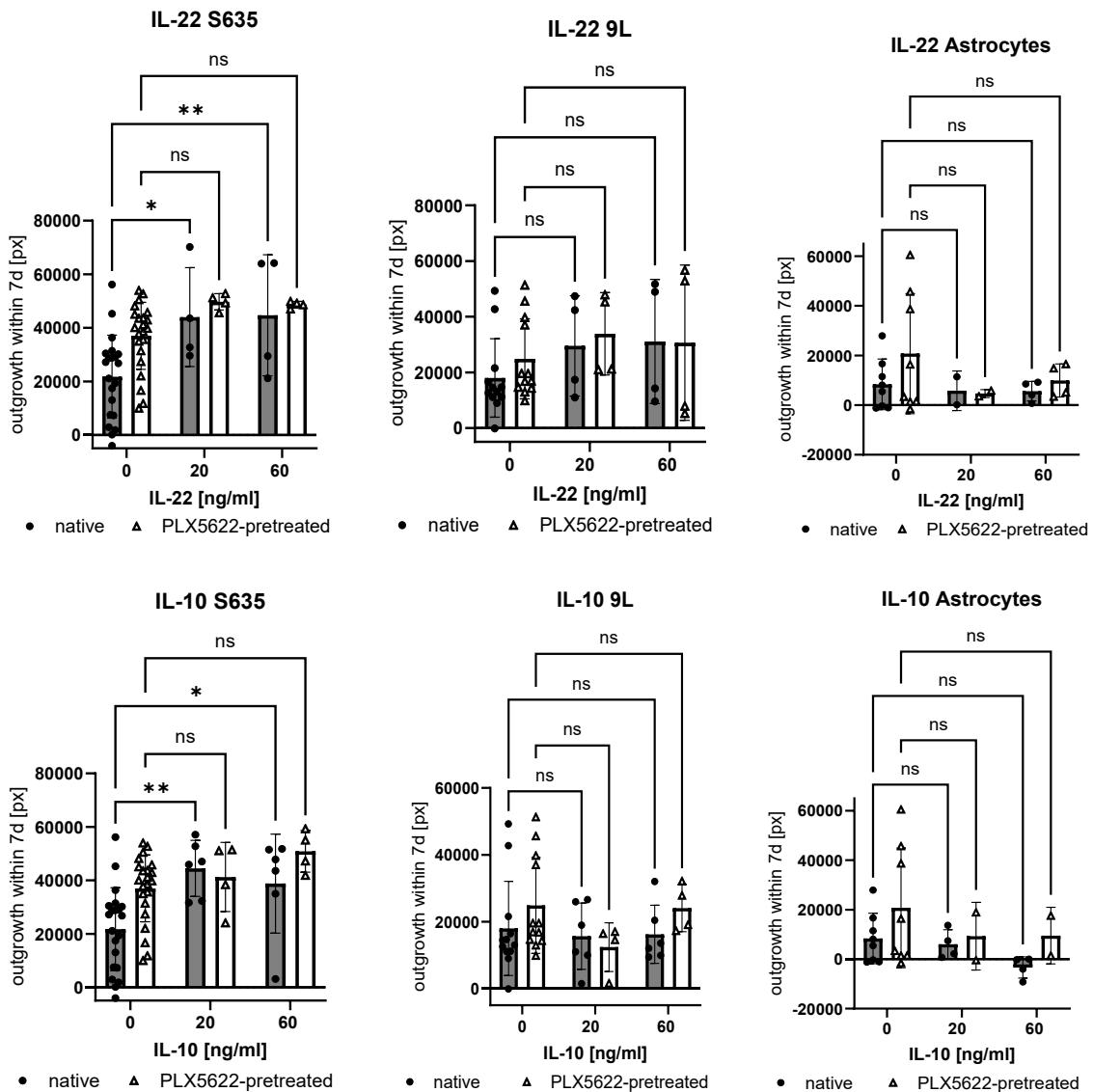


Abbildung 20: Ergebnisse des Auswachsverhaltens der drei Zelllinien abhängig von PLX5622-Vorbehandlung und Behandlung mit IL-22 (pro-inflammatorisch) oder IL-10 (anti-inflammatorisch). Beim Vergleich des Auswuchsverhaltens auf Mikroglia nativen und PLX5622-vorbehandelten OBSC zeigte sich bei Behandlung mit IL-22 ein Effekt für die S635 Zelllinie bei Mikroglia nativer Kondition (zweifaktorielle ANOVA, Interaktion $p=0,4594$; Faktor IL-22 $p=0,0005$, Faktor PLX5622-Behandlung $p=0,0988$; bei Dunnett's Mehrfachvergleichen 0 vs. 20 ng/ml $p=0,0115$, 0 vs. 60 ng/ml $p=0,0090$). Bei Behandlung mit IL-10 bei S635 in der Mikroglia nativen Kondition: zweifaktorielle ANOVA, Interaktion $p=0,1875$, Faktor IL-10 $p=0,0016$, Faktor IL-10 $p=0,0772$ (Dunnett's Mehrfachvergleiche: 0 vs. 20 ng/ml $p=0,0017$ und 0 vs. 60 ng/ml $p=0,0207$).

Aufgrund des im Vorversuch aufgefallenen vermehrten Auswachsens des Zellsphäroids im *ex vivo* OBSC-Modell durch die Behandlung mit Interleukin-22 wurde zur Untersuchung dieses Effekts IL-22 auf Mikroglia nativen und PLX5622-vorbehandelten OBSC angewendet. Hier zeigten sich die Effekte

wiederum nur für die expansivere S635 Zelllinie, und zwar im Sinne von vermehrtem Auswachsen in beiden angewandten Konzentrationen (20 ng/ml und 60 ng/ml) im Mikroglia nativen OBSC, wohingegen kein Effekt in der PLX5622-vorbehandelten Kondition zu beobachten war. An sich ist IL-22 ein pro-inflammatorisches Zytokin, das bei Defizienz zu einer reduzierten Aktivierung von mikroglialen und astrozytären Zellen bei Infektionsgeschehen führen kann [234], wobei gleichzeitig ein immunsuppressiver Effekt auf Makrophagen beschrieben wurde [235], was auf eine kontext-abhängige komplexe Rolle im Tumor und bereits in unserem reduzierten Modell vermuten lässt. Darüber hinaus wurde IL-10 als immunsuppressives Interleukin eingesetzt, welches bei Mikroglia einen immunsuppressiven M2-Phänotyp induzieren kann [236]. Hier zeigte sich ebenso ein gesteigertes Auswuchsverhalten im Mikroglia nativen OBSC unter IL-10-Behandlung für die S635 Zelllinie, jedoch keine Effekte bei PLX5622-Vorbehandlung bzw. auf die anderen beiden Zelllinien (s. Abbildung 20).

2. Effekte der Dexamethasonbehandlung der OBSC (Mikroglia nativ und mikroglia-depletiert)

Die in unserer Untersuchung verwendete Dexamethason-Dosis von 0,1 µg/ml wurde anhand der humanpharmakokinetischen Spitzenplasmakonzentrationen festgelegt, die zwischen 8,4+/- 3,6 µg/l/1mg Dosis (nach Czock et al. 2005) bei etablierten klinischen Dosen bei GBM-Patienten im Bereich von 8-16 mg liegen [237]. Außerdem fügten wir eine übermäßige Dexamethason-Dosis von 1 µg/ml hinzu. Die Dosis wurde also unabhängig von den Eigenschaften der Zelllinien festgelegt, sondern begründen sich in vorbeschriebenen im klinischen Setting erreichten Plasmakonzentrationen.

a) Dexamethason *in vitro*: Sphäroidmigrationsassay

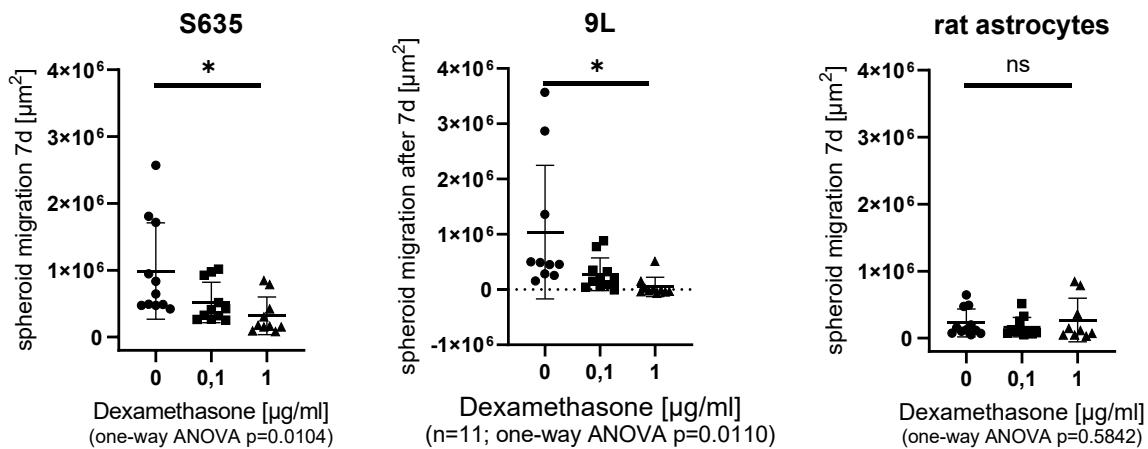


Abbildung 21: Darstellung der Auswirkungen von Dexamethasongabe auf die Migration im Sphäroidmigrationsassay. Die Migration von Sphäroiden auf Plastik war bei den mit Dexamethason

behandelten S635- (einfaktorielle ANOVA, $p=0,0104$) und 9L-Zelllinien (einfaktorielle ANOVA, $p=0,0110$) in Abhängigkeit von der Konzentration signifikant reduziert. Für die allgemein geringe astrozytäre Migration auf Plastik wurde kein Effekt festgestellt (einseitige ANOVA, $p=0,5842$).

Um die direkte Wirkung von Dexamethason auf die isolierten Ratten-GBM-Zellen *in vitro* zu untersuchen, führten wir zunächst einen *in vitro* Sphäroid-Migrationstest mit verschiedenen Konzentrationen von Dexamethason ($0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) durch und maßen die Zunahme der zellbedeckten Fläche innerhalb von sieben Tagen. Die Sphäroidmigration auf Plastik war bei der mit Dexamethason behandelten S635- und 9L-Zelllinie konzentrationsabhängig deutlich reduziert (s. Abbildung 21).

b) ATP-Assay

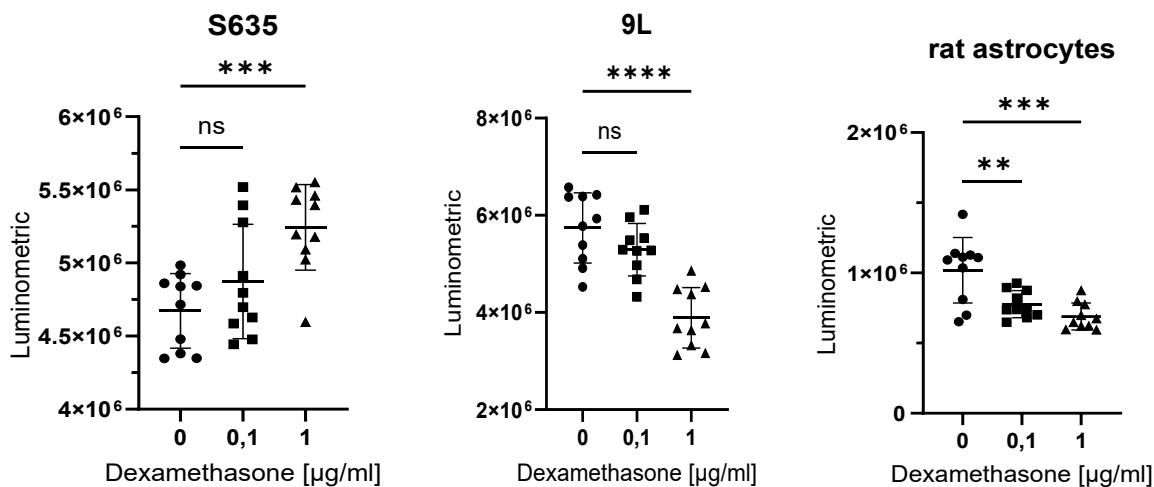


Abbildung 22: Luminometrisch bestimmte ATP-Menge nach Zugabe zweier Dexamethasondosen ($0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) zu den kultivierten Zelllinien. S635: Effekt durch Dexamethasongabe, einfaktorielle ANOVA, $p=0,0016$. Dunnett's Mehrfachvergleiche zeigen keinen Effekt bei $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Dexamethason im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,2842$), jedoch eine signifikante Zunahme in der Behandlung mit $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Dexamethason ($p=0,0008$). 9L: Signifikanter Effekt durch Dexamethasongabe, einfaktorielle ANOVA, $p<0,0001$. Signifikante Abnahme in der überhöhten Konzentration (Dunnett's Mehrfachvergleich, adjustiertes $p<0,0001$). Astrozyten: Signifikante Veränderung durch den Faktor Dexamethason (einfaktorielle ANOVA, $p=0,0002$). Nach Dunnett's Mehrfachvergleichstest zeigt sich eine signifikante Abnahme bereits durch $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Dexamethason (adjustiertes $p=0,0033$), und durch $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Dexamethason (adjustiertes $p=0,0001$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Um die Dexamethason-abhängige Zelllinienviabilität zu überprüfen, führten wir einen ATP-Assay durch. Hier wurde für S635 durch die überhöhte Dexamethasondosis eine zunehmende ATP-Menge festgestellt, also eine gesteigerte Viabilität. Die überhöhte Dexamethasonkonzentration führte bei 9L zu einer signifikant abnehmenden ATP-Menge und somit zu verringrigerter Zellviabilität. Bei der mitgeführten Ratten-Astrozytenzelllinie zeigte sich eine signifikante Abnahme der ATP-Menge und somit der Zellviabilität bereits in der 0,1 µg/ml Dosierung und entsprechend auch in der 1 µg/ml Dosierung (s. Abbildung 22).

c) Dexamethasoneffekte im OBSC auf das Sphäroid-Auswachsen (S635, 9L, Astrozyten)

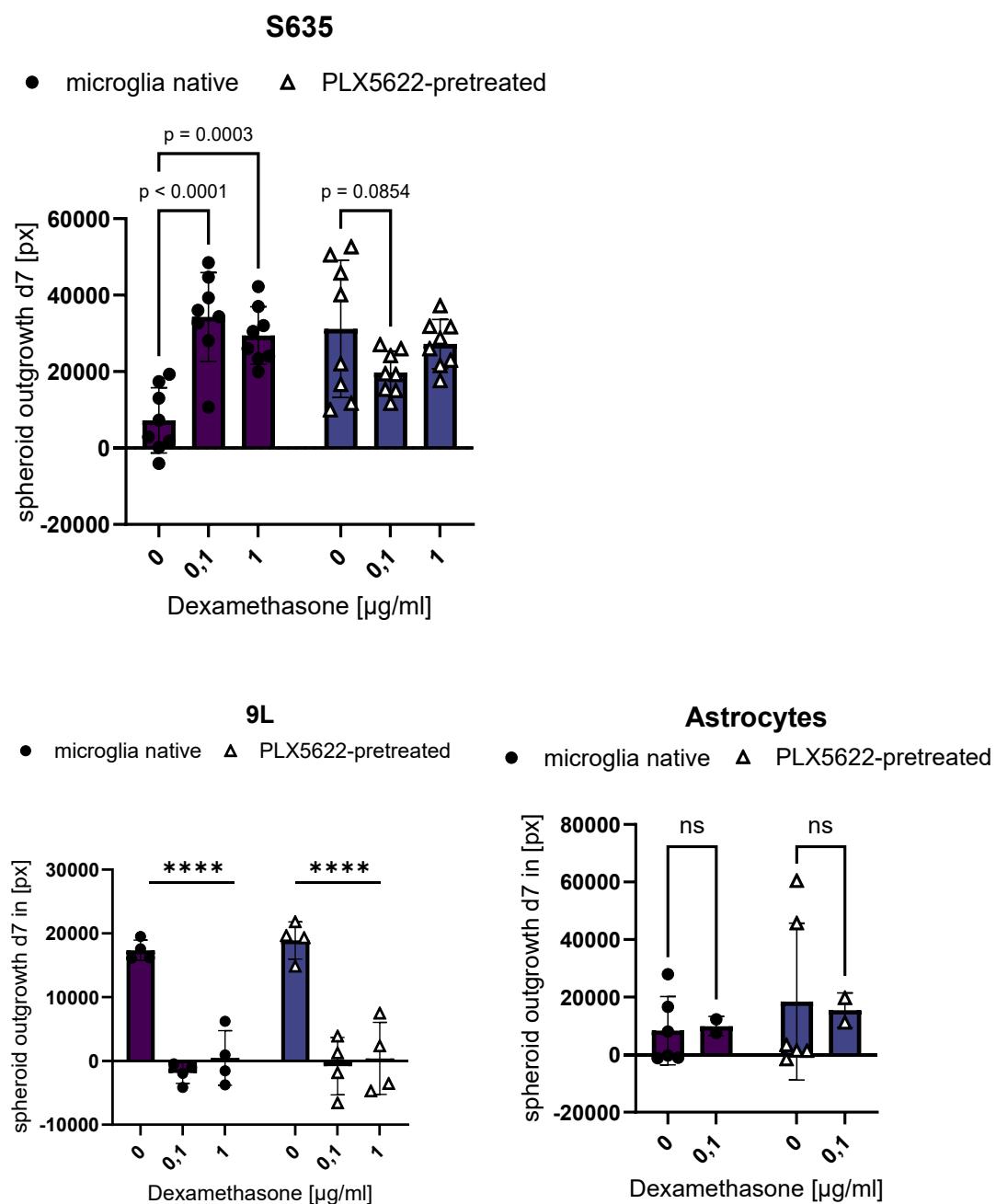


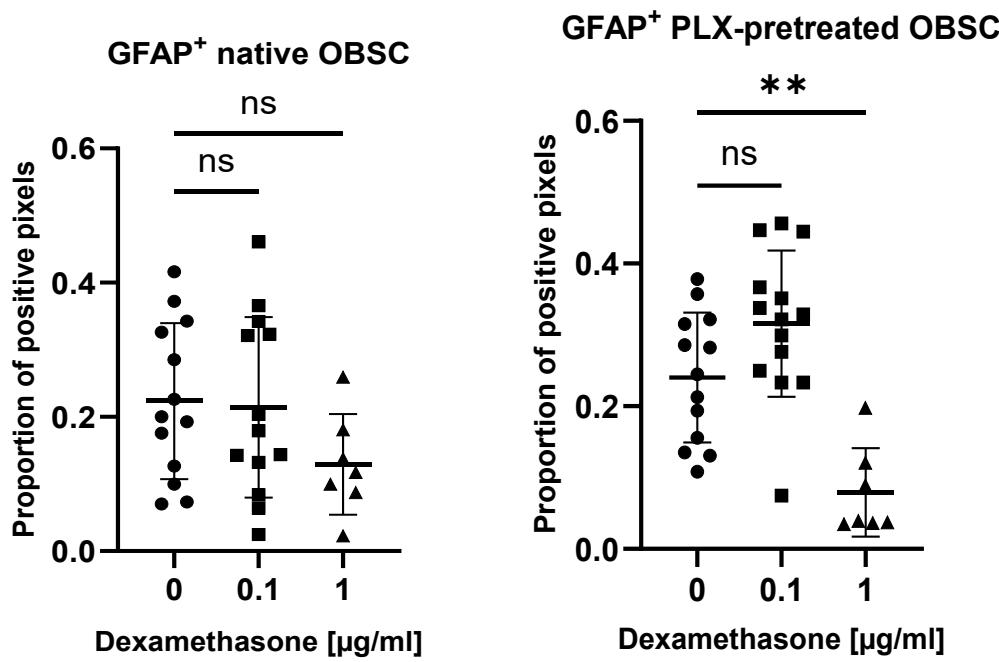
Abbildung 23: Darstellung der Effekte von Dexamethason auf das Auswachsen der Zellliniensphäroide in Abhängigkeit von PLX5622-Vorbehandlung auf den OBSC. In OBSC führte bei der S635 Zelllinie die Dexamethason-Behandlung zu einem signifikant verstärkten Wachstum in der Mikroglia nativen Gruppe mit 0,1 (Tukey's multiple comparisons test $p<0,0001$) und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p=0,0003$) Dexamethason (zweifaktorielle ANOVA, Effekt für Interaktion $p<0,0001$, Effekt für Dexamethason $p=0,0378$, kein Effekt für PLX5622-Behandlung $p=0,4326$), während in der mit PLX5622 vorbehandelten Bedingung nur eine tendenziell tumorwachstumsemmende Wirkung von Dexamethason 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nachweisbar war (Tukey's multiple comparisons test, $p=0,0854$). Für die 9L Zelllinie zeigte sich unter Dexamethasonbehandlung ein anti-9L-Effekt, der sogar zu einem signifikanten Rückgang der Sphäroidausbreitung über die Zeit führte (zweifaktorielle ANOVA, Effekt für Dexamethason $p<0,0001$).

Bei den OBSC führte die Dexamethason-Behandlung auch zu einem signifikant verstärkten S635-Auswachsen in der nativen Mikrogliabedingung, sowohl für 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, als auch für 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dexamethason, während sich in der mit PLX5622 vorbehandelten Bedingung ein tendenziell wachstumsemmender Effekt von Dexamethason 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zeigte (s. *Abbildung 23*). Der *in vitro* beobachtete anti-migratorische Effekt von Dexamethason auf S635 (Sphäroidmigrationsassay) bei erhöhter Viabilität (ATP-Assay) resultiert im *ex vivo* Ansatz nichtsdestotrotz in erhöhtem Sphäroidauswachsen durch Dexamethason im Mikroglia nativen Ansatz, was wiederum auf die relevanten pleiotropen und indirekten Effekte von Dexamethason, vermittelt über die Mikroumgebung, hinweist.

Die bei den *in vitro* Versuchen beobachteten Effekte auf die 9L Zelllinie mit deutlich reduzierter Migration (Sphäroidmigrationsassay) und anti-9L-Wirkung im Sinne einer abnehmenden Vitalität (ATP-Assay) durch Dexamethason resultierten auf den Ratten-OBSC in einem ausbleibenden, teils über die Zeit abnehmenden Sphäroidausmaß (bei gemessener Differenz aus Tag 0 und Tag 7 als negativer Wert in der Darstellung) sowohl für die nativen als auch die PLX5622-vorbehandelten Schnitte. Dies war bei 0,1 und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu beobachten und entspricht der im ATP-Assay nachvollziehbaren Abnahme der Viabilität und der verminderten Migration *in vitro* durch die Dexamethasonbehandlung. Bei ausgesprochener Dexamethason-empfindlichkeit mit entsprechender anti-9L Wirkung durch Dexamethason musste für die weiteren Untersuchungen bezüglich der Wirkungen von Dexamethason auf den Einschluss der 9L Zelllinie verzichtet werden (s. *Abbildung 23*).

Die Ratten Astrozyten-Sphäroide zeigten keine signifikanten Unterschiede im Auswachsen durch die PLX5622-Behandlung oder die Gabe von Dexamethason bei niedriger Fallzahl (s. Abbildung 23).

d) Dexamethasoneffekte auf die astrozytären und mikroglialen Kompartimente im OBSC
Bei verminderter Viabilität der Ratten-Astrozyten-Zelllinie im ATP-Assay untersuchten wir den Einfluss von Dexamethason auf den OBSC selbst, insbesondere auf das astrogliale Kompartiment, da ein Dexamethason-bedingter Zellniedergang nicht auszuschließen war. Die bei -80°C archivierten OBSC wurden kryosektioniert und GFAP-immunfluoreszenzgefärbt.
Bei der Dexamethason-Behandlung wurde in beiden Bedingungen (nativ und PLX5622-behandelt) kein Unterschied in der GFAP⁺-Immunfluoreszenz zwischen 0 µg/ml Dexamethason und 0,1 µg/ml Dexamethason-Behandlung festgestellt. Die überhöhte Konzentration von 1 µg/ml führte jedoch zu einem signifikant verminderten GFAP-Fluoreszenzsignal in PLX5622-behandelten Schnitten und einem tendenziell verringerten Signal in nativen OBSC (s. Abbildung 24).



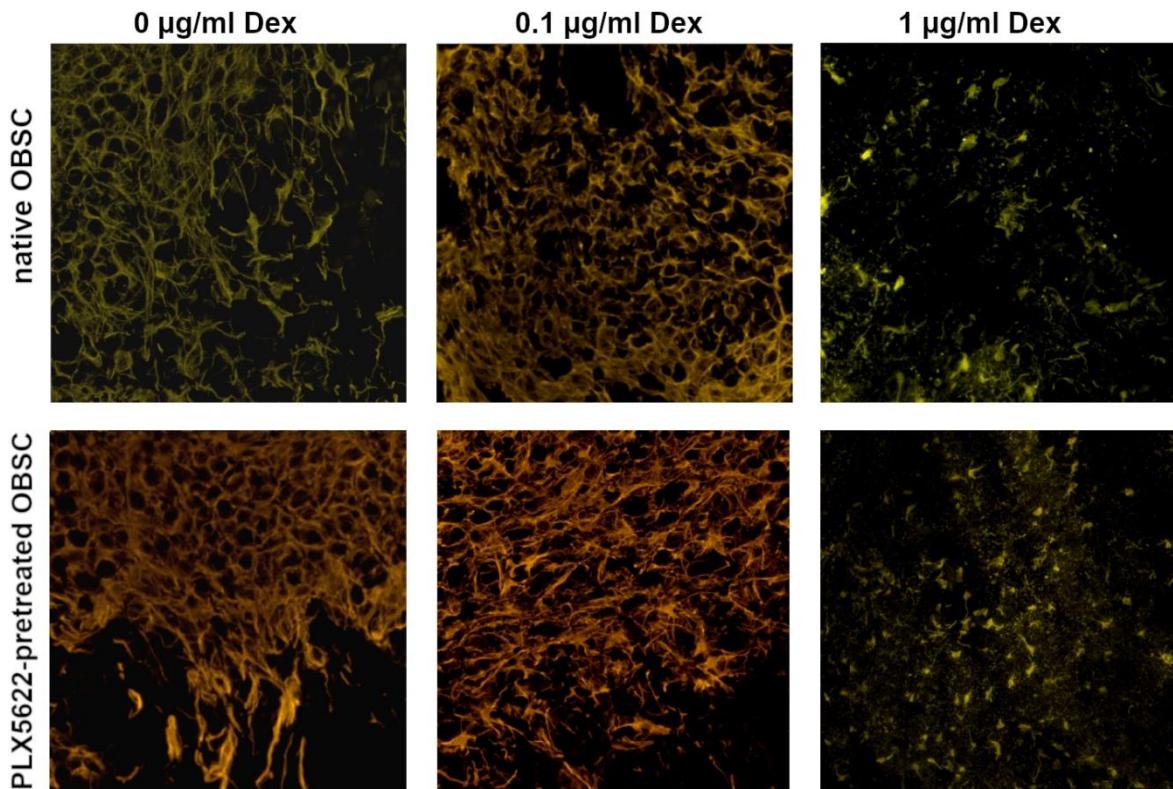


Abbildung 24: GFAP-Positivität im OBSC unter Dexamethasonbehandlung. Oben: Anteil der GFAP⁺-Pixel in nativen OBSC mit Sphäroid (links) und PLX5622-behandelten OBSC an Tag 6 (rechts) nach Dexamethason-Behandlung. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht mit Dexamethason behandelten, den mit 0,1 µg/ml und den mit 1 µg/ml Dexamethason behandelten Schnitten feststellbar (einfaktorielle ANOVA, $p=0,2117$). Für PLX5622-vorbehandelte Schnitte zeigte sich in der einfaktoriellen ANOVA ein signifikanter Effekt ($p<0,0001$). Dunnett's Test für Mehrfachvergleiche ergab hier keinen Unterschied zwischen 0 und 0,1 µg/ml Dexamethason ($p=0,0727$) jedoch ein signifikantes Abfallen der GFAP-positiven Zellen bei 1 µg/ml Dexamethason ($p=0,0014$). Unten: Beispielbilder von GFAP-gefärbten Schnitten. Nur die übermäßige Dexamethason-Konzentration von 1 µg/ml führt zu einer signifikanten astrogialen Degeneration.

3. Identifikation differentieller Zytokinsekretion auf dem Rattenhirnschnittmodell

abhängig von Mikroglia-Depletion und Dexamethasonbehandlung

a) Proteom Profiler

Zur Identifikation differentieller immunologischer Signalkaskaden in den beiden Bedingungen (native OBSC vs. PLX5622-behandelt) in Kombination mit Dexamethason bzw. dem anti-inflammatorischen Interleukin-10 wurden die Überstände (entnommen an Tag 3 und Tag 6) von vier verschiedenen Replikaten jeder Bedingung gepoolt und mit einem semi-quantitativen,

membranbasierten Proteom-Profiler (R&D Systems) untersucht. Wir haben OBSC ohne GBM-Zellsphäroide als Kontrollen in unsere Analyse einbezogen.

Wir konnten einen allgemeinen Hintergrund aus dem Serum, den Supplementen und anderen Bestandteilen des Kulturmediums beobachten, waren aber dennoch in der Lage, differentielle Signale zu erkennen: für MMP-3 sahen wir z. B. kein Signal in den Kontroll-OBSC ohne GBM-Sphäroid, allerdings ein gutes Signal in den Bedingungen mit GBM-Sphäroid, was darauf hinweist, dass das Screening trotz des vorhandenen Hintergrunds schlüssige Ergebnisse für bestimmte differenzielle Zytokinkonzentrationen lieferte (s. *Abbildung 25*).

Beim Vergleich der jeweiligen Bedingungen miteinander fanden wir eine Sphäroid-, PLX5622-Behandlungs-, Dexamethason- und IL-10-abhängige Sekretion für CXCL2 und ein > 3-fach höheres Signal in der nativen OBSC-Bedingung mit vorhandenem Sphäroid im Vergleich zur nativen OBSC-Bedingung ohne Sphäroid, was auf eine potenziell wichtige Rolle bei der Interaktion des Sphäroids mit dem TiME in unserem Modell hinweist, so dass wir die Rolle der CXCL2-CXCR2-Achse in unserem Modell weiter untersuchten und quantifizierten.

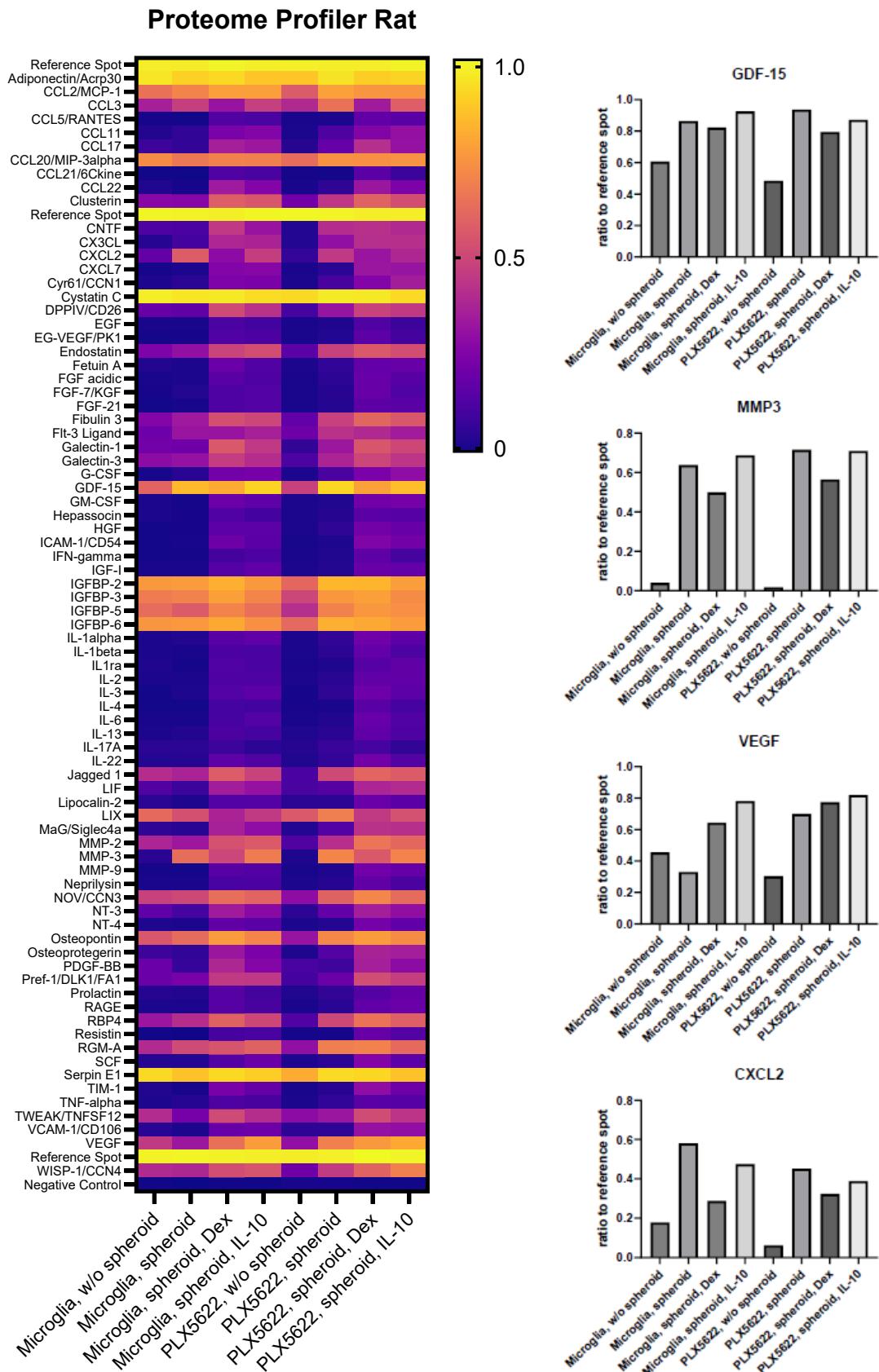


Abbildung 25: Heatmap des membranbasierten Ratten-Zytokin Proteom-Profilers (XL Rat Cytokine, R&D Systems): gepoolte Proben aus Überständen von zwei Zeitpunkten und vier

verschiedenen Replikaten (Pool aus n=8 Überständen pro Kondition). Beispielhaft zeigt MMP3 ein eindeutiges Signal, das von der Anwesenheit des Sphäroids herrührt. CXCL2 zeigt Sphäroid- (fast keine), PLX5622-Behandlungs- (am höchsten in nativen OBSC) und Dexamethason-abhängige (mittlere) Konzentrationen sowie IL-10 (höhere Konzentration als mit Dexamethason), was auf eine potenziell differentielle Rolle der CXCL2-Achse beim Sphäroidwachstum in unserem Modell hinweist. *Rechts* ist beispielhaft eine Auswahl der densitometrischen Signalintensitäten bezogen auf den Referenz-Spot von vier differentiell exprimierten Proteinen (GDF-15, MMP3, VEGF und CXCL2) aufgetragen.

b) Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) zur Quantifizierung von CXCL2 in den Überständen

Um unsere semiquantitative Beobachtung weiter zu untersuchen, führten wir einen Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) durch, um die CXCL2-Konzentrationen in den Überständen pro OBSC und Zeitpunkt (Tag 0 = Ausgangswert nach Auswaschen der PLX5622-Vorbehandlung, Tag 3 und Tag 6) quantitativ zu überprüfen.

Betrachtet man alle CXCL2-Konzentrationen in den Überständen der einzelnen Zeiträume unabhängig von ihrer Behandlung in OBSC mit Sphäroid, so findet man einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden OBSC-Bedingungen (native OBSC vs. PLX5622-behandelt), der zeigt, dass die PLX5622-Behandlung eine generelle Reduktion der CXCL2-Sekretion bewirkt. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist im zweiten Teil des Beobachtungszeitraums (Überstand von Tag 6) jedoch deutlich weniger ausgeprägt bei insgesamt zurückgehender CXCL2-Sekretion (s. *Abbildung 26*).

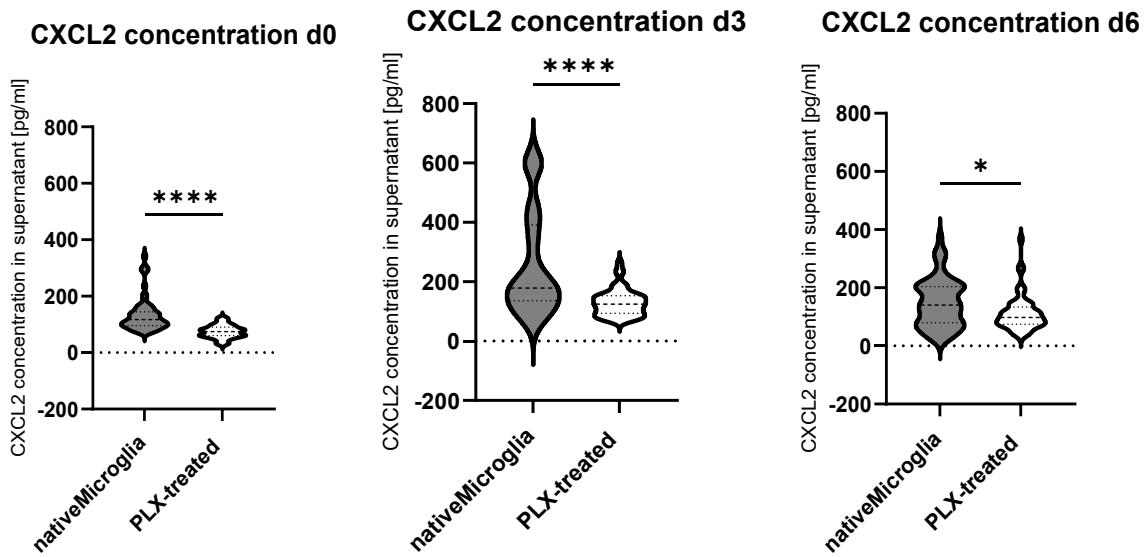
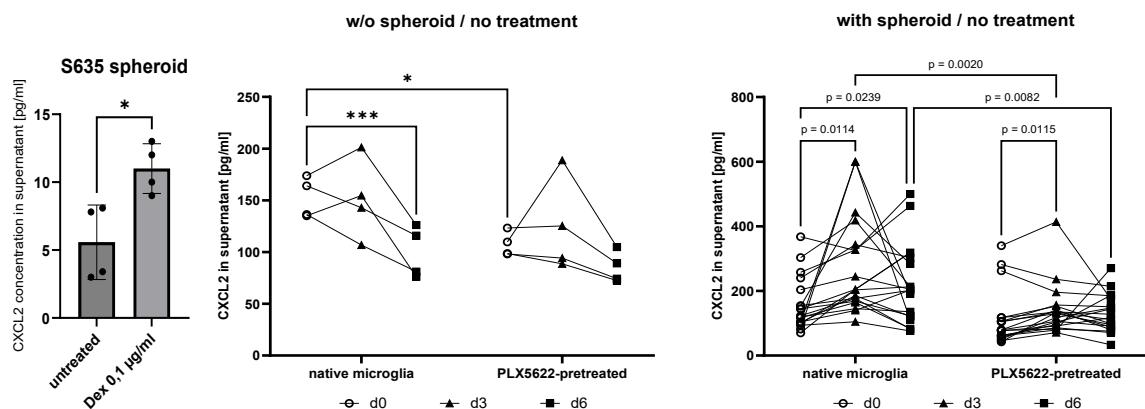


Abbildung 26: CXCL2-Konzentrationen aller untersuchten Überstände im Vergleich von Mikroglia nativen und PLX5622-vorbehandelten OBSC. Violin plot, n=58 Werte pro Kondition. Vergleich der Konzentrationen von CXCL2 in allen OBSC-Überständen mit und ohne Mikroglia unabhängig von sonstiger Behandlung. *Links:* ungepaarter t-test, p<0,0001; *Mitte:* ungepaarter t-test, p<0,0001; *Rechts:* ungepaarter t-test, p=0,0103.

Um die Sekretion von CXCL2 durch die S635 Zelllinie zu untersuchen, wurden Überstände von isolierten GBM-Zelllinien-Sphäroiden untersucht, die über einen längeren Zeitraum (7 Tage) in einem Zehntel des Volumens im Vergleich zum OBSC-Kulturmedium auf Kunststoff kultiviert wurden. Insgesamt zeigte sich eine sehr niedrige CXCL2-Basissekretion im Überstand (bis zu 13 ng/ml) (s. Abbildung 27).



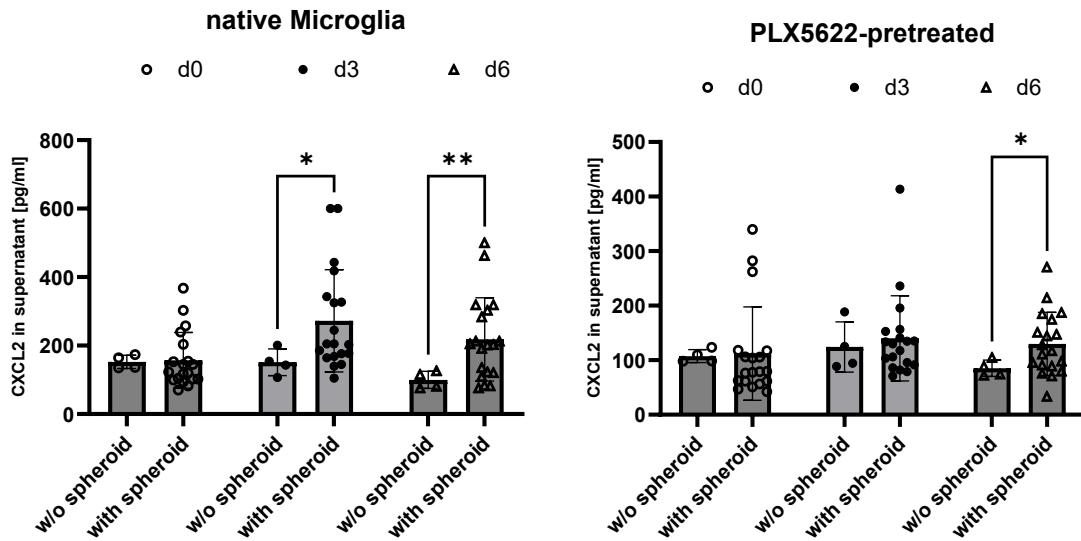


Abbildung 27: CXCL2-Konzentrationen in den Überständen Tag 0, Tag 3 und Tag 6 von Mikroglia nativen und PLX5622-vorbehandelten OBSC ohne und mit aufgebrachtem Zellliniensphäroid. *Oben links:* Baseline CXCL2-Sekretion von S635 Zellen. Dexamethason führt zu einer signifikant höheren CXCL2-Konzentration im Überstand (ungepaarter t-test, $p=0,167$) bei jedoch sehr niedrigen Konzentrationen bei 10-fach niedrigerem Überstandvolumen. *Oben mittig:* Baseline CXCL2-Sekretion von OBSC ohne Sphäroide (mit und ohne PLX5622-Vorbehandlung). Zweifaktorielle ANOVA, Effekt für Zeit $p=0,0105$; adjustierte p-Werte für Tukey's Mehrfachvergleiche: Mikroglia nativ, Tag 0 vs. Tag 3 $p=0,0007$ und Tag 0, Mikroglia nativ vs. PLX5622-vorbehandelt $p=0,0116$. *Oben rechts:* Baseline CXCL2-Sekretion von OBSC mit Sphäroid ohne sonstige Behandlung (mit und ohne PLX5622-Vorbehandlung). Zweifaktorielle ANOVA, Effekte für PLX5622 ($p=0,0011$) und Zeit ($p=0,0020$); signifikante adjustierte p-Werte für Tukey's Mehrfachvergleiche in Klammern abgebildet. *Unten links:* Direkte Gegenüberstellung der Mikroglia nativen OBSC mit und ohne Sphäroid (ohne sonstige Behandlung). Šídák's Mehrfachvergleich, ohne vs. mit Sphäroid an Tag 3 adjustierter $p=0,0184$ und an Tag 6 adjustierter $p=0,0026$. *Unten rechts:* Direkte Gegenüberstellung der PLX5622-vorbehandelten OBSC mit und ohne Sphäroid (ohne sonstige Behandlung). Šídák's Mehrfachvergleich, ohne vs. mit Sphäroid an Tag 3 adjustierter $p=0,0256$.

Betrachtet man die CXCL2-Sekretion des OBSC ohne Sphäroid über die Zeit, so zeigt sich für Mikroglia native OBSC eine stabile CXCL2 Sekretion in die Überstände von Tag 0 und Tag 3, jedoch eine signifikante Abnahme im letzten Abschnitt des Experiments (Überstand an Tag 6). Der Unterschied in den Überständen an Tag 0 zwischen PLX5622 und Mikroglia nativen OBSC zeigt sich signifikant unterschiedlich mit weniger CXCL2 in PLX5622-vorbehandelten OBSC. Ein CSF-1R-bedingter Effekt möglicherweise auch auf andere Zellen ist hier nicht

auszuschließen, da dieser Unterschied an Tag 3 nicht mehr signifikant ist (s. *Abbildung 27*, oben mittig).

Betrachtet man die CXCL2-Konzentrationen in den Überständen von OBSC mit aufgebrachten Sphäroiden ohne sonstige Behandlung, so zeigt sich hier zunächst ein vergleichbarer Ausgangswert an Tag 0 (Mikroglia nativ vs. PLX5622-vorbehandelt). Das Aufbringen des Sphäroids an Tag 0 führt über drei Tage zu einem steigenden CXCL2-Gehalt im Überstand, und zwar in beiden Konditionen. Für Mikroglia native OBSC zeigt sich diese CXCL2-Erhöhung bis zum Ende des Versuchs an Tag 6. Für Tag 3 und Tag 6 zeigt sich durchweg eine erhöhte CXCL2-Konzentration für die Mikroglia nativen Schnitte im Vergleich zu den PLX5622-behan delten OBSC (s. *Abbildung 27*, oben rechts).

Im Vergleich von OBSC mit und ohne aufgebrachten Sphäroid zeigt sich für Mikroglia native OBSC ein signifikanter Unterschied an Tag 3 und Tag 6 mit höherer CXCL2-Konzentration im Überstand (s. *Abbildung 27*, unten links). Ein derartiger Effekt zeigt sich auch in PLX5622-vorbehandelten OBSC, jedoch nur für Tag 6 (s. *Abbildung 27*, unten rechts).

Durch die Darstellung der CXCL2-Konzentration des isolierten Zelllinien-Sphäroids, das 7 Tage lang auf Kunststoff kultiviert wurde, konnten wir zeigen, dass die Baseline CXCL2-Sekretion der S635 Zelllinie selbst vernachlässigbar ist (s. *Abbildung 27*, oben links). Auf der anderen Seite zeigen wir durch eine niedrigere CXCL2-Konzentration in den Überständen der OBSC ohne den S635-Zelllinien-Sphäroid (Baseline der OBSC selbst), dass die Interaktion des Sphäroids mit den OBSC zu einer erhöhten CXCL2-Sekretion führt.

Weiterhin quantifizierten wir die CXCL2-Konzentrationen aus den Überständen der OBSC mit Sphäroiden, die mit IL-22 (inflammatorisches Zytokin aus den Vorversuchen), mit Dexamethason (immunsuppressiv und als synthetisches Kortikosteroid mit pleiotropen Effekten [16]) sowie mit IL-10 (immunsuppressives Zytokin) behandelt wurden (s. *Abbildung 28*).

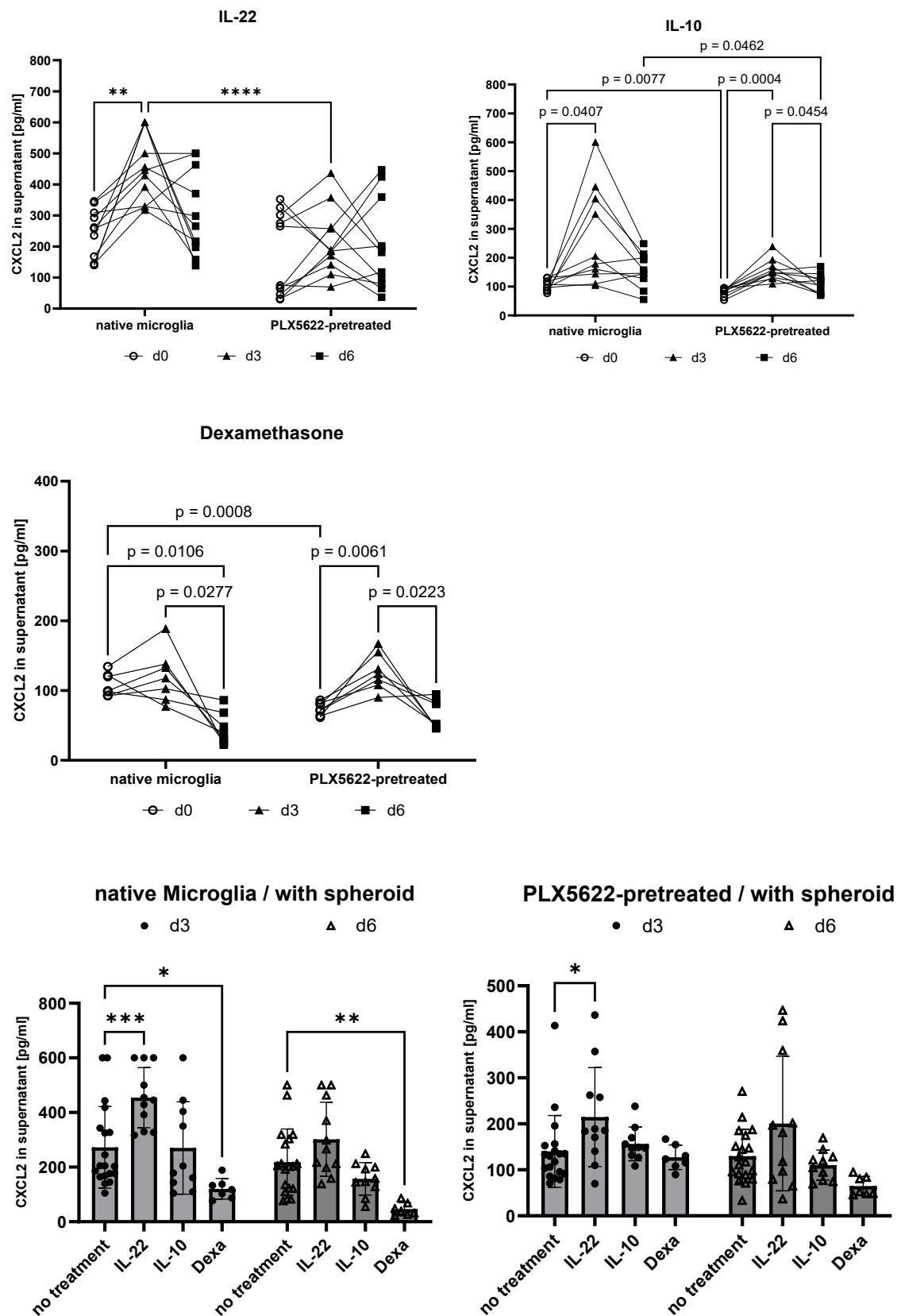


Abbildung 28: CXCL2-Konzentrationen in den Überständen Tag 0, Tag 3 und Tag 6 von Mikroglia nativen und PLX5622-vorbehandelten OBSC mit aufgebrachtem Zellliniensphäroid und Behandlung mit IL-22, IL-10 und Dexamethason. Oben links: Bei Behandlung mit IL-22 zeigen sich

in der zweifaktoriellen ANOVA Effekte für Zeitpunkt ($p=0,0021$), PLX5622-Vorbehandlung ($p=0,0018$) und deren Interaktion ($p=0,0182$). Tukey's Mehrfachvergleiche zeigen einen signifikanten Anstieg von CXCL2 in der Mikroglia nativen Kondition bei Tag 0 vs. Tag 3 (adjustiertes $p=0,0020$). Weiterhin zeigt sich ein signifikanter Unterschied, vergleicht man die Konditionen ‚Mikroglia nativ‘ vs. ‚PLX5622-vorbehandelt‘ an Tag 3 (adjustiertes $p<0,0001$). *Oben rechts:* Bei Behandlung mit IL-10 ergeben sich in der zweifaktoriellen ANOVA Effekte für Zeitpunkt ($p=0,0004$) und PLX5622-Vorbehandlung ($p=0,0146$). Tukey's Mehrfachvergleiche zeigen ein signifikantes Ansteigen von CXCL2 bei Tag 0 vs. Tag 3 für beide Konditionen, sowie ein Abfallen von CXCL2 in der PLX5622-vorbehandelten Kondition. Niedrigere CXCL2-Konzentrationen ergeben sich hier für PLX5622-Vorbehandlung an Tag 0 und Tag 6. *Mitte:* Bei Behandlung mit Dexamethason ergeben sich in der zweifaktoriellen ANOVA kein signifikanter Effekt für die Vorbehandlung ($p=0,5387$), jedoch signifikante Effekte für Zeitpunkt ($p<0,0001$) und die Interaktion Zeitpunkt x Vorbehandlung ($p=0,0402$). Tukey's Mehrfachvergleiche ergeben einen signifikanten Unterschied zwischen Mikroglia nativ und PLX5622-vorbehandelter Kondition an Tag 0 ($p=0,0008$); ein signifikanter Abfall der CXCL2-Konzentration an Tag 6 (Mikroglia nativ) und ein Anstieg in der PLX5622-Vorbehandlung an Tag 3 sowie ein erneuter Abfall an Tag 6 sind festzustellen (s. p-Werte in der Graphik). Insgesamt zeigen sich hier deutlich erniedrigte CXCL2-Konzentrationen. *Unten links:* Beim Vergleich der einzelnen Behandlungen innerhalb einer Kondition zeigen sich für ‚Mikroglia nativ‘ (links) signifikante Effekte in der zweifaktoriellen ANOVA für Behandlung ($p<0,0001$) und Zeitpunkt ($p=0,0003$). Es ergibt sich nach Dunnett's Mehrfachvergleich ein signifikant höheres CXCL2 im Überstand für IL-22 an Tag 3 ($p=0,0005$) im Vergleich zu nicht-behandelten OBSC, sowie eine signifikant niedrigere CXCL2-Konzentration für die Dexamethasonbehandlung an Tag 3 ($p=0,0171$) und Tag 6 ($p=0,0056$). *Unten rechts:* Bei PLX5622-Vorbehandlung zeigen sich in der zweifaktoriellen ANOVA entsprechend signifikante Effekte für Behandlung ($p=0,0024$) und Zeitpunkt ($p=0,0342$), wobei Dunnett's Mehrfachvergleich einen signifikanten Anstieg bei IL-22-Behandlung im Vergleich zur nicht-behandelten Gruppe zeigt ($p=0,0389$).

Die Auswirkungen des pro-inflammatorischen IL-22, des anti-inflammatorischen IL-10 und des mit pleiotropen Effekten wirkenden Dexamethason wurden hinsichtlich der CXCL2-Sekretion über die Zeit und in Abhängigkeit der Vorbehandlung mit PLX5622 genauer dargestellt.

Bei IL-22-Behandlung zeigt sich ein betonter Anstieg von Tag 0 auf Tag 3 in der Mikroglia nativen Kondition und entsprechend ein signifikanter Unterschied zwischen den PLX5622-vorbehandelten und Mikroglia nativen Konditionen. Diese zeitabhängigen Unterschiede zeigen sich ähnlich auch bei IL-10-behandelten Schnitten, wobei hier ein Anstieg an Tag 3 und erneuter Abfall an Tag 6 auch für die PLX5622-Vorbehandelten beobachtbar ist und insgesamt ein

Unterschied zwischen PLX5622-vorbehandelten und Mikroglia nativen Konditionen besteht, insbesondere an Tag 6.

In der Reihe mit Dexamethasonbehandlung zeigt sich für Mikroglia native OBSC kein Anstieg der CXCL2-Sekretion an Tag 3, jedoch ein deutliches Abfallen an Tag 6, was für eine mit Latenz auftretende CXCL2-Repression durch Dexamethason spricht. Nach PLX5622-Vorbehandlung zeigt sich mit Dexamethason ein Anstieg der CXCL2-Konzentration an Tag 3 und dann auch ein signifikanter Abfall an Tag 6. Statistisch ergibt sich in der zweifaktoriellen ANOVA kein Effekt für Vorbehandlung, was für eine komplette Repression mikroglialer Aktivität oder zumindest mikroglialer CXCL2-Sekretion durch Dexamethason sprechen könnte, da sich hier die Mikroglia-depletierte Kondition von der Mikroglia nativen Kondition nicht unterscheidet.

Im Direktvergleich von OBSC ohne sonstige Behandlung (mit und ohne PLX5622-Vorbehandlung und den einzelnen Behandlungen (IL-22, IL-10, Dexamethason) zeigen sich Unterschiede an Tag 3 in der Mikroglia nativen Kondition für IL-22 mit erhöhter CXCL2-Konzentration und an beiden Zeitpunkten für Dexamethason mit erniedrigter CXCL2-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Behandlung. In Mikroglia-depletierten OBSC zeigen sich insgesamt keine Unterschiede im Vergleich von Kontroll-OBSC ohne sonstige Behandlung und den einzelnen Behandlungen (IL-22, IL-10 und Dexamethason), lediglich an Tag 3 mit IL-22-Behandlung, so dass hier Mikroglia-unabhängig vermittelte CXCL2-Sekretion über Induktion mit dem pro-inflammatorischen IL-22 vermutet werden muss (s. *Abbildung 28*).

c) Effekte der CXCR2-Blockade und -Überstimulation im Kontext von Mikroglia-Depletion und Dexamethasonbehandlung auf das Auswachsen eines Rattenzelllinien-Sphäroids (S635) im OBSC

Um die Rolle der CXCL2-CXCR2-Achse in unserem Modell weiter zu untersuchen, blockierten wir den entsprechenden CXCL2-Rezeptor (CXCR2) mit zwei verschiedenen Inhibitoren (small molecules Danirixin und Navarixin) und durch ungerichtete Überstimulation mit rekombinantem CXCL2.

Um die direkten Auswirkungen der Hemmstoffe auf die isolierte GBM-Zelllinie S635 zu überprüfen, wurde ein Sphäroidmigrationsassay durchgeführt, bei dem die small molecules Danirixin und Navarixin sowie die Blockierung der ungerichteten CXCR2-Überstimulation

keine Auswirkungen auf die Migration zeigten; in Kombination mit Dexamethason wurde unter der Bedingung der CXCL2-Überstimulierung eine geringere Migration beobachtet (s. Abbildung 29).

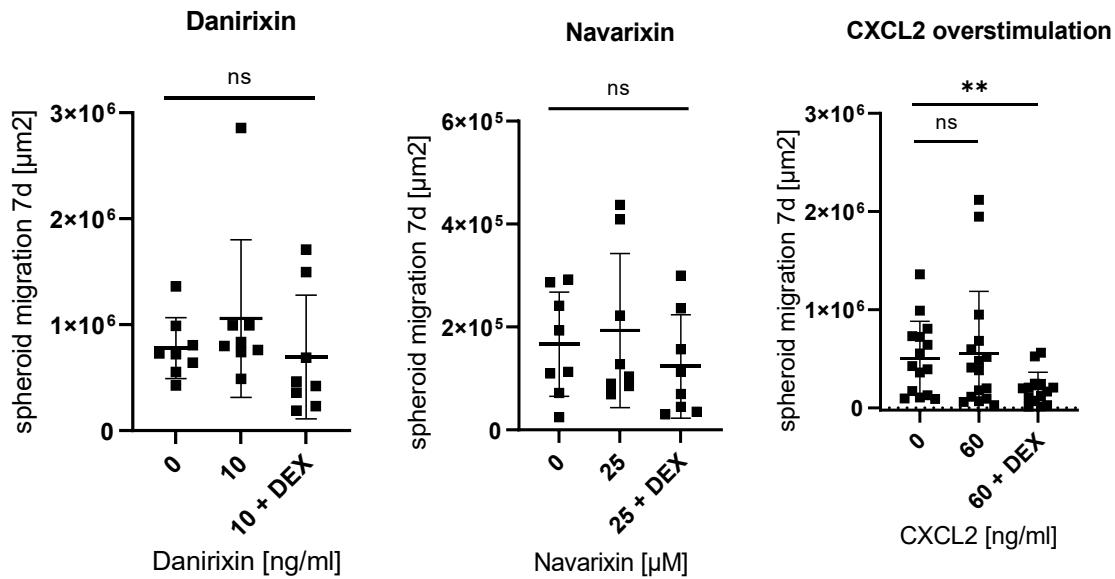


Abbildung 29: Ergebnisse des Sphäroidmigrationsassays (S635 Zelllinie) in Abhängigkeit von Danirixin, Navarixin und CXCL2 mit und ohne Dexamethason. Die Hemmung von CXCR2 zeigte keine signifikante Auswirkung auf die isolierte Zellmigration im Sphäroid-Migrationsassay. Bei einer CXCL2-Überstimulation in Kombination mit Dexamethason wurde eine signifikante Verringerung der Sphäroidmigration festgestellt (ungepaarter t-Test, p = 0,0082).

In unserem *ex vivo* OBSC-Modell induzierten die drei hemmenden Bedingungen ein verstärktes Auswachsen in der Mikroglia nativen Bedingung, was in Kombination mit Dexamethason sogar noch verstärkt wurde und somit einen tumorfördernden Effekt hervorrief. In der Mikroglia-depletierten Bedingung wurde keine Veränderungen des Wachstums mit CXCR2-Inhibition beobachtet, auch nicht in Kombination mit Dexamethason (s. Abbildung 30).

CXCR2-Inhibition +/- dexamethasone

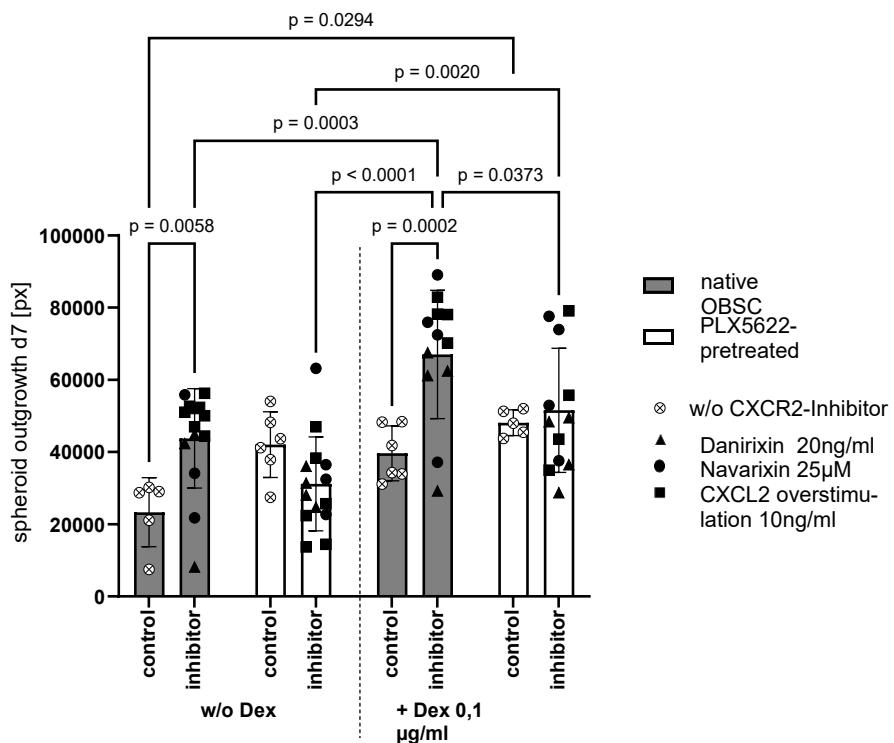


Abbildung 30: Darstellung des Sphäroidauswachsen (S635) in Abhängigkeit von CXCR2-Inhibition, PLX5622-Vorbehandlung +/- Dexamethasongabe. Zweifaktorielle ANOVA mit Effekten für Inhibitor/control ($p=0,0055$), PLX5622-Vorbehandlung+/-Dexamethason ($p=0,0002$) und deren Interaktion ($p=0,0008$); Tukey's Mehrfachvergleiche ergeben signifikante Veränderungen (p-Werte und Richtung siehe Graphik). Abbildung teilweise übernommen aus Falter et al. (2023) [230].

d) Effekte auf Zellebene

Im peri-sphäroidalen Bereich unterscheidet sich die Anzahl der Iba1⁺ Zellen je nach Vorbehandlung signifikant. Eine Dexamethason-Behandlung mit 0,1 µg/ml führte nicht zu einer Verringerung des Iba1⁺-Signals, aber eine Behandlung mit 1 µg/ml Dexamethason führte unter beiden Bedingungen (nativ und mit PLX5622 vorbehandelt) zu einem deutlich verringerten Iba1⁺-Signal (s. *Abbildung 31*).

Die Behandlung mit CXCR2-hemmenden Wirkstoffen führte auch zu weniger Iba1⁺-Partikeln im peri-sphäroidalen Bereich nativer OBSC; in Kombination mit Dexamethason ist dieser Rückgang sogar noch ausgeprägter (s. *Abbildung 31*).

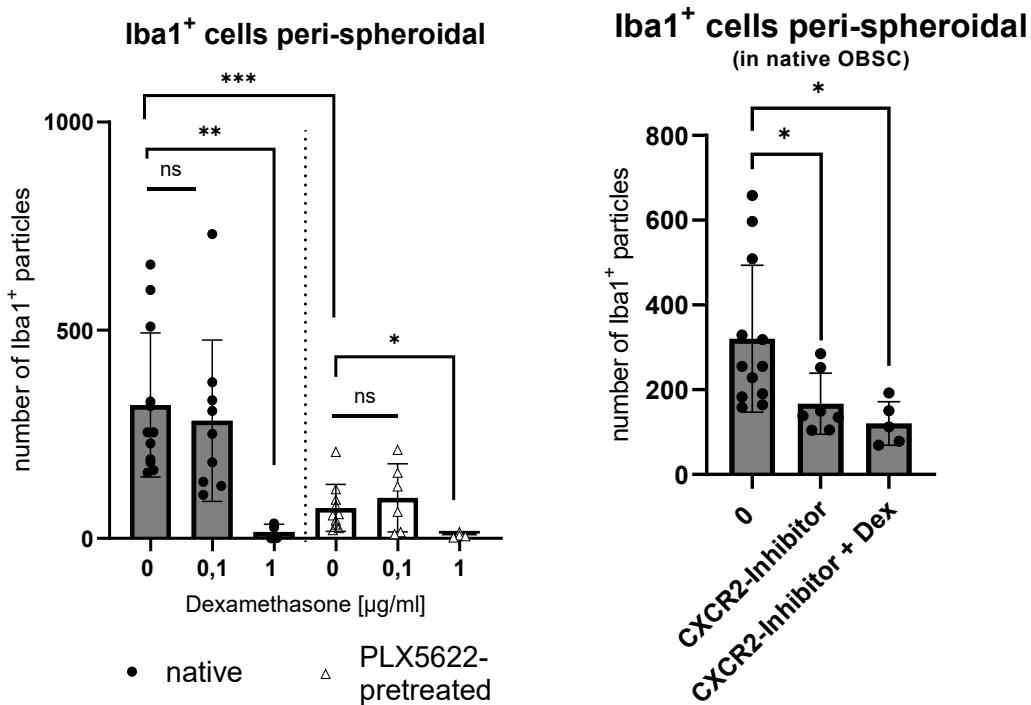


Abbildung 31: Auswirkungen von Dexamethason auf das Auftreten peri-sphäroidaler Iba1-positiver Zellen abhängig von PLX5622-Vorbehandlung sowie Auswirkungen von CXCR2-Inhibition auf entsprechendes Zellvorkommen in Mikroglia nativen OBSC. *Links:* Im peri-sphäroidalen Bereich an Tag 7 finden wir einen signifikanten Effekt für die Dexamethasonbehandlung und die native/PLX5622-Vorbehandlung (Zwei-Wege-ANOVA, keine Interaktion, $p = 0,1096$; Effekt für Dexamethasonbehandlung, $p = 0,0048$; Effekt für native/PLX5622-Vorbehandlung; $p = 0,0017$). Paarweise Vergleiche zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dexamethason unter beiden Bedingungen (ungepaarter t-Test, $p = 0,6456$ [nativ] und $p = 0,4917$ [PLX5622]), während beim Vergleich von 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dexamethason in nativen und mit PLX5622 vorbehandelten Slices signifikant weniger Iba1+ Partikel nachgewiesen werden können (ungepaarter t-Test, $p = 0,0041$ [nativ] und $p = 0,0424$ [PLX5622]). Vergleicht man native und mit PLX5622 vorbehandelte OBSC ohne Dexamethasonbehandlung, so findet man signifikant weniger Iba1+ Partikel peri-sphäroidal in mit PLX5622 vorbehandelten OBSC (ungepaarter t-Test, $p = 0,0003$). *Rechts:* Wir fanden eine signifikante Reduktion der Iba1+ Zellen im peri-sphäroidalen Bereich mit CXCR2-Inhibitor (ungepaarter t-Test, $p = 0,0408$) und nach Behandlung mit CXCR2-Inhibitor und Dexamethason (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (ungepaarter t-Test, $p = 0,0247$). Abbildung übernommen aus Falter et al. (2023) [230].

Morphologisch fanden wir in nativen OBSC ohne Sphäroid an Tag 0 verzweigte/ruhende Mikroglia. Im peri-sphäroidalen Bereich fanden wir an Tag 6 reichlich aktivierte amöboide

Mikroglia. Trotz der Depletion konnten wir auch an Tag 7 amöboide Mikroglia im peri-sphäroidalen Bereich der mit PLX5622 vorbehandelten Bedingungen finden, allerdings nur in sehr geringem Ausmaß. Unmittelbar nach der Vorbehandlung mit dem CSF-1R-Antagonisten PLX5622 sind nur noch dystrophische Mikroglia mit sehr geringem Iba1⁺ Signal erkennbar (s. Abbildung 32).

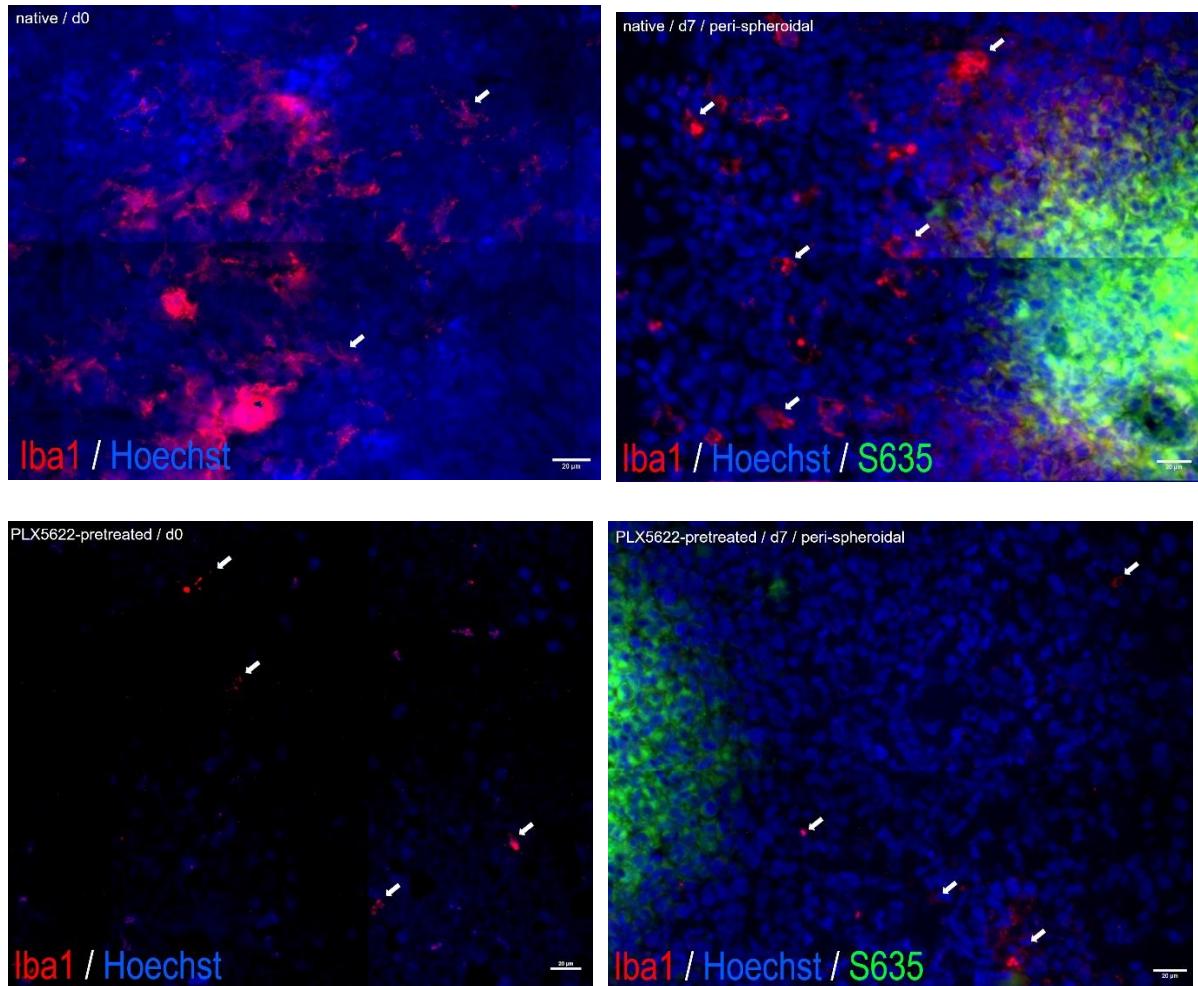


Abbildung 32: Beispielhafte Aufnahmen zur Darstellung peri-sphäroidaler Mikroglia-Morphologie. Betrachtet man die morphologischen Merkmale unserer Iba1⁺ gefärbten Zellen, so findet man verzweigte Mikroglia in Tag 0 un behandelten nativen OBSC (oben links), amöboide (=aktivierte) Mikroglia-Merkmale bei Tag 7 in nativen OBSC im peri-sphäroidalen Bereich (oben rechts). Dystrophische Iba1+-Mikroglia findet man an Tag 0 (unten links) und amöboide, aber wenige Mikroglia am Tag 7 im peri-sphäroidalen Bereich in mit PLX5622 vorbehandelten OBSC (unten rechts). Abbildung übernommen aus Falter et al. (2023) [230].

- b. Humane Proben: Einfluss von Dexamethason auf die myeloide Immunzellmikroumgebung und die CXCL2/IL8-CXCR2-Achse bei Glioblastompatienten
 - i. Klinische Daten, Vergleich der Dex-naiven mit den DEX-behandelten Gruppen

	Kein präoperatives Dexamethason	Dexamethason-behandelt	p =
n=	16	27	
Geschlecht (f/m)	8/8 (50,0%/50,0%)	12/16 (44,4%/55,6%)	0,724
Alter (median)	71,7 (range: 50,1 – 79,5)	68,9 (range: 40,3 – 86,3)	0,701
Präoperativer KPI (median)	80 (range: 50 – 100)	80 (range: 60 – 100)	0,598
MGMT-promoter Status	Methyliert: 10 (62,5%) Unmethyliert: 6 (37,5%)	Methyliert: 16 (57,3%) Unmethyliert: 11 (40,7%)	0,834
Tumorvolumen	45,7 (range: 12,7 – 103,8)	53,8 (range: 20,3 – 94,2)	0,283
Resektionsausmaß			
Biopsie	1 (6,3%)	0 (0%)	0,170
Inkomplette Resektion	4 (25%)	13 (48,2%)	
Komplettresektion	11 (68,7%)	14 (51,2%)	

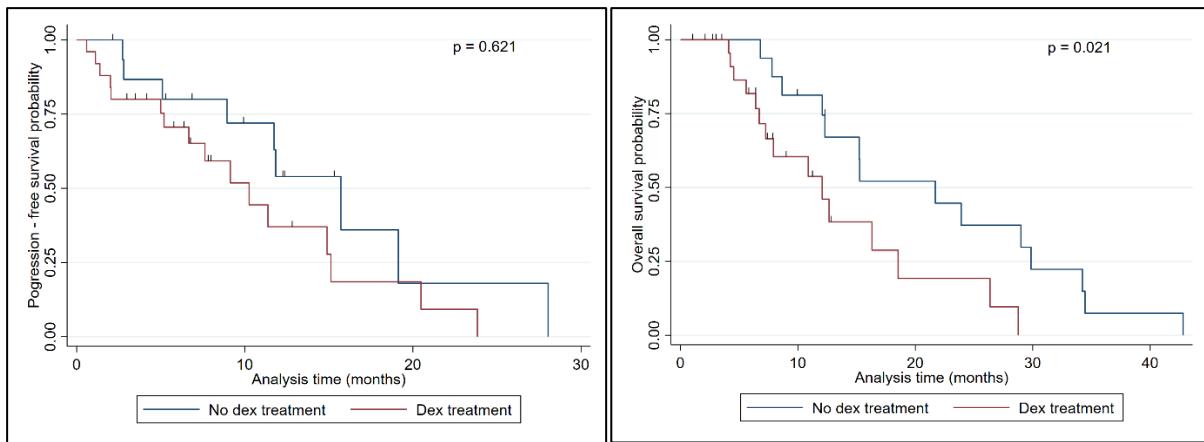
Tabelle 14: Klinische Daten der gematchten Gruppen. Im Gruppenvergleich zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Dexamethason-naiven und Dexamethason-behandelten Gruppe bezogen auf die Verteilung von Geschlecht, Alter, dem präoperativen Karnofsky-Performance-Index (KPI), dem MGMT-Promoter-Status, volumetrierten Tumogröße oder dem Resektionsausmaß.

Zunächst erfolgte die Identifikation aller Glioblastomproben in unserer Biobank (NOMOREg, ZKS-Nr.: Z-2020-1431-10) aus den Jahren zwischen 2012 und 2020, die im Rahmen der Erstoperation entnommen wurden und von denen genügend Material vorhanden ist (n=325). In einem zweiten Schritt wurden die entsprechenden Patientenunterlagen und Krankenakten dieser 325 Patienten, insbesondere digital archivierte Stationskurven, hinsichtlich einer präoperativen Dexamethasongabe genau durchsucht. Es konnten letztlich n=16 Patienten (4,9%) identifiziert werden, die präoperativ kein Dexamethason erhalten haben und auch ansonsten dem Profil „Erstoperation bei IDH-Wildtyp Glioblastom in der postoperativen neuropathologischen Beurteilung“ entsprachen und von denen gleichzeitig genügend Material in der Biobank vorhanden war. Insgesamt entspricht die sehr geringe Anzahl identifizierter Patienten, die

präoperativ kein Dexamethason erhalten haben, unserer Erwartung, da die niederschwellige Dexamethasongabe bei Verdacht auf Glioblastom lange Zeit üblich war, was sich auch in einer entsprechenden Umfrage unter Neurochirurgen zur Applikation von Dexamethason im klinischen Alltag widerspiegelt [13]. In einem zweiten Schritt erfolgte die Identifikation einer nach Tumorvolumen, MGMT-Promoter-Methylierungsstatus, Resektionsausmaß und Behandlung gematchten präoperativ Dexamethason-behandelten Kohorte aus der zur ZHT-Biobank mitgeführten klinischen Datenbank, so dass insgesamt n=27 Patientensamples mit genügend vorhandenem Material identifiziert werden konnten. Für diese Kollektiv wurde entsprechend die kumulative Dexamethasondosis aus den Unterlagen entnommen. Als Kontrolle sollten Genexpressionsanalysen auch an nicht-hirneigenen Hirntumoren, die entweder präoperativ Dexamethason erhalten haben oder kein Dexamethason, durchgeführt werden. Hierfür konnte auf ein separat durchgeführtes Screening zurückgegriffen werden, das dankenswerterweise von Dr. T. Araceli (Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie) zur Verfügung gestellt wurde. Hier konnten n=4 Patienten mit cerebralen Melanommetastasen und n=5 Patienten mit cerebralen NSCLC-Metastasen identifiziert werden, die präoperativ Dexamethason-naiv waren. Entsprechend konnten n=10 (cerebrale Melanommetastasen) bzw. n=12 (cerebrale NSCLC-Metastasen) Dexamethason-behandelte Patientenproben eingeschlossen werden.

Die klinischen Daten der eingeschlossenen Glioblastopatienten zeigten sich ohne signifikante Unterschiede hinsichtlich des Geschlechtes, des medianen Alters, des medianen präoperativen Karnofsky-Index, des MGMT-Promoter-Status, des Tumorvolumens oder des Resektionsausmaßes (s. *Tabelle 14*).

Im Vergleich des progressionsfreien Überlebens zeigte sich zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied, jedoch zeigte sich im Gesamtüberleben für unserer Kohorte ein signifikanter Unterschied ($p=0,021$) mit deutlichem Überlebensvorteil in der präoperativ Dexamethason-naiven Kohorte (15,2 Monate vs. 7,3 Monate). In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse war Dexamethason signifikant mit einem erhöhten Risiko für schlechteres Gesamtüberleben assoziiert ($HR=3,290$; 95%-KI: 1,285-8,423, $p=0,013$) (s. *Abbildung 33*).



	Dexamethason-naiv	Dexamethason-behandelt	p =
PFS (median; Monate)	10,8 (range: 2,1-28,1)	7,2 (range: 1,1-23,8)	0,621
OS (median; Monate)	15,2 (range: 2,2-42,1)	7,3 (range: 1,2-28,8)	0,021

	Harzard Ratio	95% Konfidenzintervall		p -Wert
Alter	1.058	1.005	1.115	0.032
KPI	1.009	0.973	1.047	0.617
MGMT-Status	1.587	0.710	3.546	0.259
Dexamethason	3.290	1.285	8.423	0.013

Abbildung 33: Vergleich von PFS und OS beider Gruppen sowie Multivariate Cox Regressionsanalyse (Gesamtüberleben). Oben links: Kaplan-Meier Kurve zur Darstellung des PFS in beiden Gruppen. Oben rechts: Kaplan-Meier Kurve zur Darstellung des Gesamtüberlebens in beiden Gruppen. Mitte: PFS und Gesamtüberleben beider Gruppen. Patienten dieser Kohorte, die präoperativ (vor der ersten Operation) mit Dexamethason behandelt wurden, zeigen ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben ($p=0,021$). Unten: Multivariate Cox-Regressionsanalyse mit signifikanten Effekten für Alter und Dexamethason.

In der Gruppe der präoperativ mit Dexamethason behandelten Patienten zeigte sich die Dauer der präoperativen Dexamethasonexposition im Median mit 5 Tagen (range: 2 - 14d) und die mediane kumulative Dosis über die Zeit mit 56 mg (range: 12 - 204 mg), wobei als Ausreißer ein Patient statt Dexamethason das Glucokortikoid Methylprednisolon erhalten hat, wo sich ein Dexamethasonäquivalent von 800 mg ergibt. Zur besseren Wiedergabe der Exposition über die Zeit wurde die Area under the Curve (AUC) tageweise anhand der Trapezregel berechnet:

$$AUC \approx \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(C_i + C_{i+1})}{2} \cdot (t_{i+1} - t_i)$$

C_i = Dexamethasondosis an Tag t_i

t_i = Tag i

In Abbildung 34 ist für jeden Dexamethason-behandelten Patienten die Anzahl der präoperativen Dexamethasongaben und die AUC (kumulative Dexamethasonexposition) aufgetragen.

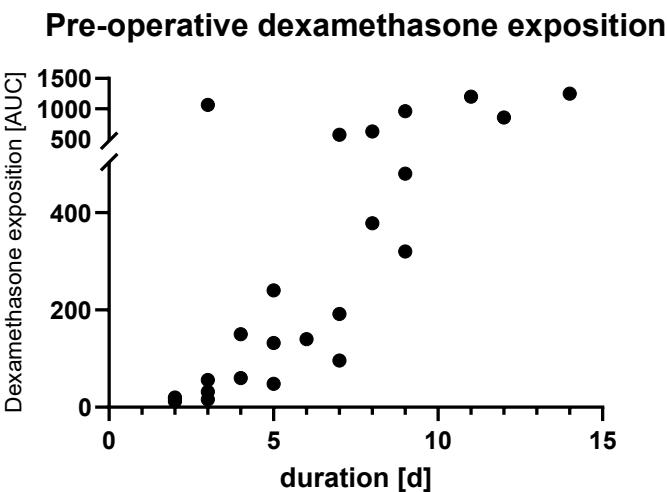


Abbildung 34: Funktion des Zeitraums der Dexamethasongabe präoperativ und der kumulativen Dexamethasondosis über die Zeit (AUC). Area under the curve (AUC) nach der Trapezregel als Annäherung an die kumulative Dexamethasonexposition über die Zeit.

ii. Präoperativ verabreichtes Dexamethason führt zu veränderter Genexpression

1. M1/M2 Genexpression

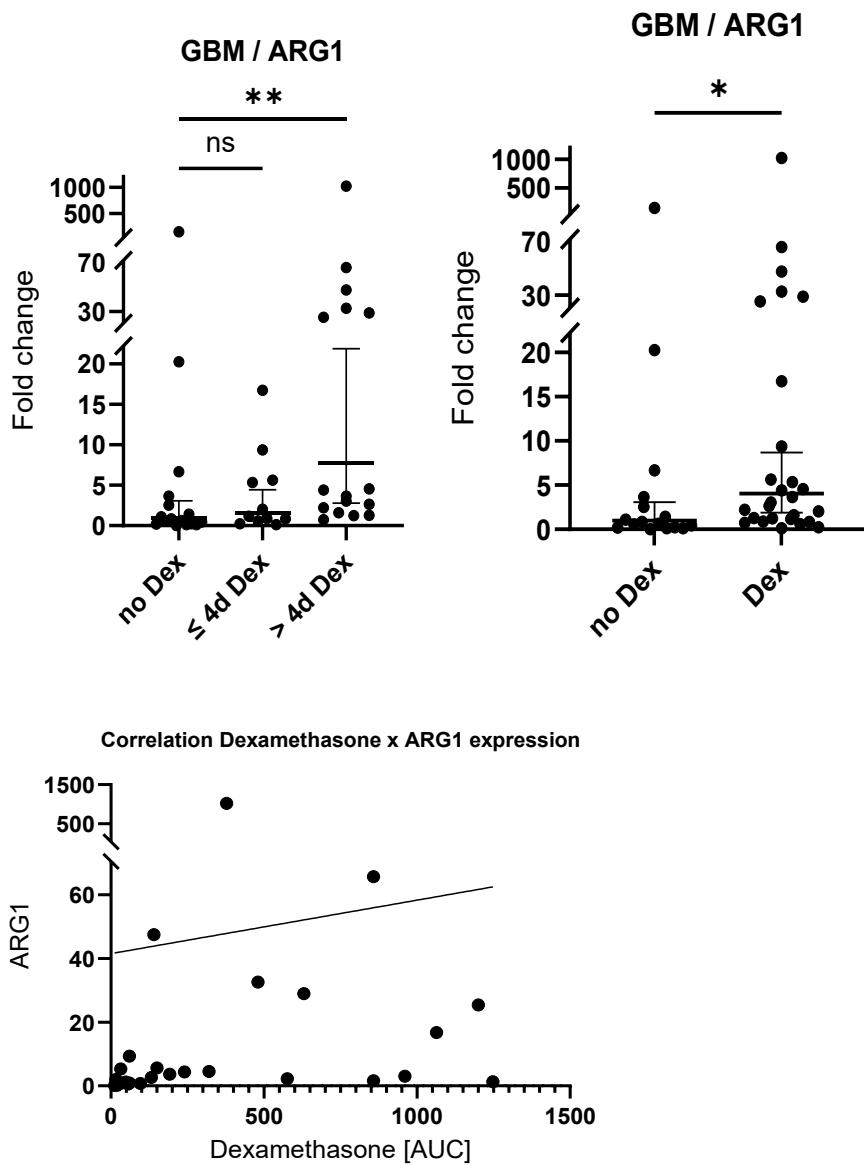


Abbildung 35: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des *fold change* der Transkripte von ARG1 im Glioblastom. Oben links: Subgruppierung in präoperativ Dexamethason-naive, Dexamethason \leq 4 Tage und Dexamethason $>$ 4 Tage behandelte Patienten. Oben rechts: Dichotomer Vergleich von Dexamethason-naiven und Dexamethason-behandelten Patienten. Unten: Korrelation der kumulativen Dexamethasondosis mit der Trapezregel (AUC) (= x-Achse) mit der Genexpressionsveränderung (= y-Achse). Es ergibt sich eine moderate positive Korrelation zwischen kumulativer Dexamethasondosis und ARG1 Genexpressionsveränderung im zweiseitigen Spearman-Korrelations-Test: $\rho = 0,5653$, $p \approx 0,0021$.

Im Vergleich der Gruppe, die kein, ≤ 4 und > 4 Tage Dexamethason erhalten haben, zeigen sich signifikante Effekte in der ARG1-Genexpressionsveränderung (Kruskal-Wallis Test, $p=0,0112$). Der angepasste p-Wert für Mehrfachvergleiche zwischen unbehandelter Gruppe und ≤ 4 Tage bzw. > 4 Tage mit Dexamethason behandelter Gruppe ergibt hier keinen Unterschied ($p=0,9749$) bzw. eine signifikant erhöhte ARG1-Expression in der > 4 d Dexamethason behandelten Gruppe ($p=0,0071$). Im dichotomen Vergleich von unbehauptet vs. Dexamethason-behandelt zeigt sich ein signifikanter Effekt (Mann-Whitney U Test, $p=0,0218$).

Es ergibt sich eine moderate positive Korrelation zwischen kumulativer Dexamethasondosis und ARG1 Genexpressionsveränderung im zweiseitigen Spearman-Korrelations-Test: $\rho = 0,5653$, $p \approx 0,0021$ (s. Abbildung 35).

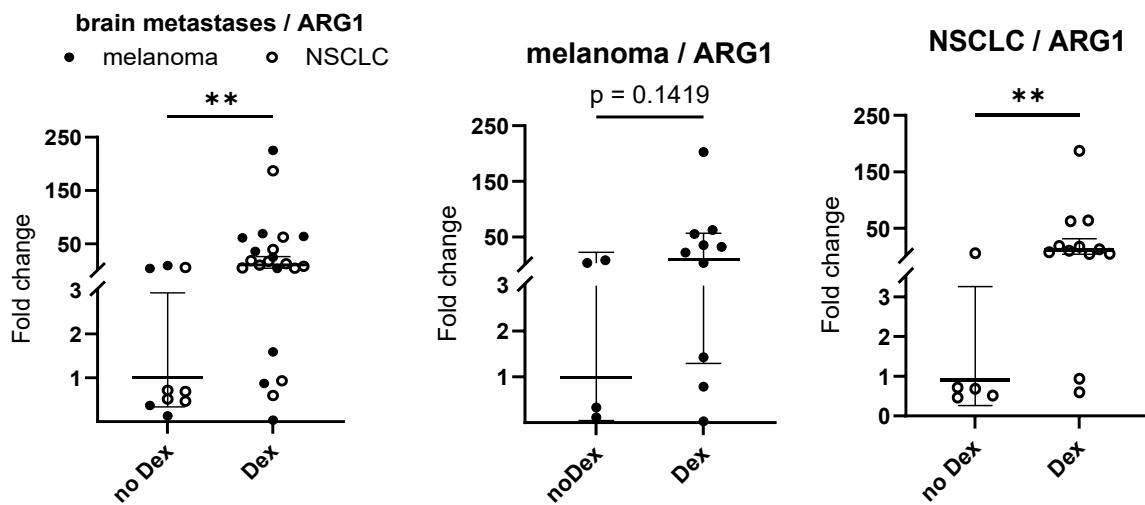


Abbildung 36: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des *fold change* der Transkripte von ARG1 in Hirnmetastasen (malignes Melanom und NSCLC). Links: Vergleich der präoperativ Dexamethason-naiven und Dexamethason-behandelten cerebralen Metastasenpatienten. Mitte: Nur cerebrale Melanommetastasen. Rechts: nur cerebrale NSCLC-Metastasen.

Im Vergleich der unbehandelten Gruppe und der Dexamethason-behandelten Gruppe zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit erhöhter Expression von ARG1 nach Dexamethasonbehandlung (Mann-Whitney U Test, $p=0,0018$). Bei Betrachtung nur der Melanommetastasen zeigt sich hier kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney U Test, $p=0,1419$) bei sehr geringer n-Zahl, jedoch eine tendenzielle Zunahme der Expression von ARG1 bei Dexamethasonbehandlung. In der NSCLC-Gruppe zeigt sich eine signifikante Zunahme der ARG1-Expression in der Dexamethasongruppe (Mann-Whitney U Test, $p=0,0094$) (s. Abbildung 36).

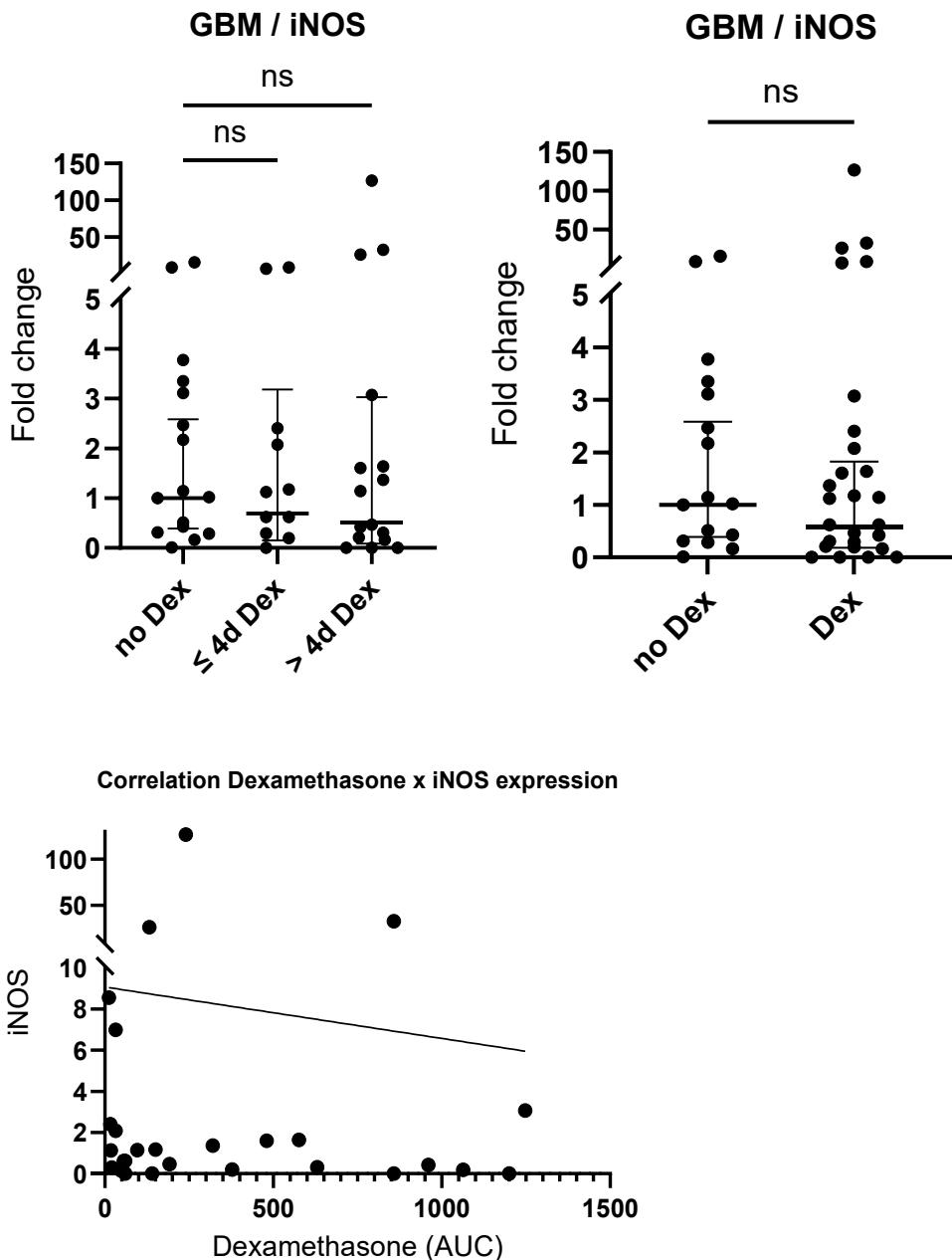


Abbildung 37: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des *fold change* der Transkripte von iNOS im Glioblastom. Oben links: Subgruppierung in präoperativ Dexamethason-naive, Dexamethason ≤ 4 Tage und Dexamethason > 4 Tage behandelte Patienten. Oben rechts: Dichotomer Vergleich von Dexamethason-naiven und Dexamethason-behandelten Patienten. Unten: Korrelation der kumulativen Dexamethasondosis mit der Trapezregel (AUC) (= x-Achse) mit der Genexpressionsveränderung (= y-Achse) ohne Signifikanz: zweiseitiger Spearman-Korrelations-Test: $p = -0,1719$, $p \approx 0,3911$.

Im Vergleich der Gruppe, die kein, ≤ 4 und > 4 Tage Dexamethason erhalten haben, zeigen sich keine signifikanten Effekte (Kruskal-Wallis Test, $p=0,7946$). Der angepasste p-Wert für Mehrfachvergleiche zwischen unbehandelter Gruppe und ≤ 4 Tage bzw. > 4 Tage mit Dexamethason behandelter Gruppe ergibt auch hier keine signifikanten Unterschiede ($p>0,9999$ bzw. $p=0,9984$). Im dichotomen Vergleich von unbehandelt vs. Dexamethason-behandelt zeigt sich kein signifikanter Effekt (Mann-Whitney U Test, $p=0,5423$).

Es ergibt sich keine Korrelation zwischen kumulativer Dexamethasondosis und iNOS-Genexpressionsveränderung im zweiseitigen Spearman-Korrelations-Test: $\rho = -0,1719$, $p \approx 0,3911$ (s. Abbildung 37).

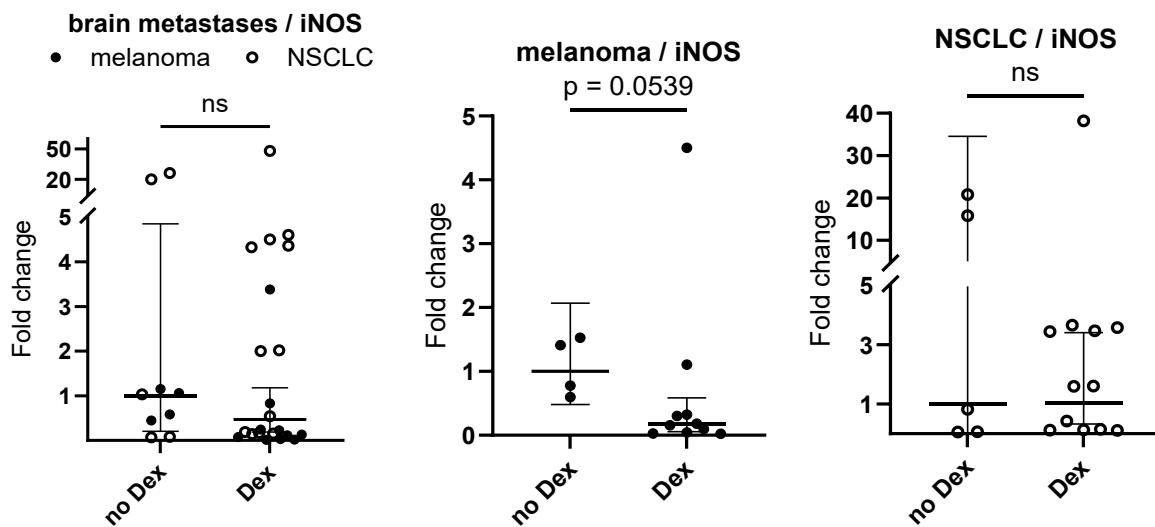


Abbildung 38: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des fold change der Transkripte von iNOS in Hirnmetastasen (malignes Melanom und NSCLC). Links: Vergleich der präoperativ Dexamethason-naiven und Dexamethason-behandelten cerebralen Metastasenpatienten. Mitte: Nur cerebrale Melanommetastasen. Rechts: Nur cerebrale NSCLC-Metastasen.

Im Vergleich der unbehandelten Gruppe mit der Dexamethason-behandelten Gruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney U Test, $p=0,4798$). *Mitte:* Bei Betrachtung nur der Melanommetastasen zeigt sich hier tendenziell eine verringerte Expression von iNOS, ein signifikanter Effekt wird bei geringer n-Zahl jedoch verpasst (Mann-Whitney U Test, $p=0,0539$). In der NSCLC-Gruppe zeigt sich keine signifikante Zunahme der iNOS-Expression in der Dexamethasongruppe (Mann-Whitney U Test, $p=0,7990$) (s. Abbildung 38).

2. CXCL2/IL8-CXCR2-Achse

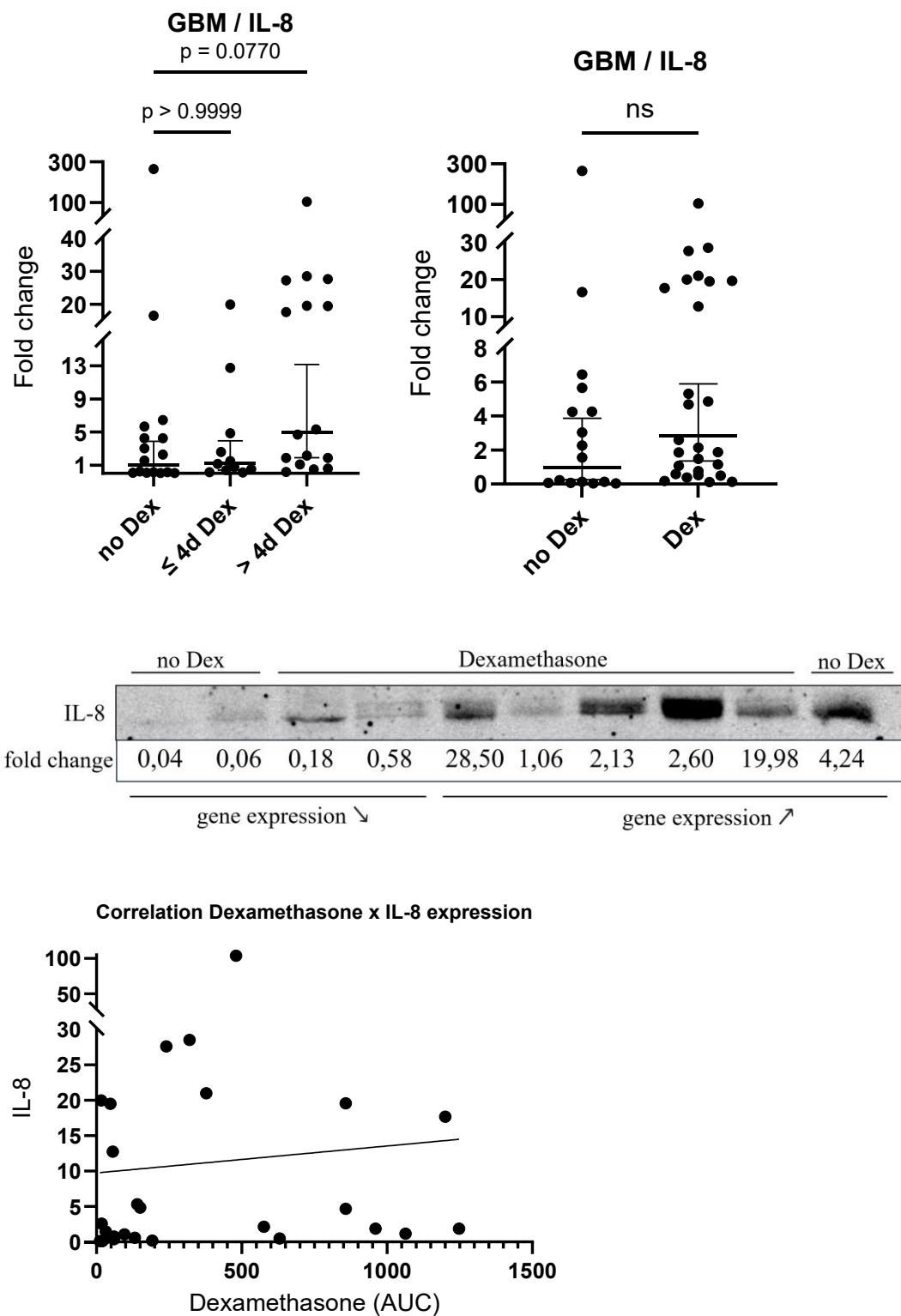


Abbildung 39: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des fold change der Transkripte von IL-8 im Glioblastom. Oben links: Subgruppierung in präoperativ

Dexamethason-naive, Dexamethason \leq 4 Tage und Dexamethason $>$ 4 Tage behandelte Patienten. *Oben rechts:* Dichotomer Vergleich von Dexamethason-naiven und Dexamethason-behandelten Patienten. *Mitte:* Western Blot für IL-8 von Glioblastomproben. Qualitativ bildet sich im Western Blot ein gewisser Zusammenhang der erhöhten Genexpression (fold change) mit der Bandenintensität. *Unten:* Korrelation der kumulativen Dexamethasondosis mit der Trapezregel (trapezoidal rule) (AUC) (= x-Achse) mit der Genexpressionsveränderung (= y-Achse) ohne Signifikanz: zweiseitigen Spearman-Korrelations-Test: $\rho = 0,2733$, $p \approx 0,1678$.

Im Vergleich der Gruppe, die kein, \leq 4 und $>$ 4 Tage Dexamethason erhalten haben, zeigen sich keine signifikanten Effekte (Kruskal-Wallis Test, $p=0,0770$). Der angepasste p-Wert für Mehrfachvergleiche zwischen unbehandelter Gruppe und \leq 4 Tage bzw. $>$ 4 Tage mit Dexamethason behandelter Gruppe ergibt keinen signifikanten Unterschied für \leq 4 Tage ($p>0,9999$), für die $>$ 4 Tage behandelte Gruppe zeigt sich eine tendenziell erhöhte IL-8 Expression, ein signifikanter Effekt wird hier allerdings verpasst ($p=0,0770$). Im dichotomen Vergleich von unbehauptet vs. Dexamethason-behandelt zeigt sich kein signifikanter Effekt (Mann-Whitney U Test, $p=0,1573$).

Es ergibt sich keine Korrelation zwischen kumulativer Dexamethasondosis und IL-8-Genexpressionsveränderung im zweiseitigen Spearman-Korrelations-Test: $\rho = 0,2733$, $p \approx 0,1678$ (s. *Abbildung 39*).

Zur qualitativen Darstellung der vorhandenen Konzentration des Liganden IL-8 auf Proteinebene (nur M1/M2-Marker und CXCR2 wurden auf Proteinebene im FFPE-Schnitt nachvollzogen) in der Gewebeprobe wurde die Bandenausprägung im Western Blot im Vergleich zu vorhandenen Genexpression gegenübergestellt (s. *Abbildung 39*).

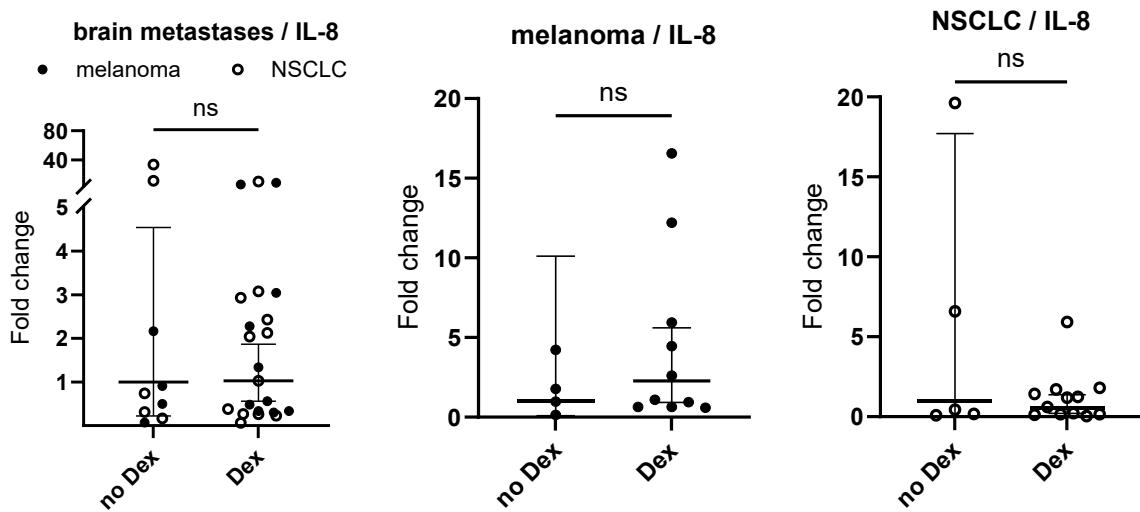


Abbildung 40: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des *fold change* der Transkripte von IL-8 in Hirnmetastasen (malignes Melanom und NSCLC). Links: Vergleich der präoperativ Dexamethason-naiven und Dexamethason-behandelten cerebralen Metastasenpatienten. Mitte: Nur cerebrale Melanommetastasen. Rechts: Nur cerebrale NSCLC-Metastasen.

Im Vergleich der unbehandelten Gruppe mit der Dexamethason behandelten Gruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney U Test, $p=0,8403$). Bei Betrachtung der Melanommetastasen zeigt sich kein signifikanter Effekt (Mann-Whitney U Test, $p=0,5185$). Ebenso zeigt sich in der NSCLC-Gruppe kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Mann-Whitney U Test, $p=0,7214$) (s. Abbildung 40).

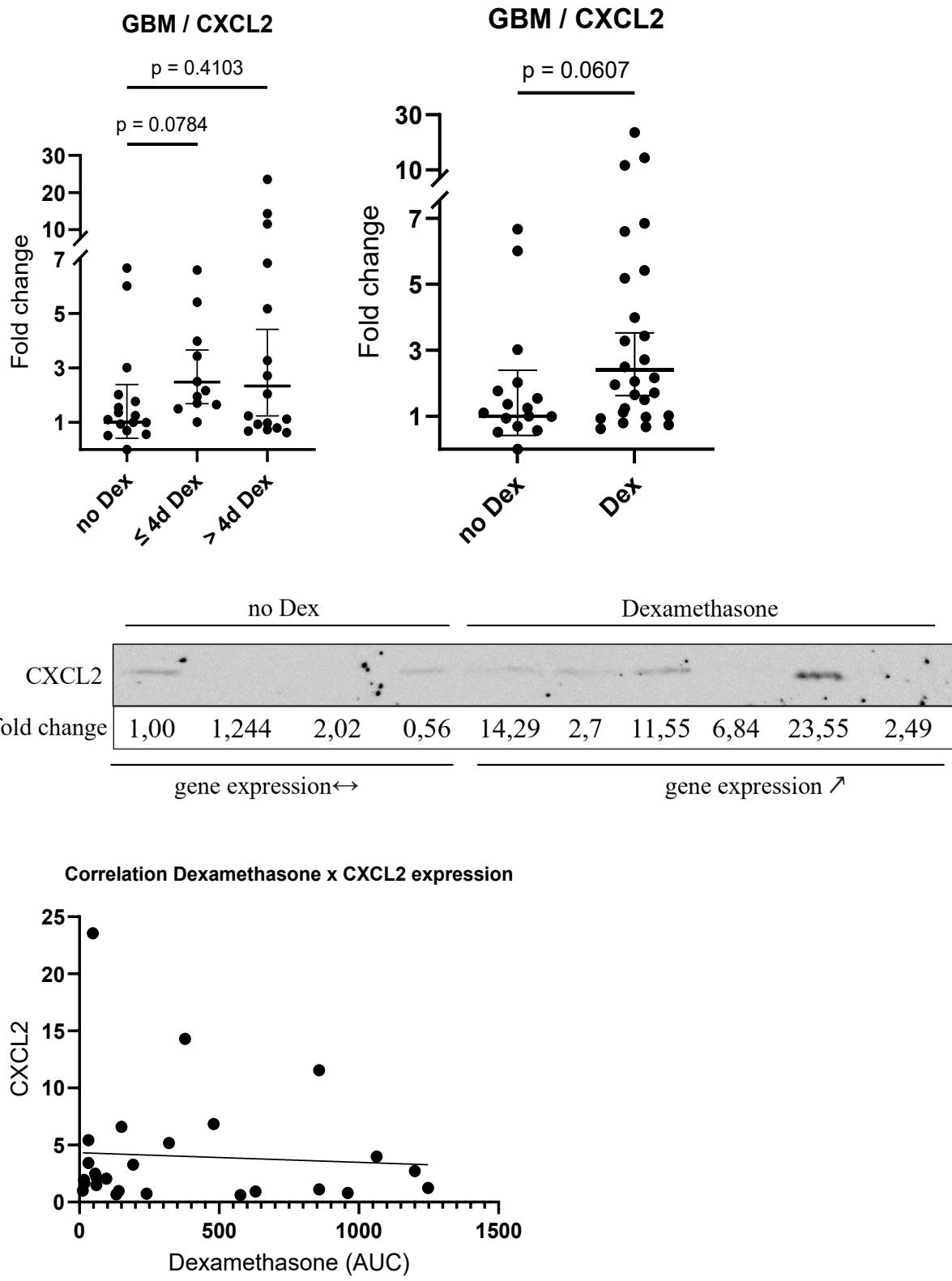


Abbildung 41: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des *fold change* der Transkripte von CXCL2 im Glioblastom. Oben links: Subgruppierung in präoperativ Dexamethason-naive, Dexamethason \leq 4 Tage und Dexamethason $>$ 4 Tage behandelte Patienten. Oben rechts: Dichotomer Vergleich von Dexamethason-naiven und Dexamethason-behandelten Patienten.

Mitte: Western Blot für CXCL2 von Glioblastomproben. Ein qualitativer Zusammenhang im Western Blot mit Genexpressionsveränderungen (*fold change*) ergibt sich nur teilweise bei insgesamt schwacher Bandenausprägung. *Unten:* Korrelation der kumulativen Dexamethasondosis mit der Trapezregel (AUC) (= x-Achse) mit der Genexpressionsveränderung (= y-Achse) ohne Signifikanz: zweiseitiger Spearman-Korrelations-Test: $\rho = -0,04428$, $p \approx 0,8264$.

Im Vergleich der Gruppe, die kein, ≤ 4 und > 4 Tage Dexamethason erhalten haben, zeigen sich keine signifikanten Effekte (Kruskal-Wallis Test, $p=0,1111$). Der angepasste p-Wert für Mehrfachvergleiche zwischen unbehandelter Gruppe und ≤ 4 Tage bzw. > 4 Tage mit Dexamethason behandelten Gruppe ergibt eine tendenzielle Zunahme der CXCL2-Expression für ≤ 4 Tage, ein statistisch signifikanter Unterschied ergibt sich jedoch nicht ($p=0,0784$). Kein signifikanter Unterschied zeigt sich für die > 4 Tage mit Dexamethason behandelte Gruppe ($p=0,4103$). Im dichotomen Vergleich von unbehandelt vs. Dexamethason behandelt zeigt sich lediglich die Tendenz zu erhöhter CXCL2-Expression (Mann-Whitney U Test, $p=0,0607$).

Es ergibt sich keine Korrelation zwischen kumulativer Dexamethasondosis und CXCL2 Genexpressionsveränderung im zweiseitigen Spearman-Korrelations-Test: $\rho = -0,04428$, $p \approx 0,8264$ (s. Abbildung 41).

Zur qualitativen Darstellung der vorhandenen Konzentration des Liganden CXCL2 auf Proteinebene (nur M1/M2-Marker und CXCR2 wurden auf Proteinebene im FFPE-Schnitt nachvollzogen) in der Gewebeprobe wurde die Bandenausprägung im Western Blot im Vergleich zu vorhandenen Genexpression gegenübergestellt (s. Abbildung 41).

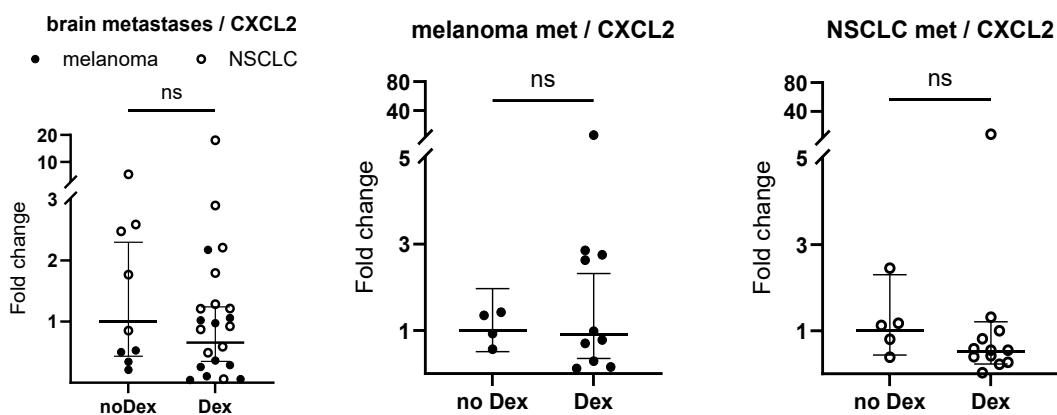
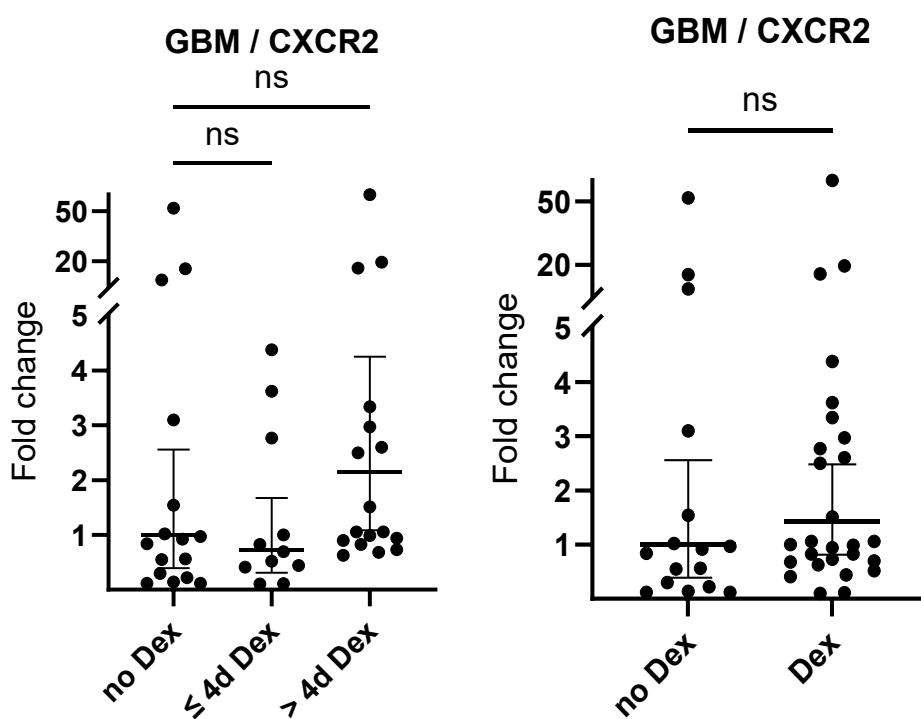


Abbildung 42: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des *fold change* der Transkripte von CXCL2 in Hirnmetastasen (malignes Melanom und NSCLC). Links: Vergleich der präoperativ Dexamethason-naiven und Dexamethason-behandelten cerebralen

Metastasenpatienten. *Mitte:* Nur cerebrale Melanommetastasen. *Rechts:* Nur cerebrale NSCLC-Metastasen.

Im Vergleich der unbehandelten Gruppe mit der Dexamethason behandelten Gruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied für CXCL2 bei cerebralen Metastasen (Mann-Whitney U Test, $p=0,5635$). Bei Betrachtung der Melanommetastasen zeigt sich kein signifikanter Effekt (Mann-Whitney U Test, $p>0,9999$). Ebenso zeigt sich in der NSCLC-Gruppe kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Mann-Whitney U Test, $p=0,4103$) (s. Abbildung 42).



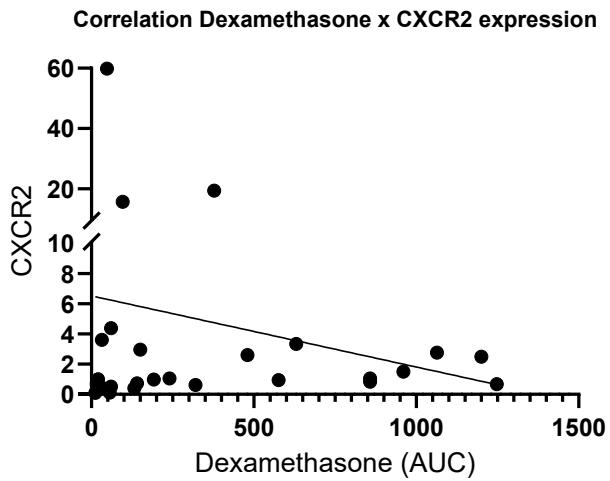


Abbildung 43: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des fold change der Transkripte von CXCR2 im Glioblastom. Oben links: Subgruppierung in präoperativ Dexamethason-naive, Dexamethason \leq 4 Tage und Dexamethason > 4 Tage behandelte Patienten. Oben rechts: Dichotomer Vergleich von Dexamethason-naiven und Dexamethason-behandelten Patienten. Unten: Korrelation der kumulativen Dexamethasondosis mit der Trapezregel (AUC) (= x-Achse) mit der Genexpressionsveränderung (= y-Achse) ohne Signifikanz: zweiseitiger Spearman-Korrelations-Test: $p = 0,2380$, $p \approx 0,2320$.

Im Vergleich der Gruppe, die kein, ≤ 4 und > 4 Tage Dexamethason erhalten haben, zeigen sich keine signifikanten Effekte für die CXCR2-Genexpression (Kruskal-Wallis Test, $p=0,0962$) bei großer Streubreite innerhalb der Gruppen. Der angepasste p-Wert für Mehrfachvergleiche zwischen unbehandelter Gruppe und ≤ 4 Tage bzw. > 4 Tage mit Dexamethason behandelter Gruppe ergibt einen signifikanten Unterschied für ≤ 4 Tage ($p>0,9999$), für die > 4 Tage behandelte Gruppe zeigt sich eine tendenziell erhöhte CXCR2-Expression, ein signifikanter Effekt findet sich jedoch nicht ($p=0,1965$). Im dichotomen Vergleich von unbehandelt vs. Dexamethason behandelt zeigt sich kein signifikanter Effekt (Mann-Whitney U Test, $p=0,3731$).

Es ergibt sich keine Korrelation zwischen kumulativer Dexamethasondosis und CXCR2 Genexpressionsveränderung. Zweiseitiger Spearman-Korrelations-Test: $\rho = 0,2380$, $p \approx 0,2320$ (s. Abbildung 43).

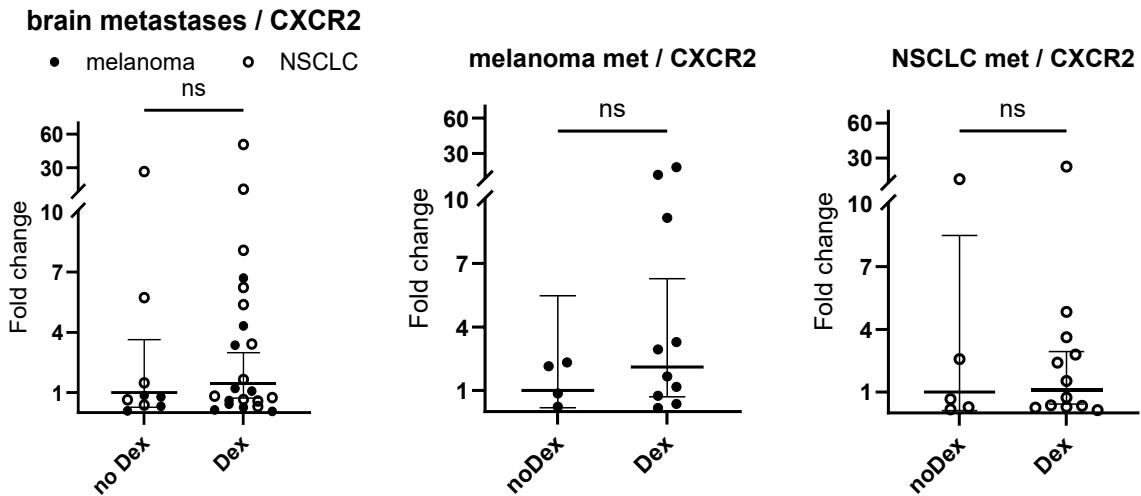


Abbildung 44: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des *fold change* der Transkripte von CXCR2 in Hirnmetastasen (malignes Melanom und NSCLC). *Links:* Vergleich der präoperativ Dexamethason-naiven und Dexamethason-behandelten cerebralen Metastasenpatienten. *Mitte:* Nur cerebrale Melanommetastasen. *Rechts:* Nur cerebrale NSCLC-Metastasen.

Im Vergleich der unbehandelten Gruppe mit der Dexamethason-behandelten Gruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney U Test, $p=0,5635$). Bei Betrachtung der Melanommetastasen zeigt sich kein signifikanter Effekt (Mann-Whitney U Test, $p=0,4535$). Ebenso zeigt sich in der NSCLC-Gruppe kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Mann-Whitney U Test, $p=0,7990$) (s. *Abbildung 44*).

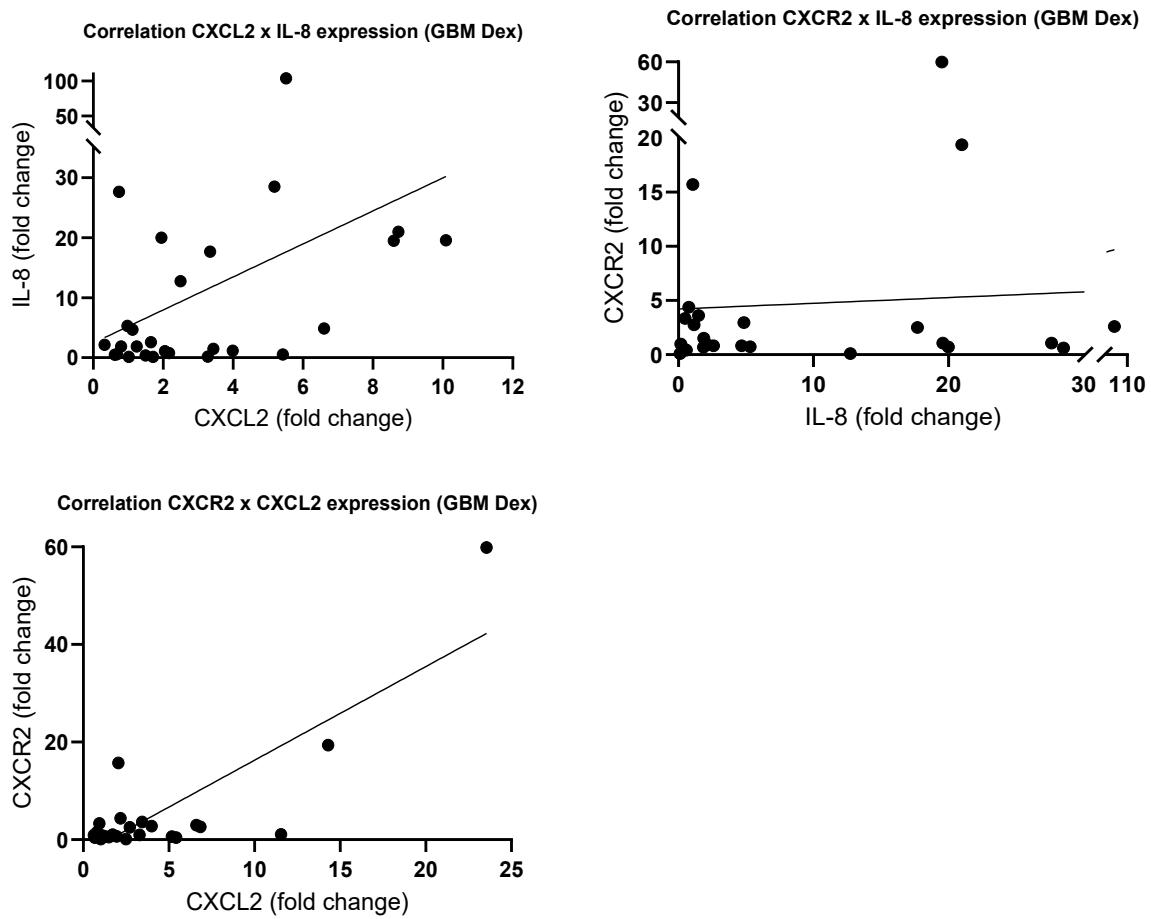


Abbildung 45: Darstellung möglicher Zusammenhänge innerhalb der CXCR2-CXCL2/IL-8 Achse.

Es zeigt sich eine moderate positive Korrelation zwischen CXCL2- und IL-8-Genexpressionsveränderung im einseitigen Spearman-Korrelations-Test: $\rho = 0,3767$, $p \approx 0,0264$. Keine Korrelation zeigt sich zwischen CXCR2- und IL-8-Expression (zweiseitiger Spearman-Korrelations-Test: $\rho = 0,18877$, $p \approx 0,3459$). Eine moderate positive Korrelation zeigt sich zwischen CXCR2- und CXCL2-Genexpressionsveränderung (zweiseitiger Spearman-Korrelations-Test: $\rho = 0,4034$, $p \approx 0,0370$) (s. *Abbildung 45*).

iii. Dexamethasongabe hat Einfluss auf zellulärer Ebene – Immunfluoreszenz-Färbung FFPE

1. T-Zell Häufigkeit: Dexamethason führt zu messbarer Depletion

In unserer Immunfluoreszenzfärbung an FFPE-Schnitten zur Darstellung CD3-positiver Zellen zeigte sich in unserem Patientenkollektiv eine signifikant geringere Anzahl CD3-positiver

Partikel pro Zellkern (s. *Abbildung 46*) und somit einen T-Zell-Depletionseffekt durch eine präoperative Dexamethasongabe im Glioblastastom. Das Auftreten von T-Zellen im FFPE-Schnitt war deutlich variabel insbesondere abhängig von benachbarten Gefäßstrukturen, so dass zur Auswertung pro Fall über eine Vielzahl von Sichtfeldern (im Durchschnitt n=85 Sichtfelder pro Schnitt) bei 20-facher Vergrößerung die Häufigkeit von CD3-positiven Partikeln bestimmt wurde, um die lokalisationsabhängige Effekte zu reduzieren.

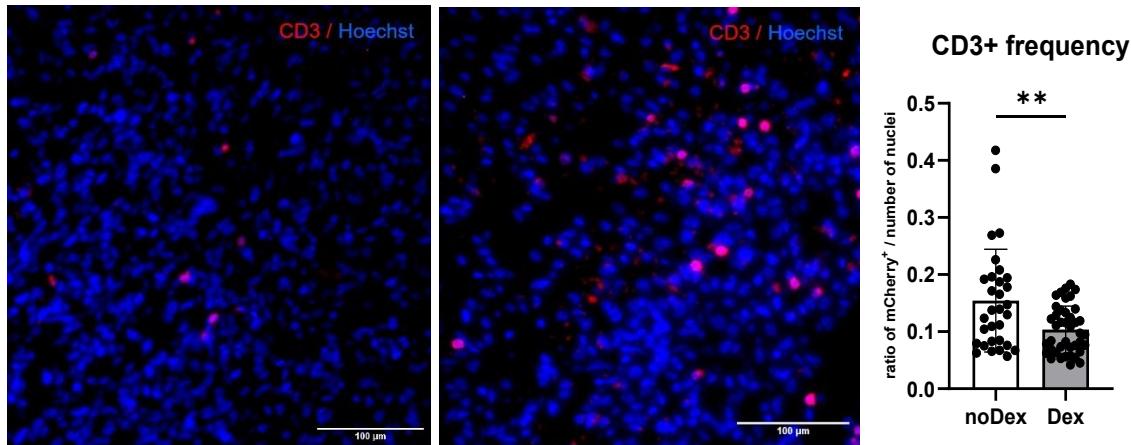


Abbildung 46: Auswertung der T-Zell-Frequenz in immunfluoreszenzgefärbten FFPE-Schnitten. Bildausschnitt mit niedrigem Anteil von CD3⁺-Partikeln pro Zellkern (*links*), und Bildausschnitt mit hohem CD3⁺-Partikel-Anteil (*mittig*). *Rechts:* Verhältnis von mCherry-positiven Partikeln (CD3-Positivität) zu Anzahl der Nuclei bei Dexamethason-Nativen und Dexamethason-Behandelten. Jeder Datenpunkt ergibt sich aus der Analyse zusammengesetzter Bilder (BigTIFF) bestehend aus im Mittel 85 Sichtfeldern bei 20facher Vergrößerung.

2. Einfluss von Dexamethason auf das GAMM-Kompartiment und GAMM-assozierte CXCR2-Expression.

Zur Untersuchung der zellulären Verteilung innerhalb des GAMM-Kompartiments und zur Einordnung der CXCR2-Verteilung haben wir eine 4-fach Immunfluoreszenzfärbung zur Anwendung auf den entsprechenden FFPE-Schnitten der einzelnen humanen Glioblastomproben etabliert. Es erfolgte die kombinierte Anwendung von primären goat anti-Iba1 (zur Darstellung der gesamten GAMM), rabbit anti-CXCR2 und mouse anti-TMEM119 (zur Darstellung der Mikroglia) Antikörpern in Kombination mit entsprechenden sekundären Antikörpern donkey Anti-Goat IgG (Cy5), donkey Anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor 594) und donkey Anti-Mouse IgG (Alexa Fluor 488) sowie Hoechst33342 zur nukleären Darstellung.

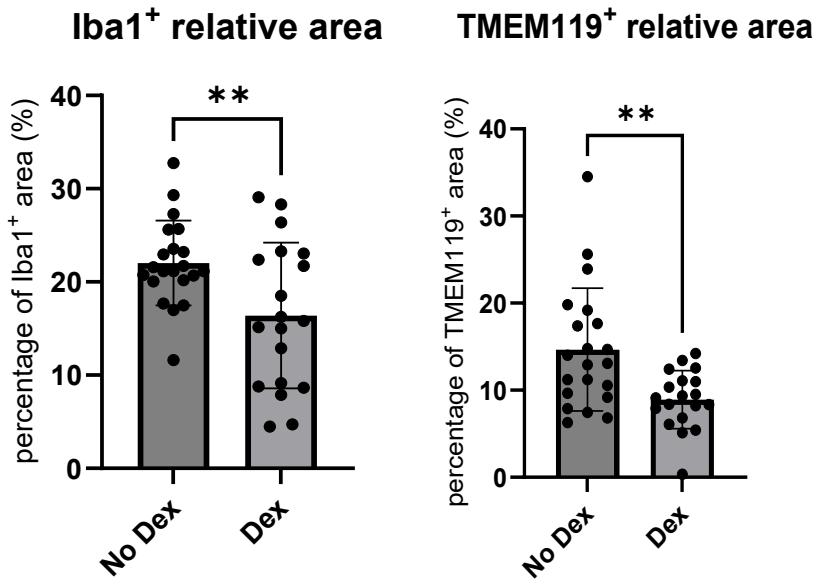
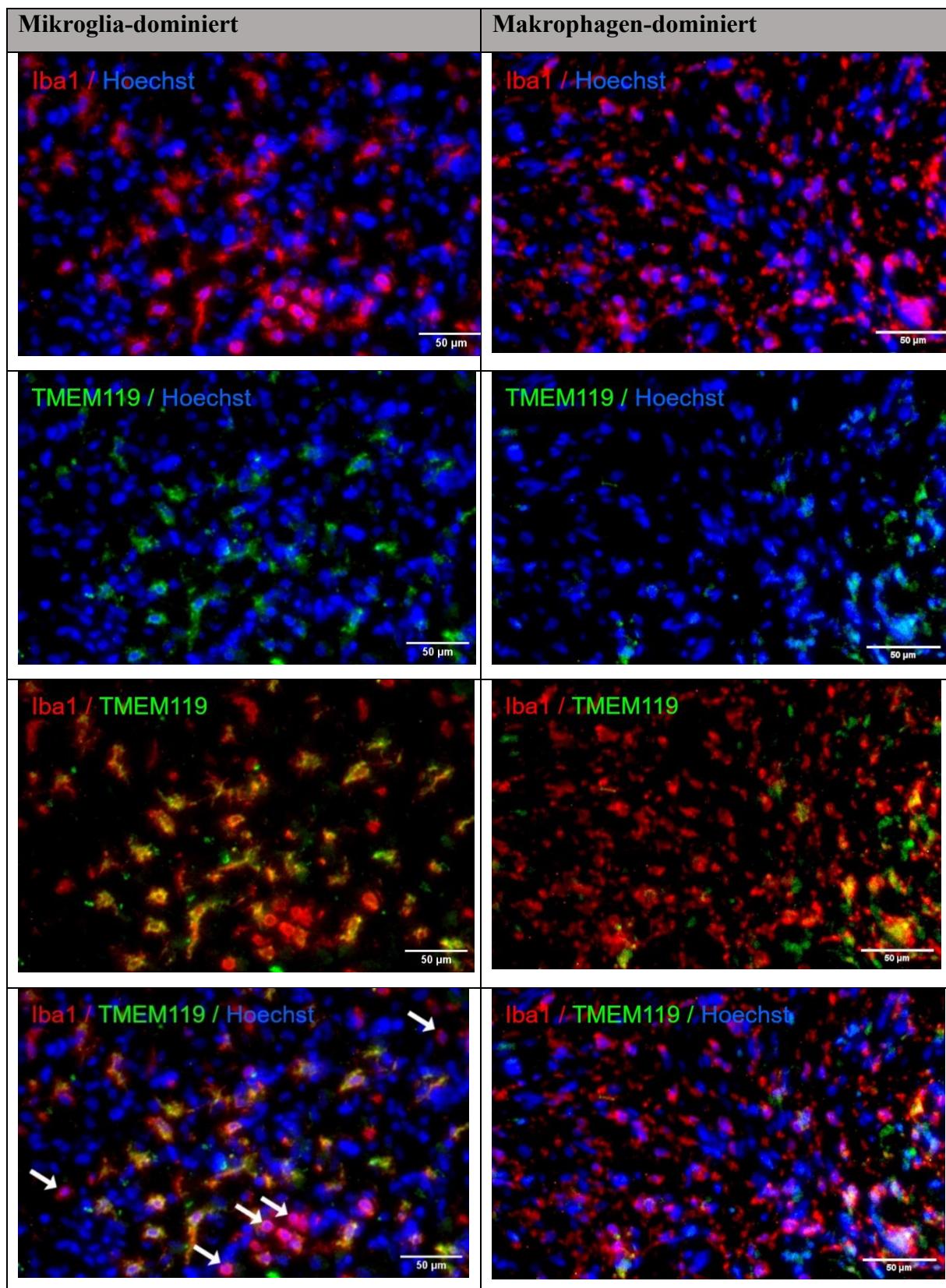


Abbildung 47: Relative Fläche (%), die sich in den immunfluoreszenzgefärbten FFPE-Schnitten Iba1⁺ (links) und TMEM119⁺ zeigt. In der Dexamethason-behandelten Gruppe zeigt sich ein signifikant niedriger Iba1-positiver Anteil (ungepaarter t-Test, $p=0,0077$). In der Dexamethason-behandelten Gruppe zeigt sich ein signifikant erniedrigter TMEM119-positiver Anteil (ungepaarter t-Test, $p=0,0026$).

Zunächst erfolgte die einfache Auswertung nach Iba1- bzw. TMEM119-positiver relativer Fläche (%) anhand zufällig ausgewählter Areale, die bei 20-facher Vergrößerung aus multiplen (im Mittel $n=40$) Sichtfeldern zusammengesetzt waren. Hier zeigte sich bei Dexamethasonbehandlung sowohl eine signifikant geringere Iba1-positive, als auch geringere TMEM119-positive relative Fläche (s. Abbildung 47).



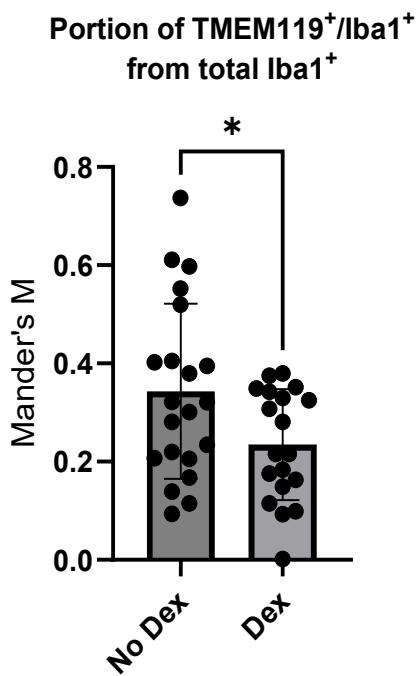
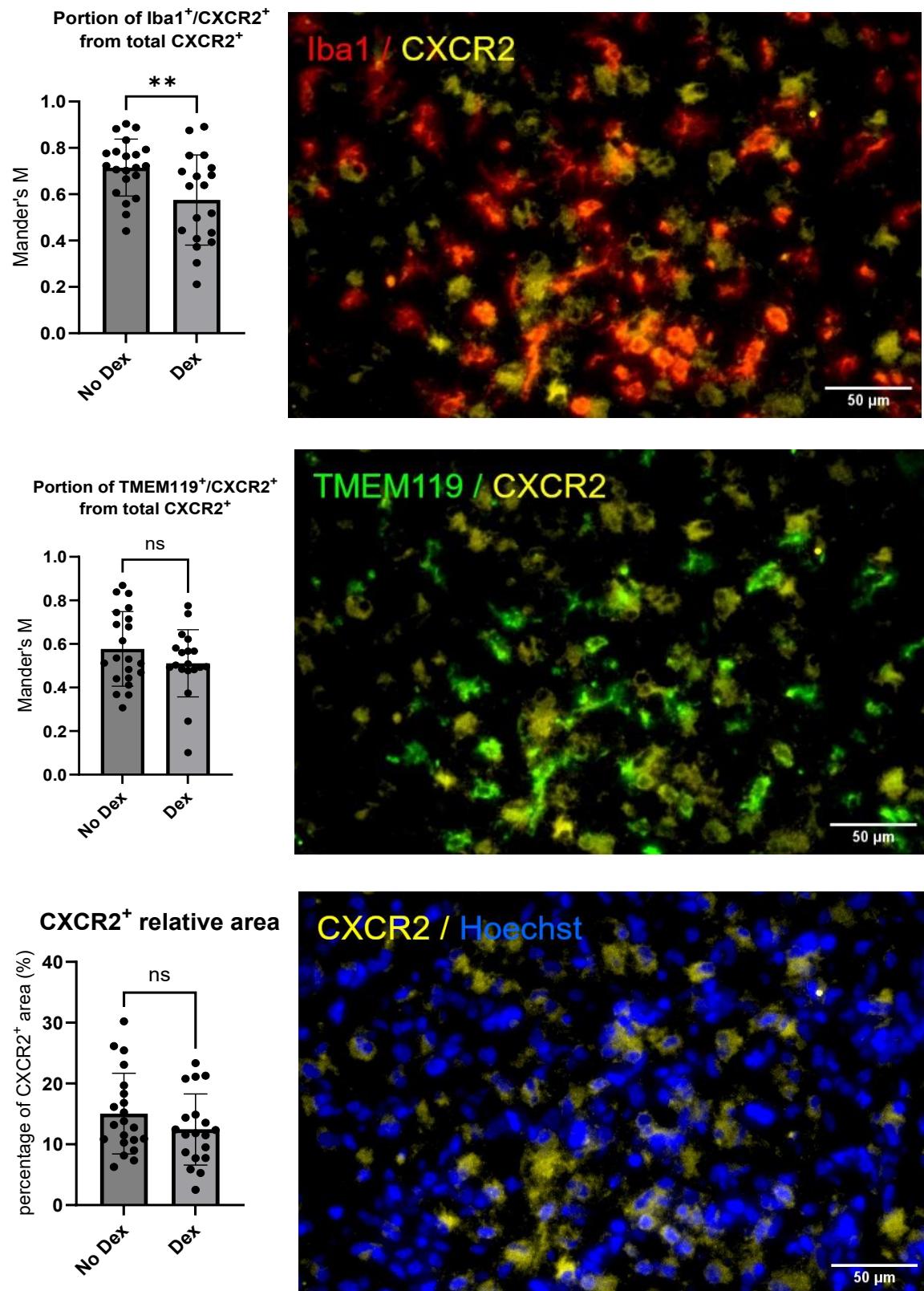


Abbildung 48: Auswertung der Makrophagen-Mikroglia-Verteilung abhängig von Dexamethasongabe. Oben: Exemplarische Darstellung von Mikroglia-dominiertem (links) bzw. Makrophagen-dominiertem (rechts) Ausschnitt. Iba1 = rot, TMEM119 = grün, Kernfärbung = blau. Unten: In der Kolokalisierungsanalyse zeigt sich der Anteil des TMEM119⁺/Iba1⁺ Areals am gesamt Iba1⁺ Areal nach Dexamethasonbehandlung signifikant erniedrigt (ungepaarter t-Test, $p=0,0286$), was auf einen erhöhten Makrophagen-Anteil hindeutet. Beispielhaft mit weißen Pfeilen markiert sind Iba1⁺/TMEM119⁻ Zellen im Mikroglia-dominierten Schnitt dargestellt, welche aus dem Knochenmark eingewanderte Makrophagen darstellen.

Zur Abschätzung der GAMM-Verteilung in Mikroglia und Makrophagen erfolgte eine Kolokalisierungsanalyse. Indem man die Fläche des kolokalisierten TMEM119-positiven und Iba1-positiven Areals ins Verhältnis zur Gesamtfläche, die Iba1-positiv ist, setzt, erhält man einen Schätzwert des mikroglialen Anteils am gesamten GAMM-Kompartiment. Hier zeigt sich in der Dexamethason-behandelten Gruppe ein erhöhter Anteil von aus dem Knochenmark stammenden Makrophagen bzw. im Verhältnis ein erniedrigerter Anteil mikroglialer Zellen im GAMM-Kompartiment (s. Abbildung 48).

Zur Abschätzung der GAMM bezogenen CXCR2-Expression führten wir eine entsprechende Kolokalisierungsanalyse mit Darstellung der Iba1+/CXCR2⁺ Fläche bzw. TMEM119⁺/CXCR2⁺ kolokalisierten Fläche im Verhältnis zur Gesamt-CXCR2⁺ Fläche. Hier zeigte sich CXCR2-Positivität durch Dexamethason vermehrt auf Iba1-negativen Zellen bzw. relativ gesehen im GAMM vermindert exprimiert. Das Verhältnis von TMEM119 positiver

CXCR2-Expression zur Gesamt-CXCR2-Expression zeigte sich durch die Dexamethasonbehandlung unverändert (s. Abbildung 49).



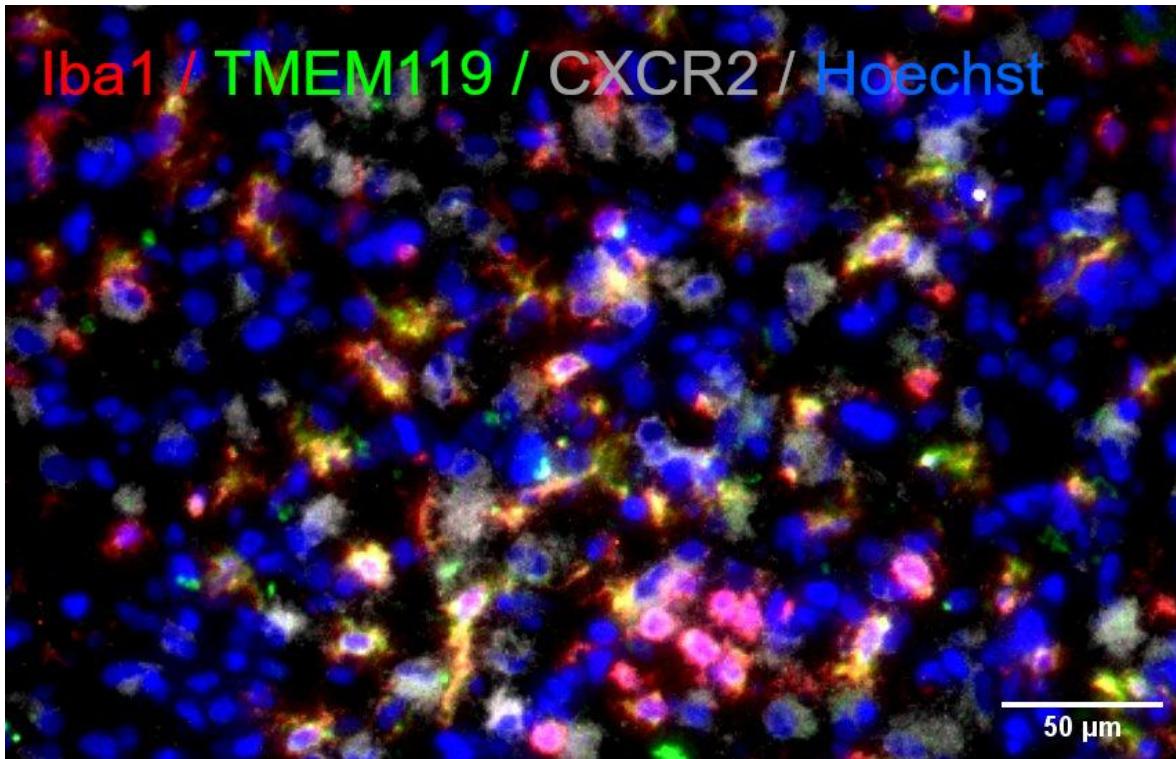
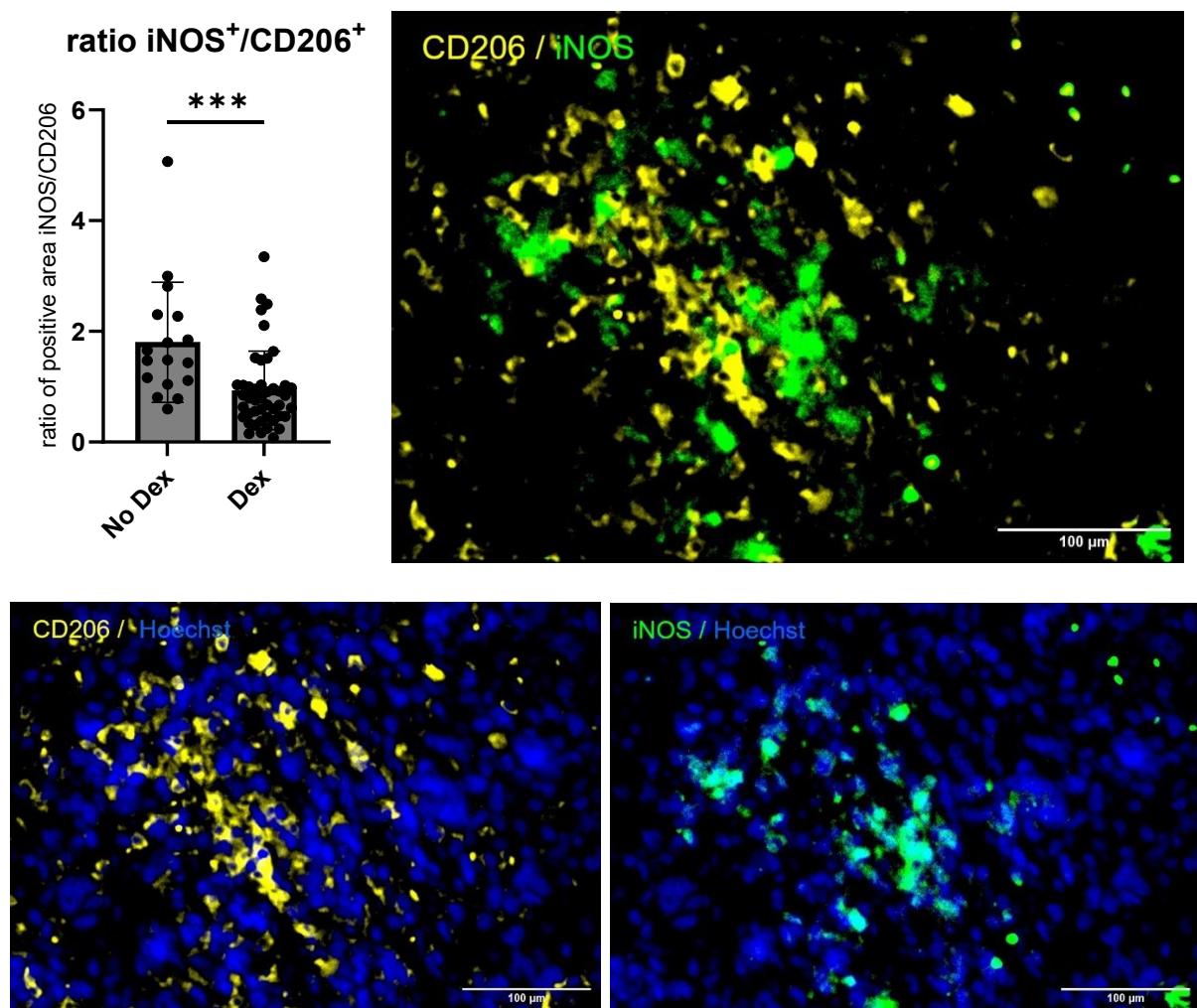


Abbildung 49: Auswertung der CXCR2-Expression und Kolokalisierung mit Makrophagen oder Mikroglia in FFPE-Schnitten. *Oben links:* In der Kolokalisierungsanalyse zeigt sich der Anteil des Iba1⁺/CXCR2⁺ Areals am Gesamt-CXCR2⁺ Areal nach Dexamethasonbehandlung signifikant erniedrigt (ungepaarter t-Test, $p=0,0094$), was auf einen erhöhten Anteil anderer CXCR2 exprimierender Zellen hindeutet oder auf einen niedrigeren Anteil CXCR2-positiver GAMM. *Oben rechts:* Exemplarische Darstellung Iba1-positiver Zellen (rot) und CXCR2-positiver Zellen (gelb). *Zweite Reihe links:* Kolokalisierungsanalyse mit Abbildung der TMEM119⁺/CXCR2⁺ Fläche am Gesamt-CXCR2⁺, was sich nach Dexamethasonbehandlung unverändert zeigt (ungepaarter t-Test, $p=0,2075$) und somit auf eine Dexamethason-unabhängige mikrogliale CXCR2-Expression hindeutet. *Zweite Reihe rechts:* Exemplarische Darstellung TMEM119-positiver Zellen (grün) und CXCR2-positiver Zellen (gelb). *Dritte Reihe links:* Relative Fläche (%), die sich in den immunfluoreszenzgefärbten FFPE-Schnitten CXCR2⁺ zeigt. In der Dexamethason-behandelten Gruppe zeigt sich keine signifikante Änderung des CXCR2-positiven Anteils (ungepaarter t-Test, $p=0,1981$). *Dritte Reihe rechts:* Exemplarische Darstellung CXCR2-positiver Zellen (gelb) und der Zellkerne (blau). *Unten:* Darstellung aller vier überlagerten Kanäle (Iba1 = rot, TMEM119 = grün, CXCR2 = grau, Zellkerne = blau).

3. iNOS/CD206-Verhältnis: iNOS/CD206-Quotient = M1/M2-Verhältnis im Schnitt

Zur Darstellung der M1-/M2-Marker im zellulären Kontext haben wir eine 4-fach Immunfluoreszenzfärbung zur Anwendung auf den entsprechenden FFPE-Schnitten der einzelnen humanen Glioblastomproben etabliert. Es erfolgte die kombinierte Anwendung von primären goat anti-Iba1 (zur Darstellung der gesamten GAMM), rabbit anti-CD206 (M2) und mouse anti-iNOS (M1) Antikörper in Kombination mit entsprechenden sekundären Antikörpern donkey Anti-Goat IgG (Cy5), donkey Anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor 594) und donkey Anti-Mouse IgG (Alexa Fluor 488) sowie Hoechst33342 zur nukleären Darstellung.

Zur Auswertung wurde die CD206 und iNOS positive relative Fläche (%) anhand zufällig ausgewählter Areale, die bei 20-facher Vergrößerung aus multiplen (im Mittel n=40) Sichtfeldern zusammengesetzt waren, bestimmt und anschließend der Quotient aus iNOS und CD206 bestimmt. Hier zeigte sich bei Dexamethasonbehandlung ein signifikant geringerer Quotient (s. Abbildung 50).



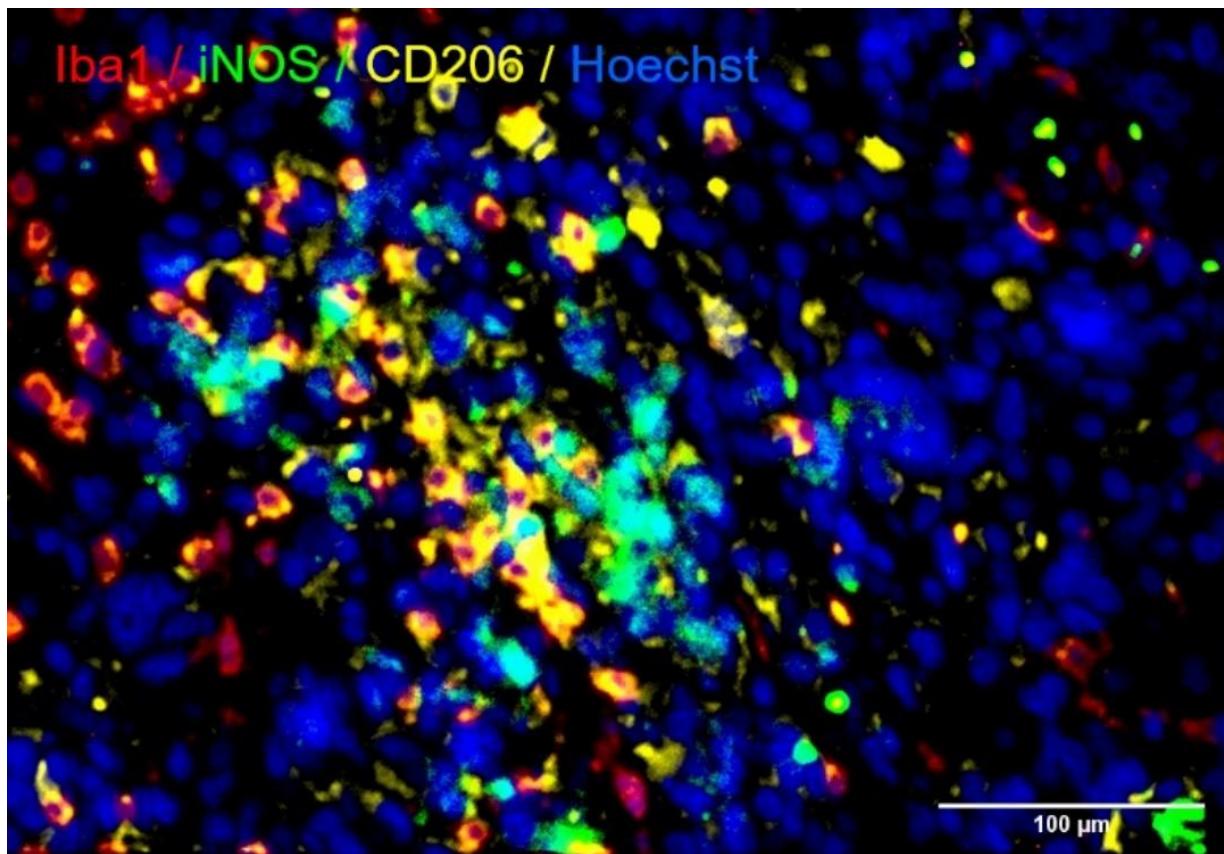


Abbildung 50: Darstellung der iNOS (M1) und CD206 (M2) Verteilung im FFPE-Schnitt. *Oben links:* Verhältnis der iNOS⁺ Fläche (M1-Marker) zur CD206⁺ Fläche (M2-Marker). Hier zeigt sich der Quotient in der Dexamethason-Gruppe erniedrigt (ungepaarter t-Test, $p=0,0005$), was auf eine geringere iNOS- oder erhöhte CD206-Positivität hinweist. *Oben rechts:* Beispielhaft Darstellung von CD206 (gelb) und iNOS positiven (grün) Zellen im Overlay. *Mitte:* CD206 (gelb) und Zellkernfärbung (blau) (links) sowie iNOS (grün) und Zellkernfärbung (blau). *Unten:* Overlay der gesamten 4-fach Immunfluoreszenzfärbung (Iba1 = rot, iNOS = grün, CD206 = gelb, Zellkerne = blau).

4. Diskussion

a. Übersicht

Ziel des ersten Teils dieser Dissertation war zunächst die Etablierung des *ex vivo* Ratten-OBSC-Modells zur Untersuchung von immunologischen Einflüssen auf das Auswachsen von Glioblastomzelllinien-Sphäroiden. Hier waren das mikrogliale Kompartiment, die mit pleiotropen immunologischen Effekten einhergehende und routinemäßig durchgeführte Dexamethasonbehandlung, sowie immunologische Signalachsen im Glioblastom von besonderem Interesse. Mehrere Überlegungen wurden hier vorausgesetzt: 1) Zur Reduktion xenogener Effekte wurden speziesgetreu Rattenzelllinien verwendet, welche zunächst anhand verschiedener *in vitro* Experimente (Transwell Invasion, Wundheilungsmigrationsassay, ATP-Assay etc.) in ihrem Verhalten charakterisiert wurden. 2) Das Vorherrschen von Mikroglia ohne einwandernde peripheren Makrophagen (BMDM) im OBSC eignet sich als Modell für eine gewisse Nachbildung der Situation in der Randzone des Glioblastoms mit Erstkontakt zu vorherrschenden hirnresidenten Mikroglia. 3) Die Möglichkeit der Mikroglia-Depletion eignet sich zur Darstellung des mikroglialen Effekts auf das Auswachsen des Zellliniensphäroids. 4) Aus dem Überstand des OBSC kann hypothesen-generierend die differentielle Sekretion von immunologischen Faktoren, abhängig von Behandlung und Mikroglia-Depletion, untersucht werden. 5) Die Beeinflussung eines differentiellen Signalweges kann durch entsprechende Behandlung den Effekt auf das Zelllinienauswachsen aufzeigen.

Im zweiten Teil dieser Dissertation sollte der durch Dexamethason und Mikroglia differentiell beeinflusste Signalweg (=CXCL2-CXCR2-Achse) an retrospektiven humanen Glioblastomproben nachvollzogen werden: 1) Zunächst wurden Glioblastompatienten mit vorhandenem FF-Gewebe in unserer Biobank identifiziert, die präoperativ kein Dexamethason erhalten hatten. Entsprechend gematchte Patienten, die präoperativ Dexamethason erhalten hatten, wurden darüber hinaus identifiziert. 2) Hypothesen-getrieben erfolgte die Untersuchung der CXCL2/IL8-CXCR2-Achse bezogen auf die Genexpressionsebene mittels qPCR (FF-Sample), der Proteinebene (CXCL2/IL8) mittels Western Blot und der Verteilung der CXCR2-Expression *in situ* in Bezug auf Mikroglia (Iba1+/TMEM119+) und Makrophagen (Iba1+/TMEM119-) anhand der entsprechenden FFPE-Schnitte. 3) Das myeloide Kompartiment wurde auf die differentielle Expression der klassischen M1/M2-Marker mittels qPCR (iNOS-Expression=M1/Arg1=M2) sowie die zelluläre Verteilung mittels 4-plex Immunfluoreszenzfärbung (Iba1, iNOS, CD206) an den entsprechenden FFPE-Schnitten untersucht.

b. Einordnung der *in vitro* und *ex vivo* Ergebnisse

Die Untersuchungen am Rattenhirnschnittmodell (OBSC) stellen einen Kompromiss zwischen mechanistischer Vereinfachung zur experimentellen Untersuchung einzelner Komponenten (z.B. Mikroglia, CXCL2-CXCR2-Achse) und biologischer Realitätsnähe dar. Insbesondere die von systemisch einwandernden Immunzellen abgetrennte immunologische Tumormikroumgebung (TiME) ermöglicht die isolierte Betrachtung des Effektes des mikroglialen Kompartiments auch durch die Möglichkeit der hochspezifischen Mikroglia-Depletion. Hierdurch lässt sich insbesondere die mikroglia-dominierte peritumorale Zone des Glioblastoms nachstellen und ermöglicht entsprechende mechanistische Untersuchungen. Somit konnten wir den Einfluss von zwei unterschiedlichen OBSC Sphäroid Mikroumgebungen (Mikroglia nativ und Mikroglia-depletiert) untersuchen und die Effekte der Behandlung mit Dexamethason und CXCR2-Blockade nachvollziehen.

i. Mikroglia im *ex vivo* Modell

Das als GAMM zusammengefasste Kompartiment im Glioblastom stellt den Hauptanteil der immunologischen Tumormikroumgebung im Glioblastom dar [238]. Die phänotypische Betrachtung dieses Kompartiments im Glioblastom kann klassischerweise bestimmten Markern entsprechend der M1/M2-Klassifikation folgen [47, 48], ohne hierbei zwischen den ontogenetisch unterschiedlichen Zellgruppen der hirn-residenten Mikroglia und den aus der Peripherie eingewanderten Makrophagen zu unterscheiden [41–43].

Während Untersuchungen zur prognostischen Rolle des GAMM-Kompartiments unterschiedliche, aber meist Zusammenhänge mit negativen protumorigen Einflüssen auf das GBM herstellen konnten [58–61] und eine hohe Anzahl von GAMM-Zellen mit einer schlechteren Gesamtüberlebensrate in Verbindung gebracht wurde, und dementsprechend präklinische Studien mit Re-Edukation oder Depletion von GAMM-Zellen Vorteile aufzeigen konnten, erwies sich dies jedoch in klinischen Studien als nicht wirksam (79). Gleichzeitig korrelierte ein höherer Anteil von Mikrogliazellen im Kompartiment der Immunzellen mit einem verbesserten Gesamtüberleben bei GBM-Patienten (80). Insbesondere gilt es, die hohe Heterogenität in der örtlichen Verteilung der mikroglialen und Makrophagen-Anteile zu beachten, was wiederum für eine differentielle Rolle der GAMM-Subgruppen spricht: Während im zellreichen Tumorzentrum, Nekrosen-assoziiert und perivaskulär eingewanderte Makrophagen vorherrschen, findet sich in der peritumoralen Randzone des Glioblastoms als

„immunologischer Erstkontakt“ die Gruppe der hirn-residenten Mikroglia [45]. Die Umwandlung von direkt anti-tumoral wirksamer mikroglialer Effektorzelle über Tumorpermissivität hin zu Generierung einer protumorigen immunologischen Tumormikroumgebung im räumlich-zeitlichen Verlauf der peritumoralen Glioblastomzone wird von verschiedenen immunologischen Signalkaskaden und Zell-Zell-Interaktionen ausgelöst [103, 239]. Ein Ziel dieser Dissertation war es, zunächst eben diese mikroglia-dominierte Randzonen-Situation möglichst realitätsnah und gleichzeitig experimentell beeinflussbar im *ex vivo* OBSC-Modell darzustellen und Effekte auf das Auswachsen von allogenen Rattenzelllinien-Sphäroiden abhängig vom mikroglialen Kompartiment zu untersuchen.

Aufgrund einer Vielzahl bisheriger Untersuchungen zur therapeutischen mikroglialen Depletion im Glioblastom mit der Rationale einer mikroglialen Re-Edukation hin zu anti-tumoral wirksamer Mikroglia sind unterschiedliche Wirkstoffe zur mikroglialen Depletion verfügbar [240]. PLX5622 als CSF1-Rezeptor-Antagonist führt über eine Suppression der pERK1/2 Stimulation zu einem reduzierten Überleben der myeloiden Zellen, es zeigt sich effizienter zu schon länger verwendeten Mikrogliadepletions-Systemen (wie z.B. Clodronat) oder dem Vorgänger Pexidartinib (PLX3397), ist sehr selektiv in der Suppression der pERK1/2 Stimulation mit 20-fach höherer Selektivität für den CSF1-Rezeptor verglichen mit anderen Kinaseninhibitoren und somit sehr spezifisch in der myeloiden Depletion mit nur geringfügigen langanhaltenden Effekten auf andere Zellarten [232, 241]. In unserem Modell zeigte die Vorbehandlung mit PLX5622 zur Depletion der Mikroglia keinen Einfluss auf das astrogliale Kompartiment im OBSC.

Über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg zeigte sich in unserer Untersuchung zwar eine moderate Regeneration von Mikroglia, wie bei den therapeutischen Ansätzen der Re-Edukation erwünscht [242], jedoch war die Mikrogliazellzahl anhaltend erniedrigt, so dass ein Vergleich von Mikroglia nativen und Mikroglia-depletierten OBSC möglich war.

Zunächst zeigte sich nach dem Aufbringen des Sphäroids auf die OBSC, dass das Vorhandensein von Mikroglia mit einem geringeren Auswachsen (Proliferation, Migration, Invasion) der Glioblastomzelllinien verbunden war bzw. auf den Mikroglia-depletierten OBSC ein erhöhtes Auswachsen zu beobachten war. Dies zeigt einmal mehr die initiale anti-tumorale Funktion von Mikroglia, die auch alleinstehend als immunologische Effektorzellen fungieren und somit ein Auswachsen begrenzen können [74]. Morphologisch konnten wir peri-sphäroidal

im OBSC aktivierte amöboide Mikroglia nachvollziehen, was eben diese anti-tumorale Aktivität dieses Zellkompartiments unterstreicht.

ii. Dexamethasoneinflüsse *in vitro* und *ex vivo*

Da sich in einer Reihe von Zellkulturexperimenten *in vitro* direkte hemmende Effekte auf die entsprechende Zelllinien gezeigt hatten, wurden Dexamethason zeitweise sogar anti-tumorale Effekte bei der Anwendung im Glioblastom zugeschrieben [121, 122, 138–140].

Bei der direkten zweidimensionalen Untersuchung in *in vitro* Assays konnten wir für unsere Zelllinien unterschiedliche Effekte beobachten:

So zeigte sich im Sphäroidmigrationsassay für die S635 und die 9L Zelllinien mit steigender Dexamethasondosis ein signifikant abnehmendes Auswandern. Für die nicht-neoplastische Astrozytenzelllinie zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied durch Dexamethason. Andererseits zeigte sich im ATP-Assay eine dexamethasondosisabhängige steigende Viabilität für die S635 Zelllinie, jedoch mit steigender Dexamethasonbehandlung eine abnehmende Viabilität sowohl für die 9L und die Astrozytenzelllinie. Bei entsprechend negativen Auswirkungen von Dexamethason auf die Astrozytenzelllinienviabilität *in vitro* wurde der Effekt von Dexamethason auf das astrozytäre Kompartiment mittels GFAP-Immunfluoreszenzfärbung im Ratten OBSC untersucht: Bei der sehr hohen Dosierung (1 μ g/ml) zeigten sich hier tatsächlich ein abnehmender Astrozytengehalt mittels GFAP-Färbung im kryosektionierten OBSC, jedoch keine Veränderung des Astrozytengehalts für die geringere Dexamethasondosis.

Einerseits konnte also ein antimigratorischer Dexamethason-Effekt *in vitro* für beide Zelllinien gezeigt werden, andererseits zeigte die Dexamethasonbehandlung einen deutlichen Zelllinienabhangigkeit bezogen auf die Viabilität: für S635 zeigte sich anti-parallel zur abnehmenden Migration durch Dexamethason im Sphäroidmigrationsassay sogar eine zunehmende Viabilität im ATP-Assay, während 9L sowohl anti-migratorisch und mit verminderter Viabilität auf Dexamethason reagierte.

Diese *in vitro* beobachtete anti-9L-Wirkung (Beobachtungszeitraum 48 Stunden) kam im *ex vivo* OBSC-Modell (Beobachtungszeitraum 7 Tage) sogar mit einer für manche Schnitte abnehmenden Fläche des Zellliniensphäroids über die Zeit zum Ausdruck, was entsprechend der anti-migratorischen Effekte und der verringerten Viabilität *in vitro* zu werten ist bei zusätzlichem Einwirken der zellulären OBSC-Mikroumgebung.

Aufgrund dieser direkten Toxizität auf die 9L Zelllinie (*in vitro* und *ex vivo*) musste diese Zelllinie zur weiteren Untersuchung des Wechselspiels von Dexamethason und Mikroglia ausgeschlossen werden. Das Ergebnis für die 9L Zelllinie reflektierte hier einmal mehr Ergebnisse aus *in vitro* Untersuchungen, wo Dexamethason „tumorizid“ auf die Zelllinien *in vitro* wirkte, und daraus folgernd Dexamethason im Glioblastom zwischenzeitlich sogar anti-tumorale Wirkung zugeschrieben wurde [138–142].

Anders zeigten sich für die S635-Zelllinie in unserer *ex vivo* Untersuchung im mikroglia-nativen OBSC ein erhöhtes Auswachsen bei Behandlung mit Dexamethason und kein Effekt im mikroglia-depletierten OBSC.

In vitro beobachtete Einflüsse im Sinne eines anti-migratorischen Effekts oder eine gesteigerte Viabilität zeigten sich hier im Kontext mit indirekten Einflüssen in Abhängigkeit des Vorhandenseins von Mikroglia.

Durch die Behandlung mit Dexamethason zeigte sich der anti-tumorale Effekt des mikroglialen Kompartiments auf mikroglia-nativen OBSC blockiert, möglicherweise durch Induktion einer Dysfunktionalität des mikroglialen Zellkompartiments bzw. durch immunsuppressive Wirkung auf die Mikroglia durch Dexamethason [243].

iii. CXCL2-CXCR2-Achse *in vitro* und *ex vivo*

In unserem Modell haben wir CXCL2 als ein von Dexamethasonbehandlung und vom Vorhandensein von Mikroglia abhängiges, differenziell sezerniertes Chemokin identifiziert.

CXCL2 wird hauptsächlich von Astrozyten im Gehirn, aber auch von myeloiden Zelltypen ausgeschüttet, während der entsprechende Rezeptor CXCR2 von Mikroglia und anderen Immunzellen exprimiert wird [84]. Auch wenn der genaue CXCL2-sezernierende Zelltyp in unserer *ex vivo* Situation unklar bleibt, wurden Veränderungen der CXCL2-Sekretion und des allgemeinen humoralen Fingerabdrucks in Abhängigkeit von (Vor-)Behandlungen analysiert.

Generell zeigte sich eine verringerte CXCL2-Sekretion in den PLX5622-vorbehandelten Schnitten zu allen drei Zeitpunkten, vergleicht man diese unabhängig von den sonstigen Behandlungen, wobei sich die Überstände der zweiten Versuchshälfte (Tag 6) weniger unterschieden als die Überstände der ersten Versuchshälfte (Tag 3) oder der Baseline an Tag 0. Die tendenzielle Nivellierung der CXCL2-Sekretion über die Zeit könnte mehrere Gründe haben: 1) Die auch in unserem Versuch in der Immunfluoreszenz nachgewiesene Regeneration

der Mikroglia kann zu einer vermehrten CXCL2-Sekretion in der PLX5622-vorbehandelten Kondition beitragen und somit die Unterschiede egalisieren. 2) Wechselwirkungen mit dem Tumorsphäroid könnten über die Zeit zu einer Verminderung der CXCL2-Sekretion führen, indem die mikrogliale oder von sonstigen Zellen ausgehende CXCL2-Sekretion unterdrückt wird, während eine initiale Antwort auf das Tumorsphäroid zu einem höheren Signal führt. 3) Die kontinuierliche Degradation des OBSC könnte zu verminderter Aktivität und Viabilität und somit verringriger CXCL2-Sekretion, unabhängig von der Vorbehandlung, führen. 4) Direkte Effekte durch die CSF-1R-Antagonisierung führen am Anfang des Beobachtungszeitraum zu betonten Effekten, lassen aber im Verlauf nach. 5) Mikrogliale *Exhaustion* durch entzündliche Reaktionen und Vorgänge durch die Rattenhirnschnitt-Situation führen zu einem deutlichen Nachlassen der CXCL2-Sekretion über die Zeit.

Bei Betrachtung der CXCL2-Sekretion in den Kontroll-OBSC ohne Sphäroid mit und ohne PLX5622-Vorbehandlung ist auffallend, dass die CXCL2-Sekretion in Mikroglia nativen Kontroll-OBSC über die Zeit deutlich abnimmt und sich hier eine anfänglich höhere CXCL2-Sekretion im Vergleich zu den PLX5622-vorbehandelten Kontroll-OBSC an Tag 6 nivelliert. Das Aufbringen eines Sphäroids auf den Rattenhirnschnitt war mit einer Induktion der CXCL2-Sekretion vergesellschaftet. Die CXCL2-Konzentration in Kontroll-OBSC mit Sphäroid und ohne PLX5622-Vorbehandlung ist über die Zeit anhaltend erhöht. Dieser Gegensatz verdeutlicht, dass durch Aufbringen des Sphäroids ein entsprechender mikroglialer Reiz zum Tragen kommt, der zu einer Zunahme der CXCL2-Konzentration führt. Möglicherweise durch die Regeneration der Mikroglia oder durch sonstige OBSC-Zellen vermittelt zeigt sich eine erhöhte CXCL2-Konzentration an Tag 6 dann auch in der PLX5622-vorbehandelten Kondition. Eine Sekretion von CXCL2 durch das S635-Sphäroid selbst konnte als vernachlässigbar gering in der Baseline Messung ausgeschlossen werden. Es scheint also vielmehr die Interaktion des Sphäroids mit den co-kultivierten Zellen des OBSC zu sein, die zu einer erhöhten CXCL2-Zytokinsekretion führt.

Bei gleichzeitiger Behandlung mit dem inflammatorischen IL-22 zeigte sich eine signifikant verstärkte CXCL2 Sekretion nach Aufbringen des Sphäroids im Mikroglia nativen OBSC. Eine entsprechend IL-22-induzierte Erhöhung von CXCL2 ist bei kolorektalen Tumorzelllinien beschrieben worden, da hier die pro-inflammatorische Wirksamkeit von IL-22 über ein CXCL2-vermitteltes Neutrophilen-Recruitment vermittelt wird [244].

Über die Zeit betrachtet führt Interleukin-10 als anti-inflammatorisches Zytokin ebenso zu verstärkter CXCL2-Sekretion an Tag 3 sowohl Mikroglia nativ als auch PLX5622-vorbehandelt, jedoch zeigt sich im Direktvergleich kein Unterschied zur Kontrolle ohne Behandlung. Es zeigt sich also durch die anti-inflammatorische Signalisierung durch IL-10 keine verminderte CXCL2-Sekretion. Zwar konnte im murinen Modell eine Repression von CXCL2-Sekretion durch IL-10 in Makrophagen beobachtet werden [245], möglicherweise hat IL-10 in diesem Zusammenhang keinen Effekt auf die in unseren OBSC isoliert vorhandene Mikroglia.

Zwar induziert Dexamethason die Ausschüttung von IL-10 zum Beispiel in dendritischen Zellen [246], jedoch vermittelt Dexamethason anscheinend - nach Integration der ausbleibenden Effekte durch IL-10 - direkt oder über andere Signalwege einen deutlichen Abfall der CXCL2-Konzentration am Ende des Beobachtungszeitraum, der sich abhängig vom Vorhandensein von Mikroglia zeigt. Dies wäre im Einklang mit Beobachtungen an LPS-stimulierten Lungen-Makrophagen von COPD-Patienten, deren CXCL2-Sekretion durch Dexamethason ebenfalls reprimierbar war [247].

Zusammenfassend zeigen sich Veränderungen der CXCL2-Expression durch die verschiedenen Behandlungen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung. Parallelen lassen sich hier in erster Linie mit vorangegangenen *in vitro* Zellkulturexperimenten ziehen. Untersuchungen der humanen *in vivo* Situation stellen sich möglicherweise durch multifaktorielle Einflüsse und eine komplexere TiME vielschichtiger und anders dar.

iv. Zusammenspiel von Mikroglia, Dexamethason und CXCL2-CXCR2-Achse

Kontext-abhängige Effekte der CXCL2-CXCR2-Achsen-Blockade auf das Auswachsen der Sphäroide im OBSC ließen sich insbesondere in Abhängigkeit der Behandlung mit Dexamethason und dem Vorhandensein von Mikroglia auf den OBSC nachweisen.

Abhängig von der Zusammensetzung unserer sphäroidalen Mikroumgebung führte Dexamethason zu einem verstärkten Auswachsen bei nativen OBSC, aber zu einem verringerten Auswachsen bei PLX5622-behandelten (Mikroglia-depletierten) OBSC. Es hat sich gezeigt, dass die von GAMM ausgehenden Signale entweder pro-tumorigene oder anti-

tumorigene Wirkungen haben [62, 75], und es wurden kontextabhängige Synergismen beschrieben [81].

Die Rolle von immunmodulierenden Zytokinen, die von Mikroglia freigesetzt werden [248], scheint zumindest teilweise der Grund für die Dexamethason-abhängige wachstumshemmende oder -fördernde Wirkung zu sein.

Die Blockade von CXCR2 zeigte synergistische Wirkungen mit Dexamethason auf die Steigerung des Auswachsens in Mikroglia nativen OBSC, hatte aber keine Auswirkungen auf das Sphäroid-Auswachsen in der PLX5622-behandelten, Mikroglia-depletierten OBSC-Mikroumgebung.

Präklinisch zeigte die Blockierung der CXCR2-Achse in Mausexperimenten ein geringeres Tumorwachstum, aber in klinischen Studien wurde kein Vorteil festgestellt [182, 185]. Interessanterweise zeigte die Blockade der CXCL2-CXCR2-Achse in unserem Modell stark kontextabhängige Wirkungen, je nachdem, ob eine Dexamethason-Behandlung und/oder eine PLX5622-Vorbehandlung beteiligt war.

Die gegenseitige Beeinflussung von Mikroglia, Dexamethason und der CXCL2-CXCR2-Achse verdeutlicht in unserem mechanistischen *ex vivo* Modell, dass mikroglia-bezogene therapeutische Ansätze (Mikroglia-Depletion) oder die Chemokin-bezogene Blockade der CXCL2-CXCR2/IL8- Achse durch die routinemäßige Behandlung mit Dexamethason in ihrer Wirksamkeit und ihrem Effekt verändert oder sogar umgekehrt werden können und insbesondere bei der klinischen Testung etwaiger Substanzen die präoperative Behandlung mit Dexamethason berücksichtigt werden sollte.

In unserem Modell verdeutlicht die pro- oder anti-tumorale Wirkung der Mikroglia innerhalb der ersten Tage der Interaktion mit den Tumorzellen einmal mehr, warum Mikroglia-zentrierte Strategien gegen das Glioblastom, wie z. B. die Depletion oder Umerziehung mit Wirkstoffen wie PLX5622, in vielen Studien gescheitert sein könnten [249].

Die Zusammenhänge zwischen Dexamethason, PLX5622-Vorbehandlung (d. h. Mikroglia-Depletion) und der CXCL2/CXCR2-Achse unterstreichen die Schwierigkeit, Behandlungsoptionen zu finden, die sich in verschiedenen Kontexten als wirksam erweisen.

Limitationen unseres *ex vivo* Modells ergeben sich aus der möglichen Induktion von Mikroglia- oder Tumormikroumgebungs-bezogenen Veränderungen durch externe Stimuli, oder mögliche nachhaltige Effekte der vorab durchgeföhrten CSF-1R-Inhibition mit PLX5622 auch auf

sonstige Zellarten im OBSC. Darüber hinaus geht aus dem Modell nicht hervor, auf welchen Zellarten der CXCR2-Rezeptor sitzt und auf welche Zellarten somit die Blockade des CXCR2-Rezeptors wirksam wird. Zur besseren translationalen Einordnung der differentiellen Effekte im OBSC wurden daher die generierten Hypothesen aus dem Ratten OBSC weiter an humanen Glioblastomproben untersucht.

- c. Kontextualisierung der Untersuchungen an humanem GBM-Gewebe
 - i. Patienten mit Dexamethasongabe vor der ersten Glioblastom-OP zeigen verkürztes Gesamtüberleben in unserer Kohorte

Prominent in der retrospektiven Auswertung der klinischen Daten zeigt sich, übereinstimmend mit der jüngsten Meta-Analyse von Scheffler et al. (2024) [119], dass die Dexamethason-behandelte Gruppe ein schlechteres Gesamtüberleben bei unverändertem progressionsfreiem Überleben im Vergleich zur doch geringen Anzahl Dexamethason-naiver Patienten an unserem Zentrum zeigte. Zwar handelt es sich hier um eine zu den Dexamethason-naiven Patienten gematchte Kohorte, dennoch ist die Vergleichbarkeit aufgrund der retrospektiven Natur der klinischen Datenauswertung limitiert. Effekte durch Begleiterkrankungen, die zum Beispiel zu einer Verzögerung der Operation und damit einhergehend zu einer möglicherweise verlängerten präoperativen Dexamethasongabe führen, aber per se mit einem möglicherweise schlechteren Outcome assoziiert sind, wären beispielsweise Confounder, die hier keinerlei Berücksichtigung finden. Grundsätzlich besteht die Frage, warum genau diese Kohorte von Patienten bei insgesamt niederschwelliger Gabe von Dexamethason bei fast allen anderen Glioblastompatienten eben kein Dexamethason erhalten hat, und ob sich diese Voraussetzung dann in einem insgesamt besseren Gesamtüberleben widerspiegelt, oder ob das Ausbleiben der Dexamethasongabe per se zu einem verlängerten Gesamtüberleben geführt hat.

Immunologisch bezogene Genexpressionsveränderungen zeigen sich in unseren Untersuchungen unabhängig oder - wenn überhaupt - nur mit moderater Korrelation zur Dexamethasondosis. Eine ausbleibende Korrelation aus kumulativer Dosis und entsprechenden immunologischen Veränderungen könnte durch einen sehr frühen Sättigungseffekt bedingt sein. So beschreiben Vecht et al. (1994) in cerebralen Metastasen einen Deckeneffekt zur Symptomkontrolle bereits bei 4 mg Dexamethason pro Tag [250], während Wong et al. (2015) ein verringertes Gesamtüberleben ab einer Dosierung von > 4,1 mg/d bei Rezidiv-GBM beschreiben [113]. Eine Korrelation von Dexamethasondosis und Gesamtüberleben war in

unserer Kohorte mit durchweg höheren Dosierungen aufgrund dessen oder aufgrund der geringen Gruppengröße somit ebenso nicht zu führen.

Darüber hinaus könnten andere Einflüsse, wie die vorhandene immunologische Zusammensetzung und dadurch bedingte kontext-abhängige Effekte, oder das Ausmaß der Blut-Hirn-Schranken-Störung und damit ein unterschiedliches Ausmaß der Penetration von Dexamethason in das Tumoralreal unabhängig von der gegebenen Dosierung entscheidende Einflussfaktoren auf die tatsächliche Auswirkung von Dexamethason sein.

Eine weitere Problematik bei der Verallgemeinerung unserer Ergebnisse stellt die im GBM vorhandene intratumorale Heterogenität dar. Die Proben aus unserer Biobank sind nach Entnahmestandort oder Tumorzone nicht kontrolliert, so dass Einflüsse wie Nekrose, Hypoxie, Invasionszone und sonstige lokalisatorisch bedingte Einflüsse auf die Dexamethasonwirkung keine Beachtung finden können. Lokalisatorisch bedingte differentielle Zellzusammensetzungen (z.B. Mikroglia/Makrophagen-Verteilung) führen zu einem zusätzlichen Hintergrundrauschen bei relativ kleiner Gruppengröße.

ii. Einflüsse von Dexamethason auf iNOS (M1) und ARG1 (M2) im humanen Glioblastom und humanen cerebralen Melanom und NSCLC Metastasen

ARG1 ist ein klassischer M2-Marker der myeloiden Zellreihe, zeigt somit eine Polarisierung zum protumorigen Phänotyp an mit Förderung der Angiogenese, Tumorinvasion und Immunsuppression durch Bildung von Faktoren wie VEGF, TGF β und IL-10 [50]. Funktionell ist ARG1 ein metabolisches Enzym und spielt eine entscheidende Rolle im Harnstoffzyklus mit Katalyse von L-Arginin in Harnstoff und Ornithin und vermittelt somit bei erhöhter Expression eine verringerte Verfügbarkeit von L-Arginin in der Tumormikroumgebung für verschiedene zelluläre Prozesse [251]. Eine Hochregulierung von ARG1 ist im Glioblastom beschrieben, sowohl in den Tumorzellen als auch in GAMM, was wiederum über eine verringerte Verfügbarkeit von L-Arginin zu einer unterdrückten T-Zell-Funktion, verringerten NO-Produktion durch iNOS, und Tumorprogression führen kann [251, 252]. Versuche zur therapeutischen Blockade mit selektiven ARG1/2-Inhibitoren haben inzwischen Daten zu verringertem Gliomwachstum erbracht und ein erhöhtes Ansprechen von PD-1-Blockern gezeigt [253].

Effekte von Dexamethason auf die ARG1-Expression scheinen gewebespezifisch zu sein: während z.B. in Leberzellen Dexamethason die ARG1-Expression durch die Induktion von CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β) hochreguliert [254, 255], hemmt es die Lipopolysaccharid-induzierte ARG1-Expression in Alveolarmakrophagen [256], was wiederum auf einen komplexen Regulationsmechanismus mit Transaktivierungs- und Transrepressionswegen hindeutet.

Einerseits ist also ARG1 ein Marker für die M2-Polarisierung im klassischen myeloischen M1/M2 Spektrum, andererseits funktionell ein immunmetabolisch wirksames Enzym, welches wiederum gewebespezifisch durch Dexamethason in der Expression beeinflusst wird.

In dieser Arbeit zeigen wir - nach bestem Wissen - erstmalig die Auswirkungen von Dexamethasongabe auf die ARG1-Expression in humanen Glioblastom- und Hirnmetastasengewebeproben, die retrospektiv als präoperativ Dexamethason-behandelt bzw. Dexamethason-naiv identifiziert wurden. Hier zeigt sich eine deutlich erhöhte Genexpression sowohl in der Gruppe der Glioblastome als auch bei Hirnmetastasen nach Anwendung von Dexamethason. Interessanterweise zeigt sich dieser Effekt bei den nach präoperativer Dauer der Dexamethasongabe stratifizierten Patientenproben (≤ 4 Tage und > 4 Tage präoperative Dexamethasonanwendung) nur in der Gruppe mit einer Dexamethasonanwendung > 4 Tage, was für eine entsprechende Latenz im Sinne von Veränderungen der zellulären Zusammensetzung oder in Gang gesetzten Signalwegen zu werten wäre. Darüber hinaus zeigt sich eine moderate positive Korrelation der ARG1-Expression mit Dosis/Dauer der Dexamethasongabe, was bei beobachteter Latenz der Genexpressionsveränderung allerdings erwartbar erscheint.

Bei den Hirnmetastasen zeigt sich der Effekt mit ausgeprägter Hochregulierung der ARG1-Expression insbesondere bei den cerebralen NSCLC-Metastasen trotz sehr kleiner Gruppengrößen ($n=5$ bzw. $n=12$). Derselbe Effekt ist - wenn auch nur tendenziell bei noch geringerer n -Zahl ($n=4$ bzw. $n=10$) - auch bei den cerebralen Melanommetastasen erkennbar.

Das Mitführen der cerebralen Metastasen als Vergleichsgruppe lohnt sich in diesem Zusammenhang durchaus. Musca et al. (2023) führten eine komparative Untersuchung der Immunzelllandschaft zwischen GBM und cerebralen Metastasen durch und beobachteten in beiden Entitäten eine Dominanz der myeloiden Zellen, jedoch mehr BMDM im Glioblastom und mehr TIL in cerebralen Metastasen [257]. Dass in beiden Entitäten durch Dexamethason eine Hochregulierung von ARG1 beobachtet wird, ist durchaus bemerkenswert:

Möglicherweise ist die Hochregulierung von ARG1 unabhängig von der GAMM-Art (Mikroglia oder Makrophagen), wobei aus unseren Untersuchungen die Quelle der ARG1-Expressionsveränderungen nicht eindeutig hervorgeht und durchaus Tumorzellen selbst ARG1-Hochregulieren könnten.

Im Einklang zur Hochregulierung von ARG1 im Sinne einer M2-Polarisierung steht die Beobachtung auf unseren FFPE-Immunfluoreszenzfärbungen, dass sich hier der Anteil von CD206 durch Dexamethason erhöht. Gleichzeitig scheint der Anteil von Iba1+ GAMM und TMEM119+ Mikroglia in der Dexamethason-behandelten Gruppe erniedrigt. Eine Veränderung der zellulären Zusammensetzung könnte eine Latenz in der veränderten Genexpression mit erklären.

Die mit T-Zell-Funktionseinschränkung einhergehende erhöhte ARG1-Expression im Glioblastom scheint durch Dexamethasongabe möglicherweise verstärkt, so dass hier Dexamethason die Effektoraktivität und anti-tumorale Reaktion weiter einschränkt.

Dem gegenüberstehend wird iNOS als klassischer Marker im M1/M2-Spektrum verwendet und zeigt eine M1-Polarisierung der Makrophagen an, es werden also in diesem Kontext proinflammatorische und anti-tumorale Effekte zugeschrieben [258]. Andererseits katalysiert das Enzym die Entstehung von NO in Glioblastomzellen, das über eine Steigerung von Angiogenese, Zellproliferation und Immunevasion zur Tumorprogression beiträgt [258]. Im GBM wird iNOS über den Transkriptionsfaktor STAT3 reguliert, welcher als hoch exprimierend in GBM-Stammzellen beschrieben wurde und hierüber proliferativ und protumorigen wirkt [259].

Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten wurde eine erhöhte glioblastomspezifische iNOS-Expression beschrieben, jedoch zeigen sich sehr starke inter-individuelle Unterschiede, was einmal mehr auf die sehr heterogene Rolle von iNOS hindeutet [260, 261].

Durch Dexamethason wird die iNOS-Expression in unterschiedlichen Zelltypen wie Makrophagen oder Endothelzellen durch transkriptionelle (via NF-κB Suppression) [262] und post-transkriptionelle Regulierung (verringerte mRNA Stabilität oder verstärkte Proteindegradation) unterdrückt [263].

Bei unserer Untersuchung zeigte sich für die Glioblastomproben keine Dexamethason-vermittelte verringerte Genexpression von iNOS. Eine entsprechende Korrelation für

Dauer/Dosis der Dexamethasongabe mit der iNOS-Expression zeigt sich nicht. Insgesamt fanden sich hier die oben erwähnten inter-individuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten im Sinne einer hohen Streubreite in allen Subgruppen. Auch bei Untersuchung der Hirnmetastasen zeigen sich durch Dexamethason keine Effekte, jedoch zeigte sich in der Subgruppenbetrachtung eine deutliche Tendenz zu verringrigerer iNOS-Expression in Dexamethason-behandelten cerebralen Melanommetastasen (bei sehr geringer Fallzahl nicht statistisch signifikant), keinerlei Tendenz ist bei den cerebralen NSCLC-Metastasen erkennbar.

Interessanterweise besteht ein Zusammenhang zwischen niedriger bis keiner iNOS-Expression in malignen Melanomzellen und distanten Metastasen [264], so dass man hier schlussfolgern könnte, dass die mittels qPCR abgebildete iNOS-Expression in erster Linie vom myeloischen Zellkompartiment stammt und nicht von den distant metastasierten Melanomzellen exprimiert wird, und Dexamethason so invers zur ARG1-Erhöhung zu einer verminderten iNOS-Expression führen kann.

Im NSCLC wiederum wird iNOS intrinsisch von Tumorzellen in ca. 1/5 der Fälle exprimiert, was hier nicht mit der Prognose zu korrelieren scheint [265]. Das wiederum könnte in unserem Fall die hohe Streubreite der iNOS-Expression ohne Effekt durch Dexamethason bei geringer Fallzahl erklären.

In unserer iNOS-Expressionsanalyse an Glioblastomproben ist davon auszugehen, dass diese Expression sowohl in Makrophagen als auch in Tumorzellen stattfinden kann, was sich wiederum als eine hohe Varianz innerhalb der Gruppen äußert und andererseits durch Dexamethason nur schwer beeinflussbar sein könnte.

Wie oben beschrieben, ergibt sich ein Einfluss von Dexamethason auf iNOS insbesondere auch post-transkriptional und post-translational. In unserer Immunfluoreszenzuntersuchung an FFPE-Schnitten derselben Patienten zeigt sich der M1-Marker iNOS im Verhältnis zu CD206 durch Dexamethason relativ erniedrigt.

iii. Einflüsse von Dexamethason auf die CXCL2/IL-8-Achse im humanen Glioblastom (und humanen cerebralen Melanom- und NSCLC Metastasen)

Neben gesteigerter Invasionsfähigkeit über autokrin sezerniertes IL-8 und konsekutiver Induktion von EMT [193, 266], und Förderung der Angiogenese über eine Stimulierung

endothelialer Zellproliferation [267], wird auch die Induktion von Therapieresistenz mit erhöhter IL-8-Expression im Glioblastom assoziiert [187].

In zwei älteren Untersuchungen an Glioblastomzelllinien (T98G oder GBM8401) zeigte sich durch Dexamethasonzugabe eine Abnahme der IL-8-mRNA-Expression und -Sekretion über eine Suppression des NF-κB-Signalweges, der normalerweise bei Aktivierung über inflammatorische Zytokine oder ROS zu einer Erhöhung der IL-8-Produktion führen würde [268, 269]. Sonstige Untersuchungen zum Einfluss von Dexamethason auf die IL-8-Sekretion oder Genexpression im humanen Glioblastomgewebe gibt es - wie in der Einleitung bereits erwähnt - nicht. Interessanterweise zeigt sich in unserem untersuchten Kollektiv eine tendenziell erhöhte IL-8-mRNA-Expression bei präoperativer Dexamethasongabe von > 4 Tagen, wenn auch hier erneut eine statistische Signifikanz bei geringer Fallzahl nicht erreicht wird. Diese Tendenz zeigt sich für die kürzer mit Dexamethason behandelten Patienten im Vergleich zu den Dexamethason-naiven Patienten nicht.

Auch wenn eine statistische Signifikanz verpasst wird, so erscheint unser tendenzielles Ergebnis mit Steigerung der IL-8-Expression nach längerer Dexamethasonbehandlung aus mehreren Gründen relevant: 1) Zwar wird der NF-κB Signalweg als wichtiger Regulationsweg der IL-8-Sekretion im Glioblastom beschrieben, so erscheint der hemmende Einfluss durch Dexamethason auf diesen Signalweg für die Regulation von IL-8 hier nicht entscheidend. 2) Erst eine länger andauernde Dexamethasongabe scheint zu einer Veränderung der IL-8-Expression zu führen, so dass indirekte Signalwege, oder eine mögliche Änderung der zellulären Zusammensetzung oder Polarisierung bei der veränderten Expression zum Tragen kommen. 3) Der Einfluss von Dexamethason könnte ein glioblastomspezifisches Phänomen sein, da sich im Vergleich dazu in den cerebralen Metastasen keinerlei Tendenzen erkennen lassen. 4) Die Genexpressionsänderung korreliert mit der semi-quantitativen Darstellung der letzten Proteinexpression im Western Blot.

Einschränkend ergibt sich jedoch keine Korrelation mit der AUC aus Dosis und Dauer der Gabe, so dass hier Dosis-unabhängige Effekte zu vermuten sind, die möglicherweise kontextabhängig sind. Ein Zusammenhang zwischen IL-8-Expression und Gesamtüberleben war in unserer Kohorte - anders als bei Hasan et al. 2019 vorbeschrieben [187] - bei sehr kleiner Kohorte nicht nachvollziehbar.

Interessanterweise wurde von Zhang et al. (2015) eine erhöhte IL-8-Expression mit kürzerem Gesamtüberleben bei Gliomen und Glioblastomen assoziiert und als prognostischer Marker in

Erwägung gezogen [266]. Einmal mehr stellt sich hier die Frage, ob der zugrundeliegende prognostische Marker der erhöhten IL-8 Expression nicht eher die Dauer der präoperativen Dexamethasongabe indirekt abbildet.

Neben IL-8 stellt CXCL2 den zweiten relevanten Liganden in der humanen CXCL2/IL-8-CXCR2 Achse dar, während in der murinen Achse einzig CXCL2 der Hauptligand ist (s. Ergebnisse und Diskussion *ex vivo* OBSC). Wie IL-8 wird auch CXCL2 über Aktivierung des NF-κB Signalwegs vermehrt exprimiert [270]. Analog zu IL-8 wäre hier also durch Dexamethason und folgliche NF-κB-Suppression eine verminderte CXCL2-Expression zu erwarten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus unserem Ratten-*ex vivo*-Modell zeigt sich in unserem humanen Kollektiv eine tendenzielle Erhöhung von CXCL2 in der Subgruppe mit kurzzeitiger Dexamethasonanwendung < 5 Tage, sowie bei dichotomer Gruppierung eine tendenziell erhöhte CXCL2-Expression im Vergleich der Dexamethason-behandelten mit der Dexamethason-nativen Gruppe. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu unseren Erkenntnissen aus dem OBSC-Modell, wo Dexamethason zu einer ausgeprägten Verringerung der CXCL2-Sekretion geführt hat, was wiederum in der humanen Glioblastomprobe für eine NF-κB-unabhängige indirekte Beeinflussung der CXCL2-Sekretion spricht, oder zu einer vermehrten autokrinen Sekretion durch die Glioblastomzellen bedingt durch indirekte Dexamethasoneinflüsse zu erklären wäre.

Keinerlei Effekte oder Tendenzen ergeben sich bei Betrachtung der cerebralen Metastasen, so dass möglicherweise Glioblastom-spezifische Signalwege oder Einflüsse zum Tragen kommen.

Zwischen CXCL2 und IL-8 zeigte sich unter Dexamethasongabe lediglich eine moderate positive Korrelation der Genexpressionsveränderungen der beiden Liganden. Auch das zeitlich verzögerte Auftreten der Genexpressionserhöhung von IL-8 bzw. das sehr schnelle Ansprechen von CXCL2 auf Dexamethasongabe könnte ein Hinweis auf eine unabhängige oder nur indirekt zusammenhängende Genregulation beider Liganden, augenscheinlich unabhängig vom NF-κB Signalweg, sein. Eine Korrelation der AUC (Dosis x Dauer) entsprechend der Trapezregel mit der CXCL2-Expression konnten in unseren Daten jedoch nicht gefunden werden, so dass hier kontext-abhängige Voraussetzungen vermutet werden können.

Weitere Untersuchungen werden hier zur genaueren Einordnung dieser neuen Erkenntnisse notwendig sein.

Vorbeschriebene Einflüsse von Dexamethason auf die CXCR2-Genexpression scheinen gewebe- und kontextabhängig zu sein: So zum Beispiel konnte die CXCR2-Expression in myeloid-derived suppressor cells (MDSC) im murinen Herztransplantationsmodell durch Dexamethason erhöht werden [271], andererseits zeigten zum Beispiel Adipozyten eine Repression der CXCR2 mRNA Level unter Dexamethasonbehandlung [272]. Die Genexpression von CXCR2 zeigte in unserer Untersuchung sowohl in der Dexamethason-behandelten wie auch -naiven Gruppe eine hohe Streubreite mit großen Konfidenzintervallen. Eine signifikant relevante Veränderung durch Gabe von Dexamethason zeigt sich somit weder für die Glioblastome, noch für die cerebralen Metastasen. Entsprechend ergibt sich hier keine Korrelation aus AUC (Dex) und CXCR2-Genexpression.

Die Untersuchung der CXCR2-Expression in unseren FFPE-Schnitten zeigt einerseits, dass Dexamethason die CXCR2-Expression insgesamt nicht beeinflusst, jedoch durch Dexamethason die CXCR2-Expression auf GAMM relativ gesehen erniedrigt. Möglicherweise ist dies durch Hochregulierung der CXCR2-Expression in Glioblastomzellen zu erklären. So beschreiben Anara et al. (2018), dass anti-angiogen behandelte orthotopische Glioblastommodelle eine erhöhte Anzahl CXCR2-exprimierender Tumorzellen aufweisen [174]. Durchaus denkbar wäre ein entsprechender Effekt auch durch die Verabreichung von Dexamethason.

iv. Auswirkungen von Dexamethason auf zellulärer Ebenen (GAMM, Mikroglia, T-Zellen)

In der Untersuchung der zellulären Zusammensetzung anhand Immunfluoreszenzfärbungen zeigte sich durch Dexamethasonbehandlung eine Abnahme der Iba1⁺ Zellen allgemein, insbesondere des mikroglialen TMEM119⁺ Gehalts. Bei der Kolokalisierungs-Analyse zeigte sich der Anteil von TMEM119 Positivität am Iba1⁺ Fluoreszenzsignal erniedrigt. Park et al. (2019) zeigten auf, dass durch Dexamethasonbehandlung die phagozytische Aktivität und Zytokinproduktion sowie die Zellproliferation der mikroglialen Zellen zurückgeht, was auf einen Übergang in einen Seneszenz-artigen Zustand hindeuten könnte [243]. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die Beobachtung an unserer Kohorte darstellen. Ob generell die Expression von TMEM119 durch Dexamethasonbehandlung zurückgeht, scheint bis dato noch nicht untersucht und kann durch unsere durchgeföhrten Analysen nicht beantwortet werden. Andererseits zeigten Zhang et al. (2007), dass Dexamethason im Kontext eines Schädel-Hirn-

Traumas bei Ratten durchaus die Iba1-Expression reduzieren kann [273], was jedoch im Kontext unserer Analyse vermutlich nicht gänzlich zur Iba1-Negativität führen würde.

In einem Gliom-Mausmodell wurde eine Abnahme um 43% der Gesamtzahl der TIL durch Dexamethasongabe beobachtet [140], in einer anderen Untersuchung am murinen Modell wurde wiederum eine T-Zell-Depletion durch Dexamethason-induzierte Apoptose beschrieben [158]. Dies steht im Einklang mit unserer Untersuchung an humanen Glioblastomproben, wo wir eine Abnahme von T-Zellen in der FFPE-Immunfluoreszenzfärbung feststellen konnten. Ob dieser Effekt indirekte Einflüsse oder direkte Dexamethason-vermittelte Auswirkungen abbildet, lässt sich an dieser Stelle nicht sagen. Denkbar sind auch Mechanismen der Dexamethason-induzierten T-Zell-Apoptose über eine Glucocorticoid-Rezeptor-Aktivierung über verschiedene Signalkaskaden, wie von Herold et al. (2005) zusammengefasst [274]. Eine Reduktion der T-Zellzahl kann durchaus im weiteren Verlauf bei sowieso erschöpftem T-Zell-Zustand im Glioblastom die weitere Prognose und den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen und somit die Assoziation von Dexamethasongabe und schlechterem Gesamtüberleben mit erklären.

5. Zusammenfassung

Kommend von Untersuchungen an Ratten-Zelllinien in einem *ex vivo* Setting, wo wir mechanistisch zunächst direkte Einflüsse von verschiedenen Interleukinen/Chemokinen und dem immunologisch wirksamen Dexamethason, und weiterhin den indirekten Einfluss des immunologischen Hauptakteurs im Glioblastom, nämlich hirn-residente Mikroglia, untersucht haben, entwickelten wir anhand dieser Beobachtungen Fragestellungen, die an retrospektiv identifizierten humanen Glioblastomproben nachvollzogen werden sollten:

Im *ex vivo* Modell zeigte sich durch Mikroglia-Depletion ein vermehrtes Auswachsen der S635 Zelllinie. In Mikroglia nativen OBSC war ein vermehrtes Auswachsen für S635 sowohl durch das pro- als auch das anti-inflammatoryische Zytokin IL-22 bzw. IL-10 induzierbar, und eben auch durch das pleiotrop wirksame Dexamethason. Entsprechende Effekte waren für 9L nicht nachvollziehbar bzw. zeigte 9L eine ausgesprochene Dexamethason-Empfindlichkeit. Im Screening wurde eine differentielle Sekretion von CXCL2 abhängig von Mikroglia und den Behandlungen mit Dexamethason und IL-10 beobachtet. Bei der genaueren Quantifizierung zeigte sich unter IL-22 eine erhöhte CXCL2-Sekretion durch Mikroglia als Antwort auf das Aufbringen des Zellliniensphäroids, unter Dexamethason jedoch ein Rückgang der CXCL2-

Sekretion. Eine Blockade des entsprechenden Rezeptors CXCR2 zeigte schlussendlich einen Synergismus mit Dexamethason hin zu erhöhtem Sphäroidauswachsen bei Vorhandensein von Mikroglia.

Die identifizierten Patienten, die kein präoperatives Dexamethason erhalten hatten, zeigten bei Gegenüberstellung mit gematchten Dexamethason-behandelten Patienten ein besseres Gesamtüberleben. Bei der Untersuchung des GAMM zeigte sich eine gesteigerte Genexpression von ARG1 (anti-inflammatoryer M2-Marker) sowohl beim Glioblastom als auch beim mitgeführten Kollektiv der Hirnmetastasen unter Dexamethasonbehandlung. Veränderungen in der CXCR2-CXCL2/IL-8 Achse zeigten sich nur tendenziell bei kleiner Gruppengröße, allerdings - anders als im Rattenmodell gesehen - hin zu vermehrter Expression der Liganden CXCL2 und IL-8 unter Dexamethasoneinfluss im Glioblastom. Auf zellulärer Ebenen ließen sich eine Zunahme der M2-Polarisierung, vermehrte Makrophagen- bzw. verminderte Mikrogliahäufigkeit, veränderte CXCR2-Verteilung und eine Verminderung der T-Zell Frequenz zeigen.

Die Ergebnisse zeigen allgemein die Schwierigkeit der Übertragbarkeit von *in vitro* / *ex vivo* Modell auf die Situation mit hochkomplexer Tumormikroumgebung und mannigfaltigen Einflüssen im humanen „multiformen“ Glioblastom. Andererseits wird der nachhaltige Einfluss von Dexamethason auf Genexpressions-, Protein- und zellulärer Ebene auf die immunologische Tumormikroumgebung im Glioblastom deutlich, so dass bei ubiquitär eingesetzter präoperativer Dexamethasongabe bisherige hochauflösende Untersuchungen der immunologischen Tumormikroumgebung des Glioblastoms durch Dexamethasoneinfluss durchaus verändert zur Darstellung kommen. In der klinischen Praxis sollte der Einsatz von Dexamethason generell kritisch hinterfragt und nur wenn symptomatisch notwendig zum Einsatz kommen.

6. Verzeichnisse

a. Literaturverzeichnis

- [1] Ostrom, Q.T.; Patil, N.; Cioffi, G.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro-oncology*, **2020**, *22*, iv1-iv96.
- [2] Ostrom, Q.T.; Shoaf, M.L.; Cioffi, G.; Waite, K.; Kruchko, C.; Wen, P.Y.; Brat, D.J.; Barnholtz-Sloan, J.S.; Iorgulescu, J.B. National-level overall survival patterns for molecularly-defined diffuse glioma types in the United States. *Neuro-oncology*, **2023**, *25*, 799–807.
- [3] Walker, M.D.; Green, S.B.; Byar, D.P.; Alexander, E.; Batzdorf, U.; Brooks, W.H.; Hunt, W.E.; MacCarty, C.S.; Mahaley, M.S.; Mealey, J.; Owens, G.; Ransohoff, J.; Robertson, J.T.; Shapiro, W.R.; Smith, K.R.; Wilson, C.B.; Strike, T.A. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *The New England journal of medicine*, **1980**, *303*, 1323–1329.
- [4] Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.B.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; Curschmann, J.; Janzer, R.C.; Ludwin, S.K.; Gorlia, T.; Allgeier, A.; Lacombe, D.; Cairncross, J.G.; Eisenhauer, E.; Mirimanoff, R.O. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*, **2005**, *352*, 987–996.
- [5] Stupp, R.; Taillibert, S.; Kanner, A.; Read, W.; Steinberg, D.; Lhermitte, B.; Toms, S.; Idbaih, A.; Ahluwalia, M.S.; Fink, K.; Di Meco, F.; Lieberman, F.; Zhu, J.-J.; Stragliotto, G.; Tran, D.; Brem, S.; Hottinger, A.; Kirson, E.D.; Lavy-Shahaf, G.; Weinberg, U.; Kim, C.-Y.; Paek, S.-H.; Nicholas, G.; Bruna, J.; Hirte, H.; Weller, M.; Palti, Y.; Hegi, M.E.; Ram, Z. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, **2017**, *318*, 2306–2316.
- [6] Weller, M.; van den Bent, M.; Preusser, M.; Le Rhun, E.; Tonn, J.C.; Minniti, G.; Bendszus, M.; Balana, C.; Chinot, O.; Dirven, L.; French, P.; Hegi, M.E.; Jakola, A.S.; Platten, M.; Roth, P.; Rudà, R.; Short, S.; Smits, M.; Taphoorn, M.J.B.; Deimling, A. von; Westphal, M.; Soffietti, R.; Reifenberger, G.; Wick, W. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature reviews. Clinical oncology*, **2021**, *18*, 170–186.

- [7] Bonis, P. de; Anile, C.; Pompucci, A.; Fiorentino, A.; Balducci, M.; Chiesa, S.; Lauriola, L.; Maira, G.; Mangiola, A. The influence of surgery on recurrence pattern of glioblastoma. *Clinical neurology and neurosurgery*, **2013**, *115*, 37–43.
- [8] Herrlinger, U.; Tzaridis, T.; Mack, F.; Steinbach, J.P.; Schlegel, U.; Sabel, M.; Hau, P.; Kortmann, R.-D.; Krex, D.; Grauer, O.; Goldbrunner, R.; Schnell, O.; Bähr, O.; Uhl, M.; Seidel, C.; Tabatabai, G.; Kowalski, T.; Ringel, F.; Schmidt-Graf, F.; Suchorska, B.; Brehmer, S.; Weyerbrock, A.; Renovanz, M.; Bullinger, L.; Galldiks, N.; Vajkoczy, P.; Misch, M.; Vatter, H.; Stuplich, M.; Schäfer, N.; Kebir, S.; Weller, J.; Schaub, C.; Stummer, W.; Tonn, J.-C.; Simon, M.; Keil, V.C.; Nelles, M.; Urbach, H.; Coenen, M.; Wick, W.; Weller, M.; Fimmers, R.; Schmid, M.; Hattingen, E.; Pietsch, T.; Coch, C.; Glas, M. Lomustine-temozolamide combination therapy versus standard temozolamide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, **2019**, *393*, 678–688.
- [9] Omuro, A.; Brandes, A.A.; Carpentier, A.F.; Idbaih, A.; Reardon, D.A.; Cloughesy, T.; Sumrall, A.; Baehring, J.; van den Bent, M.; Bähr, O.; Lombardi, G.; Mulholland, P.; Tabatabai, G.; Lassen, U.; Sepulveda, J.M.; Khasraw, M.; Vauleon, E.; Muragaki, Y.; Di Giacomo, A.M.; Butowski, N.; Roth, P.; Qian, X.; Fu, A.Z.; Liu, Y.; von Potter; Chalamandaris, A.-G.; Tatsuoka, K.; Lim, M.; Weller, M. Radiotherapy combined with nivolumab or temozolamide for newly diagnosed glioblastoma with unmethylated MGMT promoter: An international randomized phase III trial. *Neuro-oncology*, **2023**, *25*, 123–134.
- [10] Zhou, Y.; Shi, F.; Zhu, J.; Yuan, Y. An update on the clinical trial research of immunotherapy for glioblastoma. *Frontiers in immunology*, **2025**, *16*, 1582296.
- [11] Lim, M.; Weller, M.; Idbaih, A.; Steinbach, J.; Finocchiaro, G.; Raval, R.R.; Ansstas, G.; Baehring, J.; Taylor, J.W.; Honnorat, J.; Petrecca, K.; Vos, F. de; Wick, A.; Sumrall, A.; Sahebjam, S.; Mellinghoff, I.K.; Kinoshita, M.; Roberts, M.; Slepetic, R.; Warad, D.; Leung, D.; Lee, M.; Reardon, D.A.; Omuro, A. Phase III trial of chemoradiotherapy with temozolamide plus nivolumab or placebo for newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter. *Neuro-oncology*, **2022**, *24*, 1935–1949.
- [12] Reardon, D.A.; Brandes, A.A.; Omuro, A.; Mulholland, P.; Lim, M.; Wick, A.; Baehring, J.; Ahluwalia, M.S.; Roth, P.; Bähr, O.; Phuphanich, S.; Sepulveda, J.M.; Souza, P. de; Sahebjam, S.; Carleton, M.; Tatsuoka, K.; Taitt, C.; Zwirtes, R.; Sampson, J.; Weller, M. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA oncology*, **2020**, *6*, 1003–1010.

- [13] Jessurun, C.A.C.; Hulsbergen, A.F.C.; Lamba, N.; Nandoe Tewarie, R.D.S.; Smith, T.R.; Broekman, M.L.D. Practice Variation in Perioperative Steroid Dosing for Brain Tumor Patients: An International Survey. *World neurosurgery*, **2022**, *159*, e431-e441.
- [14] Mistry, A.M.; Jonathan, S.V.; Monsour, M.A.; Mobley, B.C.; Clark, S.W.; Moots, P.L. Impact of postoperative dexamethasone on survival, steroid dependency, and infections in newly diagnosed glioblastoma patients. *Neuro-oncology practice*, **2021**, *8*, 589–600.
- [15] Wiencke, J.K.; Molinaro, A.M.; Warrier, G.; Rice, T.; Clarke, J.; Taylor, J.W.; Wrensch, M.; Hansen, H.; McCoy, L.; Tang, E.; Tamaki, S.J.; Tamaki, C.M.; Nissen, E.; Bracci, P.; Salas, L.A.; Koestler, D.C.; Christensen, B.C.; Zhang, Z.; Kelsey, K.T. DNA methylation as a pharmacodynamic marker of glucocorticoid response and glioma survival. *Nature communications*, **2022**, *13*, 5505.
- [16] Mistry, A.M. Perioperative dexamethasone in high-grade gliomas: the short-term benefits and long-term harms. *Frontiers in oncology*, **2023**, *13*, 1335730.
- [17] Bailey, P. and H. Cushing. A classification of the tumors of the glioma group on a histogenic basis with a correlated study of prognosis. *Philadelphia: J. B. Lippincott.*, **1926**, 146–167.
- [18] Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; Deimling, A. von; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica*, **2016**, *131*, 803–820.
- [19] Louis, D.N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Cavenee, W.K.; Burger, P.C.; Jouvet, A.; Scheithauer, B.W.; Kleihues, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, **2007**, *114*, 97–109.
- [20] Louis, D.N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D.J.; Cree, I.A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H.K.; Pfister, S.M.; Reifenberger, G.; Soffietti, R.; Deimling, A. von; Ellison, D.W. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-oncology*, **2021**, *23*, 1231–1251.
- [21] Hegi, M.E.; Diserens, A.-C.; Gorlia, T.; Hamou, M.-F.; Tribolet, N. de; Weller, M.; Kros, J.M.; Hainfellner, J.A.; Mason, W.; Mariani, L.; Bromberg, J.E.C.; Hau, P.; Mirimanoff, R.O.; Cairncross, J.G.; Janzer, R.C.; Stupp, R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine*, **2005**, *352*, 997–1003.

- [22] Singh, S.K.; Clarke, I.D.; Terasaki, M.; Bonn, V.E.; Hawkins, C.; Squire, J.; Dirks, P.B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*, **2003**, *63*, 5821–5828.
- [23] Verhaak, R.G.W.; Hoadley, K.A.; Purdom, E.; Wang, V.; Qi, Y.; Wilkerson, M.D.; Miller, C.R.; Ding, L.; Golub, T.; Mesirov, J.P.; Alexe, G.; Lawrence, M.; O'Kelly, M.; Tamayo, P.; Weir, B.A.; Gabriel, S.; Winckler, W.; Gupta, S.; Jakkula, L.; Feiler, H.S.; Hodgson, J.G.; James, C.D.; Sarkaria, J.N.; Brennan, C.; Kahn, A.; Spellman, P.T.; Wilson, R.K.; Speed, T.P.; Gray, J.W.; Meyerson, M.; Getz, G.; Perou, C.M.; Hayes, D.N. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell*, **2010**, *17*, 98–110.
- [24] Neftel, C.; Laffy, J.; Filbin, M.G.; Hara, T.; Shore, M.E.; Rahme, G.J.; Richman, A.R.; Silverbush, D.; Shaw, M.L.; Hebert, C.M.; Dewitt, J.; Gritsch, S.; Perez, E.M.; Gonzalez Castro, L.N.; Lan, X.; Druck, N.; Rodman, C.; Dionne, D.; Kaplan, A.; Bertalan, M.S.; Small, J.; Pelton, K.; Becker, S.; Bonal, D.; Nguyen, Q.-D.; Servis, R.L.; Fung, J.M.; Mylvaganam, R.; Mayr, L.; Gojo, J.; Haberler, C.; Geyeregger, R.; Czech, T.; Slavc, I.; Nahed, B.V.; Curry, W.T.; Carter, B.S.; Wakimoto, H.; Brastianos, P.K.; Batchelor, T.T.; Stemmer-Rachamimov, A.; Martinez-Lage, M.; Frosch, M.P.; Stamenkovic, I.; Riggi, N.; Rheinbay, E.; Monje, M.; Rozenblatt-Rosen, O.; Cahill, D.P.; Patel, A.P.; Hunter, T.; Verma, I.M.; Ligon, K.L.; Louis, D.N.; Regev, A.; Bernstein, B.E.; Tirosh, I.; Suvà, M.L. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*, **2019**, *178*, 835-849.e21.
- [25] Wang, L.; Babikir, H.; Müller, S.; Yagnik, G.; Shamardani, K.; Catalan, F.; Kohanbash, G.; Alvarado, B.; Di Lullo, E.; Kriegstein, A.; Shah, S.; Wadhwa, H.; Chang, S.M.; Phillips, J.J.; Aghi, M.K.; Diaz, A.A. The Phenotypes of Proliferating Glioblastoma Cells Reside on a Single Axis of Variation. *Cancer discovery*, **2019**, *9*, 1708–1719.
- [26] Kim, Y.; Varn, F.S.; Park, S.-H.; Yoon, B.W.; Park, H.R.; Lee, C.; Verhaak, R.G.W.; Paek, S.H. Perspective of mesenchymal transformation in glioblastoma. *Acta neuropathologica communications*, **2021**, *9*, 50.
- [27] Richards, L.M.; Whitley, O.K.N.; MacLeod, G.; Cavalli, F.M.G.; Coutinho, F.J.; Jaramillo, J.E.; Svergun, N.; Riverin, M.; Croucher, D.C.; Kushida, M.; Yu, K.; Guilhamon, P.; Rastegar, N.; Ahmadi, M.; Bhatti, J.K.; Bozek, D.A.; Li, N.; Lee, L.; Che, C.; Luis, E.; Park, N.I.; Xu, Z.; Ketela, T.; Moore, R.A.; Marra, M.A.; Spears, J.; Cusimano, M.D.; Das, S.; Bernstein, M.; Haibe-Kains, B.; Lupien, M.; Luchman, H.A.; Weiss, S.; Angers, S.; Dirks, P.B.; Bader, G.D.; Pugh, T.J. Gradient of Developmental and Injury Response

- transcriptional states defines functional vulnerabilities underpinning glioblastoma heterogeneity. *Nature cancer*, **2021**, *2*, 157–173.
- [28] Couturier, C.P.; Ayyadhyury, S.; Le, P.U.; Nadaf, J.; Monlong, J.; Riva, G.; Allache, R.; Baig, S.; Yan, X.; Bourgey, M.; Lee, C.; Wang, Y.C.D.; Wee Yong, V.; Guiot, M.-C.; Najafabadi, H.; Misic, B.; Antel, J.; Bourque, G.; Ragoussis, J.; Petrecca, K. Single-cell RNA-seq reveals that glioblastoma recapitulates a normal neurodevelopmental hierarchy. *Nature communications*, **2020**, *11*, 3406.
- [29] Camus, M.; Tosolini, M.; Mlecnik, B.; Pagès, F.; Kirilovsky, A.; Berger, A.; Costes, A.; Bindea, G.; Charoentong, P.; Bruneval, P.; Trajanoski, Z.; Fridman, W.-H.; Galon, J. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer research*, **2009**, *69*, 2685–2693.
- [30] Wang, L.; Geng, H.; Liu, Y.; Liu, L.; Chen, Y.; Wu, F.; Liu, Z.; Ling, S.; Wang, Y.; Zhou, L. Hot and cold tumors: Immunological features and the therapeutic strategies. *MedComm*, **2023**, *4*, e343.
- [31] Mahajan, S.; Schmidt, M.H.H.; Schumann, U. The Glioma Immune Landscape: A Double-Edged Sword for Treatment Regimens. *Cancers*, **2023**, *15*.
- [32] González-Tablas Pimenta, M.; Otero, Á.; Arandia Guzman, D.A.; Pascual-Argente, D.; Ruíz Martín, L.; Sousa-Casasnovas, P.; García-Martin, A.; Roa Montes de Oca, J.C.; Villaseñor-Ledezma, J.; Torres Carretero, L.; Almeida, M.; Ortiz, J.; Nieto, A.; Orfao, A.; Tabernero, M.D. Tumor cell and immune cell profiles in primary human glioblastoma: Impact on patient outcome. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, **2021**, *31*, 365–380.
- [33] Martinez-Lage, M.; Lynch, T.M.; Bi, Y.; Cocito, C.; Way, G.P.; Pal, S.; Haller, J.; Yan, R.E.; Ziobro, A.; Nguyen, A.; Kandpal, M.; O'Rourke, D.M.; Greenfield, J.P.; Greene, C.S.; Davuluri, R.V.; Dahmane, N. Immune landscapes associated with different glioblastoma molecular subtypes. *Acta neuropathologica communications*, **2019**, *7*, 203.
- [34] Gieryng, A.; Pszczolkowska, D.; Walentynowicz, K.A.; Rajan, W.D.; Kaminska, B. Immune microenvironment of gliomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **2017**, *97*, 498–518.
- [35] Orrego, E.; Castaneda, C.A.; Castillo, M.; Bernabe, L.A.; Casavilca, S.; Chakravarti, A.; Meng, W.; Garcia-Corrochano, P.; Villa-Robles, M.R.; Zevallos, R.; Mejia, O.; Deza, P.; Belmar-Lopez, C.; Ojeda, L. Distribution of tumor-infiltrating immune cells in glioblastoma. *CNS oncology*, **2018**, *7*, CNS21.

- [36] Poon, C.C.; Sarkar, S.; Yong, V.W.; Kelly, J.J.P. Glioblastoma-associated microglia and macrophages: targets for therapies to improve prognosis. *Brain : a journal of neurology*, **2017**, *140*, 1548–1560.
- [37] Müller, S.; Kohanbash, G.; Liu, S.J.; Alvarado, B.; Carrera, D.; Bhaduri, A.; Watchmaker, P.B.; Yagnik, G.; Di Lullo, E.; Malatesta, M.; Amankulor, N.M.; Kriegstein, A.R.; Lim, D.A.; Aghi, M.; Okada, H.; Diaz, A. Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment. *Genome biology*, **2017**, *18*, 234.
- [38] Gonzalez, N.; Asad, A.S.; Gómez Escalante, J.; Peña Agudelo, J.A.; Nicola Candia, A.J.; García Fallit, M.; Seilicovich, A.; Candolfi, M. Potential of IDH mutations as immunotherapeutic targets in gliomas: a review and meta-analysis. *Expert opinion on therapeutic targets*, **2021**, *25*, 1045–1060.
- [39] Ravi, V.M.; Neidert, N.; Will, P.; Joseph, K.; Maier, J.P.; Kückelhaus, J.; Vollmer, L.; Goeldner, J.M.; Behringer, S.P.; Scherer, F.; Boerries, M.; Follo, M.; Weiss, T.; Delev, D.; Kernbach, J.; Franco, P.; Schallner, N.; Dierks, C.; Carro, M.S.; Hofmann, U.G.; Fung, C.; Sankowski, R.; Prinz, M.; Beck, J.; Salié, H.; Bengsch, B.; Schnell, O.; Heiland, D.H. T-cell dysfunction in the glioblastoma microenvironment is mediated by myeloid cells releasing interleukin-10. *Nature communications*, **2022**, *13*, 925.
- [40] Charles, N.A.; Holland, E.C.; Gilbertson, R.; Glass, R.; Kettenmann, H. The brain tumor microenvironment. *Glia*, **2012**, *60*, 502–514.
- [41] Gomez Perdiguero, E.; Klapproth, K.; Schulz, C.; Busch, K.; Azzoni, E.; Crozet, L.; Garner, H.; Trouillet, C.; Bruijn, M.F. de; Geissmann, F.; Rodewald, H.-R. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, **2015**, *518*, 547–551.
- [42] Hoeffel, G.; Chen, J.; Lavin, Y.; Low, D.; Almeida, F.F.; See, P.; Beaudin, A.E.; Lum, J.; Low, I.; Forsberg, E.C.; Poidinger, M.; Zolezzi, F.; Larbi, A.; Ng, L.G.; Chan, J.K.Y.; Greter, M.; Becher, B.; Samokhvalov, I.M.; Merad, M.; Ginhoux, F. C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity*, **2015**, *42*, 665–678.
- [43] Chen, Z.; Ross, J.L.; Hambardzumyan, D. Intravital 2-photon imaging reveals distinct morphology and infiltrative properties of glioblastoma-associated macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2019**, *116*, 14254–14259.

- [44] Huang, B.; Zhang, J.; Zong, W.; Chen, S.; Zong, Z.; Zeng, X.; Zhang, H. Myeloidcells in the immunosuppressive microenvironment in glioblastoma: The characteristics and therapeutic strategies. *Frontiers in immunology*, **2023**, *14*, 994698.
- [45] Chen, Z.; Feng, X.; Herting, C.J.; Garcia, V.A.; Nie, K.; Pong, W.W.; Rasmussen, R.; Dwivedi, B.; Seby, S.; Wolf, S.A.; Gutmann, D.H.; Hambardzumyan, D. Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer research*, **2017**, *77*, 2266–2278.
- [46] Pombo Antunes, A.R.; Scheyltjens, I.; Duerinck, J.; Neyns, B.; Movahedi, K.; van Ginderachter, J.A. Understanding the glioblastoma immune microenvironment as basis for the development of new immunotherapeutic strategies. *eLife*, **2020**, *9*.
- [47] MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*, **2002**, *23*, 549–555.
- [48] Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews. Immunology*, **2003**, *3*, 23–35.
- [49] Ren, J.; Xu, B.; Ren, J.; Liu, Z.; Cai, L.; Zhang, X.; Wang, W.; Li, S.; Jin, L.; Ding, L. The Importance of M1-and M2-Polarized Macrophages in Glioma and as Potential Treatment Targets. *Brain sciences*, **2023**, *13*.
- [50] Xiong, J.; Zhou, X.; Su, L.; Jiang, L.; Ming, Z.; Pang, C.; Fuller, C.; Xu, K.; Chi, H.; Zheng, X. The two-sided battlefield of tumour-associated macrophages in glioblastoma: unravelling their therapeutic potential. *Discover. Oncology*, **2024**, *15*, 590.
- [51] Chen, Z.; Herting, C.J.; Ross, J.L.; Gabanic, B.; Puigdelloses Vallcorba, M.; Szulzewsky, F.; Wojciechowicz, M.L.; Cimino, P.J.; Ezhilarasan, R.; Sulman, E.P.; Ying, M.; Ma'ayan, A.; Read, R.D.; Hambardzumyan, D. Genetic driver mutations introduced in identical cell-of-origin in murine glioblastoma reveal distinct immune landscapes but similar response to checkpoint blockade. *Glia*, **2020**, *68*, 2148–2166.
- [52] Gabrusiewicz, K.; Rodriguez, B.; Wei, J.; Hashimoto, Y.; Healy, L.M.; Maiti, S.N.; Thomas, G.; Zhou, S.; Wang, Q.; Elakkad, A.; Liebelt, B.D.; Yaghi, N.K.; Ezhilarasan, R.; Huang, N.; Weinberg, J.S.; Prabhu, S.S.; Rao, G.; Sawaya, R.; Langford, L.A.; Bruner, J.M.; Fuller, G.N.; Bar-Or, A.; Li, W.; Colen, R.R.; Curran, M.A.; Bhat, K.P.; Antel, J.P.; Cooper, L.J.; Sulman, E.P.; Heimberger, A.B. Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype. *JCI insight*, **2016**, *1*.

- [53] Hambardzumyan, D.; Gutmann, D.H.; Kettenmann, H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nature neuroscience*, **2016**, *19*, 20–27.
- [54] Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, **2004**, *25*, 677–686.
- [55] Sankowski, R.; Böttcher, C.; Masuda, T.; Geirsdottir, L.; Sagar; Sindram, E.; Seredenina, T.; Muhs, A.; Scheiwe, C.; Shah, M.J.; Heiland, D.H.; Schnell, O.; Grün, D.; Priller, J.; Prinz, M. Mapping microglia states in the human brain through the integration of high-dimensional techniques. *Nature neuroscience*, **2019**, *22*, 2098–2110.
- [56] Martinez, F.O.; Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*, **2014**, *6*, 13.
- [57] London, A.; Cohen, M.; Schwartz, M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Frontiers in cellular neuroscience*, **2013**, *7*, 34.
- [58] Coniglio, S.J.; Eugenin, E.; Dobrenis, K.; Stanley, E.R.; West, B.L.; Symons, M.H.; Segall, J.E. Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, **2012**, *18*, 519–527.
- [59] Zhang, X.; Chen, L.; Dang, W.-Q.; Cao, M.-F.; Xiao, J.-F.; Lv, S.-Q.; Jiang, W.-J.; Yao, X.-H.; Lu, H.-M.; Miao, J.-Y.; Wang, Y.; Yu, S.-C.; Ping, Y.-F.; Liu, X.-D.; Cui, Y.-H.; Zhang, X.; Bian, X.-W. CCL8 secreted by tumor-associated macrophages promotes invasion and stemness of glioblastoma cells via ERK1/2 signaling. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **2020**, *100*, 619–629.
- [60] Vinnakota, K.; Hu, F.; Ku, M.-C.; Georgieva, P.B.; Szulzewsky, F.; Pohlmann, A.; Waiczies, S.; Waiczies, H.; Niendorf, T.; Lehnardt, S.; Hanisch, U.-K.; Synowitz, M.; Markovic, D.; Wolf, S.A.; Glass, R.; Kettenmann, H. Toll-like receptor 2 mediates microglia/brain macrophage MT1-MMP expression and glioma expansion. *Neuro-oncology*, **2013**, *15*, 1457–1468.
- [61] Markovic, D.S.; Vinnakota, K.; Chirasani, S.; Synowitz, M.; Raguet, H.; Stock, K.; Sliwa, M.; Lehmann, S.; Kälin, R.; van Rooijen, N.; Holmbeck, K.; Heppner, F.L.; Kiwit, J.; Matyash, V.; Lehnardt, S.; Kaminska, B.; Glass, R.; Kettenmann, H. Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2009**, *106*, 12530–12535.

- [62] Ye, X.; Xu, S.; Xin, Y.; Yu, S.-C.; Ping, Y.-F.; Chen, L.; Xiao, H.; Wang, B.; Yi, L.; Wang, Q.; Jiang, X.; Yang, L.; Zhang, P.; Qian, C.; Cui, Y.-H.; Zhang, X.; Bian, X.-W. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF- β 1 signaling pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **2012**, *189*, 444–453.
- [63] Feng, X.; Szulzewsky, F.; Yerevanian, A.; Chen, Z.; Heinzmann, D.; Rasmussen, R.D.; Alvarez-Garcia, V.; Kim, Y.; Wang, B.; Tamagno, I.; Zhou, H.; Li, X.; Kettenmann, H.; Ransohoff, R.M.; Hambardzumyan, D. Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis. *Oncotarget*, **2015**, *6*, 15077–15094.
- [64] Dzaye, O.; Hu, F.; Derkow, K.; Haage, V.; Euskirchen, P.; Harms, C.; Lehnardt, S.; Synowitz, M.; Wolf, S.A.; Kettenmann, H. Glioma Stem Cells but Not Bulk Glioma Cells Upregulate IL-6 Secretion in Microglia/Brain Macrophages via Toll-like Receptor 4 Signaling. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **2016**, *75*, 429–440.
- [65] Hu, F.; Ku, M.-C.; Markovic, D.; Dzaye, O.D.a.; Lehnardt, S.; Synowitz, M.; Wolf, S.A.; Kettenmann, H. Glioma-associated microglial MMP9 expression is upregulated by TLR2 signaling and sensitive to minocycline. *International journal of cancer*, **2014**, *135*, 2569–2578.
- [66] Wallmann, T.; Zhang, X.-M.; Wallerius, M.; Bolin, S.; Joly, A.-L.; Sobocki, C.; Leiss, L.; Jiang, Y.; Bergh, J.; Holland, E.C.; Enger, P.Ø.; Andersson, J.; Swartling, F.J.; Miletic, H.; Uhrbom, L.; Harris, R.A.; Rolny, C. Microglia Induce PDGFRB Expression in Glioma Cells to Enhance Their Migratory Capacity. *iScience*, **2018**, *9*, 71–83.
- [67] Henrik Heiland, D.; Ravi, V.M.; Behringer, S.P.; Frenking, J.H.; Wurm, J.; Joseph, K.; Garrelfs, N.W.C.; Strähle, J.; Heynckes, S.; Grauvogel, J.; Franco, P.; Mader, I.; Schneider, M.; Potthoff, A.-L.; Delev, D.; Hofmann, U.G.; Fung, C.; Beck, J.; Sankowski, R.; Prinz, M.; Schnell, O. Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nature communications*, **2019**, *10*, 2541.
- [68] Szulzewsky, F.; Schwendinger, N.; Güneykaya, D.; Cimino, P.J.; Hambardzumyan, D.; Synowitz, M.; Holland, E.C.; Kettenmann, H. Loss of host-derived osteopontin creates a glioblastoma-promoting microenvironment. *Neuro-oncology*, **2018**, *20*, 355–366.
- [69] Hu, F.; Dzaye, O.D.; Hahn, A.; Yu, Y.; Scavetta, R.J.; Dittmar, G.; Kaczmarek, A.K.; Dunning, K.R.; Ricciardelli, C.; Rinnenthal, J.L.; Heppner, F.L.; Lehnardt, S.; Synowitz, M.; Wolf, S.A.; Kettenmann, H. Glioma-derived versican promotes tumor expansion via

glioma-associated microglial/macrophages Toll-like receptor 2 signaling. *Neuro-oncology*, **2015**, *17*, 200–210.

- [70] Sørensen, M.D.; Dahlrot, R.H.; Boldt, H.B.; Hansen, S.; Kristensen, B.W. Tumour-associated microglia/macrophages predict poor prognosis in high-grade gliomas and correlate with an aggressive tumour subtype. *Neuropathology and applied neurobiology*, **2018**, *44*, 185–206.
- [71] Wang, Q.; Hu, B.; Hu, X.; Kim, H.; Squatrito, M.; Scarpace, L.; deCarvalho, A.C.; Lyu, S.; Li, P.; Li, Y.; Barthel, F.; Cho, H.J.; Lin, Y.-H.; Satani, N.; Martinez-Ledesma, E.; Zheng, S.; Chang, E.; Sauvé, C.-E.G.; Olar, A.; Lan, Z.D.; Finocchiaro, G.; Phillips, J.J.; Berger, M.S.; Gabrusiewicz, K.R.; Wang, G.; Eskilsson, E.; Hu, J.; Mikkelsen, T.; DePinho, R.A.; Muller, F.; Heimberger, A.B.; Sulman, E.P.; Nam, D.-H.; Verhaak, R.G.W. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer cell*, **2017**, *32*, 42-56.e6.
- [72] Maximov, V.; Chen, Z.; Wei, Y.; Robinson, M.H.; Herting, C.J.; Shanmugam, N.S.; Rudneva, V.A.; Goldsmith, K.C.; MacDonald, T.J.; Northcott, P.A.; Hambardzumyan, D.; Kenney, A.M. Tumour-associated macrophages exhibit anti-tumoural properties in Sonic Hedgehog medulloblastoma. *Nature communications*, **2019**, *10*, 2410.
- [73] Woolf, Z.; Swanson, M.E.V.; Smyth, L.C.; Mee, E.W.; Schweder, P.; Heppner, P.; Kim, B.J.H.; Turner, C.; Oldfield, R.L.; Curtis, M.A.; Faull, R.L.M.; Scotter, E.L.; Park, T.I.-H.; Dragunow, M. Single-cell image analysis reveals a protective role for microglia in glioblastoma. *Neuro-oncology advances*, **2021**, *3*, vdab031.
- [74] Hutter, G.; Theruvath, J.; Graef, C.M.; Zhang, M.; Schoen, M.K.; Manz, E.M.; Bennett, M.L.; Olson, A.; Azad, T.D.; Sinha, R.; Chan, C.; Assad Kahn, S.; Gholamin, S.; Wilson, C.; Grant, G.; He, J.; Weissman, I.L.; Mitra, S.S.; Cheshier, S.H. Microglia are effector cells of CD47-SIRP α antiphagocytic axis disruption against glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2019**, *116*, 997–1006.
- [75] Chen, J.-W.E.; Lumibao, J.; Leary, S.; Sarkaria, J.N.; Steelman, A.J.; Gaskins, H.R.; Harley, B.A.C. Crosstalk between microglia and patient-derived glioblastoma cells inhibit invasion in a three-dimensional gelatin hydrogel model. *Journal of neuroinflammation*, **2020**, *17*, 346.
- [76] Chen, A.X.; Gartrell, R.D.; Zhao, J.; Upadhyayula, P.S.; Zhao, W.; Yuan, J.; Minns, H.E.; Dovas, A.; Bruce, J.N.; Lasorella, A.; Iavarone, A.; Canoll, P.; Sims, P.A.; Rabidan, R. Single-cell characterization of macrophages in glioblastoma reveals MARCO as a mesenchymal pro-tumor marker. *Genome medicine*, **2021**, *13*, 88.

- [77] Hau, P.; Kunz-Schughart, L.A.; Rümmele, P.; Arslan, F.; Dörfelt, A.; Koch, H.; Lohmeier, A.; Hirschmann, B.; Müller, A.; Bogdahn, U.; Bosserhoff, A.-K. Tenascin-C protein is induced by transforming growth factor-beta1 but does not correlate with time to tumor progression in high-grade gliomas. *Journal of neuro-oncology*, **2006**, *77*, 1–7.
- [78] Stratoulias, V.; Venero, J.L.; Tremblay, M.-È.; Joseph, B. Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *The EMBO journal*, **2019**, *38*, e101997.
- [79] Ochocka, N.; Segit, P.; Walentynowicz, K.A.; Wojnicki, K.; Cyranowski, S.; Swatler, J.; Mieczkowski, J.; Kaminska, B. Single-cell RNA sequencing reveals functional heterogeneity of glioma-associated brain macrophages. *Nature communications*, **2021**, *12*, 1151.
- [80] Ahmed, R.; Zaman, T.; Chowdhury, F.; Mraiche, F.; Tariq, M.; Ahmad, I.S.; Hasan, A. Single-Cell RNA Sequencing with Spatial Transcriptomics of Cancer Tissues. *International journal of molecular sciences*, **2022**, *23*.
- [81] Xuan, W.; Lesniak, M.S.; James, C.D.; Heimberger, A.B.; Chen, P. Context-Dependent Glioblastoma-Macrophage/Microglia Symbiosis and Associated Mechanisms. *Trends in immunology*, **2021**, *42*, 280–292.
- [82] Codrici, E.; Popescu, I.-D.; Tanase, C.; Enciu, A.-M. Friends with Benefits: Chemokines, Glioblastoma-Associated Microglia/Macrophages, and Tumor Microenvironment. *International journal of molecular sciences*, **2022**, *23*.
- [83] Brandenburg, S.; Blank, A.; Bungert, A.D.; Vajkoczy, P. Distinction of Microglia and Macrophages in Glioblastoma: Close Relatives, Different Tasks? *International journal of molecular sciences*, **2020**, *22*.
- [84] Uhlén, M.; Fagerberg, L.; Hallström, B.M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, Å.; Kampf, C.; Sjöstedt, E.; Asplund, A.; Olsson, I.; Edlund, K.; Lundberg, E.; Navani, S.; Szigyarto, C.A.-K.; Odeberg, J.; Djureinovic, D.; Takanen, J.O.; Hober, S.; Alm, T.; Edqvist, P.-H.; Berling, H.; Tegel, H.; Mulder, J.; Rockberg, J.; Nilsson, P.; Schwenk, J.M.; Hamsten, M.; Feilitzen, K. von; Forsberg, M.; Persson, L.; Johansson, F.; Zwahlen, M.; Heijne, G. von; Nielsen, J.; Pontén, F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science (New York, N.Y.)*, **2015**, *347*, 1260419.
- [85] Schwabenland, M.; Brück, W.; Priller, J.; Stadelmann, C.; Lassmann, H.; Prinz, M. Analyzing microglial phenotypes across neuropathologies: a practical guide. *Acta neuropathologica*, **2021**, *142*, 923–936.
- [86] Jurga, A.M.; Paleczna, M.; Kuter, K.Z. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Frontiers in cellular neuroscience*, **2020**, *14*, 198.

- [87] Eme-Scolan, E.; Dando, S.J. Tools and Approaches for Studying Microglia In vivo. *Frontiers in immunology*, **2020**, *11*, 583647.
- [88] Bennett, M.L.; Bennett, F.C.; Liddelow, S.A.; Ajami, B.; Zamanian, J.L.; Fernhoff, N.B.; Mulinyawe, S.B.; Bohlen, C.J.; Adil, A.; Tucker, A.; Weissman, I.L.; Chang, E.F.; Li, G.; Grant, G.A.; Hayden Gephart, M.G.; Barres, B.A. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2016**, *113*, E1738-46.
- [89] Vankriekelsvenne, E.; Chrzanowski, U.; Manzhula, K.; Greiner, T.; Wree, A.; Hawlitschka, A.; Llovera, G.; Zhan, J.; Joost, S.; Schmitz, C.; Ponsaerts, P.; Amor, S.; Nutma, E.; Kipp, M.; Kaddatz, H. Transmembrane protein 119 is neither a specific nor a reliable marker for microglia. *Glia*, **2022**, *70*, 1170–1190.
- [90] Tang, F.; Wang, Y.; Zeng, Y.; Xiao, A.; Tong, A.; Xu, J. Tumor-associated macrophage-related strategies for glioma immunotherapy. *NPJ precision oncology*, **2023**, *7*, 78.
- [91] Butowski, N.; Colman, H.; Groot, J.F. de; Omuro, A.M.; Nayak, L.; Wen, P.Y.; Cloughesy, T.F.; Marimuthu, A.; Haidar, S.; Perry, A.; Huse, J.; Phillips, J.; West, B.L.; Nolop, K.B.; Hsu, H.H.; Ligon, K.L.; Molinaro, A.M.; Prados, M. Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 in recurrent glioblastoma: an Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium phase II study. *Neuro-oncology*, **2016**, *18*, 557–564.
- [92] Steindl, A.; Valiente, M. Potential of ex vivo organotypic slice cultures in neuro-oncology. *Neuro-oncology*, **2025**, *27*, 338–351.
- [93] Bak, A.; Koch, H.; van Loo, K.M.J.; Schmied, K.; Gittel, B.; Weber, Y.; Ort, J.; Schwarz, N.; Tauber, S.C.; Wuttke, T.V.; Delev, D. Human organotypic brain slice cultures: a detailed and improved protocol for preparation and long-term maintenance. *Journal of neuroscience methods*, **2024**, *404*, 110055.
- [94] AlaylioĞlu, M.; Dursun, E.; Yilmazer, S.; Ak, D.G. A Bridge Between in vitro and in vivo Studies in Neuroscience: Organotypic Brain Slice Cultures. *Noro psikiyatri arsivi*, **2020**, *57*, 333–337.
- [95] Li, Q.; Han, X.; Wang, J. Organotypic Hippocampal Slices as Models for Stroke and Traumatic Brain Injury. *Molecular neurobiology*, **2016**, *53*, 4226–4237.
- [96] Richter, M.; Vidovic, N.; Biber, K.; Dolga, A.; Culmsee, C.; Dodel, R. The neuroprotective role of microglial cells against amyloid beta-mediated toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, **2020**, *30*, 589–602.

- [97] Kipp, M.; van der Star, B.; Vogel, D.Y.S.; Puentes, F.; van der Valk, P.; Baker, D.; Amor, S. Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Multiple sclerosis and related disorders*, **2012**, *1*, 15–28.
- [98] Delbridge, A.R.D.; Huh, D.; Brickelmaier, M.; Burns, J.C.; Roberts, C.; Challa, R.; Raymond, N.; Cullen, P.; Carlile, T.M.; Ennis, K.A.; Liu, M.; Sun, C.; Allaire, N.E.; Foos, M.; Tsai, H.-H.; Franchimont, N.; Ransohoff, R.M.; Butts, C.; Mingueneau, M. Organotypic Brain Slice Culture Microglia Exhibit Molecular Similarity to Acutely-Isolated Adult Microglia and Provide a Platform to Study Neuroinflammation. *Frontiers in cellular neuroscience*, **2020**, *14*, 592005.
- [99] Masuch, A.; Biber, K. Replenishment of Organotypic Hippocampal Slice Cultures with Neonatal or Adult Microglia. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **2019**, *2034*, 127–147.
- [100] Blazquez, R.; Sparrer, D.; Sonbol, J.; Philipp, J.; Schmieder, F.; Pukrop, T. Organotypic 3D Ex Vivo Co-culture Model of the Macro-metastasis/Organ Parenchyma Interface. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **2024**, *2764*, 165–176.
- [101] Leidgens, V.; Proske, J.; Rauer, L.; Moeckel, S.; Renner, K.; Bogdahn, U.; Riemschneider, M.J.; Proescholdt, M.; Vollmann-Zwerenz, A.; Hau, P.; Seliger, C. Stattic and metformin inhibit brain tumor initiating cells by reducing STAT3-phosphorylation. *Oncotarget*, **2017**, *8*, 8250–8263.
- [102] Eyüpoglu, I.Y.; Hahnen, E.; Heckel, A.; Siebzehnrübl, F.A.; Buslei, R.; Fahlbusch, R.; Blümcke, I. Malignant glioma-induced neuronal cell death in an organotypic glioma invasion model. Technical note. *Journal of neurosurgery*, **2005**, *102*, 738–744.
- [103] D'Alessio, A.; Proietti, G.; Sica, G.; Scicchitano, B.M. Pathological and Molecular Features of Glioblastoma and Its Peritumoral Tissue. *Cancers*, **2019**, *11*, 469.
- [104] Karschnia, P.; Smits, M.; Reifenberger, G.; Le Rhun, E.; Ellingson, B.M.; Galldiks, N.; Kim, M.M.; Huse, J.T.; Schnell, O.; Harter, P.N.; Mohme, M.; Baumgarten, L. von; Albert, N.L.; Huang, R.Y.; Mehta, M.P.; van den Bent, M.; Weller, M.; Vogelbaum, M.A.; Chang, S.M.; Berger, M.S.; Tonn, J.-C. A framework for standardised tissue sampling and processing during resection of diffuse intracranial glioma: joint recommendations from four RANO groups. *The Lancet. Oncology*, **2023**, *24*, e438-e450.
- [105] GALICICH, J.H.; FRENCH, L.A.; MELBY, J.C. Use of dexamethasone in treatment of cerebral edema associated with brain tumors. *The Journal-lancet*, **1961**, *81*, 46–53.
- [106] Ly, K.I.; Wen, P.Y. Clinical Relevance of Steroid Use in Neuro-Oncology. *Current neurology and neuroscience reports*, **2017**, *17*, 5.

- [107] Jessurun, C.A.C.; Hulsbergen, A.F.C.; Cho, L.D.; Aglio, L.S.; Nandoe Tewarie, R.D.S.; Broekman, M.L.D. Evidence-based dexamethasone dosing in malignant brain tumors: what do we really know? *J Neurooncol*, **2019**, *144*, 249–264.
- [108] Kostaras, X.; Cusano, F.; Kline, G.A.; Roa, W.; Easaw, J. Use of dexamethasone in patients with high-grade glioma: a clinical practice guideline. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, **2014**, *21*, e493-503.
- [109] Schroeder, T.; Bittrich, P.; Noebel, C.; Kuhne, J.F.; Schroeder, J.; Schoen, G.; Fiehler, J.; Kniep, H.C.; Gellißen, S. Efficiency of Dexamethasone for Treatment of Vasogenic Edema in Brain Metastasis Patients: A Radiographic Approach. *Frontiers in oncology*, **2019**, *9*, 695.
- [110] Ryken, T.C.; Kuo, J.S.; Prabhu, R.S.; Sherman, J.H.; Kalkanis, S.N.; Olson, J.J. Congress of Neurological Surgeons Systematic Review and Evidence-Based Guidelines on the Role of Steroids in the Treatment of Adults With Metastatic Brain Tumors. *Neurosurgery*, **2019**, *84*, E189-E191.
- [111] Lim-Fat, M.J.; Bi, W.L.; Lo, J.; Lee, E.Q.; Ahluwalia, M.S.; Batchelor, T.T.; Chang, S.M.; Chiocca, E.A.; Chukwueke, U.; Cloughesy, T.F.; Colman, H.; DeAngelis, L.M.; Galanis, E.; Gilbert, M.R.; Groot, J.F. de; Lassman, A.B.; Liau, L.M.; Mason, W.; McFaline-Figueroa, J.R.; Mehta, M.P.; Mellinghoff, I.K.; Nabors, L.B.; Nayak, L.; Reardon, D.A.; Wen, P.Y. Letter: When Less is More: Dexamethasone Dosing for Brain Tumors. *Neurosurgery*, **2019**, *85*, E607-E608.
- [112] Romero, I.A.; Radewicz, K.; Jubin, E.; Michel, C.C.; Greenwood, J.; Couraud, P.-O.; Adamson, P. Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neuroscience letters*, **2003**, *344*, 112–116.
- [113] Wong, E.T.; Lok, E.; Gautam, S.; Swanson, K.D. Dexamethasone exerts profound immunologic interference on treatment efficacy for recurrent glioblastoma. *British journal of cancer*, **2015**, *113*, 232–241.
- [114] Heiss, J.D.; Papavassiliou, E.; Merrill, M.J.; Nieman, L.; Knightly, J.J.; Walbridge, S.; Edwards, N.A.; Oldfield, E.H. Mechanism of dexamethasone suppression of brain tumor-associated vascular permeability in rats. Involvement of the glucocorticoid receptor and vascular permeability factor. *The Journal of clinical investigation*, **1996**, *98*, 1400–1408.
- [115] Fan, Z.; Sehm, T.; Rauh, M.; Buchfelder, M.; Eyupoglu, I.Y.; Savaskan, N.E. Dexamethasone alleviates tumor-associated brain damage and angiogenesis. *PloS one*, **2014**, *9*, e93264.

- [116] Rasmussen, M.; Bundgaard, H.; Cold, G.E. Craniotomy for supratentorial brain tumors: risk factors for brain swelling after opening the dura mater. *Journal of neurosurgery*, **2004**, *101*, 621–626.
- [117] Alan, N.; Seicean, A.; Seicean, S.; Neuhauser, D.; Benzel, E.C.; Weil, R.J. Preoperative steroid use and the incidence of perioperative complications in patients undergoing craniotomy for definitive resection of a malignant brain tumor. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, **2015**, *22*, 1413–1419.
- [118] Chambless, L.B.; Kistka, H.M.; Parker, S.L.; Hassam-Malani, L.; McGirt, M.J.; Thompson, R.C. The relative value of postoperative versus preoperative Karnofsky Performance Scale scores as a predictor of survival after surgical resection of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*, **2015**, *121*, 359–364.
- [119] Scheffler, P.; Fung, C.; Momjian, S.; Koessinger, D.; Häni, L.; Neidert, N.; Straehle, J.; Volz, F.; Schnell, O.; Beck, J.; El Rahal, A. Dexamethasone in Patients with Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers*, **2024**, *16*.
- [120] Arora, H.; Mammi, M.; Patel, N.M.; Zyfi, D.; Dasari, H.R.; Yunusa, I.; Simjian, T.; Smith, T.R.; Mekary, R.A. Dexamethasone and overall survival and progression free survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a meta-analysis. *J Neurooncol*, **2023**.
- [121] Petrelli, F.; Stefani, A. de; Ghidini, A.; Bruschieri, L.; Riboldi, V.; Dottorini, L.; Iaculli, A.; Zaniboni, A.; Trevisan, F. Steroids use and survival in patients with glioblastoma multiforme: a pooled analysis. *Journal of neurology*, **2021**, *268*, 440–447.
- [122] Zhou, L.; Shen, Y.; Huang, T.; Sun, Y.; Alolga, R.N.; Zhang, G.; Ge, Y. The Prognostic Effect of Dexamethasone on Patients With Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in pharmacology*, **2021**, *12*, 727707.
- [123] Pitter, K.L.; Tamagno, I.; Alikhanyan, K.; Hosni-Ahmed, A.; Pattwell, S.S.; Donnola, S.; Dai, C.; Ozawa, T.; Chang, M.; Chan, T.A.; Beal, K.; Bishop, A.J.; Barker, C.A.; Jones, T.S.; Hentschel, B.; Gorlia, T.; Schlegel, U.; Stupp, R.; Weller, M.; Holland, E.C.; Hambardzumyan, D. Corticosteroids compromise survival in glioblastoma. *Brain : a journal of neurology*, **2016**, *139*, 1458–1471.
- [124] Koning, A.-S.C.A.M.; Satoer, D.D.; Vinkers, C.H.; Zamanipoor Najafabadi, A.H.; Biermasz, N.R.; Nandoe Tewarie, R.D.S.; Moojen, W.A.; van Rossum, E.F.C.; Dirven, C.M.F.; Pereira, A.M.; van Furth, W.R.; Meijer, O.C. The DEXA-CORT trial: study protocol of a randomised placebo-controlled trial of hydrocortisone in patients with brain

- tumour on the prevention of neuropsychiatric adverse effects caused by perioperative dexamethasone. *BMJ open*, **2021**, *11*, e054405.
- [125] Caramanna, I.; Kort, J.M. de; Brandes, A.A.; Taal, W.; Platten, M.; Idbaih, A.; Frenel, J.S.; Wick, W.; Preetha, C.J.; Bendszus, M.; Vollmuth, P.; Reijneveld, J.C.; Klein, M. Corticosteroids use and neurocognitive functioning in patients with recurrent glioblastoma: Evidence from European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) trial 26101. *Neuro-oncology practice*, **2022**, *9*, 310–316.
- [126] Kostopoulou, O.N.; Mohammad, A.-A.; Bartek, J.; Winter, J.; Jung, M.; Stragliotto, G.; Söderberg-Nauclér, C.; Landázuri, N. Glucocorticoids promote a glioma stem cell-like phenotype and resistance to chemotherapy in human glioblastoma primary cells: Biological and prognostic significance. *International journal of cancer*, **2018**, *142*, 1266–1276.
- [127] Sur, P.; Sribnick, E.A.; Patel, S.J.; Ray, S.K.; Banik, N.L. Dexamethasone decreases temozolomide-induced apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Glia*, **2005**, *50*, 160–167.
- [128] Das, A.; Banik, N.L.; Patel, S.J.; Ray, S.K. Dexamethasone protected human glioblastoma U87MG cells from temozolomide induced apoptosis by maintaining Bax:Bcl-2 ratio and preventing proteolytic activities. *Molecular cancer*, **2004**, *3*, 36.
- [129] Shields, L.B.E.; Shelton, B.J.; Shearer, A.J.; Chen, L.; Sun, D.A.; Parsons, S.; Bourne, T.D.; LaRocca, R.; Spalding, A.C. Dexamethasone administration during definitive radiation and temozolomide renders a poor prognosis in a retrospective analysis of newly diagnosed glioblastoma patients. *Radiation oncology (London, England)*, **2015**, *10*, 222.
- [130] Bracci, P.M.; Rice, T.; Hansen, H.M.; Francis, S.S.; Lee, S.; McCoy, L.S.; Shrestha, P.P.; Warrier, G.; Clarke, J.L.; Molinaro, A.M.; Taylor, J.W.; Wiencke, J.K.; Wrensch, M.R. Pre-surgery immune profiles of adult glioma patients. *J Neurooncol*, **2022**, *159*, 103–115.
- [131] Nair, S.K.; Botros, D.; Chakravarti, S.; Mao, Y.; Wu, E.; Lu, B.; Liu, S.; Elshareif, M.; Jackson, C.M.; Gallia, G.L.; Bettegowda, C.; Weingart, J.; Brem, H.; Mukherjee, D. Predictors of surgical site infection in glioblastoma patients undergoing craniotomy for tumor resection. *Journal of neurosurgery*, **2023**, *138*, 1227–1234.
- [132] Jatana, S.; Mohammad, A.H.; Al-Saadi, T.D.; Carias, M.; Guevara-Moriones, N.; Ruiz-Barrera, M.A.; Mindru, C.S.; Diaz, R.J. Characterization of perioperative glycemic status and dexamethasone use with associated postoperative complications in glioblastoma patients. *Acta neurochirurgica*, **2023**, *165*, 1031–1040.

- [133] Zaki, P.G.; Herr, S.; Shepard, M.J. Letter to the editor: Dexamethasone and overall survival and progression free survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a meta-analysis. *J Neurooncol*, **2024**, *167*, 363–364.
- [134] Cenciarini, M.; Valentino, M.; Belia, S.; Sforna, L.; Rosa, P.; Ronchetti, S.; D'Adamo, M.C.; Pessia, M. Dexamethasone in Glioblastoma Multiforme Therapy: Mechanisms and Controversies. *Frontiers in molecular neuroscience*, **2019**, *12*, 65.
- [135] Wong, E.T.; Swanson, K.D. Dexamethasone-Friend or Foe for Patients With Glioblastoma? *JAMA neurology*, **2019**, *76*, 247–248.
- [136] Kelly, W.J.; Gilbert, M.R. Glucocorticoids and immune checkpoint inhibitors in glioblastoma. *J Neurooncol*, **2021**, *151*, 13–20.
- [137] Upadhyayula, P.S.; Higgins, D.M.; Argenziano, M.G.; Spinazzi, E.F.; Wu, C.-C.; Canoll, P.; Bruce, J.N. The Sledgehammer in Precision Medicine: Dexamethasone and Immunotherapeutic Treatment of Glioma. *Cancer investigation*, **2022**, *40*, 554–566.
- [138] Kaup, B.; Schindler, I.; Knüpfer, H.; Schlenzka, A.; Preiss, R.; Knüpfer, M.M. Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone. *J Neurooncol*, **2001**, *51*, 105–110.
- [139] Piette, C.; Deprez, M.; Roger, T.; Noël, A.; Foidart, J.-M.; Munaut, C. The dexamethasone-induced inhibition of proliferation, migration, and invasion in glioma cell lines is antagonized by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and can be enhanced by specific MIF inhibitors. *The Journal of biological chemistry*, **2009**, *284*, 32483–32492.
- [140] Villeneuve, J.; Galarneau, H.; Beaudet, M.-J.; Tremblay, P.; Chernomoretz, A.; Vallières, L. Reduced glioma growth following dexamethasone or anti-angiopoietin 2 treatment. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, **2008**, *18*, 401–414.
- [141] Ai, J.; Weng, Y.; Jiang, L.; Liu, C.; Liu, H.; Chen, H. Dexamethasone Suppresses IL-33-exacerbated Malignant Phenotype of U87MG Glioblastoma Cells via NF-κB and MAPK Signaling Pathways. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, **2024**, *24*, 389–397.
- [142] Luedi, M.M.; Singh, S.K.; Mosley, J.C.; Hassan, I.S.A.; Hatami, M.; Gumin, J.; Anderegg, L.; Sulman, E.P.; Lang, F.F.; Stueber, F.; Fuller, G.N.; Colen, R.R.; Zinn, P.O. Dexamethasone-mediated oncogenicity in vitro and in an animal model of glioblastoma. *Journal of neurosurgery*, **2018**, *129*, 1446–1455.
- [143] Swildens, K.X.; Silleveld Smitt, P.A.E.; van den Bent, M.J.; French, P.J.; Geurts, M. The effect of dexamethasone on the microenvironment and efficacy of checkpoint inhibitors in glioblastoma: a systematic review. *Neuro-oncology advances*, **2022**, *4*, vdac087.

- [144] Adhikaree, J.; Franks, H.A.; Televantos, C.; Vaghela, P.; Kaur, A.P.; Walker, D.; Schmitz, M.; Jackson, A.M.; Patel, P.M. Impaired circulating myeloid CD1c⁺ dendritic cell function in human glioblastoma is restored by p38 inhibition – implications for the next generation of DC vaccines. *Oncoimmunology*, **2019**, *8*.
- [145] Chitadze, G.; Flüh, C.; Quabius, E.S.; Freitag-Wolf, S.; Peters, C.; Lettau, M.; Bhat, J.; Wesch, D.; Oberg, H.-H.; Luecke, S.; Janssen, O.; Synowitz, M.; Held-Feindt, J.; Kabelitz, D. In-depth immunophenotyping of patients with glioblastoma multiforme: Impact of steroid treatment. *Oncoimmunology*, **2017**, *6*.
- [146] Fries, G.; Perneczky, A.; Kempski, O. Enhanced interleukin-1 beta release and longevity of glioma-associated peripheral blood monocytes in vitro. *Neurosurgery*, **1994**, *35*, 264-70; discussion 270-1.
- [147] Gustafson, M.P.; Lin, Y.; New, K.C.; Bulur, P.A.; O'Neill, B.P.; Gastineau, D.A.; Dietz, A.B. Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14+HLA-DRlo/neg monocytes, tumor factors, and dexamethasone. *Neuro-oncology*, **2010**, *12*, 631–644.
- [148] Otvos, B.; Alban, T.J.; Grabowski, M.M.; Bayik, D.; Mulkearns-Hubert, E.E.; Radivoyevitch, T.; Rabljenovic, A.; Johnson, S.; Androjna, C.; Mohammadi, A.M.; Barnett, G.H.; Ahluwalia, M.S.; Vogelbaum, M.A.; Fecci, P.E.; Lathia, J.D. Preclinical Modeling of Surgery and Steroid Therapy for Glioblastoma Reveals Changes in Immunophenotype that are Associated with Tumor Growth and Outcome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **2021**, *27*, 2038–2049.
- [149] Quillien, V.; Carpentier, A.F.; Gey, A.; Avril, T.; Tartour, E.; Sejalon, F.; Campillo-Gimenez, B.; Vauleon, E. Absolute numbers of regulatory T cells and neutrophils in corticosteroid-free patients are predictive for response to bevacizumab in recurrent glioblastoma patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, **2019**, *68*, 871–882.
- [150] Chongsathidkiet, P.; Jackson, C.; Koyama, S.; Loebel, F.; Cui, X.; Farber, S.H.; Woroniecka, K.; Elsamadicy, A.A.; Dechant, C.A.; Kemeny, H.R.; Sanchez-Perez, L.; Cheema, T.A.; Souders, N.C.; Herndon, J.E.; Coumans, J.-V.; Everitt, J.I.; Nahed, B.V.; Sampson, J.H.; Gunn, M.D.; Martuza, R.L.; Dranoff, G.; Curry, W.T.; Fecci, P.E. Sequestration of T cells in bone marrow in the setting of glioblastoma and other intracranial tumors. *Nature medicine*, **2018**, *24*, 1459–1468.
- [151] Dubinski, D.; Won, S.-Y.; Gessler, F.; Quick-Weller, J.; Behmanesh, B.; Bernatz, S.; Forster, M.-T.; Franz, K.; Plate, K.-H.; Seifert, V.; Harter, P.N.; Senft, C. Dexamethasone-

- induced leukocytosis is associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma. *J Neurooncol*, **2018**, *137*, 503–510.
- [152] Dusoswa, S.A.; Verhoeff, J.; van Asten, S.; Lüppers, J.; van den Braber, M.; Peters, S.; Abeln, S.; Crommentuijn, M.H.W.; Wesseling, P.; Vandertop, W.P.; Twisk, J.W.R.; Würdinger, T.; Noske, D.; van Kooyk, Y.; Garcia-Vallejo, J.J. The immunological landscape of peripheral blood in glioblastoma patients and immunological consequences of age and dexamethasone treatment. *Frontiers in immunology*, **2024**, *15*, 1343484.
- [153] Combes, A.J.; Samad, B.; Tsui, J.; Chew, N.W.; Yan, P.; Reeder, G.C.; Kushnoor, D.; Shen, A.; Davidson, B.; Barczak, A.J.; Adkisson, M.; Edwards, A.; Naser, M.; Barry, K.C.; Courau, T.; Hammoudi, T.; Argüello, R.J.; Rao, A.A.; Olshen, A.B.; Cai, C.; Zhan, J.; Davis, K.C.; Kelley, R.K.; Chapman, J.S.; Atreya, C.E.; Patel, A.; Daud, A.I.; Ha, P.; Diaz, A.A.; Kratz, J.R.; Collisson, E.A.; Fragiadakis, G.K.; Erle, D.J.; Boissonnas, A.; Asthana, S.; Chan, V.; Krummel, M.F. Discovering dominant tumor immune archetypes in a pan-cancer census. *Cell*, **2022**, *185*, 184-203.e19.
- [154] Cari, L.; Rosa, F. de; Nocentini, G.; Riccardi, C. Context-Dependent Effect of Glucocorticoids on the Proliferation, Differentiation, and Apoptosis of Regulatory T Cells: A Review of the Empirical Evidence and Clinical Applications. *International journal of molecular sciences*, **2019**, *20*.
- [155] Moyes, K.W.; Davis, A.; Hoglund, V.; Haberthur, K.; Lieberman, N.A.; Kreuser, S.A.; Deutsch, G.H.; Franco, S.; Locke, D.; Carleton, M.O.; Gilbertson, D.G.; Simmons, R.; Winter, C.; Silber, J.; Gonzalez-Cuyar, L.F.; Ellenbogen, R.G.; Crane, C.A. Effects of tumor grade and dexamethasone on myeloid cells in patients with glioma. *Oncoimmunology*, **2018**, *7*, e1507668.
- [156] Carenza, C.; Franzese, S.; Castagna, A.; Terzoli, S.; Simonelli, M.; Persico, P.; Bello, L.; Nibali, M.C.; Pessina, F.; Kunderfranco, P.; Peano, C.; Balin, S.; Mikulak, J.; Calcaterra, F.; Bonecchi, R.; Savino, B.; Locati, M.; Della Bella, S.; Mavilio, D. Perioperative corticosteroid treatment impairs tumor-infiltrating dendritic cells in patients with newly diagnosed adult-type diffuse gliomas. *Frontiers in immunology*, **2022**, *13*, 1074762.
- [157] Giles, A.J.; Hutchinson, M.-K.N.D.; Sonnemann, H.M.; Jung, J.; Fecci, P.E.; Ratnam, N.M.; Zhang, W.; Song, H.; Bailey, R.; Davis, D.; Reid, C.M.; Park, D.M.; Gilbert, M.R. Dexamethasone-induced immunosuppression: mechanisms and implications for immunotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer*, **2018**, *6*, 51.

- [158] Iorgulescu, J.B.; Gokhale, P.C.; Speranza, M.C.; Eschle, B.K.; Poitras, M.J.; Wilkens, M.K.; Soroko, K.M.; Chhoeu, C.; Knott, A.; Gao, Y.; Lim-Fat, M.J.; Baker, G.J.; Bonal, D.M.; Nguyen, Q.-D.; Grant, G.R.L.; Ligon, K.L.; Sorger, P.K.; Chiocca, E.A.; Anderson, A.C.; Kirschmeier, P.T.; Sharpe, A.H.; Freeman, G.J.; Reardon, D.A. Concurrent Dexamethasone Limits the Clinical Benefit of Immune Checkpoint Blockade in Glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **2021**, *27*, 276–287.
- [159] Koch, M.S.; Zdioruk, M.; Nowicki, M.O.; Griffith, A.M.; Aguilar, E.; Aguilar, L.K.; Guzik, B.W.; Barone, F.; Tak, P.P.; Tabatabai, G.; Lederer, J.A.; Chiocca, E.A.; Lawler, S. Systemic high-dose dexamethasone treatment may modulate the efficacy of intratumoral viral oncolytic immunotherapy in glioblastoma models. *Journal for immunotherapy of cancer*, **2022**, *10*.
- [160] Nayak, L.; Molinaro, A.M.; Peters, K.; Clarke, J.L.; Jordan, J.T.; Groot, J. de; Nghiempuhu, L.; Kaley, T.; Colman, H.; McCluskey, C.; Gaffey, S.; Smith, T.R.; Cote, D.J.; Severgnini, M.; Yearley, J.H.; Zhao, Q.; Blumenschein, W.M.; Duda, D.G.; Muzikansky, A.; Jain, R.K.; Wen, P.Y.; Reardon, D.A. Randomized Phase II and Biomarker Study of Pembrolizumab plus Bevacizumab versus Pembrolizumab Alone for Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **2021**, *27*, 1048–1057.
- [161] Keskin, D.B.; Anandappa, A.J.; Sun, J.; Tirosh, I.; Mathewson, N.D.; Li, S.; Oliveira, G.; Giobbie-Hurder, A.; Felt, K.; Gjini, E.; Shukla, S.A.; Hu, Z.; Li, L.; Le, P.M.; Allesøe, R.L.; Richman, A.R.; Kowalczyk, M.S.; Abdelrahman, S.; Geduldig, J.E.; Charbonneau, S.; Pelton, K.; Iorgulescu, J.B.; Elagina, L.; Zhang, W.; Olive, O.; McCluskey, C.; Olsen, L.R.; Stevens, J.; Lane, W.J.; Salazar, A.M.; Daley, H.; Wen, P.Y.; Chiocca, E.A.; Harden, M.; Lennon, N.J.; Gabriel, S.; Getz, G.; Lander, E.S.; Regev, A.; Ritz, J.; Neuberg, D.; Rodig, S.J.; Ligon, K.L.; Suvà, M.L.; Wucherpfennig, K.W.; Hacohen, N.; Fritsch, E.F.; Livak, K.J.; Ott, P.A.; Wu, C.J.; Reardon, D.A. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. *Nature*, **2019**, *565*, 234–239.
- [162] Hughes, C.E.; Nibbs, R.J.B. A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS journal*, **2018**, *285*, 2944–2971.
- [163] Zhou, C.; Gao, Y.; Ding, P.; Wu, T.; Ji, G. The role of CXCL family members in different diseases. *Cell death discovery*, **2023**, *9*, 212.
- [164] Wu, T.; Yang, W.; Sun, A.; Wei, Z.; Lin, Q. The Role of CXC Chemokines in Cancer Progression. *Cancers*, **2022**, *15*.

- [165] Korbecki, J.; Bosiacki, M.; Chlubek, D.; Baranowska-Bosiacka, I. Bioinformatic Analysis of the CXCR2 Ligands in Cancer Processes. *International journal of molecular sciences*, **2023**, 24.
- [166] Korbecki, J.; Kupnicka, P.; Chlubek, M.; Goracy, J.; Gutowska, I.; Baranowska-Bosiacka, I. CXCR2 Receptor: Regulation of Expression, Signal Transduction, and Involvement in Cancer. *International journal of molecular sciences*, **2022**, 23.
- [167] Urbantat, R.M.; Blank, A.; Kremenetskaia, I.; Vajkoczy, P.; Acker, G.; Brandenburg, S. The CXCL2/IL8/CXCR2 Pathway Is Relevant for Brain Tumor Malignancy and Endothelial Cell Function. *International journal of molecular sciences*, **2021**, 22.
- [168] Yang, L.; Liu, Z.; Wu, R.; Yao, Q.; Gu, Z.; Liu, M. Correlation of C-X-C chemokine receptor 2 upregulation with poor prognosis and recurrence in human glioma. *Oncotargets and therapy*, **2015**, 8, 3203–3209.
- [169] Presti, M.; Mazzon, E.; Basile, M.S.; Petralia, M.C.; Bramanti, A.; Colletti, G.; Bramanti, P.; Nicoletti, F.; Fagone, P. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor and functionally-related genes, D-DT, CD74, CD44, CXCR2 and CXCR4, in glioblastoma. *Oncology letters*, **2018**, 16, 2881–2886.
- [170] Korkolopoulou, P.; Levidou, G.; El-Habr, E.A.; Adamopoulos, C.; Samaras, V.; Zisakis, A.; Kavantzas, N.; Boviatsis, E.; Frangkou, P.; Papavassiliou, A.G.; Patsouris, E.; Piperi, C. Expression of interleukin-8 receptor CXCR2 and suppressor of cytokine signaling-3 in astrocytic tumors. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, **2012**, 18, 379–388.
- [171] Hu, J.; Zhao, Q.; Kong, L.-Y.; Wang, J.; Yan, J.; Xia, X.; Jia, Z.; Heimberger, A.B.; Li, S. Regulation of tumor immune suppression and cancer cell survival by CXCL1/2 elevation in glioblastoma multiforme. *Science advances*, **2021**, 7.
- [172] Brat, D.J.; Bellail, A.C.; van Meir, E.G. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncology*, **2005**, 7, 122–133.
- [173] Biterge-Sut, B. A comprehensive analysis of the angiogenesis-related genes in glioblastoma multiforme vs. brain lower grade glioma. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, **2020**, 78, 34–38.
- [174] Angara, K.; Borin, T.F.; Rashid, M.H.; Lebedeva, I.; Ara, R.; Lin, P.-C.; Iskander, A.; Bollag, R.J.; Achyut, B.R.; Arbab, A.S. CXCR2-Expressing Tumor Cells Drive Vascular Mimicry in Antiangiogenic Therapy-Resistant Glioblastoma. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, **2018**, 20, 1070–1082.

- [175] Dwyer, J.; Hebda, J.K.; Le Guelte, A.; Galan-Moya, E.-M.; Smith, S.S.; Azzi, S.; Bidere, N.; Gavard, J. Glioblastoma cell-secreted interleukin-8 induces brain endothelial cell permeability via CXCR2. *PloS one*, **2012**, *7*, e45562.
- [176] Yeo, A.T.; Shah, R.; Aliazis, K.; Pal, R.; Xu, T.; Zhang, P.; Rawal, S.; Rose, C.M.; Varn, F.S.; Appleman, V.A.; Yoon, J.; Varma, H.; Gygi, S.P.; Verhaak, R.G.W.; Boussioutis, V.A.; Charest, A. Driver Mutations Dictate the Immunologic Landscape and Response to Checkpoint Immunotherapy of Glioblastoma. *Cancer immunology research*, **2023**, *11*, 629–645.
- [177] Jin, L.; Tao, H.; Karachi, A.; Long, Y.; Hou, A.Y.; Na, M.; Dyson, K.A.; Grippin, A.J.; Deleyrolle, L.P.; Zhang, W.; Rajon, D.A.; Wang, Q.J.; Yang, J.C.; Kresak, J.L.; Sayour, E.J.; Rahman, M.; Bova, F.J.; Lin, Z.; Mitchell, D.A.; Huang, J. CXCR1- or CXCR2-modified CAR T cells co-opt IL-8 for maximal antitumor efficacy in solid tumors. *Nature communications*, **2019**, *10*, 4016.
- [178] Zhang, Q.; Wang, J.; Yao, X.; Wu, S.; Tian, W.; Gan, C.; Wan, X.; You, C.; Hu, F.; Zhang, S.; Zhang, H.; Zhao, K.; Shu, K.; Lei, T. Programmed Cell Death 10 Mediated CXCL2-CXCR2 Signaling in Regulating Tumor-Associated Microglia/Macrophages Recruitment in Glioblastoma. *Frontiers in immunology*, **2021**, *12*, 637053.
- [179] Desbaillets, I.; Diserens, A.C.; Trbolet, N.; Hamou, M.F.; van Meir, E.G. Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *The Journal of experimental medicine*, **1997**, *186*, 1201–1212.
- [180] Sharma, I.; Singh, A.; Sharma, K.C.; Saxena, S. Gene Expression Profiling of Chemokines and Their Receptors in Low and High Grade Astrocytoma. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, **2017**, *18*, 1307–1313.
- [181] Brandenburg, S.; Müller, A.; Turkowski, K.; Radev, Y.T.; Rot, S.; Schmidt, C.; Bungert, A.D.; Acker, G.; Schorr, A.; Hippe, A.; Miller, K.; Heppner, F.L.; Homey, B.; Vajkoczy, P. Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors. *Acta neuropathologica*, **2016**, *131*, 365–378.
- [182] Urbantat, R.M.; Vajkoczy, P.; Brandenburg, S. Advances in Chemokine Signaling Pathways as Therapeutic Targets in Glioblastoma. *Cancers*, **2021**, *13*.
- [183] Sitaru, S.; Budke, A.; Bertini, R.; Sperandio, M. Therapeutic inhibition of CXCR1/2: where do we stand? *Internal and Emergency Medicine*, **2023**, 1–18.

- [184] Acker, G.; Zollfrank, J.; Jelgersma, C.; Nieminen-Kelhä, M.; Kremenetskaia, I.; Mueller, S.; Ghori, A.; Vajkoczy, P.; Brandenburg, S. The CXCR2/CXCL2 signalling pathway - An alternative therapeutic approach in high-grade glioma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, **2020**, *126*, 106–115.
- [185] Urbantat, R.M.; Jelgersma, C.; Vajkoczy, P.; Brandenburg, S.; Acker, G. Combining TMZ and SB225002 induces changes of CXCR2 and VEGFR signalling in primary human endothelial cells in vitro. *Oncology reports*, **2022**, *48*.
- [186] Urbantat, R.M.; Jelgersma, C.; Brandenburg, S.; Nieminen-Kelhä, M.; Kremenetskaia, I.; Zollfrank, J.; Mueller, S.; Rubarth, K.; Koch, A.; Vajkoczy, P.; Acker, G. Tumor-Associated Microglia/Macrophages as a Predictor for Survival in Glioblastoma and Temozolomide-Induced Changes in CXCR2 Signaling with New Resistance Overcoming Strategy by Combination Therapy. *International journal of molecular sciences*, **2021**, *22*.
- [187] Hasan, T.; Caragher, S.P.; Shireman, J.M.; Park, C.H.; Atashi, F.; Baisiwala, S.; Lee, G.; Guo, D.; Wang, J.Y.; Dey, M.; Wu, M.; Lesniak, M.S.; Horbinski, C.M.; James, C.D.; Ahmed, A.U. Interleukin-8/CXCR2 signaling regulates therapy-induced plasticity and enhances tumorigenicity in glioblastoma. *Cell death & disease*, **2019**, *10*, 292.
- [188] Yuan, W.; Zhang, Q.; Gu, D.; Lu, C.; Dixit, D.; Gimple, R.C.; Gao, Y.; Gao, J.; Li, D.; Shan, D.; Hu, L.; Li, L.; Li, Y.; Ci, S.; You, H.; Yan, L.; Chen, K.; Zhao, N.; Xu, C.; Lan, J.; Liu, D.; Zhang, J.; Shi, Z.; Wu, Q.; Yang, K.; Zhao, L.; Qiu, Z.; Lv, D.; Gao, W.; Yang, H.; Lin, F.; Wang, Q.; Man, J.; Li, C.; Tao, W.; Agnihotri, S.; Qian, X.; Mack, S.C.; Zhang, N.; You, Y.; Rich, J.N.; Sun, G.; Wang, X. Dual Role of CXCL8 in Maintaining the Mesenchymal State of Glioblastoma Stem Cells and M2-Like Tumor-Associated Macrophages. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **2023**, *29*, 3779–3792.
- [189] McCoy, M.G.; Nyanyo, D.; Hung, C.K.; Goerger, J.P.; R Zipfel, W.; Williams, R.M.; Nishimura, N.; Fischbach, C. Endothelial cells promote 3D invasion of GBM by IL-8-dependent induction of cancer stem cell properties. *Scientific reports*, **2019**, *9*, 9069.
- [190] Infanger, D.W.; Cho, Y.; Lopez, B.S.; Mohanan, S.; Liu, S.C.; Gursel, D.; Boockvar, J.A.; Fischbach, C. Glioblastoma stem cells are regulated by interleukin-8 signaling in a tumoral perivascular niche. *Cancer research*, **2013**, *73*, 7079–7089.
- [191] Bajetto, A.; Pattarozzi, A.; Corsaro, A.; Barbieri, F.; Daga, A.; Bosio, A.; Gatti, M.; Pisaturo, V.; Sirito, R.; Florio, T. Different Effects of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Glioblastoma Stem Cells by Direct Cell Interaction or Via Released Soluble Factors. *Frontiers in cellular neuroscience*, **2017**, *11*, 312.

- [192] Zhou, J.; Yi, L.; Ouyang, Q.; Xu, L.; Cui, H.; Xu, M. Neurotensin signaling regulates stem-like traits of glioblastoma stem cells through activation of IL-8/CXCR1/STAT3 pathway. *Cellular signalling*, **2014**, *26*, 2896–2902.
- [193] Raychaudhuri, B.; Vogelbaum, M.A. IL-8 is a mediator of NF-κB induced invasion by gliomas. *J Neurooncol*, **2011**, *101*, 227–235.
- [194] Antonosante, A.; Brandolini, L.; d'Angelo, M.; Benedetti, E.; Castelli, V.; Del Maestro, M.; Luzzi, S.; Giordano, A.; Cimini, A.; Allegretti, M. Autocrine CXCL8-dependent invasiveness triggers modulation of actin cytoskeletal network and cell dynamics. *Aging*, **2020**, *12*, 1928–1951.
- [195] Sahu, U.; Barth, R.F.; Otani, Y.; McCormack, R.; Kaur, B. Rat and Mouse Brain Tumor Models for Experimental Neuro-Oncology Research. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **2022**, *81*, 312–329.
- [196] Lee, Y.S.; Bigner, S.H.; Eng, L.F.; Molnar, P.; Kuruvilla, A.; Groothuis, D.R.; Bigner, D.D. A glial fibrillary acidic protein-expressing and tumorigenic cell line derived from an avian sarcoma virus-induced rat astrocytoma. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **1986**, *45*, 704–720.
- [197] Stoppini, L.; Buchs, P.-A.; Muller, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of neuroscience methods*, **1991**, *37*, 173–182.
- [198] Humpel, C. Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience*, **2015**, *305*, 86–98.
- [199] Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, **2001**, *25*, 402–408.
- [200] Bolte, S.; Cordelières, F.P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy*, **2006**, *224*, 213–232.
- [201] Manders, E.M.M.; Verbeek, F.J.; Aten, J.A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of microscopy*, **1993**, *169*, 375–382.
- [202] Zhao, J.; Liu, H.; Zhang, X.; Zhang, W.; Liu, L.; Yu, Y.; Ren, S.; Yang, Q.; Liu, B.; Li, J.; Li, X.; Liu, Y.; Zhao, L. Tumor Cells Interleukin-22 Expression Associates with Elevated Tumor-Associated Macrophages Infiltrating and Poor Prognosis in Patients with Breast Cancer. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, **2021**, *36*, 160–166.
- [203] Kim, E.-Y.; Choi, B.; Kim, J.-E.; Park, S.-O.; Kim, S.-M.; Chang, E.-J. Interleukin-22 Mediates the Chemotactic Migration of Breast Cancer Cells and Macrophage Infiltration of the Bone Microenvironment by Potentiating S1P/SIPR Signaling. *Cells*, **2020**, *9*.

- [204] Katara, G.K.; Kulshrestha, A.; Schneiderman, S.; Riehl, V.; Ibrahim, S.; Beaman, K.D. Interleukin-22 promotes development of malignant lesions in a mouse model of spontaneous breast cancer. *Molecular oncology*, **2020**, *14*, 211–224.
- [205] Xu, X.; Yang, C.; Chen, J.; Liu, J.; Li, P.; Shi, Y.; Yu, P. Interleukin-23 promotes the migration and invasion of gastric cancer cells by inducing epithelial-to-mesenchymal transition via the STAT3 pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, **2018**, *499*, 273–278.
- [206] Zheng, Q.; Diao, S.; Wang, Q.; Zhu, C.; Sun, X.; Yin, B.; Zhang, X.; Meng, X.; Wang, B. IL-17A promotes cell migration and invasion of glioblastoma cells via activation of PI3K/AKT signalling pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, **2019**, *23*, 357–369.
- [207] Hou, K.-Z.; Fu, Z.-Q.; Gong, H. Chemokine ligand 20 enhances progression of hepatocellular carcinoma via epithelial-mesenchymal transition. *World journal of gastroenterology*, **2015**, *21*, 475–483.
- [208] Du, D.; Liu, Y.; Qian, H.; Zhang, B.; Tang, X.; Zhang, T.; Liu, W. The effects of the CCR6/CCL20 biological axis on the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. *International journal of molecular sciences*, **2014**, *15*, 6441–6452.
- [209] Shi, J.; Wang, Y.; Wang, F.; Zhu, Z.; Gao, Y.; Zhang, Q.; Du, Z. Interleukin 22 is related to development and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, **2020**, *44*, 855–864.
- [210] Feng, R.; Cui, Z.; Liu, Z.; Zhang, Y. Upregulated microRNA-132 in T helper 17 cells activates hepatic stellate cells to promote hepatocellular carcinoma cell migration in vitro. *Scandinavian journal of immunology*, **2021**, *93*, e13007.
- [211] Mei, Z.; Chen, S.; Chen, C.; Xiao, B.; Li, F.; Wang, Y.; Tao, Z. Interleukin-23 Facilitates Thyroid Cancer Cell Migration and Invasion by Inhibiting SOCS4 Expression via MicroRNA-25. *PloS one*, **2015**, *10*, e0139456.
- [212] Li, S.; Cong, X.; Gao, H.; Lan, X.; Li, Z.; Wang, W.; Song, S.; Wang, Y.; Li, C.; Zhang, H.; Zhao, Y.; Xue, Y. Tumor-associated neutrophils induce EMT by IL-17a to promote migration and invasion in gastric cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, **2019**, *38*, 6.
- [213] Iida, T.; Iwahashi, M.; Katsuda, M.; Ishida, K.; Nakamori, M.; Nakamura, M.; Naka, T.; Ojima, T.; Ueda, K.; Hayata, K.; Nakamura, Y.; Yamaue, H. Tumor-infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer. *Oncology reports*, **2011**, *25*, 1271–1277.

- [214] Liu, W.; Wang, W.; Wang, X.; Xu, C.; Zhang, N.; Di, W. Cisplatin-stimulated macrophages promote ovarian cancer migration via the CCL20-CCR6 axis. *Cancer letters*, **2020**, *472*, 59–69.
- [215] Liu, W.; Wang, W.; Zhang, N.; Di, W. The Role of CCL20-CCR6 Axis in Ovarian Cancer Metastasis. *Oncotargets and therapy*, **2020**, *13*, 12739–12750.
- [216] He, Y.; Yang, Y.; Xu, J.; Liao, Y.; Liu, L.; Deng, L.; Xiong, X. IL22 drives cutaneous melanoma cell proliferation, migration and invasion through activation of miR-181/STAT3/AKT axis. *Journal of Cancer*, **2020**, *11*, 2679–2687.
- [217] Wang, P.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Jiang, J.; Jin, F.; Sun, Z. IL-23 concentration-dependently regulates T24 cell proliferation, migration and invasion and is associated with prognosis in patients with bladder cancer. *Oncology reports*, **2018**, *40*, 3685–3693.
- [218] Yu, T.; Tang, Q.; Chen, X.; Fan, W.; Zhou, Z.; Huang, W.; Liang, F. TGF- β 1 and IL-17A comediate the protumour phenotype of neutrophils to regulate the epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, **2021**, *50*, 353–361.
- [219] Liu, Y.; Wang, J.; Ni, T.; Wang, L.; Wang, Y.; Sun, X. CCL20 mediates RANK/RANKL-induced epithelial-mesenchymal transition in endometrial cancer cells. *Oncotarget*, **2016**, *7*, 25328–25339.
- [220] Komine-Aizawa, S.; Aizawa, S.; Takano, C.; Hayakawa, S. Interleukin-22 promotes the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *Immunological medicine*, **2020**, *43*, 121–129.
- [221] Le Zhang; Li, J.; Li, L.; Zhang, J.; Wang, X.; Yang, C.; Li, Y.; Lan, F.; Lin, P. IL-23 selectively promotes the metastasis of colorectal carcinoma cells with impaired Socs3 expression via the STAT5 pathway. *Carcinogenesis*, **2014**, *35*, 1330–1340.
- [222] Song, X.; Wei, C.; Li, X. The potential role and status of IL-17 family cytokines in breast cancer. *International immunopharmacology*, **2021**, *95*, 107544.
- [223] Mo, M.; Tong, S.; Huang, W.; Cai, Y.; Zu, X.; Hu, X. High serum CCL20 is associated with tumor progression in penile cancer. *Journal of Cancer*, **2020**, *11*, 6812–6822.
- [224] Zeng, H.; Liu, Z.; Wang, Z.; Zhou, Q.; Qi, Y.; Chen, Y.; Chen, L.; Zhang, P.; Wang, J.; Chang, Y.; Bai, Q.; Xia, Y.; Wang, Y.; Liu, L.; Zhu, Y.; Dai, B.; Guo, J.; Le Xu; Zhang, W.; Xu, J. Intratumoral IL22-producing cells define immuno-evasive subtype muscle-invasive

- bladder cancer with poor prognosis and superior nivolumab responses. *International journal of cancer*, **2020**, *146*, 542–552.
- [225] Arshad, T.; Mansur, F.; Palek, R.; Manzoor, S.; Liska, V. A Double Edged Sword Role of Interleukin-22 in Wound Healing and Tissue Regeneration. *Frontiers in immunology*, **2020**, *11*, 2148.
- [226] Akil, H.; Abbaci, A.; Lalloué, F.; Bessette, B.; Costes, L.M.M.; Domballe, L.; Charreau, S.; Guilloteau, K.; Karayan-Tapon, L.; Bernard, F.-X.; Morel, F.; Jauberteau, M.-O.; Lecron, J.-C. IL22/IL-22R pathway induces cell survival in human glioblastoma cells. *PloS one*, **2015**, *10*, e0119872.
- [227] Muscella, A.; Vetrugno, C.; Marsigliante, S. CCL20 promotes migration and invasiveness of human cancerous breast epithelial cells in primary culture. *Molecular carcinogenesis*, **2017**, *56*, 2461–2473.
- [228] Jung, Y.; Ahn, S.-H.; Park, H.; Park, S.H.; Choi, K.; Choi, C.; Kang, J.L.; Choi, Y.-H. MCP-1 and MIP-3 α Secreted from Necrotic Cell-Treated Glioblastoma Cells Promote Migration/Infiltration of Microglia. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, **2018**, *48*, 1332–1346.
- [229] Bender, D.E.; Schaettler, M.O.; Sheehan, K.C.; Johanns, T.M.; Dunn, G.P. Cytokine Profiling in Plasma from Patients with Brain Tumors Versus Healthy Individuals using 2 Different Multiplex Immunoassay Platforms. *Biomarker insights*, **2021**, *16*, 11772719211006666.
- [230] Falter, J.; Lohmeier, A.; Eberl, P.; Stoerr, E.-M.; Koskimäki, J.; Falter, L.; Rossmann, J.; Mederer, T.; Schmidt, N.O.; Proescholdt, M. CXCR2-Blocking Has Context-Sensitive Effects on Rat Glioblastoma Cell Line Outgrowth (S635) in an Organotypic Rat Brain Slice Culture Depending on Microglia-Depletion (PLX5622) and Dexamethasone Treatment. *International journal of molecular sciences*, **2023**, *24*.
- [231] Middeldorp, J.; Hol, E.M. GFAP in health and disease. *Progress in neurobiology*, **2011**, *93*, 421–443.
- [232] Liu, Y.; Given, K.S.; Dickson, E.L.; Owens, G.P.; Macklin, W.B.; Bennett, J.L. Concentration-dependent effects of CSF1R inhibitors on oligodendrocyte progenitor cells ex vivo and in vivo. *Experimental neurology*, **2019**, *318*, 32–41.
- [233] Coleman, L.G.; Zou, J.; Crews, F.T. Microglial depletion and repopulation in brain slice culture normalizes sensitized proinflammatory signaling. *Journal of neuroinflammation*, **2020**, *17*, 27.

- [234] Liang, Y.; Yi, P.; Ru, W.; Jie, Z.; Wang, H.; Ghanayem, T.; Wang, X.; Alamer, E.; Liu, J.; Hu, H.; Soong, L.; Cai, J.; Sun, J. IL-22 hinders antiviral T cell responses and exacerbates ZIKV encephalitis in immunocompetent neonatal mice. *Journal of neuroinflammation*, **2020**, *17*, 249.
- [235] Yu, C.; Ling, Q.; Jiao, J.; Liu, J.; Huang, Z.; Wang, F.; Sun, X.; Kong, X. Interleukin-22 protects from endotoxemia by inducing suppressive F4/80+Ly6GhiLy6Chi cells population. *BMC immunology*, **2022**, *23*, 45.
- [236] Laffer, B.; Bauer, D.; Wasmuth, S.; Busch, M.; Jalilvand, T.V.; Thanos, S.; Meyer Zu Hörste, G.; Loser, K.; Langmann, T.; Heiligenhaus, A.; Kasper, M. Loss of IL-10 Promotes Differentiation of Microglia to a M1 Phenotype. *Frontiers in cellular neuroscience*, **2019**, *13*, 430.
- [237] Czock, D.; Keller, F.; Rasche, F.M.; Häussler, U. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clinical pharmacokinetics*, **2005**, *44*, 61–98.
- [238] Pombo Antunes, A.R.; Scheyltjens, I.; Lodi, F.; Messiaen, J.; Antoranz, A.; Duerinck, J.; Kancheva, D.; Martens, L.; Vlaminck, K. de; van Hove, H.; Kjølner Hansen, S.S.; Bosisio, F.M.; van der Borght, K.; Vleeschouwer, S. de; Sciot, R.; Bouwens, L.; Verfaillie, M.; Vandamme, N.; Vandenbroucke, R.E.; Wever, O. de; Saeys, Y.; Guilliams, M.; Gysemans, C.; Neyns, B.; Smet, F. de; Lambrechts, D.; van Ginderachter, J.A.; Movahedi, K. Single-cell profiling of myeloid cells in glioblastoma across species and disease stage reveals macrophage competition and specialization. *Nature neuroscience*, **2021**, *24*, 595–610.
- [239] Böttcher, C.; Schlickeiser, S.; Sneeboer, M.A.M.; Kunkel, D.; Knop, A.; Paza, E.; Fidzinski, P.; Kraus, L.; Snijders, G.J.L.; Kahn, R.S.; Schulz, A.R.; Mei, H.E.; Hol, E.M.; Siegmund, B.; Glauben, R.; Spruth, E.J.; Witte, L.D. de; Priller, J. Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nature neuroscience*, **2019**, *22*, 78–90.
- [240] Andersen, J.K.; Miletic, H.; Hossain, J.A. Tumor-Associated Macrophages in Gliomas—Basic Insights and Treatment Opportunities. *Cancers*, **2022**, *14*.
- [241] Spiteri, A.G.; King, N.J.C. Putting PLX5622 into perspective: microglia in central nervous system viral infection. *Neural regeneration research*, **2023**, *18*, 1269–1270.
- [242] Sakuma, R.; Kawahara, M.; Nakano-Doi, A.; Takahashi, A.; Tanaka, Y.; Narita, A.; Kuwahara-Otani, S.; Hayakawa, T.; Yagi, H.; Matsuyama, T.; Nakagomi, T. Brain pericytes

- serve as microglia-generating multipotent vascular stem cells following ischemic stroke. *Journal of neuroinflammation*, **2016**, *13*, 57.
- [243] Park, M.-J.; Park, H.-S.; You, M.-J.; Yoo, J.; Kim, S.H.; Kwon, M.-S. Dexamethasone Induces a Specific Form of Ramified Dysfunctional Microglia. *Molecular neurobiology*, **2019**, *56*, 1421–1436.
- [244] Drosler, R.A.; Iezzi, G. IL-22-mediates Cross-talk between Tumor Cells and Immune Cells Associated with Favorable Prognosis in Human Colorectal Cancer. *Journal of cellular immunology*, **2021**, *3*, 118–121.
- [245] Gautam, A.; Dixit, S.; Embers, M.; Gautam, R.; Philipp, M.T.; Singh, S.R.; Morici, L.; Dennis, V.A. Different patterns of expression and of IL-10 modulation of inflammatory mediators from macrophages of Lyme disease-resistant and -susceptible mice. *PloS one*, **2012**, *7*, e43860.
- [246] Xia, C.-Q.; Peng, R.; Beato, F.; Clare-Salzler, M.J. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scandinavian journal of immunology*, **2005**, *62*, 45–54.
- [247] Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, **2008**, *455*, 1061–1068.
- [248] Lanza, M.; Casili, G.; Campolo, M.; Paterniti, I.; Colarossi, C.; Mare, M.; Giuffrida, R.; Caffo, M.; Esposito, E.; Cuzzocrea, S. Immunomodulatory Effect of Microglia-Released Cytokines in Gliomas. *Brain sciences*, **2021**, *11*.
- [249] Martins, T.A.; Schmassmann, P.; Shekarian, T.; Boulay, J.-L.; Ritz, M.-F.; Zanganeh, S.; Vom Berg, J.; Hutter, G. Microglia-Centered Combinatorial Strategies Against Glioblastoma. *Frontiers in immunology*, **2020**, *11*, 571951.
- [250] Vecht, C.J.; Hovestadt, A.; Verbiest, H.B.; van Vliet, J.J.; van Putten, W.L. Dose-effect relationship of dexamethasone on Karnofsky performance in metastatic brain tumors: a randomized study of doses of 4, 8, and 16 mg per day. *Neurology*, **1994**, *44*, 675–680.
- [251] Mohan, A.A.; Tomaszewski, W.H.; Haskell-Mendoza, A.P.; Hotchkiss, K.M.; Singh, K.; Reedy, J.L.; Fecci, P.E.; Sampson, J.H.; Khasraw, M. Targeting Immunometabolism in Glioblastoma. *Frontiers in oncology*, **2021**, *11*, 696402.
- [252] Agarwal, P.; Pajor, M.J.; Anson, D.M.; Guda, M.R.; Labak, C.M.; Tsung, A.J.; Velpula, K.K. Elucidating immunometabolic targets in glioblastoma. *American journal of cancer research*, **2017**, *7*, 1990–1995.
- [253] Pilanc, P.; Wojnicki, K.; Roura, A.-J.; Cyranowski, S.; Ellert-Miklaszewska, A.; Ochocka, N.; Gielniewski, B.; Grzybowski, M.M.; Błaszczyk, R.; Stańczak, P.S.;

- Dobrzański, P.; Kaminska, B. A Novel Oral Arginase 1/2 Inhibitor Enhances the Antitumor Effect of PD-1 Inhibition in Murine Experimental Gliomas by Altering the Immunosuppressive Environment. *Frontiers in oncology*, **2021**, *11*, 703465.
- [254] Gotoh, T.; Chowdhury, S.; Takiguchi, M.; Mori, M. The glucocorticoid-responsive gene cascade. Activation of the rat arginase gene through induction of C/EBPbeta. *The Journal of biological chemistry*, **1997**, *272*, 3694–3698.
- [255] Majaw, T.; Sharma, R. Arginase I Regulation by Dexamethasone in the Liver of Aging Mouse. In: *Topics in Biomedical Gerontology*. Rath, P.C., Sharma, R., Prasad, S., Eds.; Springer Singapore: Singapore, **2017**; pp. 109–116.
- [256] Klasen, S.; Hammermann, R.; Fuhrmann, M.; Lindemann, D.; Beck, K.F.; Pfeilschifter, J.; Racké, K. Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *British journal of pharmacology*, **2001**, *132*, 1349–1357.
- [257] Musca, B.; Russo, M.G.; Tushe, A.; Magri, S.; Battaggia, G.; Pinton, L.; Bonaudo, C.; Della Puppa, A.; Mandruzzato, S. The immune cell landscape of glioblastoma patients highlights a myeloid-enriched and immune suppressed microenvironment compared to metastatic brain tumors. *Frontiers in immunology*, **2023**, *14*, 1236824.
- [258] Kashfi, K.; Kannikal, J.; Nath, N. Macrophage Reprogramming and Cancer Therapeutics: Role of iNOS-Derived NO. *Cells*, **2021**, *10*.
- [259] Puram, S.V.; Yeung, C.M.; Jahani-Asl, A.; Lin, C.; La Iglesia, N. de; Konopka, G.; Jackson-Grusby, L.; Bonni, A. STAT3-iNOS Signaling Mediates EGFRvIII-Induced Glial Proliferation and Transformation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **2012**, *32*, 7806–7818.
- [260] Kato, S.; Esumi, H.; Hirano, A.; Kato, M.; Asayama, K.; Ohama, E. Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human brain tumors: relationships of iNOS to superoxide dismutase (SOD) proteins (SOD1 and SOD2), Ki-67 antigen (MIB-1) and p53 protein. *Acta neuropathologica*, **2003**, *105*, 333–340.
- [261] Ellie, E.; Loiseau, H.; Lafond, F.; Arsaut, J.; Demotes-Mainard, J. Differential expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in human brain tumours. *Neuroreport*, **1995**, *7*, 294–296.
- [262] Vera, M.E. de; Taylor, B.S.; Wang, Q.; Shapiro, R.A.; Billiar, T.R.; Geller, D.A. Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I-kappa B alpha and inhibiting NF-kappa B. *The American journal of physiology*, **1997**, *273*, G1290-6.

- [263] Walker, G.; Pfeilschifter, J.; Kunz, D. Mechanisms of suppression of inducible nitric-oxide synthase (iNOS) expression in interferon (IFN)-gamma-stimulated RAW 264.7 cells by dexamethasone. Evidence for glucocorticoid-induced degradation of iNOS protein by calpain as a key step in post-transcriptional regulation. *The Journal of biological chemistry*, **1997**, *272*, 16679–16687.
- [264] Tschugguel, W.; Pustelnik, T.; Lass, H.; Mildner, M.; Weninger, W.; Schneeberger, C.; Jansen, B.; Tschauder, E.; Waldhör, T.; Huber, J.C.; Pehamberger, H. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression may predict distant metastasis in human melanoma. *British journal of cancer*, **1999**, *79*, 1609–1612.
- [265] Giatromanolaki, A.; Tsolou, A.; Daridou, E.; Kouroupi, M.; Chlachlia, K.; Koukourakis, M.I. iNOS Expression by Tumor-Infiltrating Lymphocytes, PD-L1 and Prognosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancers*, **2020**, *12*.
- [266] Zhang, B.; Shi, L.; Lu, S.; Sun, X.; Liu, Y.; Li, H.; Wang, X.; Zhao, C.; Zhang, H.; Wang, Y. Autocrine IL-8 promotes F-actin polymerization and mediate mesenchymal transition via ELMO1-NF-κB-Snail signaling in glioma. *Cancer biology & therapy*, **2015**, *16*, 898–911.
- [267] Conroy, S.; Kruyt, F.A.E.; Wagemakers, M.; Bhat, K.P.L.; Dunnen, W.F.A. den. IL-8 associates with a pro-angiogenic and mesenchymal subtype in glioblastoma. *Oncotarget*, **2018**, *9*, 15721–15731.
- [268] Hong, T.-M.; Teng, L.-J.; Shun, C.-T.; Peng, M.-C.; Tsai, J.-C. Induced interleukin-8 expression in gliomas by tumor-associated macrophages. *J Neurooncol*, **2009**, *93*, 289–301.
- [269] Mukaida, N.; Morita, M.; Ishikawa, Y.; Rice, N.; Okamoto, S.; Kasahara, T.; Matsushima, K. Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *The Journal of biological chemistry*, **1994**, *269*, 13289–13295.
- [270] Burke, S.J.; Lu, D.; Sparer, T.E.; Masi, T.; Goff, M.R.; Karlstad, M.D.; Collier, J.J. NF-κB and STAT1 control CXCL1 and CXCL2 gene transcription. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, **2014**, *306*, E131-49.
- [271] Zhao, Y.; Shen, X.-F.; Cao, K.; Ding, J.; Kang, X.; Guan, W.-X.; Ding, Y.-T.; Liu, B.-R.; Du, J.-F. Dexamethasone-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells Prolong Allo Cardiac Graft Survival through iNOS- and Glucocorticoid Receptor-Dependent Mechanism. *Frontiers in immunology*, **2018**, *9*, 282.

- [272] Amatya, S.; Carroll, N.G.; Petrillo, M.G.; Cidlowski, J.A.; Topete, D.C. SUN-586 CXCR2 Repression by Glucocorticoids in Adipose Tissue. *Journal of the Endocrine Society*, **2020**, 4.
- [273] Zhang, Z.; Zhang, Z.; Artelt, M.; Burnet, M.; Schluesener, H.J. Dexamethasone attenuates early expression of three molecules associated with microglia/macrophages activation following rat traumatic brain injury. *Acta neuropathologica*, **2007**, 113, 675–682.
- [274] Herold, M.J.; McPherson, K.G.; Reichardt, H.M. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **2006**, 63, 60–72.

b. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Morphologie der 3 verwendeten Ratten-Zelllinien.....</i>	33
<i>Abbildung 2: Ablauf der Zellaussat in zweikammrigen Ibidi-Inserts.....</i>	35
<i>Abbildung 3: Auswertung des Wound Healing Migrationsassays.....</i>	36
<i>Abbildung 4: Auswertung des Transwell Matrigel Invasionsassays.....</i>	37
<i>Abbildung 5: Auswertung des Sphäroidmigrationsassays.....</i>	38
<i>Abbildung 6: Präparation der organotypischen Rattenhirnschnitte (OBSC).....</i>	41
<i>Abbildung 7: Allgemeiner Ablauf der OBSC-Generierung, -Behandlung und Analysen ..</i>	42
<i>Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf des gesamten Versuchsablauf von Präparation, Vorbehandlung und Behandlung.</i>	45
<i>Abbildung 9: Darstellung des Fluoreszenzsignals durch den vitalgefärbten Sphäroid im parahippokampalen Bereich des Rattenhirnschnittes.</i>	45
<i>Abbildung 10: Darstellung der Auswertung der T-Zell-Frequenz in FFPE-Schnitten.....</i>	58
<i>Abbildung 11: Darstellung der Ergebnisse des Wound healing Migrationsassay (zweikammriger Ibidi-Assay) für die drei Zelllinien, und IL-22, IL-23, IL-17A und CCL20.</i>	63
<i>Abbildung 12: Darstellung der Ergebnisse des Transwell Matrigel Invasionsassays für die drei Zelllinien, und IL-22, IL-23, IL-17A und CCL20.</i>	64
<i>Abbildung 13: Darstellung der Ergebnisse des Sphäroidmigrationsassays für die drei Zelllinien, und IL-22, IL-23, IL-17A und CCL20.</i>	65
<i>Abbildung 14: Darstellung der Ergebnisse im ex vivo OBSC für die drei Zelllinien, und IL-22, IL-23, IL-17A und CCL20.</i>	66
<i>Abbildung 15: Darstellung des Einflusses der PLX5622-Vorbehandlung und Veränderung über die Zeit Tag 0 vs. Tag 6) der GFAP-Positivität auf Kontroll-OBSC.</i>	67
<i>Abbildung 16: Auswirkungen von PLX5622 auf Iba1-positive Zellhäufigkeit.</i>	68
<i>Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopie des Sphäroids im OBSC mit gleichzeitiger Darstellung vitalgefärbter und re-populierter Mikroglia.</i>	69
<i>Abbildung 18: Darstellung der vitalgefärbten Zelllinien- und mikroglialen Sphäroide....</i>	70
<i>Abbildung 19: Auswirkungen auf das Sphäroidauswachsen durch mikrogliale Depletion.</i>	71
<i>Abbildung 20: Ergebnisse des Auswachsverhaltens der drei Zelllinien abhängig von PLX5622-Vorbehandlung und Behandlung mit IL-22 (pro-inflammatorisch) oder IL-10 (anti-inflammatoryisch).</i>	72

Abbildung 21: Darstellung der Auswirkungen von Dexamethasongabe auf die Migration im Sphäroidmigrationsassay.....	73
Abbildung 22: Luminometrisch bestimmte ATP-Menge nach Zugabe zweier Dexamethasondosen (0,1 µg/ml und 1 µg/ml) zu den kultivierten Zelllinien.....	74
Abbildung 23: Darstellung der Effekte von Dexamethason auf das Auswachsen der Zellliniensphäroide in Abhängigkeit von PLX5622-Vorbehandlung auf den OBSC.....	76
Abbildung 24: GFAP-Positivität im OBSC unter Dexamethasonbehandlung.....	78
Abbildung 25: Heatmap des membranbasierten Ratten-Zytokin Proteom-Profilers	80
Abbildung 26: CXCL2-Konzentrationen aller untersuchten Überstände im Vergleich von Mikroglia nativen und PLX5622-vorbehandelten OBSC.....	82
Abbildung 27: CXCL2-Konzentrationen in den Überständen Tag 0, Tag 3 und Tag 6 von Mikroglia nativen und PLX5622-vorbehandelten OBSC ohne und mit aufgebrachtem Zellliniensphäroid.....	83
Abbildung 28: CXCL2-Konzentrationen in den Überständen Tag 0, Tag 3 und Tag 6 von Mikroglia nativen und PLX5622-vorbehandelten OBSC mit aufgebrachtem Zellliniensphäroid und Behandlung mit IL-22, IL-10 und Dexamethason..	85
Abbildung 29: Ergebnisse des Sphäroidmigrationsassays (S635 Zelllinie) in Abhängigkeit von Danirixin, Navarixin und CXCL2 mit und ohne Dexamethason.	88
Abbildung 30: Darstellung des Sphäroidauswachsen (S635) in Abhängigkeit von CXCR2-Inhibition, PLX5622-Vorbehandlung +/- Dexamethasongabe.....	89
Abbildung 31: Auswirkungen von Dexamethason auf das Auftreten peri-spheroidaler Iba1-positiver Zellen abhängig von PLX5622-Vorbehandlung sowie Auswirkungen von CXCR2-Inhibition auf entsprechendes Zellvorkommen in Mikroglia nativen OBSC.....	90
Abbildung 32: Beispielhafte Aufnahmen zur Darstellung perispheroidaler Mikroglia-Morphologie.....	91
Abbildung 33: Vergleich von PFS und OS beider Gruppen sowie Multivariate Cox Regressionsanalyse (Gesamtüberleben).	94
Abbildung 34: Funktion des Zeitraums der Dexamethasongabe präoperativ und der kumulativen Dexamethasondosis über die Zeit (AUC).	95
Abbildung 35: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des fold change der Transkripte von ARG1 im Glioblastom.	96
Abbildung 36: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des fold change der Transkripte von ARG1 in Hirnmetastasen (malignes Melanom und NSCLC).	97

<i>Abbildung 37: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des fold change der Transkripte von iNOS im Glioblastom.....</i>	98
<i>Abbildung 38: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des fold change der Transkripte von iNOS in Hirnmetastasen (malignes Melanom und NSCLC).....</i>	99
<i>Abbildung 39: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des fold change der Transkripte von IL-8 im Glioblastom.</i>	100
<i>Abbildung 40: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des fold change der Transkripte von IL-8 in Hirnmetastasen (malignes Melanom und NSCLC).</i>	102
<i>Abbildung 41: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des fold change der Transkripte von CXCL2 im Glioblastom.</i>	103
<i>Abbildung 42: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des fold change der Transkripte von CXCL2 in Hirnmetastasen (malignes Melanom und NSCLC).....</i>	104
<i>Abbildung 43: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des fold change der Transkripte von CXCR2 im Glioblastom.</i>	106
<i>Abbildung 44: Darstellung der geometrischen Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall des fold change der Transkripte von CXCR2 in Hirnmetastasen (malignes Melanom und NSCLC).....</i>	107
<i>Abbildung 45: Darstellung möglicher Zusammenhänge innerhalb der CXCR2-CXCL2/IL-8 Achse.</i>	108
<i>Abbildung 46: Auswertung der T-Zell-Frequenz in immunfluoreszenzgefärbten FFPE-Schnitten.</i>	109
<i>Abbildung 47: Relative Fläche (%), die sich in den immunfluoreszenzgefärbten FFPE-Schnitten Iba1⁺ (links) und TMEM119⁺ zeigt.</i>	110
<i>Abbildung 48: Auswertung der Makrophagen-Mikroglia-Verteilung abhängig von Dexamethasongabe.</i>	112
<i>Abbildung 49: Auswertung der CXCR2-Expression und Kolokalisierung mit Makrophagen oder Mikroglia in FFPE-Schnitten.</i>	114
<i>Abbildung 50: Darstellung der iNOS (M1) und CD206 (M2) Verteilung im FFPE-Schnitt.</i>	116

c. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der zellulären Zusammensetzung der TiME.	10
Tabelle 2: Darstellung der Unterschiede zwischen GAMM und MDSC nach Huang et al. (2023)	11
Tabelle 3: Darstellung der Charakteristika der M1/M2-Polarisierung in GAMM nach Ren et al. (2023) [49].	12
Tabelle 4: Ausstattung, Instrumente, Materialien	28
Tabelle 5: Verwendete Software.	28
Tabelle 6: Verwendete Reagenzien.	32
Tabelle 7: Medien für die Herstellung und Kultivierung des organotypischen Rattenhirnschnittmodells (OBSC).	33
Tabelle 8: Reagenzienmischungen für die Reverse Transkription.	49
Tabelle 9: Übersicht der Primereigenschaften der fünf untersuchten Gene und des Referenzgens (oben) sowie verwendetes Thermocycler-Reaktionsprogramm (unten).	50
Tabelle 10: Antikörper im Western Blot.	53
Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Reagenzien zur Immunfluoreszenzfärbung der FFPE-Schnitte.	56
Tabelle 12: Verwendete Filter Cubes zur Darstellung der jeweiligen Kanäle bei 2- bis 4-plex Immunfluoreszenzfärbungen.	57
Tabelle 13: Übersichtstabelle von Tumorentitäten bei denen jeweils die vier verwendeten Interleukine pro-tumorigene Eigenschaften aufweisen.	61
Tabelle 14: Klinische Daten der gematchten Gruppen.	92

d. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Langform
AC-like	astrocyte-like
ANOVA	Analysis of Variance
Aqua Dest.	Destilliertes Wasser
ARG1	Arginase 1
ATP	Adenosine Triphosphate
AUC	Area under the curve
BMDM	Bone Marrow-Derived Macrophages
BSA	Bovine Serum Albumin
C3	Complement Component 3
CAR	chimeric antigen receptor
CCAAT	CCAAT-Box (DNA-Motiv)
CCL	Chemokine (C-C motif) Ligand
CCL20	Chemokine (C-C motif) Ligand 20
CD14	cluster of differentiation 14
CD3	cluster of differentiation 3
CD4	cluster of differentiation 4
CD45	cluster of differentiation 45
CD47	cluster of differentiation 47
CD68	cluster of differentiation 68
CD8	cluster of differentiation 8
CD80	cluster of differentiation 80
CINC	Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CSC	Cancer Stem Cells
CSF1	Colony Stimulating Factor 1
CSF-1R	CSF1-Rezeptor
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen
CXC	Chemokine (C-X-C motif)
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) Ligand
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 2
CXCR2	C-X-C Chemokine Receptor 2
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor 4
d	Tag (day)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DEX	Dexamethason
dk	Esel (<i>engl.</i> donkey)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGFR	epithelial growth factor receptor

ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELR	Glu-Leu-Arg motif (ELR motif)
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS / FCS	Fetal Bovine / Calf Serum
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
GAMM	Glioblastom-assoziierte Mikroglia und Makrophagen
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GBM	Glioblastom
GDF	Growth Differentiation Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GSC	Glioma stem-like cells
gt	Ziege (<i>engl.</i> goat)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen - DR isotype
HR	Hazard Ratio
HRP	Horseradish Peroxidase
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IELTS	International English Language Testing System
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IL22	Interleukin 22
IL23	Interleukin 23
IL8	Interleukin 8
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium Supplement
IX70	Olympus IX70 Microscope
JAK2	Janus Kinase 2
KPI	Karnofsky-Performance Index
KI	Konfidenzintervall
KPI	Karnofsky-Performance-Index
l	Liter
LGG	niedriggradige Gliome (<i>engl.</i> low grade glioma)
LPS	Lipopolysaccharide
LSD	Least Significant Difference
M	molar
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
MEM	Minimum Essential Medium
MES-like	mesenchymal-like
mg	Milligramm
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinase
MMP3	Matrix Metalloproteinase 3

MRT	Magnetresonanztomogramm
ms	Maus (<i>engl.</i> mouse)
µm	Mikrometer
nCET	nicht-kontrastmittelanreichernder Tumor
NF1	Neurofibromatose Typ 1
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Nitric Oxide
NPC-like	neural progenitor cell like
NSCLC	nicht-kleinzeliges Lungenkarzinom
OBSC	Organotypic Brain Slice Culture (organotypische Hirnschnittkultur)
OP	Operation
OPC-like	oligodendrocyte-like
OS	Overall Survival
pmol	pikomol
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-L1	programmed death ligand 1
PD-CD10	Programmed Cell Death 10
PDL	Poly-D-Lysin
PFS	Progression-Free Survival
PI	Propidium Iodid
PKH	Lipophilic Fluorescent Dye
PKH26	Lipophiler Fluoreszenzfarbstoff (grün)
PKH67	Lipophilic Fluorescent Dye (green)
PMN	Polymorphonuclear Neutrophils
PMT	proneural-mesenchymale Transition
rb	Kaninchen (<i>engl.</i> rabbit)
RCT	randomisiert-kontrollierte Studie
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Reverse Transkription
sc-RNASeq	single-cell RNA-Sequencing
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SHH	Sonic Hedgehog
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SYBR	SYBR Green Dye
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBS	Tris-Buffered Saline
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TGF-β	Transforming Growth Factor beta

TIL	tumor infiltrating lymphocytes
TiME	Immunologische Tumormikroumgebung
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Tregs	Regulatorische T-Zellen
TTF	Tumor-Therapie Felder
U	Units (Einheiten)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
WHO	World Health Organization
XCL	Chemokine (C motif) Ligand
XL	Extra Large (z. B. Kulturgefäßgröße)
z.B.	zum Beispiel
ZHT	Zentrum für Hirntumorforschung
ZKS	Zentrum für Klinische Studien
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zonula occludens

7. Danksagung

„Il faut imaginer Sisyphe heureux.“ – Camus’ Bild schwingt auf vielen verschiedenen Ebenen in dieser vierjährigen Arbeit mit: Es spiegelt eine Forschungserfahrung, die von Wiederholungen, Rückschlägen und oft ungewissem Ausgang geprägt, und nicht geradlinig, sondern in Schleifen – mit viel Aufwand und ohne Garantie auf Erfolg – verläuft. Doch gerade in der bewussten Auseinandersetzung mit dieser Absurdität, im Arbeiten trotz Ungewissheit, liegt eine Form von Klarheit. Forschung wird so zu einer Haltung: dem Unverstandenen und damit einhergehenden Herausforderungen mit Ausdauer und Offenheit zu begegnen.

Die Arbeit an diesem Projekt war nicht nur ein wissenschaftlicher, sondern auch ein zutiefst persönlicher Weg – geprägt von Entwicklung, Zweifel, Ausdauer und dem ständigen Ringen um Balance. Besonders geprägt hat mich in dieser Zeit der Verlust meines Vaters – ein tiefgreifender Einschnitt, der vieles erschütterte und lange nachwirkte. Mit der Geburt meiner beiden Töchter Lola und Phelia wuchs – zwischen Klinikdiensten, Forschung und Schreibarbeit – nicht nur meine Familie, sondern auch ich selbst. Dass ich diesen Weg trotz aller Herausforderungen mit innerer Überzeugung gegangen bin, verdanke ich nicht zuletzt den Menschen, die mich in dieser Zeit begleitet, gestützt und ermutigt haben. Ihnen allen gilt mein tief empfundener Dank.

Mein aufrichtiger Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Martin Proescholdt für seine Rolle als Laborleiter, Biobankgründer, Betreuer und Doktorvater. Seine Begeisterung für neue Ideen, seine konstruktive Haltung in unseren Jour-fix-Diskussionen und sein realistischer, erfahren-kritischer Blick auf Methodik und Machbarkeit haben dieses Projekt entscheidend geprägt. Aus einem anfänglichen Geflecht aus Ideen, Literatur und Möglichkeiten half er stets, eine klare, wissenschaftlich tragfähige Fragestellung zu formulieren – dabei stets ausgleichend und unterstützend.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Nils Ole Schmidt für die Ermöglichung meiner Laborzeit, die Bereitstellung der nötigen Strukturen sowie für das Vertrauen in die Vereinbarkeit klinischer Arbeit mit Forschung.

Herrn Prof. Dr. Peter Oefner danke ich für die Aufnahme in das Else-Kröner-Forschungskolleg – als wissenschaftlicher „Quereinsteiger“ profitierte ich sehr von seinem wachsamen Blick für Balance und Umsetzbarkeit im Spannungsfeld zwischen Klinik und Labor. Dabei waren insbesondere die jährlichen Else-Kröner Treffen ein wiederkehrender Akt der Offenbarung mit nützlichen Impulsen – anspannend, aber zielführend.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Mentorat – Herrn Prof. Dr. Klein und Herrn Prof. Beckhove – für ihre Begleitung und Impulse im Laufe der Zeit.

Ebenso danke ich den einzelnen neuroonkologischen Arbeitsgruppen – insbesondere aus der Neurologie und Neuropathologie – für den fachlichen Austausch und die kollegiale Unterstützung.

Für die tatkräftige und oft spontane Unterstützung im Laboralltag gilt ein besonderer Dank Annette Lohmeier. Mit Süßigkeiten im entscheidenden Moment, unermüdlichem Einsatz bei Experimenten, bei den aufwendigen Rattenhirnschnitten, PCR- und Western Blot Methoden, und der nötigen Portion Humor – von Weißwurstfrühstücken bis Halloren-Kugeln – war sie eine tragende Säule dieses Projekts.

Petra Eberl danke ich für ihre direkte niederbayerische Art, wertvolle Laborerziehung, ihre meist notwendigen scherhaften Seitenhiebe und den unverzichtbaren Pragmatismus im Alltag.

Anne Pietryga-Krieger danke ich für ihre Geduld und Sorgfalt bei den FFPE-Schnitten, ihre Ausdauer bei Wiederholungen und Vorversuchen sowie die Umsetzung des Tageslichtbleachings – und nicht zuletzt für ihre wertvollen Kontakte in die Neuropathologie.

Eva-Maria Stoerr unterstützte mit viel Engagement bei der Rattenversorgung und mit an Pedanterie grenzender Pflege der Laborstrukturen – auch dafür ein herzliches Dankeschön.

Mein tiefster Dank gilt meiner Frau Lena – für ihre Liebe, Geduld und Stärke. In all den Momenten, in denen ich zwischen Klinik, Labor und Schreibarbeit zerrieben war, hast du den Raum gehalten – für unsere Familie, für mich, für diese Arbeit. Du hast nicht nur das Alltägliche getragen, sondern mir auch immer wieder das Gefühl gegeben, dass das, was ich hier tue, Sinn hat. Ohne deine Wärme, deine Rücksicht, bei gleichzeitiger Erdung hin zu familienorientierten Prioritäten und deinen unerschütterlichen Glauben an mich hätte ich diesen Weg so nicht gehen können.

Lola und Phelia – auch wenn ihr euch später vielleicht nicht daran erinnern werdet, wart ihr meine größte Motivation und mein leuchtender Anker. Eure Anwesenheit hat mir geholfen, die Perspektive zu bewahren, und euer Lachen hat mir oft die Kraft gegeben, weiterzumachen. Diese Arbeit ist auch ein Stück für euch.

Meiner Mutter danke ich von Herzen – für ihre beständige Zuversicht, ihre leise, aber unerschütterliche Unterstützung und den tiefen Glauben daran, dass ich meinen Weg gehen werde.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Dr. med. Johannes Falter, B.Sc.
E-Mail: johannes.falter@ukr.de

Akademische Laufbahn

Seit 04/2021 - 04/2024	Kollegiat des Else Kröner-Forschungskolleg Regensburg - Teilnahme an der Biomedizinischen Internationalen Graduiertenschule (BioMediGS) zur Erlangung des akademischen Grad eines Doktors in den Biomedizinischen Wissenschaften (Dr. rer. physiol.)
Seit 07/2018	Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Regensburg
05/2015 - 05/2020	Experimentelle Doktorarbeit, Klinik und Poliklinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungs chirurgie in Kooperation mit dem Institut für Röntgendiagnostik, Universitätsklinik Regensburg, „ <i>Akute Auswirkungen von zwei verschiedenen Röntgenkontrastmitteln (Iodixanol im Vergleich zu Iopromid) nach wiederholter intraarterieller Applikation auf die renale Hämodynamik und den renalen Gewebe sauerstoffpartialdruck: Randomisierte, explorative Vergleichsstudie in einem Großtiermodell (Deutsches Landschwein)</i> “ Promotion (Dr. med.), 05.05.2020 (magna cum laude)
10/2013 - 10/2016	Universität Regensburg, Studium B.Sc. Psychologie, Bachelorarbeit zum Thema „ <i>Longitudinale Betrachtung der kortikalen Dicke von Patienten mit Makuladegeneration während einer perzeptuellen Lernaufgabe</i> “ (1,3)
10/2011 - 05/2018	Universität Regensburg, Studium der Humanmedizin (1,3)

Auslandsaufenthalte

08 - 10/2017	St Georges Hospital, University of London, London, Großbritannien (Praktisches Jahr)
05 - 08/2017	Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spanien (Praktisches Jahr)
09/2016 - 10/2016	Wissenschaftliches Praktikum, Proteinstrukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie, Bar-Ilan University, Safed, Israel
02-02/2016	Clínica Daniel Alcides Carrión, Huancayo, Peru (Famulatur)
08/2014	Ruman Sakit Saiful Anwar (RSSA), Malang, Jawa, Indonesien (Famulatur)

Zivildienst

09/2010 - 09/2011	Zivildienstleistender, Universitätsklinikum Regensburg
-------------------	--

Schulbildung

07/2010	Abitur (1,1)
2002 - 2010	Burkhart-Gymnasium Mallersdorf-Pfaffenberg
01 - 04/2008	Belmont Secondary School, Victoria, BC, Kanada
1998 - 2002	Grundschule Ergoldsbach

Sprachkompetenzen

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend in Wort und Schrift (IELTS 7.5)
Spanisch	sehr gute Kenntnisse
Französisch	gute Kenntnisse

PUBLIKATIONSHINWEIS

Ich, Johannes Falter, geboren am 25.04.1991, in Mallersdorf-Pfaffenberg, erkläre hiermit, dass Teile der vorliegenden Monografie in einem wissenschaftlichen Fachjournal in Form eines Erstautorenmanuskripts publiziert wurden.

→Falter, J.; Lohmeier, A.; Eberl, P.; Stoerr, E.-M.; Koskimäki, J.; Falter, L.; Rossmann, J.; Mederer, T.; Schmidt, N.O.; Proescholdt, M. CXCR2-Blocking Has Context-Sensitive Effects on Rat Glioblastoma Cell Line Outgrowth (S635) in an Organotypic Rat Brain Slice Culture Depending on Microglia-Depletion (PLX5622) and Dexamethasone Treatment. International journal of molecular sciences, 2023, 24.

Ort, Datum

eigenhändige Unterschrift des Promovenden

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich, Johannes Falter, geboren am 25.04.1991 in Mallersdorf-Pfaffenberg, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater*in oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

eigenhändige Unterschrift des Promovenden