

Aus dem Institut für Neuropathologie
komm. Direktor: Prof. Dr. med. R. M. Bohle

Bereich Klinische Medizin
Medizinische Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Charakterisierung regulatorischer T-Zell- und Makrophagenpopulationen in Hirntumoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät II für theoretische Medizin und Biowissenschaften der
Universität des Saarlandes

Diplom Biologin

Elke Sartorius

Homburg

2012

Dekan: Prof. Dr. M. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Meese

Prof. Dr. R.M. Bohle

Tag des Kolloquiums:

0. Inhaltsverzeichnis

0. Inhaltsverzeichnis	I
I. Abkürzungsverzeichnis	III
II. Abbildungsverzeichnis	VI
III. Tabellenverzeichnis	VIII
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	4
2.1 Das menschliche Gehirn	4
2.2 Das menschliche Immunsystem	5
2.2.1 Immunologie des ZNS	7
2.3 Hirntumoren	8
2.4 Immunregulation in Tumoren	9
2.4.1 PD-1	11
2.4.2 Regulatorische T-Zellen	12
2.4.3 Regulatorische Makrophagen	12
2.5 Histologie des ZNS	14
2.5.1 Histologie der Astrozyten	14
2.5.2 Histologie der Mikroglia	15
2.5.3 Histologie der Lymphozyten	16
2.5 Ziele der Arbeit	17
3. Material und Methoden	18
3.1 Materialien	18
3.1.1 Gerätschaften	18
3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel	19
3.1.3 Substanzen	20
3.1.4 Pufferlösungen und Kits	21
3.1.5 Antikörper	22
3.1.6 Primer zur quantitativen Expressionsanalyse mittels TaqMan-Real-Time-PCR	23
3.1.7 Gewebeproben	24
3.2 Methoden	25
3.2.1 Fixierung und Einbettung der Gewebeproben	25
3.2.2 Anfertigung der Paraffinschnitte für die Immunhistochemie und Expressionsanalyse	27
3.2.3 Immunhistochemische Färbung	28
3.2.4 Indirekte Immunfluoreszenz	35
3.2.5 Quantitative Genexpressionsanalyse mittels TaqMan-Real-Time-PCR	37
4. Ergebnisse	45
4.1 Immunregulatorische Zellen im Normalgewebe des ZNS	45
4.2 Regulatorische T-Zellen und Makrophagen in Gliomen	47
4.2.1 Diffuse Astrozytome (WHO Grad II):	47
4.2.2 Anaplastische Astrozytome (WHO Grad III):	51
4.2.3 Glioblastome	55
4.2.4 Statistische Auswertung:	59
4.3 Regulatorische T-Zellen und Makrophagen in primären ZNS Lymphomen	62
4.3.1. Manifestation und Ki-67-Index	62
4.3.2 Identifizierung immunreaktiver Zellen im primären ZNS Lymphom	64
4.3.3 Statistische Auswertung:	67
4.3.4. Charakterisierung immunreaktiver T-Zellen im PZNSL	69
4.4 Immunregulatorische Zellen in Rezidiven	72
4.4.1 Gliomrezidive	72

4.4.2 Rezidive primärer ZNS Lymphome.....	74
4.5 Immunregulatorische Zellen in primären ZNS Lymphomen bei Immunsuppression.....	76
4.6 Quantitative Genexpressionsanalyse.....	78
4.6.1 Expression von PD-1.....	78
4.6.2 Expression von CD163	80
5. Diskussion.....	83
5.1 Immunregulation in Gliomen	84
5.1.1 Tumor-infiltrierende T-Zellen (TIL).....	84
5.1.2 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM).....	86
5.2 Immunregulatorische T-Zellen und Makrophagen in primären ZNS Lymphomen.....	87
5.2.1 Tumor-infiltrierende T-Zellen (TIL).....	87
5.2.2 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM).....	89
5.3 Immunregulatorische Zellen in Rezidiven und immunsupprimierten DLBCL Patienten	90
5.4 Quantitative Expressionsanalyse.....	91
5.5. Ausblick	93
6. Literaturverzeichnis	94
7. Danksagung.....	106
8. Lebenslauf	107

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APC	<i>antigen presenting cell</i> (antigenpräsentierende Zelle(n))
Aqua dest.	destilliertes Wasser
B7-H1	<i>human B7 homolog 1</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD163	<i>cluster of differentiation 163</i>
CD25	<i>cluster of differentiation 25</i>
CD3	<i>cluster of differentiation 3</i>
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
CD68	<i>cluster of differentiation 68</i>
CD8	<i>cluster of differentiation 8</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNS)
Ct	<i>Thresholdcycle</i>
CTL	<i>cytotoxic T cell</i> (zytotoxische T-Zelle(n))
DAB	Diaminobenzidin
DC	<i>dendritic cell</i> (dendritische Zelle(n))
DLBCL	<i>diffuse large B cell lymphoma</i> (diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxiribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>

FFPE	<i>formalin fixed paraffin embedded</i> (Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FOXP-3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
GBM	<i>Glioblastoma multiforme</i> (Glioblastom)
h	Stunde(n)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (humanes Leukozytenantigen)
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
M1	klassisch aktivierte Makrophage(n)
M2	alternativ aktivierte Makrophage(n)
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i> (Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIC	<i>major histocompatibility complex class I-related chains</i>
min	Minute(n)
NK	Natürliche Killerzelle(n)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PD-1	<i>programmed cell death 1</i>
PDL-1	<i>programmed cell death ligand 1</i>
PDL-2	<i>programmed cell death ligand 2</i>

PZNSL	primäres ZNS Lymphom
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
RT	Raumtemperatur
Tab	Tabelle
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBP	<i>Tata-box binding protein</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
TE	TRIS-HCl + EDTA
TGF- β	Tumor-Nekrose-Faktor β
T _H	T-Helferzelle(n)
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
T _{reg}	regulatorische T-Zelle(n)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEAK	<i>TNF-related WEAK inducer of apoptosis</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
ZNS	Zentrales Nervensystem

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die drei Phasen der Immunreaktion bei der Tumorentwicklung	10
Abbildung 2: Tumorinduzierte T-Zellenergie	11
Abbildung 3: Aktivierung von Makrophagen	13
Abbildung 4: Indirekte Methode und Polymer-Konjugat-Methode der Immunhistochemie ...	29
Abbildung 5: Prinzip der TaqMan- Real-Time-PCR Methode	38
Abbildung 6: Amplifikationsplot	42
Abbildung 7: Immunregulatorische Zellen im Normalgewebe	46
Abbildung 8: Diffuses Astrozytom	47
Abbildung 9: CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ TIL in diffusen Astrozytomen.....	48
Abbildung 10: CD68+ und CD163+ TAM in diffusen Gliomen	50
Abbildung 11: Anaplastisches Astrozytom	51
Abbildung 12: CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ TIL in anaplastischen Astrozytomen	52
Abbildung 13: CD68+ und CD163+ TAM in anaplastischen Astrozytomen	54
Abbildung 14: Heterogenität und Ki-67-Index der Glioblastome.....	55
Abbildung 15: CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ TIL in Glioblastomen.....	57
Abbildung 16: CD68+ und CD163+ TAM in Glioblastomen.....	58
Abbildung 17: CD163+ TAM und Ki-67-Index der Gliome	61
Abbildung 18: Manifestation und Ki-67-Index der PZNSL (DLBCL).....	63
Abbildung 19: Verteilung der immunreaktiven T-Zellen in PZNSL (DLBCL)	64
Abbildung 20: CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ TIL in PZNSL (DLBCL)	66
Abbildung 21: CD68+ und CD163+ TAM in PZNSL (DLBCL)	67

Abbildung 22: Häufigkeit PD-1+ T-Zellen vs. Alter der PZNSL-Patienten.....	69
Abbildung 23: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen an primären ZNS Lymphomen (DLBCL) I.....	70
Abbildung 24: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen an primären ZNS Lymphomen (DLBCL) II.....	71
Abbildung 25: TIL und TAM in Glioblastomrezidiven	73
Abbildung 26: TIL und TAM in PZNSL (DLBCL)-Rezidiven	75
Abbildung 27: TIL und TAM in immunsupprimierten PZNSL (DLBCL)	77
Abbildung 28: Quantitative Genexpressionsanalyse für PD-1 in verschiedenen Tumorentitäten	79
Abbildung 29: Quantitative Genexpressionsanalyse für CD163 in verschiedenen Tumorentitäten	82

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper zur Untersuchung der von Tumorzellen induzierten Immunantwort	22
Tabelle 2: Charakteristik der ausgewählten Gewebeproben	24
Tabelle 3: Übersicht über die eingesetzten Antikörper	31
Tabelle 4: Semi-quantitative Bewertungskriterien	34
Tabelle 5: Konzentrationen und Inkubationszeiten der zur indirekten Immunfluoreszenz verwendeten Primär- und Sekundärantikörper	36
Tabelle 6: Statistische Auswertung der immunregulatorischen Zellpopulationen in Gliomen	59
Tabelle 7: Statistische Auswertung der immunregulatorischen Zellpopulationen in primären ZNS Lymphomen	68

1. Zusammenfassung

Gliome und die primären Lymphome des ZNS zeichnen sich meist durch eine hohe Malignität aus. Vor allem die Glioblastome und die diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome weisen keine günstige Prognose auf und die Patienten zeigen eine mittlere Überlebenszeit von nur circa sechs Monaten nach Diagnosestellung (Burger et al., 2002; Panageas et al., 2005). Die Tumormikroumgebung spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Tumors, bestimmt dessen klinisches Verhalten und sein Ansprechen auf eine Therapie (Alvaro et al., 2006; Dave et al., 2004; Glas et al., 2007). Genaue Studien dieser Mikroumgebung bieten daher neue therapeutische Ansätze zur Unterstützung der tumorspezifischen Immunantwort und damit zur Tumorbekämpfung.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten und Makrophagen, spezifisch die regulatorischen Subpopulationen, in Gliomen unterschiedlicher Malignitätsstufen und primären Lymphomen des Zentralnervensystems zu charakterisieren und quantifizieren. Dazu wurden regulatorische Lymphozyten über die Expression von PD-1 und FOXP-3, regulatorische Makrophagen über eine Expression von CD163 identifiziert. Die Charakterisierung erfolgte mittels immunhistochemischer Färbungen und Immunfluoreszenz, die Quantifizierung ebenfalls über die Immunhistochemie, sowie über eine Real-Time-PCR für PD-1 und CD163.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Population der infiltrierenden Lymphozyten nur im high-grade Gliom gegenüber dem Normalgewebe erhöht ist. Regulatorische Makrophagen waren im Vergleich zum Normalgewebe im Zentralnervensystem in allen Malignitätsgraden der Gliome zu finden. Tumor infiltrierende Lymphozyten und Tumor assoziierte Makrophagen korrelierten außerdem mit dem Malignitätsgrad und dem Ki-67-Index des Tumors. Eine starke Infiltration von regulatorischen Lymphozyten und Makrophagen konnte auch in den primären ZNS Lymphomen beobachtet werden, wobei weder eine Korrelation mit einer bestimmten Manifestation der Lymphome (pseudoecephalitisches, rasenartig oder diffus) noch mit deren Ki-67-Index nachzuweisen war. Bei der Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen zeigte sich, dass es nur selten PD-1+FOXP-3+ Zellen gibt. Es existieren folglich in den PZNSL mindestens zwei regulatorische T-Zellsubpopulationen. Neben der PD-1 Expression der T-Lymphozyten zeigten auch die Tumor-B-Zellen der Lymphome eine deutliche Expression des inhibitorischen Moleküls.

Dies liefert einen Hinweis, dass das Zusammenspiel PD-1+ Tumorzellen und Lymphozyten, sowie regulatorischen T-Zellen im Lymphom eine immuninhibitorische Funktion ausübt und damit die Tumorprogression unterstützen könnte.

Ein Unterschied im Vorkommen von tumorinfiltrierenden Lymphozyten und Tumor assoziierten Makrophagen zwischen Primärtumoren und Rezidiven war weder bei den Gliomen noch bei den primären Lymphomen des Zentralnervensystems zu sehen. Die Immunantwort, sowie die Mechanismen des Tumors dieser zu entgehen, sind folglich in Rezidiven nicht signifikant verändert. Ein Vergleich der Immunantwort von immunkompetenten und immunsupprimierten Lymphompatienten ließ keine Unterschiede in der anti-Tumorimmunantwort erkennen.

Insgesamt tragen die Resultate dieser Arbeit dazu bei, die differentielle Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen in Gliomen und PZNSL näher zu erläutern und einen Zusammenhang zwischen den regulatorischen Zellpopulationen und der Malignität dieser Tumoren darzustellen.

Characterization of regulatory T cell and macrophage populations in brain tumors

Gliomas and primary lymphomas of the central nervous system are common brain tumors and are characterized by high malignancy. Especially glioblastomas and the diffuse large B cell lymphomas feature a bad prognosis with a mean survival time of six months after diagnosis (Burger et al., 2002; Panageas et al., 2005). The microenvironment of the tumor plays an important role for the tumor development and appropriates its clinical behaviour and its responsiveness to therapy (Alvaro et al., 2006; Dave et al., 2004; Glas et al., 2007). Therefore, specific studies of this microenvironment offer new therapeutic approaches supporting the tumor specific immune response and thereby the tumor control.

The purpose of this work was to characterize and quantify the tumor infiltrating lymphocytes and macrophages, in particular the regulatory subpopulations, in gliomas of different malignancy grades and primary CNS lymphomas. For this purpose, regulatory lymphocytes were identified by the expression of PD-1 and FOXP-3, regulatory macrophages by the expression of CD163. The characterization was done by immunohistochemical staining and immunofluorescence, the quantification by immunohistochemistry and Real-Time-PCR for PD-1 and CD163.

In summary, it could be observed that the population of infiltrating lymphocytes is only increased in the high grade gliomas compared to the normal tissue. The regulatory macrophages were detected in gliomas of all malignancy grades compared to the normal tissue of central nervous system. Furthermore tumor infiltrating lymphocytes and tumor associated macrophages correlated with the malignancy grade and the Ki-67 index of the tumor. A strong infiltration of regulatory lymphocytes and macrophages was also observed in the primary CNS lymphomas, whereas neither a correlation with a specific type of manifestation (pseudoneoplastic, leptomeningeal or diffuse) nor with their Ki-67 index was detected. The characterization of regulatory T cells shows that PD-1+FOXP-3+ cells were rare. Therefore, not less than two regulatory populations have to exist in primary CNS lymphomas. Besides the PD-1 expression of the lymphocytes also the neoplastic B cells were distinguished by a clear expression of the inhibitory molecule. There is evidence that the interaction between PD-1+ tumor cells and lymphocytes, as well as Treg in lymphomas have an immune inhibitory function, thus promoting the tumor progression.

A difference in the incidence of tumor infiltrating lymphocytes and tumor associated macrophages between primary tumors and relapses were not found, neither in gliomas nor in primary CNS lymphomas. Accordingly, the immune response as well as the mechanisms of tumor to escape from it, are not changed significantly in relapses. A comparison of the immune response of immune competent and immune compromised patients shows no differences in the anti-tumor immune response.

In summary, the results of this work contribute to explain in detail the differential infiltration of lymphocytes and macrophages in glioma and primary CNS lymphoma, and to demonstrate the correlation between the regulatory cell populations and the malignancy of these tumors.

2. Einleitung

2.1 Das menschliche Gehirn

Das zentrale Nervensystem ist die Steuerzentrale des Körpers. Es setzt sich aus dem Gehirn und dem Rückenmark zusammen. Das Gehirn liegt in der Schädelhöhle und wird von drei Hirnhäuten (Dura mater, Arachnoidea mater und Pia mater) umgeben, welche zum Schutz und zur Versorgung des Gehirns beitragen. Zusätzlich befindet sich im Subarachnoidalraum, welcher zwischen der Arachnoidea mater und der Pia mater gelegen ist, der Liquor cerebrospinalis, eine klare, farblose Flüssigkeit, welche hauptsächlich zur Polsterung des Gehirns dient.

Das Gehirn selbst wird grob in vier Bereiche unterteilt: Großhirn, Kleinhirn, Zwischenhirn und Hirnstamm. Das Großhirn gliedert sich in zwei Hemisphären und besteht aus dem äußeren Rindenband (graue Substanz) und dem inneren Rindenmark (weiße Substanz). Im Rindenband liegen die Nervenzellen, im Rindenmark dagegen nur Nervenfasern. Die Rinde kann in verschiedene Felder unterteilt werden, welche Funktionen wie Sehen, Riechen, Empfindung oder aber Gedächtnis steuern. Das Kleinhirn gliedert sich ebenfalls in zwei Hemisphären und ist unter anderem für Gleichgewicht, Bewegung und Koordination verantwortlich. Zum Zwischenhirn zählen Thalamus, Hypothalamus, Subthalamus und Epithalamus. Der Thalamus dient als Vermittler von Signalen zum Großhirn. Der Hypothalamus ist für die Bildung verschiedener Hormone sowie die vegetative Steuerung des Organismus zuständig. Der Hirnstamm ist der älteste Teil des Gehirns und übernimmt neben der Steuerung sensorischer und motorischer Signale wichtige elementare Funktionen des Organismus.

In allen Bereichen des Gehirns werden die Nervenzellen von Gliazellen umgeben, welche als Stützgerüst und als elektrische Isolation zwischen den Nervenzellen dienen. Außerdem sind die Gliazellen maßgeblich am Stoff- und Flüssigkeitstransport, sowie an der Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn beteiligt. Auch bei Prozessen der Informationsverarbeitung, -speicherung und -weiterleitung sind diese Zellen involviert. Die Astroglia oder Astrozyten findet man in der grauen und in der weißen Substanz. Sie zeigen einen sternförmigen Aufbau und stehen durch ihre Fortsätze mit den Blutgefäßen in Verbindung. Bei pathologischen Prozessen werden Astrozyten reaktiv, d.h. bilden verstärkt Gliafasern und schwellen an (reaktive Astroglie).

Oligodendroglia oder Oligodendrozyten zeichnen sich durch kleine, runde Zellkerne mit hohem Anteil an Heterochromatin aus. Ebenfalls zu den Gliazellen gehört die Mikroglia, auch Hortegazellen oder Mesoglia genannt. Diese Zellen erfüllen nicht die genannten typischen Gliazellfunktionen, sondern bilden eine aktive Immunabwehr im Zentralnervensystem. Bei Aktivierung durch pathologische Prozesse erlangen sie die Funktion der Phagozytose und der Sekretion inflammatorischer Moleküle. Letztendlich sind noch die Ependymzellen zu nennen, welche die einschichtige Auskleidung des Hohlraums im Zentralnervensystem bilden und ebenfalls zu den Gliazellen gehören. Einige Ependymzellen werden als Plexusepithelien bezeichnet und bilden zusammen mit einem Teil der Pia mater den Plexus choroideus, welcher in den Hirnventrikeln liegt und für die Produktion des Liquor cerebrospinalis verantwortlich ist (Trepel, 2008).

2.2 Das menschliche Immunsystem

Als Immunsystem (vom lateinischen *immunis* = unberührt, frei, rein) wird ein komplexes Netzwerk bestehend aus Organen, Zellen, Proteinen und Molekülen bezeichnet, welches zum Schutz des Organismus vor körperfremden Substanzen und Krankheitserregern wie Viren, Bakterien und Pilzen dient. Außerdem ist es in der Lage fehlerhaft gewordene körpereigene Zellen zu entfernen. Das Immunsystem kann in zwei Bereiche unterteilt werden. Zum einen besteht es aus dem angeborenen Immunsystem und zum anderen aus dem adaptiven Immunsystem, welches auch als erworbenes Immunsystem bezeichnet wird. Das angeborene Immunsystem stellt die vorderste Frontlinie der Immunabwehr da. Durch physikalische Barrieren, wie z.B. die Epithelien oder chemische Barrieren, wie z.B. der pH-Wert im Magen treffen in den Organismus eingedrungene Pathogene auf den ersten Widerstand. Lösliche Faktoren wie Lysozyme, Akutphaseproteine, Zytokine, Typ-I-Interferone und Komplementproteine können Pathogene relativ schnell bekämpfen. Zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören Phagozyten, wie Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, und Dendritische Zellen (DC), aber auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die Mechanismen der angeborenen Immunabwehr sind relativ unspezifisch und werden unmittelbar nach dem Eindringen eines Erregers aktiv. Die adaptive Immunantwort setzt erst einige Tage nach einer Infektion ein. Bis zu diesem Zeitpunkt wird die Infektion allein durch das angeborene Immunsystem unter Kontrolle gehalten.

Das adaptive Immunsystem besteht ausschließlich aus Lymphozyten. Diese werden unterteilt in T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Letztere produzieren nach einer Aktivierung Antikörper, welche die humorale Immunantwort des adaptiven Immunsystems darstellen. Die Zellen des adaptiven Immunsystems erkennen nur bestimmte Antigene und bilden daher eine spezifische Immunantwort aus. Eine klonale Expression spezifischer Effektorklone und die daraus resultierende Spezifität ist auch der Grund, warum die Immunantwort des adaptiven Immunsystems erst nach einigen Tagen nach dem Antigenkontakt erfolgt. Nach dem Antigenkontakt ist das adaptive Immunsystem in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln, wodurch die Immunantwort bei einem erneuten Antigenkontakt schneller erfolgen kann. Auf Grund verschiedener Membranproteine können die T-Lymphozyten in CD4-positive ($CD4^+$) T-Helferzellen (T_H) und CD8-positive ($CD8^+$) zytotoxischen T-Zellen (CTL) unterteilt werden. Die Funktion der T-Helferzelle besteht in der Ausschüttung von Zytokinen, um damit anderen Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen, CTL oder B-Zellen zur Aktivierung zu helfen. CTL dienen zum direkten Abtöten infizierter Zellen. Dies wird durch das Effektormolekül Perforin ermöglicht, welches in der Lage ist, Poren in der Membran der infizierten Zelle auszubilden. Dadurch können die lytischen Granula der CTL in die Zielzelle eindringen und den Zelltod auslösen. Damit $CD4^+$ - und $CD8^+$ T-Zellen ihre Funktion erlangen, müssen sie zunächst aktiviert werden. Dies geschieht durch Bindung des T-Zellrezeptors (TCR) auf ihrer Zelloberfläche an fremde Antigene, welche von sogenannten „major histo-compatibility complex“ (MHC) auf der Oberfläche einer Zelle präsentiert werden. Zellen mit dieser Eigenschaft der Antigenpräsentation werden daher als Antigenpräsentierende Zellen (APC) bezeichnet. Dazu gehören DC, B-Zellen und Monozyten/Makrophagen (Janeway et al., 2002).

2.2.1 Immunologie des ZNS

Das zentrale Nervensystem unterscheidet sich bezüglich seiner Immunreaktion bei pathologischen Prozessen von den übrigen Organen und Geweben im Körper. Auf Grund seiner hohen Sensitivität besitzt es verschiedene Eigenschaften, um sich vor einer übermäßigen Immunantwort und daraus resultierenden Schäden zu schützen. Es wird daher den immunprivilegierten Organen zugeordnet (Barker und Billingham, 1977). Neuere Studien belegen jedoch, dass weniger die Isolation des ZNS vom Immunsystem der Grund für diese Zuordnung ist, sondern vielmehr die zahlreichen ZNS gesteuerten Mechanismen, die eine T-Zellantwort innerhalb des ZNS regulieren (Bechmann, 2005; Ransohoff et al., 2003). Einer dieser Mechanismen ist die Blut-Hirn-Schranke (BHS), welche hauptsächlich von eng verbundenen Endothelzellen in den Kapillaren gebildet wird. Sie dient als physiologisches Hindernis zwischen dem ZNS und dem Blutkreislauf und kontrolliert selektiv die Passage bestimmter Metaboliten, Plasmaproteine und Immunzellen (Abbott et al., 2006; Hickey, 1991). Dem Hirnparenchym fehlen außerdem die klassischen antigen-präsentierenden Zellen (APC): die dendritischen Zellen (DC). Die Mikrogliazellen sind die immunkompetenten Zellen des Parenchyms und regulieren die angeborene und adaptive Immunantwort. Bei Aktivierung steigt die Fähigkeit zur Antigenpräsentation, welche jedoch im Vergleich zu der der DCs gering ist (Miller et al., 2007; Olson and Miller, 2004). Außerdem besitzt das ZNS kein konventionelles Lymphsystem, wodurch Antigene schlechter abtransportiert werden können und durch bestimmte Zytokine ein antientzündliches Milieu geschaffen wird (Cserr und Knopf, 1992). Es konnte auch die Expression sogenannter Todesmoleküle auf Astrozyten nachgewiesen werden, welche bei T-Zellen Apoptose auslösen können (Bauer et al., 1998; Ford et al., 1996). Durch diese komplexen Mechanismen kann das ZNS zu Recht als ein besonderer immunologischer Bereich bezeichnet werden.

2.3 Hirntumoren

Im Vergleich zu peripheren soliden Tumoren ist die Inzidenz primärer Tumoren des ZNS mit 2 % aller Krebserkrankungen zwar gering, jedoch zeichnen sie sich oft durch eine starke Aggressivität und schnelle Progression aus. Am häufigsten treten Gliome auf, bei denen es sich um Neoplasien der Gliazellen handelt. Sie werden von der World Health Organisation (WHO) in vier Malignitätsgrade eingeteilt: Histologisch benigne Hirntumoren, welche langsam wachsend sind und sehr gute Prognosen haben, werden dem WHO Grad I zugeordnet. Infiltrativ wachsende Tumoren, welche häufiger rezidivieren und in bösartigere Tumoren übergehen können, werden als WHO Grad II Tumoren, auch „low grade“ Tumoren, bezeichnet. WHO Grad III Tumoren werden als bösartig, maligne, bezeichnet und sind durch eine deutliche Reduktion der Überlebenszeit gekennzeichnet. Nach der Resektion sind in der Regel Chemo- oder Strahlentherapie notwendig. Die hochmalignen WHO Grad IV Tumoren zeichnen sich durch eine sehr schlechte Prognose und einer kurzen Überlebenszeit der Patienten aus. WHO Grad III und IV Tumoren werden als „high grade“ Tumoren zusammengefasst (Louis et al., 2007). Die Prognose eines Tumors des ZNS wird jedoch nicht nur durch den Malignitätsgrad des Tumors, sondern auch durch seine Lokalisation bestimmt. Je nachdem aus welcher Ursprungszelle der Tumor entstanden ist und welcher Zelltyp das Zellbild dominiert, werden sie in Astrozytome und Oligodendrogliome unterteilt. (Burger und Scheithauer, 2007; Kolles et al., 1998). „Low grade“ Astrozytome zeichnen sich durch ein langsames Wachstum aus. Die Tumorzellen wachsen diffus infiltrierend, das bedeutet der Tumor ist kaum abgrenzbar vom nicht-neoplastischen Gewebe. Das histologische Bild ist geprägt durch ein Nebeneinander von Nervenzellen, Axonen, normalen Gliazellen, reaktiven Astrozyten, sowie von mehr oder weniger dicht liegenden neoplastischen astrozytären Zellen (Burger et al., 2002).

Der Tumor ist durch die unscharfe Tumorgrenze praktisch nicht komplett chirurgisch entfernbar. Hierdurch kommt es zu Rezidiven, welche oft eine Progression zu einem höheren Malignitätsgrad aufweisen (Salcman et al., 1994). Hochmaligne Astrozytome mit WHO Grad IV werden als Glioblastome (GBM) bezeichnet. Sie stellen 15-20% aller intrakraniellen Tumoren und 50% der Gliome dar (CBTRUS, 2010; Ohgaki und Kleihues, 2005). Sie können primär auftreten oder sekundär als progredientes Astrozytom. Histologisch zeigen sich im Vergleich zu den diffusen Astrozytomen niedrigeren Malignitätsgrades zusätzlich zu den dichteren neoplastischen Astrozyten strichförmige Nekrosen und Gefäßproliferate.

Dadurch kommt es zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke und es können auch Blutungen auftreten. Lokalisiert ist das Glioblastom meist im tiefen frontalen Marklager und breitet sich in kontralateralen Hemisphären aus. Die Glioblastompatienten zeigen eine mittlere Überlebenszeit von ca. sechs Monaten nach Diagnosestellung (Burger et al., 2002). Nach den Metastasen, welche an zweiter Stelle in der Häufigkeit maligner Neoplasien im ZNS stehen, sind differentialdiagnostisch die primären ZNS Lymphome (PZNSL) zu nennen. Diese stellen eine interessante Entität dar, da die Häufigkeit spontan auftretender PZNSL bei immunkompetenten Patienten in den letzten Jahren zugenommen hat (Eby et al., 1988; Miller et al., 1994). Es handelt sich bei diesen Tumoren um extranodale Non-Hodgkin-Lymphome, welche sich primär im ZNS, selten auch im Auge, manifestieren. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist keine extradurale Lymphommanifestation feststellbar (Ellison und Wilkins, 2001; Hochberg und Miller, 1988). Am häufigsten treten die diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome auf (DLBCL von „diffuse large B cell lymphoma“) (Kleihues und Cavenee, 1998). Diese Tumorentität zeichnet sich durch große, runde Kerne und vergrößerte Nukleoli aus. Auch Nekrosen und Apoptosen sind häufig zu finden. Neben einem rasenartigen Wachstum des Tumors, können die Tumorzellen auch perivascular akkumulieren (pseudoecephalitisches Wachstum) oder diffus im Hirngewebe verteilt liegen. Begleitend zu den Tumorzellen treten häufig auch reaktive Lymphozyten auf, welche auch als Tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) bezeichnet werden (Burger et al., 2002).

2.4 Immunregulation in Tumoren

Die Kontrolle durch das Immunsystem ist ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung von Tumoren. Dieser Prozess kann in drei Phasen eingeteilt werden. In der ersten, sogenannten Eliminierungsphase, werden die Tumorzellen vom Immunsystem detektiert und zerstört, das Tumorstadium wird unterdrückt. Außerdem wird der Tumor von seiner Umgebung geprägt und es proliferieren nur die Tumorzellen, welche am wenigsten immunogen gegen die aktive Immunantwort sind. Selten werden alle Tumorzellen zerstört und es kommt zur Gleichgewichtsphase. Die Tumorzellpopulation eignet sich Mechanismen an, um der Immunkontrolle zu entgehen, kann jedoch gerade noch vom Immunsystem unter Kontrolle gehalten werden. Dieses Gleichgewicht kann bis zu mehreren Jahren aufrecht erhalten werden. Schließlich bildet sich aus der schnell mutierenden Tumorzellpopulation ein immunresistenter Phänotyp.

Der Tumor befindet sich in der dritten und letzten Phase, der Fluchtphase (Immunescape) und kann nicht mehr länger vom Immunsystem kontrolliert werden (Dunn et al., 2004). Die Mechanismen, die der Tumor benutzt, um sich der Immunantwort zu entziehen, sind sehr vielfältig: Klassische HLA-I Liganden werden nicht mehr exprimiert, dafür alternative Formen, welche schlechter das Tumorantigen präsentieren (Algarra et al., 2000). Auch immunstimulatorische Moleküle wie IFN- γ fehlen (Kaplan et al., 1998), dafür werden immunsupprimierende Zytokine, wie z.B. TGF- β oder IL-10, überproduziert (Khong und Restifo, 2002). Die Tumorzellen können auch bestimmte Liganden, z.B. MIC oder IDO sezernieren, welche die Immuneffektorzellen direkt hemmen (Groh et al., 2002; Uyttenhove et al., 2003). Gleichzeitig können die Tumorzellen Faktoren exprimieren, die ihr eigenes Wachstum fördern und die Apoptose verhindern (Konnikova et al., 2003). Ein weiterer effektiver Mechanismus der Immunantwort zu entgehen, ist die Generierung bzw. Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen durch den Tumor (Curiel et al., 2004).

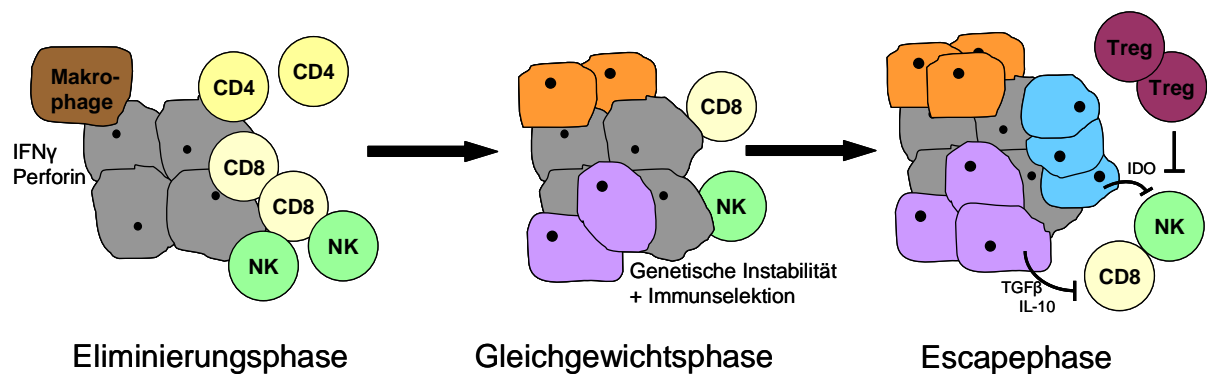


Abbildung 1: Die drei Phasen der Immunreaktion bei der Tumorentwicklung

Neoplastische Zellen werden in der Eliminierungsphase durch CD4+ und CD8+ T-Zellen, sowie NK-Zellen und Makrophagen bekämpft. Können die entarteten Zellen nicht beseitigt werden, tritt die Gleichgewichtsphase ein, welche sich durch mutierende Tumorzellen und eine schwache Immunantwort gegen die neu gebildeten Zellen auszeichnet. In der Escapephase produzieren die Tumorzellen hemmende Faktoren, welche neben den regulatorischen T-Zellen die Immunantwort minimal halten.

2.4.1 PD-1

Das koinhibitorische Molekül PD-1, welches hauptsächlich auf T-Zellen, aber auch auf B-Zellen und myeloiden Zellen exprimiert werden kann, wird durch Bindung seiner Liganden PDL-1 und PDL-2 aktiviert und bewirkt eine Inaktivierung der Trägerzelle (Agata et al., 1996). Ursprünglich identifiziert wurde es bei Hybridoma-T-Zellen, die gerade in Apoptose gingen, aber auch bei aktivierten und ruhenden T-Zellen (Ishida et al., 1992). Durch inhibitorische Signale reguliert es die T-Zellaktivierung, Toleranz und immunvermittelte Gewebsschädigung. Bei Aktivierung einer T-Zelle wird es verstärkt exprimiert, um auch ein Abschalten der Aktivierung zu gewährleisten. Danach sinkt die Expression von PD-1 wieder (Sharpe et al., 2007). Bei persistierendem Antigen dagegen, wie es bei einem Tumor vorkommt, werden die T-Zellrezeptoren permanent stimuliert und PD-1 bleibt konstitutiv auf den T-Zellen exprimiert. Außerdem exprimieren eine Reihe von Tumoren den Liganden B7-H1 und sorgen dafür, dass die tumorreaktiven T-Zellen in eine Art Ruhezustand übergehen. Proliferationskapazität, Zytokinproduktion und Zytotoxizität sind stark reduziert, wobei die Tendenz zur Apoptose erhöht ist (Dong et al., 2002; Iwai et al., 2002; Keir et al., 2006). Wegen seiner regulatorischen Eigenschaften spielt der PD-1 Signalweg auch eine wichtige Rolle bei der Immunsuppression vermittelt durch regulatorische T-Zellen (Kitazawa et al., 2007). Die Expression von PD-1 stellt somit einen wichtigen Faktor in der unterdrückten Mikroumgebung bei Tumoren dar.

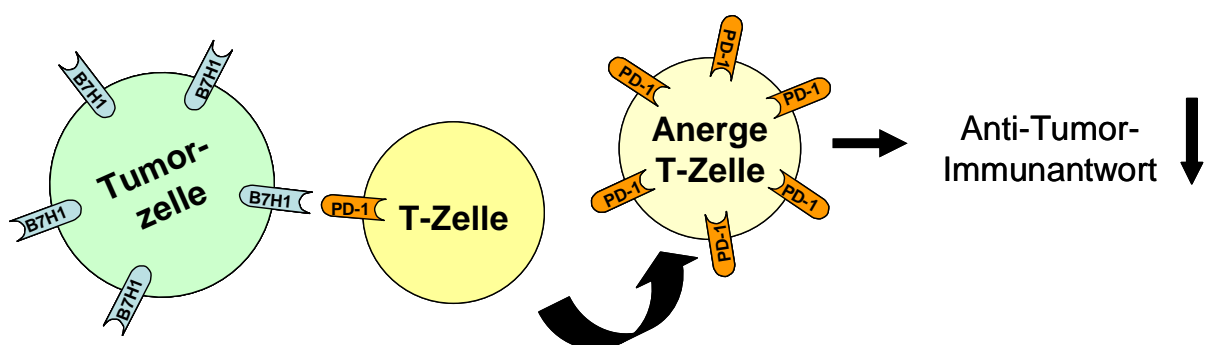


Abbildung 2: Tumorinduzierte T-Zellanergie

Durch verstärkte Expression von B7-H1 auf der Tumorzelloberfläche wird das PD-1 Molekül der immunreaktiven T-Zellen gebunden und ein inhibitorisches Signal in der T-Zelle ausgelöst. Die Expression von PD-1 wird verstärkt und die tumorspezifische T-Zelle tritt in einen Ruhezustand ein, die Anti-Tumor-Immunantwort wird gehemmt.

2.4.2 Regulatorische T-Zellen

Um ein Gleichgewicht zwischen Immunität und Toleranz aufrecht zu erhalten, unterdrücken regulatorische T-Zellen (Treg) die Aktivierung des Immunsystems durch die direkte Inhibierung von aktivierten T-Zellen. Diese T-Zellsubpopulation zeichnet sich durch eine starke Expression der IL-2 Rezeptor- α -Kette, CD25 und FOXP-3 aus (Sakaguchi et al., 2006). Neben den natürlicherweise im Thymus vorkommenden Treg, können sich auch in der Peripherie aus CD4+FOXP-3- T-Zellen regulatorische T-Zellen durch die Expression von FOXP-3 entwickeln (adaptive Treg). Diese Population ist jedoch nicht stabil und die Treg können auch durch Verlust von FOXP-3 wieder zu Effektorzellen umgewandelt werden (Fontenot et al., 2003; Yang et al., 2008). Auch PD-1 und B7-H1 können auf Treg exprimiert werden, wobei dieser Signalweg die Initialphase der Aktivierung und Expansion selbstreaktiver T-Zellen limitiert und die Effektorfunktion selbstreaktiver Effektorzellen beschränkt (Keir et al., 2006; Probst et al., 2005). Außerdem wird durch die Expression von PD-1 die Erhaltung der Treg Population gefördert und die Formation von immunologischen Kontakten stabilisiert (Francisco et al., 2009). Der PD-1 Signalweg unterstützt also auch die Entwicklung und Funktion von Treg und reguliert damit das dynamische Gleichgewicht zwischen potentiell pathogenen selbstreaktiven T-Zellen und Treg.

2.4.3 Regulatorische Makrophagen

Unter den Makrophagen und Monozyten konnte eine Subpopulation identifiziert werden, der man unter anderem auch regulatorische Eigenschaften zuspricht (Zwadlo et al., 1987). Vor allem Makrophagen dieser Subpopulation zeigen eine Expression von CD163, ein Typ-1-Membranprotein, welches sowohl als membranständiges als auch lösliches Protein vorkommt (Law et al., 1993). Zum einen kann CD163 andere Moleküle wie TWEAK (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis) oder Hämoglobin-Heptaglobin-Komplexe internalisieren, damit diese abgebaut werden. Zum anderen kann es Erythrozyten binden und deren Überleben sichern. Außerdem fungiert es als Immunsensor bei Bakterienbefall. (Bover et al., 2007; Fabriek et al., 2007; Fabriek et al., 2009; Kristiansen et al., 2001). Neben den klassisch aktivierten Makrophagen, welche über Bakterien oder IFN- γ aktiviert werden, konnte auch eine Population alternativ aktivierter Makrophagen entdeckt werden.

Diese entstehen in einem bestimmten Milieu, unter anderem bestehend aus IL-4, IL-13 und M-CSF, und exprimieren nach der Aktivierung stark CD163. Außerdem produzieren sie im Gegensatz zu den klassisch aktivierten Makrophagen wenig IL-12, IL-23, dafür mehr IL-10, TGF- β und Arginase-1, welche in einem Tumor die T-Zellaktivität gegen die Tumorzellen hemmen. Außerdem exprimieren sie EGFR und IL-8, welche direkt das Tumorwachstum positiv beeinflussen können. Umgekehrt konnte nachgewiesen werden, dass auch die Tumorzellen Faktoren exprimieren, z.B. M-CSF, welche alternativ aktivierte Makrophagen induzieren. Eine Korrelation zwischen CD163+ Makrophagen und der Malignität und Tumorprognose bei Gliomen konnte bereits festgestellt werden (Fujiwara et al., 2011; Komohara et al., 2008).

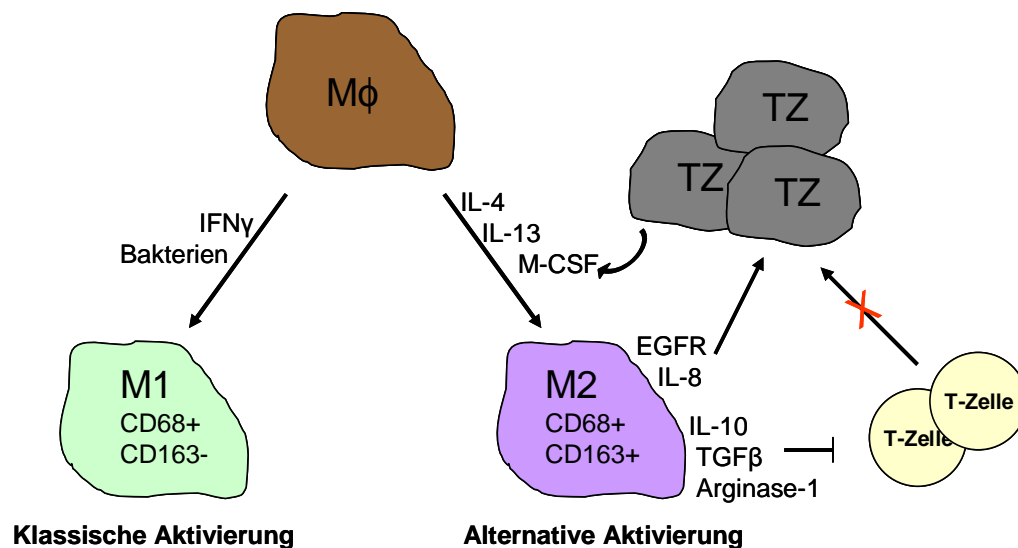


Abbildung 3: Aktivierung von Makrophagen

Bei einer klassischen Aktivierung werden Makrophagen unter anderem durch IFN γ oder Bakterien stimuliert. Sie werden als M1 Makrophagen bezeichnet und exprimieren den klassischen Makrophagenmarker CD68, aber kein CD163. Durch IL-4, IL-13 oder M-CSF, welcher von Tumorzellen produziert werden kann, entwickeln sich M2 Makrophagen, welche sowohl für CD68 als auch für CD163 positiv sind. Durch die Sekretion von EGFR und IL-8 können sie direkt das Tumorwachstum positiv beeinflussen. Über die Produktion von IL-10, TGF- β und Arginase-1 hemmen sie die Aktivität tumorspezifischer T-Zellen und verhindern so eine erfolgreiche Tumorbekämpfung.

2.5 Histologie des ZNS

Die Histologie (von gr. histos „Gewebe“ und logos „Lehre“) ist die Wissenschaft vom Gewebe und eine Schnittstelle zwischen der Medizin und der Biologie. Vor allem für die Pathologie ist die Histologie wichtig, um krankhafte Veränderungen im menschlichen Organismus zu untersuchen und stellt somit die Grundlage zur Erstellung pathologischer Befunde dar. Die histologischen Techniken ermöglichen schnelle, kostengünstige und sichere Diagnosen im Vergleich zu anderen diagnostischen Verfahren. Gewebeproben eines Patienten werden über verschiedene Arbeitsschritte zu mikroskopischen Präparaten verarbeitet, welche dann vom Pathologen untersucht werden. Die Bewertung histologischer Präparate liefert dem Kliniker wichtige Informationen für die Diagnose, die Therapie, sowie die Prognosen eines Patienten. Ebenso wie in allen anderen Organen und Geweben ist es auch im ZNS zwingend notwendig, die Struktur und den Aufbau von normalem Gewebe zu kennen, um abnormales Gewebe zu erkennen und einer Erkrankung zuzuordnen. Der grobe anatomische Aufbau, sowie die wichtigsten Zellkomponenten und deren Funktion wurden schon unter 1.1. genannt. Für die vorliegende Arbeit sind vor allem die neoplastischen Astrogliazellen, sowie die Mikroglia und die infiltrierenden bzw. neoplastischen Lymphozyten von Bedeutung, weshalb deren mikroskopische Anatomie näher erklärt wird.

2.5.1 Histologie der Astrozyten

Astrozyten weisen im normalen Hirngewebe eine sternförmige Struktur auf, welche jedoch nur mittels einer Färbung des sauren Gliafaserproteins (GFAP) sichtbar wird. In der HE-Färbung sind lediglich die Kerne der Astrozyten sichtbar. Durch Schädigung des ZNS kommt es zu einer reaktiven Astrozytose, welche sich durch eine Hypertrophie und Hyperplasie der Astrozyten auszeichnet. Die erste Reaktion der Astrozyten ist die Hypertrophie. Die Zellgröße nimmt zu und das Zytoplasma wird prominenter. Besonders zytoplasmareiche Astrozyten werden dann als Gemistozyten bezeichnet. Bei chronischer Astrogliose tritt auch die Hyperplasie auf. Dabei steigt sowohl die Anzahl als auch die Dichte der astrozytären Nuklei ohne begleitende zytoplasmatische Prominenz (Mills, 2006). Neoplastische Astrozyten zeigen ähnliche Veränderungen wie bei einer Gliose. Dennoch sind die beiden Prozesse zu differenzieren.

Die sternförmige Gestalt der Astrozyten ist im Gliom wenig ausgeprägt, außerdem treten die neoplastischen Astrozyten mit einer höheren Zelldichte und in unregelmäßigerer Verteilung auf. Beim diffusen Astrozytom ist die Erhöhung der Zelldichte gegenüber der weißen Substanz nicht immer direkt deutlich sichtbar. Die neoplastischen Zellen erscheinen jedoch pleomorph, hyperzellulär und hyperchromat. Innerhalb des Tumors kann sich die Zellmorphologie verschiedener Areale unterscheiden: Zellen mit unauffälligem Zytoplasma und nackt erscheinenden Kernen sind meistens in der Infiltrationszone zu finden. Zellen mit reichlich eosinophilem Zytoplasma und exzentrischen Kernen findet man häufig in Regionen mit hoher Zelldichte. Letzterer Zelltyp wird auch als gemistozytische Variante bezeichnet. WHO Grad III Astrozytome zeigen prinzipiell die gleichen Zellmorphologien wie die diffusen Astrozytome. Die Kerne erscheinen zum Teil dunkler und atypischer, das Zytoplasma ist reduziert. Generell sind die Zelldichte und die Mitoserate gegenüber dem diffusen Astrozytom erhöht. Kapillarproliferation und Nekrosen, zusätzlich zur beschriebenen Zellmorphologie, zeichnen einen Tumor als WHO Grad IV, einem Glioblastom, aus. Diese Tumoren sind meist sehr heterogen. Ein Mix aus pleomorphen Zellen mit hyperchromaten Kernen und variabler Menge an blassem Zytoplasma ist häufig zu sehen. Aber auch monomorphe kleinzellige Areale sind nicht selten. Diese Zellen sind charakterisiert durch meist runde oder längliche Kerne und sehr wenig Zytoplasma. Vereinzelt können auch Riesenzellen mit multiplen Kernen im Glioblastom gefunden werden (Burger et al., 2002).

2.5.2 Histologie der Mikroglia

Die Mikroglia des ZNS ist homogen im Parenchym verteilt und besteht aus Zellen mit kleinen, dunklen, verlängerten Kernen, welche in der HE-Färbung unauffällig sind. Mittels immunhistochemischer Färbung, z.B. mit CD68, kann sie jedoch sichtbar gemacht werden. Bei pathologischen Prozessen bzw. Schädigung des ZNS entsteht eine diffuse Mikrogliose. Fokal bilden sich auch mikrogliale Knötchen aus Mikroglia und aktivierten Astrozyten. Aus der Mikroglia entstehen zum Teil auch Makrophagen, welche das Gewebe infiltrieren. Aber auch aus Blutmonozyten werden Makrophagen im Gewebe gebildet. Die Makrophagen zeichnen sich durch mittlere bis große Kerne aus (Mills, 2006).

2.5.3 Histologie der Lymphozyten

Lymphozyten, welche bei pathologischen Prozessen ins ZNS wandern, sind durch ihre Morphologie gut vom Hirngewebe abgrenzbar. Sie besitzen kleine, runde Kerne, relativ wenig Zytoplasma und das Chromatin ist kondensiert. Die Unterscheidung der T-Zellen von B-Zellen ist ohne immunhistochemische Färbung schwieriger. T-Zellen zeigen etwas weniger Zytoplasma und irregulärere Kerne als die B-Zellen. Das Chromatin der T-Zellen ist noch etwas dichter als das der B-Zellen. Meist sind die Lymphozyten im ZNS perivascular zu finden (Mills, 2006).

Eine Neoplasie der B-Zellen, das diffuse, großzellige B-Zell-Lymphom, ist das häufigste primäre ZNS Lymphom. Die neoplastischen B-Zellen sind auf Grund der deutlich erhöhten Größenzunahme gut von nicht neoplastischen Lymphozyten unterscheidbar. Auf Grund verschiedener B-Zellmorphologien kann das DLBCL in drei Varianten unterteilt werden, wobei jedoch bei fast allen DLBCL ein Mischbild vorliegt (Harris et al., 1994). Am häufigsten tritt die zentroblastische Variante auf. Neoplastische Zentroblasten des Keimzentrums, charakterisiert durch helle, rundliche Kerne und zwei bis drei meist randständige Nukleolen, zeichnen die häufigste Variante aus. Immunoblasten, also extrafollikuläre B-Blasten, bilden die Basis des immunoblastischen DLBCL. Es handelt sich dabei um große Zellen mit rundlich-ovalem Kern, solitärem und zentralen Nukleolus und einem breiten basophilen Zytoplasma. Die anaplastische Variante, bestehend aus pleomorphen, zum Teil mehrkernigen B-Zellen ist eine sehr aggressive Form des DLBCL und eher selten (Lennert und Feller, 1990).

2.5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die Immunantwort, speziell von Immunzellen mit regulatorischer Funktion, bei verschiedenen Hirntumorentitäten vergleichend untersucht werden. Basierend auf bestehenden Veröffentlichungen über die Vorgänge bestimmter regulatorischer Signalwege in Tumoren wird eine vergleichende Analyse Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TIL) und Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) in unterschiedlichen Tumorentitäten erstellt. Im Einzelnen werden mittels immunhistochemischer Färbungen die regulatorischen Subpopulationen von Lymphozyten und Makrophagen auf Proteinebene identifiziert, charakterisiert und quantifiziert. Außerdem soll die Genexpression der Marker für regulatorische T-Zellen (PD-1) und regulatorische Makrophagen (CD163) quantitativ mittels Real-Time-PCR analysiert werden.

Folgende Fragestellungen sollen explizit beantwortet werden:

- Inwiefern besteht ein Unterschied im Auftreten immunregulatorischer T-Zellen und Makrophagen in Gliomen und normalem Hirngewebe?
- Besteht eine Korrelation zwischen dem Auftreten regulatorischer T-Zellen bzw. regulatorischer Makrophagen in Gliomen und deren Malignität oder Ki-67-Index?
- Wie häufig treten diese regulatorischen Populationen bei einem nicht hirneigenen Tumor des Immunsystems auf, welcher sich im Gehirn manifestiert hat (PZNSL) und wie unterscheidet sich das Vorkommen solcher Zellen im Vergleich zum Normalgewebe des ZNS?
- Besteht eine Korrelation zwischen dem Auftreten regulatorischer Zellpopulationen in PZNSL und deren Manifestationsart oder deren Ki-67-Index?
- Wie sind diese Populationen charakterisiert, welche Marker werden exprimiert?
- Gibt es Unterschiede in der Immunantwort bei rezidivierenden Tumoren zwischen Primärtumor und Rezidiv?
- Welchen Einfluss hat die Immunsuppression bei PZNSL Patienten auf das Auftreten der regulatorischen T-Zell- sowie Makrophagenpopulationen?

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Gerätschaften

Ausgießstation	Tissue-Tek [®] , TEC EC S/N 47150853, Sakura Finetek Germany GmbH, Heppenheim
Brutschränke	Heraeus Instruments, Function Line T6 und T12, Hanau
Dampfgarer	BRAUN Multi Gourmet, Kronberg
Gewebeeinbettautomat	Shandon, Excelsior ES, H42/EG 48289 Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US
Mikroskop	Nicon Eclipse E600 & Olympus Typ BH-2, Japan Leica DM5000B, Wetzlar
PCR-Thermocycler	MyCycler, BIO-RAD, Kalifornien, US
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Rotationsmikrotom	Reichert-Jung, Typ 2030, Wien, Österreich
Spectrophotometer	Nanodrop ND-1000, PeqLab, Erlangen
Real-Time-PCR- System	7900HT Real-Time PCR System, Software: 7900HT Version 2.3, Applied Biosystems, Kalifornien, US
Wasserbad	GFL Typ 1052, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Wärmeplatte	Bestandteil der Ausgießstation, Tissue-Tek [®]

Vortexer	Vibrofix VF1, Janke+Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen
Zentrifugen	5415 R, Eppendorf, Hamburg Z-326-K, Hermle, Wehingen

3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel

Coverplates	Shandon Coverplate QTY: 25, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US
Deckgläser	24 x 50mm, Glasdicke: 0,13- 0,16mm, R. Langenbrink Labor-und Medizintechnik, Emmendingen
Latexhandschuhe	Hartmann, Heidenheim
Objektträger	Super Frost Plus, LOT 24499, R. Langenbrink Labor-und Medizintechnik, Emmendingen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5, 1,0, 2,0ml)	Eppendorf, Hamburg
96-well-Platten	MicroAmp 96well reaction plate, Applied Biosystems, Kalifornien, US
Versiegelungsfolie für Platten	MicroAmp optical adhesive film, Applied Biosystems, Kalifornien, US

3.1.3 Substanzen

Alkohole	Ethanol (Ethylalkohol), vergällt, mind 99,9% Vol Sorte 642, EWG-Nr. 200-578-6, UN-Nr. 1170, BERKEL Pfälz. Spritfabrik Ludwigshafen; bei 90%, 80% und 70% Alkoholen Verdünnung mit entsprechenden Mengen Aqua dest. verdünnt
Antikörper-Substrat	Dako REAL™ Antibody Diluent, REF 52022, LOT 00053956, Dako, Glostrup, Dänemark
Bläuungsreagenz	Shandon Bläuungsreagenz, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US
DAB	Dako REAL™ DAB + CHROMOGEN (x 50), REF K5007, LOT 00054660, Dako, Glostrup Dänemark
DAB-Substrat	Dako REAL™ Substrate Buffer REF K5007, LOT 00054660, Dako, Glostrup Dänemark
Eindeckmedium	Entellan®, LOT HX822747 Merck, Darmstadt Aquatex, Merck, Darmstadt
Envision	Dako REAL™ EnVision™ HRP Rabbit/Mouse, REF K5007, LOT 0054660A, Dako, Glostrup Dänemark
Envision Flex	Dako EnVision™ Flex + Mouse (Linker) (Dako Autostainer/Autostainer Plus), REF K8022, LOT 00058805, Dako, Glostrup Dänemark
Formaldehyd-Lösung	4%, neutral gepuffert, Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Hämatoxylin	Shandon Harris-Hämatoxylin, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US
Kupfersulfatlösung	2%, bestehend aus Kupfer (II)-sulfat-Penttchhydrat, LOT A 483787 448, MERCK KGaA Darmstadt und Aqua dest.

LiChrosolv	gereinigtes Wasser für die TaqMan , Merck, Darmstadt
Methanol	AnalaR NORMAPUR Reagent ph.Eur., VWR, Belgien
Normalserum aus Ziege	Dianova, Hamburg
Paraffin	56/58°C, Engelbrecht, Edermünde
Wasserstoffperoxid	30%, ph.Eur., PZN 7284667, Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Xylol	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken

3.1.4 Pufferlösungen und Kits

Pufferlösungen:

Für die Herstellung der verwendeten Pufferlösungen wurde immer mit entsprechenden Mengen Aqua dest. verdünnt.

Demaskierungspuffer pH 9,0	Dako Target Retrieval solution, pH 9 (10x) REF S2367, LOT 00046966, Dako, Glostrup ,Dänemark
Demaskierungspuffer pH 6,1	Dako Target Retrieval solution, pH 6,1 (10 x Concentrate), REF S1699, LOT 10022859, Dako, Glostrup Dänemark
TE-Puffer, 1x	10 mM Tris-Cl, pH 7,5 1mM EDTA pH 8,0
Waschpuffer/TRIS- Puffer	Dako Wash Buffer (10x), REF S3006, LOT 00056259, Dako, Glostrup ,Dänemark

Kits:

RNeasy FFPE Kit	Qiagen, Hilden
High capacity cDNA reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Kalifornien, US
TaqMan PreAmp Master Mix Kit	Applied Biosystems, Kalifornien, US
TaqMan Gene Expression Master Mix Kit	Applied Biosystems, Kalifornien, US

3.1.5 Antikörper

Um die Immunantwort der in 2.6.1 aufgeführten Gewebeproben zu untersuchen, wurden die in Tabelle 1 dargestellten Antikörper verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Antikörper zur Untersuchung der von Tumorzellen induzierten Immunantwort

A: Verwendete Primärantikörper

Antikörper gegen	Klonalität	Ig-Klasse	Hersteller	Hauptzellexpression
CD3	Polyklonal Kaninchen	-	Dako, Dänemark	T-Lymphozyten
PD-1	Monoklonal Maus Klon: NAT	IgG1	Abcam, United Kingdom	T- und B-Lymphozyten
FOXP-3	Monoklonal Maus Klon: 259D	IgG1, kappa	BioLegend, San Diego	Regulatorische T-Zellen
CD20	Monoklonal Maus Klon: L26	IgG2a, kappa	Dako, Dänemark	B-Lymphozyten
CD25	Monoklonal Maus Klon: 4C9	IgG2b	Cell Marque, Kalifornien	Regulatorische T-Zellen
CD68	Monoklonal Maus Klon:	IgG3, kappa	Dako, Dänemark	Makrophagen
CD163	Monoklonal Maus Klon: 10D6	IgG1	Leica Microsystems, United Kingdom	Monozyten Makrophagen
Ki-67	Monoklonal Maus Klon: MIB-1	IgG1, kappa	Dako, Dänemark	Zellen in Proliferation

B: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Konjugiert mit	Hersteller
Goat Anti-Mouse IgG (Subclasses 1,2a,2b,3), Fc _γ Fragment specific	FITC	Jackson ImmunoResearch, Suffolk
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Texas Red	Jackson ImmunoResearch, Suffolk
Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Rhodamin Red	Jackson ImmunoResearch, Suffolk

3.1.6 Primer zur quantitativen Expressionsanalyse mittels TaqMan-Real-Time-PCR

Die in der TaqMan-Real-Time-PCR eingesetzten Primer zur quantitativen Expressionsanalyse der Zielgene PD-1 und CD163, sowie des Haushaltsgens (endogene Kontrolle) wurden als fertige Assays der Firma Applied Biosystems verwendet.

Zielgen PD-1: TaqMan Gene Expression Assay für PDCD1: Hs00169472_m1

Zielgen CD163: TaqMan Gene Expression Assay für CD163: Hs 00174705_m1

Haushaltsgen TBP: TaqMan Gene Expression Assay für TBP: Hs00427620_m1

Die ausgewählten Assays enthalten Primer, welche zwei Exon Grenzen abdecken, wodurch eine Vervielfältigung von spezifischen Transkripten sichergestellt wird. Außerdem detektieren die Assays laut Hersteller die maximale Anzahl an vorhandenen Transkripten des Zielgens, wobei Genhomologien ausgeschlossen werden können. Die Assays zeigen also eine hohe Spezifität für die ausgewählte Sequenz.

3.1.7 Gewebeproben

Die Gewebeproben stammen von Patienten des Universitätsklinikums des Saarlandes und wurden durch einen Neuropathologen begutachtet und befundet. Die Proben sind eingekapselt, fixiert und in Paraffin eingebettet (siehe 2.7). Untersucht wurden ausschließlich Geweblöcke aus den Jahren 2010 bis 1992, welche über das Computerprogramm PathoPro aus dem Archiv des Instituts für Neuropathologie der Universität des Saarlandes ausgewählt wurden (siehe 2.6.1). Die Auswahl der geeigneten Gewebeproben aus der hauseigenen Tumorbank des Instituts für Neuropathologie am Universitätsklinikum des Saarlandes erfolgte über die Pathologie-Software PathoPro und SAP. Die insgesamt 163 ausgewählten Proben werden in nachfolgender Tabelle (Tab.2) in einer Übersicht dargestellt. Bei den ausgewählten primären ZNS Lymphomen handelte es sich in allen Fällen um DLBCLs.

Tabelle 2: Charakteristik der ausgewählten Gewebeproben

	n gesamt	n weiblich	n männlich	Alter [Jahren]	Ø Alter [Jahren]
Diffuses Astrozytom	29	13	16	19-73	44
Anaplastisches Astrozytom	18	8	10	7-77	47
Glioblastom	40	21	19	40-83	62
Glioblastomrezidiv	9	3	6	39-62	50
Primäres ZNS Lymphom (DLBCL)	42	23	19	32-85	68
Primäres ZNS Lymphom-Rezidiv	10	4	6	52-75	66
Primäres ZNS Lymphom unter Immunsuppression	7	2	5	35-56	47
Tonsille	2	2	0	5-11	8
Normalgewebe ZNS	6	4	2	13-82	46

3.2 Methoden

3.2.1 Fixierung und Einbettung der Gewebeproben

Zu Beginn der Aufbereitung der Gewebeproben werden diese vermessen und die Beschaffenheit und Lokalisation des Tumorgewebes beschrieben. Anschließend werden die Proben zugeschnitten, in Einbettkassetten für die Paraffineinbettung verteilt und mit Aqua dest. abgespült. Die eingekapselten Proben werden bei Raumtemperatur mehrere Stunden in einer 4%igen neutral gepufferten Formaldehyd-Lösung inkubiert. Dadurch bleibt die ursprüngliche Gewebe- und Zellmorphologie der entnommenen Gewebeproben erhalten und der Zerfall durch freigesetzte zelluläre Proteasen, auch als Autolyse bezeichnet, bzw. das Wachstum von Fäulnisbakterien und Schimmelpilzen wird verhindert. Das Formalin trägt zur Festigung und Härtung des Gewebes bei. Die basischen Aminosäuren in der Gewebeprobe reagieren mit dem Formalin und es entstehen quervernetzte Hydroxymethylenbrücken, die die Proben während der Verarbeitung und der Färbung vor mechanischen Verletzungen schützen und anschließend gewährleisten, dass sich die hergestellten Gewebelöcke schneiden lassen. Die Dauer der Fixierung in Formalin hängt von der Größe und der Beschaffenheit des Probenmaterials ab. Nach der Fixierung folgt die Einbettung der Proben in Paraffin. Zunächst müssen die Proben dazu entwässert werden. Sie durchlaufen eine schrittweise in der Konzentration ansteigende Alkoholreihe. Dadurch kommt es neben einer Härtung der Probe auch zu einem Herauslösen der meisten Lipide. Danach werden die Gewebeproben vom wässrigen Zustand über Xylol in etwa 55-58°C heißes Paraffin überführt. Das Xylol dient dabei zur Entfernung des Alkohols aus dem Gewebe. Nachfolgend ist das Protokoll der Formalinfixierung bzw. das Programm der Paraffineinbettung, welches in einem vollautomatisierten Gewebereinbettungsautomaten von statten geht, im Überblick dargestellt.

Protokoll: Formalinfixierung/Paraffineinbettung

4% Formalin	1,3 h
Ethanol 50%	1,05 h
Ethanol 70%	1,05 h
Ethanol 80%	1,05 h
Ethanol 100%	1,05 h
Ethanol 100%	1,05 h
Ethanol 100%	1,05 h
Xylol	55 min
Xylol	55 min
Xylol	120 min
Paraffin	1,0 h
Paraffin	1,2 h
Paraffin	1,2 h

Nachdem die Gewebeproben ihr ca. 15-stündiges Programm zum Einbetten durchlaufen haben und mit Paraffin durchtränkt sind, können sie ausgeblockt werden. Dies erfolgt an der sogenannten Ausgießstation. Die Gewebeproben werden von der Einbettkassette in ein Gießschälchen überführt. Dieser Schritt erfolgt auf der Wärmeplatte der Ausgießstation. Es wird ein wenig Paraffin in das Gießschälchen gefüllt, die Gießform wird von der Wärmeplatte entfernt und das Gewebestück an den Boden des Schälchens angedrückt. Durch den Entzug der Wärme kann das Paraffin erstarren und die Gewebeprobe am Boden anhaften. Danach wird das Schälchen vollständig mit heißem Paraffin übergossen. Die zuvor verwendete Einbettkassette wird auf das mit Paraffin befüllte Gießschälchen gesetzt und vorsichtig angedrückt. Die Kassette bildet somit den Blockträger des Paraffinblockes, welcher später in die Vorrichtung des Mikrotoms eingespannt wird. Zum Erstarren werden die hergestellten Paraffinblöcke auf eine Eisplatte gestellt. Nach dem Erkalten sind diese dann zum Schneiden feiner Paraffinschnitte (siehe 2.7.3) einsatzbereit und können von der Gießform gelöst werden.

3.2.2 Anfertigung der Paraffinschnitte für die Immunhistochemie und Expressionsanalyse

Immunhistochemie-Schnitte

Die Anfertigung der Schnitte erfolgt an einem Rotationsmikrotom. Eine maximale Schnittdicke von 3 µm gewährleistet dabei die bestmögliche Qualität der Zell- bzw. Gewebemorphologie. Hierzu müssen die zu verwendeten Gewebeblöcke zunächst auf einem Eisblock etwa 10-15 min heruntergekühlt werden. Im Anschluss kann mit dem eigentlichen Schneiden des Paraffinblockes begonnen werden. Die erhaltenen Schnitte werden dann zur Streckung und zur Entfernung möglicher Falten auf ein 40°C warmes Wasserbad gelegt, um sie dann glatt auf beschichtete Objektträger aufziehen zu können. Die Objektträger müssen dazu sauber und fettfrei sind. Die Beschichtung der Objektträger dient zur besseren Haftung der Gewebeschnitte, da sie durch die Beschichtung adhäsiver sind und somit ein Abschwimmen der Schnitte durch die nachfolgenden immunhistochemischen Färbeprozesse verhindert wird. Abschließend werden die aufgezogenen Schnitte über Nacht bei 37°C im Brutschrank getrocknet. Die Gewebeschnitte, die nicht direkt am nächsten Tag weiterbearbeitet bzw. gefärbt werden, werden für spätere immunhistologische Untersuchungen bei Raumtemperatur gelagert.

Expressionsanalyse-Schnitte

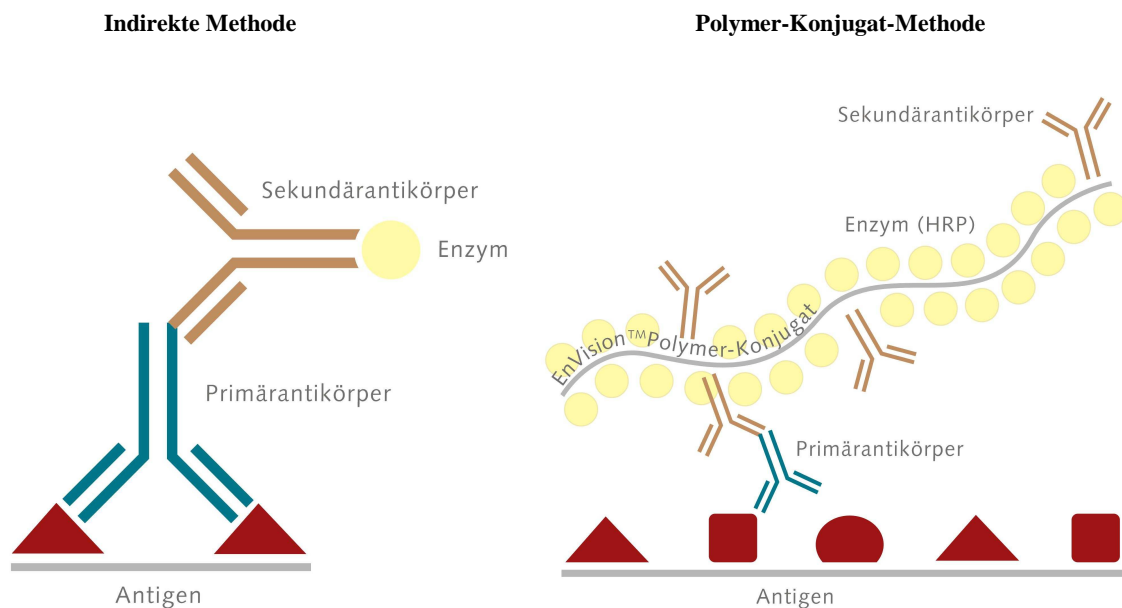
Zur quantitativen Expressionsanalyse werden von den in Paraffin eingebetteten Proben am Rotationsmikrotom Schnittpräparate mit einer Schnittdicke von 10 µm angefertigt. Die Anzahl der Schnittpräparate pro Probe hängt von der Größe der Gewebeprobe ab. Von kleinen Proben werden vier Schnitte gesammelt, von mittleren Proben zwei bis drei und von großen Proben nur ein Schnitt. Es ist darauf zu achten, alle Paraffin- und Gewebereste nach dem Schneiden einer Probe sorgfältig vom Mikrotom zu entfernen, um Kontaminationen in der nächsten Probe zu meiden. Die Schnitte einer Probe werden in 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

3.2.3 Immunhistochemische Färbung

3.2.3.1 Prinzip

Die Immunhistochemie ist eine methodische Vorgehensweise, welche den Nachweis spezifischer chemischer Verbindungen, insbesondere Peptide und Proteine mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion ermöglicht. In dieser Arbeit dient die Immunhistochemie zur Typisierung und Identifizierung von Zellen, die bestimmte Antigene exprimieren. Bei der Visualisierung der exprimierten Antikörper sind unterschiedliche Techniken bzw. Methoden bekannt. Das Funktionsprinzip ist jedoch bei allen Techniken gleich. Ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, welcher spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist, geht eine spezifische Bindung mit dem Epitop des nachzuweisenden Antigens ein und bleibt somit an dessen Strukturen im Gewebeschnitt haften. Es entsteht ein sogenannter Antigen-Antikörper-Komplex, welcher dann durch ein Detektionssystem sichtbar gemacht werden kann. Dies erfolgt durch Einsatz einer Markersubstanz auch Chromogen genannt, meist ein Enzym, welches an den Antikörper gekoppelt ist und bei Zugabe seines Substrats ein farbiges Reaktionsprodukt bildet. Die erzeugten Signale sind folglich nur im Bereich des Epitops bzw. an der Stelle im Gewebeschnitt, an der das gesuchte Antigen vorkommt, zu erkennen. In der vorliegenden Arbeit wird die indirekte Methode der immunhistochemischen Antikörper-Färbung angewandt (siehe Abb.4). Dabei wird im ersten Schritt ein unmarkierter Antikörper, der sogenannte Primärantikörper auf den Gewebeschnitt aufgetragen. Er bindet an das darzustellende Antigen im Gewebe. In einem zweiten Schritt wird ein zweiter Antikörper, der Sekundärantikörper, eingesetzt. Dieser bindet den Primärantikörper und ist an ein Enzym gekoppelt, welches durch Zugabe seines Substrats ein farbiges Reaktionsprodukt bildet und somit die Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar macht. Durch den Einsatz eines Sekundärantikörpers kommt es zur Signalverstärkung, da mehr Enzymmoleküle am Ort des Antigens binden können. In dieser Arbeit wird die indirekte Methode mit der Technik der Polymerkonjugat-Methode angewandt (siehe Abb.4). Dabei wird im ersten Schritt der Primärantikörper zugegeben. Im zweiten Schritt folgt dann ein enzym- und antikörpermarkiertes Dextranpolymer, in unserem Fall das EnVision™-Polymer, welches im Durchschnitt aus 10 Molekülen Sekundärantikörper und 70 Enzymmolekülen besteht. Eine weitere Zugabe eines Sekundärantikörpers und eines Markerenzym ist somit also nicht notwendig, da diese bereits an den Dextran-Komplex gebunden sind.

Neben der genannten Polymerkonjugat-Methode gibt es noch weitere Techniken der indirekten Antikörperfärbung, auf die nachfolgend aber nicht weiter eingegangen wird, da sie bei den vorliegenden Untersuchungen nicht angewendet wurden. Grundsätzliches Gegenstück der indirekten Methode stellt die direkte Methode dar, bei der ein direkt markierter Antikörper mit dem Antigen im Gewebe reagiert. Diese Methode ist zwar sehr spezifisch, liefert jedoch schwächere Signale und ist für die nachfolgenden Untersuchungen in dieser Arbeit nicht optimal.



Quelle: Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden 3. Auflage, DAKO

Abbildung 4: Indirekte Methode und Polymer-Konjugat-Methode der Immunhistochemie

Bei der indirekten Methode bindet der Primärantikörper an das Antigen, die Detektion erfolgt durch Bildung eines markierten Sekundärantikörpers an den Antigen-Primärantikörperkomplex. Bei der Polymer-Konjugat-Methode sind die Sekundärantikörper an eine Kette von Polymer-Konjugaten gekoppelt, was zu einer Signalverstärkung führt.

3.2.3.2 Durchführung

Deparaffinieren und Rehydrieren

Zunächst wird das Paraffin in den Gewebeschnitten durch drei Xylolbäder von jeweils 2 min entfernt, um später unspezifische Hintergrundfärbungen bzw. ein Überdecken der spezifischen Anfärbungen zu vermeiden. Danach werden die Schnitte durch eine Alkoholreihe absteigender Konzentration wieder in die wässrige Phase überführt. Jeweils zwei Minuten werden die Schnitte in den unterschiedlich konzentrierten Alkoholbädern rehydriert. Das absolute Alkoholbad müssen die Proben zweimal durchlaufen, das 90%ige, 80%ige und 70%ige Alkoholbad einmal. Eine ständige Bewegung der Proben während der Inkubation trägt zu einem besseren Ergebnis bei. Zum Schluss werden die Proben in Aqua dest. überführt

Blockieren der endogenen Peroxidase

Um zu verhindern, dass das später verwendete Chromogen für das Enzym der Meerrettichperoxidase (siehe 2.8, Unterpunkt 5) mit der im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidase reagiert, muss diese zunächst blockiert bzw. inaktiviert werden. Dieser Schritt beruht auf dem Prinzip der Substrathemmung und eine mögliche unspezifische und unerwünschte Hintergrundfärbung wird damit reduziert. Die Proben werden dazu 10 min bei RT in einer 0,5%ige Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung inkubiert und danach mehrmals in Aqua dest gespült.

Antigen-Demaskierung (hitzeinduziertes Epitop-Retrieval)

Die durch die Formalinfixierung entstandenen chemischen Quervernetzungen bzw. Aldehydvernetzungen sowohl innerhalb der Proteine als auch zwischen verschiedenen Proteinen verhindern ein adäquates Färbeergebnis. Sie maskieren die zu detektierenden Antigene bzw. deren Epitope und verändern sie in ihrer räumlichen Struktur soweit, dass ein teilweiser oder vollständiger Immunreaktivitätsverlust entsteht. Diese Bindungen müssen folglich aufgebrochen und beseitigt werden. Durch die Inkubation der Gewebeschnitte in einer kochenden Pufferlösung kann die veränderte Epitopstruktur teilweise wiederhergestellt bzw. „renaturiert“ und somit die entstandene Immunreaktivität wiedergegeben werden. Dies trägt dann später zur Entstehung einer besseren Antigen-Antikörper-Bindung bei.

In den vorliegenden Experimenten wurden wässrige Lösungen, Pufferlösungen, auch als „Retrieval-Lösung“ bezeichnet, mit unterschiedlichen pH-Werten verwendet. Entsprechende Demaskierungspuffer, abhängig vom später verwendeten Antikörper (siehe Tabelle 4) werden in einem Dampfgarer 20 min bis auf 100°C erhitzt. Nach dem Vorwärmen werden die Gewebeschnitte vom Aqua dest. in den heißen Puffer überführt und je nach pH-Wert des verwendeten Puffers bei ca. 100°C gekocht. Demaskierungspuffer mit einem pH-Wert von 6,1 werden zusammen mit den Gewebeschnitten 30 min erhitzt, die Proben im Puffer mit einem pH-Wert von 9,0 nur 15 min. Danach werden die Gewebeschnitte samt Demaskierungslösung aus dem Dampfgarer genommen und bei RT mindestens 30 min abgekühlt. Anschließend werden die Proben mehrmals in Aqua dest. gespült und in den Waschpuffer überführt.

Tabelle 3: Übersicht über die eingesetzten Antikörper

Antikörper	Demaskierungs- puffer	Konzentration/ Verdünnung	Inkubation des Antikörpers	Inkubation mit EnVision™ FLEX	Inkubation mit EnVision™
CD3	pH 9,0	2 µg/ml	½ h bei RT	-	½ h bei RT
PD-1	pH 6,1	10 µg/ml	über Nacht bei 4°C	-	½ h bei RT
FOXP-3	pH 9,0	2,5 µg/ml	1 h bei RT	10 min bei RT	½ h bei RT
CD68	pH 9,0	0,1 µg/ml	½ h bei RT	-	½ h bei RT
CD163	pH 6,1	1:400	1 h bei RT	10 min bei RT	½ h bei RT
Ki-67	pH 6,1	0,26 µg/ml	½ h bei RT	-	½ h bei RT

Antikörper-Inkubation

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten werden auf Coverplates aufgetragen, in die Coverplate-Halterung gesteckt und anschließend einmal mit Waschpuffer gespült, um die korrekte Positionierung des Objektträgers auf dem Coverplate zu überprüfen und somit den gewünschten Kapillareffekt zu erzielen. Ist dies der Fall, durchläuft der Waschpuffer nur mit geringer Geschwindigkeit die Probe.

Der Einschluss von Luftblasen wird beim Aufbringen der Objektträger möglichst vermieden, da sonst später im Gewebeschnitt eine heterogene Färbung auftritt. Nun können die mit Antikörper-Substrat verdünnten Antikörper (siehe Tabelle 3) auf die Proben gegeben werden. Jeweils 100µl werden auf die Coverplateöffnungen pipettiert und die Proben je nach verwendetem Antikörper, unterschiedlich lang und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (siehe Tabelle 3). Der polyklonale Antikörper tritt nun im Gegensatz zu den monoklonalen Antikörpern mit mehreren Epitopen auf den Gewebeschnitten in Reaktion. Nach der Inkubationszeit werden die Proben jeweils dreimal mit Waschpuffer im Coverplate gespült.

Detektion des Antikörpers

Die Detektion des Antikörpers erfolgt nach der Inkubation mit dem entsprechenden Antikörper durch Zugabe des Dextrankomplexes in Form der EnVision™-Lösung. Diese enthält neben dem Sekundärantikörper auch das Markerenzym, hier die sogenannte Meerrettichperoxidase, kurz HRP, welche an die Sekundärantikörper gebunden ist. Dieser bindet nach Zugabe der EnVision™-Lösung den Primärantikörper, welcher bereits am Gewebeschnitt haftet. Jeweils 100µl werden in die Coverplates pipettiert und die Gewebeschnitte 30-60 min, je nachdem welcher Antikörper verwendet wurde, bei RT inkubiert (siehe Tabelle 3). Bei einigen Antikörperfärbungen ist es notwendig vor der Inkubation der EnVision™-Lösung einen zusätzlichen Schritt einzufügen, welcher die Detektion des bereits gebundenen Antikörpers nochmals verstärkt. Bei der dazu verwendeten EnVision™ FLEX+ Lösung handelt es sich um einen „Linker“, welcher die Bindung von mehreren Dextranpolymeren der später aufgetragenen EnVision™-Lösung an den bereits gebundenen primären monoklonalen Mausantikörper ermöglicht. Es kommt dadurch zu einer weiteren Signalverstärkung. Nachdem die Proben mit dem EnVision™ FLEX+ Linker und der EnVision™-Lösung inkubiert wurden, erfolgen wieder drei Spülschritte mit Waschpuffer. Danach wird den Proben das Chromogen-Substrat für HRP, hier in Form der sogenannten DAB-Substrat-Lösung zur Farbkonversion bzw. Farbstoffbildung hinzugefügt. Das DAB wird dazu 1:50 mit dem Substrat verdünnt. Jeweils 100µl der Lösung werden in die Coverplates gegeben und die Proben 10 min bei RT inkubiert. Durch das Enzym HRP wird das Substrat zu einem farbigen Niederschlag umgesetzt und somit sämtliche Strukturen im Schnitt, an die der Primärantikörper ursprünglich gebunden hat, sichtbar. Durch eine eisenhaltige Hämgruppe, das sogenannte Hämatin im aktiven Zentrum der Meerrettichperoxidase wird das DAB in ein braunes, in organischen Lösungen stabiles Reaktionsprodukt oxidiert.

Durch eine nachfolgende kurze Inkubation der Gewebeschnitte von 1 min in einer 2%igen Kupfersulfatlösung kommt es zu einer Verstärkung der optischen Dichte des polymerisierten DAB. Davor müssen die Proben jedoch aus den Coverplate-Halterungen genommen und gründlich in Aqua dest. gespült werden. Auch nach dem Tönen mit der Kupfersulfatlösung sind mehrere Waschschrte mit Aqua dest. notwendig.

Gegenfärbung der Proben mit Hämatoxylin

Um sich bei der späteren mikroskopischen Auswertung im Gewebe orientieren zu können, werden die Zellkerne der Gewebeschnitte nach der Antikörperdetektion in einer anderen Farbe gegengefärbt. Bei der vorliegenden spezifischen braunen Färbung durch DAB eignet sich der blaue Farbstoff Hämatoxylin als unspezifische Hintergrundfärbung. Die Proben werden 2 min im wässrigen Hämatoxylin gefärbt und danach kurz mit Aqua dest. gespült. Der niedrige pH-Wert der Färbelösung erzeugt zunächst eine rötlich bis braune Färbung der Kerne, welche sich als Gegenfärbung zum braunen DAB schlecht eignet. Durch eine kurze Inkubation von 1 min im Bläuungsreagenz mit einem höheren pH-Wert erhalten die Kerne eine bläulich violette Färbung. Sie unterscheiden sich farblich gut von den braunen immunhistochemisch gefärbten Zellen. Die Gewebeschnitte werden danach noch einmal kurz im Aqua dest gespült und jeweils 2 min in 70%, 80%, 90% und 100% Alkohol dehydriert. Die Inkubation in 100%igem Alkohol erfolgt dabei zweimal. Zum Auswaschen des Alkohols werden die Proben dann dreimal jeweils 2 min in Xylol geschwenkt.

Eindeckeln der Objektträger und Mikroskopische Kontrolle

Nach der Gegenfärbung der Paraffinschnitte werden diese zur Konservierung und zur leichteren mikroskopischen Analyse mit Entellan, einem Medium, welches an der Luft aushärtet, und sogenannten Deckgläsern eingedeckelt. Nachdem die Objektträger kurz bei Raumtemperatur getrocknet sind, wird unter dem Lichtmikroskop kontrolliert, ob die immunhistochemische Färbung erfolgreich war. Auch auf die Sensitivität der Antikörperfärbung sowie auf schlechte Entwässerung oder schlechte Eindeckung des Schnittes wird geachtet und die Färbung gegebenenfalls wiederholt.

3.2.3.3 Auswertung und Interpretation der immunhistochemisch gefärbten Proben

CD3, PD-1, FOXP-3, CD68 und CD163

Zur Bewertung der Aktivität der eigens induzierten Immunantwort der Tumorzellen wird der Anteil positiv gefärbter Zellen an der Gesamtzahl der Zellen eines bestimmten Gewebeausschnittes ermittelt. Dies erfolgt lichtmikroskopisch nach semi-quantitativen Gesichtspunkten. Dabei werden je Gewebeschnitt mit 200x Originalvergrößerung 10 Gesichtsfelder eingestellt und die Menge der gefärbten Zellen semi-quantitativ bewertet. Anschließend wird aus den ermittelten Werten der einzelnen Bildausschnitte der Mittelwert gebildet, der für die gesamte Probe ausschlaggebend ist. Bei durchschnittlich 0-5% positiven Zellen pro Gesichtsfeld wird die Probe mit der Bewertung „0“ versehen und in die Kategorie „negativ“ eingestuft. Proben, welche im Mittel 6-15% positive Zellen aufweisen, werden als „(+“ bezeichnet, Proben mit 16-30% positiven Zellen als „+“. Alle Proben, welche den Bewertungspunkt „(+“ oder „+“ erhalten, werden zur einfacheren Darstellung unter der Kategorie „geringe Häufigkeit positiver Zellen“ zusammengefasst. Bei einer durchschnittlichen Positivität von 31-70% erhalten die Proben den Bewertungspunkt „++“. Sind mehr als 71% der Zellen einer Probe positiv so werden sie als „+++“ bewertet. Die beiden letzteren Bewertungspunkte werden unter der Kategorie „hohe Häufigkeit positiver Zellen“ zusammengefasst.

Tabelle 4: Semi-quantitative Bewertungskriterien

Positive Zellen/Gesichtsfeld	Bewertungspunkt	Bewertungskategorie
0-5%	0	negativ
6-15%	(+)	geringe Häufigkeit positiver Zellen
16-30%	+	
31-70%	++	hohe Häufigkeit positiver Zellen
71-100%	+++	

Ki-67

Die Auswertung der Ki-67 positiven Zellen erfolgt bei allen Proben quantitativ. Dazu werden zunächst pro Probe fünf Bildausschnitte mit 400x Originalvergrößerung fotografiert. Über das Programm ImageJ können die Bilder geöffnet werden und mittels eines speziellen Plug-In werden die gefärbten, Ki-67 positiven Kerne automatisch erkannt und quantifiziert (Kim et al., 2006). Die Gesamtzahl der Zellen, sowie die Anzahl positiver Zellen pro Bildausschnitt werden automatisch ermittelt und als Tabelle ausgegeben. Der Ki-67-Index einer Probe wird als Mittelwert der positiven Kerne aus allen fünf Bildausschnitten angegeben. Aus allen Proben einer Tumorentität wird dann wiederum der Durchschnitt für die jeweilige Entität berechnet.

3.2.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Bei der indirekten Immunfluoreszenz handelt es sich um eine Methode zur Detektion vorhandener Antigene im Gewebe mittels fluoreszenter Moleküle. Es wird dazu zunächst ein Primärantikörper auf das Gewebe gegeben, welcher spezifisch das zu detektierende Antigen bindet und es entsteht ein Antigen-Antikörper-Komplex. In einem weiteren Schritt wird dann der Sekundärantikörper aufgetragen, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist und selbst an ein fluoreszierendes Molekül gekoppelt ist. Es entsteht folglich ein fluoreszentes Signal am Antigen-Antikörper-Komplex, welches mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann.

Durchführung:

Die Gewebeschnitte werden zunächst wie auch unter 2.9 beschrieben deparaffinisiert und rehydriert. Danach findet die hitzeinduzierte Antigen-Demaskierung je nach verwendetem Antikörper in unterschiedlichen Puffern statt (siehe 2.9 und Tab.4).

Die Schnitte werden nach dem Abkühlen auf die Coverplates aufgetragen und mit Waschpuffer gespült. Es werden 100 µl 5% Normalserum/PBS aus Ziege zu jeder Probe gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dies dient zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen im Gewebe, welche später somit nicht mehr vom Sekundärantikörper gebunden werden können. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher mit 5% Normalserum/PBS zur Endkonzentration verdünnt wird. Die folgende Tabelle gibt Konzentration, sowie Inkubationszeiten der verwendeten Primärantikörper an.

Tabelle 5: Konzentrationen und Inkubationszeiten der zur indirekten Immunfluoreszenz verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

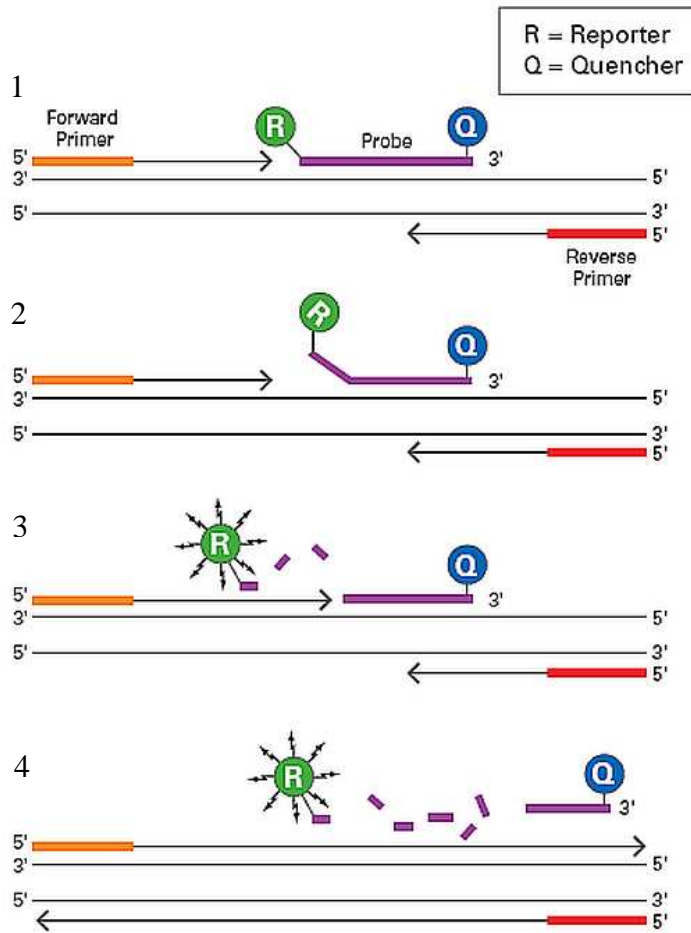
Antikörper	Konzentration/ Verdünnung	Inkubation des Antikörpers
CD3	2 µg/ml	½ h bei RT
CD20	2 µg/ml	½ h bei RT
CD25	1:50	über Nacht bei 4°C
FOXP-3	2,5 µg/ml	1h bei RT
PD-1	10 µg/ml	über Nacht bei 4°C
Anti-Maus FITC-gekoppelt	7,5 µg/ml	1 h RT lichtgeschützt
Anti-Kaninchen Texas Red-gekoppelt	5 µg/ml	1 h RT lichtgeschützt
Fab Anti-Maus Rhodamin Red-gekoppelt	8,5 µg/ml	1 h RT lichtgeschützt

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper werden die Proben in den Coverplates dreimal mit Waschpuffer gespült, bevor der Sekundärantikörper aufgetragen wird. Dieser wird vorher gemäß Tabelle 5 mit 5% Normalserum/PBS verdünnt und lichtgeschützt aufbewahrt, um die Fluoreszenzintensität zu erhalten. Bei allen verwendeten Sekundärantikörpern beträgt die Inkubationszeit auf der Probe 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt. Danach wird dreimal mit Waschpuffer gespült, ebenfalls lichtgeschützt. Die Färbung ist nun abgeschlossen und die Proben können eingedeckelt werden. Dies erfolgt mit dem wässrigen Eindeckmedium Aquatex. Bevor die Proben mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden können ohne die Fluoreszenzintensität zu mindern, müssen sie über Nacht bei 4°C aushärten.

3.2.5 Quantitative Genexpressionsanalyse mittels TaqMan-Real-Time-PCR

3.2.5.1 Prinzip

In den folgenden Experimenten wird die TaqMan-Real-Time-PCR, eine Methode von Lee et al. (1993) bei der Firma Applied Biosystems etabliert, verwendet, um die Genexpression von PD-1 und CD163 zu quantifizieren. Das Prinzip der Methode beruht auf der Polymerase Kettenreaktion (PCR), bei welcher zusätzlich zu Desoxyribonukleinphosphaten (dNTPs), dem Primerpaar und der Taq-Polymerase, ein Überschuss fluoreszierender Sonden zugesetzt wird. Die Sonden, sequenzspezifische Oligonukleotide, welche zwischen den beiden Primern an das Zielgen binden, sind jeweils am 5'-Ende an einen „Reporter“ und am 3'-Ende an einen „Quencher“ gekoppelt. Der „Reporter“ besteht aus einem Fluorescein-Derivat, der „Quencher“ ist nicht fluoreszierend. Bei der Anregung der intakten Sonde mit einer Wellenlänge von 488 nm fluoresziert der Reporter nicht, da durch die räumliche Nähe zum „Quencher“ ein Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt wird. Bei der angewandten Methode wird das Prinzip der generellen PCR angewandt: Zunächst wird der Reaktionsansatz erhitzt, die doppelsträngige DNA wird aufgetrennt. Im zweiten Schritt wird abgekühlt, damit die Primer spezifisch an den Matrizenstrang binden. Dann erfolgt die Elongation der Primer durch die Polymerase und die Nucleotide. Der DNA Abschnitt ist verlängert, der Zyklus abgeschlossen und ein neuer Zyklus kann beginnen. Bei der TaqMan-Real-Time-PCR bindet im zweiten Schritt des Amplifikationszyklus die Sonde zwischen den beiden Primern an den Matrizenstrang. Durch die Taq-Polymerase beginnt die Elongation an den Primern beginnend. Trifft die Taq-Polymerase dann auf die Sonde, wird diese vom Matrizenstrang verdrängt und es entsteht eine Sekundärstruktur, welche die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase aktiviert. Die vorher gebundene Sonde wird geschnitten und die räumliche Nähe des „Reporters“ zum „Quencher“ wird aufgehoben, die Emission des Fluorescein-Derivats des „Reporters“ kann gemessen werden. Somit erzeugen nur spezifisch hybridisierte Sonden und spezifisch gebundene Primer ein Fluorescein-Signal. Mit jedem Amplifikationszyklus der PCR steigt proportional zur Menge des Amplifikats auch die Menge an messbaren Fluorescein-„Reporter“-Signalen, wodurch sich die Menge an Amplifikat messen und somit quantifizieren lässt. Die Methode ist in Abbildung 5 grafisch dargestellt.



Quelle: *TaqMan Gene Expression Assay Protocol, APPLIED BIOSYSTEMS*

Abbildung 5: Prinzip der TaqMan- Real-Time-PCR Methode

1. Forward und Reverse Primer binden an die cDNA, die TaqMan Probe, konjugiert mit dem Reporter (R) und dem nicht fluoreszierenden Quencher (Q), bindet an den 3`-5`Strang im Bereich vor den Forward Primer. **2.** Die Elongation an beiden Primern beginnt bis der Forward Primer auf die gebundene TaqMan Probe trifft. **3.** Der Reporter wird durch die Polymerase verdrängt und mittels der 5`-3`-Exonukleaseaktivität abgespalten. Durch die nun entstandene räumliche Entfernung zum Quencher beginnt der Reporter zu fluoreszieren. **4.** Durch weitere Elongation wird auch die TaqMan Probe vom Matrizenstrang verdrängt abgebaut. Es ist eine komplette Kopie der ursprünglichen cDNA angefertigt worden.

3.2.5.2 Durchführung

Isolation der Gesamt-RNA aus Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebetteten Gewebe und Messung der RNA-Konzentration

Die Gesamt-RNA aus den Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Proben erfolgt über das „RNeasy FFPE Kit“ der Firma Qiagen nach dem dort beigefügten Protokoll. Die Proben werden zunächst in mehreren Schritten deparaffiniert, danach wird mittels Proteinase K das Gewebe verdaut. Durch einen folgenden DNase Verdau wird die Gesamt DNA der Probe abgebaut und sollte später nicht mehr detektierbar sein. Die Isolation der RNA erfolgt dann über eine Säule mit einer speziellen Membran, welche die RNA zunächst bindet. Nach mehreren Waschschrritten wird die RNA dann abhängig von der Probengröße in 15 µl bzw. 30µl Aqua_{dest} eluiert. Genaue Angaben zur Methode sind im Protokoll des Kits nachzulesen (<http://www.qiagen.com/literature/>). Die Messung der Gesamt-RNA Konzentration werden mittels des NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 durchgeführt. Jeweils 1 µl jeder Proben werden in das Gerät pipettiert und die Gesamt-RNA-Konzentration, sowie Reinheitsgrad jeder Probe werden gemessen. Danach werden die Proben bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Synthese von cDNA mittels reverser Transkriptase

Die gewonnene Gesamt-RNA aller Proben wird auf Eis aufgetaut und mittels des „High capacity cDNA reverse Transcription Kit“ von Applied Biosystems wird die RNA mittels reverser Transkriptase und einem Mix aus Desoxyribonukleotiden in cDNA umgeschrieben. Bis zu 2 ng RNA können in die Reaktion eingesetzt werden. Aus der zuvor bestimmten Konzentration der Gesamt-RNA kann dann bei jeder Probe die einzusetzende Menge in µl berechnet werden. Eine maximale Menge von 9 µl RNA sollte jedoch nicht überschritten werden. Bei sehr kleinen Proben, mit niedriger RNA-Konzentration können deutlich weniger als 2 ng eingesetzt werden. Das genaue Protokoll zur Reaktion ist im Kit (<http://www.qiagen.com/literature/>) nachzulesen. Zur Überprüfung der reversen Transkription wird bei allen Proben nach der Reaktion die Konzentration an DNA mittels des NanaDrop Spectrophotometers ND-1000 gemessen. Bei erfolgreicher reversen Transkription sollten alle Proben eine DNA-Konzentration im Bereich von 2000 ng/ml besitzen. Die Proben werden bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

Präamplifikation

Die Präamplifikation wird bei kleinen cDNA Konzentrationen eingesetzt und dient dazu mittels einer PCR Reaktion die Menge an Zielgen-cDNA zu erhöhen. Dadurch wird die Detektion der Zielgenexpression in der später angewendeten TaqMan verbessert. Für die Präamplifikation der Zielgene wird das „TaqMan PreAmp Master Mix Kit“ von Applied Biosystems verwendet. Der enthaltene Mastermix enthält neben der Polymerase auch die Nukleotide zur Amplifikation der Zielgene. Die Primer, die zur Amplifikation der Zielgene PD-1, CD163 und der endogenen Kontrolle TBP benötigt werden, sind in den jeweiligen „TaqMan 20x Gene Assays“ enthalten. Für die Präamplifikation wird ein Pool aus allen drei Assays in einer Endkonzentration von 0,2x benötigt. Die Assays werden dazu mit 1x TE-Puffer verdünnt. In einen Präamplifikationsansatz von 25 µl wird 1 µl cDNA hinzugegeben, was einer ungefähren Menge von 2 ng cDNA entspricht.

Ansatz Präamplifikation:

- 12,5 µl TaqMan PreAmp Master Mix
- 6,25 µl der gepoolten Assays
- 1 µl cDNA
- 5,25 µl Wasser (LiChrsolv)

PCR-Programm:

- 95°C 10 min
- 10 Zyklen 95°C 15 sec
- 60°C 4 min
- 4°C ∞

Nach der Präamplifikation werden die Proben 1:5 verdünnt und bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

TaqMan-Real-Time-PCR für die quantitative Expressionsanalyse von PD-1 und CD163

Zur quantitativen Expressionsanalyse mittels TaqMan-Real-Time-PCR werden die Proben zusammen mit den TaqMan Gene Expression Assays (Primern) und dem TaqMan Gene Expression Master Mix Kit in eine 96-well Platte pipettiert. Für jede Probe wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Platten werden mittels einer adhäsiven Folie versiegelt und kurz abzentrifugiert. Anschließend wird die Platte in das Real-Time PCR Gerät 7900HT von Applied Biosystems eingestellt und mittels der Software 7900HT Version 2.3 gemessen.

Pipettierschema für einen Reaktionsansatz von 20 µl zur TaqMan-Real-Time-PCR:

- 10 µl TaqMan Gene Expression Master Mix Kit
- 1 µl TaqMan Gene Expression Assay (PD-1, CD163 oder TBP)
- 9 µl präamplifizierte cDNA

Programm der Real-Time PCR:

- 95°C 10 min
- 40 Zyklen 95°C 15 sek
- 60°C 1 min

3.2.5.3 Auswertung der TaqMan PCR und relative Quantifizierung

Die Messung der Proben erfolgt durch das 7900HT Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems, welches als Ergebnis eine Amplifikationskurve der PCR ausgibt (Abb.6). Diese setzt sich aus einer exponentiellen Phase und einer anschließenden Plateauphase zusammen. In der exponentiellen Phase erreicht die Fluoreszenzintensität einen bestimmten Schwellenwert, der vom Gerät gemessen wird. Der Schwellenwert wird so festgelegt, dass er die Amplifikationskurven der zu vergleichenden Proben in der exponentiellen Phase schneidet. Der PCR-Zyklus in dem dieser Schwellenwert überschritten wird, wird als Thresholdcycle (C_t) bezeichnet. Dieser C_t -Wert korreliert negativ mit der Zielgenkonzentration. Je höher also die Konzentration des Zielgens, desto niedriger ist die Anzahl der PCR Zyklen, welche notwendig war, um den Schwellenwert zu erreichen.

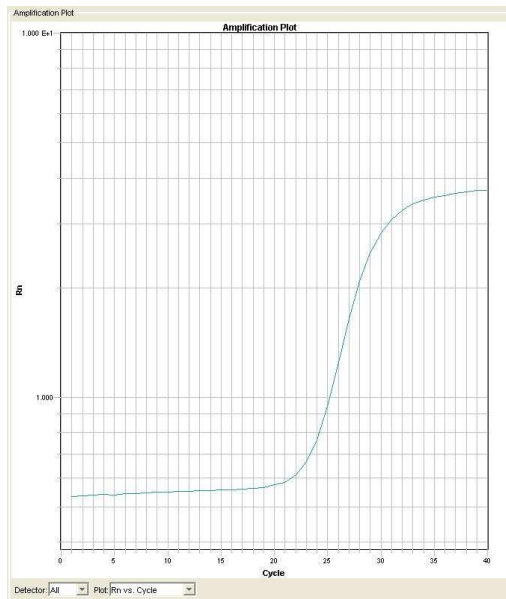


Abbildung 6: Amplifikationsplot

Beispiel eines Amplifikationsplots, wie er nach der PCR im 7900HT Real-Time PCR System ausgegeben wird. Auf der x-Achse ist die Anzahl der gelaufenen Zyklen gegen den R_n-Wert (Y-Achse) aufgetragen. Der R_n-Wert ist der Quotient der Emissionsintensitäten von Reporterfarbstoff und Referenzfarbstoff. Bis zum 20. Zyklus ist keine deutliche Zunahme der Fluoreszenz sichtbar, danach ist ein exponentieller Anstieg der Intensität bis zum 30. Zyklus erkennbar. Danach bleibt die Fluoreszenzintensität auf einem konstanten Niveau. Insgesamt werden 40 Zyklen durchlaufen

In der frühen Phase der PCR ändert sich das Fluoreszenzsignal nicht, dann wird das Hintergrundsignal ermittelt. Zusätzlich zur Fluoreszenz des Reportersignals, wird auch die Fluoreszenz eines Referenzfarbstoffs gemessen. Der schon bereits im TaqMan Master Mix vorhandene Referenzfarbstoff ROX (6-Carboxy-X-rhodamin) dient zum Abgleich möglicher sondenspezifischer Fluoreszenzunterschiede. Diese Schwankungen können unter anderem durch Pipettierfehler entstehen. Die Normalisierung wird durch die Bildung des Quotienten der Emissionsintensität des Reporterfarbstoffs und der Emissionsintensität des Referenzfarbstoffs vorgenommen (R_n-Wert) und auf der Y-Achse gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen (Abb.6). Neben der quantitativen Expression der Zielgene, wurde vergleichend auch die Expression einer endogene Kontrolle in diesem Gewebe untersucht. Dazu wurde das Haushaltsgen TATA-box binding protein (TBP) gewählt, welches nach Valente et al. (2009) das am besten geeignete Haushaltsgen bei der Expressionsanalyse in Hirngewebe darstellt. Eine untersuchte Probe wird als positiv für die Expression des Zielgens betrachtet, wenn für das Zielgen ein Ct-Wert ≤ 40 und ein Ct-Wert für das Haushaltsgen gemessen werden kann. Proben, welche nur eine Expression des Haushaltsgens aufweisen und keinen gültigen Ct-Wert für das Zielgen, werden als negativ für die Expression des Zielgens bezeichnet.

Lässt sich auch der Ct-Wert für das Haushaltsgen nicht detektieren, so wird die Probe als ungültig klassifiziert. Negative oder ungültige Proben werden nicht in die nachfolgende relative Quantifizierung miteinbezogen. Bei der Methode der relativen Quantifizierung wird ein relativer Mengenvergleich des Zielgens von neoplastischem Probenmaterial mit dem Normalgewebe hergestellt. Das Haushaltsgen dient dabei als Referenzgen, dessen Expressionsanalyse notwendig ist, um zum Beispiel Konzentrationsunterschiede im Ausgangsmaterial auszugleichen. Die Expressionsmenge des Zielgens im neoplastischen Gewebe wird in Abhängigkeit vom Normalgewebe dargestellt. Diese relative Quantifizierung der Expressionsanalyse kann aus den gewonnenen C_t -Werten wie folgt erstellt werden (Livak and Schmittgen, 2001):

$$C_t\text{-Wert (Zielgen, PD-1 oder CD163)} - C_t\text{-Wert (Haushaltsgen, TBP)} = \Delta C_t$$

$$\Delta C_t\text{-Wert (neoplastisches Gewebe)} - \Delta C_t\text{-Wert (Normalgewebe)} = \Delta\Delta C_t$$

Die Differenz von + oder – 1 eines Ct-Wertes entspricht dem zweifachen Unterschied in der cDNA Ausgangskonzentration. Die n-fache Expression x wird daher wie folgt berechnet:

$$X = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Der Wert 1 bedeutet, dass das Zielgen im neoplastischen und Normalgewebe gleich stark exprimiert wird. Werte > 1 , zeigen eine Erhöhung, Werte < 1 eine Erniedrigung der Zielgenexpression im neoplastischen Gewebe gegenüber dem Normalgewebe.

3.2.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen werden mittels des Statistikprogramms SPSS 17.0 durchgeführt. Die untersuchten Merkmale wurden entweder als qualitativ oder als quantitativ (stetig) klassifiziert. Die Expression der Marker PD-1, CD3, FOXP-3, CD68 und CD163 werden auf Grund der semiquantitativen Auswertung als qualitatives, also nicht stetiges Merkmal klassifiziert, ebenso wie WHO-Grad und Geschlecht der Patienten. Das Alter der Patienten, sowie der Ki-67-Index wurden als quantitative, stetige Merkmale eingestuft. Als statistischer Test für qualitative Werte wird der exakte Test nach Fischer verwendet. Bei gemischten Variablen (quantitativ und qualitativ) wird der Kruskal-Wallis Test angewendet und bei einem Vergleich rein quantitativer Werte wird eine bivariabile Korrelation nach Pearson durchgeführt. Alle p-Werte der Testergebnisse wurden auf zwei Nachkommastellen gerundet und eine Testsignifikanz von $p = 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Immunregulatorische Zellen im Normalgewebe des ZNS

Nicht pathologisch verändertes, nicht entzündliches oder reaktives Hirngewebe wurde als Normalgewebe des ZNS bezeichnet und als Referenz für die nachfolgenden Untersuchungen genutzt. In Abbildung 7A ist exemplarisch eine Normalgewebeprobe in einer HE-Färbung in 100x Originalvergrößerung dargestellt. Die Nervenzellen als auch die Astrozyten sind gleichmäßig verteilt und nicht reaktiv. Bei sechs Normalgewebeproben des ZNS wurden immunhistochemisch die T-Zellmarker CD3, PD-1, FOXP-3, sowie die Makrophagenmarker CD68 und CD163 gefärbt und semiquantitativ ausgewertet. Außerdem wurde der Ki-67-Index bestimmt. Dazu wurde der Proliferationsmarker Ki-67 gefärbt und quantitativ ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 exemplarisch dargestellt.

Bei der Hälfte der Normalgewebeproben traten CD3+ T-Zellen mit einer geringen Häufigkeit meist nur perikapillär auf. In drei weiteren Proben, konnten keine CD3+ T-Zellen identifiziert werden. In keiner der Proben konnten Zellen mit der Expression der regulatorischen Marker PD-1 oder FOXP-3 nachgewiesen werden (s.Abb.7D+E). Außerdem geht aus Abbildung 7F und G hervor, dass die Mikroglia positiv für CD68 (s.Abb7F roter Pfeil) war und vereinzelt CD68+ und CD163+ Makrophagen (s.Abb.7G schwarzer Pfeil) perikapillär auftraten. Bei allen fünf Proben kamen diese jedoch nur mit einer geringen Häufigkeit vor. Der Ki-67-Index, untersucht über die Expression von Ki-67, betrug im Mittel 0,4 %. Lediglich ganz vereinzelt traten proliferierende Lymphozyten im Bereich der Kapillaren auf.

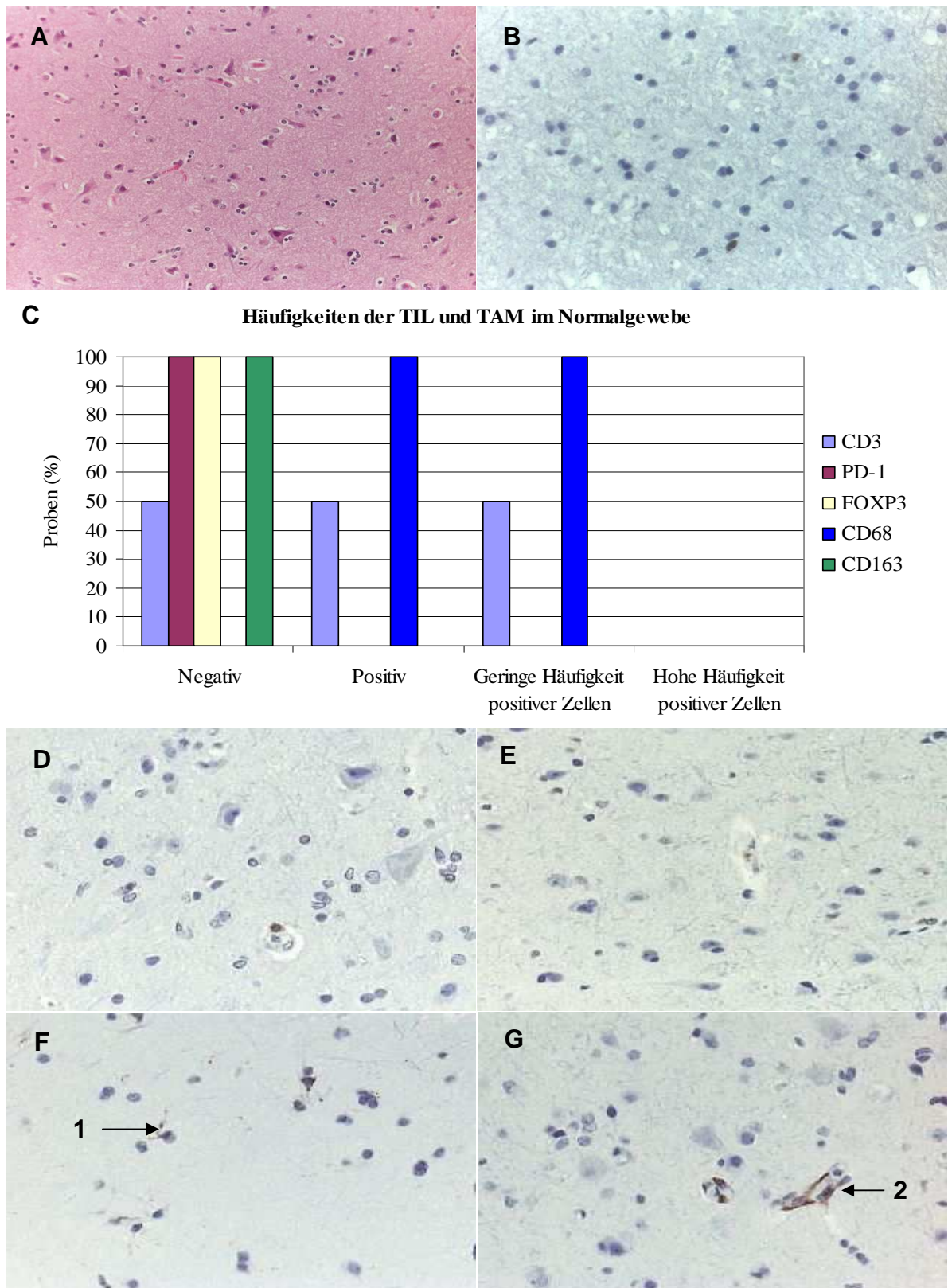


Abbildung 7: Immunregulatorische Zellen im Normalgewebe

Hämatoxylin-Eosin Färbung von Normalgewebe des ZNS (100x)(A). Der Ki-67-Index des Normalgewebes betrug im Mittel 0,4% (200x) (B). Häufigkeiten CD3+, PD-1+, FOXP-3+, CD68+ und CD163+ Zellen im Normalgewebe (C). **D-G:** Immunhistochemische Färbung von CD3, PD-1, CD68 und CD163 an Normalgewebe (200x): CD3 positive T-Zellen sind nur im Bereich der Kapillaren zu erkennen (D), PD-1+ T-Zellen sind nicht vorhanden (E). CD68 positive Mikroglia ist gleichmäßig verteilt (Pfeil 1) und CD68 (F), sowie CD163 (G) positive Makrophagen sind nur mit geringer Häufigkeit im Bereich der Kapillaren zu sehen (Pfeil 2).

4.2 Regulatorische T-Zellen und Makrophagen in Gliomen

4.2.1 Diffuse Astrozytome (WHO Grad II):

4.2.1.1 Charakteristik und Ki-67-Index

Die diffusen Astrozytome sind hirneigene Tumoren, da sie aus den Gliazellen, den Astrozyten entstehen. Wie der Name schon sagt, sind bei dieser Tumorentität die Tumorzellen im Hirngewebe diffus zerstreut (s.Abb.8A). Eine Abgrenzung dieses Tumors von normalem Hirngewebe ist nicht eindeutig möglich. Die diffusen Astrozytome können als fibrillärer Typ vorliegen, wobei hier die Tumorzellen wenig Zytoplasma aufweisen, das Gewebe aber stark mit Gliafasern durchsetzt ist (s.Abb.8B). Die gemistozytäre Variante besteht aus Tumorzellen mit stark vergrößertem Zytoplasma und teils mehreren exzentrisch gelegenen Kernen (s. Abb8B). Es wurde bei 29 diffusen Astrozytomen, darunter sowohl die fibrilläre als auch die gemistozytische Variante, der Ki-67-Index bestimmt. Durchschnittlich 3,6% der gesamten Zellen zeigten Ki-67 positive Kerne (s.Abb.8C).

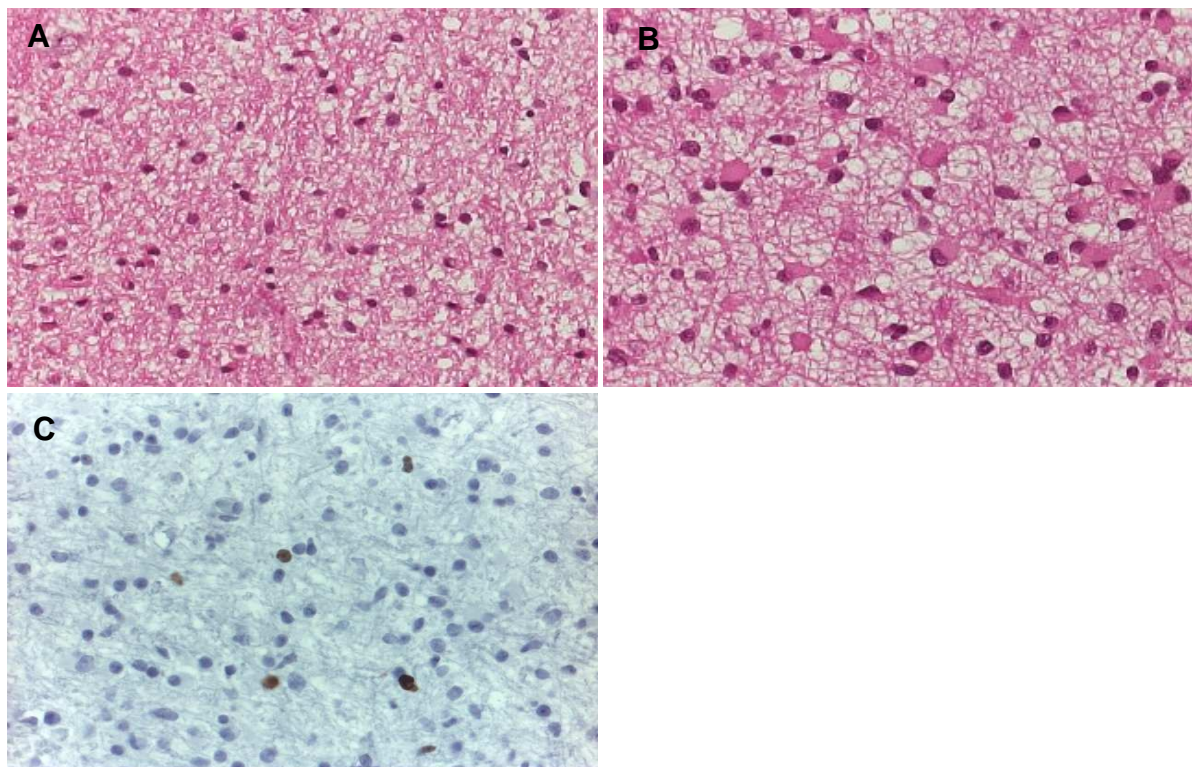


Abbildung 8: Diffuses Astrozytom

Hämatoxylin-Eosin Färbung eines diffusen Astrozytoms (200x) (A) sowie einer gemistozytischen Variante (200x) (B). Der Ki-67-Index wurde über die Ki-67-Expression bestimmt: Durchschnittlich 3,6% der Gesamtzellen exprimieren Ki-67 (200x) (C).

4.2.1.2 Regulatorische T-Zellen und Makrophagen

Das Auftreten immunreaktiver, regulatorischer T-Zellen wurde in den diffusen Astrozytomen untersucht und mit dem in Normalgewebe und in anderen Tumorentitäten verglichen. Die tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten (TIL) wurden mittels antiCD3-Antikörper markiert. Regulatorische Eigenschaften wurden mittels Anfärbung der Marker PD-1 und FOXP-3 untersucht. Das Vorkommen und die Häufigkeit positiver Zellen sind in Abbildung 9 dargestellt.

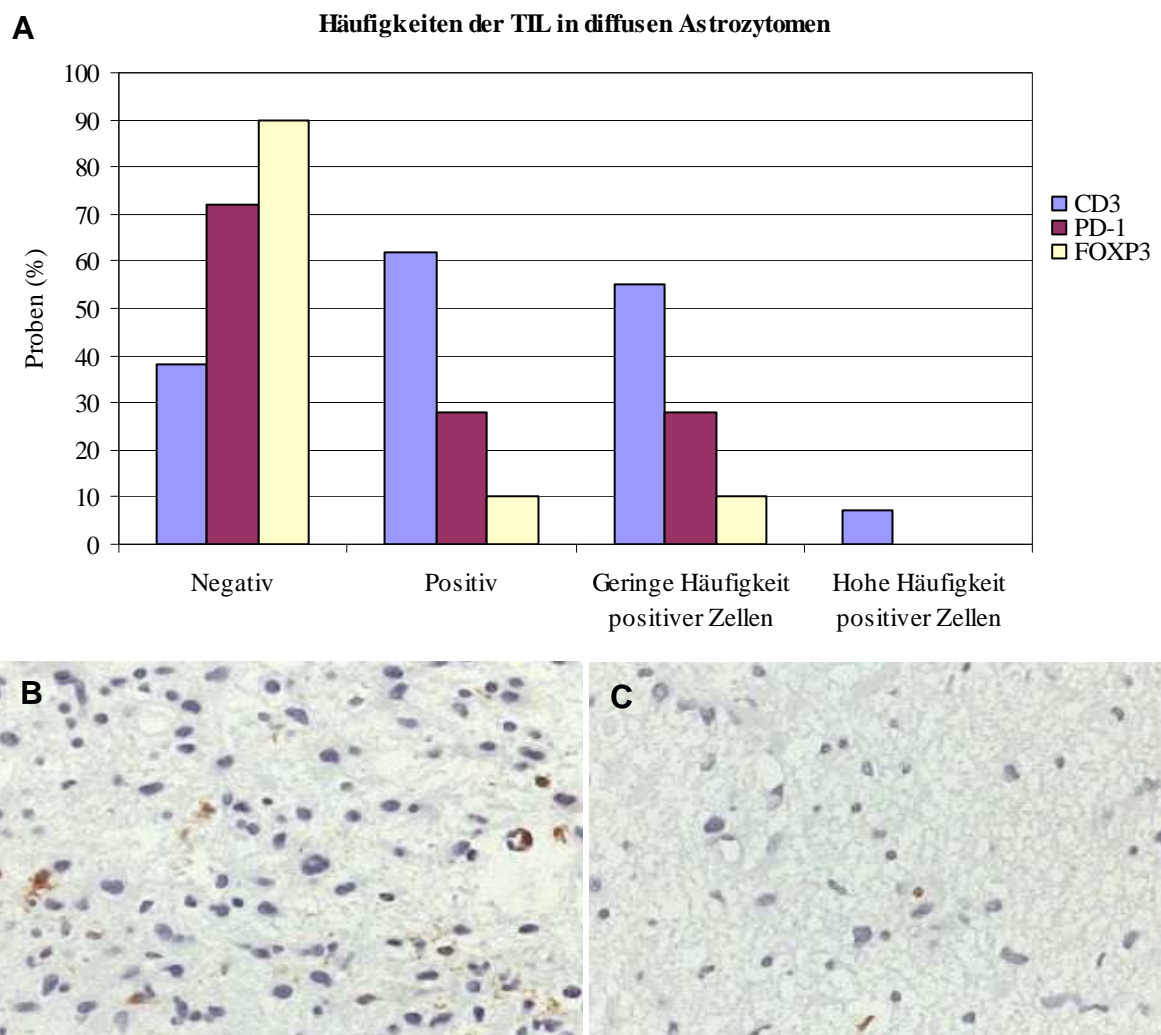


Abbildung 9: CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ TIL in diffusen Astrozytomen

A: Infiltration von CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ T-Zellen in 29 untersuchten diffusen Astrozytomen: In jeder Probe wurde die Häufigkeit CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ Zellen semiquantitativ bestimmt. **B+C:** Immunhistochemische Färbung von CD3 (**B**) und PD-1 (**C**): geringe Häufigkeit positiver Zellen im diffusen Astrozytom (200x).

In 38% der Proben waren keine CD3+ T-Zellen identifizierbar, in weiteren 55% war eine geringe Häufigkeit an T-Zellen erkennbar (s.Abb.9B) und bei nur zwei Proben konnte von einer hohen Häufigkeit gesprochen werden. Auch die Populationen PD-1 traten mit geringer Häufigkeit auf, nur 28% der Proben waren positiv für diese Zellen (s.Abb.9C). Generell war in jeder positiven Probe erkennbar, dass es ein Teil der CD3+ T-Zellen war, welche auch PD-1 exprimierten. Regulatorische FOXP-3+ T-Zellen waren in 10% der Proben mit geringer Häufigkeit nachweisbar, es konnte hier nicht eindeutig gesagt werden, ob es sich gleichzeitig auch um auch PD-1+ Zellen handelt. Sowohl die CD3+, als auch die PD-1+ und FOXP-3+ Zellen traten hauptsächlich perivascular auf. Statistisch unterschied sich das Auftreten dieser T-Zellpopulationen nicht mit dem im Normalgewebe ($p > 0,99$).

Über die Expression von CD68 wurde in den diffusen Astrozytomen auch die Population der Tumor-infiltrierenden Makrophagen und Mikroglia (TAM) identifiziert. Die Subpopulation regulatorischer Makrophagen wurde über die Expression von CD163 bestimmt. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung und der semiquantitativen Auswertung dargestellt. CD68+ Makrophagen waren in allen Proben vorhanden, in 76% der Proben traten sie mit hoher Häufigkeit auf. Die regulatorischen CD163+ Makrophagen waren in 16 von 29 Proben identifizierbar, allerdings mit einer geringen Häufigkeit. Nur bei 14% der Proben waren die CD163+ Zellen mit einer hohen Häufigkeit zu finden. Neben den Makrophagen war auch eine deutliche CD68 und CD163 Expression der Mikroglia erkennbar (s.Abb.10C, D).

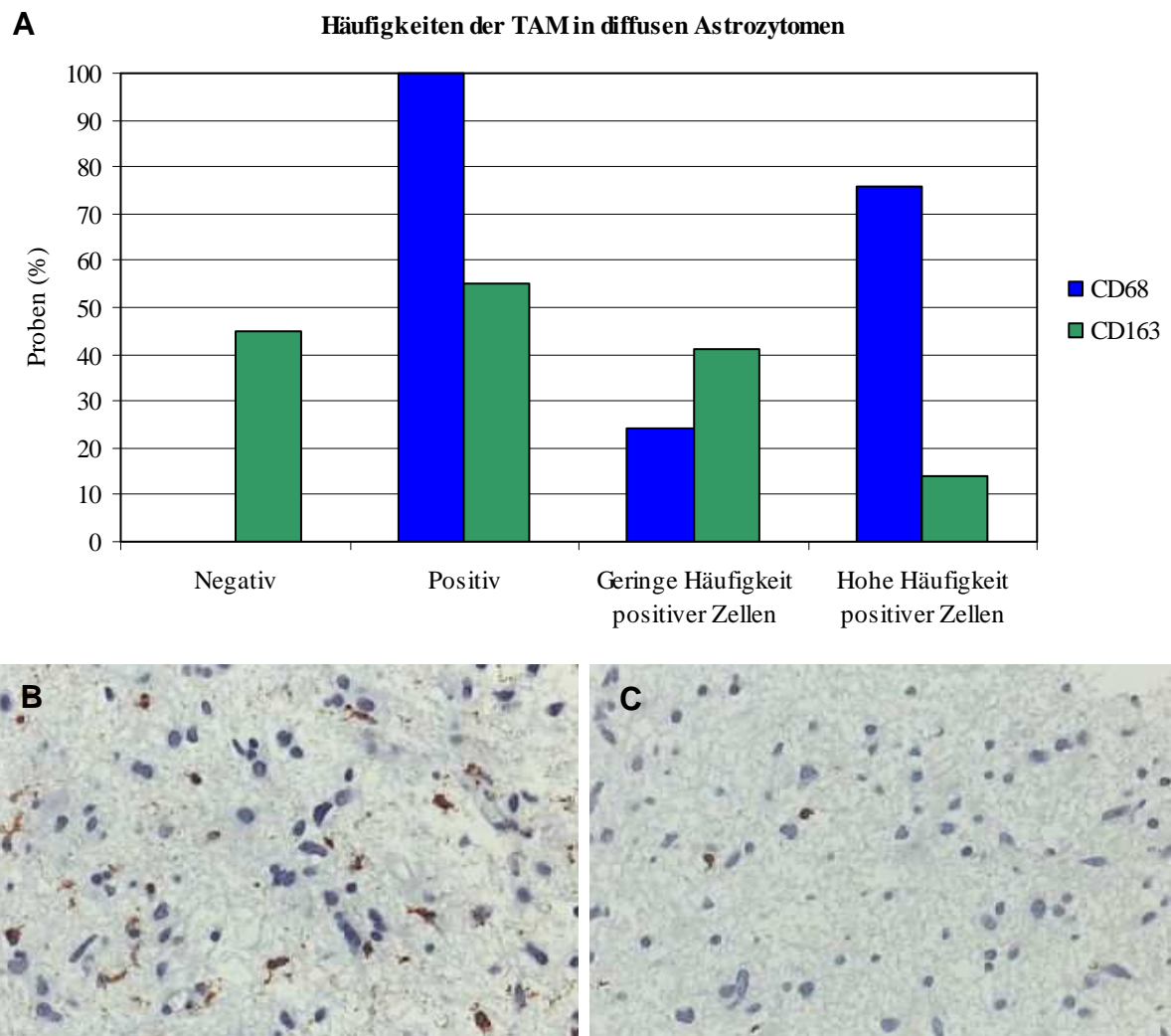


Abbildung 10: CD68+ und CD163+ TAM in diffusen Gliomen

A: Infiltration von CD68+ und CD163+ Makrophagen/Mikroglia in 29 untersuchten diffusen Astrozytomen: In jeder Probe wurde die Häufigkeit CD68+ und CD163+ Zellen semiquantitativ bestimmt.
B: Immunhistochemische Färbung von CD68: Hohe Häufigkeit positiver Zellen im diffusen Astrozytom (200x)
C: Immunhistochemische Färbung von CD163: geringe Häufigkeit positiver Zellen im diffusen Astrozytom (200x).

4.2.2 Anaplastische Astrozytome (WHO Grad III):

4.2.2.1 Charakteristik und Ki-67-Index

Die Transformation vom diffusen zum anaplastischen Astrozytom erfolgt eher fließend. Oftmals können einige Areale schon als anaplastische Variante bezeichnet werden, da die Zellen hier dichter liegen und deutlich vermehrt Kernteilungsfiguren aufweisen, während in anderen Bereichen noch die diffuse weniger maligne Variante des WHO Grades II vorliegt. In den folgenden Untersuchungen wurden daher nur Proben ausgewählt, welche eindeutig als anaplastisches Astrozytom identifiziert werden konnten. In Abbildung 11 ist in einer HE-Färbung das typische Bild eines solchen Tumors dargestellt. Die Zelldichte ist erhöht und es sind Kernteilungsfiguren erkennbar. Der Ki-67-Index der untersuchten anaplastischen Astrozytome, ermittelt über die Ki-67 Expression, betrug 9,8% (s.Abb.11D).

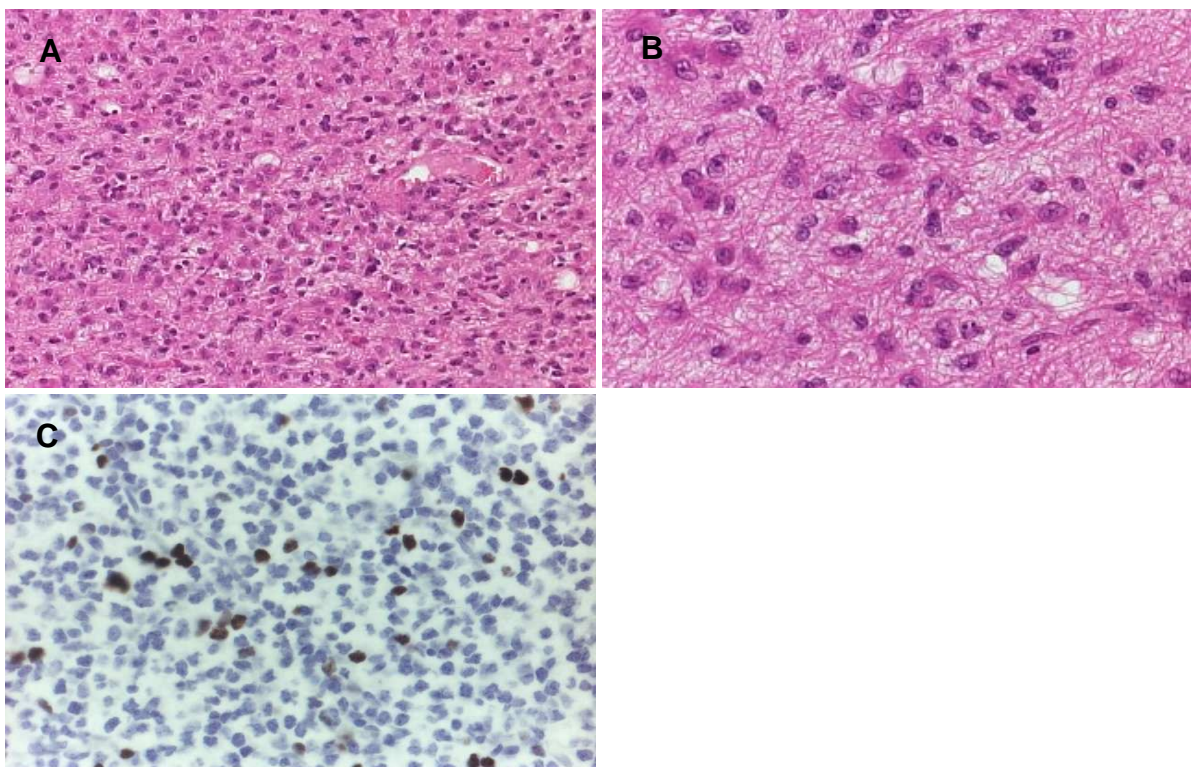


Abbildung 11: Anaplastisches Astrozytom

Hämatoxylin-Eosin Färbung eines anaplastischen Astrozytoms in 100x (A) und 200x Originalvergrößerung (B). Ki-67 Expression im anaplastischen Astrozytom: Ki-67 wird von 9,8% der Gesamtzellen exprimiert (200x) (D).

4.2.2.2 Regulatorische T-Zellen und Makrophagen

Es wurde die Expression der Marker CD3, PD-1 und FOXP-3 untersucht, um die tumorinfiltrierenden Lymphozyten in anaplastischen Astrozytomen zu charakterisieren. Dazu wurden 18 anaplastische Astrozytomproben immunhistochemisch gefärbt und semiquantitativ ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

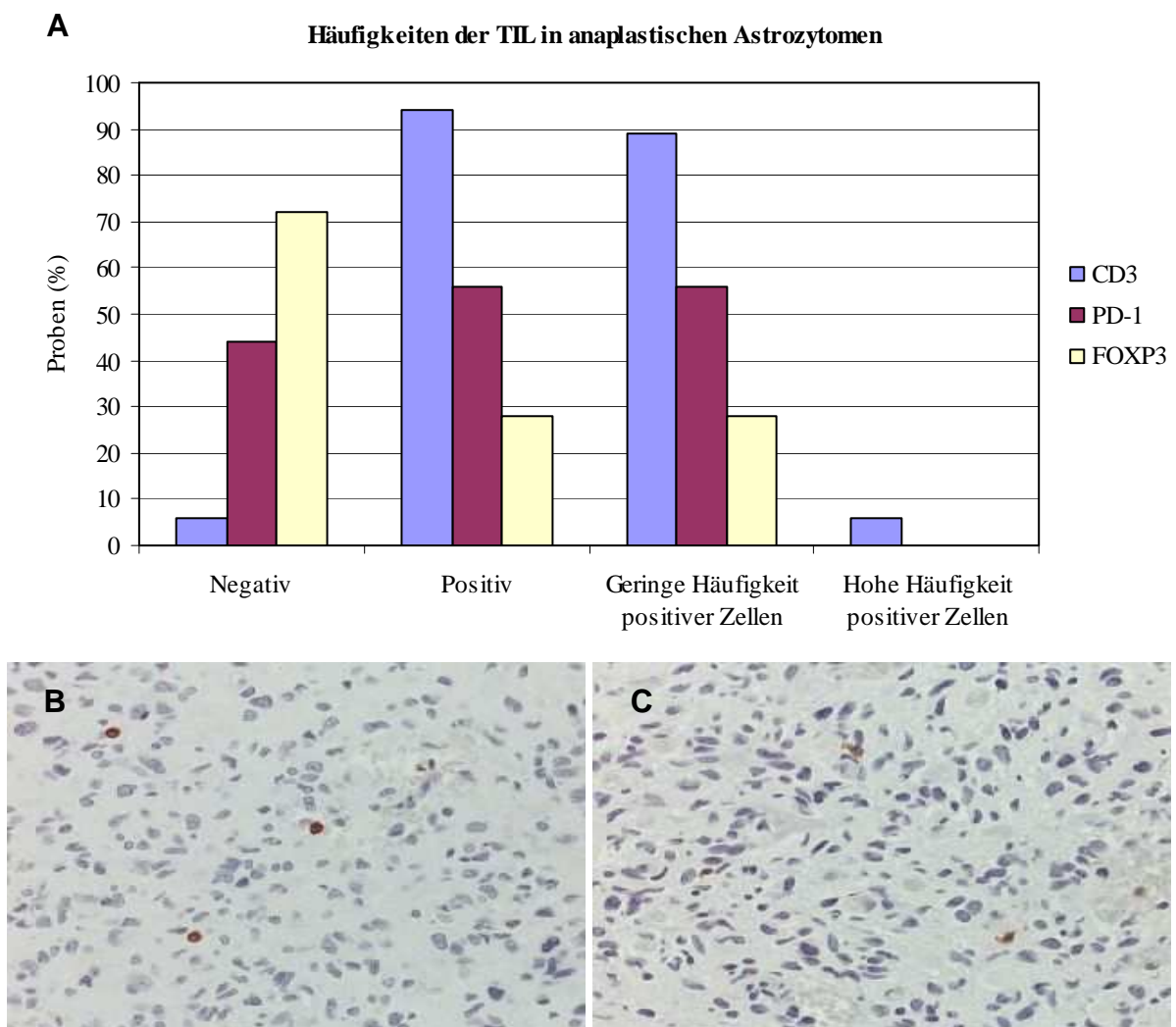


Abbildung 12: CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ TIL in anaplastischen Astrozytomen

A: Infiltration von CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ T-Zellen in 18 untersuchten anaplastischen Astrozytomen: In jeder Probe wurde die Häufigkeit CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ Zellen semiquantitativ bestimmt. **B+C:** Immunhistochemische Färbung von CD3 (**B**) und PD-1 (**C**): geringe Häufigkeit positiver Zellen im anaplastischen Astrozytom (200x).

Aus Abbildung 12 geht hervor, dass in fast allen Proben CD3+ Zellen (94%) detektiert werden konnten. In 89% der Proben traten diese mit einer geringen Häufigkeit auf (s.Abb.12B). Nur bei 6% der Proben war eine hohe Häufigkeit positiver Zellen erkennbar. Auch bei den anaplastischen Astrozytomen wurde deutlich, dass die Population PD-1 exprimierender Zellen eine Subpopulation CD3+ T-Zellen ist. In 56% der Proben konnten sie mit einer geringen Häufigkeit nachgewiesen werden (s.Abb.12C). Ebenfalls mit geringer Häufigkeit traten die FOXP-3+ T-Zellen in 28% der Fälle auf. 13 der 18 Proben waren negativ für diese regulatorische T-Zellpopulation. Sowohl das Vorkommen PD-1+ als auch FOXP-3+ Zellen konnte nicht als statistisch signifikanter Unterschied zum Normalgewebe bezeichnet werden.

Makrophagen und deren regulatorische Subpopulation wurden auch im anaplastischen Astrozytom mittels der Marker CD68 und CD163 immunhistochemisch identifiziert. Das Vorhandensein dieser Populationen ist in Abbildung 13 dargestellt. Sowohl Mikroglia als auch Makrophagen exprimierten CD68 und CD163 (s.Abb.13B, C). Alle Proben zeigten eine Positivität für CD68+ Zellen, 89% auch für CD163+ Zellen. In 72% der Proben traten die CD68+ Zellen mit einer hohen Häufigkeit auf. Die CD163+ Zellen waren in 50% der Proben mit einer hohen Häufigkeit identifizierbar und in 39% der Proben mit einer geringen Häufigkeit (s.Abb.13A).

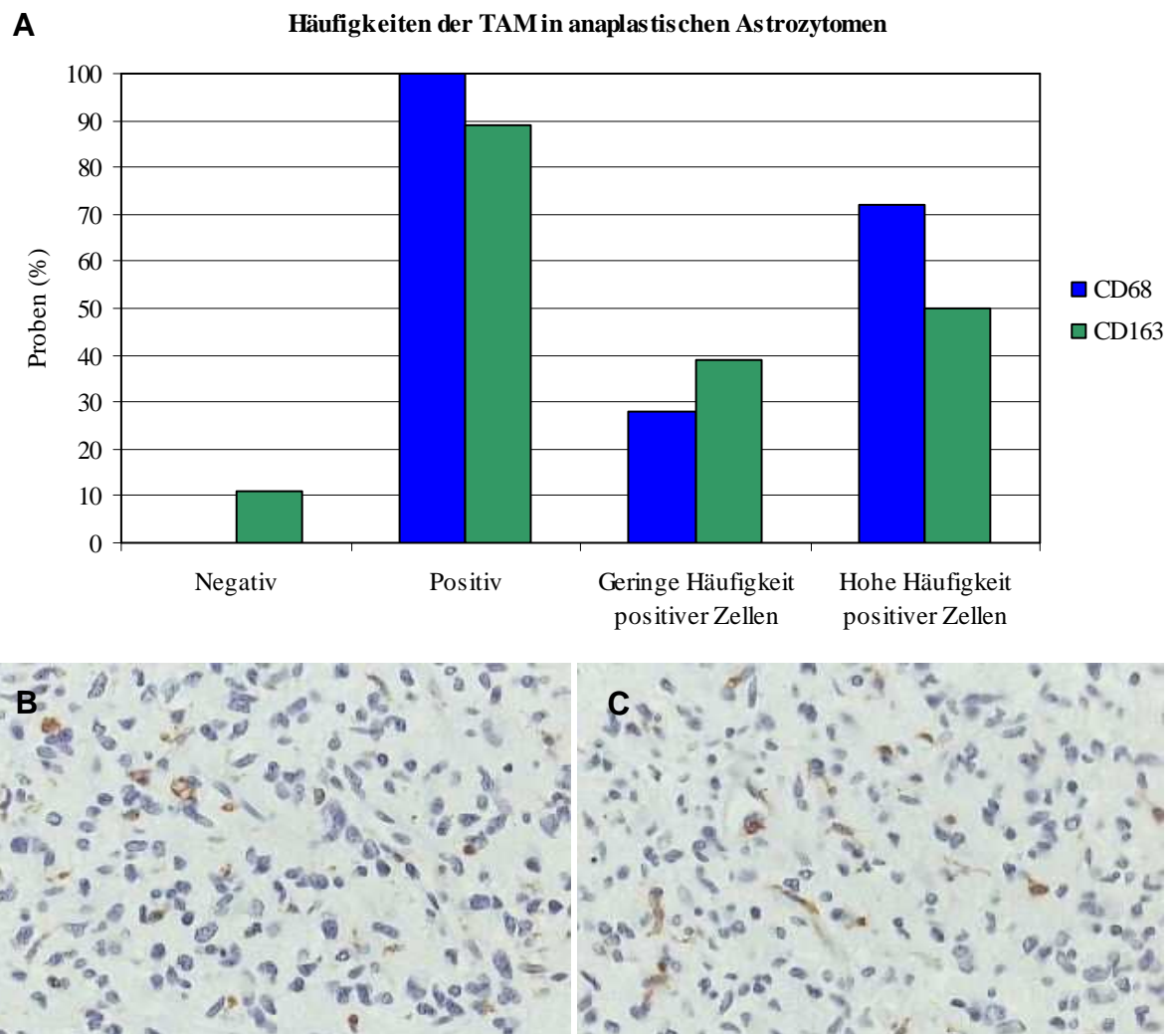


Abbildung 13: CD68+ und CD163+ TAM in anaplastischen Astrozytomen

A: Infiltration von CD68+ und CD163+ Makrophagen/Mikroglia in 18 untersuchten anaplastischen Astrozytomen: In jeder Probe wurde die Häufigkeit CD68+ und CD163+ Zellen semiquantitativ bestimmt. **B+C:** Immunhistochemische Färbung von CD68 (**B**) und CD163 (**C**): Hohe Häufigkeit positiver Zellen im anaplastischen Astrozytom (200x).

4.2.3 Glioblastome

4.2.3.1 Charakteristik und Ki-67-Index

Die höhere Zelldichte, starke mitotische Aktivität, das Auftreten von Nekrosen sowie hyperplastische Gefäße sind Merkmale, welche das Glioblastom vom anaplastischen Astrozytom unterscheiden. Auf alle wurde bei der Auswahl der zu untersuchenden Glioblastome geachtet. Mikroskopisch erschienen die Glioblastome sehr heterogen. Die astrozytären Tumorzellen waren fibrillär (s.Abb.14A) oder gemistozytär (s.Abb.14B). Auch kleine undifferenzierte Zellen (s.Abb.14C), sowie mehrkernige Riesenzellen (s.Abb.14A) traten in den Glioblastomen auf. Nach einer Kernfärbung mit Ki-67, konnte der Ki-67-Index auf durchschnittlich 16,9% festgelegt werden (s.Abb.14D).

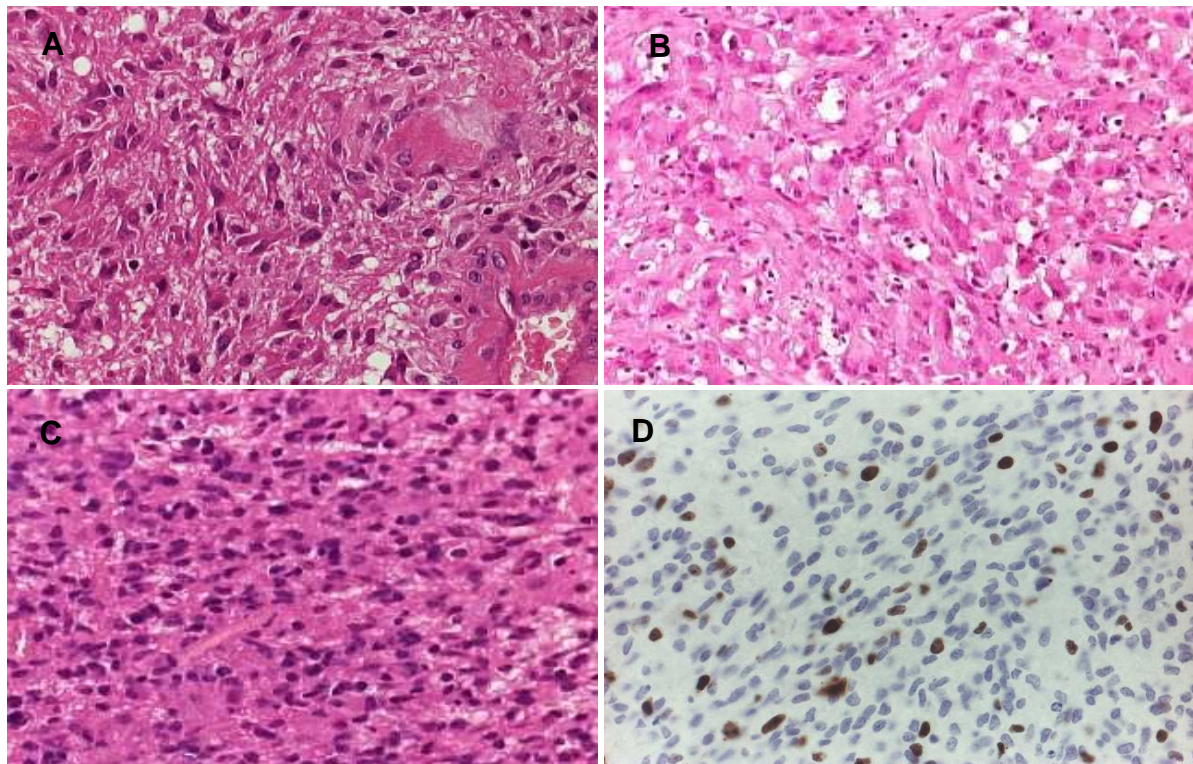


Abbildung 14: Heterogenität und Ki-67-Index der Glioblastome

Hämatoxylin-Eosin Färbung eines Glioblastoms mit fibrillären Astrozyten, sowie einer Riesenzelle (200x)(A). Gemistozytäre Variante eines Glioblastoms (200x) (B), sowie kleine undifferenzierte Zellen eines Glioblastoms (200x)(C). Ki-67 Expression im Glioblastom: Durchschnittlich 16,9% der Kerne sind positiv für Ki-67(200x) (D).

4.2.3.2 Regulatorische T-Zellen und Makrophagen

Es wurden 40 Glioblastomproben auf die Expression verschiedener T-Zellmarker untersucht. Die Expression von CD3 wurde detektiert, mögliche regulatorische Funktionen durch die Expression von PD-1 und FOXP-3. Da alle Glioblastome eine heterogene Histologie aufwiesen, wurde beim Betrachten und semiquantitativen Auswerten ein Mittelwert aller Areale gebildet. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der verschiedenen Zellpopulationen in Glioblastomen dargestellt.

In allen untersuchten Proben waren CD3+ T-Zellen vorhanden, in 32,5% der Fälle traten sie mit einer hohen Häufigkeit auf. Eine hohe Häufigkeit PD-1+ Zellen war nur in 5% der Glioblastomproben detektierbar. Zwar waren fast alle Proben positiv (90%), aber bei 85% der Proben traten PD-1+ Zellen mit geringer Häufigkeit auf. Auch in den Glioblastomen konnten die PD-1+ Zellen eindeutig als Subpopulation der CD3+ T-Zellen identifiziert werden. FOXP-3+ Zellen konnten in mehr als der Hälfte der Proben gefunden werden (52,5%) und traten mit geringer Häufigkeit auf (s.Abb.15A). Die Verteilung der CD3+, PD-1+, sowie FOXP-3+ Zellen war unterschiedlich. Eine perivasale Akkumulation (s.Abb.15B) oder eine Akkumulation an hyperplastischen Gefäßen (s.Abb.15C) war nicht selten. Auch am Nekroserand traten häufig immunreaktive Zellen auf (s.Abb.15D). Eine regelmäßige Verteilung der immunreaktiven Zellen im Gewebe war ebenfalls gegeben (s.Abb.15E).

Die TAM in den Glioblastomen wurden mittels anti-CD68-Antikörper markiert und regulatorische Eigenschaften der Makrophagen über die Expression von CD163 untersucht. Die semiquantitative Auswertung, sowie Ergebnisse der Immunhistochemie sind in Abbildung 16 dargestellt. Makrophagen und Mikroglia, welche typischerweise CD68 exprimieren konnten in allen Proben nachgewiesen werden (s.Abb.16A). Sie traten in 92,5% der Fälle in einer hohen Häufigkeit auf (s.Abb.16B). Auch die Expression des regulatorischen Markers CD163 war auf allen Makrophagen nachzuweisen. Alle Proben zeigten eine hohe Häufigkeit CD163+ Zellen (s.Abb.16C).

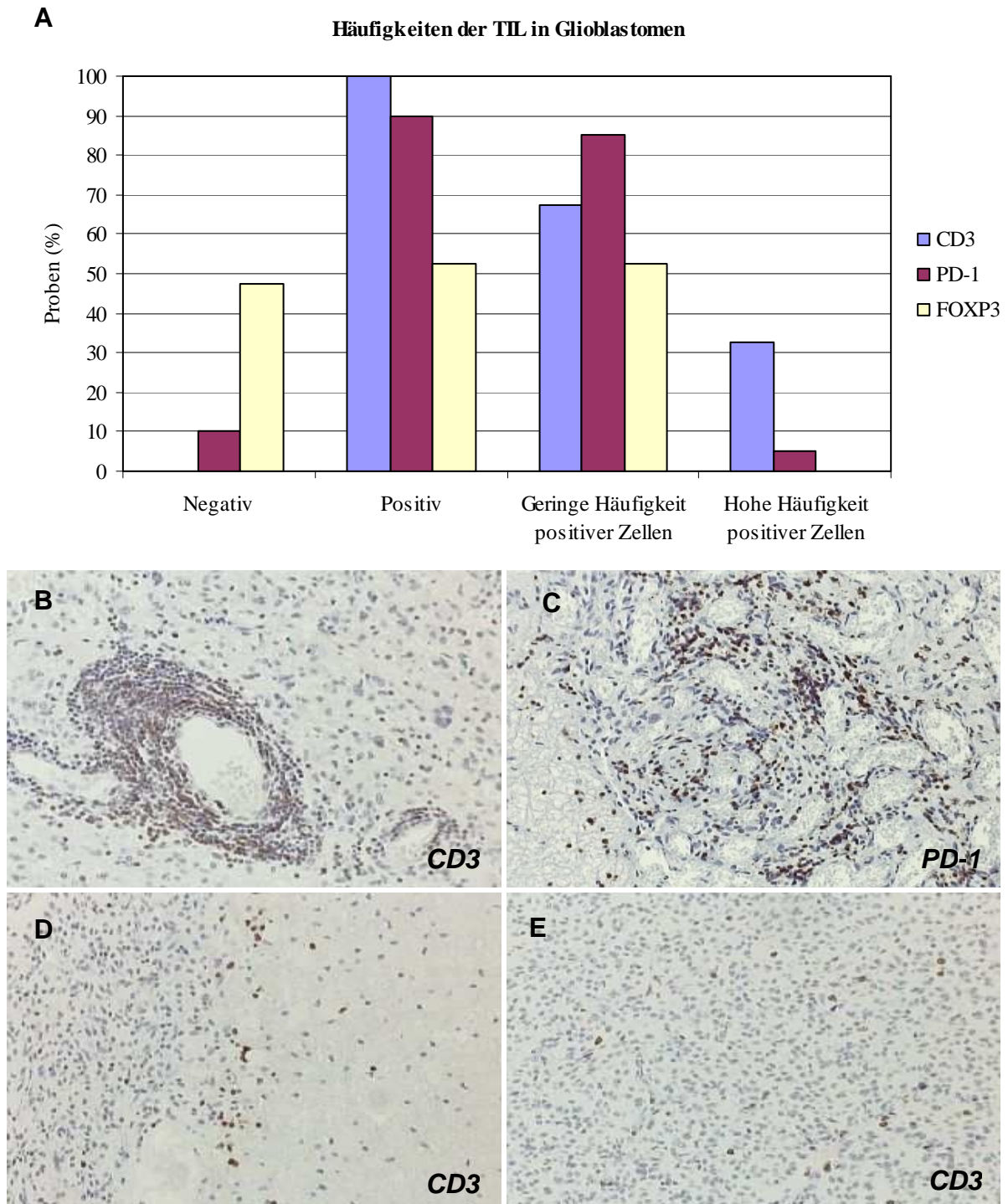


Abbildung 15: CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ TIL in Glioblastomen

A: Infiltration von CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ T-Zellen in 40 untersuchten Glioblastomen: In jeder Probe wurde die Häufigkeit CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ Zellen semiquantitativ bestimmt. **B-C:** Immunhistochemische Färbung von CD3 und PD-1 (200x): Akkumulation immunreaktiver Zellen perivascular (B), an hyperplastischen Gefäßen (C), am Nekroserand (D) oder diffuse Verteilung (E).

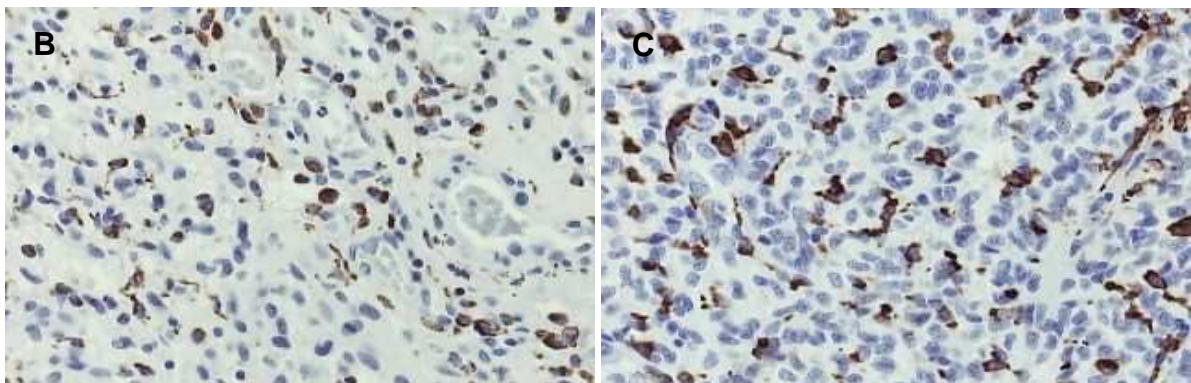
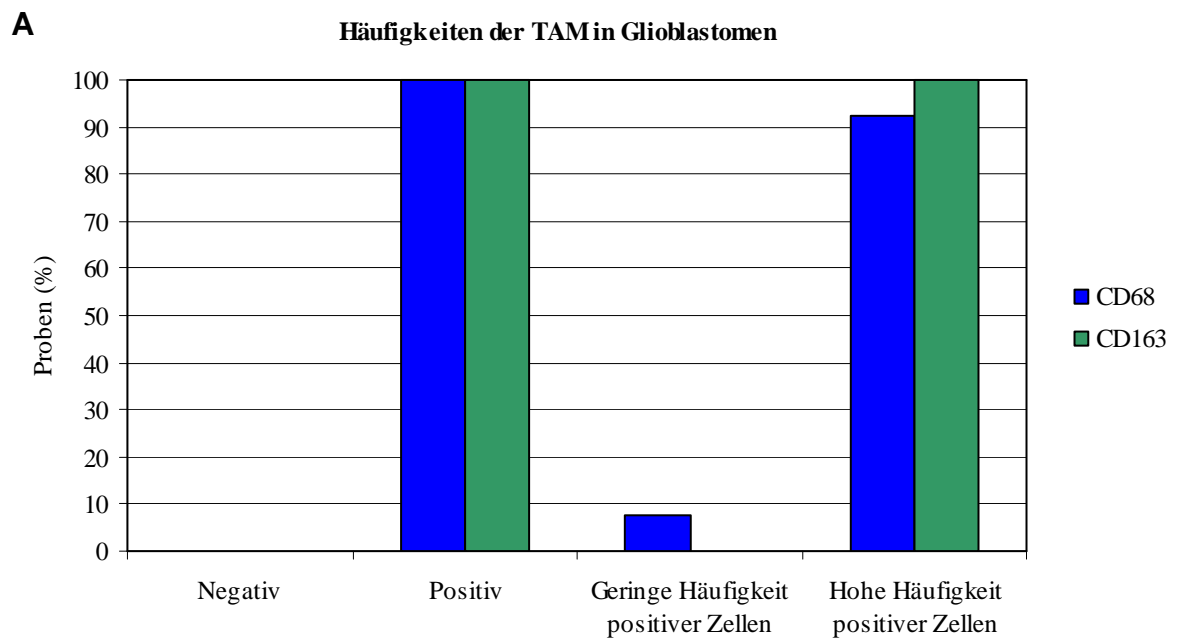


Abbildung 16: CD68+ und CD163+ TAM in Glioblastomen

A: Infiltration von CD68+ und CD163+ Makrophagen/Mikroglia in 40 untersuchten Glioblastomen: In jeder Probe wurde die Häufigkeit CD68+ und CD163+ Zellen semiquantitativ bestimmt. **B+C:** Immunhistochemische Färbung von CD68 (**B**) und CD163 (**C**): Hohe Häufigkeit positiver Zellen im Glioblastomen. (200x)

4.2.4 Statistische Auswertung:

Ein statistisch signifikanter Unterschied im Vorkommen der T-Zellen und Makrophagen zwischen dem Normalgewebe des ZNS und den einzelnen Gliomentitäten wurde untersucht. Auch eine mögliche Korrelation zwischen den Häufigkeiten dieser Zellen und dem Malignitätsgrad (WHO Grad) wurde ermittelt. Ob bestimmte Zellpopulationen innerhalb einer bestimmten Altersklasse oder geschlechtsspezifisch auftreten wurde ebenfalls untersucht. Die p-Werte der durchgeführten statistischen Tests sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Tabelle 6: Statistische Auswertung der immunregulatorischen Zellpopulationen in Gliomen

Das Vorkommen CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ T-Zellen, sowie CD68+ und CD163+ Makrophagen in den Gliomentitäten wurde mit dem in normalem Hirngewebe verglichen und der jeweilige p-Wert des Testergebnis angegeben. Außerdem wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen den Merkmalen WHO Grad, Alter, Geschlecht, Ki-67-Index und dem Vorkommen der Zellpopulationen untersucht. Ein signifikanter Zusammenhang besteht, wenn der p-Wert $\leq 0,05$ ist. Bei den Variablen „Häufigkeit CD3+, PD-1+, FOXP-3+, CD68+, CD163+ Zellen“ sowie „WHO Grad“ und „Geschlecht“ handelt es sich um nicht stetige qualitative Variablen. „Ki-67-Index“ und „Alter“ werden als quantitative, stetige Variablen in den jeweiligen Test eingesetzt.

	Häufigkeit CD3+Zellen	Häufigkeit PD1+Zellen	Häufigkeit FOXP- 3+Zellen	Häufigkeit CD68+Zellen	Häufigkeit CD163+Zellen
Normalgewebe vs. diffuses Astrozytom	p > 0,99	p > 0,99	p > 0,99	p < 0,01	p = 0,04
Normalgewebe vs. anaplastisches Astrozytom	p = 0,03	p = 0,17	p = 0,28	p = 0,03	p = 0,04
Normalgewebe vs. Glioblastom	p < 0,01	p < 0,01	p = 0,02	p < 0,01	p < 0,01
WHO-Grad	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p = 0,07	p < 0,01
Alter	p = 0,07	p = 0,13	p = 0,92	p = 0,92	p < 0,01
Geschlecht	p = 0,9	p = 0,54	p = 0,65	p = 0,41	p = 0,41
Ki-67-Index	p = 0,01	p < 0,01	p = 0,02	p = 0,03	p < 0,01

Die Häufigkeiten der T-Zellpopulationen unterschieden sich im diffusen Astrozytom nicht signifikant von derer im Normalgewebe des ZNS ($p > 0,99$), anders als die Makrophagenpopulationen (siehe Tabelle 5). Beim Vergleich der Häufigkeiten der Immunzellen des anaplastischen Astrozytoms mit dem Normalgewebe bestand ein signifikanter Unterschied in dem Auftreten der CD3+ T-Zellpopulation und Makrophagen. Im Glioblastom zeigten sich deutlich vom normalen Hirngewebe verschiedene Häufigkeiten der T-Zellen und Makrophagen.

Außerdem geht aus Tabelle 5 hervor, dass sowohl die Häufigkeit CD3+ T-Zellen, als auch die der PD-1+ und FOXP-3+ Subpopulationen positiv mit dem Malignitätsgrad in Gliomen korrelieren. Auch die Häufigkeit der CD163+ Makrophagen stieg mit dem WHO Grad ($p < 0,01$). Ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Gliompatienten und der Häufigkeit CD163+ Makrophagen konnte ebenfalls festgestellt werden ($p < 0,01$). Mit steigendem Alter der Gliompatienten stieg auch die Häufigkeit der CD163+ Zellen (s.Abb.17). Die Häufigkeiten bestimmter Zellpopulationen deuteten auf keine Korrelation mit dem Geschlecht der Patienten hin. Der Ki-67-Index, ermittelt über die Expressionsrate von Ki-67 zeigte eine signifikante positive Korrelation mit der Häufigkeit aller Subpopulationen, alle p-Werte liegen hier unter 0,05. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen der Ki-67 Positivität und dem WHO Grad der Gliome festgestellt werden. Aus Abbildung 17 geht hervor, dass der Ki-67-Index mit der Malignität steigt. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen diffusen (WHO Grad II) und anaplastischen (WHO Grad III) Astrozytomen ($p = 0,04$) sowie zwischen anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen (WHO Grad IV) ($p < 0,01$).

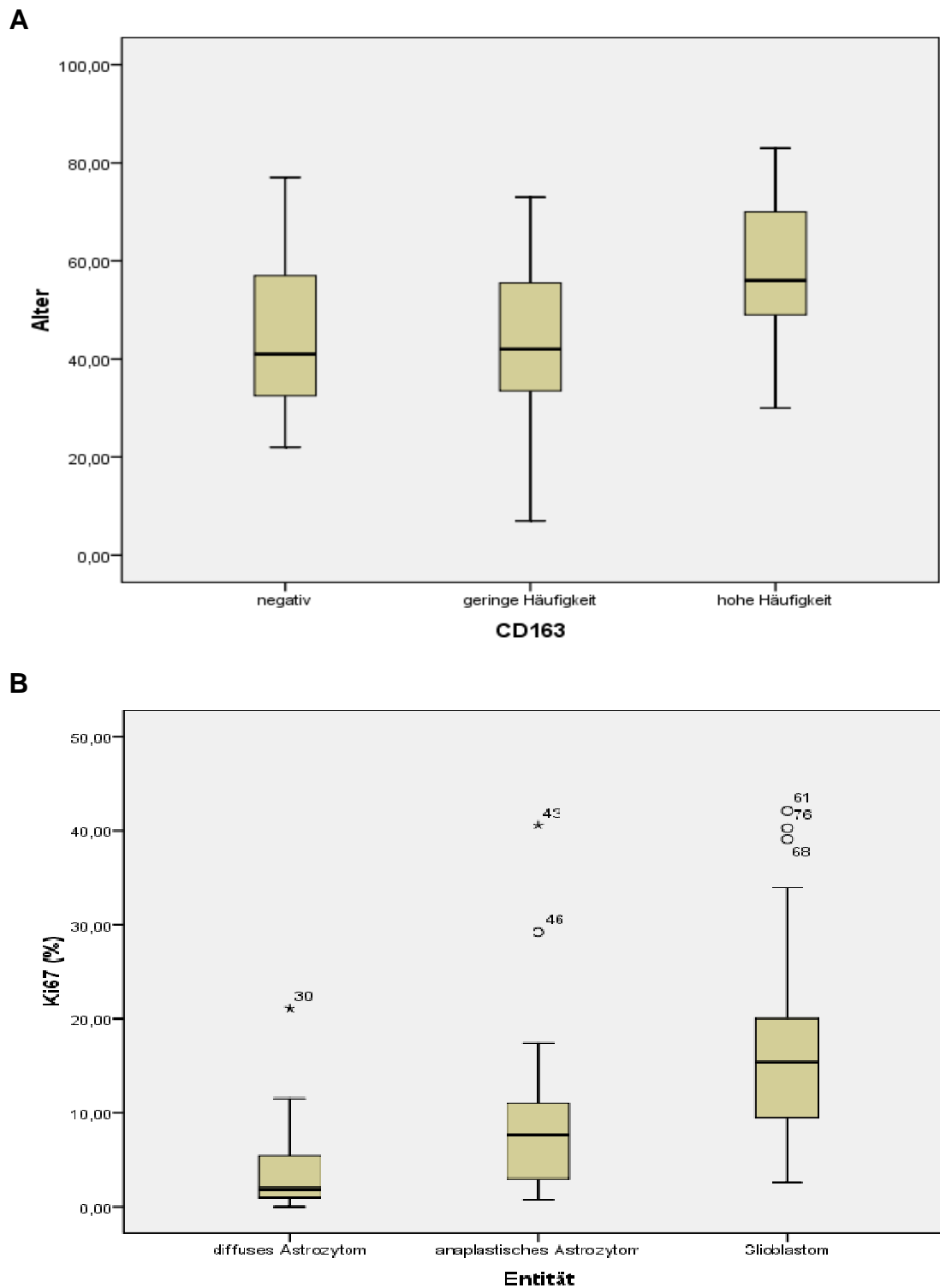


Abbildung 17: CD163+ TAM und Ki-67-Index der Gliome

A: Boxplot, der die Abhängigkeit CD163+ TAM vom Alter der Gliompatienten darstellt. Die Infiltration CD163+ Zellen ist bei älteren Patienten höher. **B:** Boxplot, der den Ki-67-Index in den einzelnen WHO Grade darstellt. Der Ki-67-Index steigt dabei mit zunehmender Malignität der Gliome.

4.3 Regulatorische T-Zellen und Makrophagen in primären ZNS Lymphomen

4.3.1. Manifestation und Ki-67-Index

Die primären ZNS Lymphome sind im Gegensatz zu den Gliomen keine hirneigenen Tumoren, sondern Tumoren der Immunzellen, in diesem Fall der B-Zellen, welche sich in der Hirnregion manifestieren ohne bekannte extradurale Manifestation bei Diagnosestellung. Die Immunreaktion, welche durch solche Tumoren hervorgerufen wird, wurde untersucht, um sie dann zu vergleichen. Alle untersuchten PZNSL waren von dem am häufigsten auftretenden Typ, der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCL). 42 dieser DLBCL wurden zunächst auf ihre Art der Manifestation untersucht.

Aus Abbildung 18 gehen die drei verschiedenen Manifestationsarten hervor. Diffus gewachsene DLBCL zeigten eine relativ gleichmäßige undichte Verteilung der Tumorzellen. Bei den rasenartig gewachsenen, traten die Tumorzellen in einer hohen Dichte auf. DLBCL, welche pseudoencephalitisches manifestiert waren, wiesen Tumorzellen hauptsächlich perivascular und dicht gedrängt auf. Diese Einteilung der Manifestationsarten ist jedoch nicht absolut sondern eher ineinander übergehend. Es wurde die in der Probe vorherrschende Manifestationsart festgelegt. 26% der 42 DLBCL konnten einem diffus wachsenden Lymphom zugeordnet werden, 48% wiesen eine rasenartige Manifestation auf und weiteren 26% konnte ein pseudoencephalitisches Wachstum zugeschrieben werden. Der Ki-67-Index lag bei durchschnittlich 49,8% (s.Abb.18).

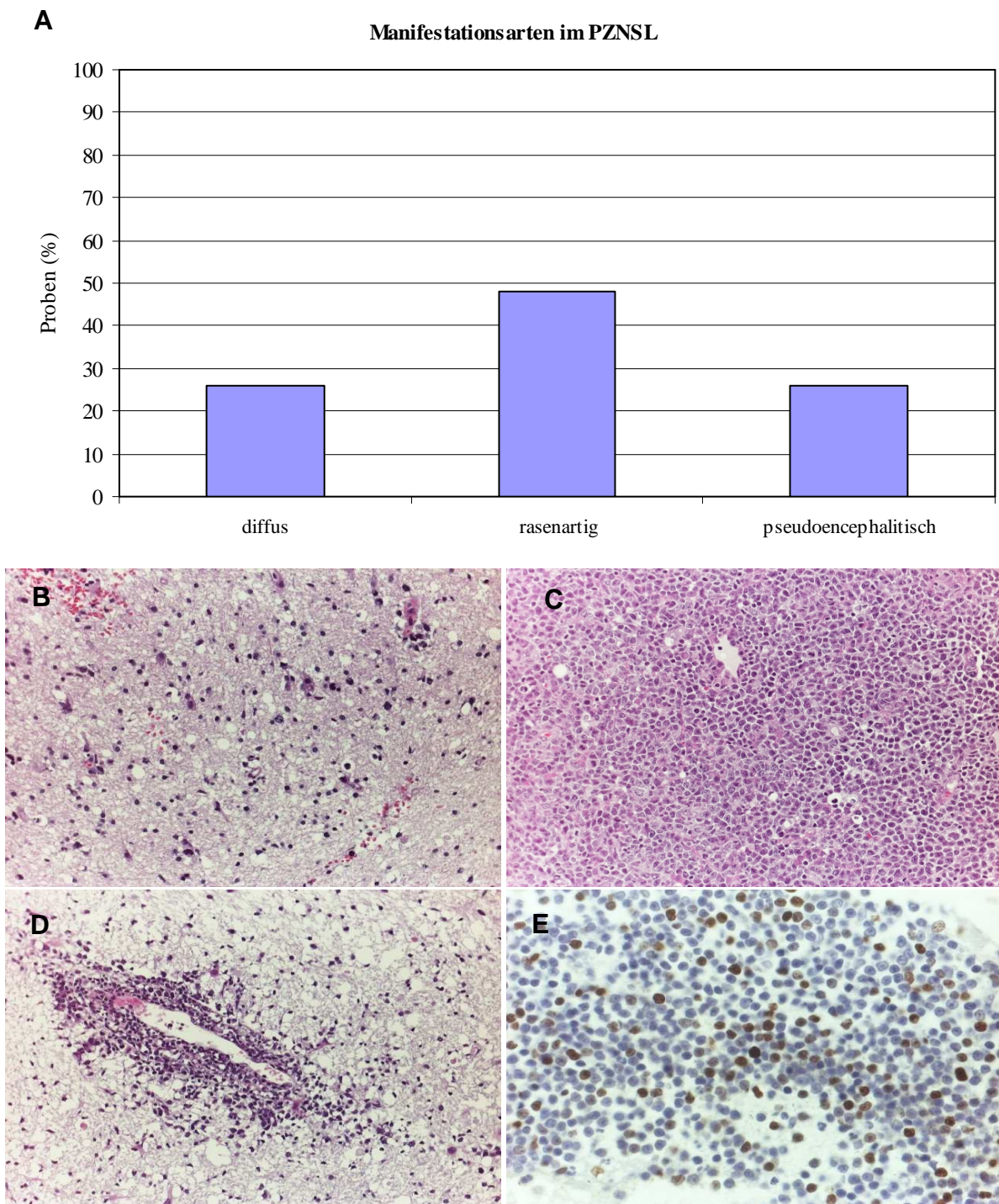


Abbildung 18: Manifestation und Ki-67-Index der PZNSL (DLBCL)

Unterteilung der 42 untersuchten PZNSL in unterschiedliche Manifestationsarten (A). Hämatoxylin-Eosin Färbung eines diffus gewachsenen Lymphoms (200x) (B), eines rasenartig gewachsenen Lymphoms (100x) (C) und eines pseudoencephalisch gewachsenen Lymphoms (200x) (D). Ki-67-Index im PZNSL: Durchschnittlich 49,8% der Gesamtzellen sind positiv für Ki-67 (E).

4.3.2 Identifizierung immunreaktiver Zellen im primären ZNS Lymphom

4.3.2.1 Verteilung

Die Verteilung der tumorspezifischen immunreaktiven Zellen war bei den DLBCL eher heterogen. In Abbildung 19 sind die unterschiedlichen Verteilungsarten CD3⁺ T-Zellen dargestellt. Wie auch die Tumorzellen können diese immunreaktiven Zellen perivascular akkumulieren (pseudoecephalitisches) (s.Abb.19A). Proben eines pseudoecephalitischen DLBCL zeigten jedoch nicht zwangsläufig auch eine pseudoecephalitische Verteilung der immunreaktiven T-Zellen. Bei anderen DLBCL akkumulierten die immunreaktiven T-Zellen auch am Tumorrand (s.Abb.19B) oder waren gleichmäßig verteilt (s.Abb.19C).

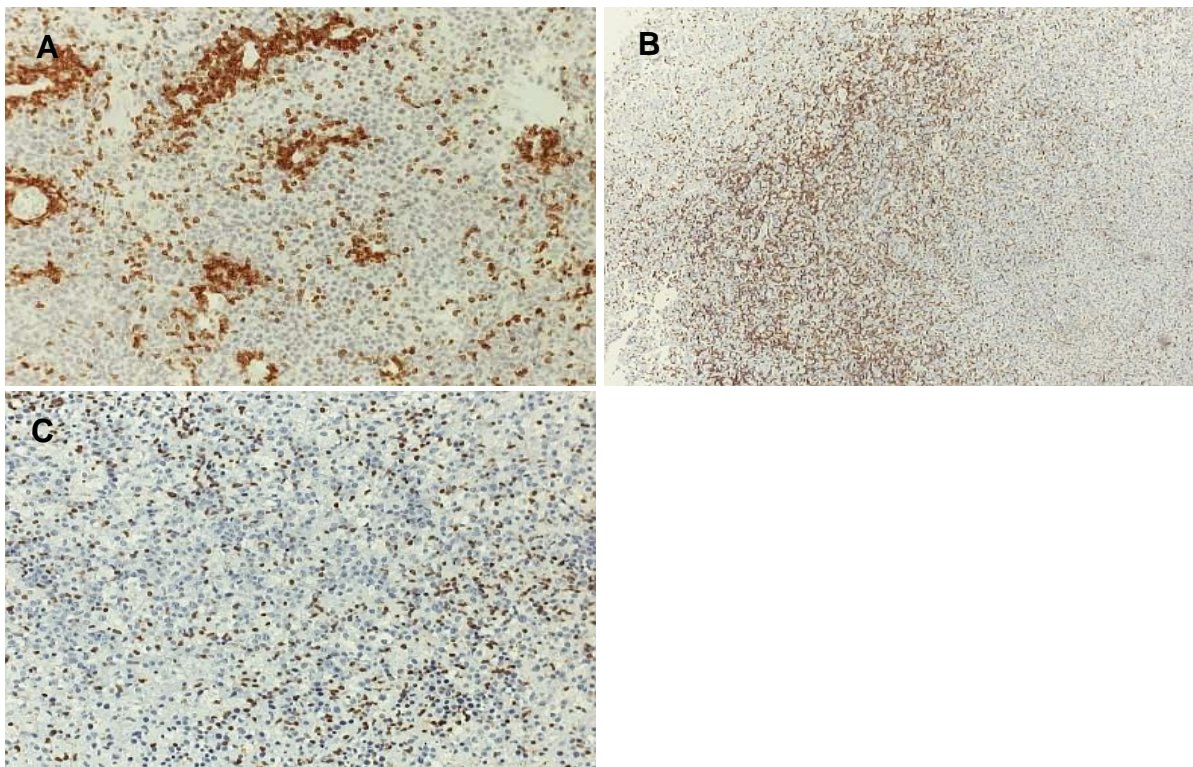


Abbildung 19: Verteilung der immunreaktiven T-Zellen in PZNSL (DLBCL)

Immunhistochemische Färbung von CD3 an DLBCL: Die T-Zellen können perivascular akkumulieren (pseudoecephalitisches) (A), am Tumorrand (B) oder gleichmäßig verteilt sein (C) (100x).

4.3.2.2 Regulatorische T-Zellen und Makrophagen

Die Population immunreaktiver T-Zellen wurde auch in den primären ZNS Lymphomen mittels des Markers CD3 bestimmt. Über die Expression von PD-1 wurde eine Subpopulation mit regulatorischen Eigenschaften dieser T-Zellen identifiziert. Die eigentlichen regulatorischen T-Zellen (Treg) wurden über die Expression von FOXP-3 markiert. Die semiquantitative Auswertung, sowie die Fotos der Immunhistochemie sind in Abbildung 20 dargestellt.

Aus Abbildung 20 geht hervor, dass alle 42 PZNSL CD3+ und PD-1+ T-Zellen aufwiesen. Dabei traten bei 76% der PZNSL die CD3+ und bei 69% die PD-1+ Zellen mit einer hohen Häufigkeit auf. Wie bisher schon festgestellt, sind es die CD3+ T-Zellen, welche auch PD-1 exprimieren (Abb.20B, C). Bei den PZNSL konnten in jeder Probe auch PD-1+ Tumorzellen gefunden werden. Teilweise gab es sogar Proben, welche 100% Positivität der Tumorzellen zeigten, jedoch etwas schwächer auf den Tumorzellen exprimiert als auf den dort vorhandenen T-Zellen (Abb.20E). Die FOXP-3+ regulatorischen T-Zellen traten nur mit einer geringen Häufigkeit auf, allerdings waren 90% der Proben generell positiv für FOXP-3+ Zellen (Abb.20D).

Auch die Tumor-infiltrierenden Makrophagen und Mikroglia wurden in PZNSL mittels eines Antikörpers gegen CD68 detektiert und durch die Expression von CD163 auf regulatorische Funktion untersucht. Die semiquantitative Auswertung ist in Abbildung 21 A dargestellt. In allen Proben der PZNSL konnten CD68 positive Makrophagen und Mikroglia nachgewiesen werden, in 95% der Fälle sogar mit einer hohen Häufigkeit (Abb.21B). Aus Abbildung 21 A und C geht hervor, dass das Auftreten von CD163+ Makrophagen noch stärker war, alle Proben wiesen eine hohe Häufigkeit CD163+ Makrophagen auf.

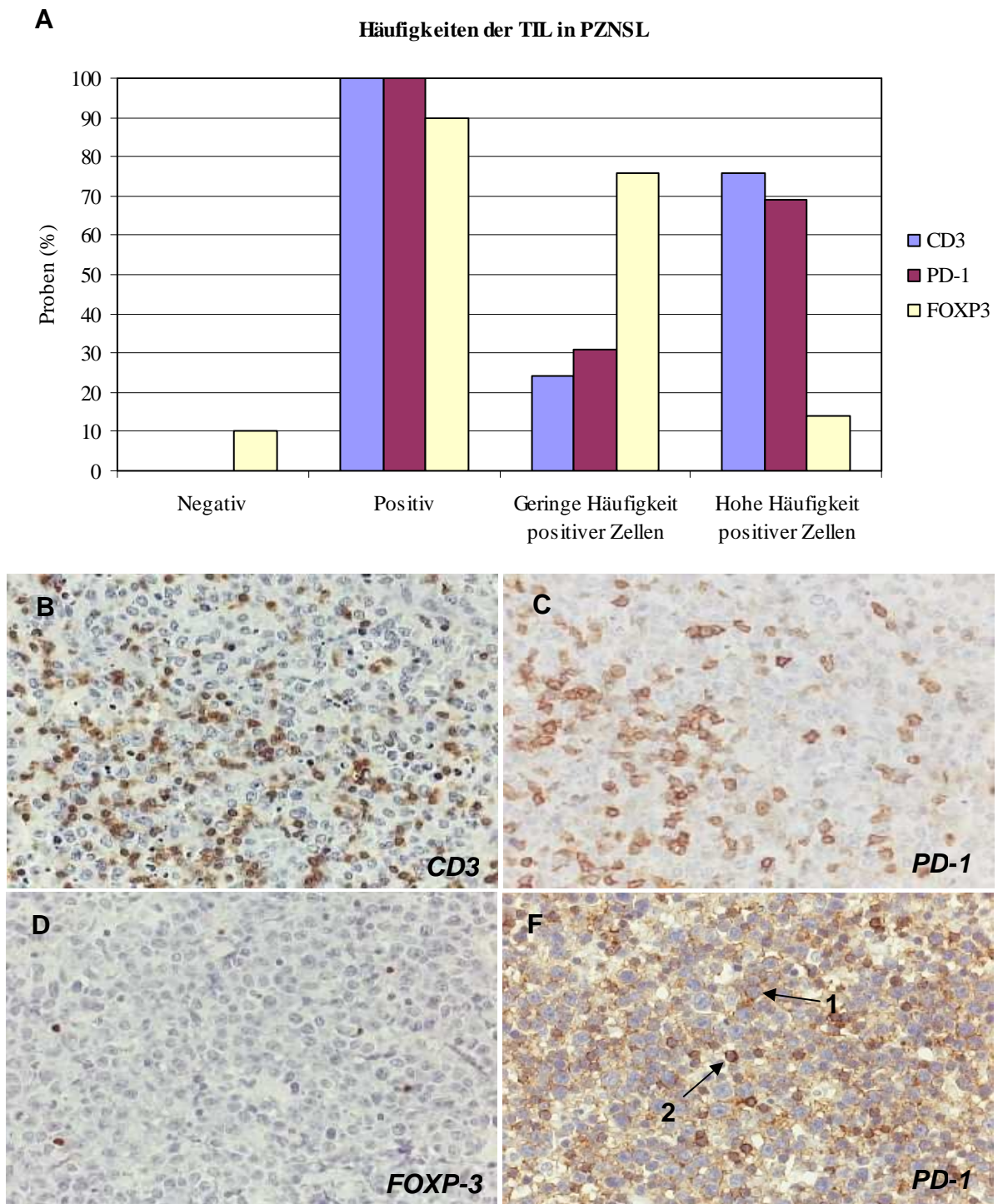


Abbildung 20: CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ TIL in PZNSL (DLBCL)

A: Infiltration von CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ T-Zellen in 42 untersuchten DLBCL: In jeder Probe wurde die Häufigkeit CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ Zellen semiquantitativ bestimmt. **B-E:** Immunhistochemische Färbung von CD3, PD-1 und FOXP-3 (200x): Starke Infiltration CD3+ Zellen (**B**), welche auch PD-1 exprimieren (**C**). FOXP-3+ Zellen sind in fast allen Lymphomproben mit geringer Häufigkeit identifizierbar (**D**). Fast alle Lymphome zeigen auch eine schwächere Expression von PD-1 auf den Tumorzellen (**E1**) und eine stärkere auf den immunreaktiven T-Zellen (**E2**).

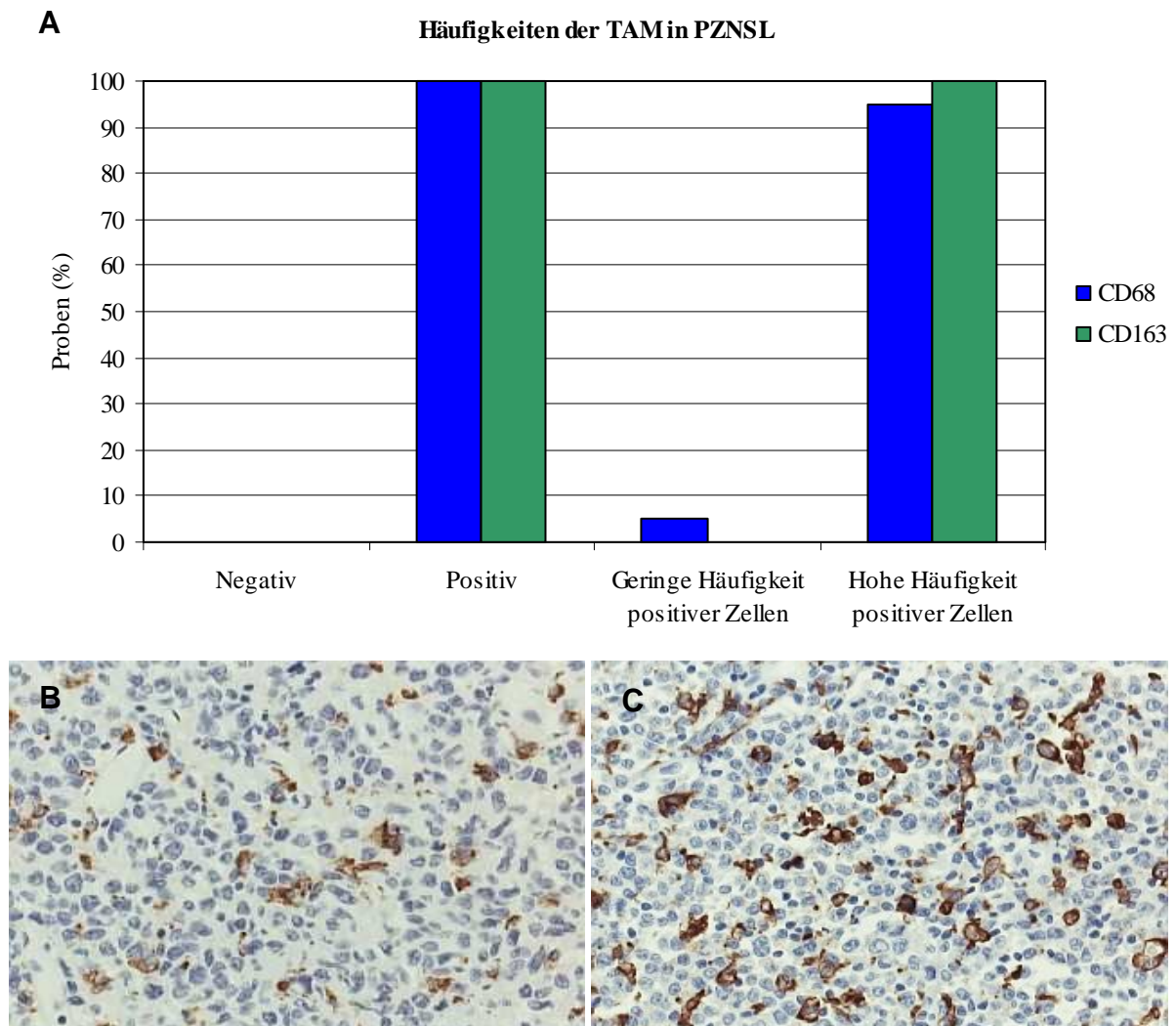


Abbildung 21: CD68+ und CD163+ TAM in PZNSL (DLBCL)

A: Infiltration von CD68+ und CD163+ Makrophagen/Mikroglia in 42 untersuchten DLBCL: In jeder Probe wurde die Häufigkeit CD68+ und CD163+ Zellen semiquantitativ bestimmt. **B+C:** Immunhistochemische Färbung von CD68 (**B**) und CD163 (**C**): Hohe Häufigkeit positiver Zellen im Lymphom. (200x).

4.3.3 Statistische Auswertung:

Ein statistisch signifikanter Unterschied der T-Zell- sowie Makrophagenhäufigkeiten zwischen dem Normalgewebe des ZNS und den primären ZNS Lymphomen wurde untersucht. Obwohl die Tumorzellen der Lymphome keine ZNS stämmigen Zellen sind, und als Referenz das gesunde Ursprungsgewebe, in diesem Fall Tonsillen, gewählt werden sollte, ist ein Vergleich mit dem Normalgewebe des ZNS hier sinnvoller, da primär die veränderte Mikroumgebung untersucht werden soll.

Eine mögliche Korrelation zwischen den Häufigkeiten der T-Zell- bzw. Makrophagenpopulationen und der Manifestationsart der PZNSL wurde außerdem geprüft. Eine geschlechts- oder altersspezifische Abhängigkeit der Zellpopulationen wurde ebenfalls untersucht. Die p-Werte der durchgeführten statistischen Tests sind in der folgenden Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 7: Statistische Auswertung der immunregulatorischen Zellpopulationen in primären ZNS Lymphomen

Das Vorkommen CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ T-Zellen, sowie CD68+ und CD163+ Makrophagen in den primären ZNS Lymphomen wurde mit dem in Tonsillen und Normalgewebe des ZNS verglichen und der p-Wert des Testergebnis angegeben. Außerdem wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen den Merkmalen Manifestationsart, Alter, Geschlecht und dem Vorkommen der Zellpopulationen untersucht. Ein signifikanter Zusammenhang besteht, wenn der p-Wert $\leq 0,05$ ist. Bei den Variablen CD3, PD-1, FOXP-3, CD68, CD163, sowie Manifestationsart und Geschlecht handelt es sich um nicht stetige qualitative Variablen. Der Ki-67-Index und das Alter werden als quantitative, stetige Variablen in den jeweiligen Test eingesetzt.

	Häufigkeit CD3+Zellen	Häufigkeit PD1+Zellen	Häufigkeit FOXP- 3+Zellen	Häufigkeit CD68+Zellen	Häufigkeit CD163+Zellen
normales Hirngewebe vs. PZNSL	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
Manifestationsart	p > 0,99	p = 0,75	p = 0,24	p > 0,99	p = 0,73
Alter	p = 0,43	p = 0,04	p = 0,39	p > 0,99	p = 0,82
Geschlecht	p = 0,47	p > 0,99	p = 0,88	p > 0,99	p = 0,16
Ki-67-Index	p = 0,35	p = 0,21	p = 0,88	p = 0,03	p = 0,1

Ein Vergleich der Häufigkeiten aller Zellpopulationen im PZNSL mit denen in normalem Hirngewebe wies einen signifikanten Unterschied auf ($p < 0,01$). Außerdem geht aus Tabelle 5 hervor, dass keine Korrelation zwischen den Häufigkeiten immunregulatorischer Zellpopulationen und der Manifestationsart der PZNSL gefunden werden konnte. Alle p-Werte lagen deutlich über 0,05. Ein Zusammenhang zwischen dem Alter der PZNSL Patienten und der Häufigkeit der PD-1+ T-Zellen konnte festgestellt werden ($p = 0,04$). Die Häufigkeit der CD163+ Zellen stieg mit dem Alter der PZNSL Patienten, wie aus dem statistischen Test hervorgeht (s.Abb.22). Die Häufigkeiten aller untersuchten Immunzellen zeigten keine Korrelation mit dem Geschlecht der Patienten. Der Ki-67-Index primärer ZNS Lymphome, ermittelt über die Ki-67 Expression, deutete nicht auf eine Korrelation mit den Häufigkeiten der PD-1+, CD3+, FOXP-3+ oder CD163+ Zellen hin. Einzig die Häufigkeit der CD68+ Makrophagen wies einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Ki-67-Index auf ($p = 0,03$).

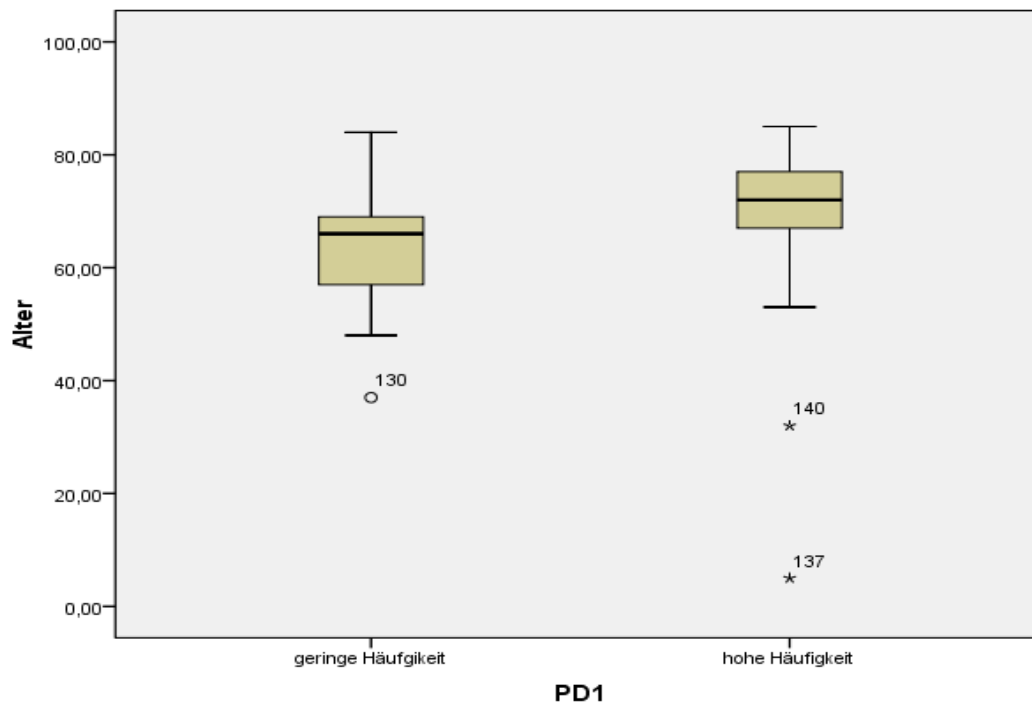


Abbildung 22: Häufigkeit PD-1+ T-Zellen vs. Alter der PZNSL-Patienten

Boxplot PD-1+ T-Zellen in Abhängigkeit des Alters von primären ZNS Lymphompatienten: Die PD-1+ T-Zellen treten häufiger bei älteren Lymphompatienten auf.

4.3.4. Charakterisierung immunreaktiver T-Zellen im PZNSL

4.3.4.1 PD-1 Expression auf Tumorzellen und T-Zellen

Die erhaltenen Ergebnisse der untersuchten primären ZNS Lymphome deuteten darauf hin, dass neben der immunreaktiven T-Zellpopulation auch die Tumorzellpopulation den Marker PD-1 exprimiert. Dies wurde mittels Fluoreszenzdoppelfärbungen in weiteren Experimenten bestätigt. Von den untersuchten 19 DLBCL konnten in allen Proben CD3+ Zellen nachgewiesen werden. Ein Teil dieser T-Zellen zeigte auch eine positive Expression von PD-1. In Abbildung 23 C sind die doppelt positiven Zellen als orangefarbene Zellen sichtbar. Die roten Zellen stellen die CD3+PD-1- T-Zellen dar. Ebenfalls waren PD-1+ CD3- Zellen detektierbar, bei welchen es sich um die Tumorzellen handelt. In 8 der untersuchten Lymphome zeigte sich eine deutliche PD-1 Expression aller Tumorzellen, wie sie in Abbildung 23 D und F exemplarisch dargestellt ist. Auch PD-1+ T-Zellen (orange) waren neben den PD-1+ Tumorzellen erkennbar. Um die PD-1 Expression der Tumorzellen zu betätigen, wurde eine Doppelfärbung mit PD-1 und dem B-Zellmarker CD20 vorgenommen. Aus Abbildung 23G geht hervor, dass auch hier zahlreiche doppelt positive Zellen (orange) vorhanden sind.

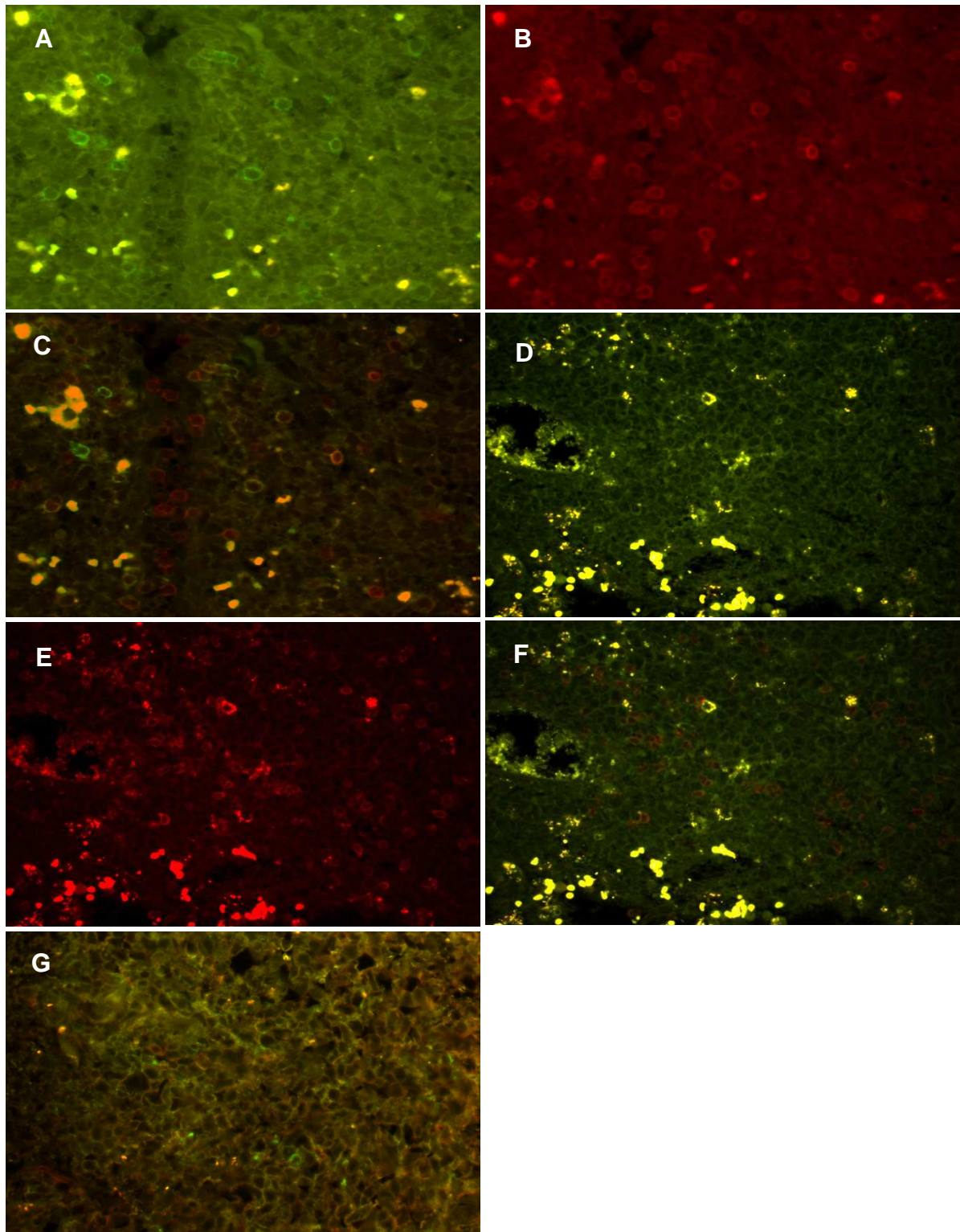


Abbildung 23: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen an primären ZNS Lymphomen (DLBCL) I

Immunfluoreszenz-Färbung von CD3, CD20 und PD-1 an 19 DLBC; PD-1 ist an FITC gekoppelt und wird auf T-Zellen exprimiert (A-C): Einzel fluoreszenz von PD-1 (A) und CD3, welches an TexasRed gekoppelt ist (B). Bei Überlagerung der Bilder (C) sind CD3+ (rot), PD-1+ (grün) und CD3+PD-1+ (orange) Zellen erkennbar. Expression von PD-1 auf Tumorzellen (D-F): Einzel fluoreszenz von PD-1 auf Tumorzellen (D) und CD3 auf T-Zellen (E). Das Overlay der Bilder (F) zeigt, dass neben den PD-1+ T-Zellen (orange) auch die Tumorzellen (grün) PD-1+ sind. In einer Doppelfärbung von CD20-FITC mit PD-1-TexasRed zeigen sich die CD20+PD-1+ Tumorzellen (orange) (G)(200x).

4.3.4.2 PD-1 Expression auf regulatorischen FOXP-3+ T-Zellen

Es wurde ebenfalls untersucht, ob die regulatorischen T-Zellen, identifiziert über eine Expression von FOXP-3 und CD25, gleichzeitig auch PD-1 exprimieren oder ob sich bei PD-1+ Zellen auch FOXP-3 nachweisen lässt. Zunächst wurde nachgewiesen, dass alle regulatorischen T-Zellen CD25 und FOXP-3 exprimieren und ein Marker alleine, nämlich FOXP-3 zur Identifizierung ausreicht (s.Abb.24A).

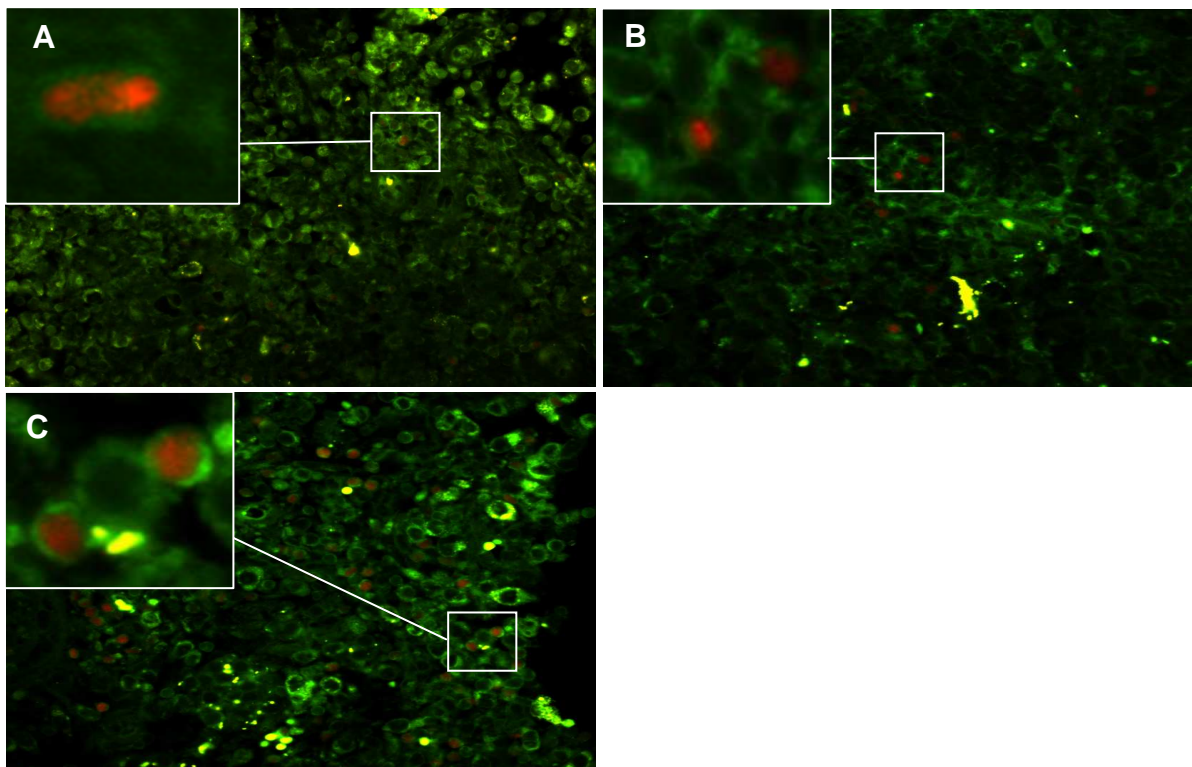


Abbildung 24: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen an primären ZNS Lymphomen (DLBCL) II

Immunfluoreszenz-Färbung von PD-1, FOXP-3 und CD25 an DLBCL: PD-1 und CD25 sind an FITC gekoppelt (grün) und werden auf der Zelloberfläche exprimiert, FOXP-3 ist an RhodaminRed (rot) gekoppelt und wird im Kern exprimiert. **A:** FOXP-3/CD25 Doppelfärbung: Nachweis, dass alle FOXP-3+ Zellen auch CD25+ sind und somit FOXP-3 als alleiniger Marker zur Identifizierung regulatorischer T-Zellen ausreicht. **B+C:** FOXP-3/PD-1 Doppelfärbung: 17/18 der untersuchten PZNSL zeigten keine doppelt positiven Zellen (**B**). 1/18 der untersuchten PZNSL zeigte PD-1+FOXP-3+ T-Zellen (**C**) (200x).

Bei 18 primären ZNS Lymphomen wurden dann Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen der Marker PD-1 und FOXP-3 durchgeführt. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse dieser Färbung exemplarisch dargestellt. Alle untersuchten Proben wiesen eine Positivität für FOXP-3 im Kern und CD25 auf der Zelloberfläche auf (s.Abb.24A). Es genügte also, FOXP-3 für die weiteren Experimente als Marker für regulatorische T-Zellen zu verwenden.

In der Mehrheit der untersuchten Lymphomproben (17) konnte bei der Doppelfärbung mit PD-1 und FOXP-3 keine doppelt positiven Zellpopulationen nachgewiesen werden. Entweder waren die Zellen positiv für den Marker PD-1 oder für FOXP-3 (s.Abb.24B). Nur bei einer Probe mit pseudoencephalitischer Manifestation konnte eine Population PD-1+FOXP-3+ Zellen identifiziert werden (s.Abb.24C). Eine Expression von PD-1 findet folglich nur selten auf regulatorischen T-Zellen statt.

4.4 Immunregulatorische Zellen in Rezidiven

4.4.1 Gliomrezidive

Ob sich das Auftreten und die Häufigkeit der untersuchten T-Zellpopulationen und Makrophagen bei einem rezidierten Gliom im Vergleich zum Primärtumor ändert, wurde ebenfalls untersucht. Auf Grund des immunologischen Gedächtnisses und Änderungen der Proteinexpression rekurrenter Tumorzellen könnten durchaus Unterschiede bestehen. Bei neun Glioblastomrezidiven wurden die immunreaktiven T-Zellen mittels CD3, PD-1 und FOXP-3 identifiziert, sowie die Makrophagenpopulationen über CD68 und CD163.

Bei den Glioblastomrezidiven konnten in allen Proben CD3+ und PD-1+ Zellen nachgewiesen werden. Die CD3+ T-Zellen kamen in 47% mit einer geringen und in 53% mit einer hohen Häufigkeit vor. Die PD-1+ Zellen waren dagegen bei der Mehrheit der Proben (78%) nur in geringer Häufigkeit vorzufinden. In 5 der 9 Proben konnten auch FOXP-3+ Zellen identifiziert werden, davon in 4 mit geringer Häufigkeit und in einer Probe mit einer hohen Häufigkeit (s.Abb.25A). CD68+ und CD163+ Makrophagen und Mikroglia waren in allen Rezidiven mit hoher Häufigkeit vertreten. Statistisch konnte bei keiner der untersuchten Zellpopulationen ein signifikanter Unterschied zum Primärtumor gefunden werden (s.Abb.25B).

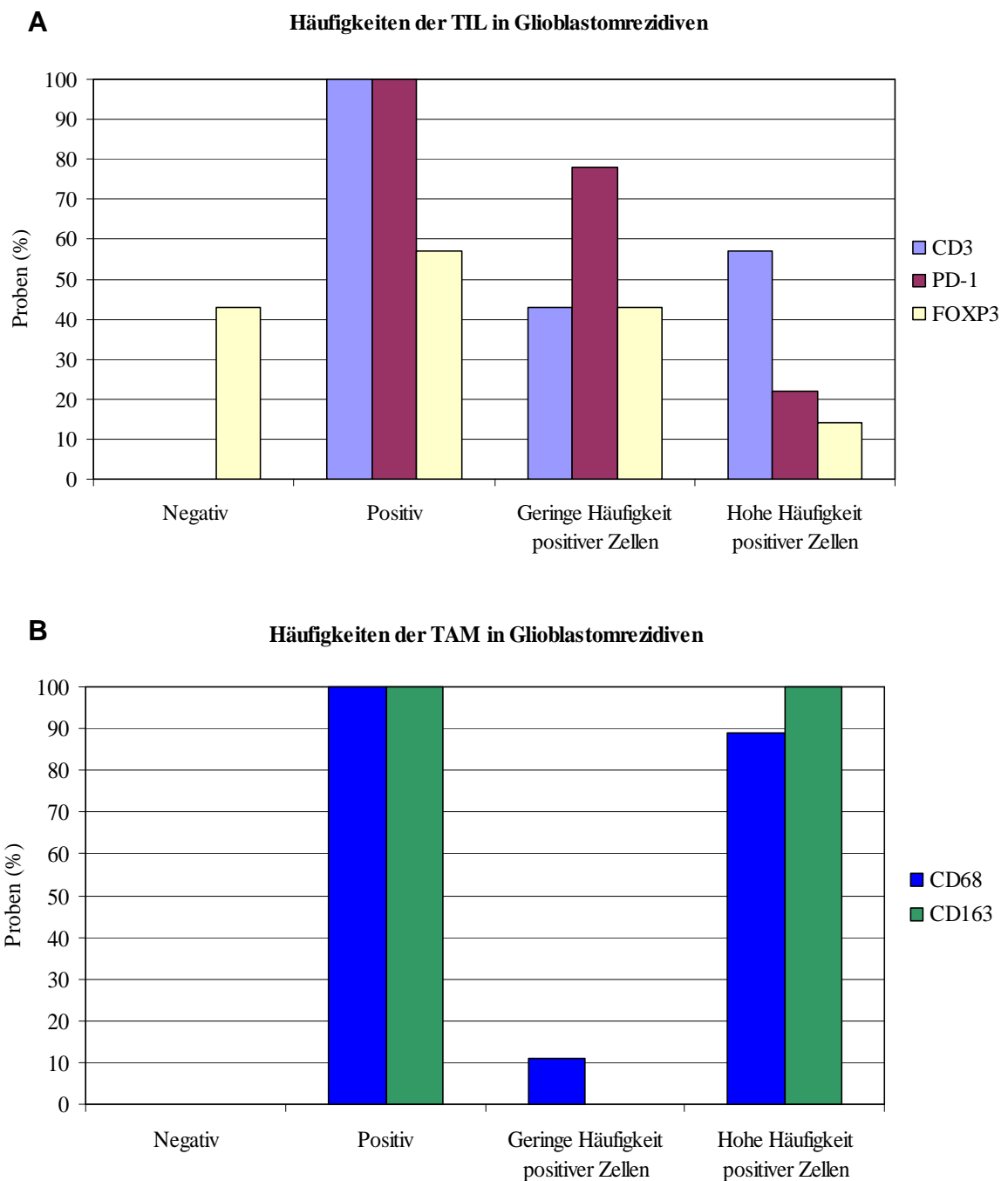


Abbildung 25: TIL und TAM in Glioblastomrezidiven

A: Infiltration von CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ T-Zellen in 9 untersuchten Glioblastomrezidiven: In jeder Probe wurde die Häufigkeit CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ Zellen semiquantitativ bestimmt. **B:** Infiltration von CD68+ und CD163+ Makrophagen/Mikroglia in 9 untersuchten Glioblastomrezidiven: In jeder Probe wurde die Häufigkeit CD68+ und CD163+ Zellen semiquantitativ bestimmt.

4.4.2 Rezidive primärer ZNS Lymphome

Auch die Immunantwort in Rezidiven der primären ZNS Lymphome wurde untersucht und mit der in Primärtumoren verglichen. Dazu wurden 10 PZNSL Rezidive, ebenfalls vom Typ der DLBCL mit den gleichen Markern für T-Zellen und Makrophagen gefärbt und somit die Häufigkeiten der Immunzellpopulationen bestimmt. Die Mehrheit (80%) der rezidierten DLBCL war rasenartig gewachsen, nur 20% waren diffus und keine Probe zeigte die pseudoencephalitische Variante.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der Marker sind in Abbildung 26 dargestellt: In allen untersuchten PZNSL Rezidiven konnten CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ T-Zellen festgestellt werden. CD3+ T-Zellen traten in 50% der Proben mit hoher Häufigkeit auf und bei 50% der Fälle mit geringer. Die PD-1+ Zellen kamen nur bei 20% der Proben mit geringer Häufigkeit vor, 80% der Proben zeigten eine hohe Häufigkeit positiver Zellen. Die regulatorischen FOXP-3+ Zellen waren in allen Proben wie erwartet mit geringer Häufigkeit erkennbar. In allen Proben konnten CD68+ und CD163+ Makrophagen nachgewiesen werden und dies mit einer hohen Häufigkeit in allen Fällen. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Primärtumor und PZNSL-Rezidiven konnte bei keiner der untersuchten Zellpopulationen festgestellt werden.

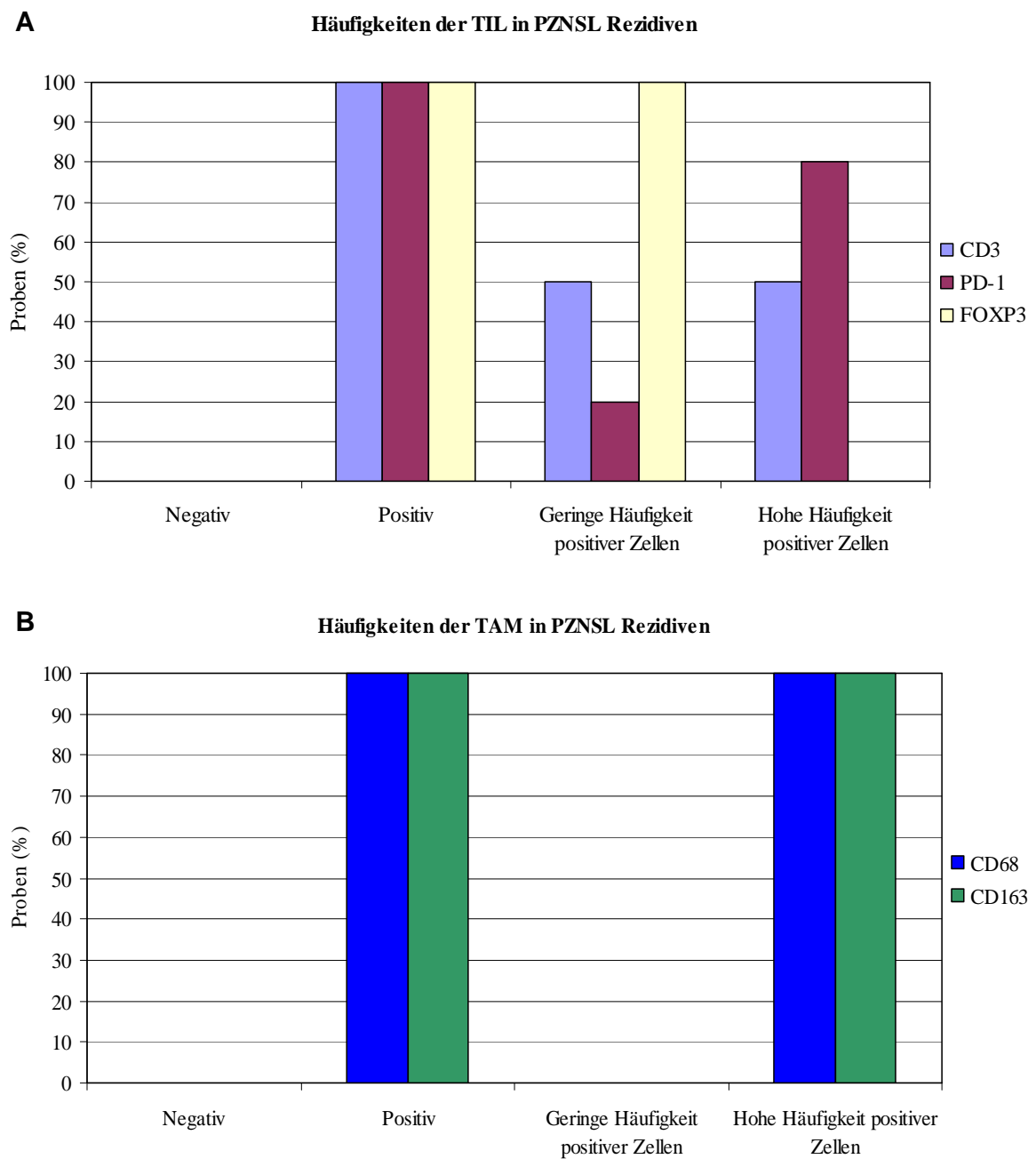


Abbildung 26: TIL und TAM in PZNSL (DLBCL)-Rezidiven

A: Infiltration von CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ T-Zellen in 10 untersuchten DLBCL-Rezidiven: In jeder Probe wurde die Häufigkeit CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ Zellen semiquantitativ bestimmt. **B:** Infiltration von CD68+ und CD163+ Makrophagen/Mikroglia in 10 untersuchten PZNSL-Rezidiven: In jeder Probe wurde die Häufigkeit CD68+ und CD163+ Zellen semiquantitativ bestimmt.

4.5 Immunregulatorische Zellen in primären ZNS Lymphomen bei Immunsuppression

Da die Inzidenz der PZNSL auch bei immunsupprimierten Patienten gestiegen ist, wurde untersucht, ob sich die immunologische Mikroumgebung in immunsupprimierten Patienten von der in immunkompetenten Patienten unterscheidet. Dazu wurden sieben DLBCL Proben immunsupprimierter Patienten auf Vorkommen und Häufigkeit immunreaktiver T-Zellpopulationen untersucht. Bei vier der Patienten konnte eine Positivität für EBV festgestellt werden, bei den verbleibenden drei sind zum EBV-Status keine Angaben gemacht worden. In den ausgewählten Proben war die Manifestationsart „diffus gewachsen“ eher gering (14%), rasenartig und pseudoencephalitisches gewachsene DLBCL traten gleich häufig auf (43%). Aus Abbildung 27 geht hervor, dass alle untersuchten Proben positiv für das Vorkommen CD3+, sowie PD-1+ und FOXP-3+ Zellen waren. Dabei zeigten sechs der sieben Proben eine hohe Häufigkeit CD3+ und PD-1+ Zellen. Regulatorische FOXP-3+ T-Zellen traten bei fünf Proben mit geringer Häufigkeit auf. Auch die Makrophagenpopulationen waren in allen Proben vorhanden. CD68+ Makrophagen waren in 80% der Fälle mit einer hohen Häufigkeit präsent, die CD163+ sogar in 100% der Proben. Es konnte statistisch kein signifikanter Unterschied im Vorkommen der T-Zell- und Makrophagenpopulationen im Vergleich zum DLBCL bei immunkompetenten Patienten gefunden werden.

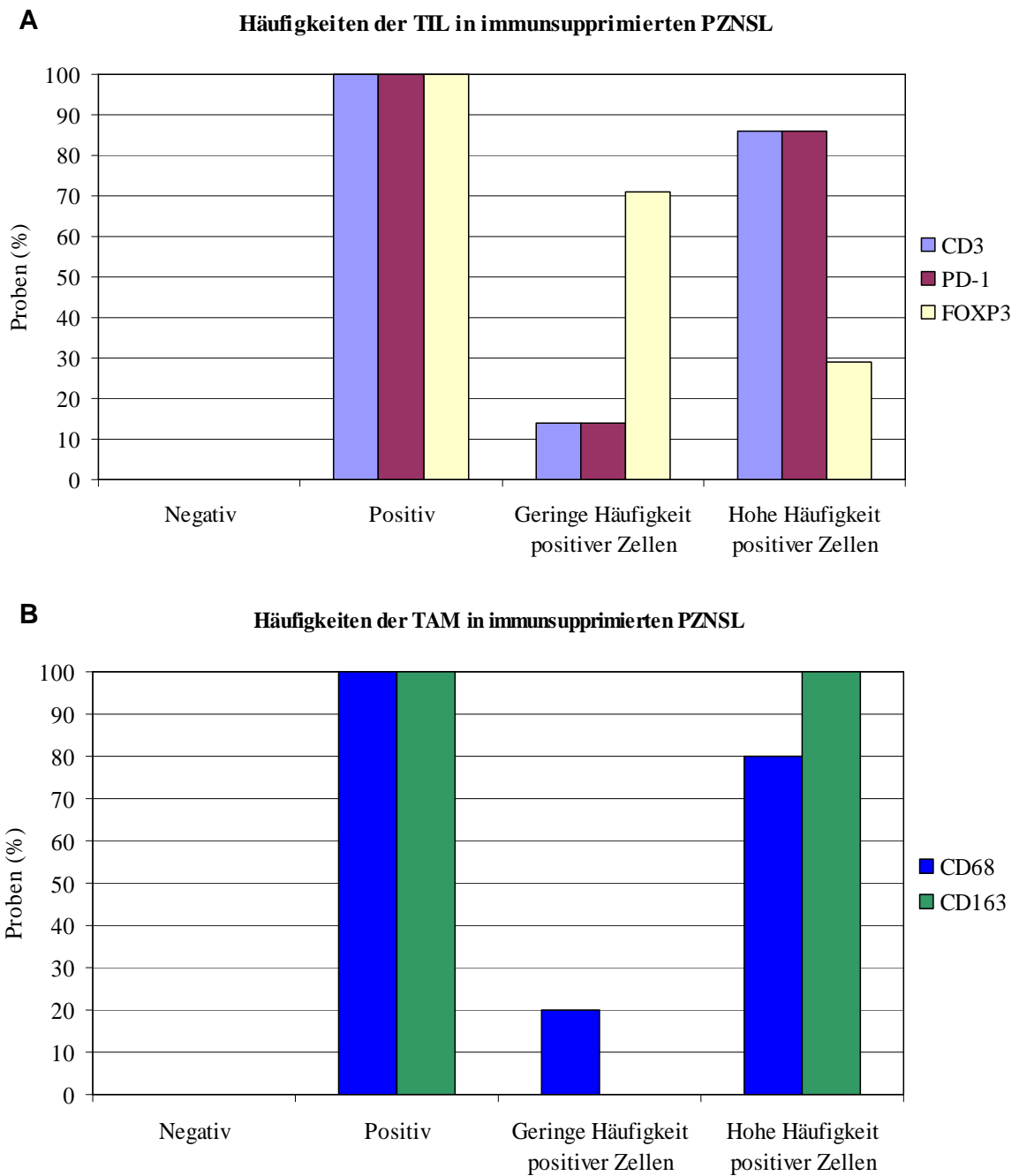


Abbildung 27: TIL und TAM in immunsupprimierten PZNSL (DLBCL)

A: Infiltration von CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ T-Zellen in 7 untersuchten immunsupprimierten DLBCL: In jeder Probe wurde die Häufigkeit CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ Zellen semiquantitativ bestimmt. **B:** Infiltration von CD68+ und CD163+ Makrophagen/Mikroglia in 7 untersuchten immunsupprimierten PZNSL: In jeder Probe wurde die Häufigkeit CD68+ und CD163+ Zellen semiquantitativ bestimmt.

4.6 Quantitative Genexpressionsanalyse

Die Expression des regulatorischen Markers PD-1 bei Lymphozyten, sowie CD163 bei Makrophagen wurde nicht nur auf Proteinebene, sondern auch auf mRNA-Ebene analysiert und mit den immunhistochemischen Ergebnissen verglichen. Es wurden sechs Proben normalen Hirngewebes als Referenz für die hirneigenen Tumorentitäten, die Gliome, ausgewählt. Bei 29 diffusen Astrozytomen, 17 anaplastischen Astrozytomen und 38 Glioblastomen konnten auf Grund der ausreichenden Probengröße die Expression von PD-1 und CD163 quantitativ ermittelt und mit der im Normalgewebe verglichen werden. Auf Grund der geringen Probenmenge konnten nur 35 der 42 primären ZNS Lymphome der quantitativen Genexpressionsanalyse unterzogen werden. Außerdem wurden jeweils neun Glioblastomrezidive und PZNSL-Rezidive, sowie vier PZNSL von immunsupprimierten Patienten untersucht. Als Referenz für die PZNSL wurden zwei Proben nicht pathologischer, nicht entzündlicher Tonsillen ausgewählt. Eine positive Expression des Zielgens wurde durch einen gemessenen Ct-Wert ≤ 40 definiert, wenn gleichzeitig auch die Expression des Haushaltsgens TBP in dieser Probe nachgewiesen werden konnte. Proben, welche keinen Ct-Wert für die Expression des Zielgens zeigten, jedoch gültige TBP Ct-Werte aufwiesen, wurden als negativ gewertet. Konnte auch keine Expression des Haushaltsgens festgestellt werden, so wurden die Messungen der Proben als ungültig klassifiziert. Die Berechnung der Expressionsänderung des Zielgens zum Referenzgewebe bzw. Referenzgens wurde bereits unter 2.11 detailliert beschrieben.

4.6.1 Expression von PD-1

Auf Grund der zahlreichen nicht detektierbaren Werte für PD-1 (s. Tab.7), vor allem im Referenzgewebe, konnte kein Vergleich der PD-1 Expression von Normalgewebe und neoplastischem Gewebe durchgeführt werden. Es konnte lediglich eine Aussage darüber gemacht werden, ob das Zielgen überhaupt im untersuchten Gewebe exprimiert wird. Die Ergebnisse mit den durchschnittlichen PD-1 Ct-Werten sind in Abbildung 28 für jede Tumorentität dargestellt.

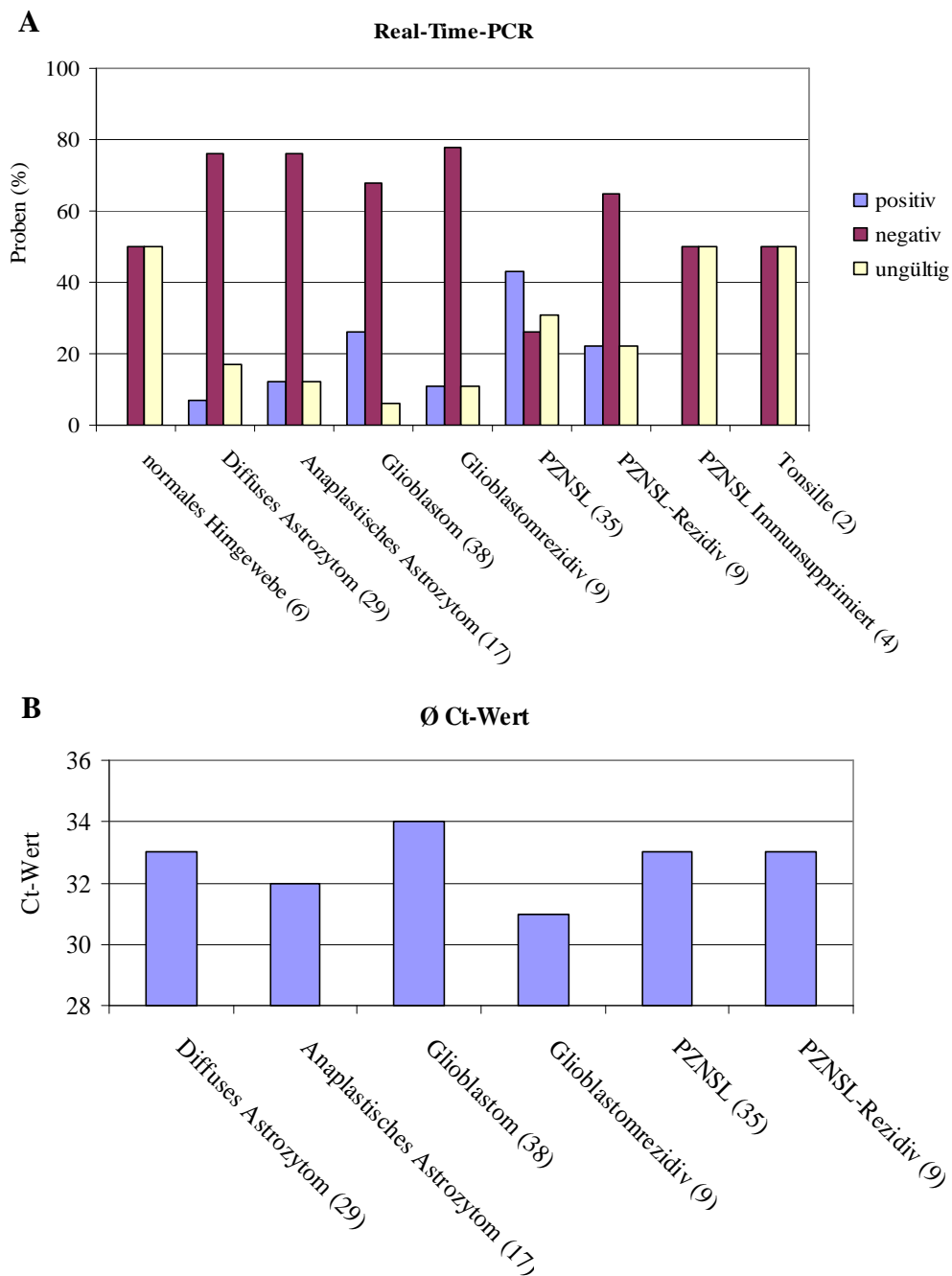


Abbildung 28: Quantitative Genexpressionsanalyse für PD-1 in verschiedenen Tumorentitäten

A: Ergebnisse der PD-1 Real-Time-PCR: Proben, welche eine Expression des Haushaltsgens zeigten und gleichzeitig einen Ct-Wert für die Expression von PD-1 werden als „positiv“ gewertet. Proben mit TBP Expression, aber ohne Ct-Wert für PD-1 gelten als „negativ“. Proben ohne Ct-Wert für das Referenzgen werden als ungültig klassifiziert. Angegeben ist die Probenmenge (%) für die jeweilige Klassifizierung in den unterschiedlichen Tumorentitäten. **B:** Durchschnittliche Ct-Werte für die Expression von PD-1 in den verschiedenen Tumorentitäten

Im normalen Hirngewebe konnten bei drei Proben gültige Ct-Werte gemessen werden, welche jedoch keine Expression von PD-1 zeigten. Bei 24 der 29 diffusen Astrozytome konnte die Expression des Haushaltsgens nachgewiesen werden, bei jedoch nur zwei Proben eine positive PD-1 Expression. Der durchschnittliche Ct-Wert dieser beiden Proben lag bei 33. 88% der anaplastischen Astrozytome konnten hinsichtlich der PD-1 Expression untersucht werden, bei 2 Proben wurde eine Expression von PD-1 detektiert. Der durchschnittliche Ct-Wert für PD-1 dieser Entität betrug 32. Von 38 Glioblastomen, konnte bei 36 die PD-1 Expression auf Grund einer vorhandenen Expression des Haushaltsgens untersucht werden. Dabei zeigten 26% eine Positivität für PD-1. Der durchschnittliche Ct-Wert betrug 34. Eine Korrelation der PD-1 Positivität mit steigender Malignität ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,12$). In einem von neun Glioblastomrezidiven konnte ebenfalls die Expression von PD-1 nachgewiesen werden, sieben Proben waren negativ und eine ungültig. Der gemittelte Ct-Wert betrug 31. Der Unterschied der PD-1 Expression zwischen Primärtumor und Rezidiv war jedoch nicht signifikant ($p = 0,66$). In 31% der Fälle konnte bei den PZNSL keine Expression des Haushaltsgens TBP detektiert werden, diese Proben wurden dann auch zur Analyse der PD-1 Expression ausgeschlossen. Von den übrigen 24 PZNSL waren 15 positiv für PD-1 und wiesen einen durchschnittlichen Ct-Wert von 33 auf. Auch bei den PZNSL Rezidiven konnte eine PD-1 Expression bei 22% nachgewiesen werden. Der Ct-Wert lag hier bei 33. Zwei der vier immunsupprimierten PZNSL Patienten zeigten die Expression von TBP, nicht aber von PD-1. Ein statistisch signifikanter Unterschied der PD-1 Positivität zwischen PZNSL und deren Rezidiven ($p = 0,46$), sowie zwischen immunkompetenten und immunsupprimierten Patienten konnte nicht gefunden werden ($p = 0,4$). Die Tonsillen, das Referenzgewebe der Lymphome, zeigten keine PD-1 Expression.

4.6.2 Expression von CD163

Bei der quantitativen Expressionsanalyse des Zielgens CD163 konnten sowohl im Referenzgewebe als auch im zu untersuchenden neoplastischen Gewebe genügend Werte ermittelt werden, welche einen aussagekräftigen Vergleich erlauben. Proben mit CD163 positiver Expression wiesen neben einem Ct-Wert ≤ 40 auch einen gültigen Ct-Wert für CD163 auf. In negativen Proben konnte nur ein Ct-Wert für das Haushaltsgen gemessen werden. Als ungültig wurden Proben klassifiziert, welche keinen Ct-Wert für das Haushaltsgen zeigten.

Bei den CD163 positiven Proben wurde wie unter 2.11 beschrieben der Wert für $2^{-\Delta\Delta Ct}$ berechnet, welcher eine Aussage über die Erhöhung bzw. Minderung der Expression von CD163 gegenüber dem Referenzgewebe trifft. Als endogene Kontrolle wurde auch hier die Expression des Haushaltsgens TBP in die Berechnungen miteinbezogen. Die Ergebnisse der CD163 Expressionsanalyse sind in Abbildung 29 dargestellt.

Mindestens 50% der Proben aller untersuchten Entitäten waren positiv für CD163. Auch das Normalgewebe zeigte eine Positivität für CD163, was eine relative Quantifizierung möglich machte. Von den 29 untersuchten diffusen Astrozytomen, waren 62% positiv für CD163. Im Vergleich zum Normalgewebe war die Expression jedoch um die Hälfte reduziert. Bei den anaplastischen Astrozytomen konnten 82% der Proben als CD163 positiv klassifiziert werden. Die CD163 Expression war um das 17fache gegenüber dem Normalgewebe gestiegen. 95% der Glioblastome zeigten eine CD163 Expression, welche knapp 50 Mal höher als im Normalgewebe war. Die Korrelation zwischen der gesteigerten CD163 Expression und der Malignität war eindeutig signifikant ($p < 0,01$). Die Erhöhung der CD163 Expression im Gewebe der Glioblastomrezidive war fast 3 Mal so hoch wie die des Primärtumors, der Unterschied jedoch wegen der Stichprobengröße statistisch nicht signifikant ($p = 0,12$). Bei den primären ZNS Lymphomproben konnten 69% als CD163 positiv klassifiziert werden. Dabei war die Expression des Makrophagenmarkers 70 Mal höher als im Referenzgewebe, den Tonsillen. Die 10fache Erhöhung in den Rezidiven dieser Tumoren war vergleichsweise gering und der Unterschied zum Primärtumor statistisch signifikant ($p = 0,02$). Zwei der untersuchten Proben der immunsupprimierten PZNSL Patienten waren CD163 positiv. Es ergab sich nach dem Vergleich mit dem Normalgewebe eine Steigerung um über das 60fache, wobei der Unterschied der CD163 Expression zwischen immunsupprimierten und immunkompetenten nicht signifikant war ($p = 0,92$). Letztendlich konnte eine generell starke Erhöhung der CD163 Expression in allen neoplastischen Geweben im Vergleich zum Normalgewebe festgestellt werden.

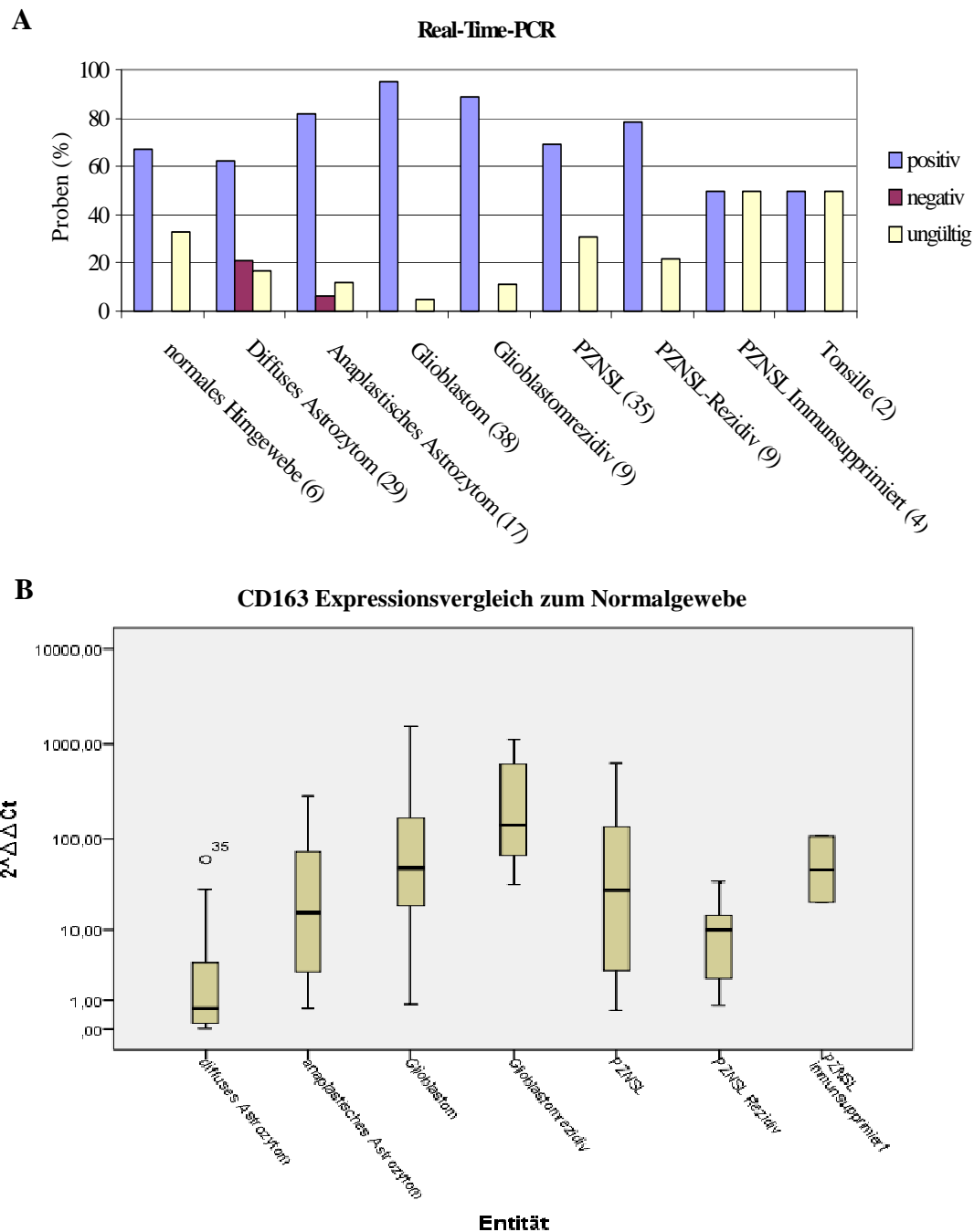


Abbildung 29: Quantitative Genexpressionsanalyse für CD163 in verschiedenen Tumorentitäten

A: Ergebnisse der CD163 Real-Time-PCR: Proben, welche eine Expression des Haushaltsgens zeigten und gleichzeitig einen Ct-Wert für die Expression von CD163 werden als „positiv“ gewertet. Proben mit TBP Expression, aber ohne Ct-Wert für CD163 gelten als „negativ“. Proben ohne Ct-Wert für das Referenzgen werden als ungültig klassifiziert. Angegeben ist die Probenmenge (%) für die jeweilige Klassifizierung in den unterschiedlichen Tumorentitäten. **B:** Verhältnis der CD163 Expression im Vergleich zum Normalgewebe ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) für die verschiedenen Tumorentitäten. Als Referenzgewebe für die Gliome wurde Normalgewebe des ZNS und für die Lymphome normale Tonsillen als Referenz gewählt. Die Auftragung der Werte für $2^{-\Delta\Delta Ct}$ im Boxplot erfolgt logarithmisch zur besseren Übersicht.

5. Diskussion

Die Mikroumgebung in Tumoren bestimmt neben dem klinischen Verlauf auch Schweregrad und das Ansprechen auf eine Therapie. Sie ist für die Tumorbekämpfung durch das Immunsystem essentiell (Dave et al., 2004; Drach et al., 2005). Vor allem die zelluläre Zusammensetzung spielt eine wichtige Rolle in der Modulation der Immunantwort. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Zellpopulationen in verschiedenen Hirntumorentitäten charakterisiert und quantifiziert, um die Bedeutung dieser Zellpopulationen hinsichtlich der Tumorentwicklung zu erläutern. Diese Immunphänotypisierung der Zellen wurde in Gliomen unterschiedlicher WHO Grade sowie in primären ZNS Lymphomen durchgeführt. Der Fokus wurde auf die Expression von PD-1 gelegt. Bei diesem Marker handelt es sich um einen inhibitorischen Kostimulator, welcher durch Bindung seiner Liganden PDL-1 und PDL-2 aktiviert wird und eine Inaktivierung der Trägerzelle bewirkt (Agata et al., 1996). Eine ausgeprägte Expression des Liganden PDL-1 (B7-H1) konnte bereits in einer Reihe von Tumoren nachgewiesen werden (Dong et al., 2002), ebenso eine Inaktivierung von T-Zellen und eine damit einhergehende Minderung der Proliferationskapazität und Zytokinsekretion dieser Zellen (Freeman et al., 2000). Die Fähigkeit der Immunmodulation in Tumoren macht die PD-1 positiven Zellen zu einer äußerst interessanten Population und bietet Anlass, sie genauer zu charakterisieren und deren Vorkommen mit anderen Populationen zu korrelieren. Es wurden neben PD-1 auch die FOXP-3 Expression untersucht. FOXP-3 wird von regulatorischen T-Zellen exprimiert, welche ebenfalls eine wichtige Bedeutung bei der Immunregulation in Tumoren haben (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Die gesamte T-Zellpopulation wurde durch den Marker CD3 identifiziert. Neben immunregulatorischen Lymphozyten wurde eine Population von Makrophagen entdeckt, welchen immunregulatorische Eigenschaften zugesprochen werden und die sowohl Tumorwachstum, als auch eine tumorspezifische T-Zellantwort beeinflusst (Law et al., 1993; Zwadlo et al., 1987). Daher wurde die Subpopulation regulatorische Makrophagen über die CD163 Expression in Gliomen und primären ZNS Lymphomen analysiert. Neben der Phänotypisierung und Quantifizierung der immunregulatorischen Zellen, wurde eine quantitative Genexpressionsanalyse für die beiden regulatorischen Marker PD-1 und CD163 durchgeführt, um ebenfalls die transkriptionelle Expression dieser Marker zu untersuchen.

5.1 Immunregulation in Gliomen

5.1.1 Tumor-infiltrierende T-Zellen (TIL)

Die Infiltration von Tumoren durch verschiedene Lymphozytenpopulationen, mehrheitlich T-Lymphozyten, sowie deren Bedeutung für die Tumorentwicklung wurde schon früh entdeckt (Farmer et al., 1989; Miescher et al., 1988). In Gliomen, der im ZNS am häufigsten auftretenden Tumorentität bei Erwachsenen, konnten diese T-Zellen bereits nachgewiesen werden (Ridley und Cavanagh, 1971). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden CD3+ T-Zellen mit unterschiedlicher Häufigkeit in Gliomen identifiziert und je nach WHO Grad ein Unterschied zum Normalgewebe des ZNS deutlich. Bei den niedrig malignen Gliomen, den diffusen Astrozytomen, konnte zwar eine Zunahme an CD3+ T-Zellen beobachtet werden, welche jedoch statistisch nicht signifikant zu denen im Normalgewebe war. In den anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III), sowie den Glioblastomen (WHO Grad IV) war jedoch eine deutliche Zunahme der T-Lymphozyten erkennbar, was für eine Korrelation von CD3+ T-Zellen mit der Malignität in Gliomen spricht.

Die zu untersuchenden immunsupprimierenden T-Zellpopulationen, die regulatorischen T-Zellen (FOXP-3+), sowie die PD-1 exprimierenden T-Zellen waren signifikant nur im Glioblastom gegenüber dem Normalgewebe erhöht. Es zeigte sich auch hier eine Korrelation mit der Malignität in Gliomen, wobei niedrig maligne Gliome noch keine Ausprägungen dieser Zellpopulationen zeigten. Dieses Resultat bestätigt bisher bekannte Ergebnisse. El Andaloussi und Lesniak (2007) fanden eine positive Korrelation zwischen FOXP-3+ regulatorischen T-Zellen und der Malignität von Astrozytomen, sowie der Tumorprogression. Eine Korrelation FOXP-3+ Treg mit der Immunsuppression ist ebenfalls entdeckt worden (Gavin et al., 2007). Generell kann für Tumoren mit infiltrierenden Tregs eine schlechte Prognose gegeben werden (Knutson et al., 2007).

T-Zellpopulationen, welche eine Immunantwort über den PD-1 Signalweg inhibieren, wurden von Jacobs et al. (2009) in einem Viertel der dort untersuchten Gliome nachgewiesen. In den eigenen Untersuchungen konnten in 28% der low-grade Astrozytome und in 56% (WHO Grad III) bzw. 90% (WHO Grad IV) der high-grade Gliome PD-1+ Zellen mit geringer Häufigkeit identifiziert werden. Die Lymphozyten waren dabei nicht nur perivascular, sondern auch diffus im Tumorgewebe identifizierbar. Diese Korrelation zur Malignität spricht dafür, dass PD-1+ T-Zellpopulation ebenfalls eine immunsuppressive Wirkung auf Hirntumoren haben könnten und somit deren Progression indirekt fördern könnten.

Die Aktivierung der negativen regulatorischen Signalwege in T-Zellen erfolgt durch den Tumor selbst, welcher am Beispiel des PD-1, dessen Ligand, B7-H1, überexprimiert und somit eine Stimulation von PD-1 erzeugt (Parsa et al., 2007; Strege et al., 2004). Diese „Strategie“, über die Expression von B7-H1 der Immunantwort auszuweichen, konnte unter anderem in Bronchialkarzinomen, Ovarialkarzinomen, Kolonkarzinomen, Melanomen und auch Gliomen nachgewiesen werden (Dong et al., 2002). Erwiesenermaßen kann der PD-1 Signalweg auch zu einer Stabilisierung der regulatorischen T-Zellpopulation beitragen und das Gleichgewicht der anti-Tumorimmunantwort zugunsten des Tumors verschieben (Blank et al., 2005). Zwischen FOXP-3+ Zellen (Treg) und PD-1 exprimierenden Zellen ergab sich eine positive Korrelation und unterstützt somit diese These.

Es konnte außerdem in der vorliegenden Arbeit ein positiver Zusammenhang zwischen dem Ki-67-Index und dem WHO Grad der Gliome gezeigt werden. In den low-grade Astrozytomen (WHO Grad II) war die Rate Ki-67 positiver Zellen geringer als in den high-grade Astrozytomen (WHO Grad III und IV). Signifikante Unterschiede traten aber auch zwischen WHO Grad III und WHO Grad IV Gliomen auf. Vergangene Studien konnten bisher noch keine eindeutigen Ki-67-Indizes für die Astrozytome festlegen. Große Schwankungen der Werte bei unterschiedlichen Probenmengen sowie Diskrepanzen bezüglich der signifikanten Unterschiede zwischen den WHO Graden sind das Ergebnis (Johannessen und Torp, 2006). Gründe für diese Diskrepanzen zwischen den Studien und auch den eigenen Ergebnissen sind auf Abweichungen bei der Gewebeverarbeitung, der immunhistochemischen Färbemethode, sowie Interpretationsmethoden der Färbungen zurückzuführen. Die hier vorliegenden Resultate sind vergleichbar mit denen von Di et al. (1997), Enestrom et al. (1998) und Wakimoto et al. (1996), welche ähnliche Ki-67 Werte für die Tumorgade, sowie signifikante Unterschiede zwischen den WHO Graden fanden. Eine eindeutige positive Korrelation des Ki-67-Index mit dem Auftreten regulatorischer T-Zellpopulationen konnte jedenfalls bewiesen werden.

5.1.2 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM)

Tumor-assoziierte Makrophagen und Mikroglia stellen einen wichtigen Bestandteil der Mikroumgebung in Tumoren dar und spielen eine bedeutende Rolle für die Entwicklung und Progression des Tumors (Lewis und Pollard, 2006; Mantovani et al., 2006; Sica et al., 2006). Neben den M1 Makrophagen, welche sich durch eine intakte Effektorfunktion und eine proinflammatorische Zytokinproduktion auszeichnen, übernehmen die alternativ aktivierten Makrophagen (M2) immunregulatorische Funktionen und stellen somit für Tumoren einen potentiellen Mechanismus zum Entgehen einer tumorspezifischen Immunantwort dar (Gordon, 2003). M2 Makrophagen haben nur noch wenig intakte Funktionen des angeborenen Immunsystems, können nur schlecht stimuliert werden und zeigen keine Hochregulation kostimulatorischer Moleküle zur Aktivierung der T-Zellen, um eine erfolgreiche anti-Tumorimmunantwort hervorzurufen (Hussain et al., 2005). Die regulatorischen Makrophagen zeichnen sich durch eine Expression von CD163 aus. Die gesamte Makrophagenpopulation lässt sich durch die Expression von CD68 nachweisen. Bereits in einer Reihe anderer Tumoren konnte diese Population der M2 Makrophagen identifiziert und eine negative Korrelation mit der Überlebensrate hergestellt werden (Bronkhorst et al., 2011; Hasita et al., 2010; Kurahara et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die M2 Makrophagen, als auch die gesamte Makrophagenpopulation in Gliomen unterschiedlicher Malignitätsstufen untersucht und mit dem Auftreten im Normalgewebe verglichen. Sowohl bei den high-grade Gliomen (anaplastische Astrozytome, WHO Grad III und Glioblastome WHO Grad IV), als auch bei den low-grade Gliomen (diffuse Astrozytome, WHO Grad II), ließ sich eine signifikante Zunahme CD68+ und CD163+ Makrophagen und Mikrogliazellen feststellen. Dabei wurde deutlich, dass die CD163+ Zellpopulation immer eine Subpopulation der CD68+ Makrophagen ist. Eine positive Korrelation zwischen der Malignitätsstufe und der Expression zeigte sich nur bei den CD163+ regulatorischen Makrophagen, nicht aber bei der Population der Gesamtmakrophagen. Diese Ergebnisse stützen bereits vorhandenen Studien (Komohara et al., 2008). Auch die gefundene Korrelation von regulatorischen Makrophagen mit dem Vaskularisierungsgrad in Gliomen (Kodelja et al., 1997; Nishie et al., 1999) passt zu diesen Ergebnissen und bekräftigt die These, dass die Population der alternativ aktivierten M2 Makrophagen tatsächlich in Zusammenhang mit dem Tumorwachstum und der Progression steht.

Durch die Sekretion von IL-10, TGF- β oder Arginase-1 hemmen die M2 Makrophagen die T-Zellaktivität gegen den Tumor (Roussel et al., 1996) und können gleichzeitig über bestimmte Faktoren, wie z.B. Stickstoffradikale oder mutagenen Sauerstoff die Tumorprogression stimulieren. Der Tumor wiederum fördert eine Polarisation der M2 Makrophagen (Pollard, 2004). Diese gegenseitige Abhängigkeit der M2 Makrophagen und des Tumors erklärt die Zunahme der CD163+ TAM in maligneren Gliomen. Sowohl die CD68+ als auch die CD163+ Makrophagen zeigten eine positive Korrelation zum Ki-67-Index. Außerdem konnten in dieser Arbeit bei Gliompatienten mehr CD163+ Makrophagen festgestellt werden, als bei jüngeren Patienten. Dies könnte bedeuten, dass die Inhibition der tumorspezifischen Immunantwort erfolgreicher bei älteren und gleichzeitig auch etwas immunschwächeren Patienten ist. Dieses Ergebnis sollte jedoch kritisch betrachtet werden, da keine der anderen untersuchten Immunzellen eine Korrelation mit dem Alter gezeigt haben.

5.2 Immunregulatorische T-Zellen und Makrophagen in primären ZNS Lymphomen

5.2.1 Tumor-infiltrierende T-Zellen (TIL)

Die zelluläre Zusammensetzung der Mikroumgebung spielt auch bei Tumoren, welche sich aus Immunzellen gebildet haben, eine wichtige Rolle. Untersuchungen der TIL in Lymphomen zeigten eine nicht einheitliche Lymphozytenverteilung in der Mikroumgebung und geben Hoffnung, diese zukünftig als diagnostischer Marker nutzen zu können (Muenst et al., 2009). Dies würde vor allem bei den primären ZNS Lymphomen nützlich sein, da diese auf Grund ihrer Lokalisation in einem immunologisch spezialisierten Bereich schlechtere Prognosen haben, als die nodalen Non-Hodgkin-Lymphome (Norden et al., 2011). Die DLBCL sind der am häufigsten auftretende Typ der PZNSL und damit auch die interessanteste Entität, um die TIL zu untersuchen. Der Fokus wurde hier ebenfalls auf die regulatorischen Lymphozytenpopulationen gelegt, die Treg (FOXP-3+) und die PD-1+ Zellen, welche die Tumorentwicklung beeinflussen können. Einen deutlichen Unterschied im Vorkommen dieser Zellen zwischen neoplastischem Gewebe und Normalgewebe des ZNS konnte generell für die T-Zellen (CD3+) als auch für die PD-1+ Zellen, sowie die Treg (FOXP-3+) festgestellt werden. Die Population PD-1+ Zellen war sehr häufig, auch im Vergleich zu den vorher untersuchten Gliomen, ebenso wie die Population der FOXP-3+ Tregs.

Dieses starke Auftreten der PD-1+ und FOXP-3+ Zellen konnte bereits in nodalen folliculären Lymphomen nachgewiesen werden und mit einer besseren Überlebensrate korreliert werden. In der gleichen Arbeit traten in den DLBCLs jedoch geringere PD-1+ Zellpopulation auf, was mit einer schlechteren Prognose korrelierte (Carreras et al., 2009). Überträgt man diese Korrelation zwischen PD-1+ Zellen und Überlebensrate auf die eigenen Ergebnisse, hätten die DLBCL des ZNS demnach eine gute Überlebensrate. Es muss dabei allerdings beachtet werden, dass diese Korrelation bei nodalen Lymphomen gefunden wurde, welche nicht in einem immunprivilegierten Bereich liegen. Ein ungleiches Muster bezüglich der TIL in Lymphknoten und Gehirn konnte bereits nachgewiesen werden und durch unterschiedliche Immunantworten, begünstigt durch eine differentielle Expression der Tumorantigene, erklärt werden (Riemersma et al., 2005).

Carreras et al. (2009) konnte bei der genaueren Charakterisierung der Zellen keine doppelt positiven Zellen in Lymphomen (PD-1+ und FOXP-3+) identifizieren. Auch die eigenen Daten der Immunfluoreszenzdoppelfärbung schlossen eine PD-1 Expression auf FOXP-3+ Treg in 17 von 18 Fällen aus. Nur in einer Probe konnten doppelt positive Zellen identifiziert werden. Eine Interaktion der Treg mit dem PD-1 Signalweg, nämlich über eine Bindung an B7-H1, ist folglich nicht auszuschließen (Wilcox et al., 2009; Yang et al., 2006).

Eine Korrelation zwischen den verschiedenen TIL und der Manifestationsart konnte nicht gefunden werden, genauso wenig wie ein Zusammenhang zwischen TIL und dem Ki-67-Index. Diese war in den untersuchten PZNSL mit 49,8% sogar deutlich über der der Gliome. In anderen Studien konnten Ki-67-Indizes zwischen 23% und 53% festgestellt werden, welche jedoch nicht mit der Überlebensrate korrelierten (Aho et al., 1995; Deckert-Schluter et al., 1998; Roser et al., 2004). Damit wäre der erhaltene Ki-67-Index der 42 untersuchten PZNSL zwar hoch, aber liegt immer noch im Rahmen bisher bekannter Ergebnisse. Im Vergleich zu nodalen DLBCL konnte kein Unterschied bezüglich des Ki-67-Index festgestellt werden (Bhagavathi, 2009).

Bei den durchgeführten Experimenten konnte eine signifikante Korrelation zwischen PD-1+ TIL und dem Alter der DLBCL Patienten gefunden werden, wobei ältere Patienten ein höheres Auftreten dieser Zellpopulation zeigten als jüngere. Interpretieren ließe sich dies durch ein schwächeres Immunsystem bei älteren Patienten, welches eine bessere Inhibition der anti-Tumorimmunantwort ermöglicht. Dieses Ergebnis sollte jedoch kritisch betrachtet werden und durch weitere Experimente mit größeren Stichproben wiederholt werden.

Entgegen anderer Studien wurde neben den PD-1 exprimierenden TIL auch eine deutliche Expression des regulatorischen Markers auf den Tumorzellen (B-Zellen) nachgewiesen. Dorfman et al. (2006) konnten bei ihren Untersuchungen an verschiedenen Lymphomentitäten keine PD-1+ Tumorzellen identifizieren, Roncador et al. (2007) bei immerhin 3 von 98 untersuchten DLBCL. Allerdings gilt hier auch zu bemerken, dass es sich um nodale und nicht um intracerebrale DLBCLs handelte. Damit wäre die Sonderstellung des ZNS als Organ bestätigt, wodurch es eigener Studien bedarf, um die genauen Mechanismen der Immunregulation zu untersuchen.

5.2.2 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM)

Tumor-assoziierte Makrophagen konnten bereits in folliculären Lymphomen und Hodgkin-Lymphomen nachgewiesen und mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht werden (Farinha et al., 2005; Steidl et al., 2010). Spezifisch die M2 Makrophagen konnten für die niedrigere Überlebensrate verantwortlich gemacht werden (Niino et al., 2010). Diese CD163 exprimierenden Makrophagen sorgen für eine Inhibition der anti-Tumorimmunantwort und unterstützen die Angiogenese und das Tumorwachstum, während die M1 Makrophagen versuchen den Tumor zu bekämpfen (Mosser und Edwards, 2008). In den durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen konnten in allen Lymphomproben sowohl CD68+ Makrophagen, als auch die CD163+ M2 Makrophagen mit einer hohen Häufigkeit festgestellt werden. Einige Proben ließen sogar vermuten, dass die CD163+ Zellen öfter auftreten als die CD68+. Diese starke Infiltration der regulatorischen Makrophagenpopulation konnte bereits in PZNSL nachgewiesen werden, jedoch nicht mit einer Prognose verbunden werden (Komohara et al., 2011). In nodalen DLBCLs wurden ebenfalls CD163+ M2 Makrophagen nachgewiesen und mit einer schlechten Prognose korreliert (Wada et al., 2012). Nguyen et al. (2005) konnte dies nicht bestätigen, er fand keine CD163+ Zellen in Lymphomen. Auch eine Korrelation mit der Prognose bleibt umstritten (Hasselblom et al., 2008).

Ein Zusammenhang der CD68+ Makrophagen bzw. der CD163+ Makrophagen und des Ki-67-Index der DLBCLs konnte nicht festgestellt werden, genauso wenig wie eine Korrelation mit einer bestimmten Alterstufe oder dem Geschlecht. Auch die unterschiedlichen Manifestationsarten der DLBCL zeigten keine unterschiedlichen TAM Vorkommen.

5.3 Immunregulatorische Zellen in Rezidiven und immunsupprimierten DLBCL Patienten

Das immunologische Gedächtnis, sowie eine differentielle Proteinexpression von rezidierten Tumoren oder die Auswirkungen einer Therapie könnten Faktoren für eine Änderung der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten und Makrophagen sein. Der Vergleich von TIL und TAM in Gliomrezidiven mit primären Glioblastomen zeigte jedoch keinen Unterschied. Auch wenn die Häufigkeit der TIL im Rezidiv leicht erhöht schien, so war diese Differenz nicht signifikant. Allerdings war die Größe der untersuchten Rezidivproben (neun) eher gering. Auch die Rezidive der DLBCL zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vorkommen der TIL und TAM im Vergleich zum Primärtumor. Die untersuchte Stichprobenanzahl, war hier ebenfalls mit 10 Patienten gering. Die Infiltration CD3+, PD-1+ und FOXP-3+ Lymphozyten, sowie CD68+ und CD163+ Makrophagen in den Tumor scheint also unabhängig von der Bildung eines immunologischen Gedächtnis oder einer veränderten Proteinexpression des Tumors zu erfolgen.

Eine häufige Ursache für die Entwicklung eines primären ZNS Lymphoms kann neben dem spontanen Auftreten eine Immunsuppression des Patienten sein. Meistens entsteht diese durch eine bestehende HIV Infektion oder durch medikamentös bedingte Immunsuppression, zum Beispiel nach einer Transplantation (Castellano-Sanchez et al., 2004; Kleihues und Cavenee, 1998). Als möglicher Auslöser für die Entwicklung eines PZNSL wurde das Epstein-Barr Virus identifiziert, welches mit PZNSL in immunsupprimierten Patienten assoziiert werden konnte (Auperin et al., 1994; Chang et al., 1993; DeAngelis et al., 1992). Die Immunabwehr immunsupprimierter Patienten ist deutlich schwächer als bei Gesunden, was möglicherweise auch Auswirkung auf die Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen in einen vorhandenen Tumor haben kann. Immunhistochemische Untersuchungen bei sieben DLBCL immunsupprimierter Patienten haben jedoch keinen signifikanten Unterschied im Vorkommen der TIL und TAM gegenüber der DLBCL in immunkompetenten Patienten erkennen lassen.

Damit hätte die Immunsuppression dieser Patienten keinen Einfluss auf die Rekrutierung von T-Zellen und Makrophagen in den Tumor. Da allerdings nur sieben DLBCL immunsupprimierter Patienten untersucht wurden, sollte das Experiment mit einer größeren Stichprobenanzahl wiederholt werden, um das Ergebnis zu bestätigen.

5.4 Quantitative Expressionsanalyse

Die Expression der regulatorischen Marker PD-1 und CD163 wurde auch auf mRNA Ebene untersucht. Die Ergebnisse der quantitativen Expressionsanalyse entsprachen nicht denen der immunhistochemischen Untersuchungen was die Expression von PD-1 betrifft. Katou et al. (2007) fand mittels Real-Time PCR eine erhöhte PD-1 Expression in Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Die eigenen Untersuchungen zeigten jedoch keine Expression von PD-1 im Referenzgewebe, wodurch ein direkter Vergleich mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode nicht möglich war. Die Proben wurde daher mittels eines Thresholdcycles von 40 als positiv ($Ct \leq 40$) oder negativ klassifiziert ($Ct > 40$). Bei den WHO Grad IV Gliomen konnten prozentual mehr PD-1 positive Proben detektiert werden, als bei den WHO Grad II und III Astrozytomen. Eine Korrelation zwischen der Malignität der Gliome und der PD-1 Expression war zwar auf den ersten Blick zu vermuten, war aber statistisch nicht signifikant ($p = 0,12$) im Gegensatz zu den immunhistochemischen Ergebnissen. Es muss jedoch die geringere Anzahl der gemessenen Werte berücksichtigt werden, welche keine eindeutigen Schlüsse der PD-1 Expression in Gliomen zulassen und somit die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Untersuchungsarten erklären. Innerhalb der PZNSL konnten einige PD-1 positive Proben detektiert werden im Gegensatz zum Normalgewebe. Dieses Ergebnis entspricht damit tendenziell der Oberflächenexpression (Carreras et al., 2009). Auch die vergleichende quantitative Genexpressionsanalyse von PD-1 zwischen primären Gliomen und ihren Rezidiven, sowie PZNSL und ihren Rezidiven ergab keinen Unterschied.

Eine hohe Expression von CD163 wurde auch auf mRNA-Ebene bei Tumoren festgestellt (Maniecki et al., 2012). Bei den eigenen Untersuchungen konnten ebenfalls sehr hohe Expressionslevel für CD163 in neoplastischem Gewebe vergleichsweise zum gesunden festgestellt werden und die immunhistochemischen Ergebnisse stützen. Die 50fache Erhöhung von CD163 in Glioblastomen war nur leicht geringer wie die Erhöhung der CD163 Expression in den PZNSL (70fach), verglichen mit dem jeweiligen Referenzgewebe.

Diese Werte zeigen, welche bedeutende Rolle den CD163+ Makrophagen in einer funktionierenden Immunabwehr des ZNS zukommt (Galea et al., 2008). Zwischen Glioblastomen und PZNSL konnte in den immunhistochemischen Untersuchungen kein Unterschied bezüglich der hohen Häufigkeit der CD163+ Makrophagen festgestellt werden. Die quantitative Expressionsanalyse weist jedoch darauf hin, dass diese regulatorischen Makrophagen noch stärker im PZNSL als im Glioblastom vertreten sind. Ebenso wie bei den immunhistochemischen Untersuchungen wurde auch nach der quantitativen Expressionsanalyse eine Korrelation zwischen CD163 und der Malignität der Gliome festgestellt, wohingegen eine Korrelation von CD163 und der Manifestationsart in PZNSL ausgeschlossen wurde. Auch Maniecki et al. (2012) fand einen Zusammenhang zwischen der gesteigerten CD163 Expression und der Aggressivität von Blasen Tumoren, ebenso wie eine positive Korrelation mit der Überlebenszeit dieser Tumoren.

Ein signifikanter Unterschied zwischen Primärtumor und Rezidiv konnte in der quantitativen Expressionsanalyse nur bei den PZNSL festgestellt werden ($p = 0,02$). Dieser ging jedoch nicht aus den immunhistochemischen Untersuchungen hervor. Es bleibt daher fraglich, ob sich die mRNA Expression von CD163 tatsächlich vom eigentlichen Proteinlevel an der Zelloberfläche bei Primärtumor und Rezidiv unterscheidet, oder ob es an der geringen Stichprobenanzahl der PZNSL Rezidive liegt, welche die unterschiedlichen Resultate verantworten. Ein Zusammenhang zwischen der CD163 Expression bei immunkompetenten und immunsupprimierten Patienten konnte jedenfalls trotz kleiner Stichproben genau wie nach den immunhistochemischen Analysen nicht gefunden werden.

5.5. Ausblick

Um einer tumorspezifischen Immunantwort zu entgehen, haben Tumoren diverse Strategien entwickelt. Dazu gehören unter anderem auch die Aktivierung negativer Signalwege in Lymphozyten oder die Rekrutierung von Treg (Jordan et al., 2008; Parsa et al., 2007). Auch die Induktion alternativ aktivierter Makrophagen stellt einen Mechanismus zum Entgehen einer potentiellen Immunantwort dar (Gordon, 2003; Pollard, 2004). In den vorliegenden Untersuchungen konnten die Populationen der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten und Makrophagen in Gliomen identifiziert und quantifiziert werden und eine positive Korrelation mit der Malignitätsstufe dieser Tumoren gefunden werden. Regulatorische T-Zellen bieten mittlerweile ein potentielles Ziel für therapeutische Ansätze (Fecci et al., 2006; Jordan et al., 2008), wodurch eine quantitative Bestimmung der Treg Aufschluss über geeignete Therapiemöglichkeiten bieten könnte. Auch die Expression von PD-1 könnte als prognostischer Marker in Gliomen unterschiedlicher Malignität genutzt werden. Seine Funktion als Modulator der Mikroumgebung kann therapeutisch genutzt werden, indem man diesen Signalweg blockiert (Iwai et al., 2002). Da in den Lymphomen unterschiedliche Häufigkeiten FOXP-3+ und PD-1+ T-Zellen vorliegen, könnten diese beiden Zellpopulationen eine Möglichkeit zur Klassifizierung von „low-grade“ und „high-grade“ Lymphomen im ZNS darstellen und dann ebenfalls als therapeutische Ansätze dienen (Hirano et al., 2005). Dazu müssten allerdings weitere Studien, vor allem auch Überlebenszeitstudien durchgeführt werden. Auch die alternativ aktivierten Makrophagen konnten in den höher malignen Tumoren (Glioblastomen und PZNSL) in hoher Anzahl nachgewiesen werden, was auch diese Zellpopulation zu einem potentiell prognostischen Marker macht. In anderen Tumoren werden die TAMs bereits als Biomarker genutzt (Jensen et al., 2009; Mukhtar et al., 2011). Auch Versuche die Polarisierung von M2 Makrophagen zu inhibieren und somit auch das Tumorstadium zu verlangsamen, zeigten positive Ergebnisse (Fujiwara et al., 2011). Eine prognostische Aussage ist in den PZNSL jedoch nicht allein über das Vorkommen der TAMs zu treffen, da in fast allen PZNSL diese Zellpopulation häufig vorkommt. Insgesamt empfehlen sich also sowohl die TIL als auch die TAM als therapeutische Ansätze, wodurch weitere intensive Studien an diesen Zellpopulationen zukünftig erfolgversprechend sind.

6. Literaturverzeichnis

Abbott, N. J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews Neuroscience* 7, 41-53.

Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., and Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International immunology* 8, 765-772.

Aho, R., Haapasalo, H., Alanen, K., Haltia, M., Paetau, A., and Kalimo, H. (1995). Proliferative activity and DNA index do not significantly predict survival in primary central nervous system lymphoma. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 54, 826-832.

Algarra, I., Cabrera, T., and Garrido, F. (2000). The HLA crossroad in tumor immunology. *Human immunology* 61, 65-73.

Alvaro, T., Lejeune, M., Salvado, M. T., Lopez, C., Jaen, J., Bosch, R., and Pons, L. E. (2006). Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, 5350-5357.

Auperin, I., Mikolt, J., Oksenhendler, E., Thiebaut, J. B., Brunet, M., Dupont, B., and Morinet, F. (1994). Primary central nervous system malignant non-Hodgkin's lymphomas from HIV-infected and non-infected patients: expression of cellular surface proteins and Epstein-Barr viral markers. *Neuropathology and applied neurobiology* 20, 243-252.

Barker, C. F., and Billingham, R. E. (1977). Immunologically privileged sites. *Advances in immunology* 25, 1-54.

Bauer, J., Bradl, M., Hickley, W. F., Forss-Petter, S., Breitschopf, H., Linington, C., Wekerle, H., and Lassmann, H. (1998). T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition. *The American journal of pathology* 153, 715-724.

Bechmann, I. (2005). Failed central nervous system regeneration: a downside of immune privilege? *Neuromolecular medicine* 7, 217-228.

Bhagavathi, S. (2009). Role of reactive perivascular lymphocytic infiltrate in primary central nervous system lymphoma. *Journal of postgraduate medicine* 55, 240-241.

- Blank, C., Gajewski, T. F., and Mackensen, A. (2005). Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 54, 307-314.
- Bover, L. C., Cardo-Vila, M., Kuniyasu, A., Sun, J., Rangel, R., Takeya, M., Aggarwal, B. B., Arap, W., and Pasqualini, R. (2007). A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *Journal of immunology* 178, 8183-8194.
- Bronkhorst, I. H., Ly, L. V., Jordanova, E. S., Vrolijk, J., Versluis, M., Luyten, G. P., and Jager, M. J. (2011). Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Investigative ophthalmology & visual science* 52, 643-650.
- Burger, P. C. and Scheithauer, B. W. (2007). *Tumors of the Central Nervous System, Vol First Edition, (USA: American Registry of Pathology).*
- Burger, P. C., Scheithauer, B. W., and Vogel, F. S. (2002). *Surgical pathology of the nervous system and its coverings, Vol Fourth Edition, (Philadelphia: Elsevir Science).*
- Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Roncador, G., Villamor, N., Colomo, L., Martinez, A., Hamoudi, R., Howat, W. J., Montserrat, E., and Campo, E. (2009). High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 1470-1476.
- Castellano-Sanchez, A. A., Li, S., Qian, J., Lagoo, A., Weir, E., and Brat, D. J. (2004). Primary central nervous system postransplant lymphoproliferative disorders. *American journal of clinical pathology* 121, 246-253.
- CBTRUS (2010). *CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2004-2006. In, C.B.T.R.o.t.U. States, ed. (Hinsdale, IL).*
- Chang, K. L., Albuja, P. F., Chen, Y. Y., Johnson, R. M., and Weiss, L. M. (1993). High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. *Blood* 81, 496-501.
- Cserr, H. F., and Knopf, P. M. (1992). Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunology today* 13, 507-512.
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., *et al.* (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine* 10, 942-949.

- Dave, S. S., Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Gascoyne, R. D., Chan, W. C., Fisher, R. I., Braziel, R. M., Rimsza, L. M., Grogan, T. M., *et al.* (2004). Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *The New England journal of medicine* 351, 2159-2169.
- DeAngelis, L. M., Wong, E., Rosenblum, M., and Furneaux, H. (1992). Epstein-Barr virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and non-AIDS primary central nervous system lymphoma. *Cancer* 70, 1607-1611.
- Deckert-Schluter, M., Rang, A., and Wiestler, O. D. (1998). Apoptosis and apoptosis-related gene products in primary non-Hodgkin's lymphoma of the central nervous system. *Acta neuropathologica* 96, 157-162.
- Di, X., Nishizaki, T., Harada, K., Kajiwara, K., Nakayama, H., and Ito, H. (1997). Proliferative potentials of glioma cells and vascular components determined with monoclonal antibody MIB-1. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 16, 389-394.
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., *et al.* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine* 8, 793-800.
- Dorfman, D. M., Brown, J. A., Shahsafaei, A., and Freeman, G. J. (2006). Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *The American journal of surgical pathology* 30, 802-810.
- Drach, J., Seidl, S., and Kaufmann, H. (2005). Treatment of mantle cell lymphoma: targeting the microenvironment. *Expert review of anticancer therapy* 5, 477-485.
- Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137-148.
- Eby, N. L., Grufferman, S., Flannelly, C. M., Schold, S. C., Jr., Vogel, F. S., and Burger, P. C. (1988). Increasing incidence of primary brain lymphoma in the US. *Cancer* 62, 2461-2465.
- El Andaloussi, A., and Lesniak, M. S. (2007). CD4+ CD25+ FOXP-3+ T-cell infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with tumor grade in human gliomas. *Journal of neuro-oncology* 83, 145-152.
- Ellison, D. W., and Wilkins, B. S. (2001). Lymphoma and the nervous system. *Current topics in pathology Ergebnisse der Pathologie* 95, 239-265.

- Enestrom, S., Vavruch, L., Franlund, B., and Nordenskjold, B. (1998). Ki-67 antigen expression as a prognostic factor in primary and recurrent astrocytomas. *Neuro-Chirurgie* 44, 25-30.
- Fabriek, B. O., Polfliet, M. M., Vloet, R. P., van der Schors, R. C., Ligtenberg, A. J., Weaver, L. K., Geest, C., Matsuno, K., Moestrup, S. K., Dijkstra, C. D., and van den Berg, T. K. (2007). The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood* 109, 5223-5229.
- Fabriek, B. O., van Bruggen, R., Deng, D. M., Ligtenberg, A. J., Nazmi, K., Schornagel, K., Vloet, R. P., Dijkstra, C. D., and van den Berg, T. K. (2009). The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* 113, 887-892.
- Farinha, P., Masoudi, H., Skinnider, B. F., Shumansky, K., Spinelli, J. J., Gill, K., Klasa, R., Voss, N., Connors, J. M., and Gascoyne, R. D. (2005). Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood* 106, 2169-2174.
- Farmer, J. P., Antel, J. P., Freedman, M., Cashman, N. R., Rode, H., and Villemure, J. G. (1989). Characterization of lymphoid cells isolated from human gliomas. *Journal of neurosurgery* 71, 528-533.
- Fecci, P. E., Sweeney, A. E., Grossi, P. M., Nair, S. K., Learn, C. A., Mitchell, D. A., Cui, X., Cummings, T. J., Bigner, D. D., Gilboa, E., and Sampson, J. H. (2006). Systemic anti-CD25 monoclonal antibody administration safely enhances immunity in murine glioma without eliminating regulatory T cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 4294-4305.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2003). FOXP-3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 4, 330-336.
- Ford, A. L., Foulcher, E., Lemckert, F. A., and Sedgwick, J. D. (1996). Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. *The Journal of experimental medicine* 184, 1737-1745.
- Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K., and Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 206, 3015-3029.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., *et al.* (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine* 192, 1027-1034.

- Fujiwara, Y., Komohara, Y., Ikeda, T., and Takeya, M. (2011). Corosolic acid inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of signal transducer and activator of transcription-3 and nuclear factor-kappa B in tumor cells and tumor-associated macrophages. *Cancer science* 102, 206-211.
- Galea, I., Felton, L. M., Waters, S., van Rooijen, N., Perry, V. H., and Newman, T. A. (2008). Immune-to-brain signalling: the role of cerebral CD163-positive macrophages. *Neuroscience letters* 448, 41-46.
- Gavin, M. A., Rasmussen, J. P., Fontenot, J. D., Vasta, V., Manganiello, V. C., Beavo, J. A., and Rudensky, A. Y. (2007). FOXP-3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445, 771-775.
- Glas, A. M., Knoop, L., Delahaye, L., Kersten, M. J., Kibbelaar, R. E., Wessels, L. A., van Laar, R., van Krieken, J. H., Baars, J. W., Raemaekers, J., *et al.* (2007). Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, 390-398.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology* 3, 23-35.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734-738.
- Harris N, Jaffe E S, Stein H, Banks P M, Chan J KC, Cleary C D, *et al.* (1994). A Revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361-1392
- Hasita, H., Komohara, Y., Okabe, H., Masuda, T., Ohnishi, K., Lei, X. F., Beppu, T., Baba, H., and Takeya, M. (2010). Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer science* 101, 1913-1919.
- Hasselblom, S., Hansson, U., Sigurdardottir, M., Nilsson-Ehle, H., Ridell, B., and Andersson, P. O. (2008). Expression of CD68+ tumor-associated macrophages in patients with diffuse large B-cell lymphoma and its relation to prognosis. *Pathology international* 58, 529-532.
- Hickey, W. F. (1991). Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain pathology* 1, 97-105.
- Hirano, H., Tabuchi, Y., Kondo, T., Zhao, Q. L., Ogawa, R., Cui, Z. G., Feril, L. B., Jr., and Kanayama, S. (2005). Analysis of gene expression in apoptosis of human lymphoma U937 cells induced by heat shock and the effects of alpha-phenyl N-tert-butyl nitron (PBN) and its derivatives. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 10, 331-340.

Hochberg, F. H., and Miller, D. C. (1988). Primary central nervous system lymphoma. *Journal of neurosurgery* 68, 835-853.

Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4⁺ T cells. *Advances in immunology* 81, 331-371.

Hussain, I., Piepenbrink, M. S., Fitch, K. J., Marsh, J. A., and Dietert, R. R. (2005). Developmental immunotoxicity of cyclosporin-A in rats: age-associated differential effects. *Toxicology* 206, 273-284.

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal* 11, 3887-3895.

Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., and Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12293-12297.

Jacobs, J. F., Idema, A. J., Bol, K. F., Nierkens, S., Grauer, O. M., Wesseling, P., Grotenhuis, J. A., Hoogerbrugge, P. M., de Vries, I. J., and Adema, G. J. (2009). Regulatory T cells and the PD-L1/PD-1 pathway mediate immune suppression in malignant human brain tumors. *Neuro-oncology* 11, 394-402.

Janeway, C. A., Walport, P. T. M., and Shlomchik, M. (2002). *Immunologie*, Vol 5, (Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag GmbH).

Jensen, T. O., Schmidt, H., Moller, H. J., Hoyer, M., Maniecki, M. B., Sjoegren, P., Christensen, I. J., and Steiniche, T. (2009). Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 3330-3337.

Johannessen, A. L., and Torp, S. H. (2006). The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathology oncology research : POR* 12, 143-147.

Jordan, J. T., Sun, W., Hussain, S. F., DeAngulo, G., Prabhu, S. S., and Heimberger, A. B. (2008). Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 57, 123-131.

Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7556-7561.

- Katou, F., Ohtani, H., Watanabe, Y., Nakayama, T., Yoshie, O., and Hashimoto, K. (2007). Differing phenotypes between intraepithelial and stromal lymphocytes in early-stage tongue cancer. *Cancer research* 67, 11195-11201.
- Keir, M. E., Liang, S. C., Guleria, I., Latchman, Y. E., Qipo, A., Albacker, L. A., Koulmanda, M., Freeman, G. J., Sayegh, M. H., and Sharpe, A. H. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine* 203, 883-895.
- Khong, H. T., and Restifo, N. P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nature immunology* 3, 999-1005.
- Kim, Y. J., Romeike, B. F., Uszkoreit, J., and Feiden, W. (2006). Automated nuclear segmentation in the determination of the Ki-67 labeling index in meningiomas. *Clinical neuropathology* 25, 67-73.
- Kitazawa, Y., Fujino, M., Wang, Q., Kimura, H., Azuma, M., Kubo, M., Abe, R., and Li, X. K. (2007). Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4+CD25+ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses. *Transplantation* 83, 774-782.
- Kleihues, P., and Cavenee, W. K. (1998). Pathology and genetics of tumours of the nervous system. (USA: Oxford University Press).
- Knutson, K. L., Disis, M. L., and Salazar, L. G. (2007). CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 56, 271-285.
- Kodelja, V., Muller, C., Tenorio, S., Schebesch, C., Orfanos, C. E., and Goerdt, S. (1997). Differences in angiogenic potential of classically vs alternatively activated macrophages. *Immunobiology* 197, 478-493.
- Kolles, H., Niedermayer, I., and Feiden, W. (1998). [Grading of astrocytomas and oligodendrogliomas]. *Der Pathologe* 19, 259-268.
- Komohara, Y., Horlad, H., Ohnishi, K., Ohta, K., Makino, K., Hondo, H., Yamanaka, R., Kajiwara, K., Saito, T., Kuratsu, J., and Takeya, M. (2011). M2 macrophage/microglial cells induce activation of Stat3 in primary central nervous system lymphoma. *Journal of clinical and experimental hematopathology : JCEH* 51, 93-99.
- Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J., and Takeya, M. (2008). Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *The Journal of pathology* 216, 15-24.

- Konnikova, L., Kotecki, M., Kruger, M. M., and Cochran, B. H. (2003). Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC cancer* 3, 23.
- Kristiansen, M., Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H. J., Law, S. K., and Moestrup, S. K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409, 198-201.
- Kurahara, H., Shinchu, H., Mataka, Y., Maemura, K., Noma, H., Kubo, F., Sakoda, M., Ueno, S., Natsugoe, S., and Takao, S. (2011). Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *The Journal of surgical research* 167, e211-219.
- Law, S. K., Micklem, K. J., Shaw, J. M., Zhang, X. P., Dong, Y., Willis, A. C., and Mason, D. Y. (1993). A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *European journal of immunology* 23, 2320-2325.
- Lee, L. G., Connell, C. R., and Bloch, W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic acids research* 21, 3761-3766.
- Lennert, K. und Feller, A.C. (1990). *Histopathologie der Non-Hodgkin-Lymphome*, Second Edition, (Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag).
- Lewis, C. E., and Pollard, J. W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer research* 66, 605-612.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica* 114, 97-109.
- Maniecki, M. B., Etzerodt, A., Ulhoi, B. P., Steiniche, T., Borre, M., Dyrskjot, L., Orntoft, T. F., Moestrup, S. K., and Moller, H. J. (2012). Tumor-promoting macrophages induce the expression of the macrophage-specific receptor CD163 in malignant cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*.
- Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P., and Sica, A. (2006). Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer metastasis reviews* 25, 315-322.
- Miescher, S., Stoeck, M., Qiao, L., Barras, C., Barrelet, L., and von Flidner, V. (1988). Proliferative and cytolytic potentials of purified human tumor-infiltrating T lymphocytes.

Impaired response to mitogen-driven stimulation despite T-cell receptor expression. *International journal of cancer Journal international du cancer* 42, 659-666.

Miller, D. C., Hochberg, F. H., Harris, N. L., Gruber, M. L., Louis, D. N., and Cohen, H. (1994). Pathology with clinical correlations of primary central nervous system non-Hodgkin's lymphoma. The Massachusetts General Hospital experience 1958-1989. *Cancer* 74, 1383-1397.

Miller, S. D., McMahon, E. J., Schreiner, B., and Bailey, S. L. (2007). Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1103, 179-191.

Mills, S.E. (2006). *Histology for Pathologists, Vol Third Edition*, (England: Lippincott Williams & Wilkins).

Mosser, D. M., and Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology* 8, 958-969.

Muenst, S., Hoeller, S., Dirnhofer, S., and Tzankov, A. (2009). Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. *Human pathology* 40, 1715-1722.

Mukhtar, R. A., Nseyo, O., Campbell, M. J., and Esserman, L. J. (2011). Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics* 11, 91-100.

Nguyen, T. T., Schwartz, E. J., West, R. B., Warnke, R. A., Arber, D. A., and Natkunam, Y. (2005). Expression of CD163 (hemoglobin scavenger receptor) in normal tissues, lymphomas, carcinomas, and sarcomas is largely restricted to the monocyte/macrophage lineage. *The American journal of surgical pathology* 29, 617-624.

Niino, D., Komohara, Y., Murayama, T., Aoki, R., Kimura, Y., Hashikawa, K., Kiyasu, J., Takeuchi, M., Suefuji, N., Sugita, Y., *et al.* (2010). Ratio of M2 macrophage expression is closely associated with poor prognosis for Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL). *Pathology international* 60, 278-283.

Nishie, A., Ono, M., Shono, T., Fukushi, J., Otsubo, M., Onoue, H., Ito, Y., Inamura, T., Ikezaki, K., Fukui, M., *et al.* (1999). Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 5, 1107-1113.

Norden, A. D., Drappatz, J., Wen, P. Y., and Claus, E. B. (2011). Survival among patients with primary central nervous system lymphoma, 1973-2004. *Journal of neuro-oncology* 101, 487-493.

- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta neuropathologica* 109, 93-108.
- Olson, J. K., and Miller, S. D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *Journal of immunology* 173, 3916-3924.
- Panageas, K. S., Elkin, E. B., DeAngelis, L. M., Ben-Porat, L., and Abrey, L. E. (2005). Trends in survival from primary central nervous system lymphoma, 1975-1999: a population-based analysis. *Cancer* 104, 2466-2472.
- Parsa, A. T., Waldron, J. S., Panner, A., Crane, C. A., Parney, I. F., Barry, J. J., Cachola, K. E., Murray, J. C., Tihan, T., Jensen, M. C., *et al.* (2007). Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nature medicine* 13, 84-88.
- Pollard, J. W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews Cancer* 4, 71-78.
- Probst, H. C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T., and van den Broek, M. (2005). Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nature immunology* 6, 280-286.
- Ransohoff, R. M., Kivisakk, P., and Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature reviews Immunology* 3, 569-581.
- Ridley, A., and Cavanagh, J. B. (1971). Lymphocytic infiltration in gliomas: evidence of possible host resistance. *Brain : a journal of neurology* 94, 117-124.
- Riemersma, S. A., Oudejans, J. J., Vonk, M. J., Dreef, E. J., Prins, F. A., Jansen, P. M., Vermeer, M. H., Blok, P., Kibbelaar, R. E., Muris, J. J., *et al.* (2005). High numbers of tumour-infiltrating activated cytotoxic T lymphocytes, and frequent loss of HLA class I and II expression, are features of aggressive B cell lymphomas of the brain and testis. *The Journal of pathology* 206, 328-336.
- Roncador, G., Garcia Verdes-Montenegro, J. F., Tedoldi, S., Paterson, J. C., Klapper, W., Ballabio, E., Maestre, L., Pileri, S., Hansmann, M. L., Piris, M. A., *et al.* (2007). Expression of two markers of germinal center T cells (SAP and PD-1) in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica* 92, 1059-1066.
- Roser, F., Saini, M., Meliss, R., Ostertag, H., Samii, M., and Bellinzona, M. (2004). Apoptosis, vascularity, and proliferation in primary central nervous system lymphomas (PCNSL): a histopathological study. *Surgical neurology* 62, 393-399; discussion 399.

- Roussel, E., Gingras, M. C., Grimm, E. A., Bruner, J. M., and Moser, R. P. (1996). Predominance of a type 2 intratumoural immune response in fresh tumour-infiltrating lymphocytes from human gliomas. *Clinical and experimental immunology* 105, 344-352.
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). FOXP-3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological reviews* 212, 8-27.
- Salcman, M., Scholtz, H., Kaplan, R. S., and Kulik, S. (1994). Long-term survival in patients with malignant astrocytoma. *Neurosurgery* 34, 213-219; discussion 219-220.
- Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R., and Freeman, G. J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature immunology* 8, 239-245.
- Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., and Allavena, P. (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *European journal of cancer* 42, 717-727.
- Steidl, C., Lee, T., Shah, S. P., Farinha, P., Han, G., Nayar, T., Delaney, A., Jones, S. J., Iqbal, J., Weisenburger, D. D., *et al.* (2010). Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *The New England journal of medicine* 362, 875-885.
- Strege, R. J., Godt, C., Stark, A. M., Hugo, H. H., and Mehdorn, H. M. (2004). Protein expression of Fas, Fas ligand, Bcl-2 and TGFbeta2 and correlation with survival in initial and recurrent human gliomas. *Journal of neuro-oncology* 67, 29-39.
- Trepel, M. (2008). *Neuroanatomie, Vol 4*, (München: Elsevir GmbH).
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature medicine* 9, 1269-1274.
- Valente, V., Teixeira, S. A., Neder, L., Okamoto, O. K., Oba-Shinjo, S. M., Marie, S. K., Scrideli, C. A., Paco-Larson, M. L., and Carlotti, C. G., Jr. (2009). Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC molecular biology* 10, 17.
- Wada, N., Zaki, M. A., Kohara, M., Ogawa, H., Sugiyama, H., Nomura, S., Matsumura, I., Hino, M., Kanakura, Y., Inagaki, H., *et al.* (2012). Diffuse large B cell lymphoma with an interfollicular pattern of proliferation shows a favourable prognosis: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. *Histopathology*.

Wakimoto, H., Aoyagi, M., Nakayama, T., Nagashima, G., Yamamoto, S., Tamaki, M., and Hirakawa, K. (1996). Prognostic significance of Ki-67 labeling indices obtained using MIB-1 monoclonal antibody in patients with supratentorial astrocytomas. *Cancer* 77, 373-380.

Wilcox, R. A., Feldman, A. L., Wada, D. A., Yang, Z. Z., Comfere, N. I., Dong, H., Kwon, E. D., Novak, A. J., Markovic, S. N., Pittelkow, M. R., *et al.* (2009). B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders. *Blood* 114, 2149-2158.

Yang, L., Anderson, D. E., Baecher-Allan, C., Hastings, W. D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K., and Hafler, D. A. (2008). IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454, 350-352.

Yang, Z. Z., Novak, A. J., Stenson, M. J., Witzig, T. E., and Ansell, S. M. (2006). Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107, 3639-3646.

Zwadlo, G., Voegeli, R., Osthoff, K. S., and Sorg, C. (1987). A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. *Experimental cell biology* 55, 295-304.

7. Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bohle für die Übernahme meiner Betreuung während einer sehr schwierigen Phase meiner Arbeit und für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Meese bedanken, dass er sich spontan bereit erklärt hat, das Erstgutachten meiner Arbeit zu erstellen.

Dank gilt auch Prof. Dr. Wolfgang Feiden, sowie seiner Frau Dr. Silvia Feiden, die mir zu Beginn meiner Arbeit die Präparate zur Verfügung gestellt haben.

Danken möchte ich auch PD Dr. Kim, der mir vor allem in der Schlussphase meiner Arbeit durch das Korrekturlesen und seine konstruktive Kritik sehr weitergeholfen hat.

Auch bei allen Mitarbeitern der Neuropathologie möchte ich mich recht herzlich bedanken, dass ich so nett von euch aufgenommen wurde und stets auf eure Hilfe zählen konnte.

Für die Hilfsbereitschaft und die Betreuung in der Pathologie bedanke ich mich besonders bei Julia Michaely, sowie bei allen anderen Mitarbeitern der Pathologie, die mir in der Endphase der Arbeit weitergeholfen haben.

Nadine Miebach danke ich sehr für die vielen hilfreichen Tipps beim Verfassen meiner Arbeit, für die Beantwortung zahlreicher Fragen und natürlich für die Mitfahrgelegenheiten.

Auch meinen Freunden, besonders Lisa Hubertus, möchte ich für die ständige Motivation danken und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Großeltern, für die moralische Unterstützung. Ohne euch hätte ich es nicht so weit geschafft.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Torsten für seine liebevolle Unterstützung und für den Mut, den er mir stets zugesprochen hat.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Homburg, August 2012

(Elke Sartorius)