

**Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
Tumorbiologisches Labor
Klinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München**
Direktor: Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn

**Effekte einer anti-VEGF-A-Therapie (Bevacizumab) auf humane
cerebrale Endothelzellen sowie Tumor- und Endothelzellen in
humanen Gliomen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jun Thorsteinsdottir
aus München
2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Christiane Bruns
Priv. Doz . Dr. med. Ulrich Schüller

Betreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Stefan Grau

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Datum der mündlichen Prüfung: 08.12.2011

| | | |
|-------|--|----|
| 6.1.3 | Nachweis in Glioblastomgewebe durch Western Blot..... | 37 |
| 6.1.4 | Immunzytofluoreszenz auf isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom | 38 |
| 6.2 | Einfluss von Bevacizumab auf Tumor- und Endothelzellen..... | 39 |
| 6.2.1 | Einfluss von Bevacizumab auf die immunzytochemische Expression von VEGFR-2 und -3 auf Tumor- und Endothelzellen..... | 39 |
| 6.2.2 | Einfluss von Bevacizumab auf die Rezeptorexpression von VEGFR-2 und -3 im Western Blot..... | 40 |
| 6.2.3 | Einfluss von Bevacizumab auf das Proliferationsverhalten von Tumor- und Endothelzellen..... | 41 |
| 6.3 | Einfluss der einzelnen Wachstumsfaktoren auf das Proliferationsverhalten von Tumor- und Endothelzellen..... | 42 |
| 6.3.1 | Einfluss einer Langzeit-Bevacizumab-Inkubation auf das Proliferationsverhalten..... | 42 |
| 6.3.2 | Einfluss der Wachstumsfaktoren auf das Proliferationsverhalten nach 14- tägiger Bevacizumab Behandlung..... | 44 |
| 6.4 | Einfluss von Bevacizumab auf die endogene Produktion von Wachstumsfaktoren der Tumor- und Endothelzellen nach zehntägiger Inkubation mit Bevacizumab..... | 46 |
| 6.5 | Einfluss von Bevacizumab auf die Zellmotilität..... | 48 |
| 6.5.1 | Einfluss von Bevacizumab auf die Zellmotilität von Tumor- und Endothelzellen im Collagen Assay | 48 |
| 6.5.2 | Einfluss von Bevacizumab auf die <i>in-vitro</i> -Angiogenese von HBMEC und isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom..... | 50 |
| 6.6 | Einfluss von Bevacizumab mit anschließender Stimulation durch Wachstumsfaktoren auf die intrazelluläre Signalkaskade..... | 53 |
| 6.7 | Einfluss von Bevacizumab auf Apoptosemechanismen..... | 55 |
| 6.8 | Einfluss eines VEGFR-2-Inhibitors (DC101) im Tiermodell in Bezug auf das Rezeptorsystem VEGFR-3..... | 59 |
| 7 | DISKUSSION..... | 62 |
| 7.1 | Erste Resultate von antiangiogenen Therapieformen in Phase II/ III-Studien..... | 62 |
| 7.2 | Hypothesen für Resistenzmechanismen im <i>in-vivo</i> Modell | 63 |
| 7.3 | Rolle des VEGFR-3-Rezeptorsystems als möglicher alternativer Signalweg in der „second wave of angiogenesis“..... | 66 |
| 7.3.1 | Expression von VEGFR-3 <i>in-vitro</i> | 68 |
| 7.3.2 | Sekretion von VEGFs <i>in-vitro</i> | 69 |
| 7.3.3 | Einfluss von VEGFs auf die Proliferation von Tumor- und Endothelzellen <i>in-vitro</i> | 71 |
| 7.3.4 | Einfluss von Bevacizumab auf Proliferation <i>in-vitro</i> | 72 |
| 7.3.5 | Einfluss von Bevacizumab auf die Migration <i>in-vitro</i> | 75 |
| 7.3.6 | Einfluss von Bevacizumab auf die <i>in-vitro</i> -Angiogenese..... | 75 |
| 7.3.7 | Einfluss von Bevacizumab auf die intrazelluläre Signalkaskade..... | 76 |
| 7.4 | Expression von VEGFR-3 im Tiermodell nach Behandlung mit einem VEGFR-2- Inhibitor (DC101)..... | 78 |
| 8 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 79 |
| 9 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 81 |
| 10 | ANHANG..... | 89 |
| 11 | DANKSAGUNG..... | 98 |

1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Rezeptorsysteme VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 mit den zugehörigen Liganden..... | 14 |
| Abb. 2: Angiogenese, Tumorangiogenese und Effekte anti-angiogener Therapie..... | 18 |
| Abb. 3: Immunhistochemie des VEGFR-3-Signalsystems in humanem Glioblastomgewebe..... | 35 |
| Abb. 4: Immunzytochemie für VEGFR-2, VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D in HBMEC und U87..... | 36 |
| Abb. 5: Nachweis von VEGFR-2, VEGFR-3 und β -Actin (Immunpräzipitation und Western Blot)..... | 37 |
| Abb. 6: Immunzytochemie für VEGFR-2, VEGFR-3, VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D in isolierten CD31-positiven Endothelzellen..... | 38 |
| Abb. 7: Einfluss von Bevacizumab auf die Expression von VEGFR-2, VEGFR-3, VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D auf immunzytochemischer Ebene in U87-Zellen..... | 39 |
| Abb. 8: Einfluss von Bevacizumab auf das Proliferationsverhalten von Tumor- und Endothelzellen in einer Konzentrationsreihe von 5-500 μ g/ml nach 96h..... | 42 |
| Abb. 9: Einfluss von Bevacizumab auf das Proliferationsverhalten von Tumor- und Endothelzellen (100/ 250 μ g/ml) nach 14d..... | 43 |
| Abb. 10: Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Proliferationsverhalten von Tumorzellen (U87 und U251) nach 14-tägiger Behandlung mit Bevacizumab..... | 44 |
| Abb. 11: Einfluss von Wachstumsfaktoren auf das Proliferationsverhalten von cerebralen Endothelzellen und Tumor-Endothelzellen nach 14-tägiger Behandlung mit Bevacizumab..... | 45 |
| Abb. 12: Einfluss von Bevacizumab nach zehntägiger Inkubation auf die endogene Produktion von VEGF-A der Tumor- und Endothelzellen..... | 47 |
| Abb. 13: Einfluss von Bevacizumab nach zehntägiger Inkubation auf die endogene Produktion der Wachstumsfaktoren VEGF-D der Tumor- und Endothelzellen..... | 47 |
| Abb. 14: Einfluss von Bevacizumab nach 15-tägiger Inkubation auf Endothelzell-Sphäroide in einem Collagen-Assay..... | 49 |
| Abb. 15: Einfluss von Bevacizumab nach 30-tägiger Inkubation auf Endothelzell-Sphäroide in einem Collagen-Assay..... | 50 |
| Abb. 16: Einfluss einer Bevacizumab-Behandlung in den Konzentrationen 100 μ g/ml und 500 μ g/ml auf HBMEC und TUEC im „Tube formation Assay“..... | 51 |
| Abb. 17: Einfluss der Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D auf HBMEC nach 14-tägiger Bevacizumab-Behandlung im „Tube formation Assay“..... | 52 |
| Abb. 18: Einfluss der Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D auf TUEC nach 14-tägiger Bevacizumab-Behandlung im „Tube formation Assay“..... | 52 |
| Abb. 19: Einfluss von Bevacizumab auf die Signalkaskade nach zehntägiger Inkubation der Tumorzellen (U87)..... | 54 |
| Abb. 20: Einfluss von Bevacizumab auf die Signalkaskade nach zehntägiger Inkubation der Endothelzellen (HBMEC)..... | 55 |
| Abb. 21: Einfluss von Bevacizumab auf Apoptosevorgänge in der Glioblastomzelllinie U87 – Gates..... | 56 |
| Abb. 22: Einfluss von Bevacizumab auf Apoptosevorgänge in der Glioblastomzelllinie U87 – PI/Annexin..... | 57 |
| Abb. 23: Einfluss von Bevacizumab auf Apoptosevorgänge in den isolierten Endothelzellen – Gates..... | 58 |
| Abb. 24: Einfluss von Bevacizumab auf Apoptosevorgänge in den isolierten Endothelzellen – PI/Annexin..... | 59 |
| Abb. 25: Einfluss von DC101 (VEGFR-2-Inhibitor) im Tiermodell hinsichtlich des Rezeptorsystems VEGFR-3..... | 61 |

2. ABKÜRZUNGEN

| Abkürzung | Erklärung |
|-------------------|--|
| A.d. | Aqua destillata |
| Abb. | Abbildung |
| BSA | <i>Bovine serum albumine</i> |
| BCNU | Bis-chloroethylnitrosurea |
| CBBG | Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blas G250 |
| DAB-Chromogen | 3,3'-Diaminobenzidin-Chromogen |
| DAPI | 4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| D-PBS | Dulbecco's PBS |
| ECM | <i>Endothelial cell medium</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | <i>Epidermal growth factor</i> |
| ERK1/2 | <i>Extracellular-related kinase 1/2</i> |
| FDA | <i>Food and drug administration</i> |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> |
| FGF | <i>Fibroblast growth factor</i> |
| Flk-1 (= VEGFR-2) | <i>Fetal Liver Kinase</i> |
| Flt-1 (= VEGFR-1) | <i>Fms-like-tyrosine Kinase 1</i> |
| GBM | Glioblastoma multiforme |
| HBMEC | <i>Human brain microvascular endothelial cell</i> |
| HIF-1 α | <i>Hypoxia-inducible factor 1α</i> |
| HUVEC | <i>Human vein umbilical endothelial cell</i> |
| IDH | Isocitrate-Dehydrogenase |
| IFL | Irinotecan /Leucovorin |
| IGF | <i>Insuline-like growth factor</i> |
| JNK | <i>c-Jun N-terminal kinase 1/2</i> |
| KDR (= VEGFR-2) | Kinase domain region |
| MAPK (= ERK1/2) | <i>Mitogen-activated proteine kinase</i> |
| MGMT | O-6-Methyl-Guanin-DNA-Methyl-Transferase |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NP40 | Nonoxynol-40 |
| PAS | <i>Periodic acid Schiff</i> |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PDGF | <i>Platelate-derived growth factor</i> |
| PGI ₂ | <i>Prostaglandine</i> |
| PIGF | <i>Placenta growth factor</i> |
| PhIC | Phosphatase inhibitor cocktail |
| PIC | <i>Protease inhibitor cocktail</i> |
| Prox-1 | <i>Prospero related homeobox</i> |
| PVDF-Membran | Polyvinylidenfluorid-Membran |
| Ras | <i>Rat sarcoma</i> |
| SAPK | <i>Stress-activated protein kinase</i> |
| SDF-1 | <i>Stromal-derived factor-1</i> |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> |
| c-Src | <i>Cellular and sarcoma</i> |
| TB-Puffer | <i>Tranfer buffer</i> |
| TBS | <i>Tris buffered saline</i> |
| TGF β | <i>Transforming growth factor β</i> |

| | |
|-------|--|
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TUEC | <i>Tumor endothelial cell</i> |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| VEGFR | <i>Vascular endothelial growth factor receptor</i> |
| WF | Wachstumsfaktor |
| WHO | World Health Organization |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |
| 5-FU | 5-Fluoruracil |

3. EINLEITUNG

3.1 Glioblastoma multiforme

Gliome gehören zu den neuroepithelialen Tumoren und stellen die häufigsten Tumoren des Zentralen Nervensystems dar. Die WHO-Klassifikation von 2007 unterscheidet die neuroepithelialen Tumore hinsichtlich ihres zellulären Ursprungs und entsprechend histopathologischer Malignitätskriterien in vier Grade (WHO I-IV). (Kleihues et al.)

Glioblastome (WHO IV) stellen den aggressivsten Gliomtyp dar und zeichnen sich durch ausgeprägte Gewebs- und Zellpolymorphien mit strichförmigen und flächenhaften Tumorgewebsnekrosen, Einblutungen, Gefäßproliferate sowie durch diffuse Infiltration des angrenzenden Hirnparenchyms aus. Sie gehören zu den häufigsten hirneigenen Tumoren des Menschen und treten bevorzugt im höheren Lebensalter auf (durchschnittlicher Altersgipfel: 62 Jahre). Die Inzidenz liegt bei etwa 2-3/ 100.000 und betrifft das männliche Geschlecht häufiger (1,6:1). Sie sind meist in der subkortikalen weißen Substanz der Großhirnhemisphären lokalisiert, können jedoch auch in bis zu 10% der Fälle multifokal auftreten (Miller et al., Plate et al). Eine extrakranielle, systemische Metastasierung findet sich praktisch nie (Lun et al.).

3.1.1 Pathogenese

Zum Einen können Glioblastome *de novo* entstehen und zum Anderen entwickeln sie sich aus niedriggradigen Gliomen. Mutationen der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH1 und 2) lassen Glioblastome in Subtypen klassifizieren und möglicherweise in Zukunft eine Aussage über die Diagnose, Prognose und Behandlungsformen treffen. In mehr als 80% aller sekundären Glioblastome und weniger als 10% primärer Glioblastome ist eine IDH1 Mutation nachzuweisen. Da die Mutation auch in niedriggradigen Astrozytomen und Oligodendrogliomen in mehr als 70% auftritt, vermutet man eine wichtige Rolle in sekundär entstandenen Glioblastomen. Diese Mutation tritt vornehmlich bei jüngeren Patienten auf und ist mit einer besseren Prognose assoziiert (Gesamtüberleben 31 Monate versus 15 Monate). Das Vorhandensein von IDH-Mutationen ist häufig gleichzeitig mit p53-Mutationen und

Deletionen auf den Chromosomen 1p/19q assoziiert, welche wahrscheinlich in der frühen Gliomgenese auftreten (Miller et al., Yan et al.).

3.1.2 Symptome

Durch das rasche Wachstum des Tumors wird das gesunde Hirngewebe sowohl verdrängt als auch infiltriert. Daraus ergeben sich je nach Lokalisation unterschiedliche Symptome. Es kommt durch die Raumforderung zu einer chronischen Zunahme des intrakraniellen Drucks, die sich in Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen äußert. Durch die infiltrierenden Eigenschaften des Tumors können fokale-neurologische Ausfälle eintreten, wie bspw. motorische und sensible Defizite, neuropsychologische Auffälligkeiten sowie epileptische Anfälle.

3.1.3 Diagnose

Die Diagnose eines Glioblastoms erfolgt mittels neuroradiologischer Bildgebung durch Computer- und Magnetresonanztomographie. Charakteristisch für diese Tumoren ist eine ring- und girlandenförmige Kontrastmittelaufnahme.

Für spezielle Fragestellungen werden zunehmend auch nuklearmedizinische Verfahren eingesetzt, die eine Unterscheidung zwischen Tumor und nicht-tumorösen Läsionen ermöglichen sowie die Klassifikation des Malignitätsgrades erleichtern können.

Die endgültige Diagnose erfolgt histopathologisch entweder durch intraoperativ gewonnene Resektate oder durch eine stereotaktische Biopsie.

3.1.4 Standardtherapie

Die Operation stellt einen Hauptbestandteil der neuroonkologischen Therapie dar. Aufgrund des starken Infiltrationspotentials der Tumorzellen in das umliegende Gewebe, ist die Kompletresektion des malignen Gewebes nicht möglich. Verbleibende Tumorzellen im Parenchym führen sehr häufig zu Rezidiven.

Deshalb wird die Behandlung des Glioblastoms durch Strahlen- und Chemotherapie ergänzt.

Die Strahlentherapie ist ein wichtiger Bestandteil der adjuvanten und additiven Therapie von Gliomen, die sowohl in der Primär-, Rezidiv als auch Palliativbehandlung zur Verbesserung der Überlebenszeit eingesetzt wird.

Das einzige evidenzbasierte Chemotherapeutikum für Glioblastome ist derzeit Temozolomid. Das Alkylanz Temozolomid zeichnet sich durch eine gute Verträglichkeit und hohe orale Verfügbarkeit mit guter Penetration der Blut-Hirn-Schranke aus und konnte die mediane Überlebenszeit in Kombination mit Strahlentherapie von zwölf auf 15 Monate verlängern. Die kombinierte Radiochemotherapie mit Temozolomid gefolgt von einer Temozolomid-Monotherapie gilt derzeit als Goldstandard (Stupp et al.).

3.1.5 Experimentelle Therapieansätze

Die Prognose von Patienten mit Glioblastomen konnte durch die kombinierten Therapiemodalitäten verbessert werden, ist jedoch mit einem Mittel von 15 Monaten immer noch stark limitiert. Mittels alternativer Therapieansätze wird versucht, das Gesamtüberleben der Patienten zu verlängern.

Um möglichst hohe Konzentration von Therapeutika am Tumor bei geringer systemischer Toxizität zu erreichen, wurden lokale Applikationsformen entwickelt. Einzig die Implantation von Chemotherapeutika (z.B. BCNU) mittels Biopolymere in die Resektionshöhle („Gliadel wafer“) (Westphal et al.) ist evidenzbasiert, die Infusion von Chemotherapeutika (z.B. Paclitaxel) durch die stereotaktische Implantation von ein bis zwei Kathetern (Tanner et al.) und die Einbringung von Chemotherapeutika mit Hilfe von Mikropumpen in die Infiltrationszone des Tumors - die sogenannte „convection enhanced delivery“ verbleiben bis dato experimentelle Methoden (Pöpperl et al., Tanner et al.).

Weitere experimentelle Therapieformen stellen die Radioimmuntherapie (mit ionisierenden Strahlern gekoppelte Antikörper gegen ein tumorspezifisches Antigen) (Goetz et al.) oder die photodynamische Therapie dar (Beck et al.).

3.2 Angiogenese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen

Als Angiogenese bezeichnet man die Ausbildung von Gefäßen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen im Organismus.

3.2.1 Physiologische Angiogenese – Hämangiogenese

Die Ausbildung des Blutgefäßsystems während der Embryogenese erfolgt zunächst durch die *in-situ*-Differenzierung von endothelialen Vorläuferzellen (Angioblasten) in Endothelzellen, die ein primitives Gefäßsystem ausbilden (Vaskulogenese). Dieses System wird modifiziert und zu einem komplexen Gefäßnetz umgebaut - die sogenannte Angiogenese (Carmeliet et al.). Zuletzt werden Perizyten und Myozyten rekrutiert, welche die Gefäßwände stabilisieren und letztlich die Arteriogenese definieren (Bergers and Benjamin). Die Perizyten und Myozyten stabilisieren das Gefäß u.a. durch Hemmung der Proliferation von Endothelzellen und Ausbildung einer Basalmembran. Dabei können Myozyten durch Stimuli aus Endothelzellen transdifferenzieren oder aus mesenchymalen Zellen *in situ* differenzieren (Carmeliet et al.).

Auch im adulten Organismus finden angiogene Prozesse statt, bspw. im Uterus während der Menstruation, in der Wundheilungsphase oder bei Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Psoriasis.

3.2.2 Lymphangiogenese

Lymphatische Gefäße unterscheiden sich morphologisch von Blutgefäßen durch die Abwesenheit von Perizyten, die diskontinuierliche fenestrierte Basalmembran, den Mangel an interendothelialen Verbindungen und der daraus resultierenden gesteigerten Permeabilität (Bergers and Benjamin; Alitalo and Carmeliet; Veikkola et al.). Das Gehirn verfügt als einziges Organ neben Kornea und Hoden nicht über ein lymphatisches System. Im Gehirn übernimmt stattdessen die zirkulierende zerebrospinale Flüssigkeit die Funktionen des Lymphabflusses (Pepper et al.).

Nach der Theorie von Sabin entsteht das Lymphsystem über das „Aussprossen“ von präexistenten venösen Gefäßen (Veikkola et al.). Eine andere Theorie besagt, dass sich das Lymphsystem über das Mesoderm eigenständig entwickelt. Die Tatsache, dass der Homeobox Transkriptionsfaktor Prox-1 an genau den Stellen exprimiert ist, wo lymphatischen Gefäße aus Venen aussprossen, unterstützen die erste Theorie (Baldwin, Stacker, and Achen).

Prox-1 ist wichtig für die Determination eines lymphatischen Phänotyps in endothelialen Vorläuferzellen (Wigle et al.). Man vermutet, dass venöse Endothelzellen initial bipotent sind und sekundär nur eine Subpopulation für das lymphatische Differenzierungsprogramm bestimmt ist (Veikkola et al.; Saharinen and Petrova; Wirzenius et al.).

Eine essentielle Rolle scheint die Rezeptor-Tyrosinkinase VEGFR-3 in der Lymphangiogenese zu spielen. Im Gehirn allerdings konnte VEGFR-3 bislang nur im Plexus choroideus und der Adenohypophyse nachgewiesen werden (Partanen et al.).

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass VEGFR-3-defiziente Mäusen während der Embryonalentwicklung sowohl die Hämangiogenese sowie die Lymphangiogenese beeinträchtigt ist. In VEGFR-3-defizienten Mäusen ist am 10. Tag ein Perikarderguss mit anschließendem Herzversagen zu beobachten (Hicklin and Ellis).

In adulten Tieren hingegen kann durch Blockierung des VEGFR-3-Systems die Metastasierungsquote in Tumoren vermindert werden, ohne dass bereits existierende Lymphgefäße in ihrer Funktion gestört werden (Alitalo and Carmeliet). So wird angenommen, dass während der Embryogenese lymphatische Zellen auch aus zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen aus dem systemischen Kreislauf rekrutiert werden und sich in Lymphgefäße differenzieren (Suzuki et al.).

3.2.3 Pathologische Angiogenese

Die Neoangiogenese ist ein charakteristisches Kennzeichen zahlreicher hochmaligner Neoplasien (Hillen and Griffioen). Hohe Gefäßdichte korreliert dabei in verschiedenen Tumoren mit der Malignität des Tumors (Sharma, Sharma und Sarkar). Im Rahmen des Tumorwachstums ist somit der Übergang in eine angiogene Wachstumsphase („angiogenic switch“) charakteristisch.

Die Gefäßbildung in Tumoren unterscheidet sich von der physiologischen Angiogenese durch mehrere Prozesse: 1.) Kooption von präexistenten Gefäßen (Bergers et al.), 2.) Angiogenese aus Kapillaren von präexistenten Gefäßen (Bergers et al.), 3.) Vaskulogenese durch Inkorporation von zirkulierenden Endothelzellen oder endotheliale Vorläuferzellen (Bergers et al., Folberg et al.) und

4.) Intussuszeption durch Gefäßteilung mit Insertion von interstitiellen Gewebebrücken in Lumina von präexistenten Gefäßen (Jain et al.).

Morphologisch sind Tumorgefäße im Glioblastom im Gegensatz zu normalen Gefäßen häufig irregulär geformt, zweigen sich in unreife Gefäßproliferate auf und bilden nicht-funktionale Glomeruli-ähnliche Strukturen aus. Außerdem weisen sie eine erhöhte Permeabilität und Hämorrhagien sowie einen irregulären Blutfluss in dysfunktionalen Kapillaren auf (Erber et al., Vajkoczy et al.) Die Basalmembran ist defekt und kaum von Perizyten umgeben (Winkler et al.).

Die Tumorendothelzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie aktiv proliferieren während sich normale Endothelzellen hauptsächlich im Ruhezustand befinden (Benouchan and Colombo). Nur ca. 0,01% der normalen Endothelzellen teilen sich unter physiologischen Bedingungen (Jekunen and Kairemo).

3.2.4 Regulation der Angiogenese

Die Regulation der Angiogenese erfolgt durch unterschiedliche pro- und anti-angiogene Faktoren. Zu den pro-angiogenen Faktoren gehören neben FGF, PDGF und EGF vor allem die sogenannten Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) und ihre Rezeptoren (VEGFR). Diese werden v.a. unter hypoxischen Bedingungen von Tumor- und Endothelzellen exprimiert und sezerniert (Kargiotis, Rao, and Kyritsis; Midgley and Kerr). Zu den endogenen anti-angiogenen Faktoren zählen unter anderem Thrombospondin-1, Angiostatin und Endostatin, welche die Wirkung der pro-angiogenen Faktoren hemmen.

Im gesunden Gewebe herrscht ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren, das durch den Bedarf an Sauerstoff und Metaboliten reguliert wird (Benouchan and Colombo; Kargiotis, Rao, and Kyritsis; Kirsch, Schackert, and Black).

Im Tumorgewebe ist dieses Gleichgewicht zugunsten der pro-angiogenen Faktoren verschoben. Dadurch werden endotheliale Vorläuferzellen und Endothelzellen rekrutiert und zur Proliferation angeregt, was z. B. im Glioblastom durch SDF-1 erfolgt (Jain et al.). Die Entwicklung eines Ungleichgewichts im wachsenden Tumor hin zur pro-angiogenen Seite bezeichnet man als „angiogenic

switch“. Die Genexpression der pro-angiogenen Faktoren wird durch Hypoxie getriggert und durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, z.B. HIF-1 α , und Onkogenen sowie Mutationen in Tumor-Supressor-Genen gefördert (Bergers and Benjamin). Der „angiogenic switch“ kann in jedem Stadium der Tumor-Progression auftreten und ist vermutlich von der Tumorentität und dem umliegenden Gewebes abhängig (Bergers and Benjamin).

Zu Beginn werden durch das von Tumorzellen sezernierte VEGF-A eine Vasodilatation und eine gesteigerte vaskuläre Permeabilität der präexistenten Kapillaren verursacht. Dadurch findet eine Extravasation von Plasmaproteinen statt, was als provisorische Matrix für aktivierte Endothelzellen dient. Gleichzeitig dissoziieren durch die Wirkung von Angiopoetin-2 Perizyten von den Gefäßen. Durch die Ausschüttung von Proteinase, Matrix-Metalloproteinase, Chymasen und Heparinasen werden die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix der Gefäße degradiert. Die Endothelzellen lösen ihre inter- und periendothelialen Zellkontakte und wandern durch den Stimulus von angiogenen Faktoren in den perivaskulären Raum ein, um dort ein ungeordnetes Gefäßsystem auszubilden. Dabei fusionieren die einzelnen Gefäßstümpfe miteinander und bilden sogenannte „vaskuläre loops“ (Bergers and Benjamin).

In *in-vitro*-Versuchen konnte auch gezeigt werden, dass Tumorzellen in Gefäßwände migrieren und vaskuläre Kanäle formen (Folberg, Hendrix, and Maniotis). Dies wird als „vasculogenic mimicry“ bezeichnet. Tumorzellen bildeten in uvealen und dermalen Melanomen vaskuläre Kanäle, die von PAS-positivem Material eingebettet waren und Farbstoff-Partikel transportieren konnten (Folberg et al.). Diese Beobachtungen sind allerdings im Glioblastom noch nicht nachgewiesen.

3.2.5 Wachstumsfaktoren der VEGF Familie

VEGF Wachstumsfaktoren sind dimerische Glykoproteine mit einer Molekülmasse von etwa 40kDa. Sie sind strukturell mit der PDGF-Familie verwandt. Es existieren sechs verschiedene Vertreter: PlGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E und hiervon jeweils Isoformen, die durch alternatives Splicing entstehen

und eine unterschiedliche biologische Aktivität aufzeigen (Olsson et al.; Moreira, Fernandes, and Ramos).

Einer der wichtigsten Vertreter dieser Faktoren für die Angiogenese ist der Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A oder VEGF), welcher die Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR-1 (Flt-1) sowie VEGFR-2 (Flk-1/KDR) aktiviert. Zu den Funktionen von VEGF-A gehört neben der Induktion von Differenzierung, Migration und Proliferation in Endothelzellen auch die Permeabilitätssteigerung von Gefäßen. In der Hämostase wirkt VEGF-A durch Sekretion von NO und PGI₂ sowohl antithrombotisch als auch prothrombotisch durch die Aktivierung von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor und von-Willebrandt-Faktor (Zachary et al.). Außerdem werden durch VEGF-A endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark mobilisiert (Hicklin and Ellis).

VEGF-A ist essentiell für die embryonale Vaskulo- und Angiogenese. Die Inaktivierung eines VEGF-Allels in Knock-out-Mäusen führt zur Letalität (Bergers and Benjamin). Die Expression von VEGF-A alleine kann Angiogenese initiieren (Hicklin and Ellis).

Die Überexpression von VEGF-A ist bei einigen Tumoren wie bspw. Melanom, kolorektalem, Mamma-, Prostata-, Pankreas-, Lungenkarzinom mit Progression und schlechter Prognose assoziiert. Im Glioblastom ist im Vergleich zu anderen Tumorentitäten die höchste Expression zu verzeichnen - 50fach höher als im normalen Hirngewebe (Machein and Plate).

VEGF-A ist nicht nur für die Angiogenese zuständig, sondern wirkt in Gefäßen auch als permeabilitätssteigerender Faktor, der eine 1.000fach stärkere Wirkung besitzt als Histamin. Im Glioblastom wird daher das vasogene Ödem hauptsächlich durch VEGF-A vermittelt (Machein and Plate). Die Sekretion von VEGF-A wird durch hypoxische Zustände, multiple Onkogene (Ras, c-Src, TP53), Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren (PDGF, IGF-1, TGFβ) und eine Reihe von Signalmolekülen (NO, MAPK) reguliert (Jain et al.).

VEGF-C und -D sind ebenfalls dimerische Glykoproteine, die strukturell mit VEGF-A verwandt sind. Ihre Expression findet sich im humanen Organismus im Herz, Plazenta, Muskel, Ovar, Dünndarm und Lymphgefäßen (Partanen et al.). Diese beiden Faktoren binden sowohl an VEGFR-2 als auch an VEGFR-3, wobei die

Affinität zu VEGFR-3 höher ist. Nur die vollständig prozessierten Isoformen dieser Faktoren können VEGFR-2 aktivieren (Olsson et al.; Achen et al.).

Die exakten biologischen Funktionen von VEGF-C und -D sind der von VEGF-A ähnlich, jedoch nicht vollständig geklärt. Sie spielen vor allem bei der Induktion der Lymphangiogenese eine Rolle. Außerdem wirken sie mitogen, motilitätssteigernd auf Endothelzellen und erhöhen die Permeabilität von Gefäßen - allerdings weniger potent als VEGF-A (Laakkonen et al.). In verschiedenen malignen Tumoren induziert VEGF-C die Hämangiogenese, während der Faktor im differenzierten Gewebe für die Lymphangiogenese verantwortlich ist (Baldwin, Stacker, and Achen).

Sowohl in der Tumorangio-genese als auch in Metastasierungsprozessen scheinen die Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen. VEGF-C und -D wird hier u. a. auch von Tumorzellen sezerniert und induziert das Aussprossen von lymphatischen Kapillaren und die Dilatation von peritumoralen lymphatischen Gefäßen, was zu einer erhöhten Metastasierungsquote führt (Alitalo and Carmeliet; Stacker et al.; Saharinen and Petrova; Laakkonen et al.; Hoshida et al.; Stacker et al.; Skobe et al.).

Es existiert eine synthetisch hergestellte Isoform, nämlich VEGF-C156s, die ausschließlich an VEGFR-3 bindet. Sie wurde für experimentelle Zwecke produziert, um die Funktion des VEGFR-3 aufzuklären (Zhang, Groopman, and Wang).

VEGF-B besitzt nur eine geringe mitogene Potenz und wird sowohl in Myokard exprimiert als auch in benignen und malignen Tumorgewebe. VEGF-E spielt vermutlich bei der Ausbildung des tissue factors sowie bei der Angiogenese eine Rolle. Über die exakte Funktion dieser Faktoren ist allerdings nur wenig bekannt (Partanen and Paavonen; Brockington et al.).

3.2.6 Wachstumsfaktorrezeptoren (VEGFR)

Die Rezeptoren für VEGF gehören zu den Rezeptor-Tyrosinkinase-n wie der PDGFR (Platelet-derived growth factor) und FGFR (Fibroblast growth factor). Strukturell bestehen sie aus einer extrazellulären Domäne mit sieben Immunglobulin-ähnlichen Bestandteilen, einer transmembranen Region, einer

juxtamembranen Tyrosin-Kinase-Domäne sowie einem C-terminalem Ende. VEGFR-3 unterscheidet sich jedoch durch eine Disulfid-Brücke in der extrazellulären Domäne. VEGFR-2 ist mit dem Korezeptor Neuropilin assoziiert und wird durch ihn reguliert (Zachary et al.).

Durch die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt die Induktion von unterschiedlichen Signalkaskaden in der Zelle, die für die charakteristischen Eigenschaften der Zellen verantwortlich sind.

VEGFR-1 ist ein 180kDa messendes Glykoprotein, auf Endothelzellen, Perizyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert und führt durch Aktivierung zur Migration dieser Zellen. Es ist in der Angiogenese, inflammatorischen Prozessen sowie in der Rekrutierung von hämatopoetischen Progenitorzellen von Bedeutung. Außerdem reguliert dieser Rezeptor die Aktivität des VEGFR-2 (Zachary et al.; Witmer et al.).

VEGFR-2 besitzt eine Molekülmasse von 220kDa. Er spielt in der Proliferation, Invasion, Migration und dem Überleben von Endothelzellen eine wichtige Rolle. Diese Aufgaben beziehen sich sowohl auf die physiologische als auch auf die pathologische Blut- und Lymphgefäßbildung. Im gesunden Organismus ist VEGFR-2 daher in Kapillaren in der Nähe von Epithelien und lymphatischen Gewebe lokalisiert. Im ZNS ist VEGFR-2 während der Angiogenese der ZNS-Gefäße des Embryos nachweisbar, allerdings bildet sich die Expression nach Terminierung der Angiogenese weitgehend zurück (Witmer et al.).

VEGFR-3 existiert als mature 190kDa-Form, die in eine 120kDa- und eine 75kDa-Kette proteolytisch prozessiert wird. Während der frühen Embryogenese ist VEGFR-3 bei der Ausbildung von Blutgefäßen essentiell (Olsson et al.; Pajusola et al.; Cross et al.). VEGFR-3-Knock-out-Mäuse waren nach zehn Tagen letal (Laakkonen et al.).

Nach der Embryogenese ist VEGFR-3 hauptsächlich in lymphatischen Gefäßen lokalisiert und zwar dort, wo Lymphgefäße im Granulationsgewebe aussprossen (Witmer et al.). Des Weiteren ist er in den fenestrierten Kapillaren von einigen Organen, z.B. Knochenmark, Sinusoiden der Milz und Leber, Glomeruli der Niere und endokrine Drüsen, exprimiert. Es konnte eine Kolokalisation mit VEGFR-2 in

Kapillaren sowie die Interaktion durch Heterodimerisation festgestellt werden, was auf eine Zusammenarbeit dieser beiden Rezeptoren schließen lässt (Alam et al.). Es wurde nachgewiesen, dass der Signalweg über VEGFR-3 Endothelzellen vor Apoptose durch Serummangel im Medium schützt (Makinen et al.).

Somit übernimmt VEGFR-3 unter bestimmten Bedingungen die Funktionen von VEGFR-2.

Neben den physiologischen Aufgaben besitzt VEGFR-3 mit seinen Liganden eine wichtige Rolle in der Tumorangio-genese. Die Überexpression von VEGFR-3 ist im Mammakarzinom und Melanom zu beobachten und fördert die Lymphangiogenese sowie die Metastasierung in regionale Lymphknoten und distante Organe (Hicklin and Ellis; Laakkonen et al.). In Tumorzellen führt die Aktivierung des VEGFR-3-Signalwegs zu einer gesteigerten Migrations- und Invasions-tendenz und somit auch zur Tumorprogression in Pankreastumoren (Su et al., Stacker et al., Hoshida et al.).

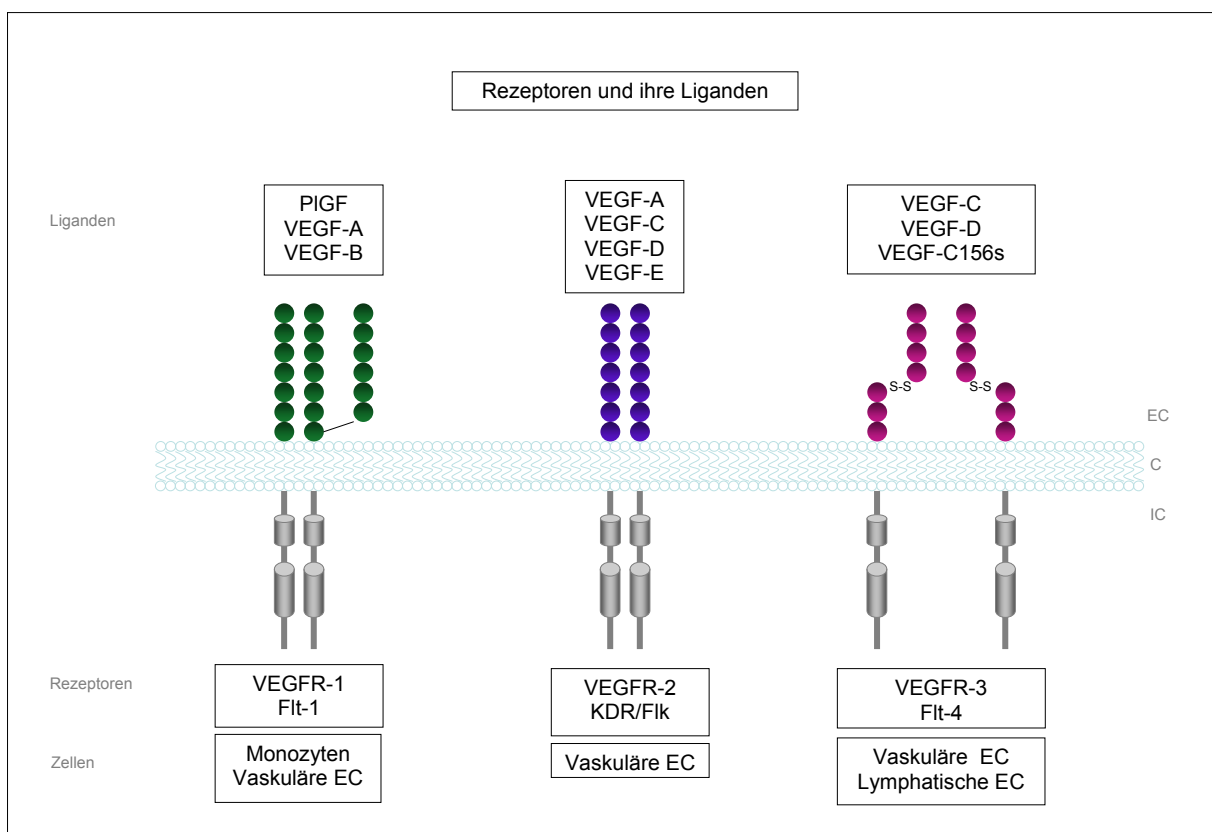


Abb. 1: Rezeptorsysteme VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 mit den zugehörigen Liganden PIGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-C156s, VEGF-D und VEGF-E (nach Zachary et al.).

3.2.7 Expression von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren im Glioblastom

VEGF-A ist im Glioblastom im Gegensatz zu niedrig malignen Gliomen 50fach überexprimiert und ausschließlich in Tumorzellen nachweisbar (Huang et al.; Plate et al.).

Obwohl lymphatische Gefäße im ZNS nicht vorhanden sind, konnte das Vorhandensein von lymphatischen Markern im Glioblastom nachgewiesen werden. Zwei Studien wiesen die gradabhängige Expression von VEGFR-3 in Gliomen nach (Grau, Trillsch, Herms et al.; Jenny et al.). Im Glioblastom ist VEGFR-3 in glomeruloiden Gefäßproliferationen lokalisiert, die sich in der Nähe von nekrotischen Arealen befinden (Witmer et al.), was auf eine Rolle in der Tumorangio-genese hinweist.

VEGF-C und -D sind in Arealen mit hoher Vaskularisation lokalisiert, allerdings korreliert ihre Expression nicht mit der Malignität des Tumors.

3.3 Anti-angiogene Therapie

Die Erkenntnis, dass der VEGF-Signalweg eine essentielle Rolle für die Tumorangio-genese spielt, führte zur Entwicklung einer neuen therapeutischen Strategie, die auf einer Inhibition dieses Signalwegs beruht. Es wurden unterschiedliche Antikörper entwickelt, die entweder gegen VEGF, VEGFRs, intrazelluläre Mediatoren der Signalkaskade oder gegen mehrere Bestandteile gerichtet sind.

Das ursprüngliche Ziel der anti-angiogenen Therapie war die Inhibition der Tumorangio-genese, die die Gefäßversorgung des Tumors stören und ihn so von Sauerstoff und Nährstoffen abschneiden sollten. Studien zeigten eine Regression des Tumors durch eine anti-angiogene Therapie, jedoch führte dies nicht zu einer signifikanten Verlängerung des Überlebens von Patienten. Eine Kombination mit Radio- und Chemotherapie konnte eine Wachstumshemmung des Tumors sowie eine Prognoseverbesserung der Patienten erreicht werden (Hicklin and Ellis).

Nach derzeit gängiger Lehrmeinung beruht der Effekt der anti-angiogenen Therapie vermutlich auf einer Normalisierung der pathologischen Gefäßarchitektur des Tumors, d.h. die mikrovaskuläre Gefäßdichte und der Durchmesser der Gefäße nimmt ab, der Anteil der Perizyten und der onkotische Druckgradient in den

Tumorgefäßen erhöht sich (Moffat et al.; Tong et al.). Hierdurch wird die interstitielle Hypertension reduziert, der Blutfluss normalisiert und das hypoxische azidotische Milieu gemindert. Dies führt dazu, dass Chemotherapeutika besser zu den Tumorzellen gelangen und der verbesserte Oxygenierungsstatus die Tumorzellen für die Strahlentherapie sensibilisiert (Hicklin and Ellis). Außerdem wird eine vermehrte Ausschüttung von VEGF-A neutralisiert, die nach einer Bestrahlung auftritt (Jain et al.). Daher ist das sogenannte „therapeutic time window“ essentiell, an dem die unterschiedlichen Therapieformen appliziert werden. Im in-vivo-Modell konnte gezeigt werden, dass der Effekt der Radio- und Chemotherapie besser greifen kann, wenn die pathologische Gefäßarchitektur durch anti-angiogene Therapie normalisiert wurde (Winkler et al.).

Von zusätzlichem Effekt könnte die Tatsache sein, dass die Rekrutierung von endothelialen Vorstufen durch pro-angiogene Faktoren aus dem Knochenmark gehemmt wird (Jain et al.; Batchelor et al.). Schließlich wird der stärkste „survival factor“ für Endothelzellen - VEGF-A - neutralisiert, so dass die Strahlentherapie noch effizienter greifen kann (Sandstrom et al.).

Theoretische Vorteile einer anti-angiogenen Therapie gegenüber einer Chemotherapie sind:

1. Tumorzellen sind sehr heterogen während Endothelzellen nach aktuellem Wissensstand eine homogene, nicht-neoplastische Gruppe repräsentieren, die vermutlich weniger resistent sind gegen eine zielgerichtete Therapie,
2. Endothelzellen sind für im Blutkreislauf zirkulierende Substanzen einfach zu erreichen,
3. Anti-angiogene Substanzen wirken nur auf proliferierende Endothelzellen, so dass ruhende gesunde Gefäße von der Therapie geschont werden,
4. Anti-angiogene Therapie ist primär gegen Endothelzellen gerichtet und kann deshalb mit Therapieformen, die gegen andere Zellen gerichtet ist, kombiniert werden. Tumorzellen und nicht-neoplastische Zellen, wie Perizyten, glatte Muskelzellen oder zirkulierende Endothelzell-Vorläufer könnten jedoch zusätzliche Ziele für anti-angiogene Therapien darstellen (Kirsch, Schackert, and Black). Da die Expression von VEGF-A im Glioblastom 50fach gesteigert ist und auch mit der Aggressivität sowie Malignität korreliert, scheint dieser pro-angiogene Faktor ein sinnvoller Ansatz zur Therapie dieser Tumoren zu sein (Jain et al.; Sandstrom et al.).

3.3.1 Bevacizumab (Avastin®)

Die Substanz Bevacizumab (Avastin®) ist ein humanisierter muriner monoklonaler Antikörper, der gegen VEGF-A gerichtet ist, und somit die Bindung des Liganden an VEGFR-2 verhindert. Eine Reihe klinischer Studien konnte eine Wirksamkeit von Bevacizumab bei unterschiedlichen onkologischen Krankheitsbildern demonstrieren.

Bei Patienten mit metastasiertem, kolorektalem Karzinom konnte durch Bevacizumab in Kombination mit 5-Fluoruracil/Leucovorin plus Irinotecan (IFL) die mediane Überlebenszeit von 15,6 auf 20 Monate verlängert werden. Bevacizumab in Kombination mit IFL wurde als erster Vertreter der anti-angiogenen Substanzen im Jahre 2004 von der FDA als first-line-Therapie beim metastasierten kolorektalen Karzinom akzeptiert (Hurwitz et al.; Jenab-Wolcott et al.; Kabbinavar et al.).

In der Therapie des Mamma-Karzinoms und des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms werden momentan Studien zur klinischen Evaluation von Bevacizumab in Kombination mit unterschiedlichen Chemotherapeutika durchgeführt (Midgley and Kerr; Rosen et al.).

In der Glioblastom-Rezidiv-Behandlung wurde Bevacizumab in Kombination mit Irinotecan angewandt. Dabei konnte in der Phase-II-Studie das progressionsfreie Intervall der Patienten verlängert werden (Vredenburgh et al.; Sathornsumetee et al.; Chamberlain et al.; Reardon et al.).

Aktuell wird eine randomisierte kontrollierte doppelblinde Multicenter-Studie durchgeführt, welche den Einfluss von Bevacizumab mit konkomitanter Radiochemotherapie mittels Temozolomid im Glioblastom als First-line-Therapie untersucht. Primäres Ziel der Studie ist die Untersuchung des Gesamtüberlebens sowie des progressionsfreien Intervalls, welches nach den MacDonald-Kriterien bestimmt wird (Macdonald et al.).

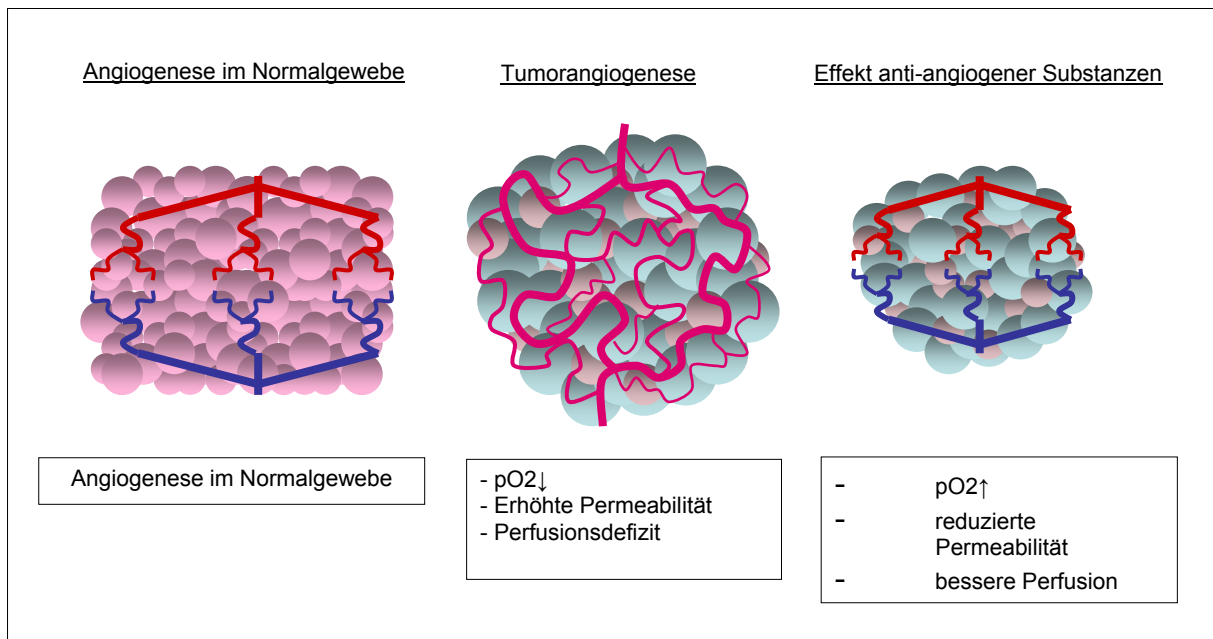


Abb. 2: Angiogenese, Tumorangiogenese und Effekte anti-angiogener Therapie (nach Jain et al.).

3.4 Hinweise auf eine „zweite Angiogenesewelle“ in Tumoren nach anti-angiogener Therapie

Die anti-angiogene Therapie bei Gliomen erzielte sowohl in Tiermodellen als auch in ersten klinischen Studien eine Tumorregression und eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls. Allerdings war dieser Effekt im Tiermodell nur transient zu beobachten. Nach einer Latenzzeit entwickelte Tumorgefäßsystem eine Resistenz gegenüber der anti-angiogenen Therapie, was zu erneuter Progression des Tumors führte. Die Mechanismen hierfür sind nicht abschließend geklärt. Diskutiert werden folgende Hypothesen:

Erstens, eine gesteigerte sekundäre Ausschüttung von anderen pro-angiogenen Faktoren wie bspw. PDGF kompensiert die Wirkung von VEGF und fördert erneut das Tumorwachstum (Erber et al.). Zweitens, epigenetische Mechanismen treten auf, die in den Endothelzellen anti-apoptotisch wirken (Charalambous et al.). Drittens, eine ausgeprägte phänotypische Heterogenität der Tumorzellpopulationen und unterschiedlicher Abhängigkeit des Gefäßsystems führt konsekutiv zu einer uneinheitlicher Sensitivität für anti-angiogene Therapie (Jubb et al.; Kerbel et al.).

Das Resistenzphänomen einer Hochregulation anderer pro-angiogenen Faktoren, wird als „second wave of angiogenesis“ bezeichnet. Hierbei werden nach Blockierung des VEGFR-2-Signalwegs möglicherweise alternative Signalwege aktiviert, welche einen zweiten kompensatorischen Schub einer Angiogenesewelle auslösen, die sonst unter physiologischen Bedingungen eine untergeordnete Rolle spielen.

Moffat et al. beobachtete beispielsweise im Tiermodell, dass eine Ausschaltung der VEGF-A-Expression in Gliomen die Angiogenese nicht komplett inhibierte. Vielmehr wurde ein alternativer Signalweg durch VEGF-D verstärkt exprimiert. Dadurch veränderte sich der Phänotyp des Tumorgefäßsystems und zeigte eine gesteigerte Gefäßdichte und erhöhten Blutfluss (Moffat et al.).

Auch Casanovas et al. zeigte im Pankreaskarzinom-Tiermodell, dass eine kurzzeitige Therapie mit einem VEGFR-2-Inhibitor eine vorübergehende Tumorrückbildung induzierte. Allerdings zeigte sich nach einer Latenzzeit von zehn Tagen eine erneute Tumorprogression. Diese Tumoren zeigten eine vermehrte Hypoxie als auch eine verstärkte Expression von proangiogenen Faktoren, wie z.B. FGF (Schmidt et al.). Eine längere Therapie kompensierte die Hypoxie durch die Ausbildung von pathologischen Gefäßen wie zu Beginn der Tumorangiogenese. Allerdings ergab ein deutlich maligneres Wachstumsmuster mit einer verdünnten Tumorkapsel und einer großen Invasionszone in das umgebende Gewebe (Casanovas et al.).

In bisherigen *in-vivo*-Modellen wurden durch eine Kombination anti-angiogener Substanzen mit Hemmung mehrerer Signalwege deutlichere Ergebnisse erzielt als in der Monotherapie. Durch eine Kombination von anti-VEGFR- und anti-FGF-Substanzen konnte bspw. eine stärkere Hemmung des Tumorwachstums sowie eine verminderte vaskuläre Dichte erreicht werden (Lamszus et al.).

Durch die Kombination zweier anti-angiogenen Substanzen, Antikörpern gegen VEGFR-2 und PDGFR wurde in Glioblastom- und Pankreaskarzinom-Modellen ebenfalls eine deutlich verstärkte Tumorregression im Vergleich zu Monotherapien erreicht (Bergers et al.).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die pro-angiogenen Vorgänge nicht auf singuläre Faktoren zurückzuführen sind und durch eine Kombination von mehreren anti-angiogenen Substanzen eine stärkere Tumorregression erreicht werden könnte.

4. FRAGESTELLUNG

Anti-angiogene Therapie stellt in der Behandlung von Glioblastomen eine zunehmend bedeutende Rolle dar und wird aktuell in der Rezidivtherapie im klinischen Alltag eingesetzt. Im Tiermodell konnte erstmals eine Tumorregression sowie eine Normalisierung der pathologischen Gefäßarchitektur mit konsekutiv besserem Ansprechen von Radio- und Chemotherapie erzielt werden – allerdings nur mit transientem Effekt. Es konnte ein „escape“-Phänomen nach einer gewissen Latenzzeit mit einer erneuten Tumorprogression sowie einer „second wave of angiogenesis“ beobachtet werden. Die zugrundeliegenden Ursachen sind noch unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass alternative proangiogene Signalsysteme während einer anti-angiogenen Therapie hochreguliert werden.

Neben dem Rezeptorsystem VEGF-A/ VEGFR-2 ist der strukturell und funktionell verwandte Signalweg VEGFR-3 mit seinen Liganden VEGF-C und VEGF-D im Glioblastom stark exprimiert. Die biologische Funktion von VEGF-C und VEGF-D sowie VEGFR-3, welche bisher der Lymphangiogenese sowie Metastasenausbildung eine Rolle zugeschrieben wurden, ist im Glioblastom unklar. Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung einer anti-VEGF-A-Therapie (Bevacizumab) auf humane cerebrale Endothelzellen sowie Tumorzellen und isolierte Endothelzellen aus dem humanen Gliom zu untersuchen. Hierbei wurde insbesondere der Effekt von Bevacizumab hinsichtlich des Signalsystems VEGFR-3 mit seinen Liganden VEGF-C und VEGF-D analysiert unter dem Gesichtspunkt, dass es als strukturell und funktionell verwandtes Signalweg möglicherweise den Effekt der anti-VEGF-A-Therapie in cerebralen Endothelzellen sowie Tumor- und Endothelzellen im Glioblastom kompensieren könnte. Auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene wurde der Einfluss von Bevacizumab auf die Proliferation, Migration und Apoptosemechanismen von Gliomzellen, cerebralen und Tumor-Endothelzellen untersucht sowie hinsichtlich der in-vitro-Angiogenese von cerebralen sowie Tumor-Endothelzellen.

5 METHODEN

5.1 Isolierung von Gewebestücken sowie Zellen aus humanem Glioblastomgewebe

Nach Einverständniserklärung der Patienten und im Einklang mit dem Votum der Ethikkommission wurde das jeweilige Tumorgewebe von einem Neurochirurgen während eines operativen Eingriffs mikroskopisch identifiziert und sorgfältig reseziert. Die histopathologische Klassifikation des Tumors erfolgte gemäß der WHO-Kriterien durch die Klinik für Neuropathologie, Klinikum Großhadern, München.

Der Transport des Tumorgewebes aus dem OP-Saal in das Tumorbiologische Labor erfolgte unmittelbar nach Resektion unter sterilen Bedingungen in Eis. Unter der Laminar Air Flow Werkbank wurden größeren Blutgefäße, Thromben und nekrotische Areale mit Hilfe eines Skalpells entfernt. Für die spätere Weiterverarbeitung des Tumorgewebes bspw. mittels Immunhistochemie, PCR, Western Blot wurden drei bis vier kirschkernegroße Stücke mit Kryomedium in Plastikwannen fixiert bzw. in Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff gelagert. Für die Isolierung von Endothelzellen wurde das Gewebe von zwei Glioblastomen ($n = 2$) verwendet.

Die Fragmentation des Tumorgewebes erfolgte unter Zugabe von einigen Millilitern Isolationsmedium und die Herstellung einer homogenen, schlierenfreien Suspension mit Hilfe eines Glashomogenisators. Nach zweimaliger Zentrifugation der Suspension bei 4°C mit 2200 U/min 10min lang zentrifugiert wurde das myelinhaltige Gewebes durch Resuspension des Zellpellets mit einer Lösung aus 6g Dextran und 40ml Isolationsmedium separiert. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 4900 U/min resultierten zwei Phasen, so dass die Myelinschicht abpipettiert werden konnte. Für eine optimale Demyelinisation wurde dieser Vorgang mehrmals wiederholt. Die Herstellung einer Einzelzellsuspension erfolgte durch Inkubation mit steriler 400µl Collagenase-Dispase-Lösung (1mg/ml) und 40ml Isolationsmedium für maximal 2h bei 37°C mit 150 U/min im Wärmeschrank. Die entstandene Primärkultur konnte in einer 75cm²-Flasche in DMEM/ 20% kultiviert werden.

5.2 Immunhistochemie (Paraffinschnitte)

Unmittelbar nach Resektion des Tumorgewebes wurden die ca. 1,5 x 1,5cm großen Gewebestücke in 10 %igem Para-Formaldehyd fixiert und in flüssiges Paraffin eingebettet. Nach Abkühlung wurden mit Hilfe des Mikrotoms aus dem Paraffinblock 10µm dünne Schnitte hergestellt und auf Objektträger fixiert. Für die Entparaffinisierung erfolgte Rehydratation der Gewebeschnitte in folgender Alkoholreihe: 2x 15min Xylol, 2x 5min Ethanol 100%, 1x 5min Ethanol 96%, 1x 5min Ethanol 70%. Die Aktivität der endogenen Peroxidase wurde durch 0,3%iges Wasserstoffperoxid blockiert. Die Antigen-Demaskierung erfolgte durch 20-minütiges Aufkochen der Gewebeschnitte in einer Citrat- und anschließend EDTA-Lösung (bestehend aus 18ml 0.1M Citronensäure, 82 ml 0.1M Natriumcitrat und 900ml Aqua destillata, pH=6.0, bzw. 1mM EDTA). Nach Abkühlen der Küvette wurden die Objektträger 2x 5min in Tris-Puffer getaucht (50mM Tris + 0,3M NaCl + 0,1% Tween; pH = 7,6). Für die Färbung wurde das Dako-Cytomation LSAB-System verwendet. Unspezifische Antigene wurden durch Protein Blocking Reagenz für 30min maskiert. Der primäre Antikörper wurde in adäquater Menge in Antibody Diluent gelöst (Konzentration s. Anhang) und über nach bei einer Temperatur von 4°C inkubiert. Für die Negativ-Kontrolle diente Antibody Diluent. Zwischen den einzelnen Schritten der Färbeprozedur erfolgten jeweils sorgfältige 10-minütige Waschvorgänge mit Tris-Puffer. Das Antikörper-Signal wurde amplifiziert durch den Sekundär-Antikörper „Biotinylated anti-mouse + anti-rabbit-Ig“ für 30min und Streptavidin-Peroxidase für 20min. Für die Visualisierung des braunen Signals diente die lichtgeschützte Inkubation mit DAB-Chromogen und anschließender Gegenfärbung mit Hämatoxilin. Die Gewebeschnitte wurden unter fließendem Leitungswasser gründlich gewaschen und zuletzt mit Entellan® und dem Deckglas fixiert.

5.3 Immunzytofluoreszenz

Nach Kultivierung der gewünschten Zellen in einer 75cm²-Zellkulturflasche wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Jeweils 2000 bis 3000 Zellen wurden im Arbeitsvolumen von 100µl in ein „well“ der 96-well-Platte pipettiert. Nach Anwachsen der Zellen und Spülung mit PBS/ 1%BSA, erfolgte die

Fixierung der Zellen bei membranständigen Antigenen durch 4%-iges Para-Formaldehyd (PFA) und Inkubation für 15min bei 4°C im Kühlschrank. Für kernständige Antigene erfolgte die Inkubation mit Methanol für 5min bei -20°C. und Permeabilisierung der Zellmembran durch 1% Triton X-100 (gelöst in PBS/ 1%BSA) für 10min erreicht. Waschvorgänge erfolgten durch 10-minütige Inkubation mit PBS/ 1% BSA. Unspezifische Antigene wurden durch die Protein Blocking Reagenz maskiert. Der primäre Antikörper wurde in entsprechender Konzentration in Antibody Diluent gelöst (s.u.) und über nach bei 4°C inkubiert. Für die Negativ-Kontrolle diente Antibody Diluent.

| Antikörper | Hersteller | Spezies | Konz. Ak | Sek. Antikörper | Konz. Sek. Ak. |
|------------|------------|---------|----------|-----------------|----------------|
| VEGF-A | R&D | goat | 1,5:100 | FITC | 5:100 |
| VEGF-C | Zymed | rabbit | 2:100 | Texas Red | 0,67:100 |
| VEGF-D | R&D | mouse | 1,5:100 | FITC | 0,8:100 |
| VEGFR-2 | R&D | mouse | 2,5:100 | Texas Red | 0,67:100 |
| VEGFR-3 | Zymed | rabbit | 1:100 | Texas Red | 0,67:100 |

Die Amplifikation des Signals wurde durch Inkubation mit dem entsprechenden spezies-gerechten sekundären Antikörper für 1h bei Raumtemperatur auf einem Rüttler erzielt. Für grün fluoreszierendes Signal wurde FITC (Extinktion bei 503nm) und für rot fluoreszierendes Signal wurde Texas Red (Extinktion bei 595nm) verwendet. Die Gegenfärbung der Zellkerne wurde mit DAPI 1µg/ml für 5min durchgeführt. Die gefärbten Zellen konnten im Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung des entsprechenden Filters betrachtet und unter Beachtung der jeweiligen Belichtungszeit fotografiert werden.

5.4 Zellkultur

5.4.1 Isolierung von Tumorendothelzellen aus dem Glioblastom mit Hilfe der Dyna-beads

Die Isolierung von Endothelzellen oder von spezifischen Zellen aus Glioblastomgewebe erfolgte durch Antikörper-beladene Dyna-beads und anschließender Extraktion der entsprechenden Zellen mit Hilfe eines Magnetic Particle Separator. Nach Resuspension der zweiphasigen Dyna-bead-Lösung wurden 25µl der Lösung in ein 1ml-Eppendorf-Cup gegeben und in einen Magnetic Particle Separator gestellt, so dass die Beads (Magnetkügelchen) aufgrund der Magnetkraft innerhalb des Eppendorf-Cup in Richtung des Magnetic Particle Separator angezogen wurde und die überschüssige Lösung problemlos

abpipettiert werden konnte. Die Reinigung der Beads mit 1000µl einer PBS/0,1%BSA-Lösung (Waschlösung) nach obig beschriebenem Prinzip wurden die Dynal-beads mit entsprechenden Antikörper gekoppelt. Für den Endothelzell-Marker CD31 wurden 2µl und für VEGFR-2 und -3 jeweils 5µl der Antikörper-Lösung in 50µl der Waschlösung gelöst und die Antikörper-Beads-Suspension bei 20°C für 30min bei mittlerer Geschwindigkeit im Dynal-Rotator durchmischt. Für die Entfernung überschüssiger Antikörper-Lösung wurden drei Waschschrte vollzogen.

Die gewonnene Einzelzell-Suspension wurde im 100µm-Filter und anschließend im 40µm-Filter fragmentiert. Nach mehreren Reinigungsschritten durch Zentrifugation des Filtrats bei 20°C für 10min mit 2200 U/min wurde das entstandene Pellet in 1000µl gekühltes Isolationsmedium pipettiert. Die Zellpellet-Suspension wurde im Dynal-Rotator mit den Antikörper-gekoppelten Beads für 30min bei 4°C inkubiert, um eine Phagozytose der Beads durch die Zellen zu verhindern. Die gewünschten CD31-positiven Endothelzellen wurden mit Hilfe des Magnetic Particle Separator in mehreren Reinigungsvorgängen unter maximaler Ausbeute extrahiert. Die Ablösung der Beads von den Zellen erfolgte durch die Zugabe von Endothelzell-Medium mit 8µl DNase (50units DNase/µl) und anschließender mechanisch scharfer Resuspension mit einer 1000µl-Pipette. Durch erneute Separation im Magnetic Particle Separator konnten die Beads gelöst werden und die Zellen in Endothelzellmedium in Gelatine-beschichteten Flaschen kultiviert werden.

5.4.2 Kultivierung von Zellen

Die Lagerung der Zelllinien erfolgte in Kryoröhrchen in DMEM mit 40%FCS/20%DMSO/ ohne Antibiose bei einer Temperatur von -190°C im Stickstofftank. Für die Kultivierung wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C etwa 30 Sekunden lang aufgetaut, um möglichst kein toxische Wirkung durch DMSO auszulösen und anschließend in eine mit 15ml Medium befüllte 75cm²-Kulturflasche gegeben. Die toxische Wirkung der DMSO-Lösung wurde durch mehrmalige sorgfältige Resuspension reduziert. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit und täglicher Inspektion unter einem Lichtmikroskop.

Nach zwei bis drei Tagen wuchsen die Zellen adhärent als Monolayer. Mediumwechsel und Spülung mit sterilem PBS erfolgte alle drei bis vier Tage.

Durch Zugabe von 15ml frischen Mediums in die Das Arbeitsvolumen für eine 75cm²-Kulturflasche betrug 15ml und für 25cm²- bzw. 150cm²-Kulturflaschen 5ml bzw. 25ml.

5.4.3 Subkultivierung von Zellen

Sobald die Zellen einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, erfolgte die Subkultivierung mit 0,05% Trypsin/ EDTA für eine Minute. Unter Zugabe von entsprechendem Arbeitsvolumen an Medium erfolgte Suspension in eine neue Kulturflasche. Zur Ausplattierung von Zellen für verschiedene Assays wurde nach Zentrifugation bei 20°C bei einer Umdrehungszahl von 1200 U/min für 6min der Zellsuspension die Zellzahl mittels Trypanblau und Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für das Passagieren von Zellen, wurde meistens ein Verhältnis von 1:2 bis 1:10 gewählt und die Zellsuspension auf die entsprechenden Kulturflaschen aufgeteilt und mit passendem Medium aufgefüllt.

5.4.4 Einfrieren und Lagern von Zellen

Die Zellen wurden trypsiniert, bei 1200 U/min zentrifugiert und as entstandene Pellet wurde in 500µl antibiotika-freies Medium resuspendiert und anschließend in das mit Einfriermedium befüllte Kryoröhrchen pipettiert. Um eine Zerstörung der Zellen zu vermeiden, wurde ein mit Isopropanol befülltes Kryo-Einfriergerät bei – 80°C gelagert, so dass die Zellen schonend in einer Geschwindigkeit von 1°C/h heruntergekühlt werden konnten. Nach drei Tagen wurden die Kryoröhrchen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff einer Temperatur von -180 °C umgelagert mit dem Ziel, dass die Zellen für unbegrenzte Zeit verfügbar waren.

5.4.5 Gelatinebeschichtung von Kulturflaschen

Aufgrund der verminderten Fähigkeit der Endothelzellen zur Ausbildung eines adhärennten Wachstumsmusters auf unbeschichteten Kulturflaschen, wurde der Flaschenboden mit einer Gelatine-Lösung aus Schweinehaut (10mg/ml, Biochrom) benetzt. 2-3ml der im Wasserbad für 10min auf 37°C erwärmten zähflüssigen Gelatine wurden mit 48ml D-PBS-Puffer (+Mg, +Cl₂) resuspendiert und in der Mikrowelle aufgeköcht, um eine homogene Lösung zu erhalten. Die 25cm²-, 75cm²- und 150cm²-Kulturflaschen wurden mit jeweils 1,5ml, bzw. 3ml und bzw. 4,5ml dieser Gelatine-Lösung über nach bei 4°C benetzt und anschließend vor Zellkultivierung mit PBS gespült.

5.4.6 Assays

5.4.6.1 Proliferationsassay mit Bevacizumab/ Kontrolle

Für alle Assays wurden folgende Zelllinien und Zellen verwendet: U87, U251, U373, HBMEC und isolierte Endothelzellen aus dem Glioblastom (TUEC). Für Proliferationsassays wurden drei 96-well-Platten pro Zelllinie verwendet und pro well 2000-3000 Zellen ausgesät – die erste Platte wurde nach 24h Kultivierung der Zellen und die nachfolgende Platte nach 96h Bevacizumab-Inkubation ausgewertet. Dabei wurde Bevacizumab in unterschiedlichen Konzentrationen in 100µl DMEM/ 1%FCS pro well gelöst (5µg/ml, 10µg/ml, 100µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml), pro Gruppe vier wells verwendet. Die Kontrollgruppen bestanden enthielten reines DMEM/ 1%FCS-Medium. Für Endothelzellen wurde jeweils Endothelzellmedium ohne VEGF-A und FCS verwendet. Die Konzentration an FCS wurde minimal gewählt, um einen möglichen proproliferativen Einfluss durch FCS zu vermeiden. Die 96-well-Platten wurden nach dem jeweiligen Zeitintervall mit Hilfe des MTT-Tests ausgewertet. Dies wird in Punkt 5.2.6.4 erläutert.

5.4.6.2 Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren

| Wachstumsfaktoren | Konzentration | Hersteller | Bestellnummer |
|-------------------|---------------|------------|---------------|
| rhVEGF165 | 50ng/ml | Promokine | C-64420 |
| rhVEGF-C | 0,5µg/ml | R&D | 2179-C |
| rhVEGF-C156s | 0,5µg/ml | R&D | 752-VC/CF |
| rhVEGF-D | 0,2µg/ml | R&D | 622VD |

Proliferationsassay

Die Stimulation der Zelllinien erfolgte mit VEGF-A, VEGF-C, VEGF-C156 und VEGF-D unter Einfluss von Bevacizumab-/nicht-Bevacizumab-behandelten Zellen. Drei 96-well-Platten mit 2000 bis 3000 Zellen pro well mit 30%-iger Konfluenz wurden für die Proliferationsassays pro Zelllinie verwendet. Die einzelnen Wachstumsfaktoren wurden mit der im Datasheet beschriebenen Konzentration in 100µl serum-freiem Medium pro well gelöst. Es waren neun Gruppen vorhanden (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-C156, VEGF-A+VEGF-C, VEGF-A+VEGF-D, VEGF-C+VEGF-D, VEGF-A+VEGF-C+VEGF-D und Kontrollgruppe) mit jeweils vier wells pro Gruppe. Die Auswertung der Proliferationsassays erfolgte nach 24h Kultivierung und 96h Inkubation mittels MTT-Test. Nach 48h erfolgte ein

Mediumwechsel mit den entsprechenden Medien. Die Auswertung der Daten und die Berechnung der Signifikanz erfolgte durch das Statistikprogramm SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Windows, Version 17.0, SPSS Inc Chicago, USA). Es wurde der Student's T-Test angewandt.

5.4.6.3 Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren - Zellen nach Langzeitinkubation mit Bevacizumab/ Kontrolle

Der Proliferationsassay mit dem Ansatz der Langzeitinkubation mit Bevacizumab bzw. Kontrolle diente der Untersuchung des Proliferationsverhaltens der unterschiedlichen Zelllinien nach 14-tägiger Inkubation mit Bevacizumab-haltigem DMEM/ 1%FCS. Für die Tumorzellen (U87, U251) wurde Bevacizumab in einer Konzentration von 100µg/ml und für Endothelzellen HBMEC 250µg/ml verwendet. Während dieser 14 Tage wurde alle drei Tage ein Mediumwechsel vollzogen und ggf. subkultiviert. Die Kontrollgruppe wurde unter denselben Bedingungen untersucht, jedoch ohne Zusatz von Bevacizumab. Nach 14-tägiger Inkubation wurde wie oben beschrieben fortgefahren.

5.4.6.4 MTT-Test

Zum gewünschten Zeitpunkt wurde pro well 5µl MTT in das Medium pipettiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert und anschließend das Medium vorsichtig verworfen. Durch Zugabe von 100µl DMSO pro well wurde die Zellmembran zerstört und das durch mitochondriale Prozesse entstandene Formazan in Lösung gebracht. Diese Extinktionsänderung, die sich durch eine dunkelblauen Farbreaktion sichtbar gemacht wurde, konnte bei einer Wellenlänge von 540nm durch den ELISA-Reader detektiert werden (Referenzwellenlänge 590nm).

5.5 ELISA

5.5.1 Endogene Produktion von Wachstumsfaktoren nach Inkubation mit Bevacizumab/ Kontrolle

100.000 Zellen wurden ausgezählt, pro well in eine 12-well-Platte pipettiert und mit Bevacizumab-haltigem Medium (100µg/ml in DMEM/1%FCS für Tumorzellen und 250µl/ml in serumfreien ECM für Endothelzellen) inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde mit serumfreien Medium behandelt. Die Inkubation erfolgte über neun Tage

mit Mediumwechsel an jedem dritten Tag. Am 9. Tag wurden die Zellen mit serumfreien Medium behandelt und über Nacht inkubiert. Am 10. Tag wurde dieses Medium für den ELISA gesammelt und bei -20°C eingefroren werden. Mittels spezieller ELISA-Kits (R&D Systems) wurde der Anteil an sezerniertem VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D durch die Zellen untersucht.

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. $50\mu\text{l}$ der Standardproben für die Verdünnungsreihe sowie der Proben aus dem gesammelten Überständen der inkubierten Zellen wurden in die einzelne wells der Antikörper-beschichteten 96-well-Platte pipettiert, 2h lang inkubiert und verworfen. Anschließend wurde nach Reinigung ein enzymatisch-gekoppelter polyklonaler Antikörper ($200\mu\text{l}$ Konjugat-Lösung) für 2h zugegeben, der gegen den entsprechenden Wachstumsfaktor gerichtet ist. Nach Entfernung überschüssigen Antikörpers, wurde die entsprechende Menge an Wachstumsfaktoren durch eine Enzymreaktion ($200\mu\text{l}$ Substrat-Lösung) farblich sichtbar gemacht werden. Die entstandene Extinktionsänderung wurde durch den ELISA-Reader bei 540nm quantifiziert.

5.6 Collagen Assay

Um das Wachstumsverhalten der Zellen innerhalb einer dreidimensionalen Matrix untersuchen zu können, wurde der Starbust Assay entwickelt. Für die Generierung von Sphäroiden wurde $0,5\text{g}$ Agar Noble wurden in 50ml DMEM + 1% Glutamin gelöst, in der Mikrowelle aufgeköcht und zügig mit einer Multikanalstripette $60\mu\text{l}$ in die einzelnen wells einer 96-well-Platte pipettiert. Nach Kühlung bei 4°C für 1h und Waschen mit PBS, wurden jeweils $1000\text{-}4000$ Zellen pro well in $100\mu\text{l}$ DMEM/ 10% FCS ausplatiert und über Nacht inkubiert. Nach etwa 48h konnte im Durchlichtmikroskop die Ausbildung von Sphäroiden beobachtet werden.

Für den „starbust assay“ wurde eine Lösung aus 8ml Collagen-Lösung, 1ml NaOH und 1ml 10fach PBS (pH-Wert = $7,4$) hergestellt und jeweils $600\mu\text{l/well}$ einer 8-well-Platte pipettiert. Die 8-well-Platte wurde mittels Tesafilm luftdicht verschlossen. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht, wurden 2-3 generierte Sphäroide unter der Laminar Air Flow Werkbank unter einem Mikroskop mit einer $20\text{-}200\mu\text{l}$ -Pipette aufgenommen und in ein well der 8-well-Platte übertragen. $600\mu\text{l}$ der Collagen-Lösung wurden vorsichtig auf die erste Collagen-Schicht und dem Sphäroid pipettiert, so dass eine Art „Sandwich-Assay“ entstand. Drei verschiedene Medien wurden hergestellt: 1.) DMEM/ ECM ohne FCS und ohne Wachstumsfaktoren

(supplement kit), 2.) DMEM/ ECM mit normaler Konzentration an Wachstumsfaktoren und FCS (10%) und 3.) DMEM/ ECM mit Wachstumsfaktoren, FCS (10%) und Bevacizumab (Tumorzellen: 100µg/ml bzw. Endothelzellen: 250µg/ml). Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Brutschrank. Nach zwei bis drei Tagen konnte die Migration der Zellen aus dem Sphäroid in die dreidimensionale Matrix im Lichtmikroskop beobachtet werden. Zusätzlich wurde die Zugabe von Bevacizumab zu einem späteren Zeitpunkt untersucht.

5.7 Tube Formation Assay

Nach Vorkühlung der Pipettenspitzen und 96-well-Platten bei -20°C wurden 50µl Growth-reduced-Matrigel in ein well einer 96-well-Platte pipettiert und anschließend bei 37° für 30min inkubiert. 10.000 Zellen HBMEC und TUEC wurden pro well für das Experiment verwendet. Folgende Zellen wurden untersucht: Endothelzellen mit 48-stündiger und 14-tägiger Bevacizumab-Behandlung in den Konzentrationen 100µg/ml und 500µ/ml. Zusätzlich wurden die Wachstumsfaktoren VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D zugegeben. Nach 48h Inkubation erfolgte die Photodokumentation. Pro Gruppe wurden vier wells angesetzt und ausgewertet. Die Analyse erfolgte durch Messung der Längsachse der „Tubes“ mittels des Auswertungsprogramms DataInf-Measure (DataInf Inc. Tübingen, Germany).

5.8 Nachweis von Proteinen

5.8.1 Stimulation und Lyse der Zellen

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob sich durch den Einfluss von Bevacizumab innerhalb der Zelle an der Aktivität der Mediatoren der intrazellulären Signalkaskade eine Veränderung zeigte.

Es wurden acht 6-well-Platten - davon jeweils vier für die Kontrollgruppe und vier für die Bevacizumab-Gruppe - verwendet. Pro well wurden jeweils 100.000 Zellen pipettiert und nach 30-prozentiger Konfluenz in 1ml des entsprechenden Mediums pro well pipettiert und neun Tage lang inkubiert mit dreitägigem Mediumwechsel. Für die Bevacizumabgruppe wurde DMEM/1% FCS mit 100µg/ml Bevacizumab und für die Kontrollgruppe wurde reines DMEM/ 1%FCS verwendet. Dieses Medium wurde verworfen und serumfreies Medium zugegeben. Am 10. Tag wurde

dieses Medium abgenommen und für den ELISA eingefroren. Nach einem Waschschrift fand eine 15-minütige Stimulation mit den Wachstumsfaktoren VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-C156s in der entsprechenden Konzentration in serumfreien Medium statt. Nach Stimulation und erneuter Spülung mit PBS wurde das Lysat durch Zugabe von 500µl Lysepuffer NP40 + Protease Inhibitor Cocktail + Phosphatase Inhibitor Cocktail pro well gewonnen und konnte bei -20°C für einige Wochen aufbewahrt werden.

5.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zunächst wurde die Eichkurve im Doppelansatz durch die Kalibrierung von Standardproteinen (20µl BSA-Standard + 1ml Bradford Dye Reagenz) im Biophotometer bestimmt. 1µl der einzelnen Proben wurde mit 19µl A.d. resuspendiert und mittels Biophotometer bestimmt. Die Extinktion wurde mittels eines Biophotometers im Bereich von 595nm gemessen und anhand der Eichkurve quantifiziert.

5.8.3 Immunpräzipitation

Zunächst wurde das Lysat mittels Pipettenspitzen fragmentiert und nach Zentrifugation des Zelllysats bei 4°C bei 12.000 U/min für 3min der proteinhaltige Überstand in ein neues Eppendorf-Cup pipettiert. Um unspezifische Antigene zu maskieren, wurde pro Eppendorf-Cup wurde 50µl Protein Plus G Agarose über Nacht in einem Rotator bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation, wurde der Überstand gesammelt und die adäquate Menge an Antikörper hinzupipettiert. Die Suspension wurde über Nacht in einem Rotator bei 4°C inkubiert und Protein Plus G Agarose zugegeben. Die gewünschten Protein-Antikörper-Agarose-Komplexe wurden durch Zentrifugation bei 4°C mit 12000 U/min für 3min extrahiert werden. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen wurde das verbleibende Pellet mit 1000µl Lysepuffer NP40 (mit Zusatz von Protease Inhibitor Cocktail und Phosphatase Inhibitor Cocktail) mehrmals resuspendiert und zentrifugiert.

5.8.4 Western Blot

5.8.4.1 SDS-Page

Zur Vorbereitung wurden die vorgefertigten Elektrophorese Gele mit 10%Tris-HCL die vorgefertigten Elektrophorese-Gele aus der Verpackung genommen und nach

Präparation in die mit gekühltem Elektrophorese-Puffer befüllten Blotkammer eingesetzt. Die in Lysepuffer NP40 + Proteinase Inhibitor Cocktail + Phosphatase Inhibitor Cocktail gelösten Proteine wurden bei 4°C mit 12000 U/min für 3min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Cup übertragen. Für die Detektion von Proteinen war eine Proteinmenge von mindestens 15µg erforderlich. Das jeweilige Volumen der Probe wurde mit 10µl der Lösung aus Lämmli-Puffers/ 5% Mercaptoethanol bei 95°C für 5min erhitzt, so dass Sekundärstrukturen der Proteine aufgebrochen wurden.

Im Anschluss an die Immunpräzipitation konnte nach der letzten Zentrifugation direkt 20µl Lämmli-Puffer/ 5% Mercaptoethanol in die jeweiligen Eppendorf-Cups pipettiert werden und von den Agarose-Beads durch Zentrifugation mit 12000 U/min abgelöst werden. Im vorliegenden Versuch betrug die Gesamtproteinmenge der Proben ca. 1,5 bis 1,7mg/ml und war in allen Proben nahezu identisch. Es war eine Proteinmenge von mehr als 1 mg/ml für die Detektion von VEGFR-2 und -3 erforderlich. 27µl jeder Probe und 1,5µl des Kaleidoscope-Markers (25kDa bis 250kDa) wurden langsam in die Taschen der Elektrophorese-Gele pipettiert. In die nicht befüllten Taschen wurde 27µl Lysepuffer + Lämmli-Puffer/ 5% Mercaptoethanol pipettiert, um einen gleichmäßigen Transfer zu erhalten. Der SDS-Page wurde an eine Spannung von 110 Volt für 55min angeschlossen.

5.8.4.2 Blot

Nach Zuschneiden der PVDF-Membran auf die Größe der Elektrophorese-Gele erfolgte die Inkubation für 5min in Methanol und anschließend für 10min in TB-Puffer. Pro Elektrophorese-Gel wurden ein in TB-Puffer angefeuchtetes Fiberpad und drei Blotting-Papers verwendet. Im Anschluss wurde das Elektrophorese-Gel aus der Kammer entfernt, die Taschen abgeschnitten und das Elektrophorese-Gel wurde in TB-Puffer von der Plastikplatte gelöst. Nach Assemblierung der Kassette der Blotkammer entsprechend dem Spannungsgefälle, konnten die Proteine von dem Elektrophorese-Gel auf die Membran transferiert werden bei einer Spannung von 110 Volt über 90min in einer mit Eis befüllten Schale.

5.8.4.3 Detektion der Proteinbanden

Um den Transfer von Proteinen auf die PVDF-Membran zu vergewissern wurde die Membran für 5min in Ponceau-Lösung inkubiert und dabei die Proteinbanden

rot angefärbt. In den nachfolgenden Schritten erfolgten jeweils 5-minütige Waschschrte in gekühltem TTBS. Unspezifische Bindungen wurden für phosphorylierte Proteine mit 30ml einer 5%igen BSA-Lösung und für nicht-phosphorylierte Proteine mit 30ml einer 5%igen Milchpulver-Lösung für 1h bei RT maskiert. Die Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper erfolgte in 0,4%iger BSA-/Milchpulver-Lösung über Nacht bei 4°C auf einem Rüttler. Am folgenden Tag wurde der spezie-gerechte sekundäre Antikörper in einem Verhältnis von 1:10.000 in 25ml Inkubationslösung pipettiert und die Membran für 1h bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert. Das spezifische Protein wurde mit Hilfe eines Chemiluminiszenz-Verstärker-Systems (1ml Immunostar Luminol Enhancer + 1ml Peroxid-Reagenz) in der Dunkelkammer auf einem hochempfindlichen Röntgenfilm (Super X-Ray RX, Fuji) je nach Sensitivität für eine Dauer von 10 sec bis zu 30min inkubiert und mittels der Scopix LR 5200 entwickelt. Die Belichtungszeit des Films war von der Proteinmenge und der Spezifität des Antikörpers abhängig, d.h. die Belichtungszeit für VEGFR-2 und -3 betrug bis zu 10min im Gegensatz zu einer Belichtungszeit von 1min bei β -Actin.

5.8.4.4 „Strippen der Membran“

Um die Membran wiederzuverwenden und mit einem neuen Antikörper zu inkubieren, wurde die Membran zwei Mal mit TTBS gewaschen und mit Stipping-Buffer bei 50°C auf einem Rüttler inkubiert. Nach drei erneuten Waschschrten mit TTBS, wurde die Membran in die entsprechende Blocking-Lösung für 1h bei Raumtemperatur getaucht. Die weiteren Schritte erfolgten analog wie oben beschrieben.

5.9 Durchflusszytometrie

Sowohl die Glioblastomzellen U87, U251 als auch isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom sowie cerebralen Endothelzellen wurden für 5 Tage bzw. 14 Tage mit Bevacizumab (100 μ g/ml und 500 μ g/ml) sowie Zytostatika (5-Fluoruracil 10 μ g/ml und Cisplatin 2 μ g/ml) als Positiv-Kontrolle und ohne Zusätze als Negativ-Kontrolle inkubiert. Alle 72h erfolgte Mediumwechsel mit Kollektion der apoptotischen Zellen im Überstand. Für die Durchflusszytometrie wurden die Proben mit dem „Annexin V Apoptosis detection Kit“ (BD Science) vorbereitet. 3,0

$\times 10^6$ Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsinisiert (ohne EDTA) und in „binding buffer“ resuspendiert. 5 μ l der FITC-konjugierten Annexin V-Lösung aus dem Kit wurden zugegeben und für 10 bis 15 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumiodid (1 μ g/ml) für 5min inkubiert. Die FACS-Analyse erfolgte für das FITC-Signal im FI-1 Detektor (Ex = 488nm; Em = 530 nm) und für das Propidiumiodid-signal im FI-2 Detektor im FACSCalibur Flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, California, USA). Es wurden jeweils 50.000 Zellen analysiert. Die Bestimmung erfolgte jeweils vierfach. Die Datenanalyse erfolgte mittels Flowjo® (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

5.10 Tiermodell

Das orthotope Tierversuchsmodell wurde von unserer Kooperationsgruppe in der Neurochirurgischen Klinik, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Lamszus durchgeführt (nach Kunkel et al.). Hierbei wurden in 6-8 Wochen alten immundefizienten weiblichen SCID-Mäusen (Typ C.B.-17, 11-12 Wochen alt) unter Narkose mit Ketamin i.p. (100mg/kg KG) und Xylazine (5mg/kg KG) mittels einer Hamilton-Spritze humane 7×10^4 Gliomzellen G55 in die Basalganglien stereotaktisch implantiert. Die Mäuse erhielten ab dem Tag der Tumor-Implantation täglich 800 μ g DC101 i.p. (VEGFR-2-Inhibitor, ImClone Systems, Inc. New York) bzw. PBS i.p. in der Kontrollgruppe bis zum 16. Tag. Anschließend wurden die Mäuse durch CO₂-Narkose eingeschläfert. Das Gewebe wurde nach Standardprotokoll in Paraffin eingebettet und Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt.

Die Präparatschnitte wurden uns freundlicherweise für die immunhistochemischen Färbungen zur Verfügung gestellt.

6 ERGEBNISSE

6.1 Expressionsanalyse von angiogenen Rezeptorsystemen im Glioblastom

Um den Einfluss von Bevacizumab auf Tumor- und Endothelzellen zu untersuchen, wurde zunächst untersucht, ob die verwendeten Tumor- und Endothelzellen sowie das Glioblastomgewebe die entsprechenden Rezeptorsysteme VEGFR-2 und VEGFR-3 sowie deren Liganden exprimieren.

6.1.1 Immunhistochemie in Glioblastom-Gewebeschnitten

In der Immunhistochemie der Gewebeschnitte aus humanem Glioblastomgewebe findet sich positives Signal für VEGFR-3 hauptsächlich im Gefäßendothel sowie in einigen Zellen distant der Gefäße (Abb. 3, Bild A und B).

Die Expression von VEGF-C und VEGF-D ist ebenfalls auf Endothelzellen von Gefäßlumina zu beobachten sowie auf Zellen, ähnlich wie bei VEGFR-3, die nicht der Vaskularisation angehören, sondern im Tumorparenchym lokalisiert sind (Abb. 3, Bilder C-F).

6.1.2 Immunzytofluoreszenz in Tumor- und Endothelzelllinien

Abb. 4 zeigt den immunzytochemischen Nachweis von VEGFR-2 und -3 sowie VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D in der Tumorzelllinie U87 und der Endothelzelllinie HBMEC aus dem Normalhirn. Die Expression der Faktoren und Rezeptoren war in U251 analog (Daten nicht aufgeführt). Über 90% aller Zellen waren für die zwei Rezeptorsysteme mit ihren Liganden positiv. Mikroskopisch erstreckt sich das Fluoreszenzsignal für alle Marker auf der Zellmembran (siehe Abb. 4, A -F).

Die entsprechenden Negativ-Kontrollen zeigten keinerlei positives Signal, ausschließlich die Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Alle Zellen wurden nach der ersten oder zweiten Passage gefärbt und für die nachfolgenden Experimente verwendet.

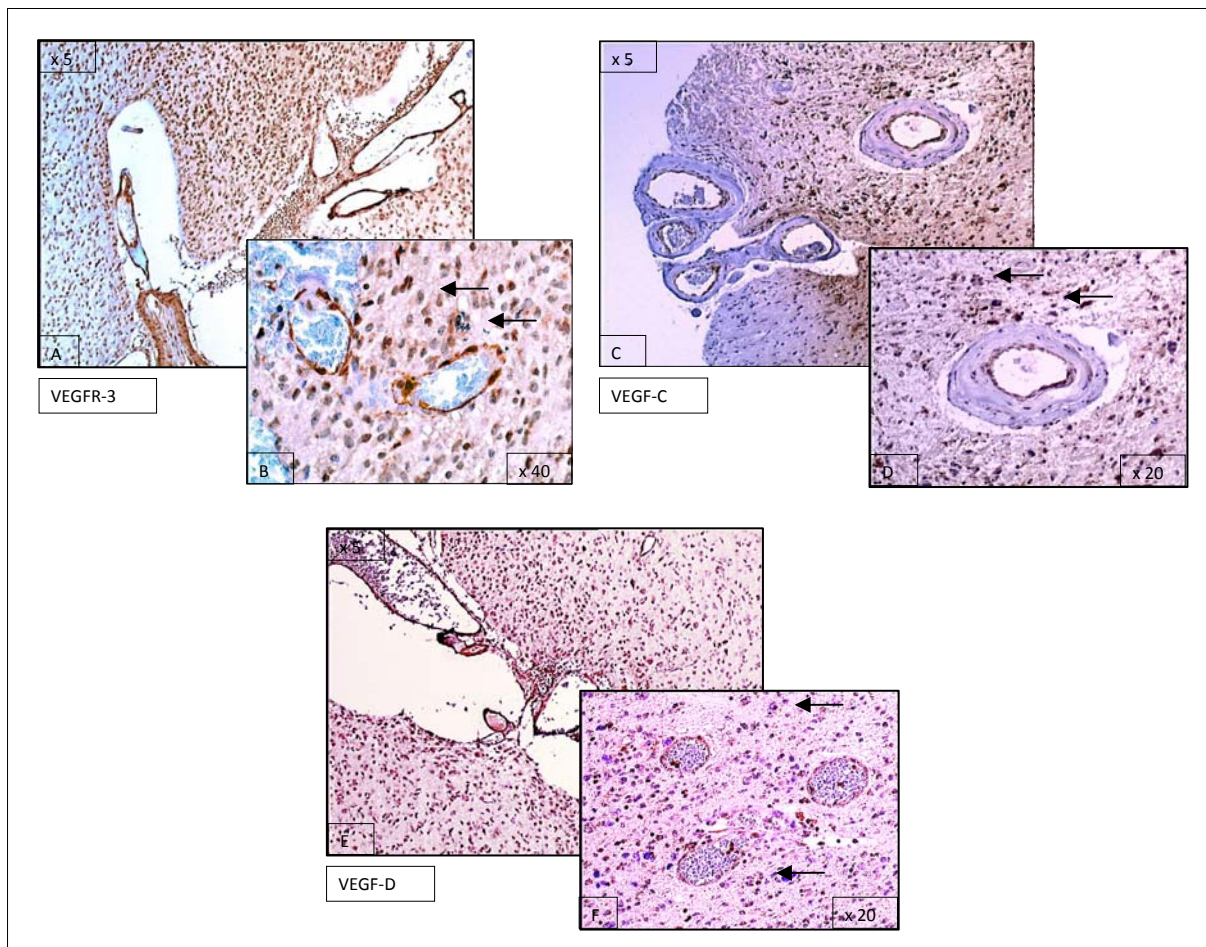


Abb. 3: Die Bilder A-F zeigen den immunhistochemischen Nachweis von VEGFR-3 (Bild A, B), VEGF-C (C, D) und VEGF-D (E, F) in Paraffinschnitten von humanem Glioblastomgewebe. Die Bilder A und B zeigen positives Signal für VEGFR-3 im Gefäßendothel sowie in einer Vielzahl von Zellen, die distal von den Gefäßlumina lokalisiert sind (schwarze Pfeile). In den Bildern C und D ist die immunhistochemische Expression von VEGF-C und in den Bildern E und F die Expression von VEGF-D dargestellt. Auch hier ist die Expression nicht nur auf Endothelzellen beschränkt, sondern findet sich auch in distalen Zellen im Tumorgewebe. Es findet sich positives Signal für VEGFR-3, VEGF-C und -D auf Endothelzellen im Bereich der Gefäßlumina sowie in einigen Zellen distal von Gefäßen (schwarze Pfeile). Vergrößerung 5x, 20x und 40x.

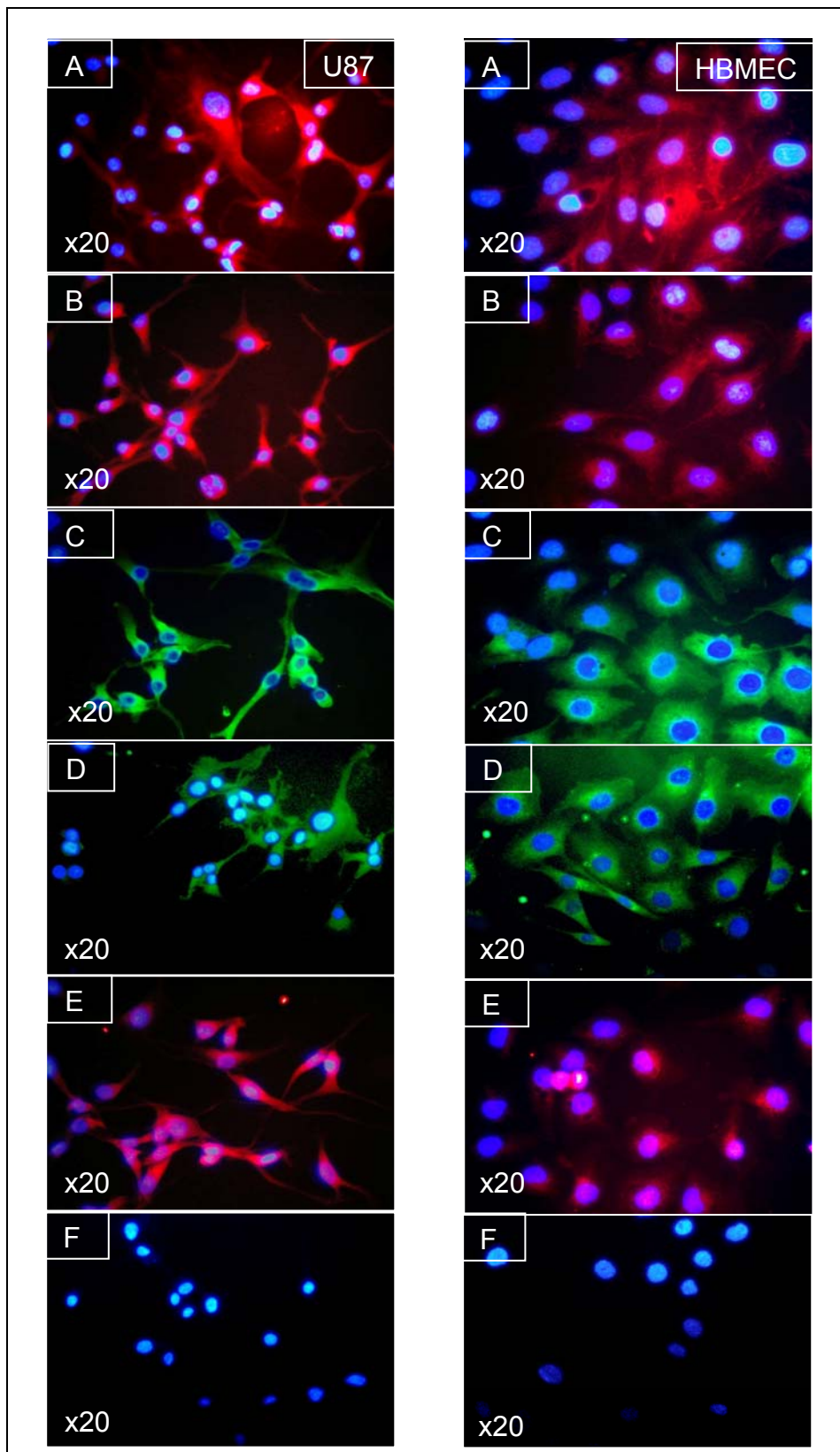


Abb. 4: Immunzytochemie für VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D, VEGFR-2, und VEGFR-3 in HBMEC und U87. Die Immunfluoreszenz-färbung erfolgte mit Texas-Red (rot) und FITC (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt (Vergrößerung: 20fach). Sowohl die Tumorzelllinien U87, U251 (hier nicht aufgeführt) und die Endothelzelllinie HBMEC exprimieren die Rezeptoren VEGFR-2 und -3 sowie die Liganden VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D in > 90% der Zellen. Die Expression der Faktoren stellt sich in der Zellmembran dar. A = VEGF-A, B = VEGF-C, C = VEGF-D, D = VEGFR-2, E = VEGFR-3, F = Negativ-Kontrolle

6.1.3 Nachweis von VEGFR-2 und -3 in Glioblastomgewebe durch Western Blot

Abb. 6 zeigt die Expression von VEGFR-2 und -3 in Glioblastomgewebe von drei Tumorproben TB266, TB274 und TB365. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben bezüglich der detektierbaren Banden von VEGFR-3. Prinzipiell ist der VEGFR-3 in der unprozessierten Form bei 195 kDa detektierbar (variabel je nach Antikörper) sowie in zwei prozessierten Formen bei 125 kDa und 70 kDa.

In den durchgeführten Western Blots war die Bande von VEGFR-3 nur auf Höhe von 125kDa nachzuweisen, die unprozessierte Form bei 195kDa war nicht detektierbar. Für VEGFR-2 konnte nur eine Bande auf 195kDa festgestellt werden. Der Gesamtproteinanteil der Proben wird durch β -Actin (42kDa) dargestellt. Insgesamt war das Signal von VEGFR-2 und -3 nur relativ schwach zu verzeichnen, dennoch nachweisbar. In den Tumorproben korrelierte die Menge an VEGFR-2 und -3 nicht mit der Gesamtproteinmenge.

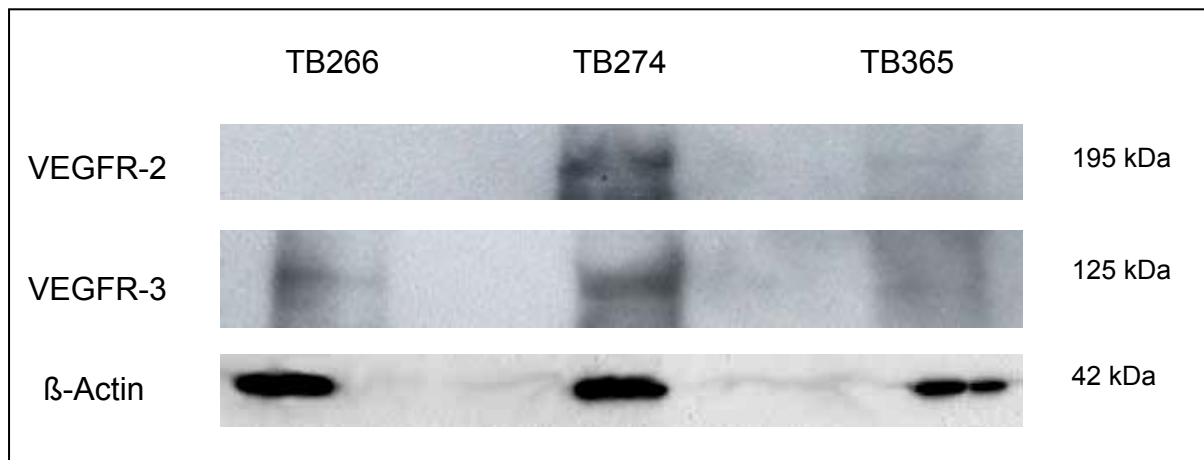


Abb. 5: Nachweis von VEGFR-2 und VEGFR-3 auf Proteinebene mittels Immunpräzipitation und anschließendem Western Blot in den Tumorproben TB 266, TB 274 und TB 365 von Glioblastomgewebe. Die Kontrolle der Gesamtproteinmenge erfolgte durch β -Actin. Belichtungszeit für VEGFR-2 und -3: 15min, für β -Actin: 5min.

6.1.4 Immunzytofluoreszenz auf isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom

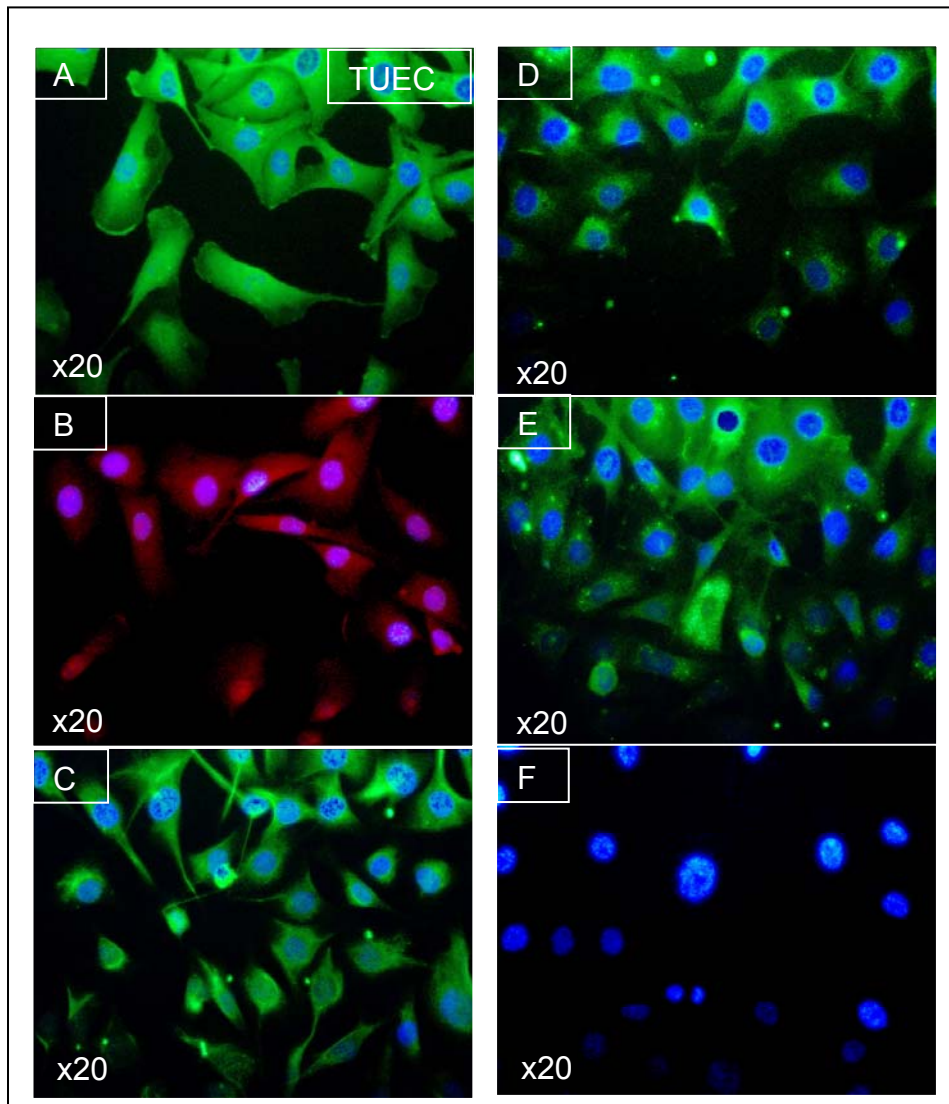


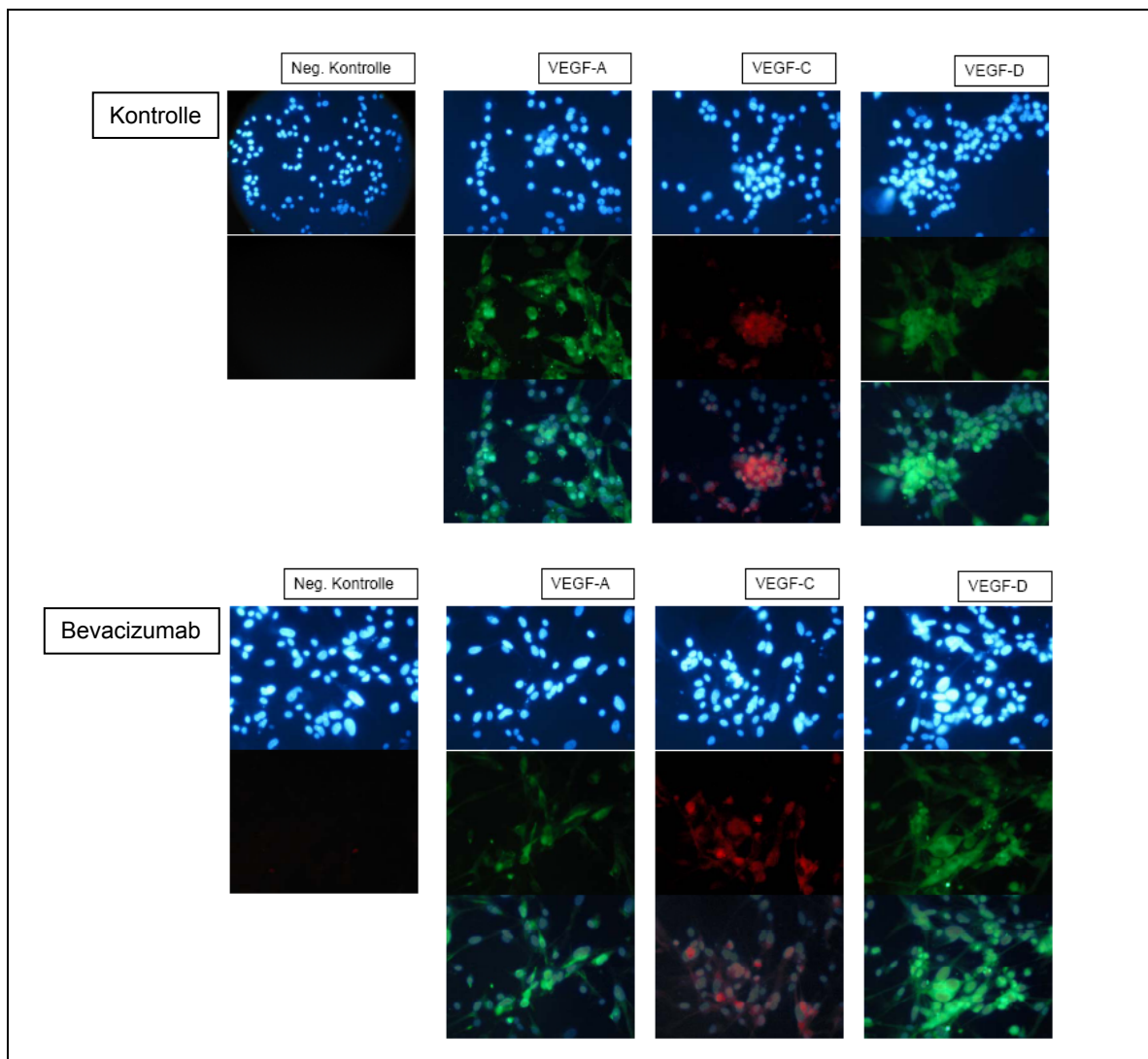
Abb. 6: Immunzytochemie für VEGF-A (Bild A), VEGF-C (Bild B), VEGF-D (Bild C), VEGFR-2 (Bild D) und VEGFR-3 (Bild E) in isolierten CD31-positiven Tumor-Endothelzellen auf dem Glioblastom (TUEC). Die Immunfluoreszenz-färbung erfolgte mit Texas-Red (rot) und FITC (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt (Vergrößerung: 40fach). Das Fluoreszenzsignal der Marker erstreckt sich über die gesamte Zellmembran der Endothelzellen. Die Negativ-Kontrolle zeigte kein Signal (F).

Für die nachfolgenden Experimente wurden Endothelzellen aus Glioblastomgewebe isoliert. Die Isolation erfolgte durch den für Endothelzellen charakteristischen Rezeptor CD31. Die isolierten CD31-positiven Tumor-Endothelzellen (TUEC) zeigten ebenfalls in über 90% die Expression von VEGFR-2, VEGFR-3, VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D (Abb. 6). Um die Reinheit der Population nachzuweisen, wurde der CD31-Rezeptor auf den Endothelzellen gefärbt. Die Immunhistochemie zeigte für CD31 ein positives Signal in mehr als 90% der Zellen (Daten nicht aufgeführt).

6.2 Einfluss von Bevacizumab auf Tumor- und Endothelzellen

6.2.1 Einfluss von Bevacizumab auf die immunzytochemische Expression von VEGFR-2 und -3 auf Tumor- und Endothelzellen

Weder nach einer kurzzeitigen noch nach einer langfristigen Inkubation von Bevacizumab konnte eine Veränderung der Morphologie der einzelnen Zellen sowie des Wachstumsmusters festgestellt werden. Des Weiteren zeigte sich auf immunzytochemischer Ebene keine Veränderung der Expression von VEGFR-2, VEGFR-3, VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D nach Inkubation mit Bevacizumab für 96h (Abb. 7). Sowohl die Endothelzellen als auch die Tumorzellen zeigten unter Einfluss von Bevacizumab eine konstante Expression der proangiogenen Faktoren von >90% (Daten der U251, HBMEC und TUEC nicht aufgeführt, da analog zu den immunzytochemischen Bildern in Abb. 4 und Abb. 6).



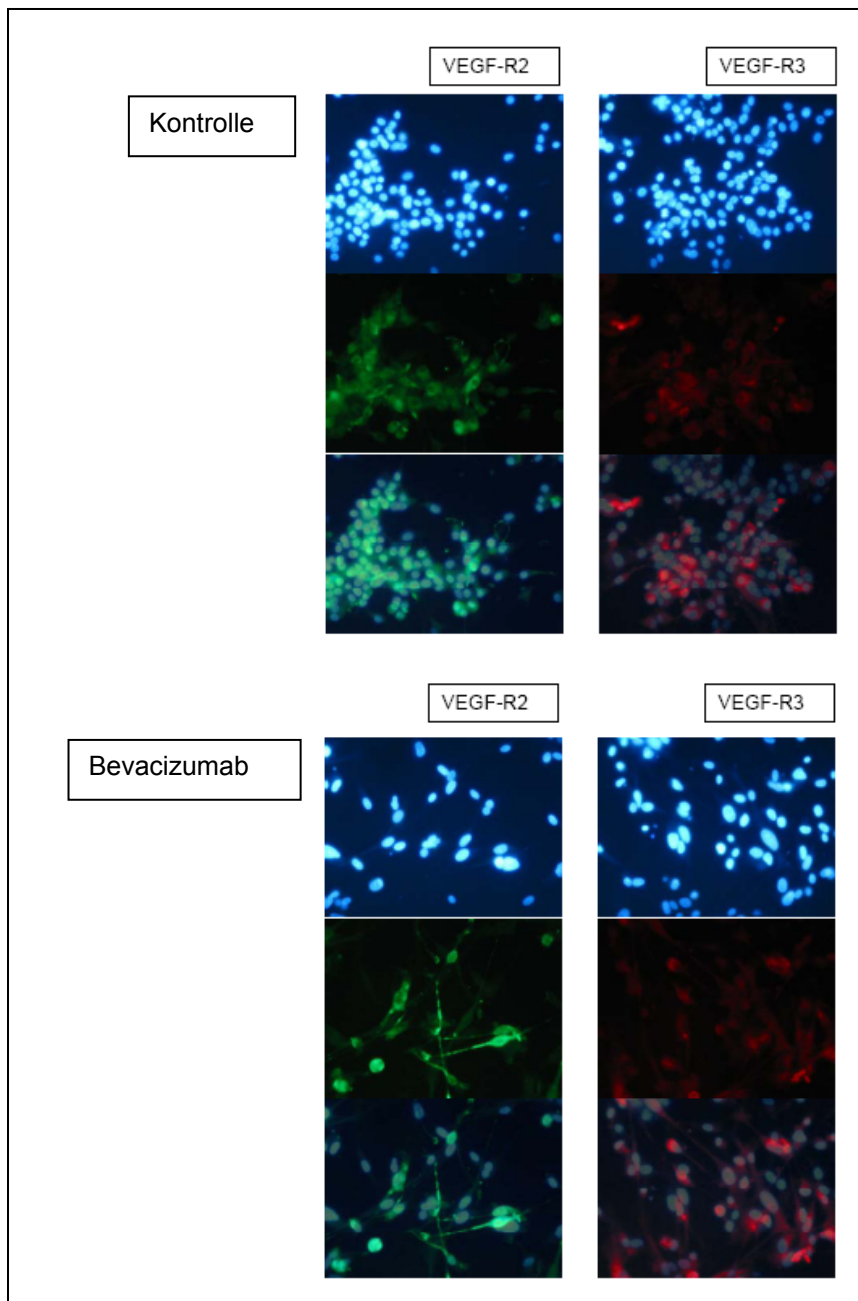


Abb. 7: Einfluss von Bevacizumab auf die Expression von VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D sowie die Rezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3 auf immunhistochemischer Ebene in U87-Gliomzellen nach 96h. Die Belichtungszeit betrug in für alle Färbungen 8ms. Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss von Bevacizumab auf die Expression der Rezeptorsysteme sowie der zugehörigen Liganden.

6.2.2 Einfluss von Bevacizumab auf die Rezeptorexpression von VEGFR-2 und -3 im Western Blot

Im Western Blot erzielte Bevacizumab keinen Einfluss auf die Proteinexpression von VEGFR-2 und -3. Die Zelllysate der Tumorzellen zeigten gleiche Proteinmengen von VEGFR-2 und -3 in der Kontroll- und Bevacizumab-Gruppe.

Da die Expression von VEGFR-2 und VEGFR-3 auf Western Blot-Ebene nur sehr gering ist und möglicherweise auf methodische Probleme zurückzuführen ist, lassen sich keine quantitativen Aussagen über den Einfluss von Bevacizumab treffen. Daher wurde der Western Blot hier nicht aufgeführt.

6.2.3 Einfluss von Bevacizumab auf das Proliferationsverhalten von Tumor- und Endothelzellen

Es wurde untersucht, ob und in welchen Konzentrationen Bevacizumab einen wachstumshemmenden Effekt auf Tumor- und Endothelzellen darstellte. Hierbei wurde die Proliferation der Zellen unter dem Einfluss von Bevacizumab in den Konzentrationen 5 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml und 500 µg/ml ermittelt. Die Proliferation wurde nach 96h mittels MTT-Test bestimmt. Nach 96h zeigte sich kein signifikanter Einfluss von Bevacizumab in den Konzentrationen 5µg/ml – 500µg/ml für die Glioblastomzelllinien, HBMEC und isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom (TUEC) (Abb. 8, A - D).

Es wurde für die nachfolgenden Experimente die mittlere Bevacizumab-Konzentration nach Literaturangaben für Tumorzellen 100µg/ml und Endothelzellen 250µg/ml verwendet.

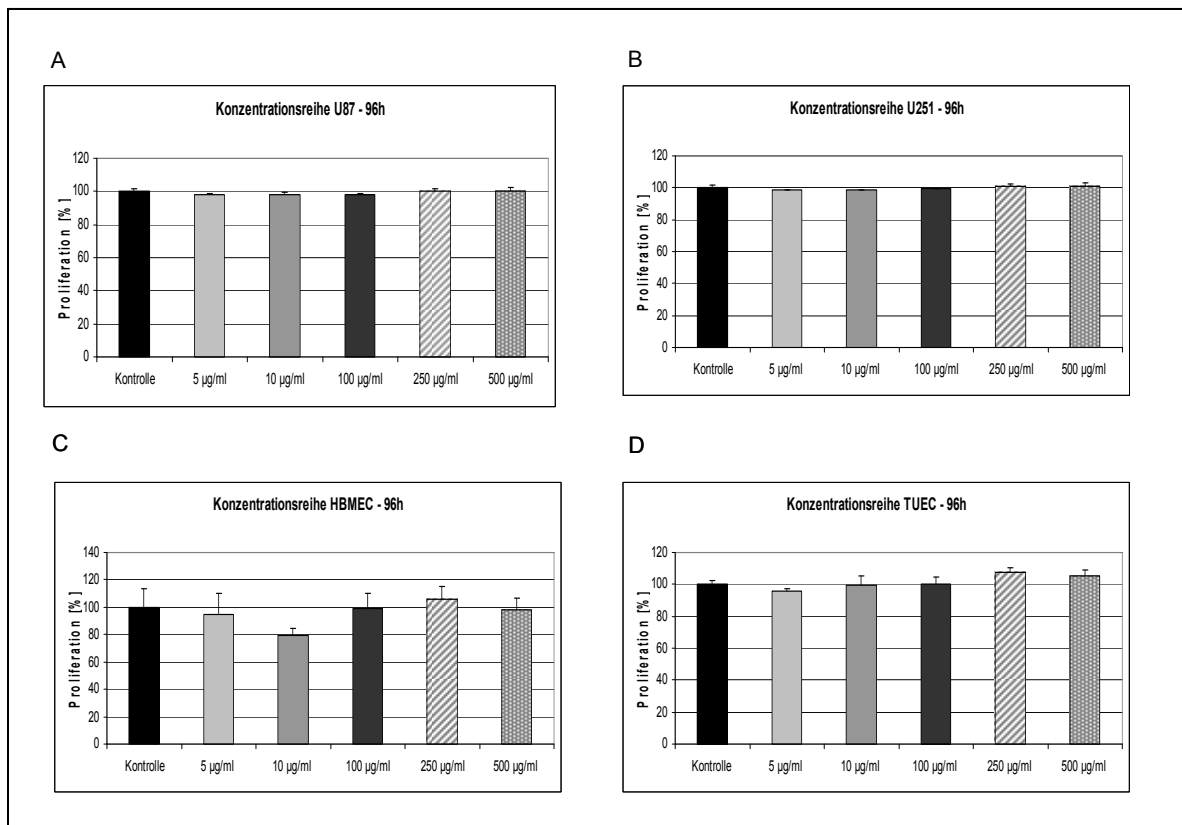


Abb. 8: Einfluss von Bevacizumab auf das Proliferationsverhalten von Tumor- und Endothelzellen in einer Konzentrationsreihe von 5-500µg/ml nach 96h. Auswertung des Proliferationsverhaltens mittels MTT-Test. Die Kontrolle beschreibt die unbehandelte Gruppe (auf 100% gesetzt). Nach 96h zeigte sich kein Einfluss von Bevacizumab sowohl auf die Gliomzelllinien U87 (Bild A) und U251 (Bild B) sowie auf die Endothelzelllinie HBMEC (Bild C) und die isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom TUEC (Bild D).

6.3 Einfluss der einzelnen Wachstumsfaktoren auf das Proliferationsverhalten von Tumor- und Endothelzellen

6.3.1 Einfluss einer Langzeit-Bevacizumab-Inkubation auf das Proliferationsverhalten

Es wurde untersucht, ob eine Langzeit-Bevacizumab-Inkubation über 14 Tage (Tumorzellen: 100µg/ml Bevacizumab, Endothelzellen 250µg/ml Bevacizumab) einen Einfluss auf die Proliferation der Tumor- und Endothelzellen darstellte. Die Proliferation der Zellen wurde nach 96h mittels MTT-Test gemessen. Prinzipiell hat Bevacizumab nach Langzeitinkubation einen anti-proliferativen Effekt auf Tumorzellen, so dass das Wachstum der U87 und U251-Zellen signifikant in ihrem Wachstum gehemmt wurden (U87: $p = 0,0004$, U251: $p = 0,0004$).

Die Endothelzellen HBMEC und Tumor-Endothelzellen TUEC wurden durch die Bevacizumab-Inkubation in ihrem Wachstumsverhalten ebenso beeinträchtigt (HBMEC: $p = 0,0006$, EC TB402 $p = 0,0232$).

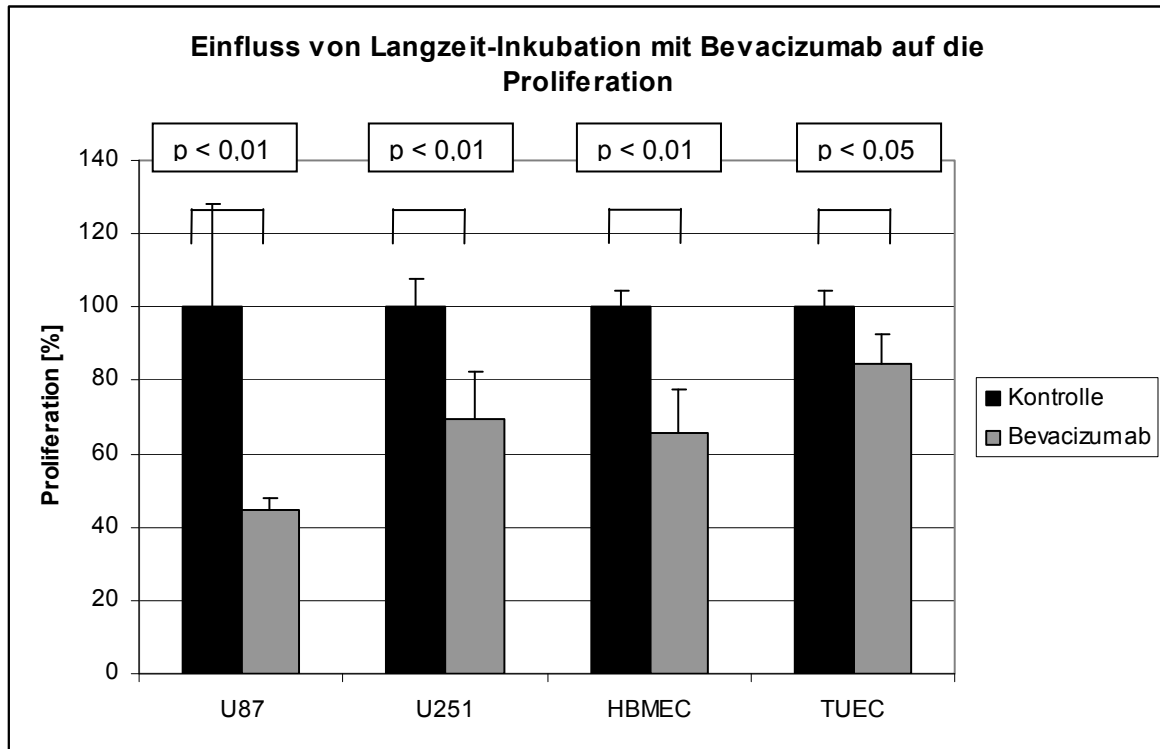


Abb. 9: Einfluss von Bevacizumab auf das Proliferationsverhalten von Tumor- und Endothelzellen nach Langzeit-Bevacizumab-Inkubation (14d) in der Konzentration $100\mu\text{g/ml}$ für Tumorzellen und $250\mu\text{g/ml}$ für Endothelzellen. Auswertung des Proliferationsverhaltens mittels MTT-Test. Die Proliferation nach 96h wird in den Tumorzellen nach Langzeit-Bevacizumab-Inkubation signifikant reduziert ($p < 0,01$ für U87, U251, HBMEC und $p < 0,05$ für TUEC).

6.3.2 Einfluss der Wachstumsfaktoren auf das Proliferationsverhalten nach 14-tägiger Bevacizumab-Behandlung

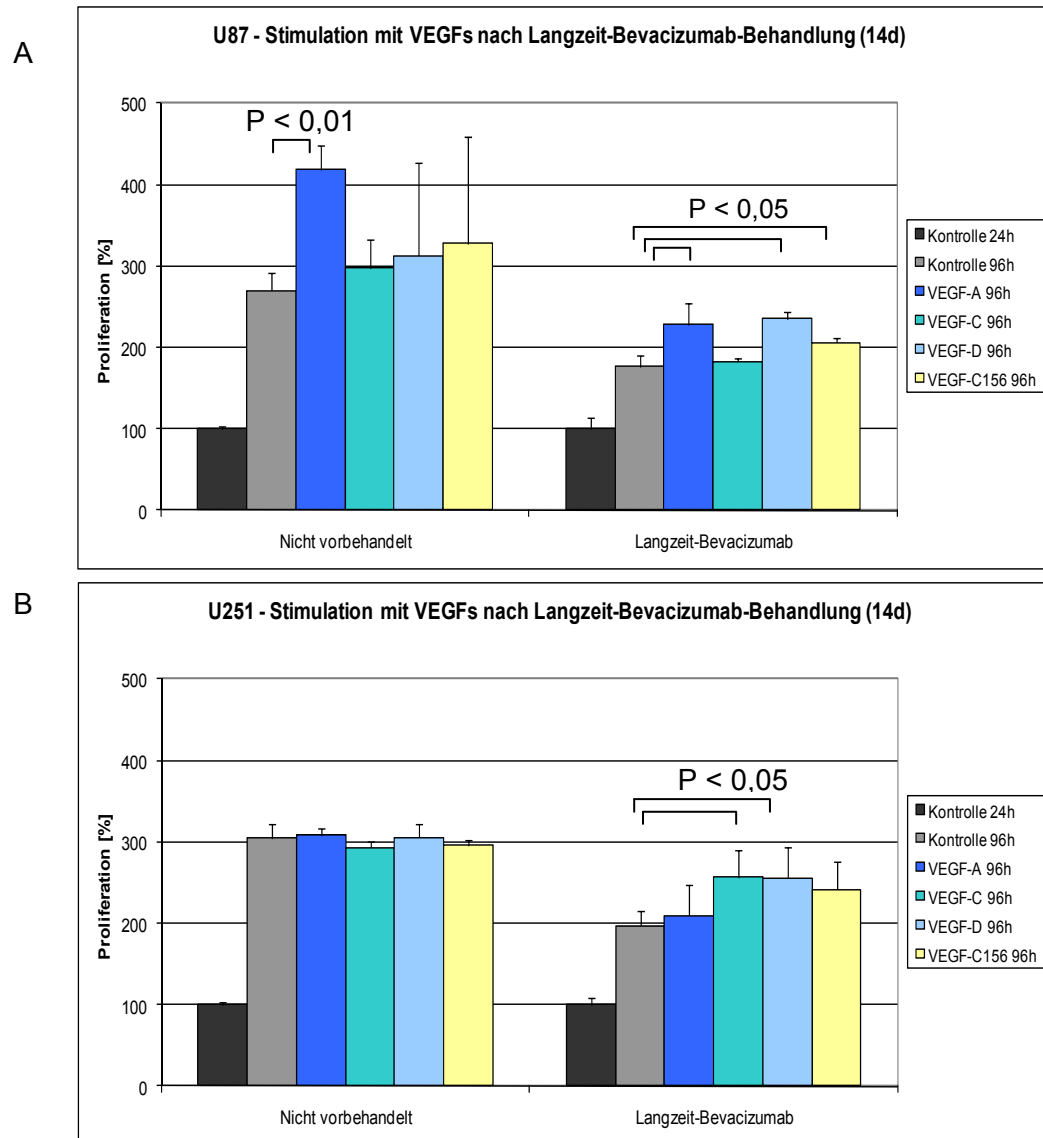


Abb. 10: Einfluss der verschiedenen Wachstumsfaktoren (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-C156s) nach Langzeit-Inkubation mit Bevacizumab auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen (U87 und U251) im Vergleich zur Nicht-vorbehandelten Gruppe. Auswertung des Proliferationsverhaltens mittels MTT-Test nach 96h.

Die **U87-Tumorzellen** werden unter Normalbedingungen durch VEGF-A in ihrer Proliferation stimuliert ($p < 0,01$). Nach Langzeit-Inkubation der U87-Zellen ist die Proliferationsrate insgesamt reduziert, jedoch wird sie durch VEGF-A, VEGF-D und VEGF-C156 insgesamt signifikant gesteigert ($p < 0,05$). Die **U251-Tumorzellen** werden unter Normalbedingungen durch die Wachstumsfaktoren nicht stimuliert, allerdings verändert sich das Ansprechen auf die Faktoren nach Langzeit-Inkubation mit Bevacizumab. Die U251-Tumorzellen werden durch VEGF-C und VEGF-D signifikant in ihrem Wachstum stimuliert ($p < 0,05$).

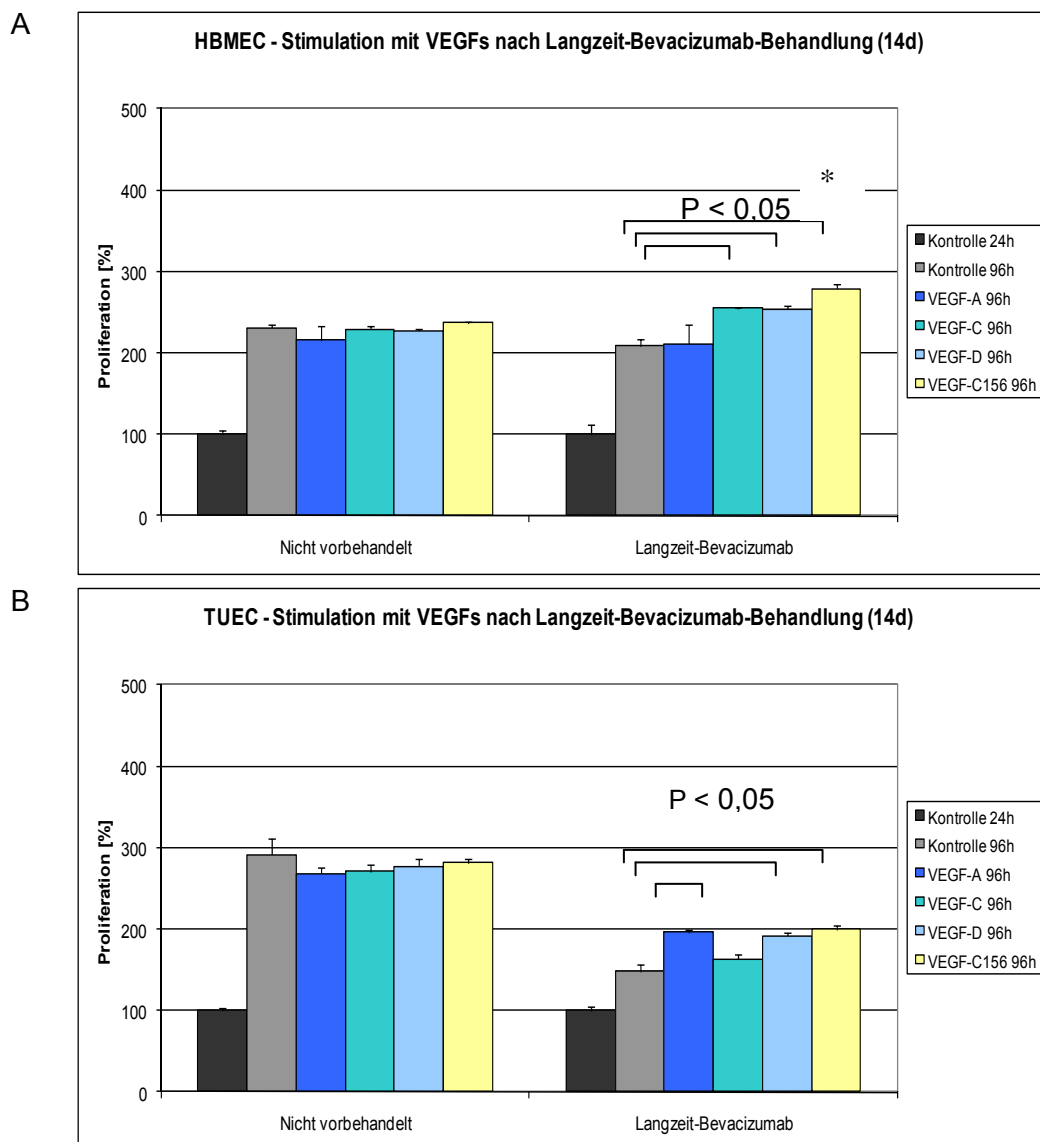


Abb. 11: Einfluss der verschiedenen Wachstumsfaktoren (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-C156s) nach Langzeit-Inkubation mit Bevacizumab auf das Proliferationsverhalten von Endothelzellen (HBMEC und EC TB402) im Vergleich zur Nicht-vorbehandelten Gruppe. Auswertung des Proliferationsverhaltens mittels MTT-Test nach 96h. Die Kontrollgruppe wurde nicht durch Wachstumsfaktoren stimuliert.

Die HBMEC werden unter Normalbedingungen durch die Wachstumsfaktoren nicht stimuliert, allerdings verändert sich das Ansprechen auf die Faktoren nach Langzeit-Inkubation mit Bevacizumab. Die HBMEC werden durch VEGF-C, VEGF-D ($p < 0,05$) und VEGF-C156 signifikant in ihrem Wachstum stimuliert (* $p < 0,01$).

Die isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom (TUEC) werden unter Normalbedingungen nicht durch die Wachstumsfaktoren zur Proliferation angeregt. Nach Langzeit-Inkubation EC TB402 ist die Proliferationsrate insgesamt reduziert, jedoch wird sie durch VEGF-A, VEGF-D und VEGF-C156 insgesamt signifikant gesteigert ($p < 0,05$).

Der MTT-Test zeigte, dass die Proliferation der Tumorzelllinie U87 (Abb. 10, A) sowohl unter Normalbedingungen als auch mit Bevacizumab-Behandlung unter Einfluss von VEGF-A zu einer signifikanten Zunahme führte (Kontrolle: $p < 0,01$,

Langzeit-Bevacizumab: $p < 0,05$). Ohne Vorbehandlung hatten VEGF-C und VEGF-D keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Tumorzellen. Nach 14-tägiger Bevacizumab-Behandlung jedoch verändert sich das Ansprechen der Tumorzellen auf die lymphangiogenen Faktoren. Durch Inkubation mit VEGF-A, VEGF-D und VEGF-C156 wurde das Wachstumsverhalten der Zellen deutlich stimuliert (VEGF-D: $p < 0,01$, VEGF-C156: $p < 0,01$).

Ebenso ließ sich dieser Effekt bei den U251-Gliomzellen nachweisen (Abb. 10, B). Unter Normalbedingungen zeigten die Wachstumsfaktoren keinen Einfluss auf die Proliferation. Nach Langzeit-Bevacizumab-Behandlung jedoch wurden die Tumorzellen durch die Faktoren VEGF-C und VEGF-D stimuliert (VEGF-C: $p < 0,05$, VEGF-D: $p < 0,05$).

Für die HBMEC konnte unter Normalbedingungen durch die Wachstumsfaktoren keine signifikante Proliferationssteigerung erzielt werden (Abb. 11). Nach Langzeit-Bevacizumab-Inkubation jedoch erreichten die Faktoren VEGF-C, VEGF-D und VEGF-C156 eine deutliche Steigerung des Wachstums, so dass der wachstumshemmende Einfluss von Bevacizumab gemindert werden konnte (VEGF-C: $p < 0,05$, VEGF-D: $p < 0,05$, VEGF-C156: $p < 0,01$).

Die isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom reagierten ohne Vorbehandlung nicht mit einer Proliferationssteigerung durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren (Abb. 11). Nach Vorbehandlung mit Bevacizumab konnte durch Zugabe von VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-C156 jedoch das Wachstum signifikant gesteigert werden (VEGF-A: $p < 0,01$, VEGF-C: $p < 0,01$, VEGF-D: $p < 0,01$, VEGF-C156: $p < 0,05$).

6.4 Einfluss von Bevacizumab auf die endogene Produktion von Wachstumsfaktoren der Tumor- und Endothelzellen nach zehntägiger Inkubation mit Bevacizumab

Die Quantität an sezerniertem VEGF-A war sowohl in allen Zelllinien als auch in den Tumorendothelzellen nach Bevacizumab-Inkubation um mindestens ein Zehnfaches geringer ($p < 0,01$, zweiseitiger Test). Unter normalen Bedingungen sezernierten die Tumor- und Endothelzellen zwischen 2000 bis 2500pg/ml VEGF-A, während die behandelten Zellen nur noch zwischen 70 bis 240pg/ml VEGF-A

sezernierten. Die minimale nachweisbare Konzentration für VEGF-A betrug 5,0 pg/ml (Abb. 12).

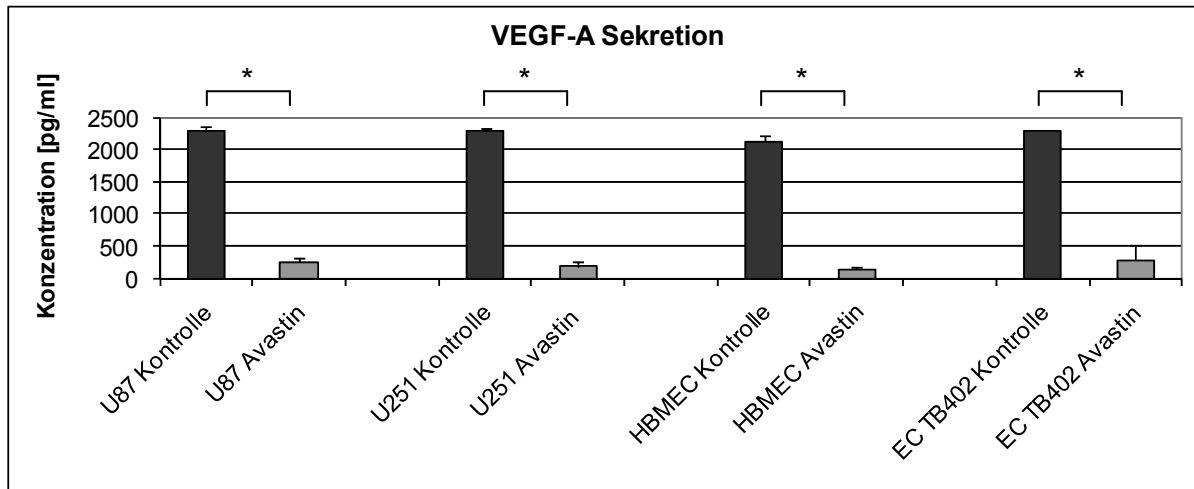


Abb. 12: Einfluss von Bevacizumab nach zehntägiger Inkubation auf die endogene Produktion der Wachstumsfaktoren VEGF-A der Tumor- und Endothelzellen (U87, U251, HBMEC und TUEC dargestellt). Auswertung der endogenen Wachstumsfaktor-Produktion mittels ELISA-Reader (t-Test: * = $p < 0,01$)

Die Menge an sezerniertem VEGF-D betrug unter Normalbedingungen ca. 100-200pg/ml für Tumorzellen und ca. 300-400pg/ml für Endothelzellen und ist um ein Zehnfaches geringer als VEGF-A. Allerdings erhöhte sich der Anteil an sezerniertem VEGF-D der Tumor- und Endothelzellen nach einer Behandlung mit Bevacizumab, allerdings nicht statistisch signifikant. Die minimale nachweisbare Konzentration betrug 11,4pg/ml für VEGF-D (Abb. 13).

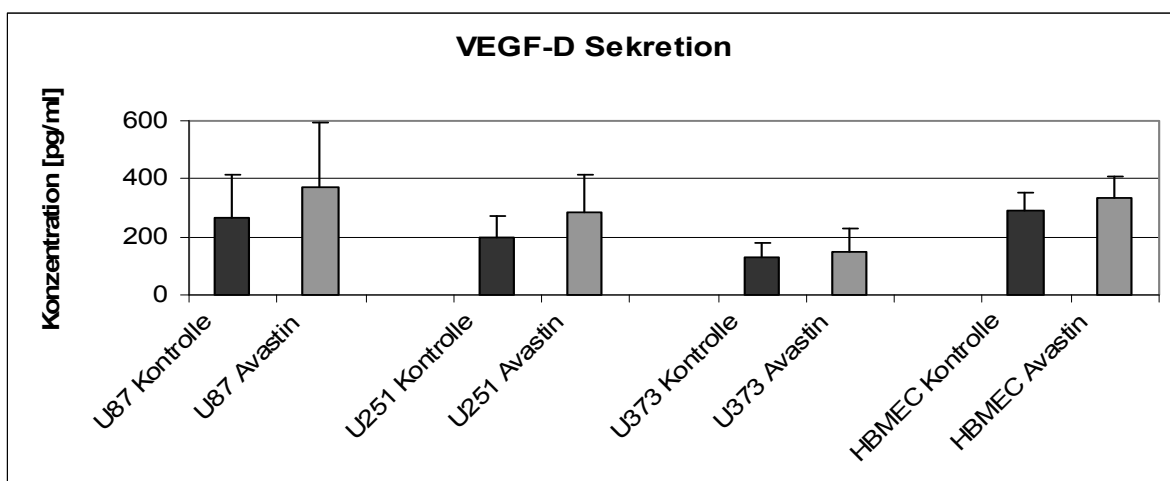


Abb. 13: Einfluss von Bevacizumab nach zehntägiger Inkubation auf die endogene Produktion des Wachstumsfaktors VEGF-D in den Tumor- und Endothelzellen (U87, U251, U373 und HBMEC dargestellt). Auswertung der endogenen Wachstumsfaktor-Produktion mittels ELISA-Reader (t-Test: $p > 0,05$).

Die Menge an der von den Tumor- und Endothelzellen sezerniertem VEGF-C war in der Kontrollgruppe leicht erhöht im Vergleich zur Bevacizumabgruppe, jedoch nicht statistisch signifikant (Daten nicht aufgeführt).

Sowohl Tumor- als auch Endothelzellen vermindern unter Einfluss von Bevacizumab die endogene Produktion und Sekretion von VEGF-A.

6.5 Einfluss von Bevacizumab auf die Zellmotilität

6.5.1 Einfluss von Bevacizumab auf die Zellmotilität von Tumor- und Endothelzellen im Collagen Assay

Im Collagen Assay wurden die Zellen mit unterschiedlichen Medien behandelt und deskriptiv beobachtet: 1.) DMEM ohne FCS/WF 2.) DMEM mit 10%FCS/WF und 3.) DMEM mit 10%FCS/Bevacizumab.

In Medium ohne FCS waren U87 nicht fähig, in die dreidimensionale Matrix einzuwandern. In der Gruppe mit FCS-haltigen Medium sowie in der Gruppe mit Bevacizumab-haltigem Medium migrierten die Zellen sternförmig in die dreidimensionale Matrix und bildeten ein netzförmiges Wachstumsmuster. Es war kein Unterschied in der Bevacizumab-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellbar (Daten nicht aufgeführt).

Vergleichbar mit den Tumorzellen waren die HBMEC ohne FCS gleichermaßen nicht fähig zu migrieren, sondern degenerierten nach drei Tagen. Die HBMEC in DEME mit 10%/WF wanderten langsam in die Matrix ein und bildeten eine sternförmige Figur um das Sphäroid nach drei Tagen, jedoch deutlich langsamer als U87. Die Bevacizumab-behandelten HBMEC zeigten eine deutlich langsamere Migration in die Collagen-Matrix. Es dauerte ca. sieben bis acht Tage bis sternförmige Ausläufer zu erkennen waren.

Außerdem unterschied sich das Migrationsverhalten der HBMEC in der Bevacizumab-Gruppe zu der unbehandelten Gruppe im Verlauf, da die Zellen nach 30 Tagen Bevacizumab-Inkubation diffus in die dreidimensionale Matrix migrierten (Abb.14 und Abb.15).

Für die isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom konnte dieselbe Beobachtung gemacht werden, allerdings war die Migrationsgeschwindigkeit in die Collagen-Matrix deutlich langsamer als die HBMEC. Die Zugabe von Bevacizumab

zu einem späteren Zeitpunkt konnte keine Veränderung hinsichtlich der Migration und Morphologie der Tumor- und Endothelzellen beobachtet werden (Daten nicht aufgeführt).

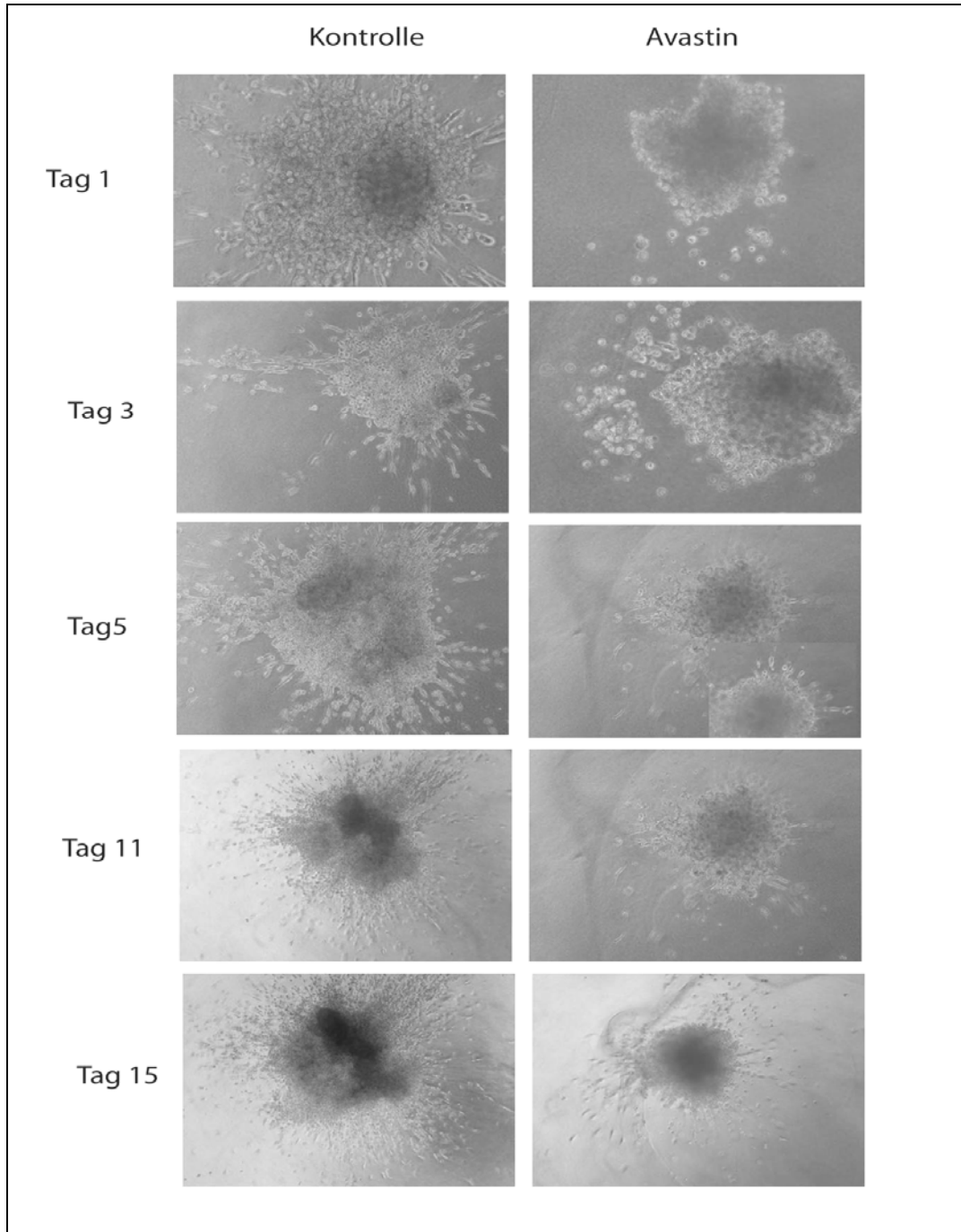


Abb. 14: Einfluss von Bevacizumab nach 15-tägiger Inkubation auf Tumor- und Endothelzell-Sphäroide in einem Collagen-Assay bezüglich dem Migrationsverhalten (hier: HBMEC). Die Endothelzellen der Kontrollgruppe wuchsen in die dreidimensionale Matrix ein und bildeten eine sternförmige Figur um das Sphäroid. Die Endothelzellen der Bevacizumab-Gruppe zeigten ein deutlich langsames Wachstum in die Collagen-Matrix. Außerdem unterschied sich das Wachstumsmuster der Zellen in der Bevacizumab-Gruppe, in dem der Abstand der in die Matrix migrierenden Zellen deutlich höher war als in der Kontrollgruppe (Vergrößerung 10x).

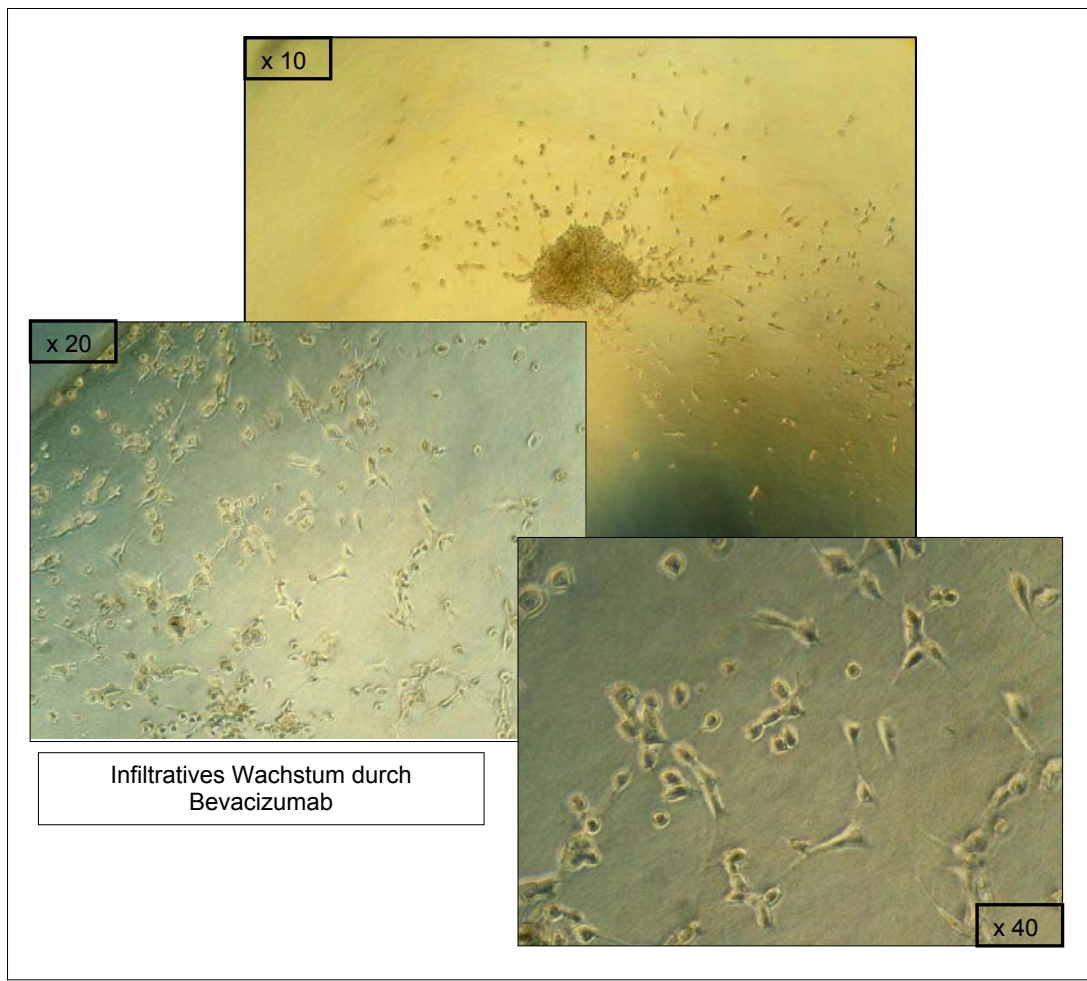


Abb. 15: Einfluss von Bevacizumab nach 30-tägiger Inkubation auf Endothelzell-Sphäroide in einem Collagen-Assay bezüglich der Morphologie der Zellen und des Wachstumsmusters (hier: HBMEC). In der Kontrollgruppe (Abb. 18) In der Bevacizumab-behandelten Gruppe migrieren die Endothelzellen diffus in die dreidimensionale Matrix ein (Vergrößerung: 10x, 20x und 40x).

6.5.2 Einfluss von Bevacizumab auf die *in-vitro*-Angiogenese von HBMEC und isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom im Tube Formation Assay

Um den Einfluss von Bevacizumab in einem *in-vitro*-Angiogenese-Modell zu untersuchen, wurden Endothelzellen mit Bevacizumab-Inkubation in einem Tube-formation-Assay beobachtet. Es wurde der Einfluss von Bevacizumab in unterschiedlichen Konzentrationen (100µg/ml und 500 µg/ml) im Tube Formation Assay untersucht. Eine konzentrationsabhängige Inhibition der „tube formation“ mittels Bevacizumab konnte in den HBMEC erzielt werden (Abb. 16). Für die isolierten Endothelzellen wirkte die 14-tägige Bevacizumab-Behandlung in einer Konzentration von 100µg/ml und 500 µg/ml ebenso inhibitorisch auf die Ausbildung der „tubes“.

In den Versuchen, welche in Abb. 17 und Abb. 18 dargestellt sind, wurden die Endothelzellen (HBMEC und TUEC) 14d mit Bevacizumab behandelt und anschließend mit den Wachstumsfaktoren VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D stimuliert.

Ohne Bevacizumab-Behandlung bewirkten VEGF-A und VEGF-C in den HBMEC eine Stimulation der „tube formation“ um 21% und 29% ($p < 0,05$). Nach der Bevacizumab-Behandlung wurden die HBMEC durch Zugabe von VEGF-C um 51% und VEGF-D 58% in ihrer Fähigkeit zur *in-vitro*-Angiogenese gefördert ($p < 0,05$) (Abb. 17).

In den TUEC war ohne Vorbehandlung mit Bevacizumab kein Effekt der Wachstumsfaktoren auf die Tube formation nachweisbar. Erst nach Inkubation mit Bevacizumab über 14 Tage wurde die *in-vitro*-Angiogenese durch Zugabe von VEGF-C um 17% und VEGF-D um 31% gefördert ($p < 0,05$). Insgesamt wird durch die Bevacizumab-Behandlung die Ansprechbarkeit hinsichtlich der Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D im Bezug auf die *in-vitro*-Angiogenese moduliert.

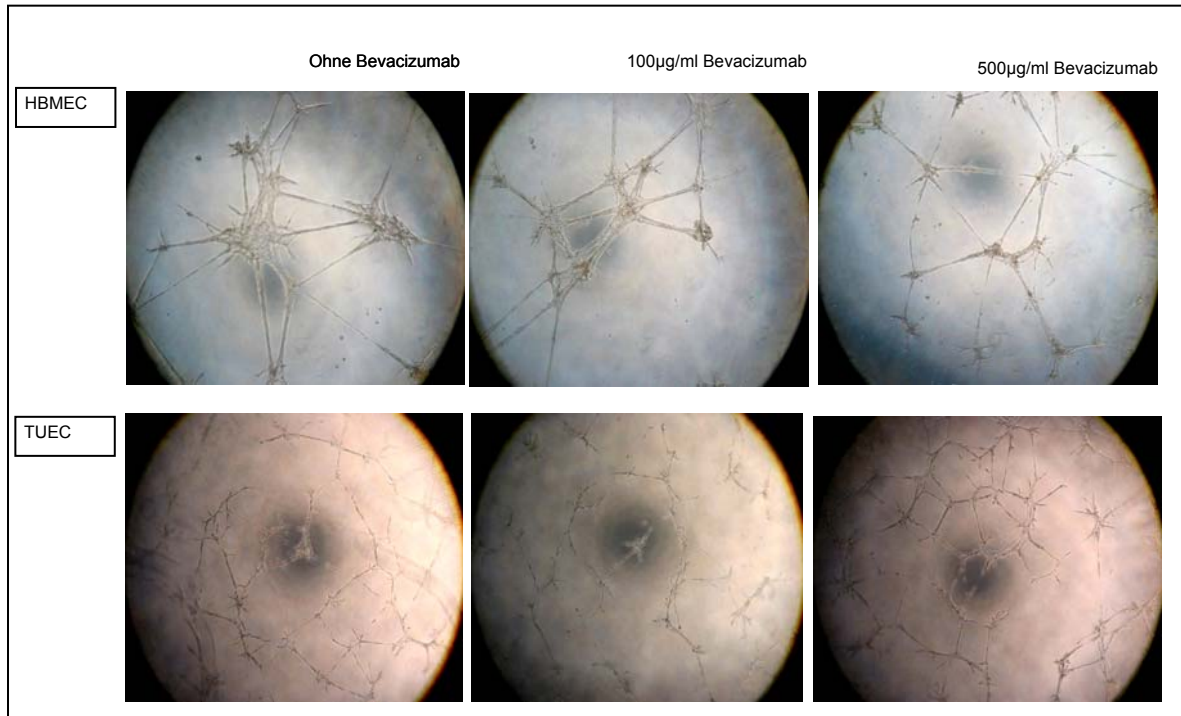


Abb. 16: Einfluss von Bevacizumab-Behandlung auf HBMEC und auf isolierte Endothelzellen aus dem Glioblastom (TUEC) in den Konzentrationen 100µg/ml und 500µg/ml. Avastin zeigte einen konzentrationsabhängigen signifikanten hemmenden Einfluss auf die Tube formation. (Vergrößerung 10x).

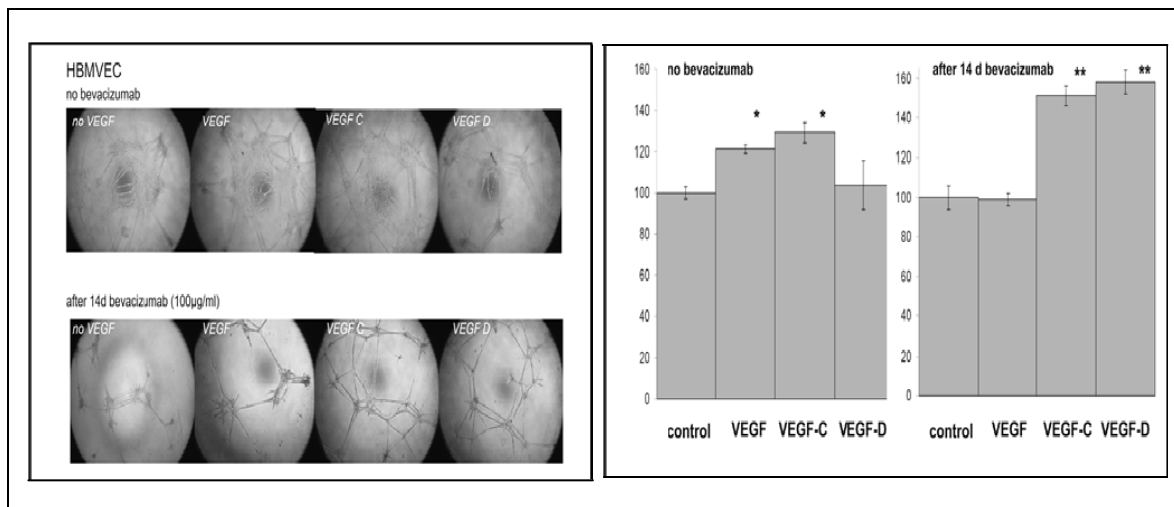


Abb. 17: Einfluss von 14-tägiger Bevacizumab-Behandlung auf HBMEC in der Konzentration 100µg/ml. Die Zellen wurden für 48h mit den Wachstumsfaktoren VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D inkubiert. Ohne Wachstumsfaktoren wurde die Tube formation durch Bevacizumab nach 14d inhibiert. Ohne Vorbehandlung mit Bevacizumab zeigte sich eine gesteigerte Tube formation durch Stimulation mit VEGF-A und VEGF-C. Nach 14-tägiger Bevacizumab-Inkubation zeigte sich ein Ansprechen hinsichtlich der Tube Ausbildung durch Stimulation mit VEGF-C und VEGF-D (* p < 0,05, ** p < 0,01). (Vergrößerung 10x) (aus Grau, Thorsteinsdottir et al.).

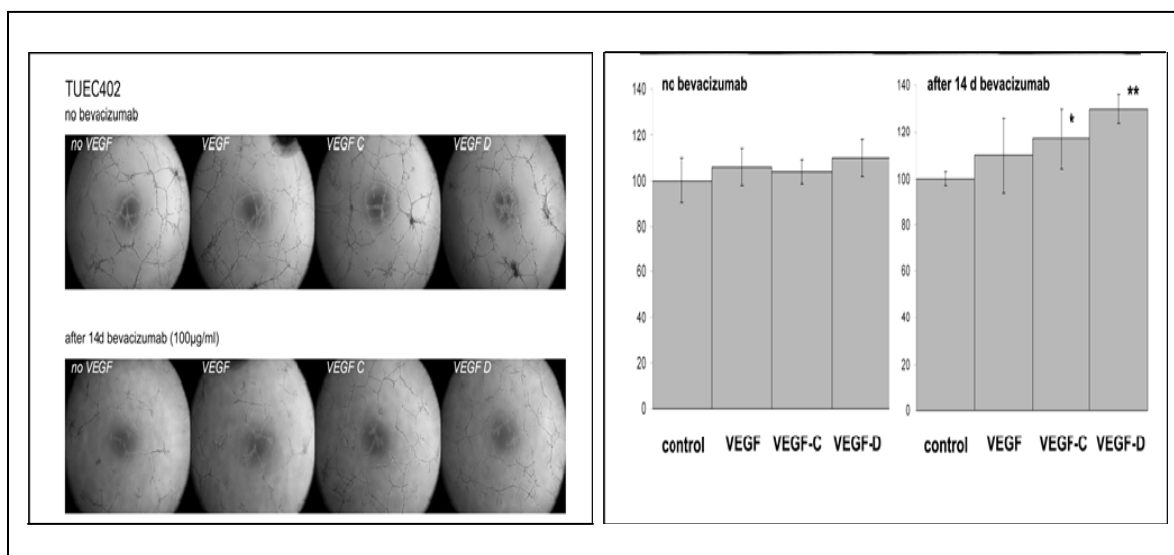


Abb. 18: Einfluss von 14-tägiger Bevacizumab-Behandlung auf TUEC in der Konzentration 100µg/ml. Ohne Vorbehandlung mit Bevacizumab reagieren die TUEC nicht durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren. Stimulation der Endothelzellen mit VEGF-C und VEGF-D zeigt eine signifikante Steigerung der Tube formation (* p < 0,05, ** p < 0,01). (Vergrößerung 10x) (aus Grau, Thorsteinsdottir et al.)

6.6 Einfluss von Bevacizumab mit anschließender Stimulation durch Wachstumsfaktoren auf die intrazelluläre Signalkaskade

Für jedes zu untersuchende Protein wurden jeweils der aktivierte phosphorylierte Anteil und der Gesamtanteil des entsprechenden Proteins sowie ein Nachweis der Gesamtproteinmenge dargestellt. Die folgenden Bestandteile der Rezeptor-Tyrosinkinase VEGFR-3 wurden nachgewiesen: p38-MAPK, p44/42-MAPK, SAPK/JNK. Die Inkubation mit Bevacizumab erfolgte 14 Tage und die Stimulation durch die Wachstumsfaktoren 15min, bis eine ausreichende Phosphorylierung nachzuweisen war.

In Abb. 19 ist ersichtlich, dass der phosphorylierte Anteil der p42/44-MAP-Kinase in der Bevacizumabgruppe vermindert ist und in der Kontrollgruppe deutlich hochreguliert ist (auch in allen mit Wachstumsfaktor stimulierten Gruppen), während der Gesamtanteil der p42/44-MAP-Kinase in allen Gruppen in etwa gleich ist.

Der Gesamtanteil der p38-MAPK ist in der Bevacizumab-Gruppe deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe. Jedoch ist der phosphorylierte Anteil der p38-MAPK in den mit VEGF-C, VEGF-D und VEGF-C156 stimulierten Gruppen vergleichbar stark wie in den Kontrollgruppen, so dass sich insgesamt eine höhere Aktivität in der Bevacizumab-Gruppe zeigt. In der unstimulierten und mit VEGF-A stimulierten Gruppe der Bevacizumab-Gruppe ist der Anteil an phosphorylierter p38-MAP-Kinase geringer als in der Kontrollgruppe.

Bezüglich der SAPK/JNK zeigt sich in allen Bevacizumab-behandelten Gruppen eine Zunahme des Phosphorylierungsstatus mit Ausnahme der Probe, in der die Tumorzellen mit VEGF-C156 stimuliert wurden.

Der β -Actin-Anteil, der ein Indikator für die Gesamtproteinmenge darstellt, ist in allen Proben annähernd gleich.

In den U251 finden sich auch die entsprechenden Ergebnisse (hier nicht aufgeführt).

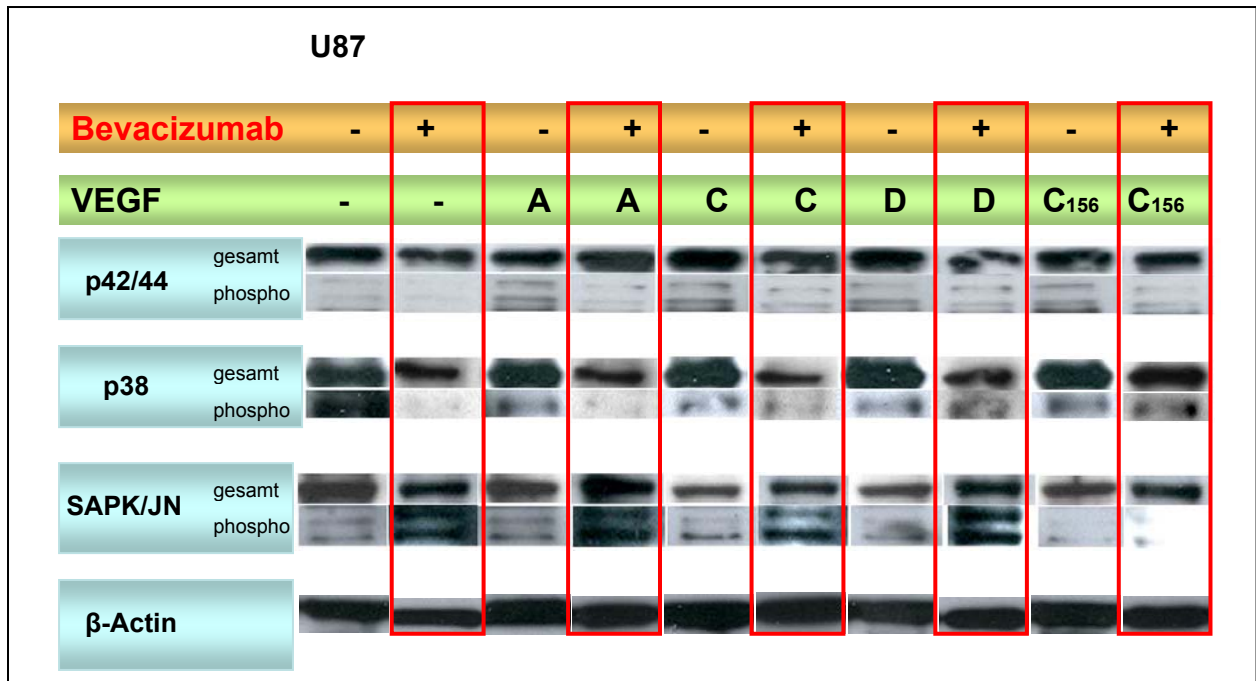


Abb. 19: Einfluss von Bevacizumab auf die Signalkaskade nach zehntägiger Inkubation der Tumorzellen U87. Es erfolgte eine Stimulation mit den Wachstumsfaktoren VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-C156s. Western Blots von p38-MAPK, p44/42-MAPK, SAPK/JNK (phosphorylierter Anteil und Gesamtanteil). Darstellung des Gesamtproteins durch Detektion von β-Actin (nach Stipping der Membran). Belichtungszeit p38-MAPK, p44/42-MAPK, SAPK/JNK: 5min, β-Actin: 2min.

In den HBMEC zeigte sich eine andere Modulation des Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinasen im Gegensatz zu den Tumorzellen (Abb. 20).

Der phosphorylierte Anteil an p42/44-MAP-Kinase ist in der Bevacizumab-Gruppe höher bei Stimulation mit VEGF-A und ohne Stimulation mit VEGFs. Bei Stimulation mit VEGF-C, VEGF-D und VEGF-C156 jedoch lässt sich ein gleicher Phosphorylierungsstatus in der Bevacizumab- und Kontrollgruppe feststellen. Der Gesamtanteil an p42/44-MAP-Kinase ist nahezu in allen Proben identisch.

Bezüglich der p38-MAP-Kinase zeigt sich unter Behandlung mit Bevacizumab eine deutliche Steigerung des Phosphorylierungsstatus in allen Wachstumsfaktor-Gruppen. In den nicht mit Bevacizumab-behandelten Gruppen ist kaum phosphorylierte p38-MAP-Kinase vorhanden. Auch hier ist der Gesamtanteil an p38-MAP-Kinase in allen Proben annähernd gleich.

Die SAPK/JNK ist in der Kontrollgruppe ohne Bevacizumab und mit Stimulation mit VEGF-A am höchsten. In den Bevacizumab-Gruppen zeigt sich eine leichtgradige Erhöhung des phosphorylierten Anteils durch Stimulation mit VEGF-A. In allen weiteren Proben sowohl mit/ohne Bevacizumab-Behandlung zeigt sich ein gleicher Phosphorylierungsstatus.

Der Anteil an Gesamtprotein, der durch β -Actin dargestellt wird, ist nahezu in allen Gruppen gleich. In den TUEC finden sich auch die entsprechenden Ergebnisse (hier nicht aufgeführt.)

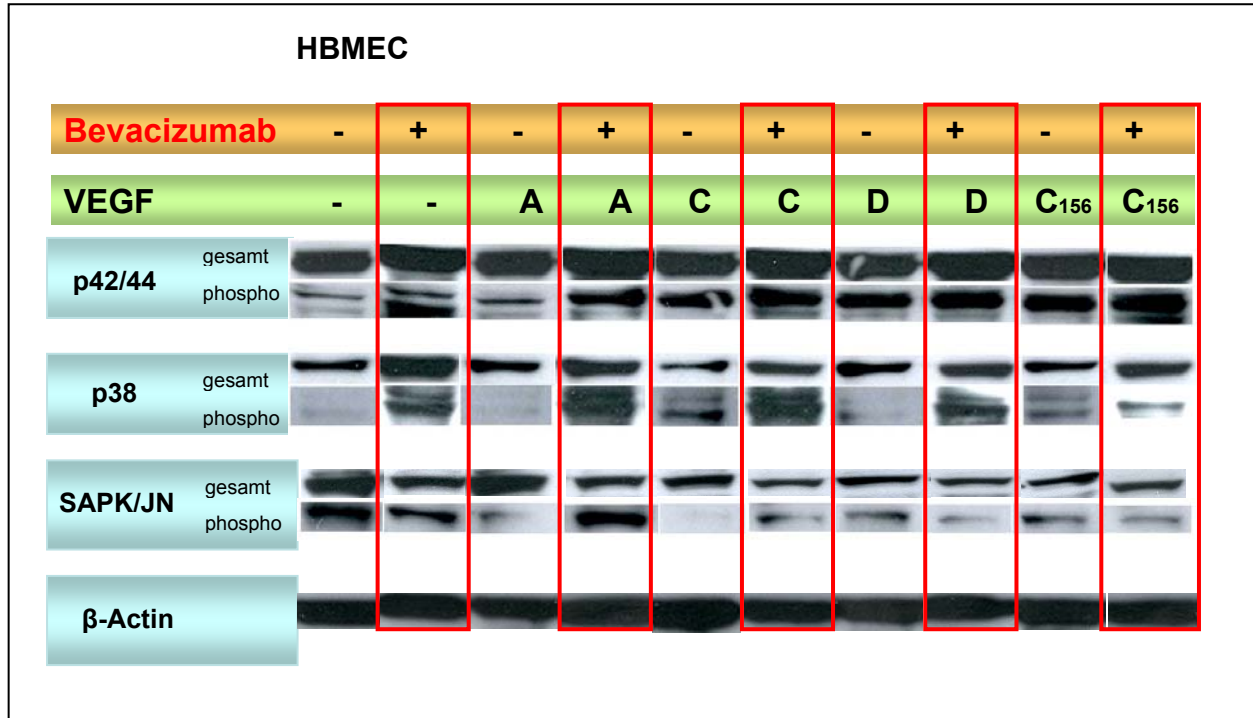


Abb. 20: Einfluss von Bevacizumab auf die Signalkaskade nach zehntägiger Inkubation der Endothelzellen (HBMEC). Es erfolgte eine Stimulation mit den Wachstumsfaktoren VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-C156s. Western Blots von p38-MAPK, p44/42-MAPK, SAPK/JNK (phosphorylierter Anteil und Gesamtanteil). Darstellung des Gesamtproteins durch Detektion von β -Actin (nach Stipping der Membran). Belichtungszeit p38-MAPK, p44/42-MAPK, SAPK/JNK: 5min, β -Actin: 2min.

6.7 Einfluss von Bevacizumab auf die Apoptosemechanismen

Um auszuschließen, dass die anti-proliferativen Eigenschaften sowie die hemmenden Einfluss von Bevacizumab auf die *in-vitro*-Angiogenese im „tube formation assay“ auf anti-apoptotische Mechanismen in der Zelle zurückzuführen sind, wurden die Bevacizumab-behandelten Zellen in der Durchflusszytometrie auf die Apoptosemarker Annexin V und Propidiumiodid getestet. Die Analyse der Durchflusszytometrie zeigte, dass die Glioblastomzelllinie U87 sowohl nach 5d (Daten nicht aufgeführt) als auch nach 11d weder durch Bevacizumab in der Konzentration 100 μ g/ml noch 500 μ g/ml Apoptose einleiteten (Abb. 22). Während in der Positivkontrolle mittels Zytostatika der Anteil der apoptotischen Zellen (Annexin V- und PI-positiv) ca. 8-10% betrug, war der Anteil der Bevacizumab-behandelten Gruppe < 0,1%, ähnlich wie in der unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 21 + 22).

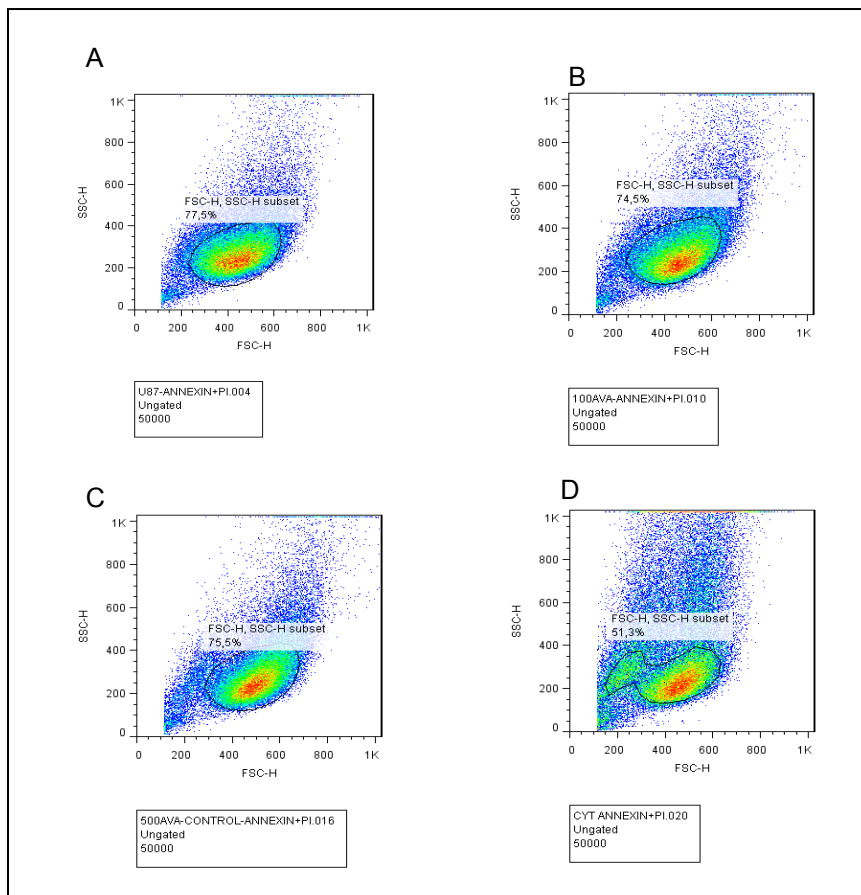


Abb. 21: Einfluss von Bevacizumab auf Apoptosevorgänge in der Glioblastomzelllinie U87. Es wurden folgende Gruppen analysiert: Kontrolle, Bevacizumab 100µg/ml, Bevacizumab 500µg/ml und Zytostatika (5-FU 10µg/ml/ Cisplatin 2µg/ml). Es wurden jeweils 50000 Zellen in der Durchflusszytometrie hinsichtlich der Apoptosemarker Annexin V (FITC-gekoppelt) und Propidiumiodid (rote Fluoreszenz) analysiert. In dieser Graphik sind die „Gates“ der jeweiligen untersuchten Populationen angezeigt.

Auch die isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom (TUEC) zeigten durch Bevacizumab-Behandlung keine Apoptoseinduktion (Abb. 22+23). Während in der Gruppe der Zytostatika-behandelten Zellen der Anteil der pro-apoptotischen Zellen bei 27% und der Anteil der apoptotischen Zellen bei 1% lag, war der Anteil in der Bevacizumab-behandelten Gruppe ähnlich wie in der Kontrollgruppe (proapoptotischer Anteil 16%, apoptotischer Anteil: 1-2%).

Allerdings ist insgesamt deutlich, dass der Anteil der pro-apoptotischen Zellen in den Endothelzellen deutlich höher ist als in der Glioblastomzelllinie. Dies mag zum einen daran liegen, dass Endothelzellen empfindlicher als Glioblastomzellen sind, zum Anderen daran, dass die Endothelzellen aus dem Glioblastomgewebe isoliert wurden und somit Änderungen der Umgebungsbedingungen einen deutlichen Einfluss auf die Endothelzellen bewirken könnten.

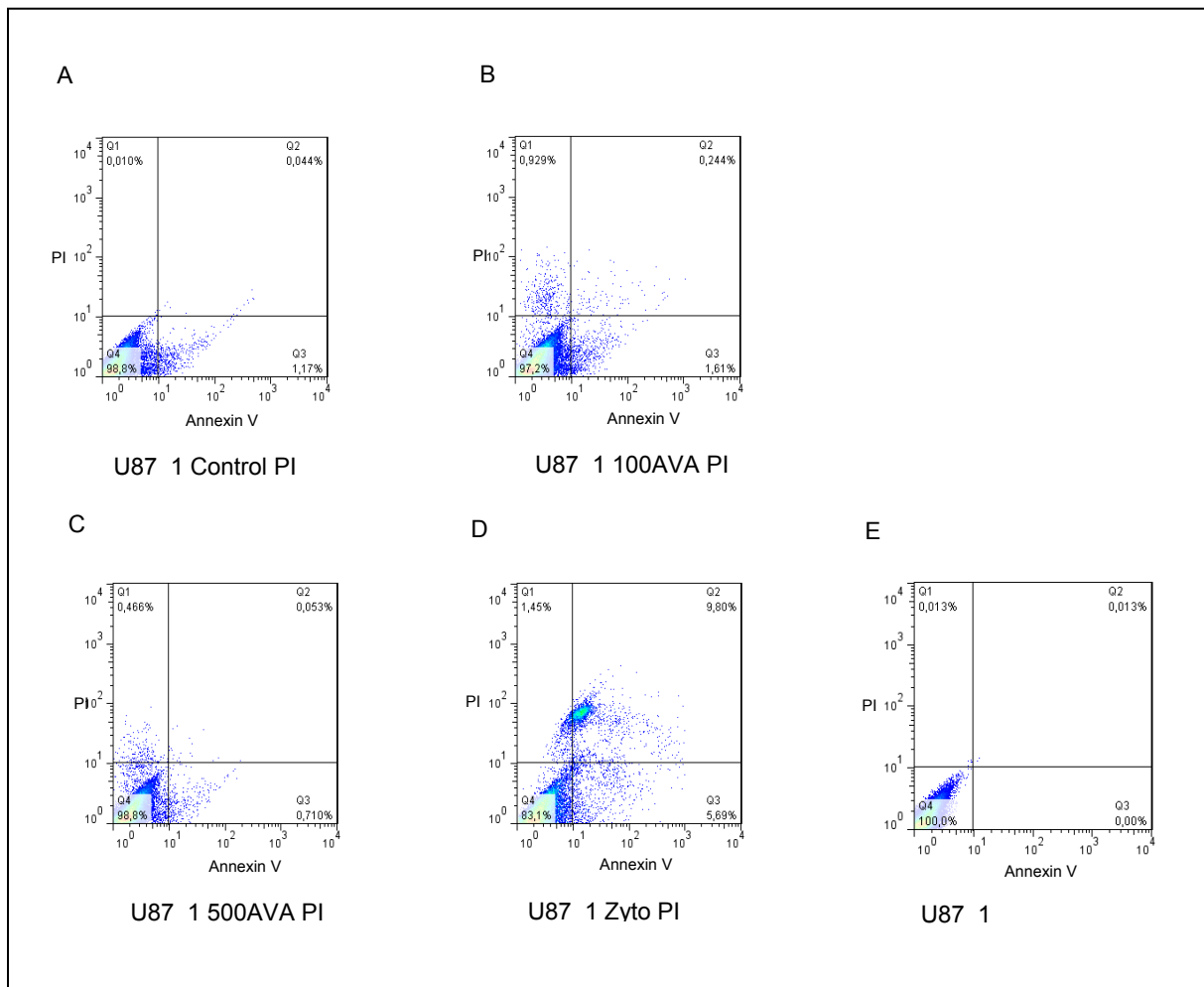


Abb. 22: Einfluss von Bevacizumab auf Apoptosevorgänge in der Glioblastomzelllinie U87. Es wurden jeweils 50000 Zellen in der Durchflusszytometrie hinsichtlich der Apoptosemarker Annexin V (FITC-gekoppelt) und Propidiumiodid (rote Fluoreszenz) analysiert. In dieser Graphik sind die untersuchten Populationen aufgeführt: A Kontrollgruppe, B Bevacizumab 100 μ g/ml, C Bevacizumab 500 μ g/ml D Zytostatika (5-FU 10 μ /ml/ Cisplatin 2 μ g/ml) und E Kontrollgruppe (ohne Färbung mit Annexin FITC und PI).

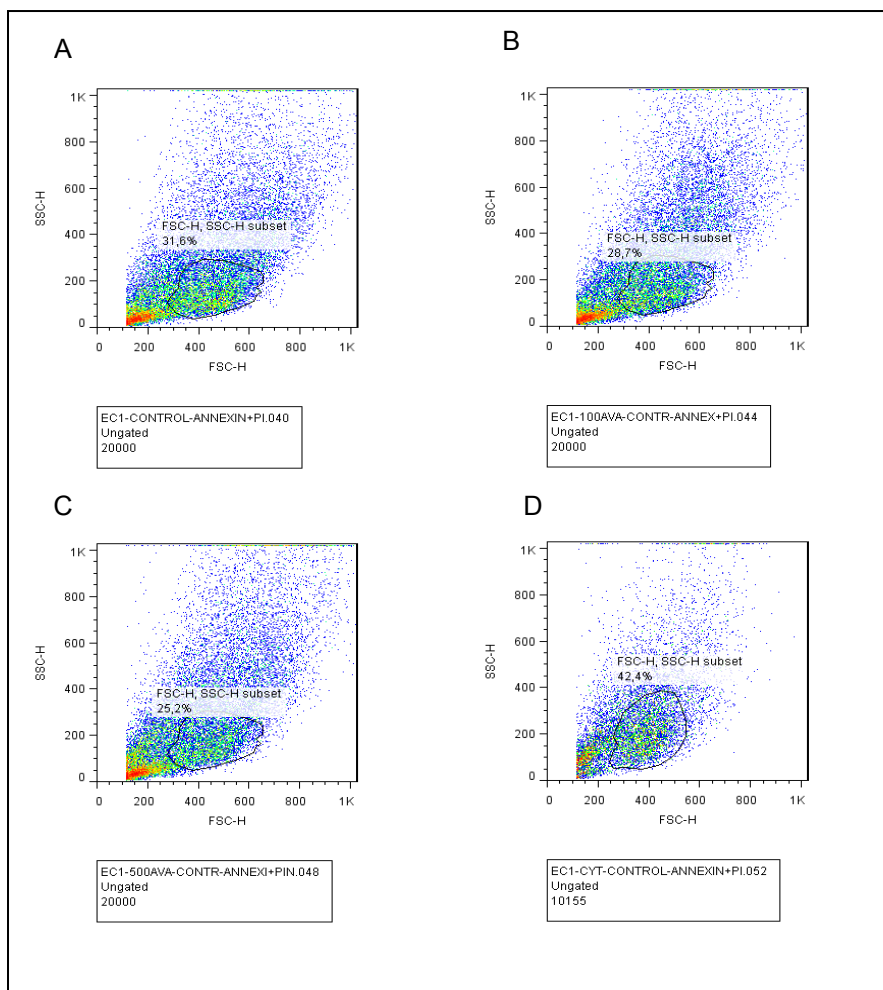


Abb. 23: Einfluss von Bevacizumab auf Apoptosevorgänge in den isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom TUEC. Es wurden folgende Gruppen analysiert: Kontrolle, Bevacizumab 100µg/ml, Bevacizumab 500µg/ml und Zytostatika (5-FU 10µg/ml/ Cisplatin 2µg/ml). Es wurden jeweils 20000 Zellen in der Durchflusszytometrie hinsichtlich der Apoptosemarker Annexin V (FITC-gekoppelt) und Propidiumiodid (rote Fluoreszenz) analysiert. In dieser Graphik sind die „Gates“ der jeweiligen untersuchten Populationen angezeigt.

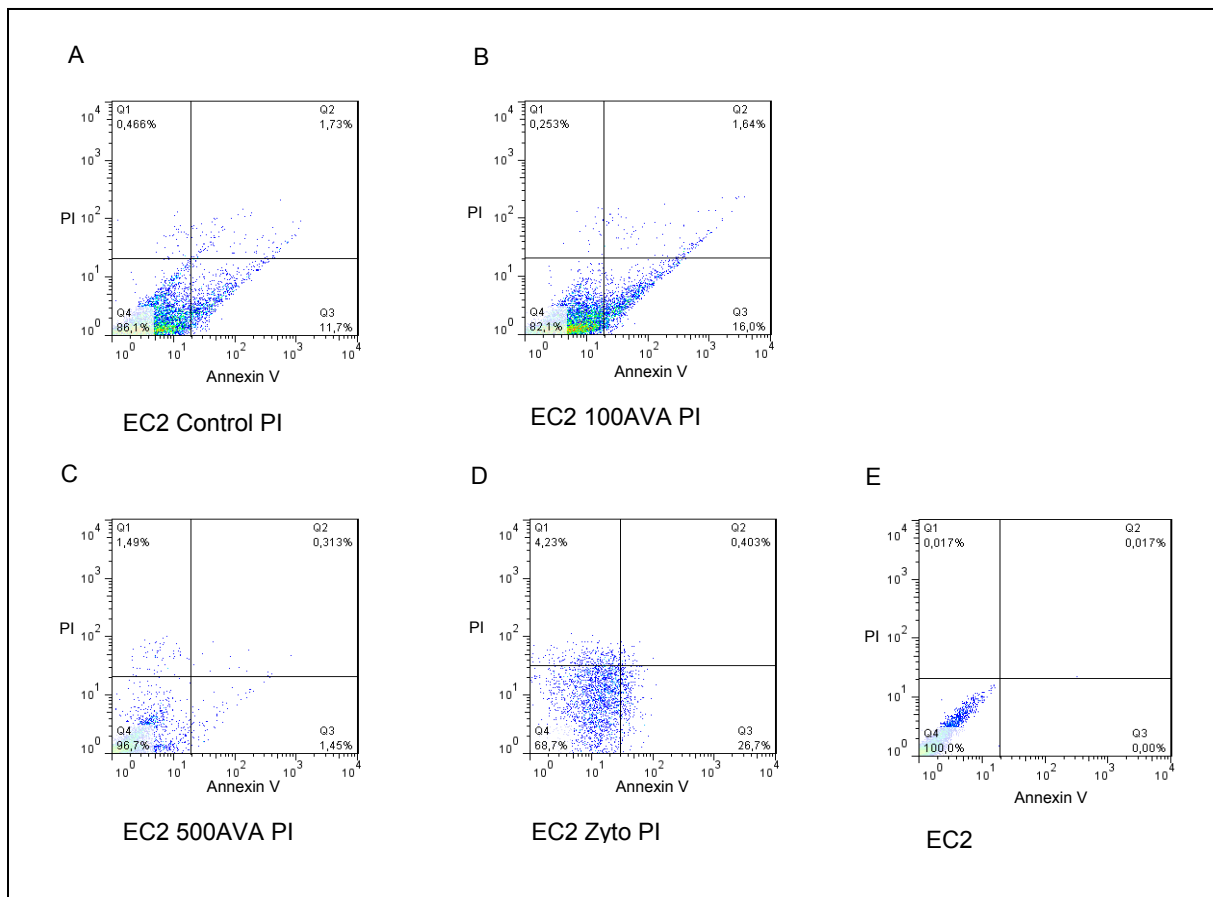


Abb. 24: Einfluss von Bevacizumab auf Apoptosevorgänge in den isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom TUEC. Es wurden jeweils 50000 Zellen in der Durchflusszytometrie hinsichtlich der Apoptosemarker Annexin V (FITC-gekoppelt) und Propidiumiodid (rote Fluoreszenz) analysiert. In dieser Graphik sind die untersuchten Populationen aufgeführt: A Kontrollgruppe, B Bevacizumab 100µg/ml, C Bevacizumab 500µg/ml D Zytostatika (5-FU 10µg/ml/ Cisplatin 2µg/ml) und E Kontrollgruppe (ohne Färbung mit Annexin FITC und PI).

6.8 Einfluss eines VEGFR-2-Inhibitors (DC101) im Tiermodell in Bezug auf das Rezeptorsystem VEGFR-3

In den aus der Kooperationsgruppe aus Hamburg von Frau Prof. Dr. med. Lamszus erhaltenen Gewebeschnitten wurde eine Immunhistochemie auf VEGFR-3 und den Liganden VEGF-C und VEGF-D durchgeführt.

Insgesamt lässt sich beobachten, dass sich durch die Therapie mit DC101 (VEGFR-2-Inhibitor) im Mausmodell um den Haupttumor kleinere Satellitentumoren bildeten. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigten sich ca. vier bis fünf kleinere Tumorabsiedelungen, während in der Kontrollgruppe gelegentlich eine weitere Tumorabsiedelung zu beobachten war. Ferner waren die Satellitentumore häufig durch ein zentrales Gefäß charakterisiert.

Die Immunhistochemie zeigte eine deutliche Expression von VEGF-C (Abb. 25, Bild A und B) und -D (Abb. 25, Bild C und D) im Tumorgewebe als auch in den Tumorabsiedelungen. Mikroskopisch war intratumoral die Anfärbung von kleineren Tumorzellnestern zu beobachten. In den Satellitentumoren war zentral die Expression eher gering und peritumoral erhöht.

Das Signal für VEGFR-3 (Abb. 25, Bild E und F) war kaum im implantierten Tumorgewebe detektierbar, sondern in der Invasionszone des Tumors sowie peritumoral um die kleineren Satellitentumoren. Des Weiteren war in einigen Tumorzellen distant vom Haupttumor und den Tumorabsiedelungen positive Zellen zu beobachten.

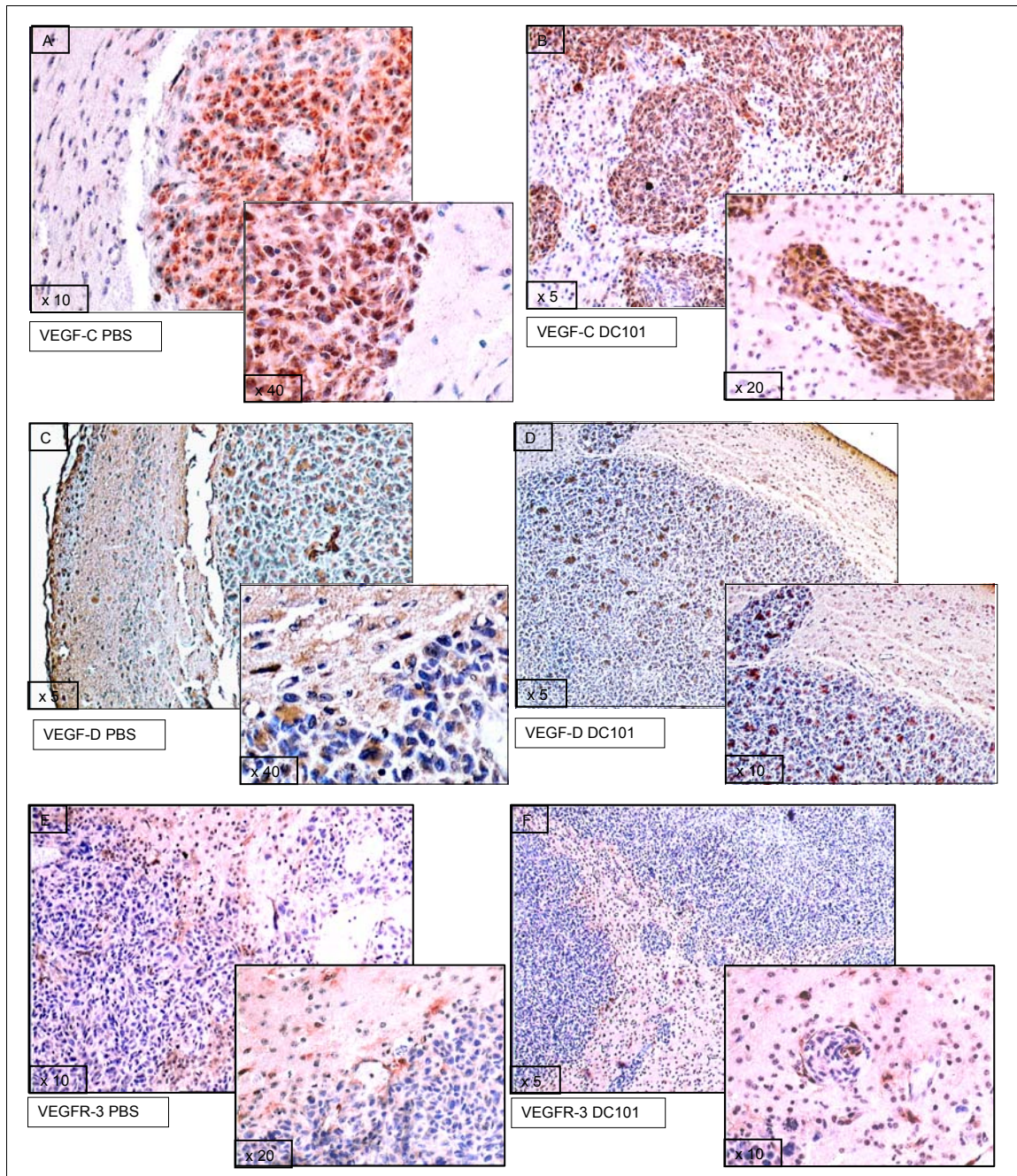


Abb. 25: Einfluss von DC101 (VEGFR-2-Inhibitor) im Tiermodell hinsichtlich des Rezeptorsystems VEGFR-3. Starke Expression von VEGF-C (Bild A und B) und VEGF-D (Bild C und D) intratumoral sowohl in der PBS als auch in der DC101-behandelten Gruppe. In den Tumorabsiedelungen in der DC101-behandelten Gruppe starke Expression von VEGF-C und VEGF-D (Vergrößerung x10 und x20). Positives Signal für VEGFR-3 hauptsächlich in der Invasionszone des Haupttumors sowie in einigen Zellen distant vom Haupttumor sowie den Tumorabsiedelungen (Bild E und F). Negativ-Kontrolle (Bild G).

7 DISKUSSION

7.1 Erste Resultate von anti-angiogenen Therapieformen in Phase II- und III-Studien

Einer der wichtigsten Mediatoren der physiologischen Angiogenese stellt das Rezeptorsystem VEGFR-2 mit seinem Liganden VEGF-A dar. Unter pathologischen Bedingungen wird die Expression von VEGF-A nicht durch den Sauerstoffbedarf reguliert, sondern durch tumorassoziierte Hypoxie und Azidose sowie durch multiple Onkogene und Tumorsuppressorgene, wie Ras, Src und TP53, sowie durch Zytokine, NO, HIF-1 α und unterschiedliche MAP-Kinasen.

Im Glioblastom scheint VEGF-A eine tragende Rolle zu spielen, da es im Vergleich zu Normalhirngewebe 50fach überexprimiert ist (Plate et al.). In einer Reihe von Tumorentitäten, darunter v.a. in Gliomen, korreliert die intratumorale Expression von VEGF-A und seinem Rezeptor VEGFR-2 mit dem histologischen Malignitätsgrad (Jain et al.; Batchelor et al.). *In vitro* führt die Aktivierung von VEGFR-2 zur Proliferation, Migration und zum Überleben von Endothelzellen. *In vivo* wurden VEGF-A-über- und unterexprimierende Gliome generiert, die in die Maus implantiert wurden. Das Tumorstadium und die Tumorangio-genese waren in den Untersuchungen sehr stark von VEGF-A abhängig, so dass diesem Faktor eine essentielle Rolle in der Neoangiogenese im Glioblastom zugeschrieben wird (Goldbrunner et al.). Des Weiteren konnte nach Implantation von Gliomzellen im Rattenmodell beobachtet werden, dass Endothelzellen in Richtung des Tumors migrierten und ein Gefäßsystem ausbildeten. Diese Endothelzellen, die die Tumorangio-genese induzierten waren stark positiv für VEGF-A, so dass eine entscheidende Rolle dieses Faktors zu Tragen kommt (Goldbrunner et al.). Die Sekretion von VEGF-A wird hierbei durch Hypoxie getriggert. In der Tumorangio-genese scheint VEGF-A neben den schon beschriebenen Vorgängen auch die Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen zu aktivieren und somit den Tropismus von Gliomzellen und Stammzellen zu fördern (Birnbach et al.; Schichor et al.).

Aufgrund dieser Resultate wurde eine Reihe von Therapieansätzen entwickelt, welche gegen dieses System gerichtet sind.

Anti-angiogene Substanzen wie am Beispiel Bevacizumab, ein neutralisierender Antikörper, der gegen VEGF-A gerichtet ist, wurden nach erfolgreichen Phase III-Studien für die Therapie von kolorektalen, Mamma-, Bronchial- und Pankreas-Karzinomen von der FDA freigegeben (Hurwitz et al., Jenab-Wolcott et al.). Auch wurden Phase II-Studien für die Therapie von Rezidiv-Glioblastom-Patienten angewandt, die zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und der radiographischen Ansprechrate führte (Vredenburgh et al.; Reardon et al.). In Kombination mit Irinotecan erreichte Bevacizumab ein 6-Monate-Progressionsfreies-Überleben von 46%, 6-Monats-Überleben von 77% (im Vergleich mit Temozolomid: 60%) und eine radiographische Ansprechrate von 57%. Die radiographische Ansprechrate beinhaltete eine Reduktion des Tumolvolumens von 72% und eine Reduktion des perifokalen Ödems von 73% (Ananthnarayan et al.).

Jedoch zeigten einige Studien, dass diese die Wirkungen nur transient sind und letztendlich zu einem erneuten Tumorprogress führen.

Erste Beobachtungen bei Patienten mit Rezidiv-Glioblastomen zeigten ähnliche Phänomene, wie sie aus Tiermodellen zu erwarten waen - ein multifokales Rezidiv mit Satellitentumoren in der MRT-Bildgebung. Die Gefäßarchitektur veränderte sich in dünnwandige, dilatierte Gefäße mit vaskulären Clustern, Arkaden und glomeruloiden Strukturen. Bezüglich des immunhistochemischen Nachweises angiogener Faktoren ließ sich keine eindeutige Über- oder Unterexpression feststellen (CD34, SMA, Podoplanin, VEGF-A) (Fischer et al.). Die Gründe für das Ausbilden eines multifokalen Rezidivs sind noch unbekannt, es gibt es bisher nur Vermutungen: vermehrte Kooptionstendenz der Gefäße, vermehrte Aktivität der perivaskulären Strukturen, wie bspw. Perizyten, gesteigerte Funktion der vaskulären Stammzellen und viele andere Theorien (Kunkel et al., Erber et al., Lamszus et al.).

7.2 Hypothesen für Resistenzmechanismen im *in-vivo*-Modell

Die Gründe für die transiente Wirkung der anti-angiogenen Therapie sind bisher unbekannt. Zahlreiche *in-vivo*-Modelle wurden durchgeführt, um den

Wirkungsmechanismus der anti-angiogenen Therapie sowie die nach einer Latenzzeit auftretenden Resistenzmechanismen aufzuklären.

Es existiert die These, dass durch die anti-angiogene Therapie eine zweite Angiogenesewelle („second wave of angiogenesis“) ausgelöst wird.

Sandström et al. untersuchte die Wirkung von ZD6474, eines Antikörpers gegen VEGFR-2, VEGFR-3 und EGFR, in Kombination mit Temozolomid und Strahlentherapie im orthotopen Gliommodell. Hier waren morphologische Veränderungen der Gliome und der Tumorangiogenese zu verzeichnen. Die Tumoren verkleinerten sich deutlich und zeigten sie eine verminderte Zelldichte, jedoch entstanden zahlreiche distante Tumorzellinseln im gesunden Hirnparenchym (Sandstrom et al.).

Die Arbeitsgruppe von Kunkel bestätigte diese Feststellung in einer tierexperimentellen Studie (Kunkel et al.). Durch DC101, ein gegen VEGFR-2 gerichteter Antikörper, nahm im Glioblastom-in-vivo-Modell das Tumolvolumen um 60% und die Mikrogefäßdichte um 40% ab, jedoch konnten auch hier in der Nähe des Tumors kleinere Satellitentumoren beobachtet werden, die im Zentrum durch einen Gefäßkern ausgezeichnet waren. Möglicherweise wurde durch die Inhibition der Angiogenese der Anteil der Gefäßkooption erhöht. Dadurch zeigten die Tumore ein invasiveres Wachstumsmuster mit der Ausbildung von Tumorzellnestern entlang der Gefäße bis hin zu den Leptomeningen.

Des Weiteren induzierte die anti-VEGF-Therapie eine erhöhte Expression von PDGF, die zu einer vermehrten Assoziation von Perizyten und muralen Zellen führte, so dass die Gefäße vor der anti-angiogenen Therapie geschützt werden. Es wird vermutet, dass durch die Stabilisierung der Gefäße eine vermehrte Gefäßkooption führt und somit, die Ausbildung von Tumorzellnestern entlang der Gefäße gefördert wird (Bergers et al.; Huang et al.). Die konsekutive Blockade von zunächst VEGF-A und anschließend PDGF konnte die Perizyten-Endothelzell-Assoziation elektronenmikroskopisch verhindern und somit die Tumorangiogenese besser hemmen (Erber et al.).

Lamszus et al. untersuchte die Wirkung der Kombination eines VEGFR-2 und EGFR-Inhibitors (DC101 und C225) im Xenograft-Modell. Dabei war die größte Tumorregrression unter DC101 zu sehen (um 75%), wohingegen unter C225 kein Effekt feststellbar war. Die Tumormorphologie unterschied sich in der DC101-behandelten Gruppe dadurch, dass das Wachstumsmuster aggressiver war und

sich zahlreiche Tumorsatelliten um den Haupttumor bildeten. Durch die zusätzliche Therapie mit dem EGFR-Inhibitor C225 konnte die Infiltrationstendenz und die Ausbildung von Satellitentumoren gemindert werden (Lamszus et al.). Somit scheint, dass durch die Blockade von unterschiedlichen Rezeptoren additive Wirkungen erzielt werden können und auch geringere Konzentrationen der Substanzen notwendig sind, um dieselbe oder sogar deutlichere Wirkung zu erzielen.

Casanovas et al. untersuchte eine konkomitante Hemmung mittels anti-VEGF-A und anti-FGF im in-vivo-Modell. Nach initialer Hemmung mit VEGF-A über 10 Tage erfolgte eine additive Hemmung durch anti-FGF. Dadurch waren die Tumoren kleiner, jedoch war auch eine vermehrte Invasivität zu beobachten (Casanovas et al.). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass FGF ein möglicher Bestandteil einer zweiten Angiogenesewelle ist, die zu einer Reangiogenese führt („second wave of angiogenesis“).

In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass andere Regulationsysteme nach anti-angiogener Therapie zu Tragen kommen. Im orthotopen Mausmodell wurden die implantierten Tumore sowie die nach anti-angiogener Therapie entstandenen Satellitentumore auf weitere Faktoren mittels Western Blot, PCR und Immunhistochemie untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Hochregulation von MMP-9, MMP-12, bFGF und Faktor VIII (Lucio-Eterovic, Piao, and de Groot; Bergers et al.; Vilorio-Petit et al.), welche für die Migrationfähigkeit von Endothelzellen zuständig sind.

In der Tumorangio-genese werden zwei weitere Mechanismen beschrieben, die in der physiologischen Angiogenese kaum zu beobachten sind: 1. die Intussuszeption und 2. „vascular mimicry“. Intussuszeption beschreibt das Phänomen, dass sich neue Gefäße durch Insertion von Gewebebrücken in Lumen von präexistenten Gefäßen bilden. Dies wurde erstmals in der Entwicklung von Kapillaren in der Lunge postnatal beobachtet. Hierbei ist keine Endothelzellproliferation zu beobachten, so dass man annimmt, dass solche zelluläre Vorgänge durch die anti-angiogene Therapie nicht erfasst werden. Das zweite Phänomen, „vascular mimicry“ beschreibt die Tatsache, dass Tumorzellen dedifferenzieren und einen endothelialen Phänotyp annehmen, der tubuläre und vaskuläre Strukturen ausbildet. Dieses Phänomen wurde erstmals in uvealen Melanomen beschrieben. Die Tumorzellen mit dem vaskulären Phänotyp

exprimierten Gene, die dem Endothelium assoziiert sind, wie VE-Cadherin, Ephrin A2, CD34, E-Selectin und CD105 (Hillen and Griffioen; Folberg, Hendrix, and Maniotis). Es ist bisher unbekannt, welche Faktoren die Ausbildung dieses vaskulären Phänotyps begünstigen.

Dies sind einige Hypothesen, welche die Resistenzmechanismen bei anti-angiogener Therapie zu erklären versuchen.

7.3 Rolle des VEGFR-3-Rezeptorsystems als möglicher alternativer Signalweg in der „second wave of angiogenesis“

Die Effekte einer anti-angiogenen Therapie auf zellulärer und molekulargenetischer Ebene sind noch weitgehend unbekannt. Da das VEGFR-3-Rezeptorsystem strukturell dem VEGFR-2-Rezeptor ähnlich ist und funktionell einerseits mit diesem Rezeptor interagiert und andererseits in der Tumorangio-genese eine wichtige Rolle spielt, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Bevacizumab auf das Rezeptorsystem VEGFR-3 *in-vitro* untersucht.

Die Expression von VEGFR-3 ist unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich auf das Lymphgefäßsystem sowie unter bestimmten Bedingungen, z.B. Wundheilung oder Entzündungsvorgängen beschränkt. Lediglich während der Embryogenese sind vermutlich venöse Endothelzellen initial bipotent und sprossen aus präexisten-ten venösen Gefäßen aus, die für das lymphatische Differenzierungsprogramm bestimmt sind. Während dieses Stadiums exprimieren diese endothelialen Progenitorzellen VEGFR-3 (Wigle et al.; Stacker et al.; Baldwin, Stacker, and Achen).

Die Funktion von VEGFR-3 beinhaltet neben der Lymphangiogenese auch die Unterstützung der klassischen Angiogenese, welche durch VEGFR-2 gesteuert wird. Im Tiermodell mit Affen konnte in der Iris, welche über kein lymphatisches System verfügt, durch Stimulation mit VEGF-A die Angiogenese induziert werden. In den aussprossenden Gefäßen konnte die Expression von VEGFR-3 nachgewiesen werden (Witmer et al.).

Die Aktivierung sollte daher als weiterer Signalweg der Tumorangio-genese berücksichtigt werden. Seit Kurzem wird VEGFR-3 eine große Rolle unter

pathologischen Bedingungen zugeschrieben. Die Lymphangiogenese dient als primärer Ausbreitungsweg zur Metastasierung, so dass der Befall der Lymphknoten als einer der wichtigsten Indikatoren für die Aggressivität eines Tumors angesehen wird (Swartz and Skobe). Bisher konnte in mehreren Arbeiten nachgewiesen werden, dass durch Induktion des VEGFR-3-Systems im Tiermodell in unterschiedlichen Tumorentitäten die Metastasierungsquote über Lymphknoten und die Ausbildung von Fernmetastasen erhöht (Hoshida et al.; Stacker et al.; Skobe et al.). Auch im Mammakarzinom konnte die Koexpression von VEGFR-2 und -3 auf Endothelzellen nachgewiesen werden, so dass angenommen wird, dass nicht nur VEGFR-2, sondern auch VEGFR-3 eine Rolle bei der Tumorangiogenese spielt (Valtola et al.). Über das VEGFR-3-System werden Signalkaskaden initiiert, die für die Migration und Invasion von Endothel- und Tumorzellen verantwortlich sind.

Daher wurden Inhibitoren des VEGFR-3-Signalwegs hergestellt. Im Tiermodell nimmt die Gefäßdichte sowie das Tumolvolumen durch VEGFR-3-Inhibitoren deutlich ab und der Anteil an nekrotischen Arealen zu, was darauf hinweist, dass VEGFR-3 in der Tumorangiogenese eine entscheidende Rolle spielt (Laakkonen et al.).

Auch strukturell konnte nachgewiesen werden, dass eine Heterodimerisation der beiden Rezeptoren in Endothelzellen stattfindet, so dass eine Interaktion anzunehmen ist. Durch die Aktivierung mit VEGF-C und VEGF-D wird die Heterodimerisation dieser beiden Rezeptoren ausgelöst. Im Heterodimer-Zustand kann VEGF-A eine Phosphorylierung des VEGFR-3 auslösen (Alam et al.; Dixelius et al.). Diese Heterodimerisation scheint sowohl bei der Häm- als auch der Lymphangiogenese notwendig zu sein. Einige Arbeiten zeigten sogar, dass eine Heterodimerisation von VEGFR-2 mit VEGFR-3 erforderlich ist, damit der Signalweg über VEGFR-3 überhaupt aktiviert wird und VEGFR-2 die Aktivität von VEGFR-3 moduliert (Alam et al.). Über die Funktion in der Tumorangiogenese ist allerdings bisher nichts bekannt.

Des Weiteren ist bekannt, dass VEGFR-2 und VEGFR-3 miteinander interagieren und Fähigkeiten wie Proliferation, Migration und Überleben vermitteln. Durch die Heterodimerisation der beiden Rezeptoren sowie durch Transphosphorylierung und intermolekulare Veränderungen kann die Aktivität von VEGFR-2 moduliert

werden. Dies konnte erstmals in endothelialen Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Matsumura et al.).

Somit könnte der Signalweg VEGFR-3/VEGF-C/VEGF-D als alternativer Mechanismus dienen, der unter anti-angiogener Therapie einen zweiten Schub einer Neoangiogenese („second wave of angiogenesis“) vermittelt. Erste Ergebnisse von Studien zeigten, dass durch kombinierte Blockierung von VEGFR-2 und -3 ein synergistischer Effekt erzielt werden konnte und möglicherweise dadurch eine längerfristige Unterdrückung des Gefäßwachstums ermöglicht (Jimenez et al.).

Kürzlich konnte in zwei Arbeiten gezeigt werden, dass in Gliomen VEGFR-3 mit seinen Liganden mit steigender Malignität exprimiert ist, obwohl im Gehirn normalerweise kein lymphatisches System existiert (Grau, Trillsch, Herms et al.; Jenny et al.).

Erstmals konnte auch VEGF-C auf mRNA-Ebene und VEGF-D immunhistochemisch in Glioblastomzelllinien nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich hierbei keine Korrelation mit dem Malignitätsgrad (Jenny et al.; Debinski et al.).

Auch weitere lymphatische Marker wie Prox-1, Podoplanin, LYVE-1 konnten sowohl auf mRNA-Ebene als auch Proteinebene im Glioblastom dargestellt werden. Diese lymphatischen Marker sind v.a. auf Gefäßendothelien zu detektieren und zeigen z.T. eine Korrelation mit dem Malignitätsgrad, so dass die Bedeutung für die Gefäßentwicklung maligner Gliome zu vermuten ist (Grau, Trillsch, von Lüttichau et al.).

Daher ist die Expression von VEGFR-3 im Glioblastom möglicherweise ein alternatives Rezeptorsystem, welches unter anti-angiogener Therapie möglicherweise zunehmend an Bedeutung gewinnt.

7.3.1 Expression von VEGFR-3 *in-vitro*

Tatsächlich ließ sich in-situ die Expression von lymphangiogenen Faktoren im Glioblastom feststellen, obwohl das ZNS kein Lymphsystem besitzt. Die Expression korrelierte mit dem Malignitätsgrad der Gliome. In humanem Glioblastomgewebe ist VEGFR-3, VEGF-C und VEGF-D durch Immunhistochemie

und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisation auf Tumorendothelzellen in hochvaskularisierten Arealen, in Tumorpalisaden um nekrotische Areale sowie in einigen von Gefäßen distanten Zellen lokalisiert. Die Expression von VEGFR-3 sowie mRNA konnte auch im Glioblastom verzeichnet werden, während die mRNA-Expression von VEGF-D nur in geringem Maße nachzuweisen war (Grau, Trillsch, Herms et al.; Jenny et al.). Der Anteil an VEGFR-3-mRNA war minimal. Die Expression der Proteine korrelierte nicht mit dem Anteil der mRNA der Faktoren. Debinsky et al. vermutet, dass zum Einen die Ursache in der Kultivierung liegt, zum Anderen wird angenommen, dass posttranskriptionale oder posttranslationale Mechanismen herrschen, die zu einer Diskrepanz zwischen RNA- und Proteinexpression führen (Debinski et al.).

Auch in den durchgeführten Experimenten besteht zwischen der starken Expression von VEGFR-2 und VEGFR-3 immunhistochemisch im Glioblastomgewebe sowie auf den Tumorzelllinien und der schwachen Expression im Western Blot von Tumorgewebe eine Diskrepanz. Dies kann auf methodische Probleme des Western Blot zurückzuführen sein. Möglicherweise unterscheidet sich das Tumorgewebe von den *in-vitro*-Kulturbedingungen.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die Expression von VEGFR-3 auf Proteinebene mittels Western Blot in Gliomzelllinien sowie in Glioblastom-Tumorgewebe gezeigt werden.

Auch ließen sich sowohl die bekannten hämangiogenen als auch die der Lymphangiogenese zugeordneten Rezeptorsysteme auf isolierten Endothelzellen, den HBMEC sowie Tumorzelllinien immunzytochemisch darstellen. Interessant ist dass sowohl die Tumorzelllinien U87 und U251 als auch die HBMEC und isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom alle genannten Faktoren exprimieren. Möglicherweise dienen diese Rezeptorsysteme einem auto- oder parakrinen Mechanismus.

7.3.2 Sekretion von VEGF *in-vitro*

In den gezeigten Versuchen wurde nach 14-tägiger Bevacizumab-Therapie die Sekretion von VEGF-A auf ein Zehntel herunterreguliert. Diese Beobachtung wird von Sathornsumetee et al. unterstützt: Nach Inkubation des Antikörper AAL881, der gegen VEGFR-2, B-Raf und C-Raf gerichtet ist, war die endogene Sekretion

von VEGF-A der Glioblastomzelle D54MG im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer (Sathornsumetee et al.). Sowohl die Tumor- als auch Endothelzellen reagieren bei anti-VEGF-A-Therapie mit einer Herunterregulation der endogenen Produktion dieses Faktors und mit einer verminderten Proliferationsrate.

In einigen Studien wird beschrieben, dass die meisten Tumorzelllinien verschiedener Tumorentitäten, u.a. Glioblastomzelllinien U87 und U118, kein VEGF-D exprimieren (Laakkonen et al.) und die VEGF-D-mRNA in Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe herunterreguliert sei, um so interessanter ist es, dass in den durchgeführten Versuchen die Sekretion von VEGF-D sowohl in den Tumor- als auch Endothelzellen nachzuweisen war.

Auch die Arbeit von Moffat et al. untersuchte das Expressionsverhalten von VEGF-D in VEGF-A-über- und -unterexprimierenden Tumoren auf mRNA-Ebene. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine deutliche Steigerung der VEGF-D-Expression mittels Western Blot und PCR in VEGF-A-unterexprimierenden Tumoren im Tiermodell festzustellen war. Des Weiteren zeichneten sich die VEGF-unterexprimierenden-Tumoren im Gegensatz zu VEGF-überexprimierenden Tumoren durch langsamere Wachstumsraten und einen erhöhten Blutfluss - insgesamt ein effizientere vaskuläre Struktur - aus. Da in den VEGF-A-unterexprimierenden Tumoren die Expression von VEGF-D signifikant gesteigert war, wurde dieser lymphangiogene Faktor als alternativer angiogener Faktor angesehen, der möglicherweise die Funktionen von VEGF-A übernimmt. Zusätzlich äußerte Moffat et al. die Vermutung, dass die Blockade nur eines angiogenen Faktors das Invasivitätspotential erhöhen könnte, zumal VEGF-D bei der Metastasenbildung eine wichtige Rolle spielt (Moffat et al.).

In einer anderen Studie wurde die Sekretion von VEGF-A und VEGF-C in Tumorzelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten untersucht, darunter Epidermoid, Mamma-Karzinom, Leiomyosarkom, Ovarial-Karzinom, Nierenzellkarzinom, kleinzelliges Bronchial-Karzinom und viele andere. Die Expression von VEGF-A und VEGF-C waren in der Tumorzelllinie U87 mit 7092 pg/ml und VEGF-C 16250 pg/ml sowie in der Zelllinie U118 mit VEGF-A 46875 pg/ml und VEGF-C 25938 pg/ml von allen Tumorentitäten am höchsten, während die Tumorzelllinien der anderen Tumorentitäten zwischen 1000 bis 10.000 pg/ml VEGF-A (Mamma-Ca, Prostata-Ca, kleinzelliges Lungenkarzinom) sezernieren (Laakkonen et al.).

So erscheinen die genannten Faktoren im Glioblastom eine essentielle Rolle zu spielen.

7.3.3 Einfluss von VEGFs auf die Proliferation von Tumor- und Endothelzellen *in-vitro*

Die Zugabe der Wachstumsfaktoren, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-C156s zeigte kaum einen Einfluss auf den verwendeten Tumorzellen U87, U251 sowie den HBMEC und den isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom. Nur VEGF-A bewirkte in den U87-Tumorzellen einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum.

Prinzipiell lässt sich nachvollziehen, dass Tumorzellen durch eine Vielzahl von Mediatoren zur Proliferation angeregt werden können. Auch wird vermutet, dass Tumorzellen eine optimale Dosis an Wachstumsfaktoren produzieren können und sich möglicherweise auto- und parakrin stimulieren. So lässt sich auch dieses Ergebnis interpretieren. Dies wurde in einer Studie von Mentlein et al. untersucht, in der die Stimulation von Gliomzellen durch VEGF-A, VEGF-D und PlGF keine signifikante Proliferationssteigerung ergab. Mentlein et al. führt dies darauf zurück, dass die auf RNA-Ebene die Expression der Rezeptorsysteme VEGFR-1 und VEGFR-2 im Vergleich zu HUVEC um 1000- bzw. 50-fach und somit die autostimulatorischen Effekte durch die Wachstumsfaktoren nur gering sind.

Endothelzellen sind bekannterweise langlebige Zellen, die selten Mitose aufweisen. Nur etwa 0,01% der Endothelzellen teilen sich und auch die Signalkaskaden sind meist inaktiv (Jekunen and Kairemo). Sie benötigen proangiogene Signale, damit sie zur Proliferation angeregt werden („angiogenic switch“) (Alitalo and Carmeliet). Innerhalb der Endothelzell-Subtypen, wie bspw. HBMEC und HUVEC bestehen deutliche Unterschiede in der Expression von VEGFR-2 und -3 sowie im Ansprechen auf die unterschiedlichen Wachstumsfaktoren. Beispielsweise exprimieren HBMEC deutlich mehr VEGFR-3 als HUVEC und werden durch Stimulation von VEGF-D in der Proliferation angeregt (Alam et al.). HUVEC werden durch die Gabe von VEGF-D hingegen im Wachstum kaum beeinträchtigt.

Auch die Affinität zwischen Rezeptoren und Liganden spielt eine tragende Rolle im VEGFR-2- und -3-System. Bezüglich VEGF-C ist bekannt, dass es die Phosphorylierung von VEGFR-3 in mittleren Dosen (bis 400ng/ml) induziert und erst in höheren Konzentrationen VEGFR-2 aktiviert (Suzuki et al.). Auch scheint

VEGF-D den VEGFR-2-Rezeptor viel schwächer zu phosphorylieren und stattdessen VEGFR-3 deutlich stärker.

Je nach dem Expressionsverhalten der untersuchten Zellen ist abhängig welcher Wachstumsfaktor für die Eigenschaften der Endothelzellen verantwortlich ist. In Studien konnte gezeigt werden, dass für VEGFR-2-positive Endothelzellen hauptsächlich VEGF-A ein Überlebensfaktor darstellt im Gegensatz zu VEGFR-3-positive Endothelzellen, bei denen diese Aufgabe von VEGF-C übernommen wird. Dies wurde an VEGFR-2 positiven hämangiogenen Endothelzellen (HBMEC) sowie VEGFR-3-positiven lymphatischen Endothelzellen überprüft, jedoch bisher noch nicht an Tumorendothelzellen.

In den hier durchgeführten Versuchen ließ sich in normalem serumfreiem Medium in den Endothelzellen keine Proliferationssteigerung erzielen. In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben bezüglich des Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Endothelzellen. In Endothelzellen der Kornea bspw. ist keine Proliferationssteigerung durch Zugabe von VEGF-A in unterschiedlichen Konzentrationen zu erzielen (Yoeruek et al.). Wohingegen in anderen Studien Endothelzellen (HUVEC) durch die Zugabe von VEGF-A deutlich mit einer Proliferationssteigerung in Konzentrationen von 100 ng/ml bis hin zu 500 ng/ml reagieren. Die hier verwendeten Endothelzellen HBMEC und TUEC reagierten unter Normalbedingungen nicht auf die Wachstumsfaktoren, was möglicherweise daran liegt, dass in diesen Versuchen VEGF-A in der Konzentration von 50ng/ml zugegeben wurde. Auch zeigen die bisherigen Studien, dass individuelle organtypische Unterschiede in den Endothelzellen bestehen und somit auch das Ansprechen auf verschiedene Wachstumsfaktoren.

7.3.4 Einfluss von Bevacizumab auf die Proliferation *in-vitro*

Die Wirkung von Bevacizumab wurde in zahlreichen Tiermodellen untersucht. In *in-vivo*-Modellen, konnte die anti-angiogene Therapie v.a. in Kombination mit Chemo- und Strahlentherapie eine transiente Tumorregression erzielen (Lamszus et al.; Kunkel et al.; Saidi et al.). Der Effekt beruht hierbei auf die Normalisierung der pathologischen Gefäßarchitektur mit einem konsekutiv verbesserten Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie zurückzuführen.

Bisher gibt es wenige Untersuchungen *in-vitro*, die den Einfluss von Bevacizumab auf Zellebene in Glioblastomen untersucht haben. In dieser Arbeit konnte erstmals der Einfluss von Bevacizumab *in-vitro* in Tumor- und Endothelzellen des Glioblastoms in Bezug auf das Rezeptorsystem VEGFR-3 dargestellt werden.

In den durchgeführten Proliferationsversuchen wurde die Konzentration nach Literaturangaben ausgewählt (Yoeruek et al., Mentlein et al.), da es bislang wenige Informationen über optimale Konzentrationen für Bevacizumab in *in-vitro*-Experimenten gibt. In der Literatur ist eine Dosisbreite von 5ng/ml bis 5mg/ml aufgeführt. Die Zeitpunkte für die Inkubation mit Bevacizumab richtete sich nach den *in-vivo*-Experimenten, in denen sich nach zehn bis 14 Tagen erstmals eine Tumorregression sowie das Auftreten von distanten Satellitentumoren zeigte (Winkler et al.).

In den durchgeführten Proliferationsversuchen mit Bevacizumab in einer Konzentrationsreihe von 5-500µg/ml konnte nach 96h kein Effekt von Bevacizumab auf die Proliferation der Tumor- und Endothelzellen nachgewiesen werden.

Analog zu den Untersuchungen, konnten auch in anderen *in-vitro*-Modellen gezeigt werden, dass anti-angiogene Substanzen auf Tumor-Zelllinien keinen Einfluss auf die Proliferation bewirkten (Kunkel et al.; Bischof et al.; Saidi et al.). In der Literatur allerdings ist beschrieben, dass gewisse Antikörper, die auch gegen Bestandteile der intrazellulären Signalkaskade gerichtet waren, wie bspw. AAL881 (Inhibitor gegen VEGFR-2 und Raf) in Gliomzelllinien (D54, U87 und U373) nach 48h einen konzentrations- und zelltyp-abhängigen Proliferationsrückgang von bis zu 68% erzielen konnten (Sathornsumetee et al.). Diese Tumorregression war auf die Inhibition eines intrazellulären Signalwegs sowie den kombinatorischen Effekt zurückzuführen, der gegen VEGFR-2 und Raf gerichtet ist.

In einem weiteren Ansatz wurde der Langzeit-Effekt von Bevacizumab über 14 Tage auf Tumor- und Endothelzellen untersucht, um den *in-vivo*-Modellen möglichst gerecht zu werden (Winkler et al.).

Nach 14-tägiger Bevacizumab-Inkubation ist die Proliferationsrate der Tumor- und Endothelzellen durch die Bevacizumabgabe signifikant eingeschränkt.

Prinzipiell wurde in den FACS-Analysen nachgewiesen, dass der proliferationshemmende Effekt durch eine Langzeit-Bevacizumab-Inkubation nicht auf apoptose-induzierende Mechanismen beruht, sondern durch einen tatsächlichen Effekt der anti-VEGF-A-Therapie.

Interessanterweise hatte die Langzeit-Bevacizumab-Inkubation nicht nur einen proliferationshemmenden Einfluss, sondern induzierte auch eine Modulation des Effekts der Wachstumsfaktoren auf die Proliferation.

In den U87-Tumorzellen konnte eine Proliferationssteigerung ohne Vorbehandlung nur durch VEGF-A erzielt werden, während nach Langzeit-Bevacizumab-Gabe VEGF-D einen signifikanten proliferationssteigernden Einfluss einnahm. In den U251-Tumorzellen war ohne Vorbehandlung mit Bevacizumab kein Effekt der Wachstumsfaktoren festzustellen, während nach der Inkubation mit Bevacizumab sowohl VEGF-C als auch VEGF-D die Proliferation stimulierten. In einer ähnlichen Studie konnte gezeigt werden, dass Bevacizumab in U87 die Expression von Matrix-Metalloproteinasen und proangiogenen Faktoren wie bspw. bFGF und Angiopoetin induziert (Lucio-Eterovic et al.) und somit alternative pathways zu Tragen kommen. Auch hinsichtlich der Expression auf mRNA-Ebene konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass in U87 nach 14d Bevacizumab-Inkubation die Expression von VEGF-D hochreguliert wird (Grau, Thorsteinsdottir et al.).

Auch in den HBMEC und TUEC konnte nach Langzeit-Bevacizumab-Inkubation ein mitogener Effekt durch VEGF-C, VEGF-D und VEGF-C156 erzielt werden.

Matsumura et al. erklärte, dass VEGF-C unter in-vitro-Bedingungen die Funktion von VEGF-A während anti-VEGF-Therapie ersetzen kann, allerdings im Bezug auf die Koloniebildung von Endothelzellen (Matsumura et al.). Das VEGFR-3-System wird als alternativer Signalweg betrachtet, der bspw. bei Serummangel im Medium eingreift und die Apoptose von Endothelzellen, sowohl von vaskulären als auch von lymphatischen Endothelzellen, verhindert.

Bezüglich der Wachstumsfaktoren ist außerdem bekannt, dass die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden wie bspw. p42/44-MAPK durch Stimulation mit VEGF-A nur kurz anhält, während die Stimulation mit VEGF-C bis zu 6h lang

persistiert (Makinen et al.). Auch dies könnte einen Grund darstellen, warum VEGF-C und -D eine gesteigerte Proliferation in den Endothelzellen induzieren.

7.3.5 Einfluss von Bevacizumab auf die Migration *in-vitro*

Der Collagen Assay stellte ein dreidimensionales System dar, in der die Migrationsfähigkeit der Zellen deskriptiv erfasst werden kann. Die Ergebnisse der dreidimensionalen Collagen Assays zeigten, dass die Migration von Tumor- und Endothelzellen entscheidend von Mediatoren im Serum abhängig ist.

Bezüglich der Endothelzellen scheint Bevacizumab einen inhibitorischen Einfluss auf das Migrationsverhalten auszuüben. Auch in anderen Studien konnte in Migrationsassays bereits gezeigt werden, dass durch anti-VEGF-A-Therapie das Migrationsverhalten von Endothelzellen gehemmt wird. In der Studie von Chen et al. wurde dies an HUVEC untersucht und auch unter dem Gesichtspunkt der Kokultur mit Glioblastomzellen (Chen et al.). Auch in einer anderen Studie von Bergers et al. konnte derselbe Effekt der Inhibition der Migration von Endothelzellen im Collagen Assay erzielt werden. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass hierbei MMP-9 für die Sekretion von VEGF-A essentiell ist (Berger et al.). Allerdings wird in den anderen Studien nicht auf die langfristige anti-VEGF-A-Inkubation eingegangen. In den hier durchgeführten Versuchen veränderten sich auch die Morphologie und das Wachstumsverhalten interessanterweise, so dass die Endothelzellen in der Kontrollgruppe im Zellverbund verblieben. Die Endothelzellen, welche mit Bevacizumab inkubiert wurden, migrierten diffus in die dreidimensionale Matrix ein. Es lässt sich somit beobachten, dass Bevacizumab bezüglich der Migration einen promigratorischen Einfluss ausübt. Dies sind jedoch noch vorläufige Beobachtungen, die quantifizierbar untersucht werden sollten.

7.3.6 Einfluss von Bevacizumab auf *in-vitro*-Angiogenese

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom im tube-formation-assay ein deutlich feinmaschigeres Netzwerk im Vergleich zu den HBMEC ausbildeten. Nach 14-tägiger Bevacizumab-Inkubation wurde die „Tube Formation“ in HBMEC und Tumorendothelzellen inhibiert. Für die TUEC und HBMEC zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung.

Interessanterweise wurde nach Langzeit-Bevacizumab-Therapie die Ansprechbarkeit auf die Faktoren VEGF-C und VEGF-D signifikant gesteigert. In Zusammenschau dieser Daten lässt sich daraus schließen, dass in den HBMEC und isolierten Endothelzellen aus dem Glioblastom die Faktoren VEGF-C und VEGF-D unter anti-VEGF-A Therapie ein essentielles System darstellen, die die Ausbildung von charakteristischen Wachstumsmustern aufrechterhalten.

Einige Studien untersuchten den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die *in-vitro*-Angiogenese im physiologischen Organismus. Durch die Stimulation von BAE (bovine aortic endothelial cells) oder HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) mit Wachstumsfaktoren wird das migratorische Potential in Tube Formation Assays und Collagen Assays gesteigert. Kongruent dazu wird durch die Inhibition von VEGFR-2 und VEGFR-3 die Migrationsfähigkeit und Tube-Formation eingeschränkt. Durch VEGFR-2-Inhibitoren konnte die Ausbildung von Tubes um bis zu 67% eingeschränkt werden und durch Blockade beider Rezeptoren wurde die Ausbildung eines *in-vitro*-Gefäßnetzes von Endothelzellen komplett unterdrückt (Persaud et al.). Alam et al. zeigte, dass die Tube Formation nur im heterodimerisierten Zustand von VEGFR-2 und -3 stattfindet. In lymphatischen Endothelzellen, die nicht über einen VEGFR-2 verfügten, konnte keine Tube formation ausgelöst werden. Nur in VEGFR-2 und -3 koexprimierenden Endothelzellen hingegen konnte die Ausbildung der Tubes durch die Stimulation mit Wachstumsfaktoren gesteigert werden (Alam et al.).

7.3.7 Einfluss von Bevacizumab auf die intrazelluläre Signalkaskade

Nach Inkubation der Zelllinien mit Bevacizumab über zehn Tage, wurde mittels Western Blot Analyse untersucht, ob sich die Quantität des VEGFR-2- und 3-Proteins verändert hat. Es ließ sich jedoch weder eine Hoch- noch Herunterregulation der Rezeptoren feststellen. Somit scheint sich durch anti-VEGF-A-Therapie an der Quantität der Rezeptoren keine Veränderung zu zeigen. Dies kann durch die Arbeit von Jimenez et al. bestätigt werden: Trotz Inkubation von HUVEC mit einem sog. Diabody, der gegen VEGFR-2 und -3 gerichtet war, sowie durch einzelne Antikörper gegen die zwei Rezeptoren, wurde keine Veränderung der Expression der beiden Rezeptoren erzielt (Jimenez et al.).

Dennoch zeigten die Ergebnisse der Proliferationsassays und der Tube-Formation-Assays eine deutliche Modulation der Rezeptoraktivität auf die Ansprechbarkeit für VEGF-C, VEGF-D und VEGF-C156.

Daher wurde untersucht, inwieweit sich diese Veränderungen in der intrazellulären Signalkaskade dieser Rezeptoren bemerkbar macht. Es war bezüglich allen intrazellulären Pathways eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus unter Bevacizumab-Therapie ersichtlich.

Für die Tumorzellen wurde insgesamt der phosphorylierte Anteil der p42/44-MAPK nach Bevacizumab deutlich reduziert. In der Literatur wird beschrieben, dass die p42/44-MAPK hauptsächlich für die Proliferation von Zellen verantwortlich ist und vor Serumdeprivation induzierter Apoptose schützt (Makinen et al, Nishina, Wada, and Katada et al.). Daher lässt sich interpretieren, dass möglicherweise nach Langzeit-Bevacizumab-Inkubation die proliferationssteigernden Pathways über die p42/44-MAPK gehemmt sind. Interessanterweise ist der Anteil der phosphorylierten p38-MAPK nach Bevacizumab-Behandlung gesteigert, welche laut einiger Studien die promigratorischen Funktionen der Tumorzellen aktiviert (Su et al.). Die SAPK/JNK schützt Zellen vor Stresszuständen inklusive Hypoxie, Bestrahlung oder inflammatorische Prozesse. Daher erscheint wäre es möglich, dass die Tumorzellen unter anti-VEGF-A-Therapie einem Stress-induzierenden Zustand ausgesetzt und dadurch andere Signalsysteme zur Kompensation aktivieren.

Auch lassen sich in den HBMEC und TUEC nach Bevacizumab-Behandlung ähnliche Veränderungen feststellen. Der Anteil der phosphorylierten p38-MAPK ist in der Bevacizumab-behandelten Gruppe hochreguliert, so dass dies die promigratorischen Eigenschaften im Collagen Assay erklären könnten. Bezüglich der p42/44-MAPK sowie der SAPK/JNK lassen sich nicht eindeutigen Aussagen treffen in den Endothelzellen bezüglich der unterschiedlichen Aktivität unter Langzeit-Bevacizumab-Behandlung feststellen.

Insgesamt lässt sich anhand der Untersuchungen zeigen, dass nach Bevacizumab-Therapie die entsprechenden Pathways der VEGF-Rezeptoren eine unterschiedliche Aktivität zeigen und dies möglicherweise für die funktionellen Veränderungen hinsichtlich Proliferation und *in-vitro*-Angiogenese verursachen könnte.

7.4 Expression von VEGFR-3 im Tiermodell nach Behandlung mit einem VEGFR-2-Inhibitor (DC101)

Die Arbeit hat den Einfluss von anti-angiogener Therapie hinsichtlich des Rezeptorsystems VEGFR-3 *in vitro* untersucht. Um jedoch die Relevanz im *in-vivo*-Modell zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte von Mäusen untersucht, welchen G55-Glioblastomzellen stereotaktisch implantiert wurden und anschließend mit dem VEGFR-2-Inhibitor DC101 behandelt wurden (Kunkel et al., Kerbel et al., Lamszus et al.). Der Effekt beruht auf einem anderen Mechanismus als der neutralisierende Antikörper Bevacizumab, da der VEGFR-2-Rezeptor durch DC101 direkt blockiert wird. In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob das VEGFR-3-System überhaupt im *in-vivo*-Modell exprimiert wird und ob es unter anti-angiogener Therapie ein unterschiedliches Expressionsmuster von VEGFR-3 zu verzeichnen ist.

Nach 14-tägiger Behandlung von Mäusen mit dem VEGFR-2-Inhibitor DC101 ist deutlich ersichtlich, dass sich ein multifokales Rezidiv mit kleineren Tumorabsiedlungen bildete. Die Ausbildung einer multifokalen Tumorphase wurde bereits in anderen *in-vivo*-Modellen beobachtet. Auch in ersten klinischen Beobachtungen an Patienten wurde die multifokale Tumorphase bereits diskutiert.

Die Immunhistochemie konnte zeigen, dass die Liganden VEGF-C und VEGF-D deutlich im Tumorgewebe exprimiert sind. Interessanterweise war positives Signal für VEGFR-3 kaum im Tumorgewebe zu finden, jedoch deutlich in der Invasionszone des Tumors zum gesunden Hirnparenchym. Außerdem fanden sich einzelne VEGFR-3-positive Zellen distal vom Haupttumor sowie von den Tumorzellabsiedlungen. Diese immunhistochemische Darstellung bestärkt, dass die in dieser Arbeit aufgezeigte Relevanz des VEGFR-3-Systems als Resistenzmechanismus nach anti-angiogener Therapie nicht nur *in-vitro* eine Rolle spielt, sondern auch *in-vivo* eine entscheidende Bedeutung erlangt. Hierzu bedarf es jedoch noch weiterer Untersuchungen.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Bisherige Studien konnten zeigen, dass das bis dato als hauptsächlich der Lymphangiogenese zugeschriebene System, VEGFR-3 und seine Liganden VEGF-C und -D im Glioblastomgewebe immunhistochemisch und auf mRNA-Ebene vorhanden ist. Mit dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass VEGFR-3 und seine Liganden VEGF-C und -D, auf Tumor- und Endothelzellen im Glioblastom auf zellulärer Ebene exprimiert werden. Des Weiteren wurde der Effekt einer anti-angiogenen Therapie mittels Bevacizumab auf zellulärer Ebene hinsichtlich des Rezeptorsystems VEGFR-3 untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch kurzzeitige Bevacizumab-Therapie nur schwache inhibitorische Effekte hinsichtlich der Proliferation und Migration von Tumor- und Endothelzellen erzielt wurden. Erst durch längerfristige Bevacizumab-Behandlung konnte eine signifikante Hemmung der Proliferation, Migration und der *in-vitro*-Angiogenese hervorgerufen werden. Zudem konnte festgestellt werden, dass erst durch die langfristige Bevacizumab-Therapie die Faktoren VEGF-C, VEGF-D und VEGF-C156 in Tumor- und Endothelzellen an Bedeutung gewinnen, in dem sie Signalsysteme aktivierten und die inhibitorische Wirkung von Bevacizumab bezüglich Proliferation und Migration verminderten.

Durch die anti-angiogene Therapie wurde weder der Rezeptorstatus noch die Aktivität von VEGFR-2 und -3 verändert, jedoch wurde die Ansprechbarkeit dieser Rezeptoren moduliert. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass durch diese Modulation andere Signalkaskaden hochreguliert wurden, die unter Normalbedingungen nicht zu Tragen kamen, welche die migratorischen Eigenschaften sowie das Überleben von Tumor- und Endothelzellen fördern. Das VEGFR-3-Rezeptorsystem dient somit nicht nur kompensatorisch während einer anti-VEGF-A-Therapie, sondern führt zu einem veränderten Phänotyp der Tumor- und Endothelzellen, dessen Eigenschaften bezüglich der Proliferation, Migration und *in-vitro*-Angiogenese sich von den Normalbedingungen unterscheiden.

Da die bisherigen Studien, welche die Wirkung von anti-angiogenen Substanzen evaluieren, nur zu einem transienten Tumorregress geführt haben und erste Beobachtungen gezeigt haben, dass die anti-angiogene Therapie möglicherweise zu einer multifokalen Ausbreitung von Tumorzellen im Glioblastomen führt, sollten zunächst alternative Signalsysteme wie beispielsweise VEGFR-3 hinreichend untersucht werden und gegebenenfalls attackiert werden.

Diese Arbeit konnte zum ersten Mal einen „Escape-Mechanismus“ während anti-angiogener Therapie durch das Rezeptorsystem VEGFR-3 aufzeigen und verdeutlichen, dass die anti-angiogene Therapie zur Ausbildung von Resistenzmechanismen im Glioblastom *in-vitro* führt. Der Aufklärung der Resistenzmechanismen der Gliom- und Endothelzellen jedoch bedarf es noch einer Vielzahl weiterführender Experimente.

9 Literaturverzeichnis

- Achen, M. G., et al. "Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4)." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 95.2 (1998): 548-53.
- Alam, A., et al. "Heterodimerization with vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) is necessary for VEGFR-3 activity." Biochem.Biophys.Res.Comm. 324.2 (2004): 909-15.
- Alitalo, K. and P. Carmeliet. "Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease." Cancer Cell 1.3 (2002): 219-27.
- Ananthnarayan, S., et al. "Time course of imaging changes of GBM during extended bevacizumab treatment." J.Neurooncol. 88.3 (2008): 339-47.
- Baldwin, M. E., S. A. Stacker, and M. G. Achen. "Molecular control of lymphangiogenesis." Bioessays 24.11 (2002): 1030-40.
- Batchelor, T. T., et al. "AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients." Cancer Cell 11.1 (2007): 83-95.
- Beck, T. J., et al. "Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX." Lasers Surg.Med. 39.5 (2007): 386-93.
- Benouchan, M. and B. M. Colombo. "Anti-angiogenic strategies for cancer therapy (Review)." Int.J.Oncol. 27.2 (2005): 563-71.
- Bergers, G. and L. E. Benjamin. "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nat.Rev.Cancer 3.6 (2003): 401-10.
- Bergers, G., et al. "Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis." Nat.Cell Biol. 2.10 (2000): 737-44.
- Bergers, G., et al. "Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors." J.Clin.Invest 111.9 (2003): 1287-95.
- Birnbaum, T., et al. "Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines." J.Neurooncol. 83.3 (2007): 241-47.
- Bischof, M., et al. "Triple combination of irradiation, chemotherapy (pemetrexed), and VEGFR inhibition (SU5416) in human endothelial and tumor cells." Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys. 60.4 (2004): 1220-32.
- Brockington, A., et al. "Vascular endothelial growth factor and the nervous system." Neuropathol.Appl.Neurobiol. 30.5 (2004): 427-46.
- Carmeliet, P. "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat.Med. 6.4 (2000): 389-95.

- Casanovas, O., et al. "Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors." Cancer Cell 8.4 (2005): 299-309.
- Chamberlain, M. C. "Treatment options for glioblastoma." Neurosurg.Focus. 20.4 (2006): E2.
- Chen, Z. et al. "In vitro angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by three-dimensional co-culture with glioblastoma cells." J Neuroonc. (2009): 121-128
- Cross, M. J., et al. "VEGF-receptor signal transduction." Trends Biochem.Sci. 28.9 (2003): 488-94.
- Debinski, W., et al. "VEGF-D is an X-linked/AP-1 regulated putative onco-angiogen in human glioblastoma multiforme." Mol.Med. 7.9 (2001): 598-608.
- Dixelius, J., et al. "Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites." J.Biol.Chem. 278.42 (2003): 40973-79.
- Erber, R., et al. "Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms." FASEB J. 18.2 (2004): 338-40.
- Ferrara, N., K. J. Hillan, and W. Novotny. "Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy." Biochem.Biophys.Res.Comm. 333.2 (2005): 328-35.
- Fischer, I., et al. "High-grade glioma before and after treatment with radiation and Avastin: initial observations." Neuro.Oncol. 10.5 (2008): 700-08.
- Folberg, R., M. J. Hendrix, and A. J. Maniotis. "Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis." Am.J.Pathol. 156.2 (2000): 361-81.
- Furnari, F. B., et al. "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment." Genes Dev. 21.21 (2007): 2683-710.
- Goetz, C. M., et al. "Distribution of labelled anti-tenascin antibodies and fragments after injection into intact or partly resected C6-gliomas in rats." Cancer Immunol.Immunother. 54.4 (2005): 337-44.
- Goldbrunner, R. H., et al. "Vascular endothelial growth factor-driven glioma growth and vascularization in an orthotopic rat model monitored by magnetic resonance imaging." Neurosurgery 47.4 (2000): 921-29.
- Goldbrunner, R. H., M. Bendszus, and J. C. Tonn. "Models for angiogenesis in gliomas." Cancer Treat.Res. 117 (2004): 115-35.
- Goldbrunner, R. H., et al. "PTK787/ZK222584, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, decreases glioma growth and vascularization." Neurosurgery 55.2 (2004): 426-32.

- Goldbrunner, R. H., et al. "Vascularization of human glioma spheroids implanted into rat cortex is conferred by two distinct mechanisms." J.Neurosci.Res. 55.4 (1999): 486-95.
- Grau, S. J., Trillsch, F., Herms J. et al. "Expression of VEGFR3 in glioma endothelium correlates with tumor grade." J.Neurooncol. 82.2 (2007): 141-50.
- Grau, S. J., Trillsch, F., von Lüttichau, I. et al. "Lymphatic phenotype of tumour vessels in malignant gliomas." Neuropathol.Appl.Neurobiol. 34.6 (2008): 675-79.
- Grau, S. J., Thorsteinsdottir, J. et al. "Bevacizumab can induce reactivity to VEGF-C and -D in human brain and tumour derived endothelial cells." J. Neurooncol. 104(1): (2011) 103-12.
- Hicklin, D. J. and L. M. Ellis. "Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis." J.Clin.Oncol. 23.5 (2005): 1011-27.
- Hillen, F. and A. W. Griffioen. "Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond." Cancer Metastasis Rev. 26.3-4 (2007): 489-502.
- Hoshida, T., et al. "Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications." Cancer Res. 66.16 (2006): 8065-75.
- Huang, H., et al. "Expression of VEGF and its receptors in different brain tumors." Neurol.Res. 27.4 (2005): 371-77.
- Huang, J., et al. "Vascular remodeling marks tumors that recur during chronic suppression of angiogenesis." Mol.Cancer Res. 2.1 (2004): 36-42.
- Hurwitz H et al. "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer." N Engl J Med (2004) 350:2335–2342
- Jain, R. K., et al. "Angiogenesis in brain tumours." Nat.Rev.Neurosci. 8.8 (2007): 610-22.
- Jain, R. K., et al. "Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer." Nat.Clin.Pract.Oncol. 3.1 (2006): 24-40.
- Jekunen, A. and K. Kairemo. "Inhibition of angiogenesis at endothelial cell level." Microsc.Res.Tech. 60.1 (2003): 85-97.
- Jenab-Wolcott J, Giantonio BJ "Bevacizumab: current indications and future development for management of solid tumors." Expert Opin Biol Ther (2009): 507–517
- Jenny, B., et al. "Expression and localization of VEGF-C and VEGFR-3 in glioblastomas and haemangioblastomas." J.Pathol. 209.1 (2006): 34-43.

- Jimenez, X., et al. "A recombinant, fully human, bispecific antibody neutralizes the biological activities mediated by both vascular endothelial growth factor receptors 2 and 3." Mol.Cancer Ther. 4.3 (2005): 427-34.
- Jubb, A. M., et al. "Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy." Nat.Rev.Cancer 6.8 (2006): 626-35.
- Kabbinavar, F. et al. "Phase II randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/ leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol (2003): 60–65
- Kargiotis, O., J. S. Rao, and A. P. Kyritsis. "Mechanisms of angiogenesis in gliomas." J.Neurooncol. 78.3 (2006): 281-93.
- Kerbel, R. S., et al. "Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches." Cancer Metastasis Rev. 20.1-2 (2001): 79-86.
- Kioi, M., et al. "Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice." J.Clin.Invest 120.3 (2010): 694-705.
- Kirsch, M., G. Schackert, and P. M. Black. "Anti-angiogenic treatment strategies for malignant brain tumors." J.Neurooncol. 50.1-2 (2000): 149-63.
- Kunkel, P., et al. "Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2." Cancer Res. 61.18 (2001): 6624-28.
- Laakkonen, P., et al. "Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth." Cancer Res. 67.2 (2007): 593-99.
- Lamszus, K., et al. "Inhibition of glioblastoma angiogenesis and invasion by combined treatments directed against vascular endothelial growth factor receptor-2, epidermal growth factor receptor, and vascular endothelial-cadherin." Clin.Cancer Res. 11.13 (2005): 4934-40.
- Lucio-Eterovic, A. K., Y. Piao, and J. F. de Groot. "Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy." Clin.Cancer Res. 15.14 (2009): 4589-99.
- Lun, M., Lok. E. Gautam, S. Wu, E. Wong, ET. "The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme." J.Neurooncol. (2011)
- Macdonald, D. R., et al. "Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma." J.Clin.Oncol. 8.7 (1990): 1277-80.
- Machein, M. R. and K. H. Plate. "VEGF in brain tumors." J.Neurooncol. 50.1-2 (2000): 109-20.
- Makinen, T., et al. "Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3." EMBO J. 20.17 (2001): 4762-73.

- Matsumoto, T., et al. "VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA_d in tumor angiogenesis." EMBO J. 24.13 (2005): 2342-53.
- Matsumura, K., et al. "Modulation of VEGFR-2-mediated endothelial-cell activity by VEGF-C/VEGFR-3." Blood 101.4 (2003): 1367-74.
- Mentlein R., Forstreuter F., Mehdorn H. M., Held-Feindt J. "Functional significance of vascular endothelial growth factor receptor expression on human glioma cells." J Neurooncol (2004) 67:9–18
- Midgley, R. and D. Kerr. "Bevacizumab--current status and future directions." Ann.Oncol. 16.7 (2005): 999-1004.
- Miller, C. R. and A. Perry. "Glioblastoma." Arch.Pathol.Lab Med. 131.3 (2007): 397-406.
- Moffat, B. A., et al. "Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A causes a paradoxical increase in tumor blood flow and up-regulation of VEGF-D." Clin.Cancer Res. 12.5 (2006): 1525-32.
- Moreira, I. S., P. A. Fernandes, and M. J. Ramos. "Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition--a critical review." Anticancer Agents Med.Chem. 7.2 (2007): 223-45.
- Nishina, H., T. Wada, and T. Katada. "Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway." J.Biochem. 136.2 (2004): 123-26.
- Norden, A. D., J. Drappatz, and P. Y. Wen. "Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas." Lancet Neurol. 7.12 (2008): 1152-60.
- Olsson, A. K., et al. "VEGF receptor signalling - in control of vascular function." Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 7.5 (2006): 359-71.
- Paez-Ribes, M., et al. "Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis." Cancer Cell 15.3 (2009): 220-31.
- Pajusola, K., et al. "FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines." Cancer Res. 52.20 (1992): 5738-43.
- Partanen, T. A., et al. "VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues." FASEB J. 14.13 (2000): 2087-96.
- Partanen, T. A. and K. Paavonen. "Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans." Microsc.Res.Tech. 55.2 (2001): 108-21.
- Pepper, M. S., et al. "Lymphangiogenesis and tumor metastasis." Cell Tissue Res. 314.1 (2003): 167-77.

- Persaud, K., et al. "Involvement of the VEGF receptor 3 in tubular morphogenesis demonstrated with a human anti-human VEGFR-3 monoclonal antibody that antagonizes receptor activation by VEGF-C." J.Cell Sci. 117.Pt 13 (2004): 2745-56.
- Plate, K. H., et al. "Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo." Nature 359.6398 (1992): 845-48.
- Pöpperl, G., Götz, C., Rachinger, W., Schnell, O., Gildehaus, F.J., Tonn, J.C., Tatsch, K. "Serial O-(2-[(18)F]fluoroethyl)-L-tyrosine PET for monitoring the effects of intracavitary radioimmunotherapy in patients with malignant glioma." Eur J Nucl Med Mol Imaging (2006)
- Reardon, D. A., et al. "The emerging role of anti-angiogenic therapy for malignant glioma." Curr.Treat.Options.Oncol. 9.1 (2008): 1-22.
- Reardon, D. A., et al. "Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma." J.Neurooncol. 96.2 (2010): 219-30.
- Rosen, L. S. "VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances." Oncologist. 10.6 (2005): 382-91.
- Saharinen, P. and T. V. Petrova. "Molecular regulation of lymphangiogenesis." Ann.N.Y.Acad.Sci. 1014 (2004): 76-87.
- Saidi, A., et al. "Experimental anti-angiogenesis causes upregulation of genes associated with poor survival in glioblastoma." Int.J.Cancer 122.10 (2008): 2187-98.
- Salameh, A., et al. "Direct recruitment of CRK and GRB2 to VEGFR-3 induces proliferation, migration, and survival of endothelial cells through the activation of ERK, AKT, and JNK pathways." Blood 106.10 (2005): 3423-31.
- Sandstrom, M., et al. "Effects of the VEGFR inhibitor ZD6474 in combination with radiotherapy and temozolomide in an orthotopic glioma model." J.Neurooncol. 88.1 (2008): 1-9.
- Sathornsumetee, S., et al. "Tumor angiogenic and hypoxic profiles predict radiographic response and survival in malignant astrocytoma patients treated with bevacizumab and irinotecan." J.Clin.Oncol. 26.2 (2008): 271-78.
- Sathornsumetee, S., et al. "AAL881, a novel small molecule inhibitor of RAF and vascular endothelial growth factor receptor activities, blocks the growth of malignant glioma." Cancer Res. 66.17 (2006): 8722-30.
- Schichor, C., et al. "Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC)." Exp.Neurol. 199.2 (2006): 301-10.
- Schmidt, N. O., et al. "Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis." Int.J.Cancer 84.1 (1999): 10-18.

- Sharma, S., M. C. Sharma, and C. Sarkar. "Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis." Histopathology 46.5 (2005): 481-89.
- Skobe, M., et al. "Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis." Nat.Med. 7.2 (2001): 192-98.
- Stacker, S. A., et al. "VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics." Nat.Med. 7.2 (2001): 186-91.
- Stupp, R., et al. "Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide." J.Clin.Oncol. 20.5 (2002): 1375-82.
- Stupp, R., et al. "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N.Engl.J.Med. 352.10 (2005): 987-96.
- Su, J. L., et al. "The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells." Cancer Cell 9.3 (2006): 209-23.
- Suzuki, H., et al. "Roles of vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling in differentiation of mouse embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells into endothelial cells." Blood 105.6 (2005): 2372-79.
- Swartz, M. A. and M. Skobe. "Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis." Microsc.Res.Tech. 55.2 (2001): 92-99.
- Tanner, P. G., et al. "Effects of drug efflux on convection-enhanced paclitaxel delivery to malignant gliomas: technical note." Neurosurgery 61.4 (2007): E880-E882.
- Tong, R. T., et al. "Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors." Cancer Res. 64.11 (2004): 3731-36.
- Vajkoczy, P., Menger, MD., Vollmar, B., Schilling, L., Schmiedek, P., Hirth, KP, Ullrich, A., Fong, TA. "Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy." Neoplasia (1999): 31-41.
- Valtola, R., et al. "VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer." Am.J.Pathol. 154.5 (1999): 1381-90.
- Veikkola, T., et al. "Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice." EMBO J. 20.6 (2001): 1223-31.
- Viloria-Petit, A., et al. "Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis." Cancer Res. 61.13 (2001): 5090-101.
- Vredenburgh, J. J., et al. "Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme." J.Clin.Oncol. 25.30 (2007): 4722-29.

- Weidner, N. "Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer." Am.J.Pathol. 147.1 (1995): 9-19.
- Westphal, M., et al. "A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma." Neuro.Oncol. 5.2 (2003): 79-88.
- Wigle, J. T., et al. "An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype." EMBO J. 21.7 (2002): 1505-13.
- Winkler, F., et al. "Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases." Cancer Cell 6.6 (2004): 553-63.
- Wirzenius, M., et al. "Distinct vascular endothelial growth factor signals for lymphatic vessel enlargement and sprouting." J.Exp.Med. 204.6 (2007): 1431-40.
- Witmer, A. N., et al. "Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3 in quiescent endothelia." J.Histochem.Cytochem. 50.6 (2002): 767-77.
- Witmer, A. N., et al. "VEGFR-3 in adult angiogenesis." J.Pathol. 195.4 (2001): 490-97.
- Yan, H., et al. "Mutant metabolic enzymes are at the origin of gliomas." Cancer Res. 69.24 (2009): 9157-59.
- Yoeruek E. et al. "Safety profile of bevacizumab on cultured human corneal cells." Cornea (2007): 26:977–982
- Zachary, I. "Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor." Am.J.Physiol Cell Physiol 280.6 (2001): C1375-C1386.
- Zhang, X., J. E. Groopman, and J. F. Wang. "Extracellular matrix regulates endothelial functions through interaction of VEGFR-3 and integrin alpha5beta1." J.Cell Physiol 202.1 (2005): 205-14.

10 ANHANG

10.1 Materialien, Lösungen und Konzentrationen

10.1.1 Geräte

| Gerät | Hersteller |
|-----------------------------------|---------------------|
| Autoklav | KSG |
| BioPhotometer | eppendorf |
| Blockthermostat BT 1301 | HLC |
| Brutschrank CD150 | Binder |
| Digitalkamera Power Shot G2 | Canon |
| FACSCalibur Durchflusszytometer | BD Biosciences |
| Einfrierbox für Kryoröhrchen | Nunc |
| Entwicklermaschine Scopix LR 5200 | Agfa |
| Fluoreszenzfilterset | Zeiss |
| Folienschweißgerät Folio | Severin |
| Gefrierschrank -80°C HFU 86 450 | Heraeus |
| Gefrierschrank Premium | NoFrost |
| Glashomogenisator | Braun |
| Glasmesszylinder | Schott |
| Handstückzähler mechanisch | VWR |
| Kühlschrank Comfort | Liebherr |
| Kühlschrank Economy | Liebherr |
| Kurzzeitmesser (Stoppuhr) | VWR |
| Laminar flow hood Hera safe | Heraeus |
| Magnet Particle Separator | Roche |
| Magnetrührer RCT basic | IKA Labortechnik |
| Messgläser | VWR Brand |
| Mikroskop Axiovert 25 | Zeiss |
| Mikroskop Axiovert 35 | Zeiss |
| Mikroskop wilovert s | Hund |
| Mikrowellenherd | Toshiba |
| MilliQ-biocel A10 | Millipore |
| Minishaker MS2 | IKA Labortechnik |
| Multipipette research pro | eppendorf |
| OP-Besteck | Medizinisches Lager |
| pH-Elektrode Sen Tix 41 | VWR |
| Pipetten (10, 20, 200, 1000µl) | eppendorf |
| Pipettierhilfe Easypet | eppendorf |
| Power Pac 3000 | Bio Rad |
| Quecksilberlampe mbq 52 ac | Zeiss |
| Röhrchengestell | TPP |
| Schüttler Polymax 1040 | Heidolph |
| Sicherheitswerkbank Hera safe | Heraeus |
| Stickstofftank Chronos | Messer |
| Waage AG204 | Mettler Toledo |
| Waage PB 3002 | Mettler Toledo |
| Wärmeschrank | Heraeus |
| Wasserbad | Memmert |
| Zählkammer, Neubauer improved | VWR |
| Zellsuspensionsrotator | Labor Brand |
| Zentrifuge 1-15 | Sigma |
| Zentrifuge 5415 R | eppendorf |
| Zentrifuge Universal 30 RF | Hettich |

10.1.2 Verbrauchsmaterialien

| Produkt | Hersteller |
|--|-------------------|
| Steri-Indikatorband 19mm x 50 m | Wagner & Munz |
| 5L Kanister blau zur Entsorgung / Abfallbehälter | SES |
| Becherglas 50 ml | Wagner & Munz |
| Becherglas 150 ml | ZEFA Laborservice |
| Becherglas 250 ml | Wagner & Munz |
| Becherglas 400 ml | Schubert & Weiß |
| Becherglas 600 ml | Wagner & Munz |
| Becherglas 1000 ml | ZEFA Laborservice |
| Cryoröhrchen Nunc 1,8ml (Bestnr.: 375418) | VWR |
| Deckgläser für Haemotom (für Neubauer Zählkammer) | ZEFA Laborservice |
| Entsorgungsbox (gelb für Kanülen ect.) | Heisig |
| Präzisionstuch Kimwipes Lite 115x215mm (rote Boxen) | ZEFA Laborservice |
| Laborflasche klar mit Kappe und Gewinde 500 ml | Schubert & Weiß |
| Laborflasche klar mit Kappe und Gewinde 250 ml | PESKE |
| Laborflasche klar mit Schraubverschluss 100 ml, Ring aus PP (blau) | PESKE |
| Laborflasche braun mit Gewinde 50 ml | Wagner & Munz |
| Meßzylinder 1000ml:10ml graduiert, mit Ausguß + Sechskantfuss | Wagner & Munz |
| Meßzylinder 100ml:1,0ml graduiert, mit Ausguß + Sechskantfuss | ZEFA Laborservice |
| Müllbehälter 50L gelb | REMONDIS Medison |
| Objektträger 76x26 (ohne Beschriftungsfeld) f. Zytospin | VWR |
| Objektträger 76x26 Superfrost | Wagner & Munz |
| Petrischale | Wagner & Munz |
| Pipette Serol. 10ml | Costar |
| Pipette Serol. 25ml | Schubert & Weiß |
| Pipette Serol. 5ml | Costar |
| Pipettenspitze blau 1000µl | Sarstedt |
| Pipettenspitzen Eppendorf crystal 0,5-20µl | Neolab |
| Präparatekasten schwarz f. 100 Objektträger | ZEFA Laborservice |
| Präparatemappe grau mit Deckel für 20 OT (Pappe) | Wagner & Munz |
| Reaktionsgefäß mit Deckel schwergängig 1,5 ml (Eppis) | Sarstedt |
| Reaktionsgefäß safe lock 2 ml (Eppis) | Sarstedt |
| Reaktionsgefäß safe lock farbl. 0,5 ml (Eppis) | Sarstedt |
| Röhre Reagenz 50ml weiß steril (Falconröhrchen blau) | Sarstedt |
| Wägepapier 133 x 100 mm | ZEFA Laborservice |
| Einweg Wägeschiffchen klein Polystyrol | Schubert & Weiß |
| Einweg Wägeschiffchen mittel Polystyrol | VWR |
| Zellstofftücher Kimberly/Clark (blau) | Bauer Papier |
| Poly-Flachbeutel 80 x 120 mm transparent | Günther D.U.E. |
| BD Microlance Kanülen gelb 20G 0,9 x 40 mm | BD |
| BD Microlance Kanülen grau 22G 0,7 x 30 mm | BD |
| Krankenunterlage 40x60cm Molinea Plus-E | Molinea |
| Krankenunterlagen 60x90cm Molinea Plus | Molinea |
| Nitrilhandschuhe pud.fr. latexfrei M | Safe Skin |
| Nitrilhandschuhe pud.fr. latexfrei XL | Safe Skin |

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Safe Skin Handschuhe groß (L) | Safe Skin |
| Safe Skin Handschuhe klein (S) | Safe Skin |
| Safe Skin Handschuhe mittel (M) | Safe Skin |
| Skalpelle steril Größe 11 | |
| Skalpelle steril Größe 15 | |
| Skalpelle steril Größe 20 | |
| Skalpelle steril Größe 23 | |
| Spritzen (10 ml) | |
| Spritzen Perfusor 50ml (Fa.Codan) | Codan |

10.1.3 Zellkultur

| Produkt | Hersteller |
|--|------------------------|
| Zellsieb 40µm blau | BD Falcon |
| Zellsieb 70µm weiß | BD Falcon |
| Fötales Kälberserum (Chrage 0121K) | Biochrom AG |
| DMEM - Medium 1,0 g/L + L-Glutamin | Biochrom AG |
| L-Glutamin (200mM) | Biochrom AG |
| Natriumpyruvat 100 mM | Biochrom AG |
| Trypsin/ EDTA (10x) (0,5%/0,2%) | Biochrom AG |
| DMEM 1 g/L Glucose | Cambrex / BioWhittaker |
| Medium 199 Earl's BSS | Cambrex / BioWhittaker |
| DPBS | Cambrex / BioWhittaker |
| MEM Eagle NEAA (100x) | Cambrex / BioWhittaker |
| D-PBS (1x) + CaCl ₂ und MgCl ₂ | Invitrogen / Gibco |
| Fungizone (250 mg/ml Amphotericin) | Invitrogen / Gibco |
| Genatamycin 10 mg/ml (für Endothelzellen) | Invitrogen / Gibco |
| MEM 100x | Invitrogen / Gibco |
| Pen/Strep/Glut Lösung | Invitrogen / Gibco |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck / VWR |
| Zellkulturschalen Nunc 175 cm ² mit Schräghals blau | Nunc |
| Zellkulturschalen Nunc 25 cm ² blau | Nunc |
| Zellkulturschalen Nunc 80 cm ² mit Schräghals blau | Nunc |
| Cryoröhrchen Nunc 1,8 ml | Nunc |
| Filterschraubkappen für ZK 25cm ² | Nunc |
| Filterschraubkappen für ZK 175cm ² | Nunc |
| Schraubkappen ohne Filter für ZK 25cm ² | Nunc |
| Schraubkappen ohne Filter für ZK 80cm ² | Nunc |
| Einfrierbox für Kryoröhrchen Nunc | Nunc |
| Endothelial Cell Basal Medium | PromoCell |
| Supplement Pack for EC Basal Medium | PromoCell |
| Microvascular endothelial cell growth medium, advanced | Provitro |
| BIT9500 | Provitro |
| Collagenase/ Dispase | Roche |
| DNase I | Roche |
| Gelatine 45%in water from cold water fish | Sigma |
| MTT | Sigma |

| | |
|--|-------|
| Noble Agar | Sigma |
| Trypan Blue Solution 0,4% | Sigma |
| Dextran | Sigma |
| Filterschraubkappen für 25cm ² ZK-Flasche | TPP |
| Filterschraubkappen für 75cm ² ZK-Flasche | TPP |
| Filterschraubkappen für 150cm ² ZK-Flasche | TPP |
| Zellkulturflasche TPP mit Filter 25cm ² gelb | TPP |
| Zellkulturflasche TPP mit Filter 75cm ² gelb | TPP |
| Zellkulturflasche TPP mit Filter 150cm ² gelb | TPP |
| Zellkulturtestplatte 6-well (gelb) | TPP |
| Zellkulturtestplatte 12-well (gelb) | TPP |
| Zellkulturtestplatte 24-well (gelb) | TPP |
| Zellkulturtestplatte 96-well (gelb) Flachboden | TPP |

10.1.4 Immunzytochemie

| Produkt | Hersteller |
|--|-------------------|
| Antikörper Verdünnungsmedium | Dako |
| Ultramount Eindeckmedium | Dako |
| Citratpuffer (10x), pH 6 | Dako |
| DAB Substrat-Chromogen System | Dako |
| DAKO Pen | Dako |
| Fluoreszenz einschlusmedium | Dako |
| Glycergel Eindeckmedium | Dako |
| Universal LSAB2- Kit | Dako |
| Universal LSAB Plus Kit (<i>System HRP+Chromogen</i>) | Dako |
| Peroxidase Blockierungsreagenz | Dako |
| Protein Blocking Reagenz | Dako |
| Proteinase K | Dako |
| Streptavidin HRP konjugiert | Dako |
| Tween20 | Dako |
| LSAB Biotinylated AB | Dako |
| Aceton | Sigma |
| Aceton | Sigma |
| DAPI | Sigma |
| Aceton reinst | VWR / Merck |
| Citronensäure Monohydrat | VWR / Merck |
| tri-Natriumcitrat Dihydrat | VWR / Merck |
| di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O) | VWR / Merck |
| Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) | VWR / Merck |
| 3-(Triethoxysilyl)-propylamine (= Silan) | VWR / Merck |
| 3-(Triethoxysilyl)-propylamine (= Silan) | VWR / Merck |
| Kaisers Glyceringelatine | VWR / Merck |
| Mayer`s Hämalun Lösung | VWR / Merck |
| Perhydrol (Wasserstoffperoxid) 30%ig | VWR / Merck |
| Xylol | VWR / Merck |

| | |
|------------------------------------|---------------------|
| Markierungsstift PAP Pen hydrophob | Zytomed |
| Pap Pen Super | Zytomed |
| Methanol P.A. | Apotheke/Innenstadt |
| Ethanol absolut (vergällt) | Apotheke/Innenstadt |
| Ethanol 96% (vergällt) | Apotheke/Innenstadt |
| Ethanol 70% (vergällt) | Apotheke/Innenstadt |
| PBS Puffer pH 7,4 (10x) | Apotheke/Innenstadt |

10.1.5 Immunpräzipitation und Western Blot

| Produkt | Hersteller |
|---|------------|
| Immun-Blot PVDF-Membran (26 cm x 3,3 m) | TPP |
| Immunstar Luminol Enhancer und HRP Peroxid-Puffer | TPP |
| Marker: Presicion Plus Protein Marker | TPP |
| Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate | TPP |
| Marker: Presicion Caleidoscope Marker | TPP |
| Lämmli Sample Buffer | TPP |
| Quickstart Bradford Protein AssayKit 2 | TPP |
| Ready Gel for Polyacrylamid Electrophoresis | TPP |
| 4-20% TRIS/HCl mit 10 Taschen | TPP |
| Remixed 10x TRIS/Glycine Buffer (TB) | TPP |
| 10x TRIS-Buffered Saline (TBS) | TPP |
| GAR HRP (Sekundär-AK) | TPP |
| GAM HRP (Sekundär-AK) | TPP |
| HRP Susbtrate | TPP |
| Mini Trans Blot Electrophoretic Transfercell | BioRad |
| Mini Trans Blot Filter Paper (7,5 x 10 cm) | BioRad |
| Fiberpads (8 x 11 cm) | BioRad |
| Flachbeutel PE ohne Schreibf. 115 x 155 mm | Boll |
| Tween20 | Dako |
| Röntgenfilm Super X-Ray RX 18 x 24 cm | Fuji |
| Kodak BioMax Light Film1 (20,3 x 25,4 cm) | Kodak |
| Methanol _{reinst} | Merck/VWR |
| Methanol zur Analyse reinst | Merck/VWR |
| Salzsäure 2 mol/l | Merck/VWR |
| Triton X-100 | Roche |
| Nonidet P40 | Roche |
| Milchpulver (Nonfat milk) | Roth |
| Probenbeutel PE mit Druckleiste 80 x 120 mm | Roth |
| Protein G + Agarose | Santa Cruz |
| Protein A + Agarose | Santa Cruz |
| β-Mercaptoethanol | Sigma |
| BSA Albumin from bovine serum | Sigma |
| EDTA | Sigma |
| Glycerol | Sigma |
| Glycerol Sigma Ultra | Sigma |
| Glycine | Sigma |

| | |
|-----------------------------------|-------------|
| Methanol | Sigma |
| PIC (Protease-Inhibitor-Cocktail) | Sigma |
| PIC (Protease-Inhibitor-Cocktail) | Sigma |
| Ponceau S-Lösung | Sigma |
| Ponceau S-Lösung 0,1% | Sigma |
| SDS-Lösung (10%) | Sigma |
| Tris (TRIZMA [®] Base) | Sigma |
| Triton X-100 | Sigma |
| TRIZMA hydrochloride | Sigma |
| Phosphatase Inhibitor Cocktail | Sigma |
| Natriumchlorid (NaCl) | VWR / Merck |

10.1.6 Antikörper

| Antikörper | Zusatz | Firma |
|------------------------|----------------------------------|------------------|
| CD31 | zum Sorten | Serotech |
| CD105 | mouse anti-human | Dako |
| FITC | rabbit anti-mouse | Dako |
| FITC | rabbit anti-goat | Dako |
| FITC | goat anti-mouse | Becton Dickinson |
| TRITC | rabbit anti-mouse | Dako |
| DAPI | dilacetate | Sigma |
| Texas Red | anti rabbit | Vector |
| VEGFR-1 | mouse anti-human | R&D |
| VEGFR-2 | mouse anti-human | R&D |
| VEGFR-3 | mouse anti-human | R&D |
| VEGFR-3 | mouse monoclonal IgG1 anti-human | R&D |
| VEGFR-3 | rabbit anti-human | Zymed |
| VEGF | goat anti-human | R&D |
| VEGF-C | rabbit anti-human | Zymed |
| VEGF-D | mouse monoclonal IgG1 anti-human | R&D |
| Phospho-Tyrosin | mouse anti-human | R&D |
| β-Actin (C4) | mouse monoclonal anti-human | Santa Cruz |
| Phospho-Stat3 (Ser727) | rabbit anti-human | Santa Cruz |
| Phospho-Stat3 (Tyr705) | rabbit anti-human | Santa Cruz |
| Phospho-p38 MAPK | mouse monoclonal IgG1 anti-human | Santa Cruz |
| Phospho-p44/42 MAPK | mouse monoclonal IgG1 anti-human | Santa Cruz |
| Phospho-SAPK/JNK | mouse monoclonal IgG1 anti-human | Santa Cruz |
| p38 MAPK | rabbit anti-human | Santa Cruz |
| p44/42 MAPK | rabbit anti-human | Santa Cruz |
| SAPK/JNK | rabbit anti-human | Santa Cruz |

10.1.7 Wachstumsfaktoren und Bevacizumab

| Wachstumsfaktoren | Hersteller |
|--------------------------|-------------------|
| rhuVEGF 165 | PromoKine |
| rhuVEGF-C | R&D |
| rhuVEGF-C (Cys156Ser) | R&D |

| | |
|-----------------------|-------------------------|
| rhuVEGF-D | R&D |
| Bevacizumab (Avastin) | Roche |
| Cisplatin | Hausapotheke Großhadern |
| 5-Fluorouracil | Hausapotheke Großhadern |

10.1.7 Medium

Endothelzellmedium + Supplements (für HBMEC und isolierte Endothelzellen aus dem Glioblastom; provitro)

| | |
|-------|--|
| 500ml | Microvascular endothelial cell growth medium, advanced |
| 50ml | Supplement Kit: BIT9500 (provitro) |

DMEM + 10% FCS (für Tumorzelllinien U87, U251, U373 und isolierte Tumorzellen aus dem Glioblastom)

| | |
|-------|---|
| 435ml | Dulbecco's MEM (Biochrom) |
| 5ml | Penicillin G / Streptomycin / L-Glutamin (Invitrogen) |
| 5ml | MEM Eagle NEAA 100x (Biochrom) |
| 5ml | Natriumpyruvat 100 mM (Biochrom) |
| 50ml | FCS (Biochrom; Charge 0121K) |

Einfriermedium

| | |
|------|--|
| 40ml | Dulbecco's MEM (Biochrom) ohne Antibiotika |
| 40ml | FCS (Biochrom) |
| 20ml | DMSO (VWR) |

Isolationsmedium

| | |
|---------|--|
| 437,5ml | M199 (Biochrom) |
| 50ml | FCS (Biochrom) |
| 12,5ml | Penicillin G / Streptomycin (Invitrogen) |

10.1.8 Zellen

| Zelllinie | Spezies | Ursprungsgewebe | | Medium | Hersteller |
|--------------------------|---------|--|--------|--------------|--------------------------|
| U87 | human | Tumorzelllinie aus dem Glioblastom | | DMEM 10% FCS | ATTC |
| U251 | human | Tumorzelllinie aus dem Glioblastom | | DMEM 10% FCS | ATTC |
| U373 | human | Tumorzelllinie aus dem Glioblastom | | DMEM 10% FCS | ATTC |
| HBMEC | human | Mikrovaskuläre Zellen aus Normalhirn | | ECM + suppl. | ScienceCell Research Lab |
| Isolierte Endothelzellen | human | Isolierte Endothelzellen aus dem Glioblastom | Tumor- | ECM + suppl. | Aus Tumorgewebe isoliert |

10.1.9 Lösungen für Western Blot

Lysepuffer NP40 + Protease Inhibitor Cocktail + Phosphatase Inhibitor Cocktail

| | | |
|-------|--------------------------------|--------|
| 20mM | Tris-HCl | 0,16g |
| 137mM | NaCl | 0,40g |
| 2mM | EDTA | 0,037g |
| 10% | Glycerol | 5ml |
| 1% | Non-idet P40 | 500µl |
| | Protease Inhibitor Cocktail | 90µl |
| | Phosphatase Inhibitor Cocktail | 90µl |
| | ad 50ml A.d. | |

Elektrophorese-Puffer (1x EP)

| | | |
|----------|------------------|--|
| 3,94 g/l | Tris/HCl | |
| 14,4g/l | Glycin | |
| 10ml/l | 10%ig SDS-Lösung | |
| | ad 1l A.d. | |

pH auf 8,3 mit NaOH (1mol/l) einstellen

10x Transferpuffer (10x TB)

| | | |
|-----------------|------------|---------------------------------|
| 390mM | Glycin | 29,3g |
| 480mM | TRIS-Base | 58,2g |
| 1,3mM (0,3%) | SDS | 37,5ml einer 10%igen SDS-Lösung |
| | ad 1l A.d. | |

1x Transferpuffer (1x TB)

| | |
|----------|-------|
| 10x TB | 100ml |
| Methanol | 200ml |
| A.d. | 700ml |

10x Tris-Buffered-Saline (10x TBS)

| | | |
|-------|------------|-------|
| 20mM | TRIS-HCl | 29,1g |
| 500mM | NaCl | 58,2g |
| | ad 1l A.d. | |

pH auf 7,5 mit NaOH (1mol/l) einstellen

1x Tris-Buffered-Saline (1x TTBS mit 0,05% Tween 20)

| | |
|----------|-------|
| 10x TBS | 100ml |
| A.d. | 900ml |
| Tween 20 | 350µl |

Blockierlösung

| | |
|-------------|------|
| Milchpulver | 3g |
| TTBS | 60ml |

Inkubationslösung

| | |
|----------------|------|
| Blockierlösung | 10ml |
|----------------|------|

TTBS 190ml

Stripping Buffer

Tris-HCl 0,985g
SDS 2ml
Mercaptoethanol 700µl
ad 100ml A.d.

10.1.10 Antikörper-Konzentrationen

| Antikörper | Konz. | Molekülgröße | Spezies | Hersteller | Bestellnummer |
|-------------------------------|-----------|--------------|---------|----------------|---------------|
| Akt | 1:1000 | 60kDa | rabbit | Cell Signaling | 9272 |
| phospho-Akt (Ser 473) | 1:1000 | 60kDa | rabbit | Cell Signaling | 4058S |
| phospho-Stat3 (Ser 727) | 1:1000 | 86kDa | rabbit | Cell Signaling | 9134 |
| phospho-Stat3 (Tyr 705) | 1:1000 | 79, 86kDa | rabbit | Cell Signaling | 9145 |
| phospho-p44/42- MAP-Kinase | 1:1000 | 43kDa | mouse | Cell Signaling | 9216 |
| phospho- SAPK/JNK | 1:1000 | 42, 44kDa | mouse | Cell Signaling | 9106 |
| phospho-Tyrosin | 1:2000 | 46, 54kDa | mouse | Cell Signaling | 9255 |
| p38-MAP-Kinase | 1:1000 | | mouse | R&D | MAB1676 |
| p44/42-MAP- Kinase | 1:2000 | 43kDa | rabbit | Cell Signaling | 9212 |
| SAPK/JNK | 1:2000 | 42, 44kDa | rabbit | Cell Signaling | 4695 |
| VEGFR-2 | 1:1000 | 46, 54kDa | rabbit | Cell Signaling | 9252 |
| VEGFR-3 | 1:333 | 125kDa | mouse | R&D | MAB3571 |
| VEGFR-3 | 1:333 | 125kDa | mouse | R&D | MAB3491 |
| β-Actin | 1:100.000 | 50kDa | mouse | Santa Cruz | sc-47778 |

10.1.11 Durchflusszytometrie

Materialien

Annexin V-Apoptosis Detection Kit
Trypsin (ohne EDTA)

Hersteller

eBiosciences
Gibco

11 DANKSAGUNG

Nach der Fertigstellung meiner Dissertation möchte ich den Personen danken, die mich bei der Durchführung der Versuche und beim Verfassen der Arbeit maßgeblich unterstützt haben.

Besonders herzlich möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn bedanken, der mir die Experimentelle Doktorarbeit im Tumorbologischen Labor ermöglicht hat und durch seine große wissenschaftliche Kompetenz bei der Fertigstellung der Dissertation unterstützt hat.

Herrn Dr. med. Stefan Grau danke ich besonders, da er mit großem Einsatz, wissenschaftlicher Sachkunde und seiner positiven Einstellung meine eigenständige Arbeit motiviert hat, bei allen Fragestellungen zur Seite stand und mich bei der Durchführung und Planung der Experimente vorangetrieben hat. Er hat mir nicht nur das wissenschaftliche Denken beigebracht, sondern auch das Interesse an die Neuroonkologie und Neurochirurgie gefördert.

Herr Dr. Christian Schichor, Leiter des Tumorbologischen Labors, und Herr Prof. Dr. med. Roland Goldbrunner, ehemaliger Leiter des Tumorbologischen Labors, haben durch regelmäßige Labortreffen und durch zahlreiche Diskussionen und Ratschläge mein kritisches Denken gefördert.

Herrn PD Frank Winkler und Frau Dr. med. Louisa von Baumgarten aus der Kooperationsgruppe mit dem Zentrum für Experimentelle Neuropathologie und Prionforschung möchte ich für die gute Kooperation und die Hilfe bei der Planung der Experimente danken.

An Frau Prof. Dr. med. Lamszus aus dem Hans Dietrich Herrmann Labor für Hirntumorbiologie der Neurochirurgischen Klinik, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, gilt ein besonderer Dank für die Bereitstellung der histologischen Schnitte aus den *in-vivo*-Experimenten.

Abschließend bedanke ich mich bei Stefanie Lange, Yvonne Hader und allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Tumorbologischen Labors, die mir bei der Einarbeitung in die Versuchsdurchführung und zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.