

Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth

Der Einfluss des humanen endogenen Retrovirus Typ
W Hüllproteins ENV auf die Homöostase von
Glioblastomzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Maiko Lehmkuhl

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Reiche L, Plaack B, Lehmkuhl M, Weyers V, Gruchot J, Picard D, Perron H, Remke M, Knobbe-Thomsen C, Reifenberger G, Küry P, Kremer D (2024). „HERV-W envelope protein is present in microglial cells of the human glioma tumor microenvironment and differentially modulates neoplastic cell behavior.” *Microbes and Infection*. 2025 Jul-Aug;27(5-6):105460. doi: 10.1016/j.micinf.2024.105460.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Glioblastom ist der häufigste primäre maligne Tumor des zentralen Nervensystems (ZNS) des Erwachsenen und hat als ZNS-WHO Grad 4 Tumor trotz multimodaler Therapie eine schlechte Prognose. Die genaue Ätiologie ist bislang unzureichend geklärt. Maßgeblich für die Glioblastom-Homöostase ist die Interaktion zwischen Tumorzellen und der Tumormikroumgebung (TME). Neben der extrazellulären Matrix, Fibroblasten, Wachstumsfaktoren und Chemokinen bilden Mikrogliazellen und Makrophagen einen großen Teil der TME und schaffen insgesamt eine tumorfördernde Umgebung. In den letzten Jahren nahmen die Erkenntnisse über den Einfluss von humanen endogenen Retroviren (HERVs) auf die Pathogenese verschiedener Autoimmun- und Tumorerkrankungen zu. Insbesondere dem Hüllprotein der HERV-Familie W (HERV-W ENV) werden pathogene Eigenschaften zugesprochen, die bisher vor allem mit der Entstehung und dem Fortschreiten der Multiplen Sklerose assoziiert zu sein scheinen. Im Vorfeld dieses Dissertationsprojektes durchgeführte histochemische Analysen konnten HERV-W ENV Protein im Vergleich zu gesundem Hirngewebe vermehrt in Gliomen und im Speziellen in Mikrogliazellen der TME nachweisen. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob und inwieweit Glioblastomzellen der humanen Zelllinie A-172 durch das HERV-W ENV Protein direkt oder indirekt über Mikrogliazellen in ihrer Genexpression und ihren zellulären Funktionen moduliert werden können. Die in dieser Dissertation vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die direkte Exposition zum HERV-W ENV Protein keinen wesentlichen Einfluss auf die Genexpression der Glioblastomzellen ausübt. Der direkte und indirekte Kontakt der Glioblastomzellen zu Mikrogliazellen unter Exposition zum HERV-W ENV Protein führt bemerkenswerterweise zu einer erhöhten Expression von Genen, assoziiert mit Inflammation, Invasivität und TME-Modulation. Weiterhin zeigt sich eine HERV-W ENV Protein vermittelte erhöhte Proliferationsrate in Glioblastomzellen in indirektem Mikrogliakontakt. Zusammengefasst weisen die Ergebnisse darauf hin, dass das HERV-W ENV Protein vermittelt über Mikrogliazellen protumorale modulierende Effekte auf die Glioblastom-Homöostase auszuüben scheint und exponiert die TME und im Speziellen Mikrogliazellen als mögliche, vielversprechende Therapieziele für die weitere pharmakotherapeutische Entwicklung bei bisher unzureichenden Therapieoptionen des Glioblastoms.

ABSTRACT

Glioblastoma is the most common primary malignant tumour of the central nervous system (CNS) in adults and has a poor prognosis despite multimodal therapy. The exact aetiology has not yet been sufficiently clarified. The interaction between tumour cells and the tumour microenvironment (TME) is essential for maintaining glioblastoma homeostasis. In addition to the extracellular matrix, fibroblasts, growth factors and chemokines, microglial cells and macrophages form a large part of the TME and create an overall tumour-promoting environment. In recent years, there has been an increasing understanding of the influence of human endogenous retroviruses (HERVs) on the pathogenesis of various autoimmune and tumour diseases. In particular, the envelope protein of the HERV family W (HERV-W ENV) has been recognised as having pathogenic properties, which to date appear to be associated primarily with the development and progression of multiple sclerosis. Histochemical analyses carried out prior to this dissertation project showed that HERV-W ENV protein was, in comparison to healthy brain tissue, increasingly detected in gliomas and in particular in microglial cells of TME. The aim of this thesis was to investigate whether and to what extent glioblastoma cells of the human cell line A-172 can be modulated by the HERV-W ENV protein directly or indirectly via the microglial cells as components of the TME. The results presented in this dissertation indicate that direct exposure to HERV-W ENV protein has no significant effect on the gene expression of glioblastoma cells. Remarkably, direct and indirect contact of glioblastoma cells to microglial cells exposed to HERV-W ENV protein result in increased expression of genes associated with inflammation, invasiveness and TME modulation. Furthermore, HERV-W ENV protein mediates an increased proliferation rate in glioblastoma cells in indirect microglial contact. In summary, the results indicate that HERV-W ENV protein mediated via microglial cells appears to exert protumoral modulating effects on glioblastoma homeostasis and exposes the TME and in particular microglial cells as potential promising therapeutic targets for further pharmacotherapeutic development in the face of insufficient treatment options for glioblastoma.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius	DNMTi	DNA-Methyltransferase-Inhibitoren
µg	Mikrogramm	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
µl	Mikroliter	EBV	Epstein-Barr-Virus
µm	Mikrometer	EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
5-ALA	5-Aminolävulinsäure	EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
Abb.	Abbildung	EGR3	Early Growth Response 3
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>	ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ATF2	Aktivierter Transkriptionsfaktor 2	Engl.	Englisch
BHS	Blut-Hirn-Schranke	ENV	<i>envelope protein</i> (Hüllprotein)
BMDM	<i>Bone marrow derived macrophages</i>	EZM	Extrazelluläre Matrix
BSA	Bovines Serumalbumin	FCS	Fetales Kälberserum
CAP1	Cyclase-assoziiertes Protein 1	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
CCL	CC-Chemokin-Ligand	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	Gy	Gray
CFL1	Cofilin-1	h	<i>Hour</i> (Stunde)
cm	Zentimeter	HERV	Humane endogene Retroviren
CSF1	<i>Colony stimulating factor 1</i>	HERV-W ENV	Humanes endogenes Retrovirus Typ W Hüllprotein
Ct	<i>Cycle threshold</i>	HHV-6	Humanes Herpesvirus-6
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>	HIF	Hypoxie induzierter Faktor
CX3CL1	C-X3-C Motiv Ligand 1	HK	<i>Housekeeping</i>
CXCL12	C-X-C Motiv Ligand 12	HSV-1	Herpes simplex Virus 1
CXCR4	C-X-C Motiv-Chemokinrezeptor 4	IDH	Isocitratdehydrogenase
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	IFN	Interferon
DMEM	Dulbecco's <i>modified eagle medium</i>	IL	Interleukin
DMSO	Dimethylsulfoxid	iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	JAK	Januskinsase

Lat.	lateinisch	PRR	<i>Pattern recognition</i> Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid	RNA	Ribonukleinsäure
LTR	<i>Long terminal repeats</i>	Rpm	<i>revolutions per minute</i>
M	Molar	s	Sekunde
MCP	<i>Monocyte chemotactic protein</i>	SEM	Standardfehler des Mittelwertes
MEM	<i>Minimum essential medium</i>	SOCS3	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i>
MG	Mikroglia	STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
mg	Milligramm	TAMs	Tumor-assoziierte Makrophagen und Mikroglia
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>	TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
min	Minute	TERT	Telomerase-Reverse-Transkriptase
ml	Milliliter	TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinasen	TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
MRT	Magnetresonanztomographie	TMB	Tetramethylbenzidine
MS	Multiple Sklerose	TME	Tumormikroumgebung
n.s.	nicht signifikant	TMZ	Temozolomid
NDS	<i>Normal donkey serum</i>	TNFA	Tumornekrosefaktor alpha
ng	Nanogramm	TSA	Tumor-spezifische Antigene
NGS	<i>Normal goat serum</i>	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
nm	Nanometer	WHO	Weltgesundheitsorganisation
ODC	Ornithindecaboxylase	ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
OPCs	Oligodendrozyten-Vorläuferzellen	ZNS	Zentrales Nervensystem
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>		
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
PD-L1	<i>Programmed death ligand 1</i>		
PFA	Paraformaldehyd		
pg	Pikogramm		

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Grundlagen der allgemeinen Tumorphathogenese	1
1.2	Tumore des Zentralen Nervensystems: Epidemiologie und Klassifikation	3
1.3	Glioblastom IDH-Wildtyp.....	4
1.3.1	Epidemiologie und Risikofaktoren.....	4
1.3.2	Pathogenese: histologische und molekulare Merkmale	4
1.3.3	Klinische Aspekte und Therapiemöglichkeiten	5
1.4	Tumormikroumgebung: Glioblastom-Mikroglia- <i>Crosstalk</i>	7
1.4.1	Fokus: Mikrogliazellen	8
1.4.2	Funktionen der TAMs und Therapieansätze	9
1.5	Humane endogene Retroviren.....	12
1.5.1	Bedeutung von HERVs in der Tumorphathogenese	13
1.5.2	Wirkungsweise von HERV-W ENV Protein	15
1.6	Ziel der Arbeit	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Organismen	17
2.1.2	Chemikalien.....	17
2.1.3	Reagenzien zur Stimulation	18
2.1.4	Immunzytochemie	18
2.1.5	Kits	19
2.1.6	Geräte, technische Ausstattung und Software	19
2.1.7	Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.8	Zusammensetzung der Kulturmedien	21
2.1.9	Zusammensetzung von HERV-W ENV und Kontroll-Puffer.....	21
2.2	Zellkulturtechniken.....	22
2.2.1	<i>In vitro</i> Kultivierung der humanen Glioblastomzelllinie A-172.....	22
2.2.2	Präparation von primären Ratten-Mikrogliazellen	23
2.2.3	Isolation der Mikrogliazellen.....	24
2.2.4	Kultivierung der Glioblastomzellen und Mikrogliazellen in Kokultur	25
2.2.5	Kultivierung für Migrationsversuche	26
2.2.6	Stimulation.....	27
2.2.7	Nukleofektion von A-172 Glioblastomzellen	28
2.3	Immunzytochemie	28

2.4	Molekularbiologische Methoden	30
2.4.1	Isolation von Ribonukleinsäure	30
2.4.2	cDNA-Synthese	31
2.4.3	<i>Real Time</i> quantitative PCR.....	32
2.5	TNFA <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	35
2.6	Kristallviolett-Assay	36
2.7	Statistik.....	37
3	ERGEBNISSE.....	38
3.1	Die Glioblastomzelllinie A-172 exprimiert neben β III-Tubulin den Hauptzielrezeptor für das HERV-W ENV Protein: TLR4.....	38
3.2	Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf das Verhalten der A-172 Glioblastomzellen in der Monokultur	40
3.2.1	HERV-W ENV Protein beeinflusst das Genexpressionsverhalten der A-172 Glioblastomzellen in der Monokultur nicht.....	40
3.2.2	HERV-W ENV Protein führt zu einer verminderten Proliferationsrate in A-172 Glioblastomzellen in der Monokultur	43
3.3	LPS induziert die Expression proinflammatorischer Gene und moduliert TME-Marker.....	44
3.4	Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf das Verhalten von A-172 Glioblastomzellen in der mikroglialen Kokultur	46
3.4.1	HERV-W ENV Protein führt zu Änderungen der Genexpression der A-172 Glioblastomzellen in der mikroglialen Kokultur.....	49
3.4.2	HERV-W ENV Protein führt in der mikroglialen Kokultur zu keiner Induktion von iNOS oder einer vermehrten Sekretion von TNFA	53
3.4.3	HERV-W ENV Protein führt zu einer Induktion der Proliferationsrate der A-172 Glioblastomzellen in indirektem Mikrogliakontakt	55
3.4.4	HERV-W ENV Protein führt zu keiner Änderung des Migrationsverhaltens der A-172 Glioblastomzellen in indirektem Mikrogliakontakt.....	57
4	DISKUSSION.....	59
4.1	Kein Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf die Genexpression der A-172 Glioblastomzellen in Monokultur.....	60
4.2	Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf die A-172 Glioblastomzellen in mikroglialer Kokultur.....	61
4.3	Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf zelluläre Funktionen der A-172 Glioblastomzellen.....	65
4.4	Limitationen und Ausblick.....	67
4.5	Schlussfolgerung.....	69
5	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	71

1 EINLEITUNG

1.1 Grundlagen der allgemeinen Tumorphathogenese

Der Begriff Tumor (lat. tumor = Schwellung) beschreibt im Allgemeinen jegliche abnorme Gewebevermehrung, unabhängig von der Ursache. Im engeren Sinne ist mit dem Begriff Tumor die Neubildung von körpereigenem Gewebe durch autonomes Zellwachstum gemeint, auch als Neoplasie (lat. neoplasia = Neubildung) definiert (Wagener, 2022). Grundsätzlich werden benigne von malignen Tumoren unterschieden. Die Entstehung von malignen Tumoren (lat. carcinoma = Krebs), auch Karzinogenese genannt, ist ein Mehrschrittprozess und beruht hauptsächlich auf einer Serie von somatischen Mutationen unterschiedlicher Gene. Daneben spielen die genetische Prädisposition des Individuums und epigenetische Veränderungen eine bedeutende Rolle (Hahn and Weinberg, 2002, Rassow J, 2022). Maligne Tumorzellen sind durch bestimmte Eigenschaften charakterisiert und unterscheiden sich in vielen Punkten von nicht-entarteten Zellen. Hanahan und Weinberg haben diese Eigenschaften erstmals im Jahr 2000 als „*Hallmarks of cancer*“ zusammengefasst: a) „Eigenständigkeit in der Vermittlung von Wachstumssignalen“, b) „Unempfindlichkeit gegenüber antiproliferativen Signalen“, c) „Umgehung der Apoptose“, d) „Gewebsinvasion und Metastasierung“, e) „unbegrenzt Replikationspotenzial“ und f) „nachhaltige Angiogenese“ (Hanahan and Weinberg, 2000). Krebszellen sind in der Lage unkontrolliert und unabhängig von Wachstumsfaktoren zu proliferieren, indem sie eigene Wachstumssignale produzieren oder Wachstumsrezeptoren überexprimieren (Chigira et al., 1990). Weiterhin sind maligne Tumorzellen unempfindlich gegenüber antiproliferativen und apoptotischen Signalen, sodass sie die Regeln und Kontrollmechanismen des Zellzyklus umgehen (Hanahan and Weinberg, 2000). Dabei spielt unter anderem die somatische Mutation des Tumorsuppressors p53 eine zentrale Rolle (Harris, 1996, Olivier et al., 2010, Hu et al., 2021). Des Weiteren sind Krebszellen in der Lage eine unbegrenzte Anzahl von Replikationen durchzuführen, wobei das Enzym Telomerase von großer Bedeutung ist (Gomez et al., 2012, Bryan and Cech, 1999, Hanahan and Weinberg, 2011). In der Funktion als Reverse-Transkriptase verlängert die Telomerase die Telomere an den Chromosomenenden und verhindert so eine zelluläre Seneszenz. In ca. 80-90% der Glioblastome konnte eine Mutation im Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT) Gen beobachtet werden, welche zur Re-Aktivierung der Telomerase führt (Arita et al., 2016, Di Nunno et al., 2023). Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Angiogenese, die vor allem durch *vascular endothelial growth factor* (VEGF) gesteuert wird. VEGF wird bereits in einem frühen Tumorstadium durch verschiedene Faktoren hochreguliert, einschließlich

Aktivierung von Onkogenen, Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Hypoxie. Es kommt zur Kapillaraussprossung mit Bildung neuer Gefäße und zum angiogenen *Switch*, wodurch der Tumor im Verlauf exponentiell wachsen kann (Carmeliet, 2005). Die durch VEGF-Stimulation entstandenen Blutgefäße sind allerdings durch strukturelle und funktionale Abnormalitäten gekennzeichnet, wie gewundene Gefäßverläufe, blinde Gefäßenden, erhöhte Permeabilität und Hämorrhagie. Dies führt im Verlauf zu hypoxischem Tumorgewebe, welches dann erneut die VEGF-Expression stimuliert und die Angiogenese aufrechterhält (Bergers and Benjamin, 2003, Carmeliet, 2005). Maligne Tumorzellen besitzen die Fähigkeit zu invasivem Wachstum und Metastasierung über das Blut- und Lymphsystem. Dazu werden Zelladhäsionsmoleküle wie E-Cadherin inaktiviert und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) aktiviert, welche zum Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) beitragen (Hanahan and Weinberg, 2000, Cavallaro and Christofori, 2004). Zwei weitere Eigenschaften, die in der Tumorforschung in den letzten Jahren einen immer bedeutenderen Stellenwert einnehmen, sind erstens die „Anpassung des zellulären Stoffwechsels“ und zweitens die „Umgehung des Immunsystems“ (Hanahan and Weinberg, 2011, Hanahan, 2022). Bereits 1930 wurde beobachtet, dass Tumorzellen auch unter oxidativen Bedingungen hauptsächlich Energie durch Glykolyse gewinnen (Warburg, 1930). Die auch „Warburg-Effekt“ genannte aerobe Glykolyse fördert Tumorwachstum und Tumorprogression. Studien konnten zeigen, dass Onkogene und Tumorsuppressorgene am *Switch* zur Glykolyse beteiligt sind; die genauen Mechanismen bleiben allerdings noch ungeklärt (DeBerardinis et al., 2008, Jones and Thompson, 2009). Die Rolle des Immunsystems in der Tumorpathogenese lässt sich als komplex und dynamisch zusammenfassen. In einer ersten Phase sind Immunzellen der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr, vor allem natürliche Killerzellen, noch in der Lage, Tumorzellen zu eliminieren. Im Verlauf der Tumorprogression entstehen Tumorzellen, welche resistent gegenüber den verschiedenen Immunzellen sind. Diese Phase von herabgesetzter Immunogenität wird auch als Gleichgewichtsphase beschrieben (Kim et al., 2007). Die Tumorprogression führt über verschiedene Mechanismen, die bis heute nicht abschließend identifiziert werden konnten, zur Umgehung des Immunsystems und immunologischer Ignoranz (Hanahan and Weinberg, 2011). Es kommt etwa zur Herabregulation von Tumorantigenen oder zur Sekretion von Faktoren, welche eine immunsuppressive Umgebung fördern, wie beispielsweise Interleukin 10 (IL10), *Transforming growth factor* beta (TGFB) oder Prostaglandin E2 (Kim et al., 2007, Vesely et al., 2011, Gubin and Vesely, 2022).

1.2 Tumore des Zentralen Nervensystems: Epidemiologie und Klassifikation

Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) bilden eine heterogene Gruppe, die sowohl gutartige (z.B. Meningeome) als auch bösartige ZNS-Tumore (z.B. Glioblastome oder ZNS-Metastasen) umfasst. 95 % der ZNS-Tumoren sind im Gehirn lokalisiert (Ronckers et al., 2023). Im Folgenden wird der Fokus auf primäre maligne Gehirntumore gelegt. Mit ca. 1,5 % aller Krebsneuerkrankungen im Erwachsenenalter in Deutschland gehören diese zu den selteneren Krebserkrankungen. Im Jahr 2020 lag die standardisierte Neuerkrankungsrate in Deutschland bei 5,5/100.000 Einwohnerinnen für Frauen und 7,5/100.000 Einwohnern für Männer (Ronckers et al., 2023). Eine durchschnittliche Mortalitätsrate von 4,41/100.000 Einwohner*innen und eine relative 5-Jahresüberlebensrate von 35,7 % verdeutlichen die insgesamt ungünstige Prognose der primär malignen Gehirntumore und die damit verbundene hohe klinische Bedeutung (Ostrom et al., 2022).

Hirntumore werden anhand der „Weltgesundheitsorganisation (WHO)-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems“ eingeteilt. Die im Jahr 2021 herausgegebene 5. Auflage setzt einen Fokus auf molekulare Biomarker und versucht, diese mit bestehenden histopathologischen Kriterien zu vereinen. Eine wichtige Neuerung bei der ZNS-WHO-Gradierung ist das Prinzip, innerhalb eines bestimmten Tumortyps zu gradieren, sowie die Berücksichtigung von molekulargenetischen Faktoren (Louis et al., 2021). Zuvor hatte jeder klassifizierte Tumor seinen zugehörigen WHO-Grad, welcher ausschließlich auf histologischen Kriterien beruhte (Louis et al., 2016). Die Klassifikation umfasst insgesamt über 100 Tumortypen, wobei im Folgenden die Einteilung der diffusen Gliome näher beschrieben wird. Es wird zwischen den häufigen diffusen Gliomen des Erwachsenenalters und den deutlich selteneren des Kindesalters unterschieden. Die diffusen Gliome vom adulten Typ umfassen drei relevante Tumortypen, die vor allem anhand von molekularen Markern wie dem Mutationsstatus der Isocitratdehydrogenase (IDH), der 1p/19q-Kodeletion oder der ATRX-Mutation (*alpha thalassemia/mental retardation syndrome, nondeletion type, X-linked*) voneinander abgegrenzt werden: (1) Astrozytom, IDH-mutiert mit ATRX-Verlust (ZNS-WHO Grad 2, 3 oder 4), (2) Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert (ZNS-WHO Grad 2 oder 3) und (3) Glioblastom, IDH-Wildtyp (ZNS-WHO Grad 4) (Louis et al., 2021). Somit ist das Glioblastom der einzige Tumortyp unter den adulten diffusen Gliomen ohne IDH-Mutation. Die WHO-Gradierung beim Astrozytom und Oligodendrogliom beruht weiterhin auf histologischen Kriterien, wie z.B. der mitotischen Aktivität, Gefäßproliferationen oder Nekrosen. Diffuse IDH-Wildtyp Astrozytome werden

jetzt unabhängig von den histologischen Merkmalen als Glioblastom, IDH-Wildtyp (ZNS-WHO Grad 4) klassifiziert, wenn bestimmte molekulare Veränderungen vorliegen (Weller et al., 2022). Dabei ist der Nachweis einer oder mehrerer folgender Mutationen relevant: eine Amplifikation des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor-Gens (EGFR), eine Mutation des TERT-Promotors und/oder eine +7/-10-Kopienzahl-Veränderung (Stichel et al., 2018, Weller et al., 2021, Weller et al., 2022).

1.3 Glioblastom IDH-Wildtyp

Das Glioblastom IDH-Wildtyp (ZNS-WHO Grad 4) gehört zur Gruppe der diffusen Gliome des Erwachsenenalters und hat trotz umfassender Therapie eine besonders schlechte Prognose (Grochans et al., 2022). Auch wenn es in der Glioblastom-Pathogenese auf molekularer Ebene in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse gab, mangelt es bis heute an wirksamen Therapieoptionen und das Glioblastom bleibt weiterhin eine unheilbare Erkrankung (Melhem et al., 2022).

1.3.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Glioblastom ist der häufigste primäre maligne ZNS-Tumor und macht ca. die Hälfte aller bösartigen Tumortypen im ZNS aus (Wen et al., 2020, Ostrom et al., 2022, Price et al., 2025). Die Inzidenz liegt bei ca. 3 Fällen pro 100.000 Personen pro Jahr (Miller et al., 2021). Mit einem medianen Gesamtüberleben von ca. 15 Monaten gehört das Glioblastom zu einer der aggressivsten Krebserkrankungen (Stupp et al., 2005, Cioffi et al., 2022). Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei 6,9% (Ostrom et al., 2022). Das Glioblastom kommt 1,6-fach häufiger bei Männern vor und die Inzidenz steigt mit dem Alter mit Höchstwerten zwischen 75 und 84 Jahren (Ostrom et al., 2022). Die Ätiologie des Glioblastoms ist noch weitgehend unbekannt. Die Schädelbestrahlung, insbesondere im Rahmen einer Krebserkrankung in der Kindheit, gilt als einziger verlässlicher Risikofaktor (Bowers et al., 2013). Weitere Studien zeigen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Entstehung des Glioblastoms und Faktoren wie der Exposition gegenüber Medikamenten, Pestiziden und Luftverschmutzung sowie dem Rauchen (Vienne-Jumeau et al., 2019, Grochans et al., 2022).

1.3.2 Pathogenese: histologische und molekulare Merkmale

Histopathologisch gehört das Glioblastom zu den neuroepithelialen Tumoren, genauer zu den Astrozytomen, welche die größte Gruppe aller Hirntumoren im Erwachsenenalter darstellen (Kellner et al., 2019). Morphologisch ist das Glioblastom besonders durch die

Entwicklung ausgedehnter Nekrosen sowie die Neubildung pathologischer Gefäße mit Endothelproliferationen charakterisiert. Zudem besteht eine ausgeprägte Polymorphie und Heterogenität der Tumorzellen (Paulus, 2002).

Der Stellenwert molekularer Zellveränderungen nimmt in der Diagnostik und Charakterisierung von Glioblastomen weiter zu (Montemurro, 2020). Neben den drei molekularen Markern EGFR-Amplifikation, TERT-Promotor-Mutation und +7/-10-Kopienzahl-Veränderung (Louis et al., 2021), gibt es verschiedene Ansätze, auf molekularer Ebene Glioblastom-Subtypen zu charakterisieren. Dies hat das Ziel, bessere Aussagen über die Prognose treffen und individuelle Therapieformen etablieren zu können. Das Glioblastom wurde als erste Krebserkrankung im Jahr 2008 von dem Netzwerk *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) analysiert, indem genetische und epigenetische Veränderungen von insgesamt 206 Glioblastomen dargestellt worden sind (TCGA, 2008). Darauf basierend haben Verhaak et al. eine Differenzierung des Glioblastoms in vier Subtypen I) klassisch, II) mesenchymal, III) proneural und IV) neural anhand dort beschriebener molekularer Marker (TCGA, 2008) vorgenommen (Verhaak et al., 2010). Der klassische Subtyp ist durch ein hohes Level an EGFR-Amplifikationen gekennzeichnet. Während der mesenchymale Subtyp Neurofibromin 1- und *Phosphatase and tensin homolog*-Mutationen aufzeigt, ist der proneurale Typ mit *Platelet derived growth factor receptor* alpha- und TP53-Mutationen assoziiert (Verhaak et al., 2010). Der neurale Subtyp ist durch die Expression vieler unspezifischer molekularer Marker sowie eine hohe Überschneidung mit gesundem neuralen Gewebe gekennzeichnet und daher in einigen Studien nicht mehr mit aufgenommen (Brennan et al., 2013, Wang et al., 2017). Bisher konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen den einzelnen Subtypen und dem Gesamt-Überleben oder Therapieansprechen gezeigt werden, sodass der klinische Nutzen dieser Einteilung aktuell noch unklar bleibt (Wen et al., 2020, Jankowska et al., 2021). Die genetische Sequenzierung der Tumorentität und die Forschung nach aussagekräftigen molekularen Biomarkern sind bis heute nicht abgeschlossen (Herrera-Oropeza et al., 2021, Verdugo et al., 2022). Denn das Glioblastom ist nicht nur histologisch, sondern auch genetisch von starker Heterogenität gekennzeichnet. Die inter- und intratumorale Heterogenität führt zu einer hohen Komplexität bezogen auf die molekulargenetische Diagnostik und stellt hohe Ansprüche an die Etablierung zielgerichteter Therapien (Sottoriva et al., 2013, Aubry et al., 2015).

1.3.3 Klinische Aspekte und Therapiemöglichkeiten

Klinische Symptome wie neu aufgetretene generalisierte oder fokale Krampfanfälle, Persönlichkeitsveränderungen, fokale neurologische Ausfälle sowie Kopfschmerzen und

Übelkeit geben erste Hinweise auf das Vorhandensein eines Gehirntumors (Wick et al., 2021). Diagnostische Methode der Wahl bei Verdacht auf einen Hirntumor ist die Magnetresonanztomographie (MRT) des Schädels unter Verwendung eines gadoliniumhaltigen Kontrastmittels. Dabei fallen Glioblastome durch ein bestimmtes Kontrastmittel-anreicherndes Verhalten auf (Nelson and Cha, 2003). Typischerweise kommt es zu einer girlandenförmigen Kontrastmittelaufnahme mit zentraler Nekrose. Differentialdiagnostisch müssen bildmorphologisch Hirnmetastasen oder Hirnabszesse in Betracht gezogen werden (Young, 2007, Aparici-Robles et al., 2022). Glioblastome sind in ca. 70% supratentoriell und dabei am häufigsten im Frontallappen lokalisiert (Grochans et al., 2022).

Die Standardtherapie von Glioblastomen besteht aus einem multimodalen Therapieansatz mit operativer Resektion, gefolgt von Bestrahlung der erweiterten Tumorregion und begleitender sowie adjuvanter Chemotherapie mit dem Alkylanz Temozolomid (TMZ) (Stupp et al., 2005, McMahon et al., 2022, Wick et al., 2021). Da die Klassifizierung des Glioblastoms vor allem aufgrund der Expression spezifischer molekularer Marker vorgenommen wird, hat die Operation mit Gewebebiopsie neben dem therapeutischen auch einen entscheidenden diagnostischen Zweck. Das diffus infiltrative und aggressive Wachstum des Tumors ins umliegende Hirngewebe macht eine vollständige Resektion nahezu unmöglich. Da das Ausmaß der Resektion aber entscheidend zur Prognose beiträgt, hat sich ein intraoperativer Gebrauch von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) Fluoreszenz etabliert. Das oral verabreichte 5-ALA wird in den körpereigenen Mitochondrien zu Protoporphyrin IX umgewandelt. Aufgrund eines Enzymdefektes akkumuliert Protoporphyrin IX in den Tumorzellen, sodass diese durch ein spezielles Lichtsignal rot fluoreszieren (Stummer et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von 5-ALA zu einem gesteigerten Gesamt- und progressionsfreien Überleben führt (Eatz et al., 2022). Eine weitere Möglichkeit das Resektionsausmaß zu optimieren sind intraoperative MRT-Bilder (Senft et al., 2011). Auch wenn das Ausmaß der Resektion ein wichtiger prognostischer Faktor ist, so gilt es, das Auftreten neuer permanenter neurologischer Defizite durch die Operation unbedingt zu vermeiden (Weller et al., 2021). Die Bestrahlung des Resttumors und der Resektionshöhle, die 3-5 Wochen nach der Operation beginnen sollte (Press et al., 2020), ist indiziert bei Patient*innen < 70 Jahren und guter körperlicher Verfassung (Karnofsky-Index > 70%) mit einer Gesamtdosis von 54-60 Gray (Gy) in täglichen Fraktionen von 1,8-2 Gy über 6 Wochen (Weller et al., 2021). Begleitend zur Bestrahlung wird eine Chemotherapie mit TMZ (75 mg/m² täglich) durchgeführt, gefolgt von 6 Zyklen adjuvanter TMZ (150-200 mg/m², an 5 von 28 Tagen) als Erhaltungstherapie (Stupp et al., 2005, Weller et al., 2021, Wick et al., 2021). Das

Ansprechen auf TMZ hängt stark von dem Methylierungsstatus des Promotors vom O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gen (MGMT), welches für ein DNA-Reparaturenzym kodiert, ab. Bei Patient*innen mit MGMT-methylierten Tumoren konnte eine signifikante Erhöhung des mittleren Gesamtüberlebens von 15,3 Monaten (95% KI 13,0 - 20,9) bei alleiniger Radiotherapie auf 23,4 Monate (95% KI 18,6 – 32,8) bei kombinierter Radiochemotherapie festgestellt werden (Stupp et al., 2009). Ältere Patient*innen >70 Jahren, bei denen aufgrund der körperlichen Verfassung die kombinierte Bestrahlung-TMZ-Therapie keine Option ist, werden je nach MGMT-Promotor-Methylierungsstatus entweder mit hypofraktionierter Bestrahlung (40 Gy) oder mit TMZ alleine behandelt (Weller et al., 2021). Weiterhin kann eine Therapie mit elektrischen Wechselfeldern nach einer erfolgreichen Radiochemotherapie angeschlossen werden (Stupp et al., 2017). Nicht zu vernachlässigen ist die symptomatische und supportive Therapie. Dabei spielen sowohl eine psychoonkologische Betreuung und eine frühe Einbindung eines Palliativ-Teams als auch eine medikamentöse Therapie z.B. mit Antikonvulsiva bei Krampfanfällen eine große Rolle (Sizoo et al., 2010, Tan et al., 2020). Im Bereich der zielgerichteten Krebstherapien wird Bevacizumab, ein VEGF-Inhibitor, in der Behandlung von Rezidiv-Glioblastomen in den USA, Kanada oder der Schweiz eingesetzt (*Food and Drug Administration* (FDA)-Zulassung) (Diaz et al., 2017, Kreisl et al., 2009). In der Europäischen Union ist Bevacizumab aufgrund der unzureichenden Datenlage aktuell jedoch nicht zugelassen (Weller et al., 2021, Wick et al., 2021). Im Bereich der Immuntherapie gibt es verschiedene Ansätze, von Impfungen und dem Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren über CAR-T-Zellen bis zu onkolytischen Viren, die bisher aber noch keine Vorteile gegenüber der Standardtherapie zeigen oder sich noch in frühen Studienphasen befinden (Tan et al., 2020, McMahon et al., 2022, Agosti et al., 2023). Ein Grund für das Nicht-Ansprechen dieser Methoden könnte eine allgemein geringe Immunogenität der Glioblastomzellen sowie eine immunsuppressive Tumormikroumgebung (TME) sein (Pearson et al., 2020).

1.4 Tumormikroumgebung: Glioblastom-Mikroglia-Crosstalk

Neben der histologischen und genetischen Heterogenität sind Glioblastome durch eine sich ständig verändernde Mikroumgebung gekennzeichnet (Quail and Joyce, 2013). Diese heterogene TME hat einen erheblichen Einfluss auf die Glioblastom-Homöostase und fördert die Tumorprogression (Hambardzumyan et al., 2016). Die TME besteht neben den Tumorzellen und der extrazellulären Matrix aus verschiedenen nicht-neoplastischen Zelltypen, wie Fibroblasten, Perizyten, Endothelzellen und Immunzellen. Dabei spielen im Speziellen Tumorassoziierte Makrophagen und Mikroglia (TAMs) eine große Rolle (Quail

and Joyce, 2017). TAMs bestehen sowohl aus ZNS-ständigen Mikroglia als auch aus *bone marrow-derived macrophages* (BMDMs) und bilden bezogen auf Ursprung und Funktion eine heterogene Gruppe (Buonfiglioli and Hambardzumyan, 2021). TAMs machen 30-40% der Tumormasse von Glioblastomen aus (Charles et al., 2012). Verschiedene Studien konnten sowohl in murinen als auch in humanen Glioblastomen zeigen, dass TAMs zum Großteil aus BMDMs bestehen, welche in den perivaskulären Bereichen des Tumors lokalisiert sind, während Mikrogliazellen peritumoral zu finden sind (Chen et al., 2017, Müller et al., 2017). Die Interaktion von TAMs mit Tumorzellen sowie anderen nicht-neoplastischen Zellen in der TME fördert Tumorstadium und -migration durch Sekretion von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen, darunter Interleukin 6 (IL6) und Interleukin 1B (IL1B), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) und MMPs (Hambardzumyan et al., 2016, Gutmann and Kettenmann, 2019). TAMs wurden lange Zeit in zwei Phänotypen unterteilt. Während der M1-Phänotyp durch Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon gamma (IFN γ) stimuliert wird (Lin et al., 2023) und mit der Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor alpha (TNFA), IFN γ oder Interleukin 2 (IL2) assoziiert ist, werden IL10 und TGF β dem antiinflammatorischen M2-Phänotyp zugeschrieben (Buonfiglioli and Hambardzumyan, 2021). In Glioblastomen wurde lange ein M2-dominierender Phänotyp angenommen, welcher die Tumorentwicklung unterstützt (Komohara et al., 2008, Li and Graeber, 2012). Aktuelle Studien zeigen allerdings, dass diese konventionelle Zweiteilung in Glioblastomen unzureichend ist, und gehen von einer dynamischen Identität der TAMs aus, wobei M1 und M2 Marker ko-exprimiert werden (Müller et al., 2017, Landry et al., 2020). Abhängig von den exprimierten Signalen der Tumorzellen wechselt zudem das Expressionsprofil der TAMs. Weiterhin beeinflussen auch TAMs das Verhalten der Glioblastomzellen, sodass von einem komplexen *Crosstalk* mit starken Interdependenzen ausgegangen wird (Buonfiglioli and Hambardzumyan, 2021).

1.4.1 Fokus: Mikrogliazellen

Mikrogliazellen, erstmals 1932 durch Río-Hortega beschrieben (Río-Hortega, 1932), machen ca. 10-15% aller Gliazellen aus, sind ZNS-ständige Makrophagen und gehören zum angeborenen Immunsystem (Lawson et al., 1990, Nayak et al., 2014). Sie entstammen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Dottersack und wandern während der frühen Embryogenese, bevor sich die Blut-Hirn-Schranke (BHS) schließt, ins Gehirn ein (Ginhoux et al., 2010). Ein wichtiger Signalweg für die Entwicklung, Erhaltung und Proliferation der Mikroglia-Population ist der *colony stimulating factor 1* Rezeptor (CSF1R) Signalweg (Elmore et al., 2014, Ginhoux and Prinz, 2015, Easley-Neal et al., 2019).

Als Teil des angeborenen Immunsystems besteht die Hauptaufgabe der Mikrogliazellen in der Immunabwehr und der Erhaltung der Gewebshomöostase (Ginhoux and Prinz, 2015). Weiterhin beeinflussen Mikroglia die neuronale Differenzierung und synaptische Aktivität, indem etwa Synapsen modifiziert oder eliminiert werden (Paolicelli et al., 2011, Wake et al., 2013, Ginhoux and Prinz, 2015). Auch im gesunden ZNS tasten die sehr mobilen Mikroglia mit ihren verzweigten Zellfortsätzen ihre Umgebung ab, ständig auf der Suche nach Pathogenen, welche über *Pattern Recognition* Rezeptoren (PRR), beispielsweise *Toll-like* Rezeptoren (TLR), gebunden werden können (Kigerl et al., 2014). Mittels Phagozytose, einer Schlüsselfunktion der Mikroglia, werden apoptotische Zellen, Fremdkörper und die ZNS-Homöostase bedrohende Pathogene eliminiert (Nimmerjahn et al., 2005, Hanisch and Kettenmann, 2007). Zudem besitzen Mikroglia die Fähigkeit zur Antigenpräsentation mittels *Major Histocompatibility Complex* (MHC) II Molekülen und damit zur Interaktion mit T-Zellen (Aloisi, 2001, Schettlers et al., 2017).

Im Rahmen von Schädigungen der ZNS-Homöostase, beispielsweise durch Ischämie, neurodegenerative Erkrankungen, Infektionen oder Tumorbildung können Mikroglia aktiviert werden (Nayak et al., 2014). Dieser Aktivierungszustand ist unter anderem durch die Veränderung der Morphologie zu einer amöboiden oder hypertrophen Form gekennzeichnet (Kettenmann et al., 2011, Savage et al., 2019). In Abhängigkeit von der Umgebung und den registrierten Signalen nehmen Mikroglia unterschiedliche Phänotypen an, ähnlich wie zuvor bei den TAMs beschrieben (siehe Abschnitt 1.4), klassischerweise als M1- oder M2-Phänotyp bezeichnet. Während der M1-Phänotyp, stimuliert durch beispielsweise LPS oder IFN γ , mit der mikroglialen Expression von proinflammatorischen Molekülen wie IL1 β , IL6 oder TNFA assoziiert ist, wird der alternative neuroregenerative M2-Phänotyp durch IL4, IL10 oder IL13 induziert. Dieser ist durch ein antiinflammatorisches Expressionsprofil gekennzeichnet (Orihuela et al., 2016). Die strikte Zweiteilung der mikroglialen Phänotypen in „M1 versus M2“ zeigte sich allerdings in vielen Studien als überholt. Mikroglia stellen vielmehr eine heterogene Zellpopulation dar, welche in Abhängigkeit von ihrer Umgebung verschiedene funktionale Zustände annehmen und dynamisch zwischen diesen wechseln kann, mit dem Ziel die Gewebshomöostase zu erhalten (Ransohoff, 2016, Hammond et al., 2019, Paolicelli et al., 2022).

1.4.2 Funktionen der TAMs und Therapieansätze

Drei Tumor-unterstützende Hauptfunktionen werden den TAMs in Glioblastomen zugeschrieben: Tumorproliferation und -progression, zerebrale Ödembildung und Immunsuppression (Buonfiglioli and Hambardzumyan, 2021).

Tumorproliferation

Verschiedene Faktoren werden von TAMs in Glioblastomen sezerniert, die die Tumorproliferation unterstützen. Dazu gehören die Interleukine IL6, IL1B sowie EGF und TGF β (Liu et al., 2010b, Coniglio et al., 2012, Ye et al., 2012, Hambardzumyan et al., 2016). Zudem kommt es durch die Tumorzellen zur Freisetzung von chemotaktischen Faktoren wie dem CC-Chemokin-Ligand 2 (CCL2) (syn. *monocyte chemotactic protein 1*; MCP-1), CX3CL1 und CSF1, um weitere TAMs zu rekrutieren (Pyonteck et al., 2013, Chen et al., 2017, Pires-Afonso et al., 2020). Eine *in vitro* Studie mit humanen Zelllinien verdeutlicht nochmals den Glioblastom-Mikroglia-Crosstalk. Das von Glioblastomzellen sezernierte Chemokin CCL2 bindet an den auf Mikroglia exprimierten Rezeptor CCR2 und führt zur mikroglialen Sekretion von IL6, welches wiederum die Invasivität der Glioblastomzellen stimuliert (Zhang et al., 2012). Ein weiteres für die TME-Modulation bedeutendes Molekül ist CXCL12 (syn. *stromal-derived factor-1*, SDF-1) sowie sein Rezeptor CXCR4. Deren Expression wird vor allem in hypoxischen Bereichen des Tumors hochreguliert und führt zu verstärkter Chemotaxis, Migration der Tumorzellen und Invasivität (Bajetto et al., 2006, Zagzag et al., 2008, Wang et al., 2012, Würth et al., 2014). Des Weiteren trägt die Expression und Aktivierung von MMPs durch TAMs zu einer protumoralen Mikroumgebung bei. MMPs gehören zu den Zink-abhängigen Endopeptidasen und führen zum Abbau der Komponenten der EZM, wodurch Invasivität und Migration der Tumorzellen gefördert werden (Rao, 2003, Raeeszadeh-Sarmazdeh et al., 2020). Eine *in vitro* Studie in Mauszellen und Maus-Gehirnschnitten konnte beispielsweise zeigen, dass die Invasivität von Gliomen in Gegenwart von Mikrogliazellen durch die Aktivierung von MMP2 zunimmt (Markovic et al., 2005). Zusammenfassend besteht eine gegenseitige Beeinflussung von Tumorzellen und TAMs, die zu einer vermehrten Tumorproliferation und -progression führt.

Ödembildung

Eine weitere Funktion von TAMs ist die zerebrale Ödembildung in Glioblastomen. Pathophysiologisch ist ein Hirnödem auf eine Dysfunktion der BHS mit erhöhter vaskulärer Permeabilität zurückzuführen, wodurch es zu einer Ansammlung extrazellulärer Flüssigkeit kommt (Nag et al., 2009). Insgesamt ist die zerebrale Ödembildung in MRT-Studien mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Pope et al., 2005, Wu et al., 2015). Insbesondere VEGF, eines der wichtigsten von TAMs und Glioblastomzellen sezernierten Angiogenese-Signalmoleküle, ist an der Ödembildung beteiligt. Bei Tumoren spielt vor allem die Unterform VEGF-A eine bedeutende Rolle, welche bei Hypoxie sezerniert wird und die Endothelproliferation und Kapillaraussprossung fördert (Ahir et al., 2020). Carlson et al. konnten zeigen, dass die VEGF-Expression mit einigen pro-angiogenen Genen korreliert, darunter *Adrenomedullin* und *Angiopoietin-2*. Interessanterweise gibt die Studie zudem

Hinweise für einen VEGF-unabhängigen Signalweg über *neuronal pentraxin 2*, der zur Ödembildung führt (Carlson et al., 2007).

Immunsuppression

Glioblastome sind durch eine immunsuppressive TME geprägt, um die Immunantworten des Organismus zu umgehen. Ein essenzieller Mechanismus ist hierbei die Produktion von immunsuppressiven Zytokinen wie IL10 und TGFB, sowohl von TAMs als auch von den Glioblastomzellen selbst (Nduom et al., 2015). TGFB führt zur Einschränkung der Lymphozytenaktivierung und der Funktion von antigenpräsentierenden Zellen (Roy et al., 2015). Des Weiteren kommt es zum Verlust von MHC-Molekülen auf TAMs, was die Antigenpräsentation und Aktivierung des Immunsystems hemmt (Razavi et al., 2016). Vor allem in hypoxischen Tumorarealen wird der *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) Signalweg via Hypoxie-induzierter Faktor (HIF-1a) aktiviert, welcher immunsuppressive Effekte auslöst, wie die Produktion von immunsuppressiven Zytokinen oder die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (Wei et al., 2011, Fu et al., 2023). Ein weiterer in zahlreichen Tumoren bekannter Mechanismus zur Immunevasion ist die Expression von *programmed death ligand 1* (PD-L1) (Dermani et al., 2019). Sowohl TAMs als auch Glioblastomzellen exprimieren vermehrt PD-L1, dessen Bindung an den auf T-Zellen lokalisierten Oberflächenrezeptor PD-1 zur T-Zell-Inaktivierung und Apoptose führt (Bloch et al., 2013, Berghoff et al., 2015, Jiang et al., 2019). Zudem konnten regulatorische CD4⁺-FoxP3⁺ T-Zellen, welche durch die Hemmung von Effektorzellen zu einer immunsuppressiven Mikroumgebung beitragen (Sonabend et al., 2008), mittels immunhistochemischer Analysen in einem hohen Maße in Glioblastomen nachgewiesen werden (Heimberger et al., 2008). Deren genaue Funktion in Glioblastomen ist allerdings noch unbekannt und Gegenstand aktueller Forschung (Razavi et al., 2016). Insgesamt führen die beschriebenen Mechanismen zu einer protumoralen immunsuppressiven TME, in der der Tumor invasiv wachsen kann. Sie stellen aber auch potenzielle Ansätze für verschiedene Immuntherapien dar (Daubon et al., 2020, Pearson et al., 2020).

Therapieansätze

Ein möglicher therapeutischer Ansatz wäre die immunsuppressive TAM-Funktion über CSF1 zu hemmen. Der CSF1-Rezeptor-Inhibitor BLZ945 führte in einem *in vivo* Glioblastom-Mausmodell zu einer verminderten Tumorprogression und einem längeren Überleben (Pyonteck et al., 2013). Interessanterweise hat sich die Anzahl der TAMs nicht reduziert, sondern es wurde ein Verlust der protumoralen M2 Genexpression sowie ein Anstieg der Phagozytosefunktion beobachtet (Pyonteck et al., 2013). Es zeigten sich allerdings schnell entwickelnde Resistenzen gegen CSF1-Rezeptor-Inhibitoren sowie die

Bildung von Rezidiven (Quail et al., 2016). Eine weitere TAM-gerichtete Strategie bezieht sich auf die Inhibition der TAM-Rekrutierung, beispielsweise durch die Blockierung von CCL2. Zur Inhibition des CCL2/CCR2 Signalweges wurden verschiedene Studien in soliden Tumoren durchgeführt (Xu et al., 2021). Vielversprechende klinische Studien wurden zudem mit Immuncheckpoint Inhibitoren durchgeführt (Agosti et al., 2023). Eine präklinische Studie in Mausmodellen konnte zeigen, dass die Kombination aus CCR2-Inhibition und PD-1 Blockade zu einem längeren Überleben führte. Dabei wurden Tumorzellen aus murinen Glioblastomzelllinien in Maus-Gehirne injiziert und nach 7 Tagen mit dem CCR2-Antagonisten CCX872 und einem anti-PD1 Antikörper behandelt (Flores-Toro et al., 2020). Die Kombinationstherapie war mit einer verstärkten Tumordinfiltration von funktionalen Lymphozyten assoziiert (Flores-Toro et al., 2020).

1.5 Humane endogene Retroviren

Humane endogene Retroviren (HERVs) sind retrovirale DNA-Insertionen, die sich vor ca. 30-60 Millionen Jahren durch retrovirale Infektionen in das Genom von Primaten integriert haben. Sie wurden mittels vertikaler Transmission an die nachfolgenden Generationen weitergegeben (Belshaw et al., 2004, Bannert and Kurth, 2006). Diese DNA-Sequenzen machen bis zu 8 % des menschlichen Genoms aus (Lander et al., 2001) und sind für gewöhnlich aufgrund von zahlreichen Mutationen und epigenetischen Veränderungen inaktiv oder dysfunktional (Hurst and Magiorkinis, 2017). HERVs gehören zu den transposablen Elementen der Klasse I (Retrotransposons), welche sich über ein reverse-transkribiertes RNA-Mediat ausbreiten (Rebollo et al., 2012). Das Genom der HERVs ähnelt ihrem endogenen retroviralen Ursprung und kodiert folgende Hauptstrukturproteine: (I) *Core (gag)*, (II) Reverse Transkriptase- und Integrase-Komplex (*pol*) und (III) die Hülle (*ENV*) (Löwer et al., 1996, Griffiths, 2001). Diese Gene werden durch regulatorische *Long Terminal Repeats* (LTR)-Regionen flankiert, deren Anzahl Einfluss auf die retrovirale Genexpression hat (Nelson et al., 2003, Kovalskaya et al., 2006). HERVs werden in drei übergeordnete Klassen und anhand der für die jeweilige Reverse Transkriptase kodierenden tRNA in über 30 verschiedene Familien eingeteilt (Nelson et al., 2003, Katzourakis and Tristem, 2005). HERV-K gilt dabei als biologisch aktivste Familie (Tönjes et al., 1996, Nelson et al., 2003).

In den letzten Jahren konnten immer mehr Zusammenhänge zwischen verschiedenen HERV-Familien und der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen aufgezeigt werden. Beispiele hierfür sind Multipler Sklerose (MS) (Perron et al., 1989), amyotropher Lateralis (Li et al., 2015), rheumatoider Arthritis (Reynier et al., 2009) und Diabetes mellitus Typ 1 (Levet et al., 2019). Zudem gibt es immer mehr Hinweise, dass HERVs auch

bei Tumorerkrankungen eine entscheidende Rolle spielen könnten. Der genaue Mechanismus, wie HERVs die Pathogenese der jeweiligen Erkrankungen beeinflussen, ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt und Gegenstand aktueller Forschung.

1.5.1 Bedeutung von HERVs in der Tumorphagenese

Bereits 1979 konnten erstmals retrovirale Proteine in humanen Keimzelltumoren nachgewiesen werden (Bronson et al., 1979). Weitere Studien bekräftigten das onkogene Potential insbesondere von HERV-K in Keimzelltumoren (Herbst et al., 1998, Kleiman et al., 2004, Chan et al., 2019). Es konnte gezeigt werden, dass in Keimzelltumorzellen das HERV-K Protein *Np9* mit verstärkter Zellmigration assoziiert ist (Chan et al., 2019). Eine vermehrte HERV-K Aktivität ist in vielen weiteren Tumorentitäten wie Brustkrebs (Wang-Johanning et al., 2014, Zhou et al., 2016), Melanomen (Büscher et al., 2005, Hirschl et al., 2007), Ovarialtumoren (Rycaj et al., 2015), Prostatakarzinom (Wallace et al., 2014) oder Lymphomen (Barth et al., 2019) beschrieben. HERV-K wird dabei als ein wichtiger Faktor in der Tumorentwicklung und Progression gesehen (Salavatiha et al., 2020). Vor allem dem Hüllprotein HERV-K ENV werden onkogene Eigenschaften, wie die Induktion der Epithelial-mesenchymalen Transition, welche mit Tumoraggressivität und Metastasierung assoziiert ist, zugesprochen (Lemaître et al., 2017, Gao et al., 2021). Eine *in vitro* Studie mit humanen Gliom-Gewebeproben aus dem Jahr 2023 zeigte, dass das HERV-K (HML-2) Protein in Glioblastomen überexprimiert wird und mit der Persistenz von Glioblastom-Stammzellen assoziiert ist (Shah et al., 2023). Ein weiterer potenzieller Effekt von ENV Proteinen der Familie HERV-H ist eine protumorale Immunmodulation, vermittelt über eine immunsuppressive Domäne in der Transmembranregion (Mangeney et al., 2001, Kudo-Saito et al., 2014). Auch wenn das Ausmaß noch unklar ist, gibt es einige Hinweise, dass auch HERV-W in der Tumorphagenese eine entscheidende Rolle spielen könnte. Eine erhöhte Expression von HERV-W Transkripten konnte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Tumorgewebe von kutanen T-Zell-Lymphomen nachgewiesen werden (Maliniemi et al., 2013, Laukkanen et al., 2020). Ergänzend zeigte eine Studie aus dem Jahr 2010 eine Expression von HERV-W ENV Protein in Leukämie- und Lymphom-Zelllinien sowie im Blut von Leukämie- und Lymphom-Patient*innen (Sun et al., 2010). HERV-W ENV Protein wird zudem in Brustkrebszellen exprimiert, wobei es Einfluss auf die Fusion von Endothel- und Tumorzellen zu haben scheint (Bjerregaard et al., 2006, Larsson et al., 2007).

Die erhöhte Expression von HERVs in Krebszellen entfachte die Diskussion über den Nutzen von HERV-Proteinen als diagnostische Biomarker. Für Brustkrebs hat sich dabei HERV-K ENV als relevant herausgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte HERV-

K ENV Antikörper und mRNA im Serum sowohl mit Krebs-Frühstadien als auch mit einem erhöhten Risiko für Metastasenbildung assoziiert sind (Wang-Johanning et al., 2014).

Neben den genannten protumoralen Wirkweisen von HERVs werden inzwischen auch einige protektive Eigenschaften diskutiert, die vor allem die Immunantwort betreffen (Bannert et al., 2018, Alcazer et al., 2020, Petrizzo et al., 2021, Müller et al., 2022). HERVs sind dabei zum einen in der Lage eine Interferon-gesteuerte angeborene Immunantwort auszulösen, auch als „virales Mimikry“ bezeichnet, zum anderen als Tumor-spezifische Antigene (TSA) eine adaptive Immunantwort zu induzieren (Alcazer et al., 2020).

HERVs können in Tumoren durch tumorspezifische epigenetische Dysregulation aber auch durch medikamenteninduzierte DNA-Hypomethylierungen durch DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMTi) reaktiviert werden (Petrizzo et al., 2021). Zusätzlich werden noch verschiedene externe Faktoren, wie die Exposition gegenüber chemischen Substanzen oder physikalischen Faktoren z.B. Röntgenstrahlung, als mögliche Reaktivierungsmechanismen diskutiert (Zhang et al., 2019). Die überexprimierte HERV-RNA (dsRNA) kann dann über Bindung an PRR beispielsweise den NFκB Signalweg aktivieren und eine antitumorale, Interferon-gesteuerte Immunantwort auslösen (Yu et al., 2012, Petrizzo et al., 2021). Dieses unter anderem durch DNMTis induzierte „virale Mimikry“ konnte bereits 2015 in einigen soliden Tumoren, beispielsweise kolorektalen Karzinomen und Melanomen, nachgewiesen werden (Chiappinelli et al., 2015, Roulois et al., 2015). In einem präklinischen Melanom-Modell wurde festgestellt, dass DNMTis zu einer erhöhten Sensitivität für eine *Anti-cytotoxic-T-lymphocyte-associated-protein 4* (CTLA-4) Immuncheckpoint Therapie führen (Chiappinelli et al., 2015).

Ein weiterer Mechanismus basiert auf der Synthese von viralen HERV-Proteinen als TSA, die zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems führen (Smith et al., 2019, Petrizzo et al., 2021). In verschiedenen Studien konnten HERV spezifische Antikörper sowie T-Zellen im Blut von Patient*innen mit Leukämien (Saini et al., 2020) und Ovarialkarzinom (Rycaj et al., 2015) detektiert werden. Es gibt bereits verschiedene Ansätze TSA in zielgerichtete Krebstherapien einzubinden. Krishnamurthy et al. berichteten beispielsweise über HERV-K ENV spezifische CAR-T-Zellen als therapeutische Option für Melanom-Patient*innen (Krishnamurthy et al., 2015).

Insgesamt ist die Bedeutung von HERVs in der Tumorphathogenese noch nicht abschließend geklärt. Einerseits sind HERVs mit Tumorproliferation und Invasivität assoziiert, andererseits scheinen sie Einfluss auf das angeborene und adaptive Immunsystem zu haben und können so eine antitumorale Immunantwort auslösen.

1.5.2 Wirkungsweise von HERV-W ENV Protein

Retrovirale Partikel der Familie HERV-W, initial als MS-assoziierte Retroviren bezeichnet, wurden erstmals vor über 30 Jahren von Perron et al. in leptomeningealen Zelllinien sowie Monozytenkulturen von Patient*innen mit MS beschrieben (Perron et al., 1989, Perron et al., 1991).

Es wird angenommen, dass die Transaktivierung von HERV-W vor allem durch Infektionen mit zeitgenössischen Viren wie dem Epstein-Barr-Virus (EBV), dem Humanen Herpesvirus-6 (HHV-6) oder dem Herpes-simplex Virus 1 (HSV-1) beeinflusst wird (Bhende et al., 2004, Ruprecht et al., 2006, Mameli et al., 2012, Charvet et al., 2018). Zudem besteht ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen den HERV-assoziierten Herpesvirusinfektionen und MS (Perron and Lang, 2010, Leibovitch and Jacobson, 2018). Die Reaktivierung von HERV-W führt zur Produktion retroviraler Partikel und insbesondere dessen Hüllprotein HERV-W ENV scheint für inflammatorische und superantigen-ähnliche Immuneffekte verantwortlich zu sein (Perron et al., 2001). Interessanterweise konnte immunhistochemisch HERV-W ENV Protein auch in gesundem Gehirngewebe vor allem in Mikroglia und Endothelzellen nachgewiesen werden (Perron et al., 2005). In aktiven MS-Läsionen zeigte sich jedoch eine deutlich erhöhte Expression von HERV-W ENV Protein, welche zudem mit dem Grad der Inflammation und Demyelinisierung korrelierte (Mameli et al., 2007). Weiterhin scheint ein erhöhter HERV-W DNA Gehalt im Blut von MS Patient*innen mit einem ungünstigeren klinischen Verlauf assoziiert zu sein (Sotgiu et al., 2002, Rolland et al., 2005). Rolland et al. konnten zeigen, dass das HERV-W ENV Protein in peripheren Blutzellen, wie Monozyten, über den PRR TLR4 und den Ko-Rezeptor *Cluster of differentiation 14* (CD14) zu einer Aktivierung des NFκB-Signalweges führt. Die Aktivierung geht mit einer Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL1B, IL6 oder TNFA einher (Rolland et al., 2006). Im Kontext der MS konnte mittels *in vitro* Studien in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPCs) gezeigt werden, dass eine HERV-W ENV Protein induzierte Aktivierung von TLR4 zu Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und zur Induktion der Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und Freisetzung von nitrosativem Stress führte, der mit der Zerstörung von Myelin assoziiert ist (Kremer et al., 2013). Darauf aufbauend zeigten weitere *in vitro* Studien, dass das HERV-W ENV Protein auch einen proinflammatorischen Phänotyp in Mikroglia induziert, der nachfolgend mit axonalem Schaden assoziiert werden konnte (Kremer et al., 2019). Eine *in vivo* Studie aus dem Jahr 2023 konnte zudem das degenerative Potenzial von HERV-W ENV Protein bestätigen (Gruchot et al., 2023).

1.6 Ziel der Arbeit

Das Glioblastom ist der häufigste primäre maligne Gehirntumor des Erwachsenen und hat als ZNS-WHO Grad 4 Tumor eine insgesamt schlechte Prognose (Ostrom et al., 2022). Vorherige Studien verdeutlichen den Einfluss der TME, darunter Mikrogliazellen, auf die Glioblastom-Homöostase und Tumorprogression (Hambardzumyan et al., 2016). In den letzten Jahren nahmen die Erkenntnisse über den Einfluss von HERVs auf die Pathogenese verschiedener Autoimmun- und Tumorerkrankungen zu. Ein in der MS Forschung bereits sowohl mittels *in vitro* als auch *in vivo* Studien untersuchtes Protein ist das HERV-W ENV Protein, das die Expression proinflammatorischer Zytokine in OPCs und Mikroglia steigert und Mikroglia-vermittelt zu axonalem Schaden führt (Rolland et al., 2006, Kremer et al., 2013, Kremer et al., 2019, Gruchot et al., 2023).

Im Vorfeld dieses Dissertationsvorhabens durchgeführte histochemische Analysen zeigten, dass das HERV-W ENV Protein im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe vermehrt in Gliomen exprimiert wird (Reiche et al., 2024). Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob und inwieweit das HERV-W ENV Protein die Homöostase von Glioblastomzellen direkt beeinflusst. Dazu wurden verschiedene Gene aus den Bereichen Inflammation, Tumorinvasivität, Modulation der TME und Angiogenese unter HERV-W ENV Protein Exposition analysiert. Weitere zuvor durchgeführte histochemische Analysen konnten nachweisen, dass das HERV-W ENV Protein im Glioblastom im Speziellen in Makrophagen- und Mikroglia-positiven Zellen innerhalb der TME detektiert wurde (Reiche et al., 2024). Daher war es in einem nächsten Schritt von erheblichem Interesse, zu analysieren, ob und inwiefern indirekte Effekte von HERV-W ENV Protein vermittelt über Mikrogliazellen, sowohl in direktem Zellkontakt zu Glioblastomzellen als auch über parakrine Zellkommunikation, bestehen. Zudem galt es, den Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf zelluläre Funktionen wie Proliferation und Migration in Glioblastomzellen zu untersuchen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Organismen

Organismen	Linie	Hersteller, Ort, Land
Humane Glioblastomzelllinie	A-172	Cell Line Services, Eppelheim, Deutschland
<i>Rattus norvegicus</i>	Wistar	Janvier Labs, Saint-Berthevin, Frankreich

2.1.2 Chemikalien

Reagenz	Hersteller, Ort, Land
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland
Accutase	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V 7,5%	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Citifluor mounting Medium	Citifluor, London, UK
DNase I	Cell Systems, Lakewood, USA
<i>Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), high glucose (D-Glucose 4,5 g/L)</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
<i>Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), low glucose</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
<i>Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), low glucose, -Phenolrot</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol > 96%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
Immu-mount	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Isofluran	Piramal-Healthcare, Mumbai, Indien
L-Cystein	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Glutamin	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Leibovitz's Medium L-15	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LiChrosolv® Wasser	Merck, Darmstadt, Deutschland

Matrigel	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
<i>Minimum essential</i> Medium (MEM)	ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Normal <i>donkey</i> serum (NDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Normal <i>goat</i> serum (NGS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Papain	Worthington / Cell Systems, Lakewood, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
pV14 control plasmid	Amsbio, Wales
pV14 Env	GeNeuro, Plan-les-Ouates, Schweiz
Rat CD11b/c Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypan Blau 0,4%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

2.1.3 Reagenzien zur Stimulation

Reagenz	Hersteller, Ort, Land
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rekombinantes HERV-W ENV-T Protein	GeNeuro, Plan-les-Ouates, Schweiz
HERV-W ENV-T Puffer	GeNeuro, Plan-les-Ouates, Schweiz
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rekombinantes Tumornekrosefaktor alpha (TNFA) Kat#510RT	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.4 Immunzytochemie

Reagenz	Verdünnung	Hersteller, Ort, Land
Anti-Ki67 Antikörper, Kaninchen monoklonal (ab16667)	1:250	Abcam, Cambridge, UK
Anti-TLR4 Antikörper, Kaninchen polyklonal (ab13556)	1:200	Abcam, Cambridge, UK
Anti-iNOS Antikörper, Kaninchen polyklonal (ab15323)	1:250	Abcam, Cambridge, UK

Anti- β III-Tubulin Antikörper, Maus monoklonal (T8660)	1:500	Merck, Darmstadt, Deutschland
Anti- β III-Tubulin Antikörper, Huhn	1:500	Aves Labs, Davis California, USA
Anti-Iba1 Antikörper, Ziege polyklonal (ab5076)	1:500	Abcam, Cambridge, UK
<i>Glial fibrillary acidic protein</i> (GFAP), Kaninchen polyklonal (Z0334)	1:1000	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Alexa Fluor™ 594 Phalloidin	1:500	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Alexa Fluor™ 488 Phalloidin	1:500	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
<i>Alexa goat anti mouse IgG 488</i>	1:500	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
<i>Alexa goat anti mouse IgG 594</i>	1:500	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
<i>Alexa goat anti rabbit IgG 488</i>	1:500	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
<i>Alexa goat anti rabbit IgG 594</i>	1:500	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
<i>Alexa goat anti chicken IgG 488</i>	1:500	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
<i>Alexa donkey anti goat IgG 594</i>	1:500	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

2.1.5 Kits

Name des Kits	Hersteller, Ort, Land
Cellline Nucleofector™ Kit T	Lonza, Basel, Schweiz
<i>Crystal Violet Cell Cytotoxicity Assay Kit</i>	BioVision, Waltham, USA
<i>High capacity cDNA reverse transcription Kit</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Human TNF alpha Single Step ELISA Kit (Ab 181421)	Abcam, Cambridge, UK
<i>Power SYBR™ Green PCR Master Mix</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Rnase-free Dnase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.6 Geräte, technische Ausstattung und Software

Name	Hersteller, Ort, Land
7900HT Fast Real-Time PCR System	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Autoclave GLA30	Fritz Gössner GmbH, Hamburg, Deutschland
Axioplan 2 Fluoreszenz Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Axioplan 4.2 <i>software</i>	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
BBD 6220 CO ₂ Inkubator	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
BioRender	BioRender, Toronto, Kanada
Endnote X9	Thomas Reuters, New York City, USA
Excella E24 <i>Incubator shaker</i>	New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland
Graphpad PRISM <i>software</i> 8.0.1	GraphPad Software, Inc, La Jolla, USA
Herasafe HSP 12 sterile Werkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
ImageJ <i>software</i>	National Institute of Health, Rockville, USA
Infinite M200 Pro	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
MACS [®] MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NanoDrop ND 1000	PegLab, Erlangen, Deutschland
Primer Express 3.0.1	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Tecan i-control (Version 1.7.1.12)	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thoma Zählkammer (Tiefe 0,1 mm; Fläche 0,0025 mm ²)	Optik Labor, Görlitz, Deutschland
Nucleofector [®] II	Lonza, Basel, Schweiz
<i>Veriti 96 Well Fast Thermal Cyclers</i>	ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems, Waltham, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zeiss LSM 510 Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zentrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller, Ort, Land
Zellkultur Platten: 24 <i>well</i> , 96 <i>well</i> , 100 mm Ø Petri Schale	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
MicroAmp [®] Fast 96- <i>well</i> Reaction Plate (0,1 ml)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Reaktionsröhrchen: 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

MACS® <i>columns</i> , MS Typ	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Millicell® <i>Cell Culture Inserts</i> (Porengröße 3,0 µm)	Merck, Darmstadt, Deutschland
ThinCerts™-TC Einsätze (Porengröße 8,0 µm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Menzel <i>coverslips</i> (Ø 13 mm)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Parafilm®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pipetten Spitzen / Stripetten: 10 µl, 10/20 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5ml, 10 ml, 25 ml	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berdorf, Deutschland Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon Zentrifugenröhrchen: 5 ml, 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand GmbH & CO., Wertheim, Deutschland

2.1.8 Zusammensetzung der Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung
Glioblastom-Zellkulturmedium	<ul style="list-style-type: none"> – DMEM D-Glucose 4,5 g/L – FCS 10% – Penicillin/Streptomycin 1%
Mikroglia-Zellkulturmedium	<ul style="list-style-type: none"> – DMEM low glucose, -phenol red – FCS 10% – L-Glutamine 2mM – Penicillin/Streptomycin 50 U/ml
<i>Mixed rat brain</i> Kulturmedium	<ul style="list-style-type: none"> – DMEM low glucose – FCS 10% – L-Glutamine 2mM – Penicillin/Streptomycin 50 U/ml
Trypsin <i>inhibitor</i> Kulturmedium	<ul style="list-style-type: none"> – Leibovitz's medium L-15 – Trypsin inhibitor 0,1mg/ml – Albumin BSA-V 5 mg/ml – DNase I 0,4 µg/ml
<i>Digestion</i> Medium	<ul style="list-style-type: none"> – 2% DNase I (40 µg/ml) – 20% L-Cystein (0,24 mg/ml) – 10% Papain (30 U/ml)

2.1.9 Zusammensetzung von HERV-W ENV und Kontroll-Puffer

Das rekombinante Protein HERV-W ENV besteht aus 548 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 61,44 kDa (Foerster, 2020). Das HERV-W ENV Protein wird in BL21

Escherichia coli von PX'Therapeutics, Grenoble, Frankreich unter sterilen Bedingungen produziert. Die in den durchgeführten Experimenten genutzte Charge von Mai 2016 mit einer Stock-Konzentration von 2,54 mg/ml wurde von GeNeuro SA, Schweiz zur Verfügung gestellt. Die HERV-W ENV Protein Stock-Konzentration wurde in einer Pufferlösung bestehend aus Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, SDS 1,5 % und DTT 10 mM auf eine Konzentration von 1000 ng/µl verdünnt. Diese Pufferlösung diente, wenn nicht anders erwähnt, in den nachfolgenden Experimenten als Kontrolle. Das Endotoxin-Level befand sich unterhalb der Nachweisgrenze von 5 EU/ml (Kremer et al., 2013). Die HERV-W ENV Protein Stock-Konzentration sowie die verdünnten *Aliquots* wurden bei -80°C gelagert.

2.2 Zellkulturtechniken

2.2.1 *In vitro* Kultivierung der humanen Glioblastomzelllinie A-172

Die Glioblastomzellen der kommerziell erworbenen humanen Zelllinie A-172 wurden in Passage 24 (Lot-Nummer 300108-1016SF) geliefert. Um ausreichend Glioblastomzellen in ähnlicher Passage für die geplanten Experimente zur Verfügung zu haben, wurden die Zellen zunächst bis Passage 26 hochgezogen und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die A-172 Glioblastomzellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 15 ml Medium kultiviert. Als Kulturmedium wurde *Dulbecco's Modified Eagle's* Medium (DMEM) mit 4,5 g/L D-Glukose genutzt, welches zuvor mit 10% Fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt worden war. Ein Mediumwechsel fand alle drei Tage statt. Das Aufteilen der Zellen erfolgte, sobald diese eine konfluierende Schicht gebildet hatten. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (PBS) pro Flasche gewaschen und anschließend mit 5 ml Accutase pro Flasche bei 37°C für 4 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Accutase-Lösung mit 5 ml Glioblastom-Medium neutralisiert und der Flascheninhalt mit vitalen Glioblastomzellen in ein 50 ml Falcon überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation mit 1200 *revolutions per minute* (rpm) bei 4°C für 3 min. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml Glioblastom-Medium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:5 auf neue Flaschen verteilt. Zum Einfrieren der Zellen in Passage 26 wurde ein Konservierungsmedium bestehend aus 5% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 95% Glioblastom-Medium genutzt. Die in Medium suspendierten Glioblastomzellen wurden in jeweils 1 Mio/Falcon aufgeteilt und mit 1200 rpm bei 4°C für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen in einer Eisbox überführt. Nach 24 Stunden bei -

30°C wurden die Glioblastomzellen für weitere 24 h bei -80°C asserviert. Zur langfristigen Asservierung erfolgte anschließend die Überführung in den Stickstofftank mit -196°C.

Das Auftauen der tiefgefrorenen Glioblastomzellen erfolgte zunächst bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden anschließend in vorgewärmtes Glioblastom-Medium überführt und bei 1200 rpm und 4°C für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Glioblastom-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension konnte dann in eine mit 15 ml Glioblastom-Medium befüllte 75 cm² Zellkulturflasche überführt werden. Die weitere Kultivierung erfolgte wie zuvor beschrieben bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank mit einem Mediumwechsel nach drei Tagen bis zur Bildung einer konfluierenden Schicht. Dann folgte das Ablösen der Zellen, eine Zentrifugation und Resuspension der vitalen Glioblastomzellen in Glioblastom-Medium, wie oben beschrieben. In Vorbereitung zur Ausplattierung der Zellen für die jeweiligen Experimente wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau versetzt und die vitalen Glioblastomzellen in einer Thoma-Zeiss-Zählkammer gezählt. Nach Ermittlung der absoluten Zellzahl wurde die jeweils benötigte Anzahl von Zellen in einer 24-*well* Platte in 500 µl Glioblastom-Medium pro *well* ausplattiert. Es wurden 10.000 Zellen/*well* für RT-qPCR-Experimente, 5.000 Zellen/*well* für immunzytochemische Versuche und 50.000 Zellen/*insert* für Kristallviolett-Assays verwendet und für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Alle Experimente wurden mit A-172 Glioblastomzellen in den Passagen 27 bis 31 durchgeführt.

2.2.2 Präparation von primären Ratten-Mikrogliazellen

Die verwendeten primären Ratten-Mikrogliazellen wurden aus dem Cortex von neugeborenen Wistar Ratten (p0 und p1) generiert (Organentnahme Projektnummer 069/11). Die Präparation beruht auf dem Protokoll von McCarthy und de Vellis von 1980 (McCarthy and de Vellis, 1980) und wurde von Technischen Assistent*innen durchgeführt. Alle beschriebenen Methoden wurden von der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt. Nachdem die neugeborenen Ratten mittels Isofluran narkotisiert worden waren, erfolgten die Dekapitation und die Entfernung der Haut und des knöchernen Schädels. Die in MEM HEPES Medium gelegten Gehirne wurden anschließend in die Hemisphären geteilt und die Meningen wurden entfernt. Die Hirnhälften wurden mit einem scharfen Skalpell zerkleinert und in 50 ml MEM HEPES Medium gesammelt. Es folgte die Zentrifugation mit 2000 rpm für 1 min. Das Medium wurde abgenommen, 1 ml *Digestion* Medium hinzugefügt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin *Inhibitor* Medium erfolgte eine erneute Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur. Mittels Glas-Pasteur-Pipetten wurde die Zellsuspension vorsichtig gemischt. Im nächsten Schritt wurde 10 ml DMEM *high*

glucose + 10% FCS hinzugefügt und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstandes wurde die Zellsuspension in 15 ml *mixed rat brain* Kulturmedium resuspendiert. Nun folgte das Überführen in 75 cm² Zellkulturflaschen und eine Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit für 10 Tage mit einem Mediumwechsel zweimal pro Woche.

Nach der Inkubationszeit von 10 Tagen wurden die Zellkulturflaschen auf einen Schüttler (Excella E24) bei 180 rpm für 2 h gelegt, sodass sich die Mikroglia lösten. Der Überstand mit den gelösten Mikroglia wurde nun abgenommen und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 1 ml *mixed rat brain* Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann mit 9 ml *mixed rat brain* Medium in eine Petrischale (Ø 10 cm) überführt und über Nacht im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellkulturflaschen enthielten jetzt am Boden haftende Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (*oligodendrocyte precursor cells*; OPCs) und Astrozyten. Nach der Zugabe von 10 ml *mixed rat brain* Medium wurden die Flaschen erneut auf dem Schüttler mit 180 rpm bei 37°C für 22 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium mit den sich abgelösten OPCs, Astrozyten und Mikrogliazellen in Petrischalen (Ø 10 cm) überführt und für 20 min im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Mikroglia hafteten nun an der Oberfläche der Petrischale. Das Medium mit den enthaltenen OPCs und Astrozyten wurde abgenommen und die Mikrogliazellen wurden für weitere 2 h in 10 ml *mixed rat brain* Medium bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.3 Isolation der Mikrogliazellen

Die Isolation der Mikrogliazellen erfolgte mittels *Magnetic-Activated Cell Sorting* System (MACS) nach Herstellerangaben (Miltenyi Biotech) unter sterilen Bedingungen. Im ersten Schritt wurde das Medium von den Petrischalen abgenommen und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 ml Accutase pro Schale und eine Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit für 5 min. Nachdem sich die Mikrogliazellen von der Oberfläche gelöst hatten, wurde pro Schale 4 ml vorgewärmtes Mikroglia-Medium hinzugefügt, um die Reaktion der Accutase zu neutralisieren. Die vorhandenen 7 ml aller Petrischalen wurden nun in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und bei 1200 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 80 µl Puffer, bestehend aus PBS mit 0,5% Bovinem Serumalbumin (BSA), resuspendiert. Nach der Zugabe von 20 µl *CD11b/c rat Microbeads* wurde die Zellsuspension vorsichtig durchmischt und anschließend für 15 min bei 2-8°C inkubiert. Nach Hinzugabe von 2 ml Puffer wurden die Zellen erneut in oben genannten

Einstellungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 500 µl Puffer resuspendiert.

Nun erfolgte die magnetische Separation der Mikrogliazellen im MACS-Magneten. Zuerst wurden 500 µl Puffer in die MS Säule pipettiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch die Säule laufen gelassen. Es folgten 3 Waschschriffe mit jeweils 500 µl Puffer. Im letzten Schritt wurde die Säule vom Separator genommen, auf ein neues Falcon gestellt, 1 ml Puffer auf die Säule gegeben und mit dem Spritzenkolben schnell herausgedrückt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die magnetische Separation, wie oben beschrieben, wiederholt. Zur weiteren Kultivierung der Mikrogliazellen erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm und 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 1 ml vorgewärmtem Mikroglia-Medium resuspendiert. Nach dem Zählen in der Thoma-Zeiss-Zählkammer, konnten die Zellen je nach Experimentenaufbau ausplattiert werden.

2.2.4 Kultivierung der Glioblastomzellen und Mikrogliazellen in Kokultur

Wie in Abb. 1 dargestellt, erfolgte die Kultivierung von humanen A-172 Glioblastomzellen und primären Rattenmikrogliazellen unter zwei verschiedenen Bedingungen. Nachdem die Glioblastomzellen wie unter 2.2.1 beschrieben gesplittet und in 24-*well* Platten ausplattiert worden waren, wurden die Zellen für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für die +MG-Bedingung wurden nun 100.000 Mikrogliazellen pro *well* direkt zu den Glioblastomzellen hinzugegeben. In der *MG-Bedingung wurden die Mikrogliazellen in *inserts* mit einer Porengröße von 3,0 µm pipettiert, nachdem 100 µl Mikroglia-Medium hineingegeben worden waren. Nach einer erneuten Inkubation von 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit erfolgte die Stimulation der Zellen wie unter 2.2.6 beschrieben.

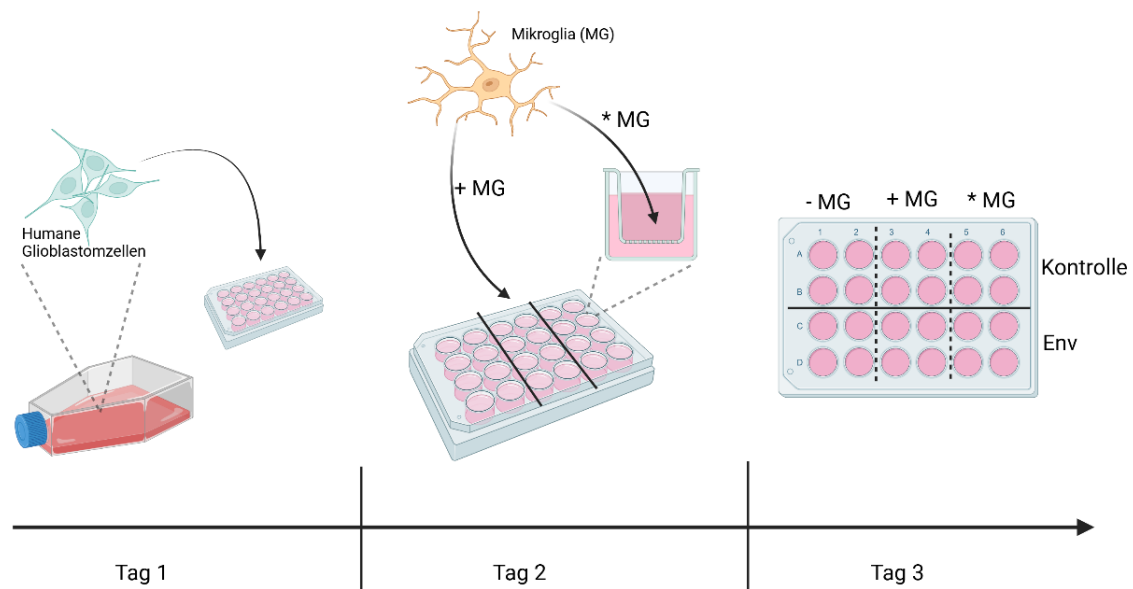


Abb. 1: Versuchsaufbau Kokultur. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Kokultur. An Tag 1 werden humane A-172 Glioblastomzellen in die 24-*well* Platte überführt und verbleiben im Inkubator für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit. An Tag 2 werden 100.000 Mikrogliazellen hinzugefügt, entweder direkt zu den Glioblastomzellen (+ MG) oder in *inserts* (* MG). Nach einer erneuten Inkubation zu den genannten Bedingungen erfolgt an Tag 3 die Stimulation mit rekombinantem HERV-W ENV Protein oder der Puffer-Kontrolle. Abbildung erstellt mit <https://BioRender.com>.

2.2.5 Kultivierung für Migrationsversuche

Für die Migrationsversuche erfolgte zuerst die Ausplattierung in 24-*well* Platten von 100.000 Mikrogliazellen pro *well* und eine Inkubation von 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit. Die *inserts* mit einer Porengröße von 8,0 µm wurden in der Vorbereitung mit Matrigel beschichtet. Das Matrigel wurde in einer Endkonzentration von 166 µg/ml mit einem Volumen von 90 µl pro *insert* verwendet. Die Ausbildung einer Membranmatrix erfolgte nach einer Inkubation der *inserts* für 1 h bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit. Anschließend wurden 50.000 Glioblastomzellen für Kristallviolett Assays oder 5.000 für die Phalloidin-Färbung mit je 100 µl Glioblastom-Medium in die mit Matrigel beschichteten *inserts* pipettiert (Abb. 2) und für weitere 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach folgte die Stimulation wie unter 2.2.6 beschrieben.

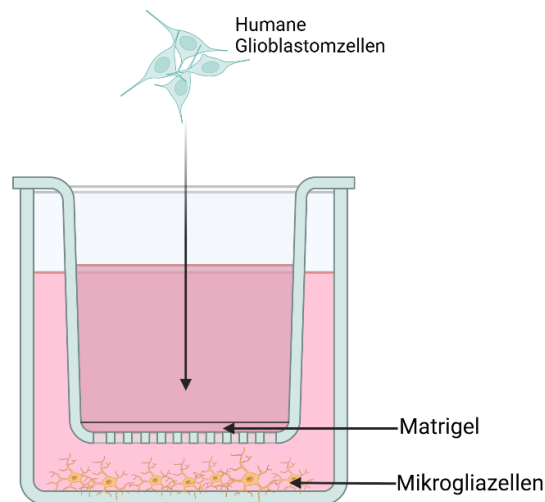


Abb. 2: Versuchsaufbau Migrationsversuche. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für Migrationsversuche. Mikrogliazellen werden in eine 24-*well* Platte ausplattiert und verbleiben für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit im Inkubator. Anschließend werden Glioblastomzellen in die mit Matrigel beschichteten *inserts* mit einer Porengröße von 8,0 µm hinzugefügt. Abbildung erstellt mit <https://BioRender.com>.

2.2.6 Stimulation

Die Stimulation mit HERV-W ENV Protein der Glioblastomzell-Monokultur erfolgte nach einer Inkubationszeit von 24 h der zuvor in einer 24-*well* Platte ausplattierten Zellen. Dazu wurden rekombinantes HERV-W ENV Protein sowie die Puffer-Kontrolle in Glioblastom-Zellkulturmedium auf eine Endkonzentration von 1000 ng/ml bzw. 5000 ng/ml verdünnt. Es erfolgte ein Mediumwechsel und eine erneute Inkubation für 24 bzw. 72 h bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit mit anschließender Lyse oder Fixierung. Die Konzentrationen und Zeitpunkte der HERV-W ENV Protein Stimulation lehnten an vorherige Experimente der Arbeitsgruppe mit Mikrogliazellen an (Kremer et al., 2019).

In der Glioblastom-Mikroglia-Kokultur sowie bei den Migrationsversuchen erfolgte die Stimulation der Zellen mit 1000 ng/ml HERV-W ENV Protein an Tag 3 des Versuchsaufbaus (Abb. 1). Die anschließende Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit dauerte 24 h.

Zur Bestätigung der Aktivierbarkeit der Glioblastomzellen der Zelllinie A-172 wurden Stimulationen mit Lipopolysaccharid (LPS) und Tumornekrosefaktor alpha (TNFA) durchgeführt. LPS hat eine hohe Relevanz als Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien und ist in der Lage, über den Rezeptor TLR4 starke Immunreaktionen auszulösen. Das Zytokin TNFA gehört neben IL6 und IL1b zu den wichtigsten Entzündungsmediatoren mit systemischer Wirkung (Rassow J, 2022). Der Versuchsaufbau

orientierte sich an aktuellen Studien (Han et al., 2017, Zhu et al., 2022). Das weitverbreitete Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) diente hierbei als Kontroll-Stimulanz. Die Reagenzien wurden in Glioblastom-Medium verdünnt. Während die Stimulation mit DMSO (1 µg/ml) und TNFA (10 ng/ml) für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit erfolgte, wurden für die Stimulation mit LPS (1 µg/ml) zwei unterschiedliche Bedingungen angewendet. Erstens wurde eine Stimulation für 4 h mit direkter Lyse oder Fixierung durchgeführt und zweitens fand eine Prästimulation mit LPS statt, bei der nach 4 h auf Glioblastom-Medium gewechselt und anschließend nach 20 h Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit fixiert bzw. lysiert wurde.

2.2.7 Nukleofektion von A-172 Glioblastomzellen

Die Nukleofektion von A-172 Glioblastomzellen erfolgte zur Erzeugung HERV-W ENV Protein produzierender Glioblastomzellen mittels *Cellline Nucleofector Kit T* (Lonza). Pro Transfektionsansatz wurden 1 Mio. A-172 Glioblastomzellen verwendet. Nach der Zentrifugation bei 1200 rpm für 4 min wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden in 100 µl Plasmidlösung resuspendiert und in eine Küvette überführt. Die zuvor angesetzte Plasmidlösung bestand aus 100 µl Transfektionslösung und 2 µg DNA pro Ansatz (pV14 Env und pV14 Ctrl). Die Nukleofektion erfolgte im Nucleofector® II mit folgenden Programmen: T-020, U-029 und X-005. Anschließend wurde 1 ml vorgewärmtes Medium in jede Küvette hinzugegeben. Die transfizierten Zellen wurden in 24-well Platten mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro well ausplattiert und in den Brutschrank gestellt. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 24 h Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit.

2.3 Immunzytochemie

Für die Durchführung von immunzytochemischen Färbungen mit der Technik der Immunfluoreszenz wurden Glioblastomzellen (5.000 Zellen/well) in Monokultur oder in Kokultur mit 100.000 Mikroglia (siehe Kapitel 2.2.4) auf *Coverslips* (Ø 13 mm) ausgesät. Nach der Stimulation mit den oben genannten Reagenzien und Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit erfolgte die Fixierung. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur für 10 min fixiert. Abschließend erfolgten drei Waschschrte mit PBS.

Die weiteren Färbeschrte erfolgten in einer feuchten mit Färbepapier und Parafilm ausgelegten Petrischale. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und Permeabilisierung wurde pro *Coverslip* 80 µl der entsprechenden Blockierungslösung (Tabelle 1) aufgetragen und bei Raumtemperatur für 40 min belassen. Anschließend

wurden die Primärantikörper in entsprechender Antikörperlösung (Tabelle 1) verdünnt und mit einem Volumen von 80 µl pro *Coverslip* aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Sekundärantikörper (1:500) sowie 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (1:100) zur Darstellung der Zellkerne mit PBS verdünnt und für 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Auch das fluoreszenzkonjugierte Phalloidin wurde für die Ko-Färbung mit Anti-Iba-1 an dieser Stelle in einer Konzentration von 1:500 hinzugegeben und für 1 h im Dunkeln inkubiert. Abschließend erfolgten erneut drei Waschschritte mit PBS und die Eindeckelung der *Coverslips* mit *Citifluor Mounting Medium*.

Das Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) mit Axiovision 4.2 Software (Zeiss) wurde zur visuellen Darstellung der immunfluoreszierenden Färbungen genutzt. Zur jeweiligen Auswertung wurden 6-9 repräsentative und zufällig ausgewählte Bilder pro *Coverslip* in 20x Vergrößerung aufgenommen. Für quantitative Analysen in der Glioblastom-Monokultur wurden mittels ImageJ Software die positiven Zellen gezählt und in Relation zu deren Gesamtzellzahl (DAPI positive Zellen) gesetzt. In der Glioblastom-Mikroglia-Kokultur wurde die Anzahl der β III-Tubulin-positiven Zellen als Referenz für die Normalisierung verwendet. Die Ergebnisse der quantitativen Analysen wurden in Prozent angegeben.

Die Phalloidin-Färbung der *inserts* im Rahmen der Migrationsversuche wurde in einer 24-*well* Platte durchgeführt. Nach der wie zuvor beschriebenen Fixierung wurden die *inserts* von innen mit einem Wattestäbchen abgekratzt, um die nicht-migrierten Glioblastomzellen zu entfernen. Anschließend wurde 100 µl des in PBS verdünnten Phalloidins (1:500) in das *well* gegeben und für 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach vier folgenden Waschschritten mit PBS wurde die Membran der *inserts* vorsichtig ausgeschnitten und mit *Immu-mount* eingedeckelt. Repräsentative Bilder wurden am Laser Scanning Mikroskop (Zeiss LSM 510) in der Z-Ebene aufgenommen.

Lösung	Zusammensetzung	Verwendung
Blockierungslösung I	PBS 2% NGS 0,5% Triton X-100	Anti-Ki-67
Antikörperlösung I	PBS 2% NGS 0,1% Triton X-100	
Blockierungslösung II	PBS 10% NGS 0,5% Triton X-100	Anti- β III-Tubulin (Maus) + Anti-iNOS
Antikörperlösung II	PBS 10% NGS 0,1% Triton X-100	
Blockierungslösung III	PBS 10% NGS 0,1% Triton X-100	Anti- β III-Tubulin (Huhn) Anti- β III-Tubulin (Huhn) + GFAP Anti- β III-Tubulin (Huhn) + Anti-Ki-67 Anti- β III-Tubulin (Huhn) + Anti-TLR4
Antikörperlösung III	PBS 10% NGS 0,03% Triton X-100	
Blockierungslösung IV	PBS 10% NDS 0,5% Triton X-100	Anti-Iba-1 + Phalloidin
Antikörperlösung IV	PBS 10% NDS 0,1% Triton X-100	

Tabelle 1: Zusammensetzung der Blockierungs- und Antikörperlösungen. Verschiedene Lösungen zur immunzytochemischen Färbung und deren Zusammensetzung aus phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), *Normal Goat Serum* (NGS) bzw. *Normal Donkey Serum* (NDS) und Triton X-100 sind dargestellt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolation von Ribonukleinsäure

Für die Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) wurde das *RNeasy Mini* Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden 10.000 A-172 Glioblastomzellen pro *well* (1,9 cm²) in Triplets pro Bedingung und Zeitpunkt ausgesät. In der Kokultur erfolgte nun die Zugabe von 100.000 Mikrogliazellen pro *well*, entweder direkt zu den Glioblastomzellen (+MG) oder in *inserts* (Porengröße 3,0 μ m) (*MG). Nach der Stimulation und Inkubation der Zellen wurde das Glioblastom-Medium abgenommen. Die *inserts* mit den Mikrogliazellen wurden vor der Zelllyse entfernt. Die Zelllyse erfolgte mit insgesamt 350 μ l RLT Lyse Puffer, versetzt mit β -Mercaptoethanol (1:100) pro Bedingung, und dem mechanischen Abkratzen der Zellen mit einer Pipettenspitze. Das jeweilige Lysat wurde in QIAshredder Säulen

pipettiert und mit 14.000 rpm bei 4°C für 1 min zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 350 µl 70%iges Ethanol auf das Eluat gegeben und das Ethanol-Eluat Gemisch in die RNeasy Säule überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4°C für 1 min. Die RNA wurde so an die Säule gebunden und das Eluat konnte entsorgt werden. Nun erfolgte ein Waschschrift mit 350 µl RW1 Puffer und erneuter Zentrifugation. Nach Hinzugabe von 80 µl DNase-RDD Puffer Gemisch (10 µl DNase in 70 µl RDD Puffer) erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 350 µl RW1 Puffer hinzugefügt und die Säule für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Zentrifugationen in voriger Einstellung, wobei je 300 µl RPE-Puffer verwendet wurden. Nach einer trockenen Zentrifugation bei 14.000 rpm für 1 min wurde 50 µl *RNAse free water* auf die Säule pipettiert und für 4 min inkubiert. Abschließend erfolgte die letzte Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 min. Die Messung des RNA-Gehaltes fand am NanoDrop ND 1000 statt. Die RNA wurde entweder bei -80°C gelagert oder direkt zur Durchführung der Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) verwendet.

2.4.2 cDNA-Synthese

Für die Reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA wurde das *High capacity cDNA Reverse Transcription* Kit (ThermoFisher Scientific) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurde ein Master Mix mit den in Tabelle 2 aufgeführten Reagenzien angesetzt. Die RNA-Proben wurden mit *RNAse free water* bis zu einer Gesamtkonzentration von 250 ng verdünnt. 10,2 µl des Master Mixes wurden anschließend zu 19,8 µl RNA-Lösung gegeben.

Die Reverse Transkription verlief dann in einem *Thermocycler* in definierten Schritten. Nach dem ersten Schritt bei 25°C für 10 min, folgte der zweite bei 37°C für 120 min. Im letzten Schritt wurden 85°C für 5 s erreicht. Abschließend wurde die cDNA auf ein Volumen von 200 µl mit LiChrosolv® Wasser verdünnt.

Reagenz	Volumen in µl
10x RT Buffer	3
10x RT Random Primer	3
dNTP Mix	1,2
RNase Inhibitor	1,5
Reverse Transkriptase	1,5

Tabelle 2: Zusammensetzung cDNA Master Mix. Verschiedene Reagenzien und das genutzte Volumen in Mikrolitern (µl) für eine Probe.

2.4.3 *Real Time* quantitative PCR

Die *Real Time* quantitative Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) ist eine bedeutende molekularbiologische Methode und dient dem Nachweis sowie der quantitativen Bestimmung von DNA. Die RT-qPCR Analysen wurden mittels *Power SYBR™ Green Master Mix* im *ABI 7900 Fast-Real Time* Gerät durchgeführt. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 15 pmol genutzt. Zuerst wurden 4 µl der verdünnten cDNA als Duplikate in die auf Eis gestellte *MicroAmp®Fast 96-well reaction* Platte pipettiert. Anschließend wurden 16 µl des *Power SYBR™ Green Master Mixes* mit den zugehörigen Primern (Tabelle 3) hinzugefügt, was ein Gesamtvolumen von 20 µl ergab. Die Messungen erfolgten in folgenden definierten Schritten. Nach dem ersten Schritt bei 50°C für 2 min folgte der zweite bei 95°C für 10 min. Anschließend wurden 40 Zyklen durchgeführt, welche aus 60°C für 1 min und 95°C für 15 s bestanden.

Nach der Auftrennung der beiden DNA-Stränge in Einzelstränge (Denaturierung) erfolgt die Bindung der spezifischen Oligonukleotide (*Annealing*). Im Rahmen der Elongation wird mithilfe der Polymerase ein neuer Molekülstrang aufgebaut. Die amplifizierte DNA-Menge wird bei der hier genutzten *Real Time* Methode nach jedem Zyklus bestimmt. Der Farbstoff SYBR Green fluoresziert, wenn er in DNA interkaliert und mit Licht angeregt wird, sodass sich die gemessene Zunahme der Fluoreszenz proportional zur Steigerung der zu amplifizierenden DNA verhält.

Die Primersequenzen, welche mittels *Primer Express 3.0.1* gebaut wurden, sind in Tabelle 4 aufgelistet. Als humanes *Housekeeping* Gen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), als Ratten *Housekeeping* Gen Ornithin-Decarboxylase (ODC) verwendet. Das Detektionslimit wurde hierbei für Ct-Werte von > 35 definiert (Bustin et al., 2009). Darüberhinausgehende detektierte Ct-Werte lassen keine verlässlichen Aussagen über die Expression des jeweiligen Gens zu. Die relative Genexpression wurde mittels der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode berechnet (Livak and Schmittgen, 2001).

Reagenz	Volumen in μ l
Forward Primer	1,2
Reverse Primer	1,2
LiChrosolv® Wasser	3,6
Power SYBR™ Green Master Mix	10

Tabelle 3: Zusammensetzung Power SYBR Green Master Mix. Verschiedene Reagenzien und das genutzte Volumen in Mikroliter (μ l) für eine Probe.

RT-qPCR Primer	Forward Sequenz	Reverse Sequenz
Hu-ANXA1	GAA GAG AGA TCT GGC CAA AGA CA	AGC AAA GCG TTC CGA AAA TC
Hu-ATF2	CCC TGT ACC AGG CCC ATT T	CAA CAG GCA TGG TTT GTC CAT
Hu-CAP1	GCA CCC ATC TCA GAG CAG ATC	TTG CTG CCT CGG TTC TTC TC
Hu-CD68	ACG CAG CAC AGT GGA CAT TC	GGG TGC TTG GAG ATC TCG AA
Hu-CD80	GGG AAC ATC ACC ATC CAA GTG	GCC AGC ACC AAG AGC TGA A
Hu-CFL1	CTG GGC CCC CGA GTC T	CTT GGA GCT GGC ATA AAT CAT TT
Hu-CSF1	TTC AGC AAG AAC TGC AAC AAC A	TCA GGC TTG GTC ACC ACA TC
Hu-CX3CL1	CGG CAA ACG CGC AAT C	CGG GTC GGC ACA GAA CAG
Hu-CXCL12a	GCC CGT CAG CCT GAG CTA	TGG CAA CAT GGC TTT CGA A
Hu-EGF	GAA TGC CAG CTG CAC AAA TAC A	ACA GGC GTC CAG CAC ACA
Hu-EGR3	CCG TGA CCT ACT TGG GAA AGT T	TGT CCT GGC ACC AGT TGG A
Hu-GAPDH 1.1	GTG GTC GTT GAG GGC AAT G	CCA GGT GGT CTC CTC TGA CTT C
Hu-IL12a	CCT TCA CCA CTC CCA AAA CCT	TGT CTG GCC TTC TGG AGC AT
Hu-IL18	GCT GAA CCA GTA GAA GAC AAT TGC	CCA GGT TTT CAT CAT CTT CAG CTA
Hu-IL1B	ACG ATG CAC CTG TAC GAT CAC T	CAC CAA GCT TTT TTG CTG TGA GT

Hu-IL23a	TCT CCT TCT CCG CTT CAA AAT C	GGC GGC TAC AGC CAC AAA
Hu-IL6	GCT GCA GGC ACA GAA CCA	GCT GCG CAG AAT GAG ATG AG
Hu-IL4	TGG GTC TCA CCT CCC AAC TG	GCC GGC ACA TGC TAG CA
Hu-iNOS	TGG ATG CAA CCC CAT TGT C	CGC TGC CCC AGT TTT TGA T C
Hu-Jun	CGG AGA GGA AGC GCA TGA	TTC CTT TTT CGG CAC TTG GA
Hu-LIMK2	TGG GCT TCC AGG GTC AAG	ATG AAG GCC TCT GTG GGT TTG
Hu-MCP-1	CAA GCA GAA TG GGT TCA GGA T	TCT TCG GAG TTT GGG TTT GC
Hu-MCP-3	TGT GCT GAC CCC ACA CAG A	TTT GGA GTT TGG GTT TTC TTG TC
Hu-MMP14	TCA GGG TCC CCC ACC AAG A	AAC AGA AGG CCG GGA GGT A
Hu-MMP2	CGT CTG TCC CAG GAT GA CAT C	ATG TCA GGA GAG GCC CCA TA
Hu-MMP9	CGC CAG TCC ACC CTT GTG	CAG CTG CCT GTC GGT GAG A
Hu-REST	GAG GAG GAG GGC TGT TTA CCA	GTC GTT AGG CAG GGC CAT T
Hu-SOCS3	CTC TGT CGG AAG ACC GTC AAC	CGG CAG CTG GGT GAC TTT
Hu-Stat3	TCC TGG TGT CTC CAC TGG TCT A	TTC CGA ATG CCT CCT CCT T
Hu-TGFB1	GGG AAA TTG AGG GCT TTC G	AGT GTG TTA TCC CTG CTG TCA CA
Hu-TLR4	GGC CAT TG C TGC CAA CAT	CAA CAA TCA CCT TTC GGC TTT T
Hu-TNFA	TGC TCC TCA CCC ACA CCA T	GGA GGT TGA CCT TGG TCT GGT A
Hu-VEGF	CGA GGG CCT GGA GTG TGT	CGC ATA ATC TGC ATG GTG ATG
Hu-WNT5a	AGT GGC TTT GGC CAT ATT TTT C	ACC ACC AAG AAT TGG CTT CAA
r-IL1B	GAA ACA GCA ATG GTC GGG AC	AAG ACA CGG GTT CCA TGG TG
r-IL6	GTT GTG CAA TGG CAA TTC TGA	TCT GAC AGT GCA TCA TCG CTG

r-iNOS	CTC AGC ACA GAG GGC TCA AAG	TGC ACC CAA ACA CCA AGG T
r-ODC1	GGT TCC AGA GGC CAA ACA TC	GTT GCC ACA TTG ACC GTG AC
r-TNFA	AGC CCT GGT ATG AGC CCA TGT A	CCG GAC TCC GTG ATG TCT AAG T

Tabelle 4: Primersequenzen: *Forward* und *Reverse* Sequenzen der genutzten Primer.

2.5 TNFA *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Zur quantitativen Analyse der TNFA Sekretion von humanen Glioblastomzellen der Zelllinie A-172 wurde das *Human TNF alpha Single Step* ELISA Kit (Ab181421) benutzt. Alle Schritte wurden nach Hersteller Angaben durchgeführt. Das Kit beruht auf der Sandwich-ELISA Methode mit dem Ziel des spezifischen Nachweises und der quantitativen Bestimmung von Proteinen. Dieser Test ist besonders sensitiv. Dabei ist ein für humanes TNFA spezifischer Primärantikörper an eine feste Phase gebunden, hier an eine 96-*well* Platte. Nach Zugabe der Proben bindet TNFA an den auf der Platte gebundenen Antikörper. Anschließend wird ein Detektionsantikörper hinzugegeben, der ebenfalls TNFA bindet und an ein Enzym (Meerrettichperoxidase, HRP) gekoppelt ist. Tetramethylbenzidine (TMB) wird nun als Substrat hinzugefügt, sodass das Enzym dieses umsetzen kann und eine blaue Lösung entsteht. Nach Zugabe der Stopp Lösung, welche Schwefelsäure enthält, kommt es zu einer Farbänderung von blau nach gelb. Die Farbintensität ist proportional zur Menge an TNFA und kann durch den Vergleich mit der Standardreihe quantifiziert werden.

Zur Probengewinnung erfolgte der Versuchsaufbau wie unter 2.2.4 beschrieben. Es wurden 10.000 A-172 Glioblastomzellen in einer 24-*well* Platte ausgesät und für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend erfolgte in der +MG und *MG-Bedingung die Zugabe von 100.000 Mikroglia und eine erneute Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit. Nun wurden die Zellen mit HERV-W ENV Protein stimuliert (1000 ng/ml). Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit wurde 500 µl Überstand pro Bedingung abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -30°C gelagert.

Zu Beginn wurde der Antikörpercocktail bestehend aus 300 µl 10X *Capture*-Antikörper, 300 µl 10X Detektions-Antikörper und 2,4 ml *Antibody Diluent* 4BR vorbereitet. Außerdem wurde eine Standardreihe mit bekannten TNFA-Konzentrationen von 0 pg/ml bis 1000 pg/ml angesetzt. Die Proben wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit *Sample Diluent NS* verdünnt. 50 µl der Proben bzw. des Standards wurden in Duplikaten in die 96-*well* Platte pipettiert. Anschließend wurden 50 µl des Antikörpercocktails pro *well* hinzugefügt. Es folgte

die Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 400 rpm. Im Anschluss wurde die Platte dreimal mit 350 µl 1X *Wash Buffer* PT gewaschen und zuletzt invertiert, um unspezifisch gebundenes TNFA zu entfernen. Anschließend wurde 100 µl der TMB *Development Solution* pro *well* zugesetzt und im Dunkeln auf einem Schüttler bei 400 rpm für 10 min inkubiert. Nun erfolgte die Hinzugabe von 100 µl der *Stop Solution*. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm im Infinite M200 Pro mittels Tecan i-control Software (Version 1.7.1.12). Zur weiteren Auswertung wurden die Daten in Microsoft Excel übertragen. Zur Quantifizierung von TNFA wurde zunächst eine Kalibrierungskurve mit den bekannten TNFA-Konzentrationen der Standardreihe (0 pg/ml bis 1000 pg/ml) und den dazugehörigen gemessenen Intensitätssignalen erstellt. Die TNFA-Konzentrationen der einzelnen Proben in µM konnten nach Verrechnung des Verdünnungsfaktors anhand der Kalibrierungskurve bestimmt werden.

2.6 Kristallviolett-Assay

Um die Migration der humanen Glioblastomzellen A-172 zu messen, wurde das *Crystal Violet Cell Cytotoxicity Assay Kit* von BioVision verwendet. Der Versuchsaufbau ist unter 2.2.5 (Migrationsversuche) beschrieben, anschließend folgte die Stimulation mit HERV-W ENV Protein (1000 ng/ml) für 24 h. Die Fixierung der *inserts* erfolgte mit 4% PFA für 10 min bei Raumtemperatur und drei anschließenden Waschschritten mit PBS. Die *inserts* wurden aus der 24-*well* Platte entnommen und von innen mit einem Wattestäbchen abgekratzt, sodass die nicht-migrierten Glioblastomzellen entfernt wurden. Anschließend wurde die Membran vorsichtig ausgeschnitten, halbiert und in eine 96-*well* Platte überführt. Die Zellen wurden einmal mit 200 µl 1X *Washing Solution* gewaschen. Im nächsten Schritt wurde 50 µl der Kristallviolett-Färbelösung, welche zuvor mit 11 ml Methanol angereichert worden war, hinzugefügt. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Färbelösung entfernt und es erfolgten vier Waschvorgänge mit je 200 µl 1X *Washing Solution*. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Waschlösung gründlich entfernt und die Membran für 3-4 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde 100 µl der *Solubilization* Lösung pro *well* hinzugefügt und die Platte in Alufolie auf einem Schüttler für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 570 nm im Infinite M200 Pro mittels Tecan i-control Software (Version 1.7.1.12). Zur Steigerung der Präzision fanden zwei Messungen an verschiedenen Positionen statt, um anschließend den Mittelwert zu bestimmen. Zur weiteren Auswertung wurden die Daten in Microsoft Excel übertragen. Die Messwerte wurden zur Leerprobe normalisiert und in Relation zur jeweiligen Kontrolle gesetzt.

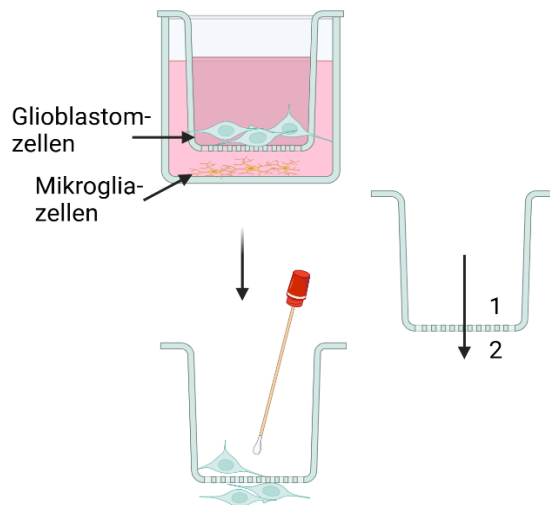


Abb. 3: Vorbereitung Kristallviolett-Assay. Schematische Darstellung der Vorbereitung zur Durchführung des Kristallviolett-Assays. Nicht migrierte Glioblastomzellen auf der Innenseite des *inserts* (1) wurden vor der Färbung mit einem Wattestäbchen abgekratzt. Auf der Unterseite des *inserts* (2) befinden sich die migrierten Glioblastomzellen. Abbildung erstellt mit <https://BioRender.com>.

2.7 Statistik

Die erhobenen Daten werden in den folgenden Abbildungen mit dem Mittelwert und dem Standardfehler des Mittelwertes (engl. *standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mittels GraphPad PRISM 8.0.1 durchgeführt. Die PCR-Ergebnisse der HERV-W ENV Protein stimulierten Zellen in Mono- sowie in Kokultur wie auch die ELISA-Daten wurden mittels zweifacher Varianzanalyse (engl. *Two-way analysis of variance*, kurz: *Two-way ANOVA*) statistisch analysiert. Für die PCR-Ergebnisse der Stimulation mit LPS und TNFA wurde eine einfache Varianzanalyse (engl. *One-way analysis of variance*, kurz: *One-way ANOVA*) durchgeführt. Die Analyse der zur Kontrolle relativierten Ki-67 Expression erfolgte mittels *One-sample t-Test*. Für die relative Migrationsrate wurde ebenfalls der *One-sample t-Test* angewandt. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5 % ($\alpha = 0,05$) gewählt, sodass sich folgende drei Gruppen für statistisch signifikante Unterschiede ergaben * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Nicht signifikante Unterschiede werden mit n.s. nicht signifikant gekennzeichnet. n gibt die Anzahl unabhängiger Experimente an.

3 ERGEBNISSE

3.1 Die Glioblastomzelllinie A-172 exprimiert neben β III-Tubulin den Hauptzielrezeptor für das HERV-W ENV Protein: TLR4

Da bekannt ist, dass Zelllinien bei jeder vorgenommenen Passagierung ihre genetische Information verändern können (Gstraunthaler and Lindl, 2021), erfolgte in einem ersten Schritt dieses Dissertationsprojektes die Überprüfung zentraler Eigenschaften der in Passage 24 kommerziell erworbenen humanen Glioblastomzelllinie A-172. Mittels immunzytochemischer Färbungen konnte die vorbekannte fehlende Expression von GFAP in der Zelllinie A-172 (Kiseleva et al., 2016) bestätigt sowie die Expression des neuronalen Markers β III-Tubulin nachgewiesen werden (Abb. 4 A). Zudem war es von zentraler Bedeutung zu überprüfen, ob die humane Glioblastomzelllinie A-172 empfänglich für das HERV-W ENV Protein sein kann. Verschiedene Studien, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, zeigten, dass das HERV-W ENV Protein mit seiner Oberflächeneinheit an TLR4 bindet, woraufhin es nachfolgend zur Induktion des NF κ B Signalweges in den jeweiligen Zielzellen kommt (Rolland et al., 2006; Kremer et al., 2013). Immunzytochemische Färbungen von unstimulierten A-172 Glioblastomzellen gegen TLR4 zeigten nach einer Inkubationszeit von 24 h eine deutliche, sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Expression (Abb. 4 B).

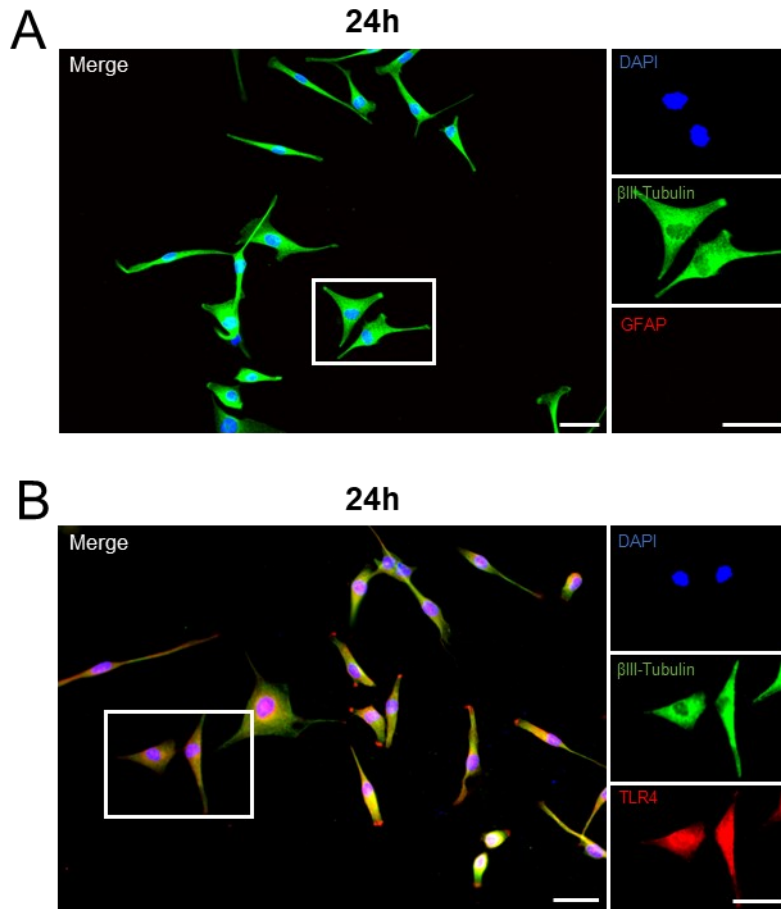


Abb. 4: Expressionsmuster von β III-Tubulin und des HERV-W ENV Protein Hauptzielrezeptors TLR4 in der humanen Glioblastomzelllinie A-172. Repräsentative Bilder von immunzytochemischen Ko-Färbungen von unstimulierten A-172 Glioblastomzellen gegen (A) β III-Tubulin (grün) und GFAP (rot) und (B) β III-Tubulin (grün) und TLR4 (rot) nach 24 h. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Es zeigte sich eine Expression von β III-Tubulin und des Hauptzielrezeptors TLR4 für das HERV-W ENV Protein, der sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch detektiert wurde. GFAP wurde hingegen von keiner Glioblastomzelle der Zelllinie A-172 exprimiert. 20x Vergrößerung; Maßstabsbalken: 50 μ m.

3.2 Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf das Verhalten der A-172 Glioblastomzellen in der Monokultur

3.2.1 HERV-W ENV Protein beeinflusst das Genexpressionsverhalten der A-172 Glioblastomzellen in der Monokultur nicht

Basierend auf der zuvor nachgewiesenen Expression von TLR4 in der Zelllinie A-172 und der damit gegebenen Grundvoraussetzung für eine mögliche Bindung des HERV-W ENV Proteins, galt es nun, einen direkten Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf das Verhalten der A-172 Glioblastomzellen in der Monokultur zu untersuchen. Dazu erfolgte zunächst die Analyse von Genexpressionsmustern mittels RT-qPCR. Um ein umfassendes Profil zu charakterisieren, wurden dabei verschiedene Gene aus den folgenden Bereichen untersucht: Inflammation, Tumordinvasivität, Modulation der TME mit hierbei besonderem Fokus auf den Glioblastom-Mikroglia-Crosstalk und Angiogenese. Die Zusammenfassung der Ct-Werte aller untersuchten Gene von HERV-W ENV Protein exponierten (1000 ng/ml) sowie kontrollstimulierten A-172 Glioblastomzellen nach 24 h gibt einen Überblick über das Genexpressionsverhalten (Abb. 5 A). Es zeigte sich, dass die Genexpression von *TNFA*, *iNOS*, *CD80*, *TGFB*, *CXCL12* und *MCP-3* mit Ct-Werten um 35 in einem nicht detektierbaren Bereich lag (Abb. 5 A) (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.3).

Während *TNFA* und *IL6* typische proinflammatorische Marker repräsentieren (Idriss and Naismith, 2000, Mihara et al., 2012), gehört *MMP9* in den Bereich der Tumordinvasivität (Raeeszadeh-Sarmazdeh et al., 2020). *MCP-1* und *CSF1* spielen eine bedeutende Rolle als chemotaktische Faktoren und beeinflussen die Modulation der TME (Leung et al., 1997, Pyonteck et al., 2013). *VEGF* ist als wichtiges Signalmolekül der Angiogenese bekannt (Carmeliet, 2005). In einem ersten Schritt wurden Genexpressionsanalysen von A-172 Glioblastomzellen durchgeführt, die zuvor mit 1000 ng/ml HERV-W ENV Protein und Kontrollpuffer für 24 h exponiert worden waren. Unter dieser verwendeten Konzentration von HERV-W ENV Protein, angelehnt an vorherige Studien der Arbeitsgruppe mit Mikrogliazellen (Kremer et al., 2019), zeigte sich keine Änderung der Genexpression in den eingangs genannten Genen (Abb. 5 B-G). Da sich Glioblastomzellen und Mikrogliazellen in ihrem Zelltyp grundlegend unterscheiden und für eine suffiziente Stimulation der Glioblastomzellen möglicherweise eine höhere Konzentration bzw. ein längerer Expositionszeitraum notwendig sein könnte, wurde die Stimulationskonzentration auf 5000 ng/ml erhöht sowie der Analysezeitpunkt auf 72 h verlängert. Auch unter den veränderten Bedingungen konnte zwischen kontrollstimulierten Glioblastomzellen und HERV-W ENV

Protein exponierten Glioblastomzellen keine Änderung der Genexpression induziert werden (Abb. 5 B-G).

Ferner wurden weitere Stimulationen der A-172 Glioblastomzelllinie mit HERV-W ENV Protein in Konzentrationen von 7500 ng/ml und 10.000 ng/ml über einen Zeitraum von bis zu 72 h durchgeführt. Auch hier konnten keine Änderungen im Genexpressionsmuster der in Abb. 5 B-G analysierten Gene detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

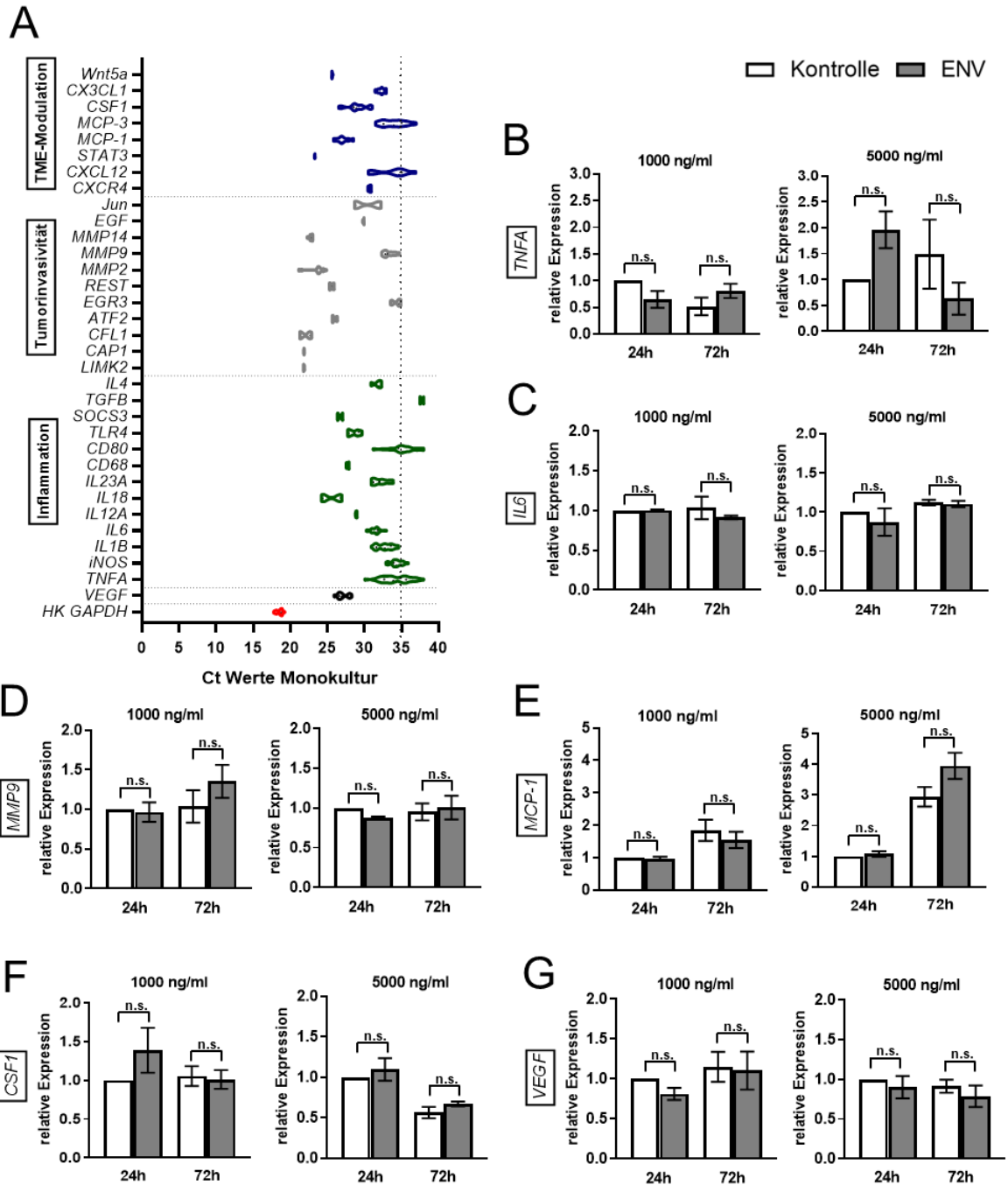


Abb. 5: Analyse der Genexpression von HERV-W ENV Protein stimulierten A-172 Glioblastomzellen. (A) Überblick aller durch RT-qPCR Analysen ermittelten Ct-Werte verschiedener Gene von HERV-W ENV Protein stimulierten (1000 ng/ml) sowie kontrollstimulierten A-172 Glioblastomzellen in der Monokultur zum Zeitpunkt 24 h. Die Gene sind in die Bereiche Inflammation (grün), Tumorinvasivität (grau) und Modulation der TME (blau) eingeteilt. *VEGF* ist zudem ein typisches Angiogenese-Signalmolekül (schwarz). Markiert ist ein Ct Wert von 35, ab dem die Genexpression als nicht detektierbar angesehen und nachfolgend als nicht aussagekräftig gewertet wurde. (HK=*Housekeeping*). (B-G) RT-qPCR Analysen von HERV-W ENV Protein stimulierten (1000 ng/ml und 5000 ng/ml) A-172 Glioblastomzellen zeigten nach 24 h und 72 h keine signifikanten Veränderungen in der Genexpression von Genen assoziiert mit (B-C) Proinflammation, (D) Tumorinvasivität, (E-F) der Modulation der TME und (G) der Angiogenese verglichen mit kontrollstimulierten A-172 Glioblastomzellen. Die abgebildeten Daten (B-G) stammen aus drei unabhängigen Experimenten pro Bedingung (n=3) und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. (B-G) *Two-way* ANOVA und Tukey post hoc Test: n.s. nicht signifikant.

3.2.2 HERV-W ENV Protein führt zu einer verminderten Proliferationsrate in A-172 Glioblastomzellen in der Monokultur

Die Proliferation stellt einen wichtigen funktionalen Marker zur Beurteilung der Dignität von Tumoren dar (Hanahan and Weinberg, 2011). Daher war es von großem Interesse zu untersuchen, ob das HERV-W ENV Protein einen Einfluss auf die Proliferationsrate von A-172 Glioblastomzellen ausübt. Hierzu wurden immunzytochemische Färbungen gegen den Proliferationsmarker Ki-67 durchgeführt, der mitotische Zellen identifiziert. Die Exposition zu HERV-W ENV Protein über 24 h führte in A-172 Glioblastomzellen zu einer signifikanten Reduktion der zur Kontrolle relativen Ki-67 Expression um 11 % (Abb. 6).

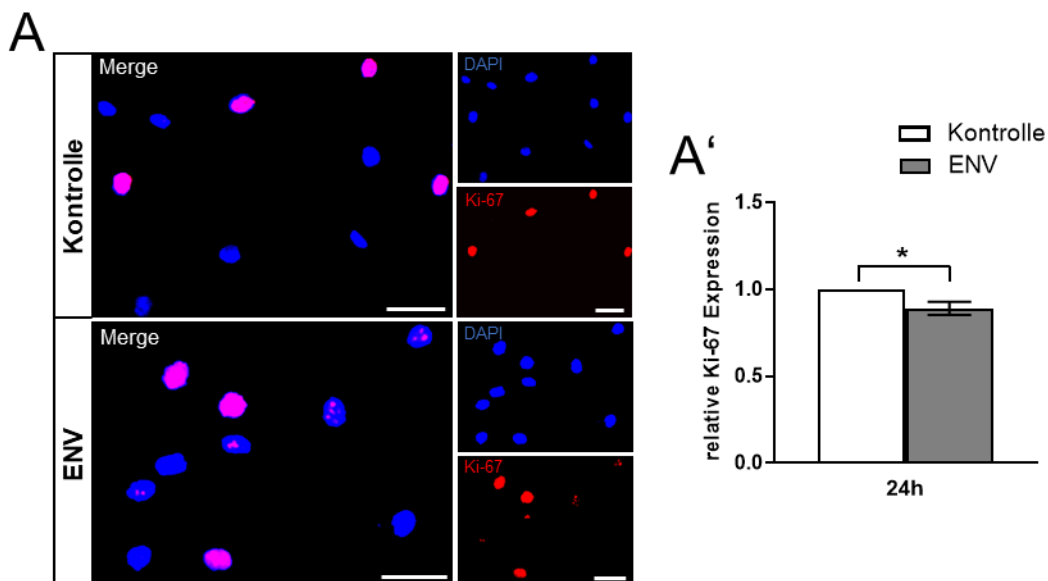


Abb. 6: HERV-W ENV Protein senkt die Proliferationsrate der A-172 Glioblastomzellen. (A, A') Immunzytochemische und quantitative Analysen von HERV-W ENV Protein stimulierten und kontrollstimulierten (1000 ng/ml) A-172 Glioblastomzellen gegen Ki-67 (rot) zeigten nach 24 h eine signifikant verminderte relative Ki-67 Expression um 11% durch HERV-W ENV Protein. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. (A') Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Ki-67 Expression \pm SEM aus n=8 unabhängigen Experimenten. *One-sample* t-Test: * p < 0,05; 20x Vergrößerung; Maßstabsbalken: 50 μ m. Abbildung modifiziert nach Reiche et al. 2024.

3.3 LPS induziert die Expression proinflammatorischer Gene und moduliert TME-Marker

Nachdem die Stimulation mit HERV-W ENV Protein in unterschiedlichen Konzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten keine Veränderungen in der Genexpression von Glioblastomzellen der Zelllinie A-172 gezeigt hatte, war es nun von Interesse zu überprüfen, ob die Zelllinie prinzipiell auf andere Stimulanzen reagiert, und vor allem, ob eine Aktivierbarkeit spezifisch über den TLR4 Signalweg erreicht werden kann. Eine Studie aus dem Jahr 2017 zeigte, dass eine LPS-Stimulation in Glioblastomzellen aus Ratten- und humanen Zelllinien nachfolgend zu einer Expression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine führte (Han et al., 2017). In Bezug auf diese Studie wurden nun Stimulationen mit LPS, einem bekannten Aktivator des TLR4 Signalweges durchgeführt. Parallel dazu wurden ebenfalls Stimulationen mit dem proinflammatorischen Zytokin TNFA (10 ng/ml, 24 h) ausgeführt. Als Kontrollbedingung erfolgte hier eine Stimulation mit DMSO (1 µg/ml, 24 h). Es konnte mittels RT-qPCR Analysen (Abb. 7 B-E) gezeigt werden, dass eine Stimulation der A-172 Glioblastomzellen mit LPS über 4 h (1 µg/ml) zu einer signifikanten Induktion von proinflammatorischen Markern wie *TNFA* (Abb. 4 B) und *IL6* (Abb. 7 C) führte. Auch die relative Genexpression von *CSF1* wurde durch die vierstündige LPS-Stimulation signifikant induziert (Abb. 7 E). Die relative Genexpression von *MCP-1* stieg ebenfalls durch die vierstündige LPS-Stimulation an, allerdings statistisch nicht signifikant (Abb. 7 D). Eine LPS-Prästimulation für 4 h mit einem anschließenden Wechsel auf Glioblastom-Medium für weitere 20 h zeigte hingegen keine Effekte in den genannten Genen (Abb. 7 B-E, prä-LPS). Weiterhin konnte eine deutliche Induktion der Genexpression von *MCP-1* und *CSF1*, Modulatoren der TME, nach 24-stündiger TNFA-Exposition detektiert werden (Abb. 4 D-E). Parallel zu den Genexpressionsanalysen wurden immunzytochemische Färbungen von dieser Versuchsreihe durchgeführt (Abb. 7 A). Eine β III-Tubulin-TLR4-Ko-Färbung zeigte eine deutliche β III-Tubulin sowie TLR4 Positivität der A-172 Glioblastomzellen in allen vier Bedingungen (Abb. 7 A).

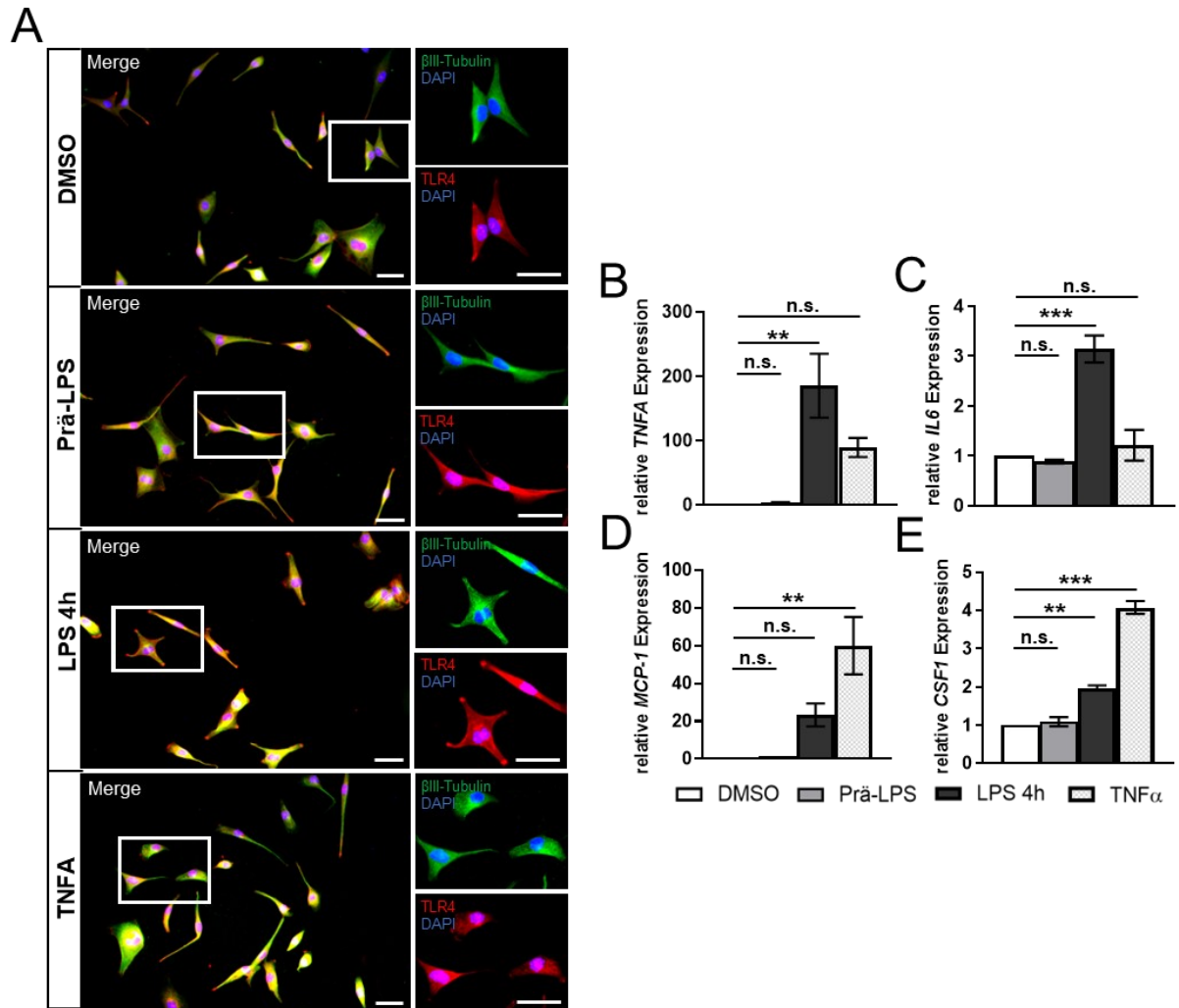


Abb. 7: LPS induziert in A-172 Glioblastomzellen die Genexpression proinflammatorischer Gene und moduliert Gene der TME. Dargestellt sind (A) repräsentative Bilder immunzytochemischer Färbungen und (B-E) RT-qPCR Analysen von DMSO (1 μ g/ml, 24 h), LPS (1 μ g/ml, 4 h) und TNFA (10 ng/ml, 24 h) stimulierten, sowie mit LPS prästimulierten A-172 Glioblastomzellen (4 h LPS 1 μ g/ml, dann Wechsel auf Glioblastom-Medium für weitere 20 h). Die Stimulation mit DMSO diente als Kontrolle. (A) Immunzytochemische Ko-Färbungen der A-172 Glioblastomzellen gegen β III-Tubulin (grün) und TLR4 (rot) zeigten in allen vier Bedingungen eine deutliche Expression von TLR4 und β III-Tubulin. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. 20x Vergrößerung; Maßstabsbalken 50 μ m. (B-E) Es zeigte sich eine signifikante Induktion der Genexpression der inflammatorischen Gene *TNFA* und *IL6* (B, C) sowie von *CSF1* (E) nach vierstündiger LPS-Stimulation. Die TNFA-Stimulation führte zu einer signifikanten Hochregulation der Genexpression von Genen, assoziiert mit der Modulation der TME (D, E). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=3 unabhängigen Experimenten. *One-way* ANOVA und Dunnett post hoc Test: *** p < 0,001; ** p < 0,01; n.s. nicht signifikant.

3.4 Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf das Verhalten von A-172 Glioblastomzellen in der mikroglialen Kokultur

Es ist bekannt, dass die Glioblastom-Homöostase stark von der TME abhängt (Tao et al., 2023). Mikrogliazellen sind hirnständige Makrophagen, die den TLR4 Rezeptor sowohl an ihrer Zelloberfläche als auch im Zytoplasma exprimieren und ein wesentlicher Bestandteil der TME sind (Hambardzumyan et al., 2016). Basierend darauf war es von Interesse, ob und inwieweit die A-172 Glioblastomzellen auf eine Exposition mit dem HERV-W ENV Protein reagieren, wenn a) ein direkter oder b) ein indirekter Kontakt zu Mikrogliazellen besteht.

Während in der +MG-Bedingung ein direkter Kontakt zwischen humanen Glioblastomzellen und primären Mikrogliazellen der Ratte bestand, waren die verschiedenen Zelltypen hingegen in der *MG-Bedingung durch *inserts* mit einer Porengröße von 3,0 µm getrennt. So konnte der Einfluss von sezernierten Faktoren ohne einen direkten Zell-Zell-Kontakt untersucht werden. Hierzu wurden immunzytochemische Ko-Färbungen von kontrollstimulierten Glioblastom- und Mikrogliazellen für 24 h gegen den Aktinfilament-Marker Phalloidin und IBA1, das spezifisch von Mikrogliazellen exprimiert wird, durchgeführt (Abb. 8 A). In der +MG-Bedingung ließen sich die Mikrogliazellen durch deren deutliche Positivität für IBA1 von den Glioblastomzellen differenzieren. Ein zusätzliches visuelles Unterscheidungsmerkmal ist die Größe der Zellkerne, die sich bei Mikrogliazellen deutlich kleiner darstellen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass in der *MG-Bedingung keine IBA1 positiven Mikrogliazellen durch das *insert* migrieren, sodass in dieser Bedingung ein direkter Zell-Zellkontakt zwischen Glioblastom- und Mikrogliazellen ausgeschlossen werden konnte (Abb. 8 A, *MG).

Da in der Kokultur, vor allem in der +MG-Bedingung, ein direkter Kontakt zwischen zwei Zelltypen unterschiedlicher Spezies bestand, wurde zunächst die Spezifität der verwendeten Primer für die RT-qPCR Analysen überprüft. In Abbildung 5 B und B' sind anhand von Ct-Werten die Genexpressionsprofile sowohl von Ratten und humanen *Housekeeping* Genen (für Ratte: *ODC*, für human: *GAPDH*) als auch von inflammatorischen Genen (*IL6*, *IL1B*, *iNOS*, *TNFA*) in HERV-W ENV Protein (1000 ng/ml) und kontrollstimulierter Mono- und Kokultur zum Zeitpunkt 24 h gemeinsam dargestellt. In der Glioblastom-Monokultur (-MG) befand sich die Genexpression der Ratten-Gene in einem nicht detektierbaren Bereich. Bei Betrachtung der Ratten-Genexpression in der +MG-Bedingung fiel bei den proinflammatorischen Genen eine Verschiebung der Ct-Werte in Bereiche höherer Genexpression auf (Abb. 8 B, +MG). In der *MG-Bedingung verschoben sich die Ct-Werte in Richtung des gesetzten Detektionslimits (Abb. 8 B, *MG).

Das humane *Housekeeping* Gen *GAPDH* zeigte sowohl in der Mono- als auch in der Kokultur eine stabile Genexpression (Abb. 8 B'). Interessanterweise zeigten sich in der +MG-Bedingung Unterschiede der Ct-Wertverteilung zwischen den beiden Spezies, wobei die Ct-Werte der Rattengene in einem Bereich mit höherer Genexpression lagen (Abb. 8 B, B', +MG).

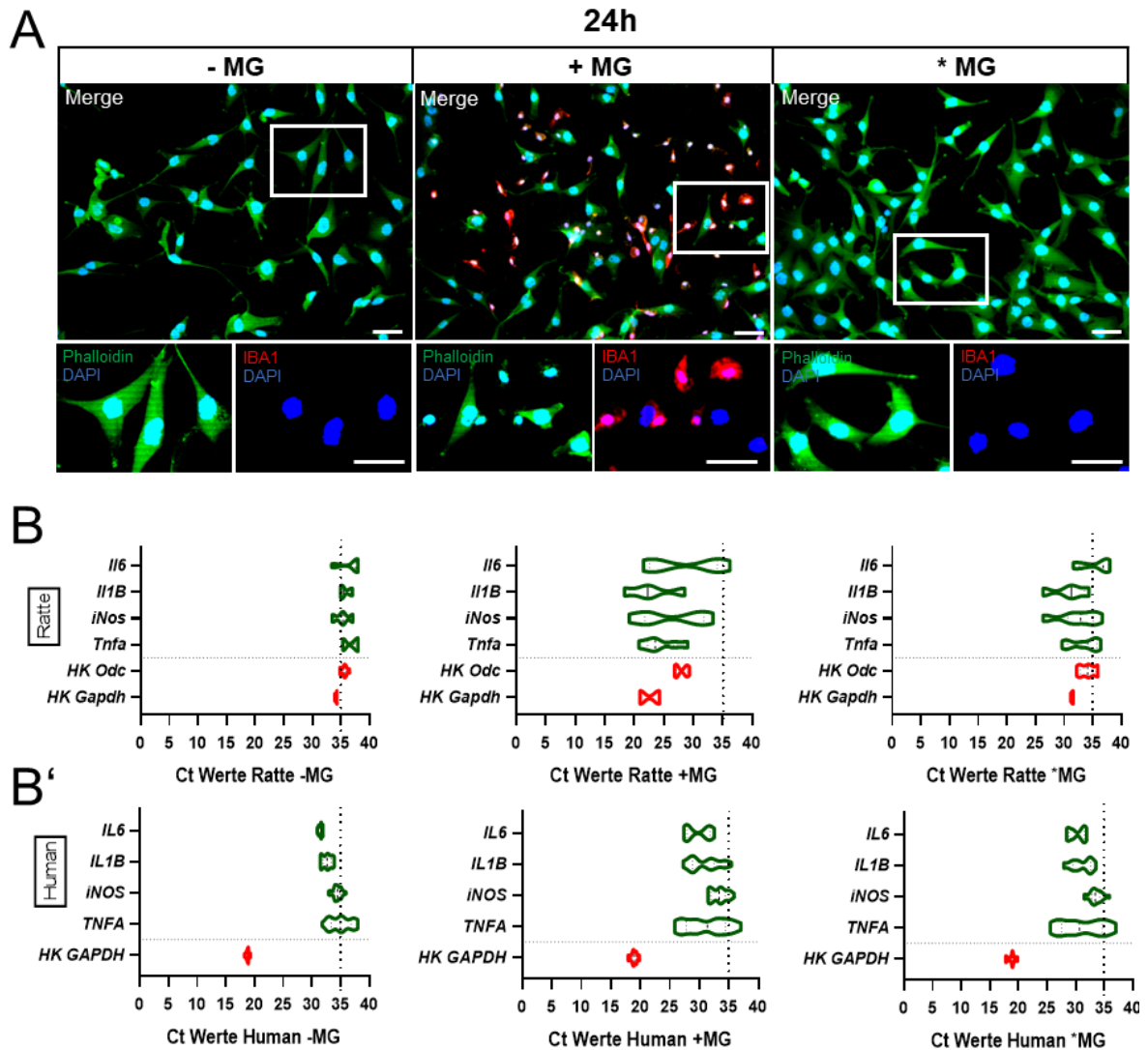


Abb. 8: Darstellung der Kokultur der humanen A-172 Glioblastomzellen und der Ratten-Mikrogliazellen sowie Spezifität der genutzten Primer. (A) Repräsentative Bilder immunzytochemischer Ko-Färbungen gegen Phalloidin (grün) und den mikroglialen Marker IBA1 (rot) von kontrollstimulierten A-172 Glioblastomzellen (1000 ng/ml, 24 h) in Monokultur (-MG) sowie in direktem Zellkontakt mit Mikrogliazellen (+MG) und mit durch *inserts* getrennten Mikrogliazellen (*MG) zeigten die erfolgreiche Trennung der Glioblastom- und Mikrogliazellen in der *MG-Bedingung. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. 20x Vergrößerung; Maßstabsbalken: 50 µm. (B, B') Überblick der Genexpression anhand der Ct-Werte von Ratten (B) und humanen- (B') *Housekeeping* Genen sowie inflammatorischen Genen (TNFA, iNOS, IL1B und IL6) in der mit HERV-W ENV Protein und kontrollstimulierten (1000 ng/ml) Glioblastom-Monokultur (-MG) sowie in der Kokultur (+MG, *MG) nach 24 h. In der -MG Bedingung befanden sich die Ct-Werte der gemessenen Rattengene > 35. Es zeigte sich in der +MG-Bedingung eine deutliche Induktion der proinflammatorischen Rattengene, die sich von den Ct-Werten der humanen Gene unterschied. In der *MG-Bedingung verschoben sich die Ct-Werte der Rattengene in einen nahezu undetektierbaren Bereich. Markiert ist ein Ct-Wert von 35, ab dem die Genexpression als nicht mehr detektierbar angesehen wurde. (MG=Mikroglia, HK=*Housekeeping*).

3.4.1 HERV-W ENV Protein führt zu Änderungen der Genexpression der A-172 Glioblastomzellen in der mikroglialen Kokultur

Ähnlich dem Vorgehen in der Monokultur, wurden auch in der mikroglialen Kokultur in einem ersten Schritt Genexpressionsanalysen von HERV-W ENV Protein exponierten Glioblastomzellen (1000 ng/ml, 24 h) durchgeführt. Analog zu Abb. 5 A stellen Abb. 9 A und A' anhand von Ct-Werten einen Überblick der Expressionsprofile aller untersuchten Gene in der mikroglialen Kokultur, getrennt nach Kontrollgruppe (Abb. 9 A) und HERV-W ENV Protein Exposition (1000 ng/ml), zum Zeitpunkt 24 h (Abb. 9 A') dar. Dabei ist zu beachten, dass die Genexpressionsmessungen der +MG- und *MG-Bedingung zusammengefasst wurden. Wie zuvor sind die Gene in die Bereiche Inflammation, Tumorinvasivität, TME-Modulation und Angiogenese aufgeteilt. Im Bereich Inflammation konnte gezeigt werden, dass sich die Genexpression von *TNFA* und *IL1B* durch die HERV-W ENV Protein Exposition (1000 ng/ml) aus einem nicht detektierbaren (Ct-Werte > 35) in einen detektierbaren Bereich mit Ct-Werten < 30 verschob. Auch bei den inflammatorischen Markern *IL6* und *iNOS* kam es durch die Stimulation mit HERV-W ENV Protein zu einer Verschiebung der Ct-Werte in Bereiche mit höherer Genexpression. Ebenfalls im Bereich der Tumorinvasivität fiel vor allem *MMP9* mit einer Verschiebung der Ct-Werte in Bereiche mit einer höheren Genexpression auf. Die Ct-Werte der übrigen Gene aus dem Bereich der Tumorinvasivität befanden sich zwar alle in einem detektierbaren Bereich, es konnten allerdings keine Veränderungen der Expressionsprofile durch die Stimulation mit HERV-W ENV Protein gemessen werden. Interessanterweise wiesen *MCP-1* und *MCP-3*, welche eine bedeutende Rolle in der Modulation der TME spielen, eine deutliche Änderung der Genexpression durch die Exposition mit HERV-W ENV Protein auf. Als Signalmolekül der Angiogenese zeigte *VEGF* eine stabile Genexpression mit Ct-Werten um 27 ohne Änderung durch HERV-W ENV Protein Exposition.

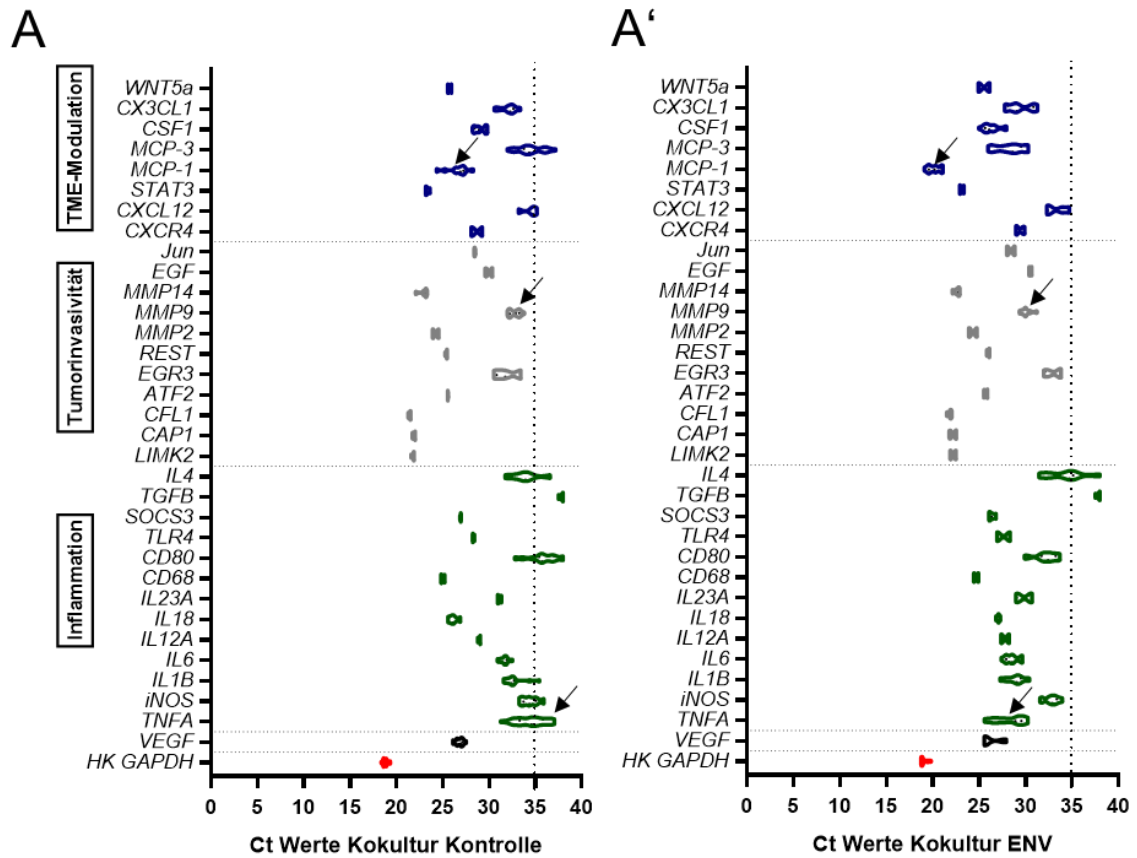


Abb. 9: Änderung der Genexpression von A-172 Glioblastomzellen in mikroglialer Kokultur unter HERV-W ENV Protein Exposition. (A, A') Überblick der durch RT-qPCR Analysen ermittelten Ct Werte verschiedener Gene mit (A) Kontroll-Puffer sowie (A') HERV-W ENV Protein (1000 ng/ml) stimulierten A-172 Glioblastomzellen in mikroglialer Kokultur (+MG und *MG) zum Zeitpunkt 24 h. Die Gene sind in die Bereiche Inflammation (grün), Tumorinvasivität (grau), Modulation der TME (blau) und Angiogenese (schwarz) eingeteilt. Exemplarisch für eine deutliche Verschiebung der Ct-Werte in niedrigere Bereiche durch die HERV-W ENV Protein Stimulation sind die Gene *MCP-1*, *MMP9* und *TNFA* mit Pfeilen gekennzeichnet. Markiert ist ein Ct-Wert von 35, ab dem die Genexpression als nicht detektierbar angesehen wird. (HK = *Housekeeping*).

Es wurde bereits anhand von Ct-Werten gezeigt, dass die Stimulation mit HERV-W ENV Protein von A-172 Glioblastomzellen in mikroglialer Kokultur in einigen Genen zu einer höheren Genexpression führte (Abb. 9). Nun war es von erheblichem Interesse zu untersuchen, wie genau sich die relative Genexpression ausgewählter Gene aus den Bereichen Inflammation (Abb. 10 A-D), Tumorinvasivität (Abb. 10 E), Modulation der TME (Abb. 10 F-G) und Angiogenese (Abb. 10 H) verändert. Es erfolgte die Stimulation mit HERV-W ENV Protein (1000 ng/ml) und Kontrollpuffer für 24 h. Generell konnte in den Bedingungen mit mikroglialem Kontakt (+MG, *MG) eine vermehrte Genexpression der untersuchten Marker in mit HERV-W ENV Protein stimulierten Kokulturen im Vergleich zur Monokultur ohne Mikroglia gemessen werden. In direktem Mikroglia-Kontakt (+MG) zeigte sich unter HERV-W ENV Protein Exposition eine signifikante Hochregulation der relativen Genexpression der Glioblastomzellen von Markern assoziiert mit Proinflammation (Abb. 10 A-D), Tumorinvasivität (Abb. 10 E) und Modulation der TME (Abb. 10 F-G) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. In der Kokultur mit direktem Mikroglia Kontakt (+MG) stieg die relative *IL1B* Genexpression signifikant von 2,25 in der Kontrollbedingung auf 45,78 unter HERV-W ENV Protein Stimulation. Bei Betrachtung der *TNFA*-Genexpression (Abb. 10 A) fiel ebenfalls eine signifikante Hochregulation der Expression von 1,12 in der Kontrollgruppe zu 104,47 unter HERV-W ENV Stimulation auf. Auch bei indirektem Mikroglia-Kontakt (*MG) führte die Exposition der Glioblastomzellen zu HERV-W ENV Protein zu einer signifikanten Induktion der Genexpression von *TNFA*, *iNOS*, *IL1B*, *MMP9*, *MCP-1* und *CSF1* im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Abb. 10 A, B, D-G). Die relative *CSF1*-Genexpression stieg unter HERV-W ENV Protein Stimulation signifikant von 1,07 auf 8,41 an. Interessanterweise zeigten die analysierten Marker höhere Genexpressionsprofile in direktem Zell-Zell-Kontakt (+MG) als in indirektem Zellkontakt über das zirkulierende Medium (*MG). Hierbei war ein signifikanter Unterschied zwischen der +MG-Env und *MG-Env-Bedingung bei *iNOS*, *IL6* und *IL1B* nachweisbar (Abb. 10 B, C, D). Die *VEGF*-Expression blieb auch in mikroglialer Kokultur von der HERV-W ENV Protein Stimulation unbeeinflusst (Abb. 10 H).

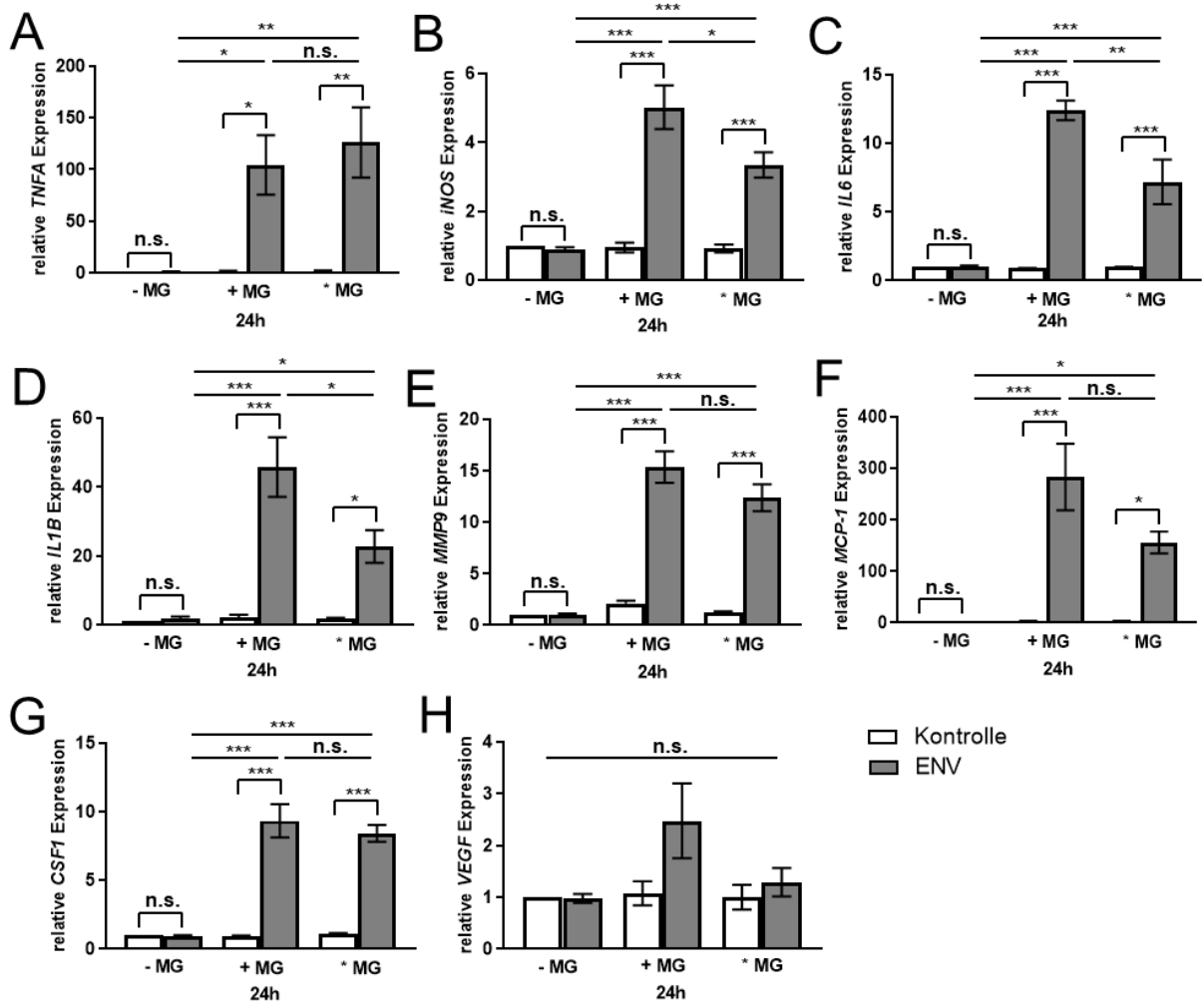


Abb. 10: Genexpressionsprofile von A-172 Glioblastomzellen in mikroglialer Kokultur unter HERV-W ENV Protein Exposition. (A-H) RT-qPCR Analysen von HERV-W ENV Protein stimulierten (1000 ng/ml) A-172 Glioblastomzellen in Monokultur (-MG) sowie in direktem Mikroglia-Kontakt (+MG) und mit Mikrogliazellen in *inserts* (*MG) zum Zeitpunkt 24 h. Die Ergebnisse zeigten in Kokultur unter HERV-W ENV Protein Exposition eine Induktion der Genexpression von Markern assoziiert mit Proinflammation (A-D), Tumorinvasivität (E) und der Modulation der TME (F-G). (H) Die Genexpression von *VEGF* als Marker der Angiogenese blieb hingegen unbeeinflusst. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt und stammen von n=5 unabhängigen Experimenten (A, B, D-G), n= 4 unabhängigen Experimenten (C) und n=3 unabhängigen Experimenten (H). Two-way ANOVA und Tukey post hoc Test: *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05; n.s. nicht signifikant

3.4.2 HERV-W ENV Protein führt in der mikroglialen Kokultur zu keiner Induktion von iNOS oder einer vermehrten Sekretion von TNFA

Auf Genexpressionsebene konnte unter HERV-W ENV Protein Exposition eine Induktion der proinflammatorischen Gene *iNOS* und *TNFA* in A-172 Glioblastomzellen in der mikroglialen Kokultur detektiert werden (Abb. 10 A, B). Um zu untersuchen, inwieweit diese Ergebnisse auch auf Proteinebene reproduzierbar sind, erfolgten immunzytochemische Ko-Färbungen gegen iNOS und β III-Tubulin von HERV-W ENV Protein stimulierten (1000 ng/ml) A-172 Glioblastomzellen in der Monokultur sowie in direktem und indirektem Zellkontakt mit primären Rattenmikrogliazellen zum Zeitpunkt 24 h (Abb. 11 A). Wie schon aus früheren Studien zur Exposition von Mikroglia gegenüber dem HERV-W ENV Protein bekannt ist (Kremer et al., 2019), konnte eine deutliche Induktion der iNOS-Expression von Mikrogliazellen in Kontakt zu dem HERV-W ENV Protein detektiert werden. Die A-172 Glioblastomzellen zeigten in allen Bedingungen eine geringe iNOS-Grundexpression ohne Änderung durch HERV-W ENV Exposition (Abb. 11 A).

Weiterhin wurde mittels ELISA basierter Messungen die TNFA-Sekretion unter Exposition mit HERV-W ENV Protein (1000 ng/ml) sowohl in der Glioblastom-Mono- als auch in der Kokultur zum Zeitpunkt 24 h quantifiziert (Abb. 11 B). Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede in der TNFA-Sekretion der A-172 Glioblastomzellen unter den verschiedenen Bedingungen.

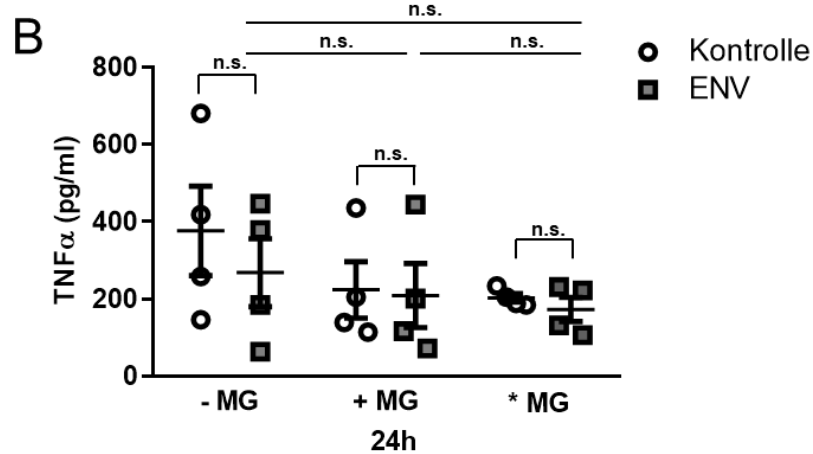
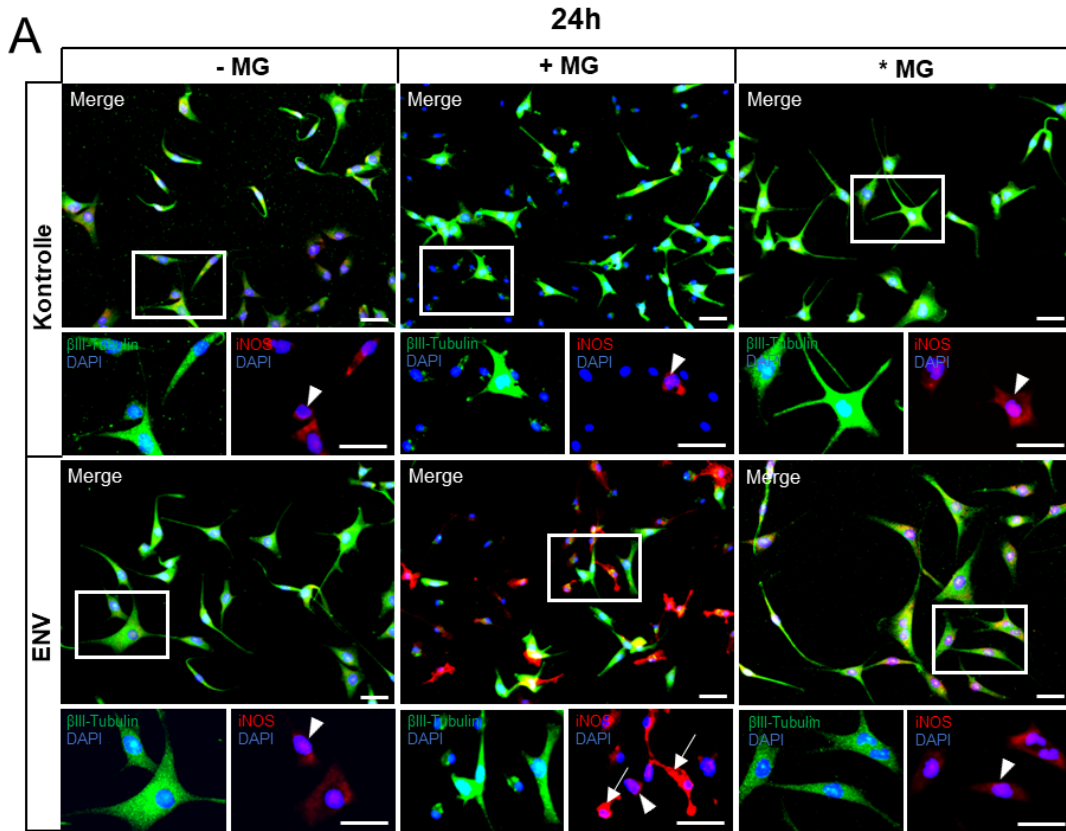


Abb. 11: HERV-W ENV Protein führt auf Proteinebene zu keiner Induktion der proinflammatorischen Marker iNOS und TNFA in A-172 Glioblastomzellen in Mono- und mikroglialer Kokultur. (A) Bilder immunzytochemischer Ko-Färbungen von HERV-W ENV Protein stimulierten (1000 ng/ml, 24 h) A-172 Glioblastomzellen in Monokultur (- MG) sowie in direktem Mikroglia-Kontakt (+ MG) und in indirektem Kontakt zu Mikrogliazellen (* MG) gegen iNOS (rot) und β III-Tubulin (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Während in den Glioblastomzellen in allen Bedingungen eine schwache Grundexpression von iNOS nachweisbar war (Pfeilköpfe), kam es in Mikrogliazellen durch HERV-W ENV Protein zu einer starken Induktion von iNOS (Pfeile). 20x Vergrößerung; Maßstabsbalken: 50 μ m (B) ELISA-basierte Analysen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der TNFA-Sekretion von HERV-W ENV Protein stimulierten (1000 ng/ml, 24 h) und kontrollstimulierten A-172 Glioblastomzellen, sowohl in der Monokultur als auch in der mikroglialen Kokultur. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus n=4 unabhängigen Messungen. Two-way ANOVA mit Tukey post hoc Test: n.s. nicht signifikant.

3.4.3 HERV-W ENV Protein führt zu einer Induktion der Proliferationsrate der A-172 Glioblastomzellen in indirektem Mikrogliakontakt

In der Glioblastom-Monokultur konnte durch HERV-W ENV Protein Exposition eine verminderte Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet werden (Abb. 6). Daher war es von großem Interesse zu untersuchen, welchen Einfluss HERV-W ENV Protein auf die Proliferation in mikroglialer Kokultur hat. Hierzu wurden die Glioblastomzellen sowohl in direktem (+MG) als auch in indirektem Mikrogliakontakt (*MG) mit HERV-W ENV Protein (1000 ng/ml) für 24 h stimuliert. Es erfolgten immunzytochemische Färbungen gegen Ki-67, sowie gegen β III-Tubulin zur sicheren Identifikation der Glioblastomzellen (Abb. 12 A'). Quantitative Analysen ergaben eine signifikante Steigerung der relativen Anzahl der Ki-67 positiven Zellen durch die Exposition zu HERV-W ENV Protein in A-172 Glioblastomzellen, die einen indirekten Kontakt zu Mikrogliazellen hatten. Währenddessen konnte in direktem Mikrogliakontakt keine Änderung der Proliferationsrate gezeigt werden (Abb. 12 A).

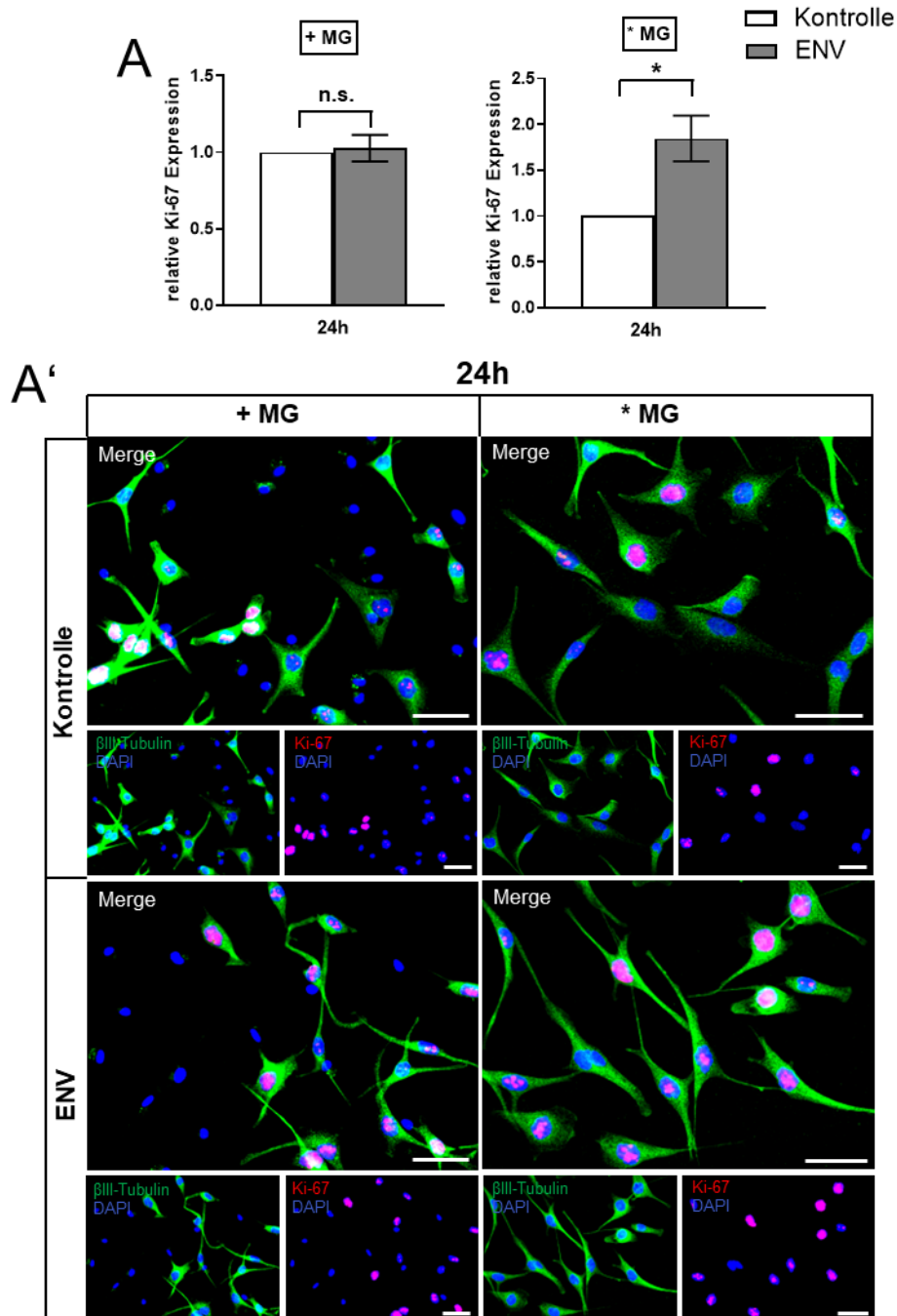


Abb. 12: Änderung der Proliferationsrate von A-172 Glioblastomzellen in mikroglialer Kokultur unter HERV-W ENV Protein Stimulation. (A) Quantitative Analysen der A-172 Glioblastomzellen in indirektem mikroglialen Kontakt (*MG) zeigten einen signifikanten Anstieg der relativen Anzahl der Ki-67 positiven Zellen unter HERV-W ENV Protein Stimulation (1000 ng/ml, 24 h). In direktem Mikroglialkontakt (+MG) konnte keine signifikante Änderung der Ki-67 Expression unter HERV-W ENV Protein Stimulation (1000 ng/ml, 24 h) verzeichnet werden. (A') Repräsentative Bilder immunzytochemischer Färbungen gegen Ki-67 (rot) und β III-Tubulin (grün) von HERV-W ENV Protein stimulierten (1000 ng/ml, 24 h) A-172 Glioblastomzellen in direktem Mikroglia-Kontakt (+MG) und mit Mikrogliazellen in *inserts* (*MG). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus n=5 unabhängigen Experimenten. 20x Vergrößerung; Maßstabsbalken: 50 μ m; *One-sample* t-Test: * p < 0,05, n.s. nicht signifikant. Abbildung modifiziert nach Reiche et al. 2024.

3.4.4 HERV-W ENV Protein führt zu keiner Änderung des Migrationsverhaltens der A-172 Glioblastomzellen in indirektem Mikroglialkontakt

Eine wichtige Eigenschaft von Tumorzellen ist die Migration und die damit verbundene Invasivität (Hanahan and Weinberg, 2000). Um den Einfluss von HERV-W ENV Protein auf die Migration von A-172 Glioblastomzellen zu untersuchen, wurden Versuche mit *Transwell*-Kammern durchgeführt. Da die bisher durchgeführten Studien eine Reaktion der Tumorzellen auf das HERV-W ENV Protein nur in Kontakt mit Mikroglia zeigten, wurden die Migrationsversuche mit indirektem mikroglialen Kontakt durchgeführt. Um die Migration der Glioblastomzellen durch die *inserts* zu visualisieren, wurde eine Phalloidin Färbung der A-172 Glioblastomzellen auf *inserts* angefertigt (Abb. 13 A). Es zeigte sich, dass trotz des Abkratzens mit einem Wattestäbchen eine gewisse Anzahl an Glioblastomzellen am Rand des *inserts* zurückblieb (Abb. 13 A'-1). Die Grenze wurde im Bild markiert.

Um die Migrationsrate der A-172 Glioblastomzellen zu quantifizieren, wurden Kristallviolett-Assays durchgeführt. Die durchschnittliche relative Migrationsrate der Glioblastomzellen unter HERV-W ENV Protein Stimulation (1000 ng/ml, 24 h) zeigte keine signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 13 B).

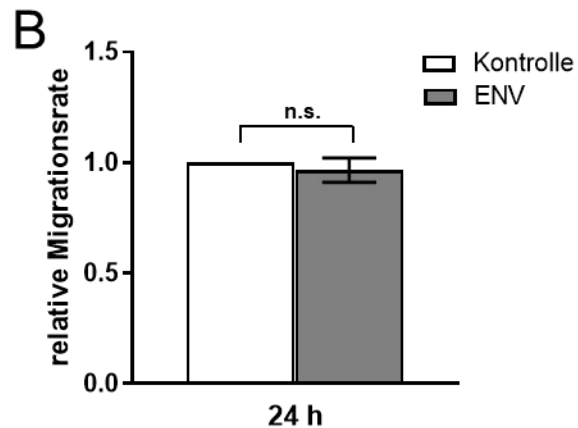
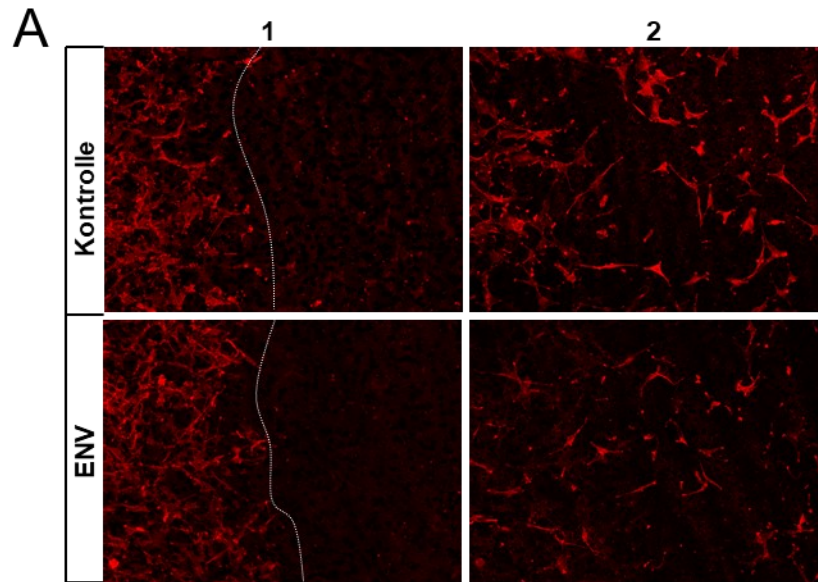


Abb. 13: Unverändertes Migrationsverhalten von A-172 Glioblastomzellen in indirektem Kontakt zu Mikroglia unter HERV-W ENV Protein Exposition. (A) Ausgewählte Bilder immunzytochemischer Färbungen von HERV-W ENV Protein stimulierten (1000 ng/ml, 24 h) A-172 Glioblastomzellen gegen Phalloidin (rot) zeigten unter 1 die nicht-migrierten Zellen, nachdem das Innere des *inserts* mit einem Wattestäbchen abgekratzt worden ist, und unter 2 die migrierten Glioblastomzellen auf der Unterseite des *inserts*. 10x Vergrößerung. Maßstabsbalken: 50 μ m. (B) Quantitative Analyse von Kristallviolett-Assays ergaben keine signifikante Änderung der Migrationsrate. Dargestellt ist die durchschnittliche Migrationsrate relativiert zur Kontrolle unter Angabe des SEM aus n=6 unabhängigen Experimenten. *One-sample* t-Test: n.s. nicht signifikant

4 DISKUSSION

Das Glioblastom ist der häufigste primäre maligne ZNS-Tumor des Erwachsenen und hat als ZNS-WHO Grad 4 Tumor trotz multimodaler Therapie eine sehr schlechte Prognose mit einem medianen Überleben von unter zwei Jahren (Schaff and Mellinghoff, 2023). Es ist bekannt, dass die Glioblastom-Homöostase stark von der TME abhängt und sich beide gegenseitig beeinflussen (Hambardzumyan et al., 2016). In den letzten Jahren gab es immer mehr Hinweise, dass HERVs an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen beteiligt sind, darunter MS (Perron et al., 1989), ALS (Douville et al., 2011), Diabetes mellitus Typ 1 (Levet et al., 2019), aber auch viele Tumorerkrankungen (Bannert et al., 2018). Zu den aktivsten HERV-Familien gehört neben HERV-K, welche bei der Karzinogenese verschiedener Tumoren eine Rolle spielt (Salavatiha et al., 2020), auch die Familie HERV-W, die bisher vor allem mit der Pathogenese der MS in Zusammenhang zu stehen scheint (Perron et al., 2005, Kremer et al., 2019). In Vorarbeiten zu diesem Dissertationsprojekt konnte erstmals eine vermehrte HERV-W ENV Protein Expression in Gliomen im Vergleich zu nicht-neoplastischen Hirngewebsproben nachgewiesen werden (Reiche et al., 2024). Interessanterweise wurde im Glioblastom HERV-W ENV Protein im Speziellen in Makrophagen und Mikroglia innerhalb der TME detektiert (Reiche et al., 2024). Daher war es Rahmen dieses Dissertationsprojektes von großem Interesse zu untersuchen, ob und inwieweit das HERV-W ENV Protein in der Lage ist, das Verhalten von Glioblastomzellen sowohl allein als auch in einer Kokultur mit Mikrogliazellen, in direktem und indirektem Kontakt, zu beeinflussen. Hierbei wurde initial spezifisch die Zelllinie A-172 experimentell charakterisiert. Bemerkenswerterweise scheint die Glioblastom-Homöostase vor allem über Mikrogliazellen vermittelt auf die Exposition des HERV-W ENV Proteins Regulationen aufzuweisen. Die Erkenntnisse, welche im Rahmen der hier abgehandelten Dissertationsarbeit dargestellt werden, bildeten den Grundstein für ein nachfolgendes Dissertationsprojekt, das weitere geeignete Glioblastom-Zelllinien auf diese Dynamik untersuchte (Plaack, 2025), und führten letztendlich zur erfolgreichen Publikation der gewonnenen Daten (Reiche et al., 2024).

4.1 Kein Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf die Genexpression der A-172 Glioblastomzellen in Monokultur

Dass HERVs in der Pathogenese von Tumorerkrankungen eine Rolle spielen, ist inzwischen vielerlei belegt; wie genau diese Rolle aussieht, ist hingegen noch weitgehend unbekannt. Es gibt auf der einen Seite Hinweise für tumorunterstützende Funktionen, beispielsweise führt die Expression von HERV-K (HML-2) ENV Protein zu einer Aktivierung des RAS/ERK-Signalweges und fördert somit nachweislich die Tumorgenese in Brustkrebszellen (Zhou et al., 2016); auf der anderen Seite sind HERVs allgemein in der Lage das Immunsystem zu aktivieren und so antitumorale Effekte, wie zum Beispiel eine zytotoxische T-Zellantwort, auszulösen (Rycaj et al., 2015, Alcazer et al., 2020, Gao et al., 2021, Müller et al., 2022).

Daher wurde im ersten Teil dieses Dissertationsprojekts der generelle und direkte Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf die Glioblastom-Homöostase der kommerziell erworbenen humanen Zelllinie A-172 in Monokultur untersucht. Die Zelllinie A-172 wurde als für dieses Projekt geeignet bewertet, da sie TLR4 exprimiert (Abb. 4 B), welcher nachweislich mit dem Ko-Rezeptor CD14 an der Vermittlung der inflammatorischen Antwort von HERV-W ENV Protein beteiligt ist (Rolland et al., 2006). Weiterhin konnten im Vorfeld durchgeführte Analysen der Forschungsgruppe eine endogene HERV-W ENV Protein Expression in der A-172 Glioblastomzelllinie ausschließen (Reiche et al., 2024). Mögliche aussagekräftige Gene aus den Bereichen Inflammation, Tumorinvasivität, Modulation der TME und Angiogenese wurden unter verschiedenen Stimulationskonzentrationen von HERV-W ENV Protein (1000 ng/ml und 5000 ng/ml) sowie zu zwei Zeitpunkten (24 und 72 h) analysiert, um eine Aussage zur Regulation des viralen Proteins machen zu können (Abb. 5). Die Konzentrationen und Zeitpunkte der HERV-W ENV Protein Exposition orientierten sich an vorherigen Studien der Arbeitsgruppe an primären Mikrogliazellen der Ratte im Rahmen der MS-Forschung (Kremer et al., 2019). Es konnte gezeigt werden, dass in A-172 Glioblastomzellen die Expression von *TNFA*, *IL6*, *MMP9*, *MCP-1*, *CSF1* und *VEGF* von einer Exposition zu HERV-W ENV Protein in unterschiedlichen Konzentrationen nahezu unbeeinflusst blieb (Abb. 5 B-G). Interessanterweise lag die relative Genexpression des proinflammatorischen Zytokins *TNFA* in einem nahezu nicht-detektierbaren Bereich, was auf eine insgesamt niedrige Expression des Zielgens hindeutet. Zudem ist die *TNFA*-Genexpression durch eine hohe Streuung gekennzeichnet (Abb. 5 A), möglicherweise bedingt durch eine unterschiedliche Reaktion der A-172 Glioblastomzellen auf die HERV-W ENV Protein Exposition. Daher ist die nahezu verdoppelte Expressionsrate unter HERV-W ENV Protein Exposition mit einer Konzentration von 5000 ng/ml zum Zeitpunkt 24 h im

Vergleich zur Kontrolle nur als deutlicher Trend zu bewerten, da ihm die statistische Relevanz fehlt (Abb. 5 B). Auch die Genexpression der chemotaktischen Faktoren *CSF1* und *MCP-1* bleibt in A-172 Glioblastomzellen in Monokultur durch eine Exposition zu verschiedenen Konzentrationen HERV-W ENV Protein statistisch unbeeinflusst, auch wenn sich eine tendenzielle Steigerung der Genexpression abzeichnet (Abb. 5 E, F).

Dass das HERV-W ENV Protein keinen Einfluss auf die Expression ausgewählter Gene aus den Bereichen Inflammation, Invasivität, TME-Modulation und Angiogenese in der A-172 Glioblastomzell-Monokultur zu haben scheint, konnte in anderen humanen Glioblastomzelllinien (LN229, U87 und T98), ebenfalls beobachtet werden (Reiche et al., 2024, Plaack, 2025). Eine mögliche Erklärung für die fehlende Reaktion der Glioblastomzellen auf eine HERV-W ENV Protein Exposition trotz Vorhandensein des TLR4 Rezeptors könnten regulatorische Mechanismen in den Tumorzellen sein, die die Signalkaskade hemmen, beispielsweise eine Mutation oder das Fehlen des Ko-Rezeptors CD14. Glioblastome sind allgemein durch eine erhöhte chromosomale Instabilität gekennzeichnet und weisen häufig strukturelle und numerische Chromosomenanomalien auf, was zur Einschränkung normaler zellulärer Funktionen führen kann (Mazzoleni et al., 2024). Des Weiteren könnte eine unzureichende Stimulationseffizienz oder eine Veränderung der Zelllinie durch zunehmende Passagierung eine Rolle spielen. Außerdem muss bedacht werden, dass das HERV-W ENV Protein die Genexpression von Glioblastomzellen in anderen bislang nicht analysierten Genen aus den genannten Bereichen beeinflussen könnte, weshalb in weiterführenden Experimenten eine vollständige Transkriptomanalyse durch RNA-Sequenzierungsverfahren angestrebt werden sollte.

4.2 Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf die A-172 Glioblastomzellen in mikroglialer Kokultur

Nachdem demonstriert werden konnte, dass die humane Zelllinie A-172 auf externe Stimuli wie LPS und TNFA reagiert (Abb. 7), war weiterhin eine generelle Aktivierbarkeit dieser Zelllinie anzunehmen. Daher galt sie für weitere Untersuchungen als geeignet. In Vorarbeiten dieses Projektes konnte HERV-W ENV Protein vor allem in Mikrogliazellen der TME nachgewiesen werden (Reiche et al., 2024). Darüber hinaus konnte in Arbeiten der Forschungsgruppe gezeigt werden, dass das HERV-W ENV Protein Mikrogliazellen aktiviert und zur Pathogenese der MS beiträgt (Kremer et al., 2019, Gruchot et al., 2023, Gruchot et al., 2025). Vor diesem Hintergrund war es von entscheidender Bedeutung zu untersuchen, ob HERV-W ENV Protein einen Einfluss auf Glioblastomzellen in Anwesenheit von Mikrogliazellen ausübt. Zu diesem Zweck wurden zwei unterschiedliche

Kokultur-Bedingungen analysiert, um festzustellen, ob sich die Effekte von HERV-W ENV Protein unterscheiden, abhängig davon, ob Mikroglia- und Glioblastomzellen direkt über Zell-Zell-Kontakte interagieren können (+MG) oder indirekt über parakrine Signalwege kommunizieren (*MG).

Zu Beginn der Studien mit humanen A-172 Glioblastomzellen und kokultivierten primären Ratten-Mikrogliazellen wurde die Spezifität der genutzten Primer bestätigt (Abb. 8 B, B'). Gerade für die +MG-Bedingung, bei der ein direkter Zellkontakt zwischen Glioblastom- und Mikrogliazellen bestand, war dies von essenzieller Bedeutung, um eine Fehlmessung auszuschließen und eine sichere Aussage über die Genexpression in humanen Glioblastomzellen treffen zu können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in der *MG-Bedingung eine Trennung der beiden verschiedenen Zellgruppen bestand (Abb. 8A) und so ein indirekter Zellkontakt über die Sekretion verschiedener löslicher Faktoren wie Zytokine oder Chemokine angenommen werden kann. Die HERV-W ENV Protein Exposition wurde in den Versuchen in mikroglialer Kokultur mit einer Konzentration von 1000 ng/ml fortgeführt, nachdem eine Erhöhung der Stimulationsdosis in der Monokultur keine Änderungen ergeben hatte und andere Studien der Forschungsgruppe an primären Mikrogliazellen der Ratte im Rahmen der MS Forschung eine ausreichende Aktivierbarkeit der Mikrogliazellen unter einer Exposition zu 1000 ng/ml HERV-W ENV Protein gezeigt hatten (Kremer et al., 2019).

Im Bereich der Inflammation kam es durch HERV-W ENV Protein Exposition zu einer signifikant erhöhten Genexpression der proinflammatorischen Zytokine *TNFA*, *iNOS*, *IL6* und *IL1B* in A-172 Glioblastomzellen in direktem und indirektem Mikrogliakontakt (Abb. 10 A-D). *TNFA* fördert Tumorprogression und Angiogenese in Glioblastomen und führt unter anderem durch eine gesteigerte *IL6* Synthese zu vermehrtem Tumorwachstum und Invasivität (Tanabe et al., 2010, Mostofa et al., 2017, Ulasov et al., 2023). Zudem beeinflusst *TNFA* die Immunantwort, indem die Expression von MHC-I Molekülen gesteigert wird (Şovrea et al., 2022). Allgemein führen inflammatorische Zytokine über den NFκB Signalweg zu einer gesteigerten *iNOS* Expression in Tumorzellen (Fukumura et al., 2006). Die Isoform *iNOS* wird in Glioblastomzellen überexprimiert und ist mit Tumorprogression und Resistenzen gegen TMZ assoziiert (Merenzon et al., 2023). *IL6* ist ein multifunktionales Zytokin, reguliert Inflamationsprozesse, die Akute-Phase-Reaktion und wirkt unter anderem über den JAK/STAT3 Signalweg (Mihara et al., 2012, West et al., 2018). Zudem hat *IL6* in Glioblastomen einen entscheidenden fördernden Einfluss auf Tumorproliferation, Angiogenese und Invasivität (Goswami et al., 1998, Wang et al., 2009, Li et al., 2010), indem es etwa eine Hochregulation der Expression von *MMP9* induziert (Liu et al., 2010b). *IL6* scheint somit eine Verbindungsfunktion zwischen den Bereichen Inflammation und

Tumorinvasivität einzunehmen. IL1B wird primär von aktivierten myeloischen Zellen produziert und ist an der Pathogenese des zerebralen Ödems beteiligt (Herting et al., 2019). Zudem ist die erhöhte IL1B Expression in Glioblastomen mit Tumorprogression und einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert (Yeung et al., 2013, Chen et al., 2023). Bei Betrachtung der Genexpression der inflammatorischen Gene *iNOS*, *IL6* und *IL1B* konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der +MG/ENV und der *MG/ENV Bedingung detektiert werden, mit einer höheren Genexpression in der +MG/ENV Bedingung (Abb. 10 B-D). Dies lässt darauf schließen, dass HERV-W ENV Protein über den direkten Zellkontakt zwischen Mikrogliazellen und Tumorzellen einen stärkeren Einfluss auf die Genexpression der A-172 Glioblastomzellen auszuüben scheint als über den indirekten Kontakt über das zirkulierende Medium. Eine mögliche Rolle könnten dabei *Gap Junctions* und *Connexine* spielen, welche essenzielle Funktionen in der Zell-Zell-Kommunikation im ZNS übernehmen (Sánchez et al., 2020, Sharma et al., 2023).

Aufgrund des zuvor beschriebenen starken Einflusses des HERV-W ENV Proteins auf die Genexpression von inflammatorischen Zytokinen in A-172 Glioblastomzellen in mikroglialer Kokultur, war es anschließend von großem Interesse die Regulation proinflammatorischer Proteine weiter zu untersuchen. Entgegen der Annahme konnte in A-172 Glioblastomzellen in Monokultur sowie in mikroglialer Kokultur nur eine schwache iNOS-Grundexpression dargestellt werden ohne Änderung der Expression unter HERV-W ENV Protein Exposition (Abb. 11 A). Weiterhin konnte HERV-W ENV Protein vermittelt keine Änderung der TNFA-Sekretion gezeigt werden (Abb. 11 B). Auch in der Studie von Reiche et al., dort mittels Zytokin-Sekretions-Assay untersucht, blieb die TNFA-Sekretion in der A-172 Zelllinie von HERV-W ENV Protein unbeeinflusst (Reiche et al., 2024). Translationale und posttranslationale Dysregulationen, darunter beispielsweise Histon-Modifikationen oder *Non-coding* RNA, sind in Tumoren bekannt und könnten eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen mRNA und Proteinlevel sein (Vaklavas et al., 2017, Isachesku et al., 2023). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass durch HERV-W ENV Protein Exposition die TNFA-Sekretion in T98 Zellen erhöht und in LN229 Zellen vermindert wird (Reiche et al., 2024). Dies verdeutlicht die Heterogenität der humanen Glioblastom-Zelllinien (Plaack, 2025), worauf im Verlauf näher eingegangen wird.

Im Bereich der TME-Modulation zeigten besonders die chemotaktischen Gene *CX3CL1*, *CSF1*, *MCP-1* und *MCP-3* durch die Exposition mit HERV-W ENV Protein in mit Mikroglia kokultivierten A-172 Glioblastomzellen eine deutlich höhere Genexpression (Abb. 9 und 10). Sowohl in direktem als auch in indirektem Mikrogliakontakt konnte eine signifikante Hochregulation von *MCP-1* und *CSF1* unter HERV-W ENV Protein Exposition dargestellt werden (Abb. 10 F, G), was sich für *MCP-1* auch mittels Zytokin-Sekretions-Assay

darstellen ließ (Reiche et al., 2024). Die genannten Faktoren werden im Glioblastom von Tumorzellen als Reaktion auf inflammatorische und tumorfördernde Signale wie IL6 und IL1B ausgeschüttet (Buonfiglioli and Hambardzumyan, 2021). Es ist zudem bekannt, dass die Tumorprogression von starken Interdependenzen zwischen TAMs und Glioblastomzellen geprägt ist (Sharma et al., 2023). Schließlich ist anzunehmen, dass die HERV-W ENV Protein Exposition eine Expression proinflammatorischer Faktoren in Mikrogliazellen induziert (Kremer et al., 2019, Plaack, 2025), die dann nachfolgend zur erhöhten Expression von Genen, assoziiert mit einer protumoralen TME-Modulation, in A-172 Glioblastomzellen führen könnte.

Insbesondere beim Glioblastom, das durch ein extrem invasives Wachstum gekennzeichnet ist, spielen Faktoren, die die Tumorinvasivität fördern, wie beispielsweise MMPs, eine entscheidende Rolle. MMPs sind Endopeptidasen mit hydrolytischer Aktivität und können zum Abbau der EZM führen (Rao, 2003). Während MMP9 und MMP2 zu den Gelatinasen gehören, ist MMP14 membrangebunden (Raeeshzadeh-Sarmazdeh et al., 2020). Eine erhöhte Expression von MMP9 in Glioblastomen kann unter anderem durch IL6 (Liu et al., 2010b), IL33 (Zhang et al., 2017) oder *astrocyte elevated gene-1* (AEG-1) (Liu et al., 2010a) hervorgerufen werden. Interessanterweise konnte in A-172 Glioblastomzellen in mikroglialer Kokultur durch HERV-W ENV Protein Exposition eine signifikante Hochregulation der Genexpression von *MMP9* verzeichnet werden (Abb. 10 E), während die Genexpression von *MMP2* und *MMP14* durch das HERV-W ENV Protein unbeeinflusst blieb (Abb. 9). Es konnte allerdings ein stabiles und hohes Expressionslevel von *MMP2* und *MMP14*, unabhängig von einer HERV-W ENV Protein Exposition, beobachtet werden (Abb. 9). Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen Liu et al., die in ihrer *in vitro* Studie zeigten, dass eine Stimulation mit IL6 zu einer erhöhten Expression von *MMP9* in zwei Glioblastom-Zelllinien führte, aber keinen Einfluss auf die *MMP2* Expression hatte (Liu et al., 2010b). Eine Rolle könnte dabei etwa der unterschiedliche Aktivierungsmechanismus der verschiedenen MMPs spielen (Nakada et al., 2003, Tanaka and Sakamoto, 2023).

VEGF nimmt eine Schlüsselfunktion in der Angiogenese in Tumoren ein und führt zur Kapillaraussprossung und Bildung dysfunktionaler Gefäße (Carmeliet, 2005). Interessanterweise blieb die Genexpression von *VEGF* auch in mikroglialer Kokultur von einer HERV-W ENV Protein Stimulation unbeeinflusst (Abb. 10 H); es zeigte sich aber ein stabiles Expressionslevel (Abb. 9). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die VEGF-Expression in der TME vor allem über Hypoxie reguliert wird, die im Rahmen dieses Dissertationsprojektes nicht induziert wurde (Abou Khouzam et al., 2020, Park and Lee, 2022).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das HERV-W ENV Protein via Mikrogliazellen einen hin zu Tumorprogression modulierenden Effekt auf die Expression von Genen aus den Bereichen Inflammation, Tumorinvasivität und TME in A-172 Glioblastomzellen auszuüben scheint. Es konnte gezeigt werden, dass eine Mikroglia-abhängige Tumorprogression durch HERV-W ENV Protein auch in den humanen Glioblastomzelllinien T98 und LN229 besteht (Reiche et al., 2024). Dies lässt Mikrogliazellen als mögliche Zielstrukturen für die weitere Entwicklung von Therapieoptionen gegen das Glioblastom in den Fokus rücken. Bei Analyse der Proteinsekretion konnten insgesamt durch HERV-W ENV Protein Stimulation ähnliche Tendenzen wie bei der Genexpression in den Glioblastomzelllinien festgestellt werden (Reiche et al., 2024). Bei näherer Betrachtung einzelner Proteine zeigten sich jedoch in den verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Reaktionsmuster auf eine HERV-W ENV Protein Exposition, wie zuvor bei TNFA beschrieben (Reiche et al., 2024, Plaack, 2025).

4.3 Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf zelluläre Funktionen der A-172 Glioblastomzellen

Maligne Tumorzellen sind durch eine unkontrollierte und gesteigerte Proliferation gekennzeichnet (Hanahan and Weinberg, 2000). In der Literatur gibt es Hinweise, dass ENV Proteine einiger HERV-Familien die Zellproliferation in verschiedenen Tumoren steigern (Sahu et al., 2022), beispielsweise HERV-K ENV Protein in Brustkrebs (Zhou et al., 2016). Es ist zudem bekannt, dass die TME, insbesondere der Glioblastom-Mikroglia-*Crosstalk*, einen steigernden Einfluss auf die Tumorphiliferation ausübt (Matias et al., 2018). Der genaue Mechanismus ist aber nicht abschließend geklärt. Eine mögliche Methode die Proliferation zu quantifizieren, ist der Ki-67 Index, der in Glioblastomen mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert ist (Tini et al., 2023). Während die HERV-W ENV Protein Exposition in A-172 Glioblastomzellen in Monokultur zu einer verminderten Proliferation führte (Abb. 6 A'), konnte in indirektem Mikrogliakontakt ein signifikanter Anstieg der relativen Ki-67 Expression durch HERV-W ENV Protein verzeichnet werden (Abb. 12 A, *MG). In direktem Mikrogliakontakt blieb die Proliferationsrate von HERV-W ENV Protein jedoch unbeeinflusst (Abb. 12 A, +MG). Diese Ergebnisse zeigen, dass HERV-W ENV Protein auch Effekte ausüben kann, wenn Glioblastomzellen nur in indirektem Kontakt zu Mikrogliazellen stehen und verdeutlichen die Relevanz der parakrinen Zellkommunikation. Weitere Forschung mit ergänzenden Methoden zur Proliferationsanalyse, beispielsweise mittels BrdU-Assay (5-Brom-2'-Desoxy-Uridin), wäre im Hinblick auf den Einfluss von HERV-W ENV Protein auf die Proliferation relevant.

In den humanen Glioblastomzelllinien T98 und LN229 zeigte sich sowohl in Mono- als auch in mikroglialer Kokultur keine signifikante Änderung der Proliferationsrate unter HERV-W ENV Protein Exposition (Reiche et al., 2024). Grund dafür könnten spezifische Eigenschaften der verschiedenen Zelllinien sein, wodurch erneut die Heterogenität der humanen Glioblastomzelllinien verdeutlicht wird (Plaack, 2025). Bisher gibt es keine wissenschaftliche Studie, die einen direkten Vergleich der humanen Glioblastomzelllinien A-172, T98, LN229 und U87 bezüglich ihrer genetischen und funktionalen Eigenschaften durchführte; wenige Studien beleuchten jedoch die Charakteristika einzelner Zelllinien (Kiseleva et al., 2016, Diao et al., 2019, Demircan et al., 2021).

Die Migration von Tumorzellen ist der Ausgangspunkt für Gewebsinvasion und gehört zu den „*Hallmarks of cancer*“ (Hanahan and Weinberg, 2000). Auf Genebene spielen MMPs dabei eine bedeutende Rolle. Da die Exposition mit HERV-W ENV Protein zu einer signifikanten Induktion der Genexpression von MMP9 in A-172 Glioblastomzellen in mikroglialer Kokultur führte (Abb. 10 E), war es von großem Interesse zu untersuchen, ob HERV-W ENV Protein einen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Glioblastomzellen in indirektem Kontakt zu Mikroglia hat. Allerdings wurde keine Änderung der Migrationsrate durch HERV-W ENV beobachtet. (Abb. 13 B). Eine Erklärung könnte das *in vitro* Modell selbst sein, in dem nur ein indirekter Kontakt zu Mikroglia über das Medium bestand. *Transwell-Assays* sind weit verbreitet und stellen ein etabliertes Verfahren dar, um Zellmigration zu untersuchen, jedoch vereinfachen sie die *in vivo* Situation allerdings stark (Manini et al., 2018). Die Glioblastom Infiltration und Migration der Zellen sind komplexe Prozesse, die vor allem auf dem Zusammenspiel der Tumorzellen mit der TME und dem umliegenden Gewebe beruhen. Glioblastomzellen migrieren meist als individuelle Zellen entlang vorhandener Gehirnstrukturen, wie perivaskulär oder im Subarachnoidalraum (Manini et al., 2018). Auf Zellebene kommt es bei der Migration von Glioblastomzellen Integrin- und CD44 vermittelt zu einem Zusammenspiel der Zytoskelett-Proteine Aktin und Myosin (Anderson et al., 2024). Die Tumorinvasivität wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Dazu gehören nicht nur die in dieser Dissertationsarbeit untersuchten Glioblastomzellen und Mikroglia, sondern auch Endothelzellen und Astrozyten. Des Weiteren spielen Komponenten der EZM und Hypoxie-induzierte Mechanismen eine Rolle (Erices et al., 2023). Es wäre zukünftig von erheblichem Interesse den Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf die Migration der Glioblastomzellen in direktem Kontakt zu Mikrogliazellen zu analysieren. Coniglio et al. haben ein 3D-Matrix *Transwell*-Modell etabliert, in dem Fluoreszenz-markierte Glioblastomzellen und Mikroglia mittels Fluoreszenzmikroskopie auf der Unterseite des Filters quantifiziert werden. Dabei zeigte sich eine Steigerung der Migration der Glioblastomzellen in direktem Kontakt zu Mikroglia

(Coniglio et al., 2016). Weitere Modelle, um die Migration zu beurteilen, wären beispielsweise *ex vivo* Modelle oder sogenannte Sphäroide, selbstorganisierte Zellaggregate (Watkins et al., 2014, Manini et al., 2018, Jo et al., 2024). Interessanterweise konnte mittels *Scratch-Assay* eine gesteigerte Migrationsgeschwindigkeit in T98 Glioblastomzellen in Kontakt zu Mikroglia unter HERV-W ENV Protein Exposition festgestellt werden, während diese in A-172 und LN229 Zellen unbeeinflusst blieb (Reiche et al., 2024). Dies macht erneut deutlich, wie wichtig es ist im Feld der Glioblastomforschung verschiedene Zelllinien parallel zu untersuchen, um diese besser zu charakterisieren und vergleichen zu können.

Insgesamt zeigen sich bei Betrachtung funktionaler Parameter Tendenzen, dass HERV-W ENV Protein via Mikroglia zu einer gesteigerten Proliferation und Migration in Glioblastomzelllinien führen könnte (Reiche et al., 2024).

4.4 Limitationen und Ausblick

In diesem Dissertationsvorhaben wurde der Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf die Glioblastom-Homöostase anhand der kommerziell erworbenen humanen Glioblastomzelllinie A-172 untersucht. Im Verlauf wurden in der Arbeitsgruppe drei weitere Zelllinien (LN229, T98 und U87) ergänzt mit tendenziell ähnlichen Ergebnissen, wobei sich die Reaktionsmuster der einzelnen Zelllinien auf HERV-W ENV Protein Stimulation voneinander unterscheiden und eine Heterogenität der Zelllinien deutlich wird (Reiche et al., 2024, Plaack, 2025). Insgesamt bleibt die Aussagekraft und Übertragbarkeit von Studien an einzelnen Zelllinien auf den Menschen eingeschränkt. Die etablierte Zelllinie A-172 wurde ursprünglich aus Glioblastomgewebe eines 53-jährigen Mannes isoliert. Sie weist spezifische genetische und epigenetische Eigenschaften auf, die jedoch aufgrund ihres klonalen Ursprungs nicht die gesamte intratumorale Heterogenität von Glioblastomen widerspiegeln (Giard et al., 1973, Kiseleva et al., 2016). Zudem ist bekannt, dass im Rahmen der Langzeitkultivierung mit fortschreitender Passage der Zelllinie das Risiko für Mutationen mit nachfolgender möglicher Änderung ihrer bekannten Eigenschaften steigt (Weiskirchen et al., 2023). Daher könnte die Übertragbarkeit der hier präsentierten Ergebnisse in den klinischen Kontext eingeschränkt sein.

Des Weiteren muss beachtet werden, dass die Studien in Kokultur mit primären Ratten-Mikrogliazellen durchgeführt worden sind. Ein limitierender Faktor bezüglich der Übertragbarkeit auf den Menschen sind unterschiedliche Genexpressionsprofile in humanen und murinen Mikroglia (Jurga et al., 2020). Beispielsweise ist die TLR4 Expression in murinen Mikroglia höher als in humanen (Smith and Dragunow, 2014).

Mikroglia und TAMs sind zudem durch ein hohes Maß an Heterogenität gekennzeichnet, ausgelöst durch einen lebenslangen Kontakt zu multiplen Pathogenen (Khan et al., 2023). Diese Eigenschaft ist bei den primären Mikrogliazellen aus neonatalen Ratten nicht gegeben. Ob sich der Einfluss von HERV-W ENV Protein auf humane Glioblastomzellen im Kontakt zu humanen adulten Mikrogliazellen ändert, wäre eine interessante Fragestellung für zukünftige Studien. In diesem Dissertationsprojekt wurde sich auf die Reaktion der Glioblastomzellen auf die HERV-W ENV Protein Exposition konzentriert. Wie sich das Genexpressionsprofil der Mikrogliazellen in Kontakt zu Glioblastomzellen unter HERV-W ENV Protein Exposition verändert, wurde in der Arbeit von Plaack genauer betrachtet (Plaack, 2025). Es zeigte sich, dass Mikroglia, kokultiviert mit Glioblastomzellen, unter HERV-W ENV Protein Exposition einen proinflammatorischen Phänotyp annehmen und so zu Tumorprogression führen könnten. Bemerkenswerterweise konnte zeitgleich durch HERV-W ENV Protein eine Induktion von antiinflammatorischen Genen in Mikroglia beobachtet werden, wodurch eine immunsuppressive protumorale TME gefördert werden könnte (Plaack, 2025), wie sie bereits für Glioblastome im Menschen beschrieben wurde (Razavi et al., 2016, Pearson et al., 2020).

Die TME besteht neben Mikroglia- und Tumorzellen aus weiteren nicht-neoplastischen Zellen wie Astrozyten und Fibroblasten aber auch Komponenten der EZM (Faisal et al., 2022). Diese nicht-neoplastischen Zellen wurden in diesem Dissertationsprojekt nicht berücksichtigt. Sharma et al. geben einen Überblick über verschiedene *in vitro* und *in vivo* TME-Modelle in Gliomen, welche in Zukunft helfen sollen, die Interaktionen in der TME besser zu verstehen (Sharma et al., 2023), darunter beispielsweise Tiermodelle wie „*Patient-derived Xenograft*“, wobei humanes Glioblastomgewebe in meist immundefiziente Mäuse implantiert wird oder syngene Mausmodelle mit murinen Glioblastomzellen in immunkompetenten Mäusen (Haddad et al., 2021). Weitere Modelle, die sich in der Glioblastomforschung zunehmend etablieren, sind *in vitro* 3D Organoide, welche sich durch höhere Zelldiversität und eine komplexere Struktur als 2D Zelllinien auszeichnen (Wang et al., 2023, White et al., 2024). In diesem System könnte genauer analysiert werden, ob sich der Einfluss des HERV-W ENV Proteins durch das Vorhandensein einer heterogenen TME mit weiteren nicht-neoplastischen Zellen auf zelluläre Funktionen in Glioblastomen verändert.

Eine interessante *in vivo* Methode wäre die Verwendung eines genetisch modifizierten Tiermodells mit transgenen Mäusen, welche HERV-W ENV Protein exprimieren (Gruchot et al., 2023). Dabei ließe sich untersuchen, wie sich Glioblastomzellen verhalten, wenn sie in eine HERV-W ENV Protein positive Tumormikroumgebung transplantiert werden. Dies käme eventuell den bisherigen histologischen Befunden, die HERV-W ENV Protein im

Glioblastom vor allem in Mikrogliazellen der TME nachweisen (Reiche et al., 2024), als Modell am nächsten.

Ein weiterer Aspekt, den es in Zukunft zu untersuchen gilt, ist der Einfluss einer endogenen Expression von HERV-W ENV Protein auf Glioblastomzellen im Vergleich zu der hier untersuchten exogenen Stimulation. Eine Möglichkeit die Reaktion auf eine endogene HERV-W ENV Expression zu analysieren, wäre die Durchführung einer Transfektion bzw. Transduktion. Erste Etablierungsversuche einer Nukleofektion mit HERV-W ENV in A-172 Glioblastomzellen wurden bereits durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Ein letzter klinisch sehr relevanter Punkt umfasst die Prognose von Hirntumoren. Reiche et al. konnten zeigen, dass HERV-W ENV Protein in Gliomen unabhängig vom WHO-Grad exprimiert wird (Reiche et al., 2024). Ob HERV-W ENV Protein mit unterschiedlichen Überlebensraten einhergeht, ist bislang noch unklar und sollte in zukünftigen Studien näher untersucht werden. Dabei wäre zudem der Einfluss von HERV-W ENV Protein auf die Homöostase von Oligodendrogliomen und Astrozytomen von Interesse.

4.5 Schlussfolgerung

Das Glioblastom ist der häufigste und aggressivste primäre Gehirntumor des Erwachsenen, welcher sich durch eine ungünstige Prognose und ausgeprägte Therapieresistenz auszeichnet, sodass weiterhin nach neuen Therapieansätzen gesucht wird (Schaff and Mellinghoff, 2023). Im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführte histochemische Analysen konnten HERV-W ENV Protein in Mikroglia-positiven Zellen in humanen Gliomen nachweisen (Reiche et al., 2024). Darauf basiert die Annahme, dass das HERV-W ENV Protein eine modulierende Rolle zwischen Glioblastomzellen und der TME einnehmen könnte. Während in der Glioblastom-Monokultur kein direkter Einfluss des HERV-W ENV Proteins auf die Genexpression der Tumorzellen festgestellt werden konnte, zeigte sich im Zusammenspiel mit Mikroglia eine deutliche Modulation der Glioblastom-Homöostase. Insbesondere kam es in Glioblastomzellen Mikroglia-vermittelt durch HERV-W ENV Protein, sowohl in direktem Zellkontakt als auch über parakrine Kommunikation, zu einer verstärkten Expression von Genen, die mit Proinflammation, Invasivität und der TME-Modulation assoziiert sind. Hinsichtlich funktioneller Parameter wie der Proliferation ergab sich ein tendenziell steigender Einfluss durch HERV-W ENV Protein Exposition in Glioblastomzellen in mikroglialer Kokultur. Insgesamt legen die Daten nahe, dass HERV-W ENV Protein weniger durch direkte Wirkung auf Tumorzellen, sondern vielmehr über modulatorische Prozesse via Mikroglia zur Tumorprogression im Glioblastom beitragen könnte. Diese Dissertationsarbeit hebt die hohe Relevanz der TME in der Pathogenese des

Glioblastoms hervor und exponiert TAMs, im Speziellen Mikrogliazellen, als mögliche pharmakotherapeutische Zielstrukturen in der bisher unzureichenden Behandlung des Glioblastoms.

5 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- ABOU KHOUZAM, R., BRODACZEWSKA, K., FILIPIAK, A., ZEINELABDIN, N. A., BUART, S., SZCZYLIK, C., KIEDA, C. & CHOUAIB, S. 2020. Tumor Hypoxia Regulates Immune Escape/Invasion: Influence on Angiogenesis and Potential Impact of Hypoxic Biomarkers on Cancer Therapies. *Front Immunol*, 11, 613114.
- AGOSTI, E., ZEPPIERI, M., DE MARIA, L., TEDESCHI, C., FONTANELLA, M. M., PANCIANI, P. P. & IUS, T. 2023. Glioblastoma Immunotherapy: A Systematic Review of the Present Strategies and Prospects for Advancements. *Int J Mol Sci*, 24.
- AHIR, B. K., ENGELHARD, H. H. & LAKKA, S. S. 2020. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Mol Neurobiol*, 57, 2461-2478.
- ALCAZER, V., BONAVENTURA, P. & DEPIL, S. 2020. Human Endogenous Retroviruses (HERVs): Shaping the Innate Immune Response in Cancers. *Cancers (Basel)*, 12.
- ALOISI, F. 2001. Immune function of microglia. *Glia*, 36, 165-79.
- ANDERSON, S. M., KELLY, M. & ODDE, D. J. 2024. Glioblastoma Cells Use an Integrin- and CD44-Mediated Motor-Clutch Mode of Migration in Brain Tissue. *Cell Mol Bioeng*, 17, 121-135.
- APARICI-ROBLES, F., DAVIDHI, A., CAROT-SIERRA, J. M., PEREZ-GIRBES, A., CARRERES-POLO, J., MAZON MOMPALER, M., JUAN-ALBARRACÍN, J., FUSTER-GARCIA, E. & GARCIA-GOMEZ, J. M. 2022. Glioblastoma versus solitary brain metastasis: MRI differentiation using the edema perfusion gradient. *J Neuroimaging*, 32, 127-133.
- ARITA, H., YAMASAKI, K., MATSUSHITA, Y., NAKAMURA, T., SHIMOKAWA, A., TAKAMI, H., TANAKA, S., MUKASA, A., SHIRAHATA, M., SHIMIZU, S., SUZUKI, K., SAITO, K., KOBAYASHI, K., HIGUCHI, F., UZUKA, T., OTANI, R., TAMURA, K., SUMITA, K., OHNO, M., MIYAKITA, Y., KAGAWA, N., HASHIMOTO, N., HATAE, R., YOSHIMOTO, K., SHINOJIMA, N., NAKAMURA, H., KANEMURA, Y., OKITA, Y., KINOSHITA, M., ISHIBASHI, K., SHOFUDA, T., KODAMA, Y., MORI, K., TOMOGANE, Y., FUKAI, J., FUJITA, K., TERAOKAWA, Y., TSUYUGUCHI, N., MORIUCHI, S., NONAKA, M., SUZUKI, H., SHIBUYA, M., MAEHARA, T., SAITO, N., NAGANE, M., KAWAHARA, N., UEKI, K., YOSHIMINE, T., MIYAOKA, E., NISHIKAWA, R., KOMORI, T., NARITA, Y. & ICHIMURA, K. 2016. A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. *Acta Neuropathol Commun*, 4, 79.
- AUBRY, M., DE TAYRAC, M., ETCHEVERRY, A., CLAVREUL, A., SAIKALI, S., MENEI, P. & MOSSER, J. 2015. From the core to beyond the margin: a genomic picture of glioblastoma intratumor heterogeneity. *Oncotarget*, 6, 12094-109.
- BAJETTO, A., BARBIERI, F., DORCARATTO, A., BARBERO, S., DAGA, A., PORCILE, C., RAVETTI, J. L., ZONA, G., SPAZIANTE, R., CORTE, G., SCHETTINI, G. & FLORIO, T. 2006. Expression of CXC chemokine receptors 1-5 and their ligands in human glioma tissues: role of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration. *Neurochem Int*, 49, 423-32.
- BANNERT, N., HOFMANN, H., BLOCK, A. & HOHN, O. 2018. HERVs New Role in Cancer: From Accused Perpetrators to Cheerful Protectors. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- BANNERT, N. & KURTH, R. 2006. The Evolutionary Dynamics of Human Endogenous Retroviral Families. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7, 149-173.
- BARTH, M., GRÖGER, V., CYNIS, H. & STAEGE, M. S. 2019. Identification of human endogenous retrovirus transcripts in Hodgkin Lymphoma cells. *Mol Biol Rep*, 46, 1885-1893.

- BELSHAW, R., PEREIRA, V., KATZOURAKIS, A., TALBOT, G., PACES, J., BURT, A. & TRISTEM, M. 2004. Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4894-9.
- BERGERS, G. & BENJAMIN, L. E. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3, 401-10.
- BERGHOFF, A. S., KIESEL, B., WIDHALM, G., RAJKY, O., RICKEN, G., WÖHRER, A., DIECKMANN, K., FILIPITS, M., BRANDSTETTER, A., WELLER, M., KURSCHEID, S., HEGI, M. E., ZIELINSKI, C. C., MAROSI, C., HAINFELLNER, J. A., PREUSSER, M. & WICK, W. 2015. Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. *Neuro Oncol*, 17, 1064-75.
- BHENDE, P. M., SEAMAN, W. T., DELECLUSE, H. J. & KENNEY, S. C. 2004. The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nat Genet*, 36, 1099-104.
- BJERREGAARD, B., HOLCK, S., CHRISTENSEN, I. J. & LARSSON, L. I. 2006. Syncytin is involved in breast cancer-endothelial cell fusions. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63, 1906-1911.
- BLOCH, O., CRANE, C. A., KAUR, R., SAFAEE, M., RUTKOWSKI, M. J. & PARSA, A. T. 2013. Gliomas promote immunosuppression through induction of B7-H1 expression in tumor-associated macrophages. *Clin Cancer Res*, 19, 3165-75.
- BOWERS, D. C., NATHAN, P. C., CONSTINE, L., WOODMAN, C., BHATIA, S., KELLER, K. & BASHORE, L. 2013. Subsequent neoplasms of the CNS among survivors of childhood cancer: a systematic review. *The Lancet Oncology*, 14, e321-e328.
- BRENNAN, C. W., VERHAAK, R. G., MCKENNA, A., CAMPOS, B., NOUSHMEHR, H., SALAMA, S. R., ZHENG, S., CHAKRAVARTY, D., SANBORN, J. Z., BERMAN, S. H., BEROUKHIM, R., BERNARD, B., WU, C. J., GENOVESE, G., SHMULEVICH, I., BARNHOLTZ-SLOAN, J., ZOU, L., VEGESNA, R., SHUKLA, S. A., CIRIELLO, G., YUNG, W. K., ZHANG, W., SOUGNEZ, C., MIKKELSEN, T., ALDAPE, K., BIGNER, D. D., VAN MEIR, E. G., PRADOS, M., SLOAN, A., BLACK, K. L., ESCHBACHER, J., FINOCCHIARO, G., FRIEDMAN, W., ANDREWS, D. W., GUHA, A., IACocca, M., O'NEILL, B. P., FOLTZ, G., MYERS, J., WEISENBERGER, D. J., PENNY, R., KUCHERLAPATI, R., PEROU, C. M., HAYES, D. N., GIBBS, R., MARRA, M., MILLS, G. B., LANDER, E., SPELLMAN, P., WILSON, R., SANDER, C., WEINSTEIN, J., MEYERSON, M., GABRIEL, S., LAIRD, P. W., HAUSSLER, D., GETZ, G. & CHIN, L. 2013. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, 155, 462-77.
- BRONSON, D. L., FRALEY, E. E., FOGH, J. & KALTER, S. S. 1979. Induction of Retrovirus Particles in Human Testicular Tumor (Tera-1) Cell Cultures: An Electron Microscopic Study². *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 63, 337-339.
- BRYAN, T. M. & CECH, T. R. 1999. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 318-24.
- BUONFIGLIOLI, A. & HAMBARDZUMYAN, D. 2021. Macrophages and microglia: the cerberus of glioblastoma. *Acta Neuropathol Commun*, 9, 54.
- BÜSCHER, K., TREFZER, U., HOFMANN, M., STERRY, W., KURTH, R. & DENNER, J. 2005. Expression of Human Endogenous Retrovirus K in Melanomas and Melanoma Cell Lines. *Cancer Research*, 65, 4172-4180.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J. & WITTEW, C. T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55, 611-22.
- CARLSON, M. R., POPE, W. B., HORVATH, S., BRAUNSTEIN, J. G., NGHIEMPHU, P., TSO, C. L., MELLINGHOFF, I., LAI, A., LIAU, L. M., MISCHEL, P. S., DONG, J., NELSON, S. F. & CLOUGHESY, T. F. 2007. Relationship between survival and edema in malignant gliomas: role of vascular endothelial growth factor and neuronal pentraxin 2. *Clin Cancer Res*, 13, 2592-8.

- CARMELIET, P. 2005. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3, 4-10.
- CAVALLARO, U. & CHRISTOFORI, G. 2004. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci*, 1014, 58-66.
- CHAN, S. M., SAPIR, T., PARK, S.-S., RUAL, J.-F., CONTRERAS-GALINDO, R., REINER, O. & MARKOVITZ, D. M. 2019. The HERV-K accessory protein Np9 controls viability and migration of teratocarcinoma cells. *PLOS ONE*, 14, e0212970.
- CHARLES, N. A., HOLLAND, E. C., GILBERTSON, R., GLASS, R. & KETTENMANN, H. 2012. The brain tumor microenvironment. *Glia*, 60, 502-14.
- CHARVET, B., REYNAUD, J. M., GOURRU-LESIMPLE, G., PERRON, H., MARCHE, P. N. & HORVAT, B. 2018. Induction of Proinflammatory Multiple Sclerosis-Associated Retrovirus Envelope Protein by Human Herpesvirus-6A and CD46 Receptor Engagement. *Front Immunol*, 9, 2803.
- CHEN, Z., FENG, X., HERTING, C. J., GARCIA, V. A., NIE, K., PONG, W. W., RASMUSSEN, R., DWIVEDI, B., SEBY, S., WOLF, S. A., GUTMANN, D. H. & HAMBARDZUMYAN, D. 2017. Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer Res*, 77, 2266-2278.
- CHEN, Z., GIOTTI, B., KALUZOVA, M., VALLCORBA, M. P., RAWAT, K., PRICE, G., HERTING, C. J., PINERO, G., CRISTEA, S., ROSS, J. L., ACKLEY, J., MAXIMOV, V., SZULZEWSKY, F., THOMASON, W., MARQUEZ-ROPERO, M., ANGIONE, A., NICHOLS, N., TSANKOVA, N. M., MICHOR, F., SHAYAKHMETOV, D. M., GUTMANN, D. H., TSANKOV, A. M. & HAMBARDZUMYAN, D. 2023. A paracrine circuit of IL-1 β /IL-1R1 between myeloid and tumor cells drives genotype-dependent glioblastoma progression. *J Clin Invest*, 133.
- CHIAPPINELLI, K. B., STRISSEL, P. L., DESRICHARD, A., LI, H., HENKE, C., AKMAN, B., HEIN, A., ROTE, N. S., COPE, L. M., SNYDER, A., MAKAROV, V., BUDHU, S., SLAMON, D. J., WOLCHOK, J. D., PARDOLL, D. M., BECKMANN, M. W., ZAHNOW, C. A., MERGHOUB, T., CHAN, T. A., BAYLIN, S. B. & STRICK, R. 2015. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell*, 162, 974-86.
- CHIGIRA, M., NODA, K. & WATANABE, H. 1990. Autonomy in tumor cell proliferation. *Med Hypotheses*, 32, 249-54.
- CIOFFI, G., WAITE, K. A., EDELSON, J. L., KRUCHKO, C., OSTROM, Q. T. & BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. 2022. Changes in survival over time for primary brain and other CNS tumors in the United States, 2004-2017. *J Neurooncol*.
- CONIGLIO, S., MILLER, I., SYMONS, M. & SEGALL, J. E. 2016. Coculture Assays to Study Macrophage and Microglia Stimulation of Glioblastoma Invasion. *J Vis Exp*.
- CONIGLIO, S. J., EUGENIN, E., DOBRENIS, K., STANLEY, E. R., WEST, B. L., SYMONS, M. H. & SEGALL, J. E. 2012. Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. *Mol Med*, 18, 519-27.
- DAUBON, T., HEMADOU, A., ROMERO GARMENDIA, I. & SALEH, M. 2020. Glioblastoma Immune Landscape and the Potential of New Immunotherapies. *Front Immunol*, 11, 585616.
- DEBERARDINIS, R. J., LUM, J. J., HATZIVASSILIOU, G. & THOMPSON, C. B. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*, 7, 11-20.
- DEMIRCAN, T., YAVUZ, M., KAYA, E., AKGÜL, S. & ALTUNTAŞ, E. 2021. Cellular and Molecular Comparison of Glioblastoma Multiform Cell Lines. *Cureus*, 13, e16043.
- DERMANI, F. K., SAMADI, P., RAHMANI, G., KOHLAN, A. K. & NAJAFI, R. 2019. PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy. *J Cell Physiol*, 234, 1313-1325.
- DI NUNNO, V., APRILE, M., BARTOLINI, S., GATTO, L., TOSONI, A., RANIERI, L., DE BIASE, D., ASIOLI, S. & FRANCESCHI, E. 2023. The Biological and Clinical Role

- of the Telomerase Reverse Transcriptase Gene in Glioblastoma: A Potential Therapeutic Target? *Cells*, 13.
- DIAO, W., TONG, X., YANG, C., ZHANG, F., BAO, C., CHEN, H., LIU, L., LI, M., YE, F., FAN, Q., WANG, J. & OU-YANG, Z. C. 2019. Behaviors of Glioblastoma Cells in in Vitro Microenvironments. *Sci Rep*, 9, 85.
- DIAZ, R. J., ALI, S., QADIR, M. G., DE LA FUENTE, M. I., IVAN, M. E. & KOMOTAR, R. J. 2017. The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma. *J Neurooncol*, 133, 455-467.
- DOUVILLE, R., LIU, J., ROTHSTEIN, J. & NATH, A. 2011. Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 69, 141-51.
- EASLEY-NEAL, C., FOREMAN, O., SHARMA, N., ZARRIN, A. A. & WEIMER, R. M. 2019. CSF1R Ligands IL-34 and CSF1 Are Differentially Required for Microglia Development and Maintenance in White and Gray Matter Brain Regions. *Front Immunol*, 10, 2199.
- EATZ, T. A., EICHBERG, D. G., LU, V. M., DI, L., KOMOTAR, R. J. & IVAN, M. E. 2022. Intraoperative 5-ALA fluorescence-guided resection of high-grade glioma leads to greater extent of resection with better outcomes: a systematic review. *J Neurooncol*, 156, 233-256.
- ELMORE, M. R., NAJAFI, A. R., KOIKE, M. A., DAGHER, N. N., SPANGENBERG, E. E., RICE, R. A., KITAZAWA, M., MATUSOW, B., NGUYEN, H., WEST, B. L. & GREEN, K. N. 2014. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron*, 82, 380-97.
- ERICES, J. I., BIZAMA, C., NIECHI, I., URIBE, D., ROSALES, A., FABRES, K., NAVARRO-MARTÍNEZ, G., TORRES, Á., SAN MARTÍN, R., ROA, J. C. & QUEZADA-MONRÁS, C. 2023. Glioblastoma Microenvironment and Invasiveness: New Insights and Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci*, 24.
- FAISAL, S. M., COMBA, A., VARELA, M. L., ARGENTO, A. E., BRUMLEY, E., ABEL, C., 2ND, CASTRO, M. G. & LOWENSTEIN, P. R. 2022. The complex interactions between the cellular and non-cellular components of the brain tumor microenvironmental landscape and their therapeutic implications. *Front Oncol*, 12, 1005069.
- FLORES-TORO, J. A., LUO, D., GOPINATH, A., SARKISIAN, M. R., CAMPBELL, J. J., CHARO, I. F., SINGH, R., SCHALL, T. J., DATTA, M., JAIN, R. K., MITCHELL, D. A. & HARRISON, J. K. 2020. CCR2 inhibition reduces tumor myeloid cells and unmasks a checkpoint inhibitor effect to slow progression of resistant murine gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117, 1129-1138.
- FOERSTER, M. 2020. HERV-W Env protein leads to a differentiation blockade in oligodendrial precursor cells via nitrosative stress.
- FU, W., HOU, X., DONG, L. & HOU, W. 2023. Roles of STAT3 in the pathogenesis and treatment of glioblastoma. *Front Cell Dev Biol*, 11, 1098482.
- FUKUMURA, D., KASHIWAGI, S. & JAIN, R. K. 2006. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 6, 521-34.
- GAO, Y., YU, X. F. & CHEN, T. 2021. Human endogenous retroviruses in cancer: Expression, regulation and function. *Oncol Lett*, 21, 121.
- GIARD, D. J., AARONSON, S. A., TODARO, G. J., ARNSTEIN, P., KERSEY, J. H., DOSIK, H. & PARKS, W. P. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51, 1417-23.
- GINHOUX, F., GRETER, M., LEBOEUF, M., NANDI, S., SEE, P., GOKHAN, S., MEHLER, M. F., CONWAY, S. J., NG, L. G., STANLEY, E. R., SAMOKHVALOV, I. M. & MERAD, M. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330, 841-5.
- GINHOUX, F. & PRINZ, M. 2015. Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7, a020537.

- GOMEZ, D. E., ARMANDO, R. G., FARINA, H. G., MENNA, P. L., CERRUDO, C. S., GHIRINGHELLI, P. D. & ALONSO, D. F. 2012. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *Int J Oncol*, 41, 1561-9.
- GOSWAMI, S., GUPTA, A. & SHARMA, S. K. 1998. Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG. *J Neurochem*, 71, 1837-45.
- GRIFFITHS, D. J. 2001. Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol*, 2, Reviews1017.
- GROCHANS, S., CYBULSKA, A. M., SIMIŃSKA, D., KORBECKI, J., KOJDER, K., CHLUBEK, D. & BARANOWSKA-BOSIACKA, I. 2022. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review. *Cancers (Basel)*, 14.
- GRUCHOT, J., LEWEN, I., DIETRICH, M., REICHE, L., SINDI, M., HECKER, C., HERRERO, F., CHARVET, B., WEBER-STADLBAUER, U., HARTUNG, H. P., ALBRECHT, P., PERRON, H., MEYER, U. & KÜRY, P. 2023. Transgenic expression of the HERV-W envelope protein leads to polarized glial cell populations and a neurodegenerative environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 120, e2308187120.
- GRUCHOT, J., REICHE, L., WERNER, L., HERRERO, F., SCHIRA-HEINEN, J., MEYER, U. & KÜRY, P. 2025. Molecular dissection of HERV-W dependent microglial- and astroglial cell polarization. *Microbes Infect*, 27, 105382.
- GSTRAUNTHALER, G. & LINDL, T. 2021. Qualitätskontrolle und Cell Banking. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- GUBIN, M. M. & VESELY, M. D. 2022. Cancer Immunoediting in the Era of Immunoncology. *Clin Cancer Res*, 28, 3917-3928.
- GUTMANN, D. H. & KETTENMANN, H. 2019. Microglia/Brain Macrophages as Central Drivers of Brain Tumor Pathobiology. *Neuron*, 104, 442-449.
- HADDAD, A. F., YOUNG, J. S., AMARA, D., BERGER, M. S., RALEIGH, D. R., AGHI, M. K. & BUTOWSKI, N. A. 2021. Mouse models of glioblastoma for the evaluation of novel therapeutic strategies. *Neurooncol Adv*, 3, vdab100.
- HAHN, W. C. & WEINBERG, R. A. 2002. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*, 347, 1593-603.
- HAMBARDZUMYAN, D., GUTMANN, D. H. & KETTENMANN, H. 2016. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*, 19, 20-7.
- HAMMOND, T. R., DUFORT, C., DISSING-OLESEN, L., GIERA, S., YOUNG, A., WYSOKER, A., WALKER, A. J., GERGITS, F., SEGEL, M., NEMESH, J., MARSH, S. E., SAUNDERS, A., MACOSKO, E., GINHOUX, F., CHEN, J., FRANKLIN, R. J. M., PIAO, X., MCCARROLL, S. A. & STEVENS, B. 2019. Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*, 50, 253-271.e6.
- HAN, S., WANG, C., QIN, X., XIA, J. & WU, A. 2017. LPS alters the immuno-phenotype of glioma and glioma stem-like cells and induces in vivo antitumor immunity via TLR4. *J Exp Clin Cancer Res*, 36, 83.
- HANAHAHAN, D. 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*, 12, 31-46.
- HANAHAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HANAHAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HANISCH, U. K. & KETTENMANN, H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 10, 1387-94.
- HARRIS, C. C. 1996. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and cancer risk assessment. *Environ Health Perspect*, 104 Suppl 3, 435-9.

- HEIMBERGER, A. B., ABOU-GHAZAL, M., REINA-ORTIZ, C., YANG, D. S., SUN, W., QIAO, W., HIRAOKA, N. & FULLER, G. N. 2008. Incidence and prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in human gliomas. *Clin Cancer Res*, 14, 5166-72.
- HERBST, H., SAUTER, M., KÜHLER-OBBARIUS, C., LÖNING, T. & MUELLER-LANTZSCH, N. 1998. Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in germ cell and trophoblastic tumours. *Apmis*, 106, 216-20.
- HERRERA-OROPEZA, G. E., ANGULO-ROJO, C., GÁSTELUM-LÓPEZ, S. A., VARELA-ECHAVARRÍA, A., HERNÁNDEZ-ROSALES, M. & AVIÑA-PADILLA, K. 2021. Glioblastoma multiforme: a multi-omics analysis of driver genes and tumour heterogeneity. *Interface Focus*, 11, 20200072.
- HERTING, C. J., CHEN, Z., MAXIMOV, V., DUFFY, A., SZULZEWSKY, F., SHAYAKHMETOV, D. M. & HAMBARDZUMYAN, D. 2019. Tumour-associated macrophage-derived interleukin-1 mediates glioblastoma-associated cerebral oedema. *Brain*, 142, 3834-3851.
- HIRSCHL, S., SCHANAB, O., SEPPELE, H., WALTENBERGER, A., HUMER, J., WOLFF, K., PEHAMBERGER, H. & MUSTER, T. 2007. Sequence variability of retroviral particles derived from human melanoma cells melanoma-associated retrovirus. *Virus Res*, 123, 211-5.
- HU, J., CAO, J., TOPATANA, W., JUENGPANICH, S., LI, S., ZHANG, B., SHEN, J., CAI, L., CAI, X. & CHEN, M. 2021. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *J Hematol Oncol*, 14, 157.
- HURST, T. P. & MAGIORKINIS, G. 2017. Epigenetic Control of Human Endogenous Retrovirus Expression: Focus on Regulation of Long-Terminal Repeats (LTRs). *Viruses*, 9, 130.
- IDRISS, H. T. & NAISMITH, J. H. 2000. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*, 50, 184-95.
- ISACHESKU, E., BRAICU, C., PIRLOG, R., KOCIJANCIC, A., BUSUIOC, C., PRUTEANU, L. L., PANDEY, D. P. & BERINDAN-NEAGOE, I. 2023. The Role of Non-Coding RNAs in Epigenetic Dysregulation in Glioblastoma Development. *Int J Mol Sci*, 24.
- JANKOWSKA, S., LEWANDOWSKA, M., MASZTALEWICZ, M., SAGAN, L., NOWACKI, P. & URASIŃSKA, E. 2021. Molecular classification of glioblastoma based on immunohistochemical expression of EGFR, PDGFRA, NF1, IDH1, p53 and PTEN proteins. *Pol J Pathol*, 72, 1-10.
- JIANG, Y., CHEN, M., NIE, H. & YUAN, Y. 2019. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. *Hum Vaccin Immunother*, 15, 1111-1122.
- JO, H., LEE, S., KIM, M.-H., PARK, S. & LEE, S.-Y. 2024. Recapitulating Glioma Stem Cell Niches Using 3D Spheroid Models for Glioblastoma Research. *Biosensors*, 14, 539.
- JONES, R. G. & THOMPSON, C. B. 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev*, 23, 537-48.
- JURGA, A. M., PALECZNA, M. & KUTER, K. Z. 2020. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci*, 14, 198.
- KATZOURAKIS, A. & TRISTEM, M. 2005. Phylogeny of human endogenous and exogenous retroviruses. *Retroviruses and primate genome evolution*, 186, 203.
- KELLNER, U., FRAHM, S., MAWRIN, C. & KRAMS, M. 2019. *Kurzlehrbuch Pathologie*, Stuttgart, Thieme.
- KETTENMANN, H., HANISCH, U. K., NODA, M. & VERKHRATSKY, A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 91, 461-553.
- KHAN, F., PANG, L., DUNTERMAN, M., LESNIAK, M. S., HEIMBERGER, A. B. & CHEN, P. 2023. Macrophages and microglia in glioblastoma: heterogeneity, plasticity, and therapy. *J Clin Invest*, 133.
- KIGERL, K. A., DE RIVERO VACCARI, J. P., DIETRICH, W. D., POPOVICH, P. G. & KEANE, R. W. 2014. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp Neurol*, 258, 5-16.

- KIM, R., EMI, M. & TANABE, K. 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121, 1-14.
- KISELEVA, L. N., KARTASHEV, A. V., VARTANYAN, N. L., PINEVICH, A. A. & SAMOILOVICH, M. P. 2016. CHARACTERISTICS OF A172 AND T98G CELL LINES. *Tsitologiya*, 58, 349-55.
- KLEIMAN, A., SENYUTA, N., TRYAKIN, A., SAUTER, M., KARSELADZE, A., TJULANDIN, S., GURTSEVITCH, V. & MUELLER-LANTZSCH, N. 2004. HERV-K(HML-2) GAG/ENV antibodies as indicator for therapy effect in patients with germ cell tumors. *Int J Cancer*, 110, 459-61.
- KOMOHARA, Y., OHNISHI, K., KURATSU, J. & TAKEYA, M. 2008. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol*, 216, 15-24.
- KOVALSKAYA, E., BUZDIN, A., GOGVADZE, E., VINOGRADOVA, T. & SVERDLOV, E. 2006. Functional human endogenous retroviral LTR transcription start sites are located between the R and U5 regions. *Virology*, 346, 373-8.
- KREISL, T. N., KIM, L., MOORE, K., DUIC, P., ROYCE, C., STROUD, I., GARREN, N., MACKEY, M., BUTMAN, J. A., CAMPHAUSEN, K., PARK, J., ALBERT, P. S. & FINE, H. A. 2009. Phase II Trial of Single-Agent Bevacizumab Followed by Bevacizumab Plus Irinotecan at Tumor Progression in Recurrent Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 740-745.
- KREMER, D., GRUCHOT, J., WEYERS, V., OLDEMEIER, L., GOTTLE, P., HEALY, L., HO JANG, J., KANG, T. X. Y., VOLSKO, C., DUTTA, R., TRAPP, B. D., PERRON, H., HARTUNG, H. P. & KURY, P. 2019. pHERV-W envelope protein fuels microglial cell-dependent damage of myelinated axons in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 15216-15225.
- KREMER, D., SCHICHEL, T., FORSTER, M., TZEKOVA, N., BERNARD, C., VAN DER VALK, P., VAN HORSSSEN, J., HARTUNG, H. P., PERRON, H. & KURY, P. 2013. Human endogenous retrovirus type W envelope protein inhibits oligodendroglial precursor cell differentiation. *Ann Neurol*, 74, 721-32.
- KRISHNAMURTHY, J., RABINOVICH, B. A., MI, T., SWITZER, K. C., OLIVARES, S., MAITI, S. N., PLUMMER, J. B., SINGH, H., KUMARESAN, P. R., HULS, H. M., WANG-JOHANNING, F. & COOPER, L. J. 2015. Genetic Engineering of T Cells to Target HERV-K, an Ancient Retrovirus on Melanoma. *Clin Cancer Res*, 21, 3241-51.
- KUDO-SAITO, C., YURA, M., YAMAMOTO, R. & KAWAKAMI, Y. 2014. Induction of immunoregulatory CD271+ cells by metastatic tumor cells that express human endogenous retrovirus H. *Cancer Res*, 74, 1361-70.
- LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., BALDWIN, J., DEVON, K., DEWAR, K., DOYLE, M., FITZHUGH, W., FUNKE, R., GAGE, D., HARRIS, K., HEAFORD, A., HOWLAND, J., KANN, L., LEHOCZKY, J., LEVINE, R., MCEWAN, P., MCKERNAN, K., MELDRIM, J., MESIROV, J. P., MIRANDA, C., MORRIS, W., NAYLOR, J., RAYMOND, C., ROSETTI, M., SANTOS, R., SHERIDAN, A., SOUGNEZ, C., STANGE-THOMANN, N., STOJANOVIC, N., SUBRAMANIAN, A., WYMAN, D., ROGERS, J., SULSTON, J., AINSCOUGH, R., BECK, S., BENTLEY, D., BURTON, J., CLEE, C., CARTER, N., COULSON, A., DEADMAN, R., DELOUKAS, P., DUNHAM, A., DUNHAM, I., DURBIN, R., FRENCH, L., GRAFHAM, D., GREGORY, S., HUBBARD, T., HUMPHRAY, S., HUNT, A., JONES, M., LLOYD, C., MCMURRAY, A., MATTHEWS, L., MERCER, S., MILNE, S., MULLIKIN, J. C., MUNGALL, A., PLUMB, R., ROSS, M., SHOWNKEEN, R., SIMS, S., WATERSTON, R. H., WILSON, R. K., HILLIER, L. W., MCPHERSON, J. D., MARRA, M. A., MARDIS, E. R., FULTON, L. A., CHINWALLA, A. T., PEPIN, K. H., GISH, W. R., CHISSOE, S. L., WENDL, M. C., DELEHAUNTY, K. D., MINER, T. L., DELEHAUNTY, A., KRAMER, J. B., COOK, L. L., FULTON, R. S., JOHNSON, D. L., MINX, P. J., CLIFTON, S. W., HAWKINS, T., BRANSCOMB, E., PREDKI, P., RICHARDSON, P., WENNING, S., SLEZAK, T., DOGGETT, N.,

- CHENG, J.-F., OLSEN, A., LUCAS, S., ELKIN, C., UBERBACHER, E., FRAZIER, M., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
- LANDRY, A. P., BALAS, M., ALLI, S., SPEARS, J. & ZADOR, Z. 2020. Distinct regional ontogeny and activation of tumor associated macrophages in human glioblastoma. *Sci Rep*, 10, 19542.
- LARSSON, L.-I., HOLCK, S. & CHRISTENSEN, I. J. 2007. Prognostic role of syncytin expression in breast cancer. *Human Pathology*, 38, 726-731.
- LAUKKANEN, K., SAARINEN, M., MALLET, F., AATONEN, M., HAU, A. & RANKI, A. 2020. Cutaneous T-Cell Lymphoma (CTCL) Cell Line-Derived Extracellular Vesicles Contain HERV-W-Encoded Fusogenic Syncytin-1. *Journal of Investigative Dermatology*, 140, 1466-1469.e4.
- LAWSON, L. J., PERRY, V. H., DRI, P. & GORDON, S. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39, 151-70.
- LEIBOVITCH, E. C. & JACOBSON, S. 2018. Viruses in chronic progressive neurologic disease. *Mult Scler*, 24, 48-52.
- LEMAÎTRE, C., TSANG, J., BIREAU, C., HEIDMANN, T. & DEWANNIEUX, M. 2017. A human endogenous retrovirus-derived gene that can contribute to oncogenesis by activating the ERK pathway and inducing migration and invasion. *PLoS Pathog*, 13, e1006451.
- LEUNG, S. Y., WONG, M. P., CHUNG, L. P., CHAN, A. S. & YUEN, S. T. 1997. Monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in gliomas. *Acta Neuropathol*, 93, 518-27.
- LEVET, S., CHARVET, B., BERTIN, A., DESCHAUMES, A., PERRON, H. & HOBER, D. 2019. Human Endogenous Retroviruses and Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep*, 19, 141.
- LI, R., LI, G., DENG, L., LIU, Q., DAI, J., SHEN, J. & ZHANG, J. 2010. IL-6 augments the invasiveness of U87MG human glioblastoma multiforme cells via up-regulation of MMP-2 and fascin-1. *Oncol Rep*, 23, 1553-9.
- LI, W. & GRAEBER, M. B. 2012. The molecular profile of microglia under the influence of glioma. *Neuro Oncol*, 14, 958-78.
- LI, W., LEE, M. H., HENDERSON, L., TYAGI, R., BACHANI, M., STEINER, J., CAMPANAC, E., HOFFMAN, D. A., VON GELDERN, G., JOHNSON, K., MARIC, D., MORRIS, H. D., LENTZ, M., PAK, K., MAMMEN, A., OSTROW, L., ROTHSTEIN, J. & NATH, A. 2015. Human endogenous retrovirus-K contributes to motor neuron disease. *Sci Transl Med*, 7, 307ra153.
- LIN, C., WANG, N. & XU, C. 2023. Glioma-associated microglia/macrophages (GAMs) in glioblastoma: Immune function in the tumor microenvironment and implications for immunotherapy. *Front Immunol*, 14, 1123853.
- LIU, L., WU, J., YING, Z., CHEN, B., HAN, A., LIANG, Y., SONG, L., YUAN, J., LI, J. & LI, M. 2010a. Astrocyte elevated gene-1 upregulates matrix metalloproteinase-9 and induces human glioma invasion. *Cancer Res*, 70, 3750-9.
- LIU, Q., LI, G., LI, R., SHEN, J., HE, Q., DENG, L., ZHANG, C. & ZHANG, J. 2010b. IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines. *J Neurooncol*, 100, 165-76.
- LIVAK, K. J. & 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, 402-8.
- LOUIS, D. N., PERRY, A., REIFENBERGER, G., VON DEIMLING, A., FIGARELLA-BRANGER, D., CAVENEE, W. K., OHGAKI, H., WIESTLER, O. D., KLEIHUES, P. & ELLISON, D. W. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 131, 803-20.

- LOUIS, D. N., PERRY, A., WESSELING, P., BRAT, D. J., CREE, I. A., FIGARELLA-BRANGER, D., HAWKINS, C., NG, H. K., PFISTER, S. M., REIFENBERGER, G., SOFFIETTI, R., VON DEIMLING, A. & ELLISON, D. W. 2021. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*, 23, 1231-1251.
- LÖWER, R., LÖWER, J. & KURTH, R. 1996. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 5177-84.
- MALINIEMI, P., VINCENDEAU, M., MAYER, J., FRANK, O., HAHTOLA, S., KARENKO, L., CARLSSON, E., MALLETT, F., SEIFARTH, W., LEIB-MÖSCH, C. & RANKI, A. 2013. Expression of Human Endogenous Retrovirus-W Including Syncytin-1 in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *PLOS ONE*, 8, e76281.
- MAMELI, G., ASTONE, V., ARRU, G., MARCONI, S., LOVATO, L., SERRA, C., SOTGIU, S., BONETTI, B. & DOLEI, A. 2007. Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6. *J Gen Virol*, 88, 264-274.
- MAMELI, G., PODDIGHE, L., MEI, A., ULERI, E., SOTGIU, S., SERRA, C., MANETTI, R. & DOLEI, A. 2012. Expression and Activation by Epstein Barr Virus of Human Endogenous Retroviruses-W in Blood Cells and Astrocytes: Inference for Multiple Sclerosis. *PLOS ONE*, 7, e44991.
- MANGENEY, M., DE PARSEVAL, N., THOMAS, G. & HEIDMANN, T. 2001. The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. *J Gen Virol*, 82, 2515-2518.
- MANINI, I., CAPONNETTO, F., BARTOLINI, A., IUS, T., MARIUZZI, L., DI LORETO, C., BELTRAMI, A. P. & CESSSELLI, D. 2018. Role of Microenvironment in Glioma Invasion: What We Learned from In Vitro Models. *Int J Mol Sci*, 19.
- MARKOVIC, D. S., GLASS, R., SYNOWITZ, M., ROOIJEN, N. & KETTENMANN, H. 2005. Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64, 754-62.
- MATIAS, D., BALCA-SILVA, J., DA GRACA, G. C., WANJIRU, C. M., MACHARIA, L. W., NASCIMENTO, C. P., ROQUE, N. R., COELHO-AGUIAR, J. M., PEREIRA, C. M., DOS SANTOS, M. F., PESSOA, L. S., LIMA, F. R. S., SCHANAIDER, A., FERRER, V. P., TANIA CRISTINA LEITE DE SAMPAIO E, S. & MOURA-NETO, V. 2018. Microglia/Astrocytes-Glioblastoma Crosstalk: Crucial Molecular Mechanisms and Microenvironmental Factors. *Front Cell Neurosci*, 12, 235.
- MAZZOLENI, A., AWUAH, W. A., SANKER, V., BHARADWAJ, H. R., ADERINTO, N., TAN, J. K., HUANG, H. Y. R., POORNASELVAN, J., SHAH, M. H., ATALLAH, O., TAWFIK, A., ELMANZALAWI, M., GHOZLAN, S. H., ABDUL-RAHMAN, T., MOYONDAFOLUWA, J. A., ALEXIOU, A. & PAPADAKIS, M. 2024. Chromosomal instability: a key driver in glioma pathogenesis and progression. *Eur J Med Res*, 29, 451.
- MCCARTHY, K. D. & DE VELLIS, J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*, 85, 890-902.
- MCMAHON, D. J., GLEESON, J. P., O'REILLY, S. & BAMBURY, R. M. 2022. Management of newly diagnosed glioblastoma multiforme: current state of the art and emerging therapeutic approaches. *Med Oncol*, 39, 129.
- MELHEM, J. M., DETSKY, J., LIM-FAT, M. J. & PERRY, J. R. 2022. Updates in IDH-Wildtype Glioblastoma. *Neurotherapeutics*.
- MERENZON, M. A., HINCAPIE ARIAS, E., BHATIA, S., SHAH, A. H., HIGGINS, D. M. O., VILLAVERDE, M., BELGOROSKY, D. & EIJAN, A. M. 2023. Nitric oxide synthase inhibitors as potential therapeutic agents for gliomas: A systematic review. *Nitric Oxide*, 138-139, 10-16.
- MIHARA, M., HASHIZUME, M., YOSHIDA, H., SUZUKI, M. & SHIINA, M. 2012. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, 122, 143-59.

- MILLER, K. D., OSTROM, Q. T., KRUCHKO, C., PATIL, N., TIHAN, T., CIOFFI, G., FUCHS, H. E., WAITE, K. A., JEMAL, A., SIEGEL, R. L. & BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. 2021. Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*, 71, 381-406.
- MONTEMURRO, N. 2020. Glioblastoma Multiforme and Genetic Mutations: The Issue Is Not Over Yet. An Overview of the Current Literature. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg*, 81, 64-70.
- MOSTOFA, A. G., PUNGANURU, S. R., MADALA, H. R., AL-OBAIDE, M. & SRIVENUGOPAL, K. S. 2017. The Process and Regulatory Components of Inflammation in Brain Oncogenesis. *Biomolecules*, 7.
- MÜLLER, M. D., HOLST, P. J. & NIELSEN, K. N. 2022. A Systematic Review of Expression and Immunogenicity of Human Endogenous Retroviral Proteins in Cancer and Discussion of Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*, 23.
- MÜLLER, S., KOHANBASH, G., LIU, S. J., ALVARADO, B., CARRERA, D., BHADURI, A., WATCHMAKER, P. B., YAGNIK, G., DI LULLO, E., MALATESTA, M., AMANKULOR, N. M., KRIEGSTEIN, A. R., LIM, D. A., AGHI, M., OKADA, H. & DIAZ, A. 2017. Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment. *Genome Biology*, 18, 234.
- NAG, S., MANIAS, J. L. & STEWART, D. J. 2009. Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema. *Acta Neuropathol*, 118, 197-217.
- NAKADA, M., OKADA, Y. & YAMASHITA, J. 2003. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Front Biosci*, 8, e261-9.
- NAYAK, D., ROTH, T. L. & MCGAVERN, D. B. 2014. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*, 32, 367-402.
- NDUOM, E. K., WELLER, M. & HEIMBERGER, A. B. 2015. Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma. *Neuro Oncol*, 17 Suppl 7, vii9-vii14.
- NELSON, P. N., CARNEGIE, P. R., MARTIN, J., DAVARI EJTEHADI, H., HOOLEY, P., RODEN, D., ROWLAND-JONES, S., WARREN, P., ASTLEY, J. & MURRAY, P. G. 2003. Demystified. Human endogenous retroviruses. *Mol Pathol*, 56, 11-8.
- NELSON, S. J. & CHA, S. 2003. Imaging glioblastoma multiforme. *Cancer J*, 9, 134-45.
- NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F. & HELMCHEN, F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308, 1314-8.
- OLIVIER, M., HOLLSTEIN, M. & HAINAUT, P. 2010. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a001008.
- ORIHUELA, R., MCPHERSON, C. A. & HARRY, G. J. 2016. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*, 173, 649-65.
- OSTROM, Q. T., PRICE, M., NEFF, C., CIOFFI, G., WAITE, K. A., KRUCHKO, C. & BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. 2022. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015-2019. *Neuro Oncol*, 24, v1-v95.
- PAOLICELLI, R. C., BOLASCO, G., PAGANI, F., MAGGI, L., SCIANNI, M., PANZANELLI, P., GIUSTETTO, M., FERREIRA, T. A., GUIDUCCI, E., DUMAS, L., RAGOZZINO, D. & GROSS, C. T. 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333, 1456-8.
- PAOLICELLI, R. C., SIERRA, A., STEVENS, B., TREMBLAY, M. E., AGUZZI, A., AJAMI, B., AMIT, I., AUDINAT, E., BECHMANN, I., BENNETT, M., BENNETT, F., BESSIS, A., BIBER, K., BILBO, S., BLURTON-JONES, M., BODDEKE, E., BRITES, D., BRÔNE, B., BROWN, G. C., BUTOVSKY, O., CARSON, M. J., CASTELLANO, B., COLONNA, M., COWLEY, S. A., CUNNINGHAM, C., DAVALOS, D., DE JAGER, P. L., DE STROOPER, B., DENES, A., EGGEN, B. J. L., EYO, U., GALEA, E., GAREL, S., GINHOUX, F., GLASS, C. K., GOKCE, O., GOMEZ-NICOLA, D., GONZÁLEZ, B., GORDON, S., GRAEBER, M. B., GREENHALGH, A. D., GRESSENS, P., GRETER, M., GUTMANN, D. H., HAASS, C., HENEKA, M. T.,

- HEPPNER, F. L., HONG, S., HUME, D. A., JUNG, S., KETTENMANN, H., KIPNIS, J., KOYAMA, R., LEMKE, G., LYNCH, M., MAJEWSKA, A., MALCANGIO, M., MALM, T., MANCUSO, R., MASUDA, T., MATTEOLI, M., MCCOLL, B. W., MIRON, V. E., MOLOFSKY, A. V., MONJE, M., MRACSKO, E., NADJAR, A., NEHER, J. J., NENISKYTE, U., NEUMANN, H., NODA, M., PENG, B., PERI, F., PERRY, V. H., POPOVICH, P. G., PRIDANS, C., PRILLER, J., PRINZ, M., RAGOZZINO, D., RANSOHOFF, R. M., SALTER, M. W., SCHAEFER, A., SCHAFER, D. P., SCHWARTZ, M., SIMONS, M., SMITH, C. J., STREIT, W. J., TAY, T. L., TSAI, L. H., VERKHRATSKY, A., VON BERNHARDI, R., WAKE, H., WITTAMER, V., WOLF, S. A., WU, L. J. & WYSS-CORAY, T. 2022. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, 110, 3458-3483.
- PARK, J. H. & LEE, H. K. 2022. Current Understanding of Hypoxia in Glioblastoma Multiforme and Its Response to Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 14.
- PAULUS, W. 2002. Tumoren. In: PEIFFER, J., SCHRÖDER, J. M. & PAULUS, W. (eds.) *Neuropathologie: Morphologische Diagnostik der Krankheiten des Nervensystems und der Skelettmuskulatur*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- PEARSON, J. R. D., CUZZUBBO, S., MCARTHUR, S., DURRANT, L. G., ADHIKAREE, J., TINSLEY, C. J., POCKLEY, A. G. & MCARDLE, S. E. B. 2020. Immune Escape in Glioblastoma Multiforme and the Adaptation of Immunotherapies for Treatment. *Front Immunol*, 11, 582106.
- PERRON, H., GENY, C., LAURENT, A., MOURIQUAND, C., PELLAT, J., PERRET, J. & SEIGNEURIN, J. M. 1989. Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Res Virol*, 140, 551-61.
- PERRON, H., JOUVIN-MARCHE, E., MICHEL, M., OUNANIAN-PARAZ, A., CAMELO, S., DUMON, A., JOLIVET-REYNAUD, C., MARCEL, F., SOUILLET, Y., BOREL, E., GEBUHRER, L., SANTORO, L., MARCEL, S., SEIGNEURIN, J. M., MARCHE, P. N. & LAFON, M. 2001. Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology*, 287, 321-32.
- PERRON, H., LALANDE, B., GRATACAP, B., LAURENT, A., GENOULAZ, O., GENY, C., MALLARET, M., SCHULLER, E., STOEBNER, P. & SEIGNEURIN, J. M. 1991. Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet*, 337, 862-3.
- PERRON, H. & LANG, A. 2010. The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. *Clin Rev Allergy Immunol*, 39, 51-61.
- PERRON, H., LAZARINI, F., RUPRECHT, K., PÉCHOUX-LONGIN, C., SEILHEAN, D., SAZDOVITCH, V., CRÉANGE, A., BATTAIL-POIROT, N., SIBAÏ, G., SANTORO, L., JOLIVET, M., DARLIX, J. L., RIECKMANN, P., ARZBERGER, T., HAUW, J. J. & LASSMANN, H. 2005. Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. *J Neurovirol*, 11, 23-33.
- PETRIZZO, A., RAGONE, C., CAVALLUZZO, B., MAURIELLO, A., MANOLIO, C., TAGLIAMONTE, M. & BUONAGURO, L. 2021. Human Endogenous Retrovirus Reactivation: Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 13.
- PIRES-AFONSO, Y., NICLOU, S. P. & MICHELUCCI, A. 2020. Revealing and Harnessing Tumour-Associated Microglia/Macrophage Heterogeneity in Glioblastoma. *Int J Mol Sci*, 21.
- PLAACK, B. O. 2025. *The envelope protein of the human endogenous retrovirus type W (HERV-W ENV) differentially modulates the glioblastoma microenvironment*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- POPE, W. B., SAYRE, J., PERLINA, A., VILLABLANCA, J. P., MISCHER, P. S. & CLOUGHESY, T. F. 2005. MR imaging correlates of survival in patients with high-grade gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol*, 26, 2466-74.
- PRESS, R. H., SHAFER, S. L., JIANG, R., BUCHWALD, Z. S., ABUGIDEIRI, M., TIAN, S., MORGAN, T. M., BEHERA, M., SENGUPTA, S. & VOLOSCHIN, A. D. 2020.

- Optimal timing of chemoradiotherapy after surgical resection of glioblastoma: stratification by validated prognostic classification. *Cancer*, 126, 3255-3264.
- PRICE, M., BALLARD, C. A. P., BENEDETTI, J. R., KRUCHKO, C., BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. & OSTROM, Q. T. 2025. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2018-2022. *Neuro Oncol*, 27, iv1-iv66.
- PYONTECK, S. M., AKKARI, L., SCHUHMACHER, A. J., BOWMAN, R. L., SEVENICH, L., QUAIL, D. F., OLSON, O. C., QUICK, M. L., HUSE, J. T., TEIJEIRO, V., SETTY, M., LESLIE, C. S., OEI, Y., PEDRAZA, A., ZHANG, J., BRENNAN, C. W., SUTTON, J. C., HOLLAND, E. C., DANIEL, D. & JOYCE, J. A. 2013. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med*, 19, 1264-72.
- QUAIL, D. F., BOWMAN, R. L., AKKARI, L., QUICK, M. L., SCHUHMACHER, A. J., HUSE, J. T., HOLLAND, E. C., SUTTON, J. C. & JOYCE, J. A. 2016. The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas. *Science*, 352, aad3018.
- QUAIL, D. F. & JOYCE, J. A. 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19, 1423-1437.
- QUAIL, D. F. & JOYCE, J. A. 2017. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell*, 31, 326-341.
- RAEESZADEH-SARMAZDEH, M., DO, L. D. & HRITZ, B. G. 2020. Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics. *Cells*, 9.
- RANSOHOFF, R. M. 2016. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci*, 19, 987-91.
- RAO, J. S. 2003. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer*, 3, 489-501.
- RASSOW J, N. R., HAUSER K 2022. *Duale Reihe Biochemie*, Thieme.
- RAZAVI, S. M., LEE, K. E., JIN, B. E., AUJLA, P. S., GHOLAMIN, S. & LI, G. 2016. Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Front Surg*, 3, 11.
- REBOLLO, R., ROMANISH, M. T. & MAGER, D. L. 2012. Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes. *Annu Rev Genet*, 46, 21-42.
- REICHE, L., PLAACK, B., LEHMKUHL, M., WEYERS, V., GRUCHOT, J., PICARD, D., PERRON, H., REMKE, M., KNOBBE-THOMSEN, C., REIFENBERGER, G., KÜRY, P. & KREMER, D. 2024. HERV-W envelope protein is present in microglial cells of the human glioma tumor microenvironment and differentially modulates neoplastic cell behavior. *Microbes and Infection*, 105460.
- REYNIER, F., VERJAT, T., TUREL, F., IMBERT, P. E., MAROTTE, H., MOUGIN, B. & MIOSSEC, P. 2009. Increase in human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) viral load in active rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol*, 70, 295-9.
- ROLLAND, A., JOUVIN-MARCHE, E., SARESELLA, M., FERRANTE, P., CAVARETTA, R., CRÉANGE, A., MARCHE, P. & PERRON, H. 2005. Correlation between disease severity and in vitro cytokine production mediated by MSR (multiple sclerosis associated retroviral element) envelope protein in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 160, 195-203.
- ROLLAND, A., JOUVIN-MARCHE, E., VIRET, C., FAURE, M., PERRON, H. & MARCHE, P. N. 2006. The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J Immunol*, 176, 7636-44.
- RONCKERS, C., SPIX, C., TRÜBENBACH, C., KATALINIC, A., CHRIST, M., CICERO, A., FOLKERTS, J., HANSMANN, J., KRANZHÖFER, K. & KUNZ, B. 2023. Krebs in Deutschland für 2019/2020.
- ROULOIS, D., LOO YAU, H., SINGHANIA, R., WANG, Y., DANESH, A., SHEN, S. Y., HAN, H., LIANG, G., JONES, P. A., PUGH, T. J., O'BRIEN, C. & DE CARVALHO, D. D. 2015. DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell*, 162, 961-73.

- ROY, L. O., POIRIER, M. B. & FORTIN, D. 2015. Transforming growth factor-beta and its implication in the malignancy of gliomas. *Target Oncol*, 10, 1-14.
- RUPRECHT, K., OBOJES, K., WENGEL, V., GRONEN, F., KIM, K. S., PERRON, H., SCHNEIDER-SCHAULIES, J. & RIECKMANN, P. 2006. Regulation of human endogenous retrovirus W protein expression by herpes simplex virus type 1: implications for multiple sclerosis. *J Neurovirol*, 12, 65-71.
- RYCAJ, K., PLUMMER, J. B., YIN, B., LI, M., GARZA, J., RADVANYI, L., RAMONDETTA, L. M., LIN, K., JOHANNING, G. L., TANG, D. G. & WANG-JOHANNING, F. 2015. Cytotoxicity of human endogenous retrovirus K-specific T cells toward autologous ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*, 21, 471-83.
- RIO-HORTEGA, P. 1932. Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System. *Can Med Assoc J*.
- SAHU, S., SINGH, B. & KUMAR RAI, A. 2022. Human endogenous retrovirus regulates the initiation and progression of cancers (Review). *Mol Clin Oncol*, 17, 143.
- SAINI, S. K., ØRSKOV, A. D., BJERREGAARD, A. M., UNNIKRIISHNAN, A., HOLMBERG-THYDÉN, S., BORCH, A., JENSEN, K. V., ANANDE, G., BENTZEN, A. K., MARQUARD, A. M., TAMHANE, T., TREPPENDAHL, M. B., GANG, A. O., DUFVA, I. H., SZALLASI, Z., TERNETTE, N., PEDERSEN, A. G., EKLUND, A. C., PIMANDA, J., GRØNBÆK, K. & HADRUP, S. R. 2020. Human endogenous retroviruses form a reservoir of T cell targets in hematological cancers. *Nat Commun*, 11, 5660.
- SALAVATIHA, Z., SOLEIMANI-JELODAR, R. & JALILVAND, S. 2020. The role of endogenous retroviruses-K in human cancer. *Rev Med Virol*, 30, 1-13.
- SÁNCHEZ, O. F., RODRÍGUEZ, A. V., VELASCO-ESPAÑA, J. M., MURILLO, L. C., SUTACHAN, J. J. & ALBARRACIN, S. L. 2020. Role of Connexins 30, 36, and 43 in Brain Tumors, Neurodegenerative Diseases, and Neuroprotection. *Cells*, 9.
- SAVAGE, J. C., CARRIER, M. & TREMBLAY, M. 2019. Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease. *Methods Mol Biol*, 2034, 13-26.
- SCHAFF, L. R. & MELLINGHOFF, I. K. 2023. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. *Jama*, 329, 574-587.
- SCHETTERS, S. T. T., GOMEZ-NICOLA, D., GARCIA-VALLEJO, J. J. & VAN KOOYK, Y. 2017. Neuroinflammation: Microglia and T Cells Get Ready to Tango. *Front Immunol*, 8, 1905.
- SENFT, C., BINK, A., FRANZ, K., VATTER, H., GASSER, T. & SEIFERT, V. 2011. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol*, 12, 997-1003.
- SHAH, A. H., RIVAS, S. R., DOUCET-O'HARE, T. T., GOVINDARAJAN, V., DEMARINO, C., WANG, T., AMPIE, L., ZHANG, Y., BANASAVADI-SIDDEGOWDA, Y. K., WALBRIDGE, S., MARIC, D., GARCIA-MONTOJO, M., SUTER, R. K., LEE, M. H., ZAGHLOUL, K. A., STEINER, J., ELKAHLOUN, A. G., CHANDAR, J., SEETHARAM, D., DESGRAVES, J., LI, W., JOHNSON, K., IVAN, M. E., KOMOTAR, R. J., GILBERT, M. R., HEISS, J. D. & NATH, A. 2023. Human endogenous retrovirus K contributes to a stem cell niche in glioblastoma. *J Clin Invest*, 133.
- SHARMA, P., AAROE, A., LIANG, J. & PUDUVALLI, V. K. 2023. Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts. *Neurooncol Adv*, 5, vdad009.
- SIZOO, E. M., BRAAM, L., POSTMA, T. J., PASMAN, H. R., HEIMANS, J. J., KLEIN, M., REIJNEVELD, J. C. & TAPHOORN, M. J. 2010. Symptoms and problems in the end-of-life phase of high-grade glioma patients. *Neuro Oncol*, 12, 1162-6.
- SMITH, A. M. & DRAGUNOW, M. 2014. The human side of microglia. *Trends Neurosci*, 37, 125-35.
- SMITH, C. C., SELITSKY, S. R., CHAI, S., ARMISTEAD, P. M., VINCENT, B. G. & SERODY, J. S. 2019. Alternative tumour-specific antigens. *Nat Rev Cancer*, 19, 465-478.

- SONABEND, A. M., ROLLE, C. E. & LESNIAK, M. S. 2008. The role of regulatory T cells in malignant glioma. *Anticancer Res*, 28, 1143-50.
- SOTGIU, S., SERRA, C., MAMELI, G., PUGLIATTI, M., ROSATI, G., ARRU, G. & DOLEI, A. 2002. Multiple sclerosis-associated retrovirus and MS prognosis: an observational study. *Neurology*, 59, 1071-3.
- SOTTORIVA, A., SPITERI, I., PICCIRILLO, S. G., TOULOUIMIS, A., COLLINS, V. P., MARIONI, J. C., CURTIS, C., WATTS, C. & TAVARÉ, S. 2013. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 4009-14.
- ŞOVREA, A. S., BOŞCA, B., MELINCOVICI, C. S., CONSTANTIN, A. M., CRINTEA, A., MĂRGINEAN, M., DRONCA, E., JIANU, M. E., SUFLEŢEL, R., GONCIAR, D., BUNGĂRDEAN, M. & CRIVII, C. B. 2022. Multiple Faces of the Glioblastoma Microenvironment. *Int J Mol Sci*, 23.
- STICHEL, D., EBRAHIMI, A., REUSS, D., SCHRIMPF, D., ONO, T., SHIRAHATA, M., REIFENBERGER, G., WELLER, M., HANGGI, D., WICK, W., HEROLD-MENDE, C., WESTPHAL, M., BRANDNER, S., PFISTER, S. M., CAPPER, D., SAHM, F. & VON DEIMLING, A. 2018. Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma. *Acta Neuropathol*, 136, 793-803.
- STUMMER, W., PICHLMEIER, U., MEINEL, T., WIESTLER, O. D., ZANELLA, F. & REULEN, H. J. 2006. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*, 7, 392-401.
- STUPP, R., HEGI, M. E., MASON, W. P., VAN DEN BENT, M. J., TAPHOORN, M. J., JANZER, R. C., LUDWIN, S. K., ALLGEIER, A., FISHER, B., BELANGER, K., HAU, P., BRANDES, A. A., GIJTENBEEK, J., MAROSI, C., VECHT, C. J., MOKHTARI, K., WESSELING, P., VILLA, S., EISENHAEUER, E., GORLIA, T., WELLER, M., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J. G. & MIRIMANOFF, R. O. 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*, 10, 459-66.
- STUPP, R., MASON, W. P., VAN DEN BENT, M. J., WELLER, M., FISHER, B., TAPHOORN, M. J., BELANGER, K., BRANDES, A. A., MAROSI, C., BOGDAN, U., CURSCHMANN, J., JANZER, R. C., LUDWIN, S. K., GORLIA, T., ALLGEIER, A., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J. G., EISENHAEUER, E. & MIRIMANOFF, R. O. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, 987-96.
- STUPP, R., TAILLIBERT, S., KANNER, A., READ, W., STEINBERG, D., LHERMITTE, B., TOMS, S., IDBAIH, A., AHLUWALIA, M. S., FINK, K., DI MECO, F., LIEBERMAN, F., ZHU, J. J., STRAGLIOTTO, G., TRAN, D., BREM, S., HOTTINGER, A., KIRSON, E. D., LAVY-SHAHAF, G., WEINBERG, U., KIM, C. Y., PAK, S. H., NICHOLAS, G., BRUNA, J., HIRTE, H., WELLER, M., PALTI, Y., HEGI, M. E. & RAM, Z. 2017. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 318, 2306-2316.
- SUN, Y., OUYANG, D.-Y., PANG, W., TU, Y.-Q., LI, Y.-Y., SHEN, X.-M., TAM, S.-C., YANG, H.-Y. & ZHENG, Y.-T. 2010. Expression of syncytin in leukemia and lymphoma cells. *Leukemia Research*, 34, 1195-1202.
- TAN, A. C., ASHLEY, D. M., LÓPEZ, G. Y., MALINZAK, M., FRIEDMAN, H. S. & KHASRAW, M. 2020. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin*, 70, 299-312.
- TANABE, K., MATSUSHIMA-NISHIWAKI, R., YAMAGUCHI, S., IIDA, H., DOHI, S. & KOZAWA, O. 2010. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *J Neuroinflammation*, 7, 16.

- TANAKA, N. & SAKAMOTO, T. 2023. MT1-MMP as a Key Regulator of Metastasis. *Cells*, 12.
- TAO, J. C., YU, D., SHAO, W., ZHOU, D. R., WANG, Y., HOU, S. Q., DENG, K. & LIN, N. 2023. Interactions between microglia and glioma in tumor microenvironment. *Front Oncol*, 13, 1236268.
- TCGA 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455, 1061-8.
- TINI, P., YAVOROSKA, M., MAZZEI, M. A., MIRACCO, C., PIRTOLI, L., TOMACIELLO, M., MARAMPON, F. & MINNITI, G. 2023. Low expression of Ki-67/MIB-1 labeling index in IDH wild type glioblastoma predicts prolonged survival independently by MGMT methylation status. *J Neurooncol*, 163, 339-344.
- TÖNJES, R. R., LÖWER, R., BOLLER, K., DENNER, J., HASENMAIER, B., KIRSCH, H., KÖNIG, H., KORBMACHER, C., LIMBACH, C., LUGERT, R., PHELPS, R. C., SCHERER, J., THELEN, K., LÖWER, J. & KURTH, R. 1996. HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 13 Suppl 1, S261-7.
- ULASOV, I., SINGH, V., LAEVSKAYA, A., TIMASHEV, P. & KHARWAR, R. K. 2023. Inflammatory Mediators and GBM Malignancy: Current Scenario and Future Prospective. *Discov Med*, 35, 458-475.
- VAKLAVAS, C., BLUME, S. W. & GRIZZLE, W. E. 2017. Translational Dysregulation in Cancer: Molecular Insights and Potential Clinical Applications in Biomarker Development. *Front Oncol*, 7, 158.
- VERDUGO, E., PUERTO, I. & MEDINA, M. 2022. An update on the molecular biology of glioblastoma, with clinical implications and progress in its treatment. *Cancer Commun (Lond)*.
- VERHAAK, R. G., HOADLEY, K. A., PURDOM, E., WANG, V., QI, Y., WILKERSON, M. D., MILLER, C. R., DING, L., GOLUB, T., MESIROV, J. P., ALEXE, G., LAWRENCE, M., O'KELLY, M., TAMAYO, P., WEIR, B. A., GABRIEL, S., WINCKLER, W., GUPTA, S., JAKKULA, L., FEILER, H. S., HODGSON, J. G., JAMES, C. D., SARKARIA, J. N., BRENNAN, C., KAHN, A., SPELLMAN, P. T., WILSON, R. K., SPEED, T. P., GRAY, J. W., MEYERSON, M., GETZ, G., PEROU, C. M. & HAYES, D. N. 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17, 98-110.
- VESELY, M. D., KERSHAW, M. H., SCHREIBER, R. D. & SMYTH, M. J. 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*, 29, 235-71.
- VIENNE-JUMEAU, A., TAFANI, C. & RICARD, D. 2019. Environmental risk factors of primary brain tumors: A review. *Revue Neurologique*, 175, 664-678.
- WAGENER, C. M., OLIVER 2022. *Molekulare Onkologie Entstehung, Progression und Therapie von Krebs*, Thieme.
- WAKE, H., MOORHOUSE, A. J., MIYAMOTO, A. & NABEKURA, J. 2013. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends in neurosciences*, 36, 209-217.
- WALLACE, T. A., DOWNEY, R. F., SEUFERT, C. J., SCHETTER, A., DORSEY, T. H., JOHNSON, C. A., GOLDMAN, R., LOFFREDO, C. A., YAN, P., SULLIVAN, F. J., GILES, F. J., WANG-JOHANNING, F., AMBS, S. & GLYNN, S. A. 2014. Elevated HERV-K mRNA expression in PBMC is associated with a prostate cancer diagnosis particularly in older men and smokers. *Carcinogenesis*, 35, 2074-2083.
- WANG-JOHANNING, F., LI, M., ESTEVA, F. J., HESS, K. R., YIN, B., RYCAJ, K., PLUMMER, J. B., GARZA, J. G., AMBS, S. & JOHANNING, G. L. 2014. Human endogenous retrovirus type K antibodies and mRNA as serum biomarkers of early-stage breast cancer. *Int J Cancer*, 134, 587-95.
- WANG, H., LATHIA, J. D., WU, Q., WANG, J., LI, Z., HEDDLESTON, J. M., EYLER, C. E., ELDERBROOM, J., GALLAGHER, J., SCHUSCHU, J., MACSWORDS, J., CAO, Y.,

- MCLENDON, R. E., WANG, X. F., HJELMELAND, A. B. & RICH, J. N. 2009. Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem Cells*, 27, 2393-404.
- WANG, Q., HU, B., HU, X., KIM, H., SQUATRITO, M., SCARPACE, L., DECARVALHO, A. C., LYU, S., LI, P., LI, Y., BARTHEL, F., CHO, H. J., LIN, Y. H., SATANI, N., MARTINEZ-LEDESMA, E., ZHENG, S., CHANG, E., SAUVÉ, C. G., OLAR, A., LAN, Z. D., FINOCCHIARO, G., PHILLIPS, J. J., BERGER, M. S., GABRUSIEWICZ, K. R., WANG, G., ESKILSSON, E., HU, J., MIKKELSEN, T., DEPINHO, R. A., MULLER, F., HEIMBERGER, A. B., SULMAN, E. P., NAM, D. H. & VERHAAK, R. G. W. 2017. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*, 32, 42-56.e6.
- WANG, S. C., HONG, J. H., HSUEH, C. & CHIANG, C. S. 2012. Tumor-secreted SDF-1 promotes glioma invasiveness and TAM tropism toward hypoxia in a murine astrocytoma model. *Lab Invest*, 92, 151-62.
- WANG, X., SUN, Y., ZHANG, D. Y., MING, G. L. & SONG, H. 2023. Glioblastoma modeling with 3D organoids: progress and challenges. *Oxf Open Neurosci*, 2, kvad008.
- WARBURG, O. H. 1930. The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem. London, UK: Arnold Constable.
- WATKINS, S., ROBEL, S., KIMBROUGH, I. F., ROBERT, S. M., ELLIS-DAVIES, G. & SONTHEIMER, H. 2014. Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. *Nat Commun*, 5, 4196.
- WEI, J., WU, A., KONG, L. Y., WANG, Y., FULLER, G., FOKT, I., MELILLO, G., PRIEBE, W. & HEIMBERGER, A. B. 2011. Hypoxia potentiates glioma-mediated immunosuppression. *PLoS One*, 6, e16195.
- WEISKIRCHEN, S., SCHRÖDER, S. K., BUHL, E. M. & WEISKIRCHEN, R. 2023. A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems. *Cells*, 12.
- WELLER, M., KNOBBE-THOMSEN, C. B., LE RHUN, E. & REIFENBERGER, G. 2022. Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems 2021. *Der Onkologe*, 28, 155-163.
- WELLER, M., VAN DEN BENT, M., PREUSSER, M., LE RHUN, E., TONN, J. C., MINNITI, G., BENDSZUS, M., BALANA, C., CHINOT, O., DIRVEN, L., FRENCH, P., HEGI, M. E., JAKOLA, A. S., PLATTEN, M., ROTH, P., RUDÀ, R., SHORT, S., SMITS, M., TAPHOORN, M. J. B., VON DEIMLING, A., WESTPHAL, M., SOFFIETTI, R., REIFENBERGER, G. & WICK, W. 2021. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18, 170-186.
- WEN, P. Y., WELLER, M., LEE, E. Q., ALEXANDER, B. M., BARNHOLTZ-SLOAN, J. S., BARTHEL, F. P., BATCHELOR, T. T., BINDRA, R. S., CHANG, S. M., CHIOCCA, E. A., CLOUGHESY, T. F., DEGROOT, J. F., GALANIS, E., GILBERT, M. R., HEGI, M. E., HORBINSKI, C., HUANG, R. Y., LASSMAN, A. B., LE RHUN, E., LIM, M., MEHTA, M. P., MELLINGHOFF, I. K., MINNITI, G., NATHANSON, D., PLATTEN, M., PREUSSER, M., ROTH, P., SANSON, M., SCHIFF, D., SHORT, S. C., TAPHOORN, M. J. B., TONN, J. C., TSANG, J., VERHAAK, R. G. W., VON DEIMLING, A., WICK, W., ZADEH, G., REARDON, D. A., ALDAPE, K. D. & VAN DEN BENT, M. J. 2020. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro Oncol*, 22, 1073-1113.
- WEST, A. J., TSUI, V., STYLLI, S. S., NGUYEN, H. P. T., MOROKOFF, A. P., KAYE, A. H. & LUWOR, R. B. 2018. The role of interleukin-6-STAT3 signalling in glioblastoma. *Oncol Lett*, 16, 4095-4104.
- WHITE, J., WHITE, M. P. J., WICKREMESEKERA, A., PENG, L. & GRAY, C. 2024. The tumour microenvironment, treatment resistance and recurrence in glioblastoma. *J Transl Med*, 22, 540.

- WICK, W., MBENDSZUS, GOLDBRUNNER, R., GROSU, A., HATTINGEN, E., HAU, P., HERRLINGER, U., T. KESSLER, M. PLATTEN, TOBIAS PUKROP, G. REIFENBERGER, F. SAHM, S. SCHAAF, SCHLEGEL, U., J. STEINBACH, G. STOCKHAMMER, STUMMER, W., G. TABATABAI, J. C. TONN & WELLER, M. 2021. Gliome, S2k-Leitlinie.
- WU, C. X., LIN, G. S., LIN, Z. X., ZHANG, J. D., LIU, S. Y. & ZHOU, C. F. 2015. Peritumoral edema shown by MRI predicts poor clinical outcome in glioblastoma. *World J Surg Oncol*, 13, 97.
- WÜRTH, R., BAJETTO, A., HARRISON, J. K., BARBIERI, F. & FLORIO, T. 2014. CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Front Cell Neurosci*, 8, 144.
- XU, M., WANG, Y., XIA, R., WEI, Y. & WEI, X. 2021. Role of the CCL2-CCR2 signalling axis in cancer: Mechanisms and therapeutic targeting. *Cell Prolif*, 54, e13115.
- YE, X. Z., XU, S. L., XIN, Y. H., YU, S. C., PING, Y. F., CHEN, L., XIAO, H. L., WANG, B., YI, L., WANG, Q. L., JIANG, X. F., YANG, L., ZHANG, P., QIAN, C., CUI, Y. H., ZHANG, X. & BIAN, X. W. 2012. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF-beta1 signaling pathway. *J Immunol*, 189, 444-53.
- YEUNG, Y. T., MCDONALD, K. L., GREWAL, T. & MUNOZ, L. 2013. Interleukins in glioblastoma pathophysiology: implications for therapy. *Br J Pharmacol*, 168, 591-606.
- YOUNG, G. S. 2007. Advanced MRI of adult brain tumors. *Neurol Clin*, 25, 947-73, viii.
- YU, P., LÜBBEN, W., SLOMKA, H., GEBLER, J., KONERT, M., CAI, C., NEUBRANDT, L., PRAZERES DA COSTA, O., PAUL, S., DEHNERT, S., DÖHNE, K., THANISCH, M., STORSBERG, S., WIEGAND, L., KAUFMANN, A., NAIN, M., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., BETTIO, S., SCHNIERLE, B., KOLESNIKOVA, L., BECKER, S., SCHNARE, M. & BAUER, S. 2012. Nucleic acid-sensing Toll-like receptors are essential for the control of endogenous retrovirus viremia and ERV-induced tumors. *Immunity*, 37, 867-79.
- ZAGZAG, D., ESENCAY, M., MENDEZ, O., YEE, H., SMIRNOVA, I., HUANG, Y., CHIRIBOGA, L., LUKYANOV, E., LIU, M. & NEWCOMB, E. W. 2008. Hypoxia- and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer's structures. *Am J Pathol*, 173, 545-60.
- ZHANG, J., SARKAR, S., CUA, R., ZHOU, Y., HADER, W. & YONG, V. W. 2012. A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis. *Carcinogenesis*, 33, 312-9.
- ZHANG, J. F., WANG, P., YAN, Y. J., LI, Y., GUAN, M. W., YU, J. J. & WANG, X. D. 2017. IL-33 enhances glioma cell migration and invasion by upregulation of MMP2 and MMP9 via the ST2-NF-kB pathway. *Oncol Rep*, 38, 2033-2042.
- ZHANG, M., LIANG, J. Q. & ZHENG, S. 2019. Expressional activation and functional roles of human endogenous retroviruses in cancers. *Rev Med Virol*, 29, e2025.
- ZHOU, F., LI, M., WEI, Y., LIN, K., LU, Y., SHEN, J., JOHANNING, G. L. & WANG-JOHANNING, F. 2016. Activation of HERV-K Env protein is essential for tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells. *Oncotarget*, 7, 84093-84117.
- ZHU, X., SHI, G., LU, J., QIAN, X. & WANG, D. 2022. Potential regulatory mechanism of TNF- α /TNFR1/ANXA1 in glioma cells and its role in glioma cell proliferation. *Open Life Sci*, 17, 208-220.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit in vielfältiger Weise unterstützt und begleitet haben.

Ich danke Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth für die Zeit und Übernahme der Begutachtung meiner Dissertationsarbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei PD Dr. med. David Kremer für die Anregung zu diesem Projekt und die Möglichkeit, dieses spannende und bedeutsame Forschungsthema zu bearbeiten, bedanken.

Ein weiterer Dank geht an Univ.-Prof. Dr. phil. Patrick Küry und die gesamte Arbeitsgruppe Neuroregeneration. Danke, dass ich Teil des Teams sein durfte und ihr mich stets mit wertvollen Tipps und Tricks im Labor unterstützt habt. Vor allem danke ich Dr. rer. nat. Laura Reiche für ihre wissenschaftliche Expertise und Hilfsbereitschaft bei allen Herausforderungen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Vivien Weyers, die mich vom ersten Tag an mit großem Engagement und fachlicher Kompetenz auf dem Weg zu dieser Dissertation betreut hat. Liebe Vivien, für Deine beständige Unterstützung, Geduld und Deine Motivation über viele Jahre hinweg bin ich sehr dankbar.

Abschließend möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Ulrike und Heinz-Peter, sowie meiner Schwester Pia und meinem Freund Kilian für ihr Verständnis, ihren Zuspruch und Rückhalt während der gesamten Zeit der Promotion danken. Ihr habt immer an mich geglaubt und mich in allen Höhen und Tiefen unterstützt.