

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
Klinik der Universität München

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

***Die Rolle des VEGFR-3-Rezeptor- und
Signaltransduktionssystem als Mediator für gesteigerte
Invasivität und Migration bei Tumor- und isolierten
humanen Endothelzellen des Glioblastoms unter
Langzeit-Hypoxie***

Dissertation

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

vorgelegt von

Juliette Ann-Catrin Runtsch

aus

München

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Schichor

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Daniel Kook
PD Dr. Heike Beck

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Jun Thorsteinsdottir

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2023

1 Inhaltsverzeichnis

2	Abbildungsverzeichnis	7
3	Abkürzungsverzeichnis.....	9
4	Einleitung	12
4.1	Glioblastoma multiforme	12
4.2	Angiogenese	19
4.2.1	Physiologische und pathologische Angiogenese.....	19
4.2.2	Lymphangiogenese.....	22
4.2.3	Vascular Endothelial Growth Factors	22
4.2.4	Vascular Endothelial Growth Factor Receptors	25
4.3	Hypoxie	25
5	Fragestellung.....	29
6	Methoden	30
6.1	Zellkultur.....	30
6.2	Sulforhodamine-B Assay.....	32
6.2.1	Auswirkung von Normoxie-/Hypoxie-Bedingungen auf die Proliferation	33
6.2.2	Auswirkung von Präkonditionierung mit Hypoxie und anschließender erneuter Kultivierung der Zellen in Normoxie auf die Proliferation.....	34
6.2.3	Einfluss von Vascular Endothelial Growth Factors auf die Proliferation von Hypoxie präkonditionierten Zellen	34
6.2.4	Einfluss von VEGFR2- und VEGFR3-Inhibition auf die Proliferation von Hypoxie präkonditionierten Zellen	35
6.3	Western Blot.....	35
6.3.1	Einfluss von Hypoxie auf die Expression von VEGFRs	38
6.3.2	Einfluss von Hypoxie auf die intrazellulären Signaltransduktionswege.....	38
6.4	Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	40

6.4.1	mRNA-Expression von VEGFR2, VEGFR3, VEGFA, VEGFC und VEGFD unter Normoxie- und Hypoxie Bedingungen.....	42
6.5	ELISA	42
6.5.1	Protein-Expression von VEGF-A unter Normoxie- und Hypoxie Bedingungen..	44
6.6	Sphäroid Assay.....	44
6.6.1	Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren auf die Migration aus den Sphäroiden bei Hypoxie präkonditionierten Zellen	45
6.6.2	Einfluss von VEGFR-2- und VEGFR-3-Inhibition auf die Migration aus den Sphäroiden bei Hypoxie präkonditionierten Zellen.....	45
6.7	Auswertung der Western Blots und RT-PCRs mittels Image J.....	46
6.8	Statistik	46
7	Ergebnisse	47
7.1	Einfluss von Hypoxie-Dauer und Hypoxie-Präkonditionierung auf das Proliferationsverhalten von Tumor- und humanen isolierten Endothelzellen	47
7.1.1	Einfluss von Hypoxie-Dauer auf das Proliferationsverhalten von U87 und IEC771	47
7.1.2	Einfluss von 14 Tagen Hypoxie-Präkonditionierung mit anschließender erneuter Kultivierung unter Normoxie-Bedingungen auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen U87 und U251	49
7.2	Expression von VEGFR2, VEGFR3, VEGFA, VEGFC und VEGFD unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen in Tumor- und isolierten humanen Endothelzellen.....	51
7.2.1	Einfluss von Hypoxie-Bedingungen auf die Expression von VEGFR-2 und VEGFR-3 in Tumorzellen U87	51
7.2.1.1	Expression von VEGFR-2 in Tumorzellen U87.....	51
7.2.1.1.1	mRNA-Expression (RT-PCR)	51
7.2.1.1.2	Protein-Expression (Western Blot).....	52
7.2.1.2	Expression von VEGFR-3 in Tumorzellen U87.....	53

7.2.1.2.1	mRNA-Expression (RT-PCR)	53
7.2.1.2.2	Protein-Expression (Western Blot).....	53
7.2.2	Einfluss von Hypoxie-Bedingungen auf die Expression von VEGFR-2 und VEGFR-3 in isolierten humanen Endothelzellen	54
7.2.2.1	Expression von VEGFR-2 in isolierten humanen Endothelzellen.....	54
7.2.2.1.1	mRNA-Expression (RT-PCR)	54
7.2.2.1.2	Protein-Expression (Western Blot).....	55
7.2.2.2	Expression von VEGFR-3 in isolierten humanen Endothelzellen.....	56
7.2.2.2.1	mRNA-Expression (RT-PCR)	56
7.2.2.2.2	Protein-Expression (Western Blot).....	57
7.2.3	Einfluss von Hypoxie-Bedingungen auf die Expression und Sekretion verschiedener VEGFs in Tumorzellen U87	57
7.2.3.1.1	mRNA-Expression (RT-PCR)	58
7.2.3.1.2	Sekretion (ELISA)	60
7.2.4	Einfluss von Hypoxie-Bedingungen auf die Expression und Sekretion verschiedener VEGFs in isolierten humanen Endothelzellen	61
7.2.4.1.1	mRNA-Expression (RT-PCR)	62
7.2.4.1.2	Sekretion (ELISA)	64
7.3	Einfluss von VEGFs unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf das Migrationsverhalten von Tumor- und isolierten humanen Endothelzellen.....	66
7.3.1	Einfluss von VEGFs auf die Migration von Hypoxie-Präkonditionierten IEC 78766	
7.4	Einfluss von VEGFR-2- und VEGFR-3-Inhibition unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf das Migrationsverhalten von Tumor- und isolierten humanen Endothelzellen	67

7.4.1	Einfluss von 48 Stunden, 72 Stunden und 7 Tage VEGFR-2- und VEGFR-3-Inhibition unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf die Migration von IEC 787 ..	67
7.5	Einfluss von Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege bei Tumor und Endothelzellen.....	70
7.5.1	Einfluss von Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf den intrazellulären Signaltransduktionsweg der p42/44 MAPK bei Tumor- und Endothelzellen	71
7.5.2	Einfluss von Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf den intrazellulären Signaltransduktionsweg der p38 MAPK bei Tumor- und Endothelzellen.....	72
7.5.3	Einfluss von Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf den intrazellulären Signaltransduktionsweg der SAPK-JNK bei Tumor- und Endothelzellen	74
7.5.4	Einfluss von Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf den intrazellulären Signaltransduktionsweg der AKT bei Tumor- und Endothelzellen	75
8	Diskussion	78
8.1	Antiangiogene Therapie und Hypoxie	78
8.2	Proliferationsverhalten von Tumor- und isolierten humanen Endothelzellen unter Einfluss von Hypoxie	80
8.3	Migrationsverhalten von isolierten humanen Endothelzellen unter Hypoxie und Einfluss von VEGFs	81
8.4	Änderung der Rezeptorexpression und Aktivierung der Signalkaskaden in Tumor- und Endothelzellen unter Hypoxie	83
9	Zusammenfassung	93
10	Literaturverzeichnis	95
11	Anhang	111
11.1	Material	111
12	Vortrag	121
13	Danksagung.....	122
14	Eidesstattliche Versicherung.....	123

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: SRB-Assay. Einfluss von hypoxischen Bedingungen auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen U87	48
Abbildung 2: SRB-Assay. Einfluss von hypoxischen Bedingungen auf das Proliferationsverhalten von isolierten humanen Endothelzellen 771	49
Abbildung 3: SRB-Assay. Einfluss von 14d Hypoxie-Präkonditionierung auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen U87	50
Abbildung 4: SRB-Assay. Einfluss von 14d Hypoxie-Präkonditionierung auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen U251	50
Abbildung 5: RT-PCR der U87 für den VEGFR-2.	51
Abbildung 6: WB der U87 für den VEGFR-2.	52
Abbildung 7: Exemplarische RT-PCR der Tumorzellen U87 für den VEGFR-3.....	53
Abbildung 8: WB der U87 für den VEGFR-3.	53
Abbildung 9: RT-PCR der IEC787 für den VEGFR-2. (A) Exemplarische RT-PCR der IEC787 für den VEGFR-2.....	54
Abbildung 10: WB der IEC784 für den VEGFR-2.....	55
Abbildung 11: RT-PCR der IEC787 für den VEGFR-3.....	56
Abbildung 12: WB der IEC784 für den VEGFR-3.....	57
Abbildung 13: RT-PCR der U87 für den VEGF-A.	58
Abbildung 14: RT-PCR der U87 für den VEGF-C.	59
Abbildung 15: RT-PCR der U87 für den VEGF-D.....	60
Abbildung 16: ELISA. VEGF-A Sekretion in Tumorzellen U87.....	60
Abbildung 17: ELISA. VEGF-C Sekretion in Tumorzellen U87.....	61
Abbildung 18: RT-PCR der IEC787 für den VEGF-A.	62
Abbildung 19: RT-PCR der IEC787 für den VEGF-C.....	63
Abbildung 20: RT-PCR der IEC787 für den VEGF-D.	63
Abbildung 21: ELISA. VEGF-A Sekretion in isolierten humanen Endothelzellen 787.....	64
Abbildung 22: ELISA. VEGF-C Sekretion in isolierten humanen Endothelzellen 787.....	65
Abbildung 23: Sphäroid-Assay. Einfluss von VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-C _{Cys156} (ein spezifischer Ligand für VEGFR-3) unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf die Migration von IEC 787 nach 72h Inkubationszeit.	67

Abbildung 24: Sphäroid-Assay. Einfluss von Tyrphostin 5 μ M (R2-Inhibition) und Maz51 (R3-Inhibition) unter Normoxie- (oben) und Hypoxie- (unten) Bedingungen auf die Migration von IEC 787 nach 48h Inkubationszeit.	68
Abbildung 25: Sphäroid-Assay. Einfluss von Tyrphostin 5 μ M (R2-Inhibition) und Maz51 (R3-Inhibition) unter Normoxie- (oben) und Hypoxie- (unten) Bedingungen auf die Migration von IEC 787 nach 72h Inkubationszeit.	69
Abbildung 26: Sphäroid-Assay. Einfluss von Tyrphostin 5 μ M (R2-Inhibition) und Maz51 (R3-Inhibition) unter Normoxie- (oben) und Hypoxie- (unten) Bedingungen auf die Migration von IEC 787 nach 7d Inkubationszeit.	70
Abbildung 27: WB der 42/44 MAPK.	71
Abbildung 28: WB der p38 MAPK.	73
Abbildung 29: WB der SAPK/JNK.	74
Abbildung 30: WB der AKT.	76

3 Abkürzungsverzeichnis

2-HG	2-Hydroxyglutarat
Ak	Antikörper
AKT = PKB	Protein Kinase B
APS	Ammoniumpersulfat
AT	Annealing Temperatur
ATRX	Alpha-Thalassämie-Geistige-Retardierung
ATTC	American Type Culture Collection
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSC	Cancer stem cells
d	Tage
DEPC	Diethylcarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extrazelluläre signal-Regulierten Kinasen
FKS	Fetales Kälberserum
GBM	Glioblastoma Multiforme
GBSC	Glioblastoma-Stammzellen
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
h	Stunden
HBMEC	Human Brain Microvascular Endothelial Cells
HCl	Salzsäure
HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1 α
H ₂ O	Wasser

HRP	Horseradish peroxidase
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IEC	Isolated Endothelial Cells
MAPK	Mitogen Aktivierte Protein Kinase
MGMT	O-Methyl Guanine-Methyl Transferase
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomografie
NaCl	Natriumchlorid
NAPDH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NEAA	Nichtessentielle Aminosäuren
NOS	not otherwise specified
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIC	Protease-Inhibitor Cocktail
pO ₂	partieller Sauerstoffdruck
PVDF	Polyvinylfluorid
RLT	RNeasy Lysis Buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transcriptase
SAPK/JNK	Stress-Activated Phospho-Kinases /c-Jun N-terminale Kinasen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRB	Sulforhodamine B
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TERT	Telomerase reverse Transkriptase
TMB	Tetramethylbenzidine
TMZ	Temozolomid
TRIS	Tris (hydroxymethyl)- aminomethan
TTBS	Tween Tris-Buffered-Saline

T/C	Test over Control
U/min	Umdrehung pro Minute
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

4 Einleitung

4.1 Glioblastoma multiforme

Definition

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste und aggressivste primäre Gehirntumor beim Erwachsenen und ist noch immer eine unheilbare Erkrankung, welche früher oder später zu schweren neurologischen Störungen und zum Tode führt (Reardon, Turner et al. 2011, Hardee and Zagzag 2012, Gaelzer, Santos et al. 2016, Louis, Perry et al. 2016, Stavrovskaya, Shushanov et al. 2016).

Der Name „multiforme“ spiegelt das histopathologische Erscheinungsbild des Tumors mit flächenhaften Nekrosen, Einblutungen und mikrovaskulären Gefäßproliferationen wider (Miller and Perry 2007). Glioblastome zeichnen sich durch eine sehr hohe mitotische und proliferative Aktivität, eine diffuse Infiltration in das umgebende gesunde Hirngewebe, eine ausgeprägte Angiogenese und Apoptoseresistenz, atypische Zellkerne und pseudopalisade Nekrosen aus (Furnari, Fenton et al. 2007, Louis, Ohgaki et al. 2007, Huang, Chen et al. 2016). Die hohe Invasivität macht eine komplette Resektion des Tumors praktisch unmöglich da mikroskopisch weiterhin einzelne Zellen im gesunden Gehirngewebe verbleiben (Hou, Veeravagu et al. 2006). Somit kommt es bei über 90% der Patienten nach wenigen Monaten zu einem Rezidiv an der ursprünglichen Tumorlokalisation (Narayana, Yamada et al. 2006, Sul and Fine 2010, Nestler, Lutz et al. 2015).

2016 hat die Welt Gesundheit Organisation (WHO) eine neue Klassifikation der Tumore des zentralen Nervensystem (ZNS) veröffentlicht, welche zusätzlich zur Histologie auch molekulare Parameter zur Tumorklassifizierung nutzt. In dieser neuen Klassifikation werden Glioblastome in IDH1/2-Wildtyp, IDH1/2-mutiert und NOS (not otherwise specified) eingeteilt (Louis, Perry et al. 2016).

Die IDH1/2-Wildtype Glioblastome zählen mit 90% zu den häufigsten Tumoren. Sie entsprechen meistens den sogenannten primären oder „*de novo*“ Glioblastomen und überwiegen bei Patienten, welche älter als 55 Jahre sind. Die IDH1/2-mutierten Glioblastome, die nur in 10% der Fälle auftreten, werden sekundäre Glioblastome bezeichnet und treten bevorzugt bei jüngeren Patienten auf. Sie wachsen über Jahre auf

dem Boden niedergradiger Tumore zu Glioblastomen heran. Bei fehlenden molekularen Markern, z.B. im Falle von ungenügendem Material oder unsicherem Resultat werden die Glioblastome als NOS (not otherwise specified) eingeteilt. (Jovcevska, Kocevar et al. 2013, Wilson, Karajannis et al. 2014, Huang, Chen et al. 2016, Louis, Perry et al. 2016, Millward, Brodbelt et al. 2016).

Studien haben gezeigt, dass Männer häufiger als Frauen und Personen kaukasischer Herkunft häufiger als Personen afroamerikanischer Herkunft betroffen sind (Wen and Kesari 2008, Daga, Bottino et al. 2011, Ellor, Pagano-Young et al. 2014). Nur 5% der Patienten haben eine familiäre Vorgeschichte (Ellor, Pagano-Young et al. 2014). Der einzige bekannte Risikofaktor ist die Vorbelastung mit ionisierender Strahlung. Die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit nach der Diagnosestellung beträgt trotz multimodaler Therapie nur 12-16 Monate (Stupp, Mason et al. 2005).

Pathogenese

Glioblastome können primär („de novo“) oder sekundär (auf dem Boden von Initial niedriggradigen Gliomen) entstehen (Ohgaki, Dessen et al. 2004, Wilson, Karajannis et al. 2014).

In der Neuroonkologie wurden in den letzten Jahrzehnten einige molekulargenetische Marker identifiziert, die sowohl die Prognose als auch die Therapie beeinflussen. Als wichtigster prognostischer und prädiktiver Wert wird die O-6-Methylguanin-Methyltransferase-(MGMT) Promotermethylierung angesehen. Die Co-Deletion von 1p und 19q welche die Unterscheidung zwischen Oligodendrogliomen und Astrozytomen ermöglicht und die IDH1/2-Mutation sowie neuere Marker wie TERT und ATRX ebenfalls von Bedeutung (Staedtke, Dzaye et al. 2016).

Die O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) ist ein sogenanntes Exzisionsreparaturenzym, welches sich im Zellkern befindet und für die DNA Reparatur zuständig ist. Dieses Enzym wird durch den MGMT-Gen kodiert, welches sich auf dem Chromosom 10q26 befindet (Dullea and Marignol 2016). Physiologisch vermag MGMT die Mutation von Guanin zu O-6-Methylguanin zu reparieren, die vor allem durch alkylierende Agenzien induziert wird. Sobald die Reparatur stattgefunden hat, wird MGMT irreversibel deaktiviert. Deshalb wird es auch als Suizidenzym bezeichnet (Soomro, Ting et al. 2017). Patienten mit Tumoren welche eine MGMT-Promoter-Methylierung besitzen, zeigen eine

deutlich bessere Langzeitprognose als die Patienten mit einer nicht-methylierten MGMT-Promoter-Methylierung (Hegi, Diserens et al. 2005, Stupp, Mason et al. 2005, Krex, Klink et al. 2007, Stupp, Hegi et al. 2009).

Die Isocitrat-Dehydrogenase katalysiert die oxydative Carboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat unter Produktion von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH). Die IDH-Mutationen führen zu einer Verminderung der normalen IDH-Aktivität um ca. 50%. Somit entsteht weniger α -Ketoglutarat und NADPH und stattdessen wird der Onkometabolit 2-Hydroxyglutarat (2-HG) unter Verbrauch von NADPH produziert (Dang, White et al. 2009, Bleeker, Atai et al. 2010, Xu, Yang et al. 2011). Es kommt deshalb zur Akkumulation hoher Mengen von 2-HG, was im Umkehrschluss die Funktion vom IDH-Enzym inhibiert, da dieses abhängig vom Vorhandensein von α -Ketoglutarat ist (Ichimura 2012, Szopa, Burley et al. 2017).

Die IDH Genfamilie besteht aus drei Isomerasen, IDH1, IDH2 und IDH3. Die IDH1 ist im Zytosol und in den Peroxisomen lokalisiert. Ihre Aufgabe ist es die Energie zur Produktion von peroxisomalen Enzymen bereitzustellen und beeinflusst somit diverse metabolische Signalwege. Die IDH2 und IDH3 sind in den Mitochondrien lokalisiert wo sie im Citratzyklus mitwirken und das Zellwachstum unterstützen (Xu, Zhao et al. 2004, Reitman and Yan 2010). Mutationen in IDH1 finden sich selten beim primären Glioblastom (10%) und häufig beim sekundären Glioblastom (80%) und sind somit ein molekularer Marker für sekundäre Glioblastome. Zusätzlich zeigen ca. 10% der Glioblastome Mutationen in IDH2, welche für eine oligodendrogliale Herkunft sprechen. Das Vorhandensein von IDH-Mutationen ist mit einer deutlich besseren Prognose verbunden (Ohgaki and Kleihues 2013, Chen, Ravindra et al. 2015).

Die zweite wichtigste genetische Alteration ist die Co-Deletion an den Chromosomenregionen 1p und 19q, welche durch eine Chromosomentranslokation $t(1p;19q)(q10;p10)$ zustande kommt. Sie ist ausschließlich mit oligodendroglialen Tumoren assoziiert und weist eine bessere Prognose auf (Kaloshi, Benouaich-Amiel et al. 2007, Eckel-Passow, Lachance et al. 2015, Sasaki and Yoshida 2017).

Studien konnten Mutationen in der Promoterregion von dem Telomerase-Reverse-Transkriptase-Gen in verschiedenen Tumoren nachweisen unter anderem beim GBM und bei

oligodendroglialen Tumoren (Arita, Narita et al. 2013, Liu, Wu et al. 2013). Physiologisch geht bei jeder Zellteilung ein Stück (ca. 100 Nukleotide) der Telomeren verloren. Die Telomerase ist ein Enzym, welches die Fähigkeit besitzt, die Endstücke der Chromosomen, die sog. Telomere, wiederherzustellen. Während embryonale Zellen eine hohe Telomerase-Aktivität aufweisen, ist die Aktivität bei adulten Zellen komplett supprimiert. Bei Tumorzellen hingegen kann die Telomerase-Aktivität bei ca. 85% der Zellen nachgewiesen werden. Kürzlich haben mehrere Studien zeigen können, dass Telomerase reverse Transkriptase (TERT) -Mutationen häufig in Gliomen vorkommen, vor allem in oligodendroglialen Tumoren und GBMs. Dies führt zu einer alterierten Telomerenverlängerung mit konsekutiver unendlicher Lebensdauer (Arita, Narita et al. 2013).

Brennan *et al.* konnten in ihrer Studie die TERT-Expression in 21 von 25 Fällen von Glioblastomen nachweisen. In den restlichen vier Fällen wurden Mutationen im Transkriptionsregulatorgen Alpha-Thalassämie-Geistige-Retardierung (ATRX) gefunden. In keinem der Tumore konnten beide Mutationen gleichzeitig nachgewiesen werden. Dies impliziert, dass sowohl TERT wie auch ATRX für die Telomerenelongation zuständig gemacht werden (Brennan, Verhaak et al. 2013).

Studien haben gezeigt, dass sogenannte Tumorstammzellen (CSC) eine wichtige Rolle in der Entstehung des GBM einnehmen (Singh, Hawkins et al. 2004, Bao, Wu et al. 2006, Yu, Ping et al. 2008, Swamydas, Ricci et al. 2013). Sie sind in geringer Anzahl im Gewebe von Glioblastomen vorhanden und besitzen die Fähigkeit sich selbst zu erneuern und in neuronale, makrogliale und gemischte neuronale/astrogliale Phänotypen zu differenzieren (Farias-Eisner, Bank et al. 2012). Es konnten bisher zwei unterschiedliche Subtypen von Glioblastoma-Stammzellen (GBSC) identifiziert werden, die proneuralen und die mesenchymalen (Bhat, Balasubramanian et al. 2013, Mao, Joshi et al. 2013). Die mesenchymalen GBSC (35-40%) besitzen einen aggressiveren Phänotypen und sind deutlich resistenter bezüglich Bestrahlung als die proneuralen GBSC. Außerdem besitzen sie einzigartige Oberflächenmarker (CD133, CD15 und ALD1A3) und modulieren typische Signalwege um die Tumorentstehung zu fördern (z.B. Hedgehog und Notch) (Nakano 2015). Die GBSC besitzen zudem die Fähigkeit bei erhöhtem intrazellulärem Stress (z.B. Strahlentherapie) die phänotypischen Eigenschaften von den unterschiedlichen Zellsubtypen

anzunehmen und in Endothelzellen und gefäßähnliche Tumorzellen zu transdifferenzieren. Somit nehmen sie eine entscheidende Rolle in der Gefäßproliferation des GBM ein (Scully, Francescone et al. 2012, Mao, Joshi et al. 2013, Aum, Kim et al. 2014, Nakano 2015). Werden CSC's in gesundes Gewebe transplantiert sind diese für das initiale Tumorwachstum verantwortlich (Goldman 2003, Jovcevska, Kocevcar et al. 2013, Karamboulas and Ailles 2013, Li, Zhou et al. 2013).

Der Ursprungsmechanismus der Tumorentstehung ist bis heute noch nicht gänzlich geklärt. Es wird angenommen, dass Tumorzellen eine Ansammlung von Mutationen besitzen, welche Gen-Rearrangements (Genumlagerungen) und Amplifikationen, Punktmutationen, Alterationen in Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen und DNA-Reparaturgenen umfassen. Es wird außerdem angenommen, dass auch epigenetische Alterationen, wie z.B. DNA-Methylierung und verschiedene Histon-Muster-Modifizierungen daran beteiligt sind (Jaenisch and Bird 2003, Jovcevska, Kocevcar et al. 2013).

Klinik

Die klinische Präsentation eines Patienten mit neu diagnostiziertem GBM variiert je nach Größe des Tumor, der Lokalisation und der Infiltration/Kompression von angrenzenden Gehirnstrukturen (Young, Jamshidi et al. 2015). Durch das stark verdrängende Wachstum kommt es zu einem stetig steigenden Hirndruck, was Allgemeinsymptome Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen (besonders im nüchternen Zustand) und Bewusstseins Einschränkungen zur Folge hat. Zusätzlich kann es je nach betroffenem Areal unter anderem zu Paresen oder sensiblen Ausfällen, Krampfanfällen und Sprachstörungen kommen. Krampfanfälle stellen in bis zu 25% das Erstsymptom des Patienten dar (Perry, Zinman et al. 2006, Schiff, Lee et al. 2015).

Diagnostik

Zur diagnostischen Einordnung wird heutzutage standardmäßig eine Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt (Brat and Mapstone 2003, Abakumov, Nukolova et al. 2015).

Das MRT gibt Aufschluss über das Tumolvolumen, die Lokalisation, die Kontrastmittelaufnahme und das Ödem (Nestler, Lutz et al. 2015). Es zeigt sich

typischerweise eine ringförmige Kontrastmittel-(KM) Aufnahme mit zentraler Nekrose und ein umgebendes Ödem (Rong, Durden et al. 2006).

Die Magnetresonanztomographie kann zusätzlich verwendet werden, um den Stoffwechselverbrauch in verschiedenen Bereichen zu beurteilen. Sie dient zur Unterscheidung zwischen Tumormasse, nekrotischen Arealen und benignen Strukturen, wird aber in der klinischen Routine bisher kaum eingesetzt (Wen and Kesari 2008).

Therapie

Die operative Resektion mit konkomitanter und adjuvanter Radiochemotherapie mit Temozolomid (TMZ) ist seit dem Jahr 2005 die Standardtherapie des GBM (Stupp, Mason et al. 2005, Stupp, Hegi et al. 2009, Reardon, Turner et al. 2011, Szabo, Schneider et al. 2016). Die alleinige operative Resektion zeigt eine mediane Überlebenswahrscheinlichkeit von nur ca. 6 Monaten. Die Kombination aus maximaler Resektion (komplette Resektion des KM-aufnehmenden Tumors) und Bestrahlung erhöht die mediane Überlebenswahrscheinlichkeit auf 12,1 Monate und diese verlängert sich bei zusätzlicher Gabe von TMZ auf 14,6 Monate (Hegi, Diserens et al. 2005, Stupp, Mason et al. 2005).

Trotz der kombinierten Therapie zeigen beinahe alle GBM-Patienten Rezidive (Stummer, Reulen et al. 2008, Rahman, Smith et al. 2010, Schuessler, Walker et al. 2014, Wilson, Karajannis et al. 2014). 90% der Rezidive befinden sich im Areal des ursprünglichen Primärtumors. In histologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass trotz Resektion des KM-aufnehmenden Tumors im umliegenden Hirngewebe Tumorzellen zu finden sind (Wen and Kesari 2008, Rahman, Smith et al. 2010, Ramirez, Weatherbee et al. 2013, Nestler, Lutz et al. 2015, Huang, Chen et al. 2016).

Die operative Resektabilität des GBM ist abhängig von der Tumorlokalisation. Bei einer Lokalisation des Tumors in eloquenten Arealen (Motorkortex, sprachrelevanten Arealen, Hirnstamm) wird aufgrund der hohen perioperativen Morbidität auf eine Komplettresektion verzichtet. Da für die Radiochemotherapie die Parameter Alter und Karnofsky-Score essenziell sind, muss kritisch evaluiert werden, welche Patienten für eine Resektion in Frage kommen. Aufgrund des infiltrativen Wachstumsverhaltens des GBM wird standardmäßig eine adjuvante Radiochemotherapie durchgeführt. Allerdings kann durch die Radiochemotherapie in den meisten Fällen keine Remission erzielt werden. Daher werden

unterschiedliche Therapieansätze in der Rezidivtherapie angewandt (andere Chemotherapeutika wie bspw. Procarbazin und CCNU, Antikörper wie Bevacizumab, Re-Bestrahlung mit Bevacizumab, interstitielle Brachytherapie mit ¹²⁵Iod-Seeds, Vakzinierung mit tumorspezifischen Antigenen wie bspw. EGFRvIII, Therapie mit elektrischen Feldern (TTF, etc.) (Huang, Kavan et al. 2008, Dixit and Hingorani 2015, Noell, Feigl et al. 2015, Chen, Cohen et al. 2016, Awad, Karsy et al. 2017). In der Phase III AVAglio Studie konnte durch die Zugabe von Bevacizumab zur Standard-Therapie, ein progressionsfreier Überlebensvorteil nachgewiesen werden. Es konnte jedoch kein statistischer Unterschied im Gesamtüberleben festgestellt werden (Chinot, de La Motte Rouge et al. 2011). Trotz der Rezidivtherapien kommt es bei nahezu allen Patienten zu einem Tumorrezidiv (Millward, Brodbelt et al. 2016).

Für die operative Resektion des GBM hat sich der intraoperative Gebrauch von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) etabliert. 5-ALA wird präoperativ per os verabreicht und ermöglicht anschließend eine Fluoreszenz gesteuerte mikrochirurgische Resektion des Tumors (Jaber, Wolfer et al. 2016). Mit dieser Technik kann eine komplette Resektion des KM-aufnehmenden Tumors signifikant besser erreicht werden als mit Weißlicht (Stummer 2016).

Im Anschluss erfolgt die konkomitante Radiotherapie mit TMZ, danach noch 6 Zyklen adjuvante TMZ-Chemotherapie (Wilson, Karajannis et al. 2014). TMZ ist ein orales alkylierendes Chemotherapeutikum, dessen Wirkungsweise auf der Methylierung von DNA-Purinbasen beruht. Diese Methylierung führt anschließend zur Bildung von O6-Methylguanin (O6-MeG) gefolgt von einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase (Zhang, Stevens et al. 2012, Manrique-Guzman 2016). Die neu entstandene Methylgruppe kann durch die sogenannte *O6-Methylguanin-Methyltransferase* (MGMT, ein DNA-Reparatur Protein) wieder entfernt werden, so dass die Tumorzellen gegen TMZ und andere alkylierende Chemotherapeutika Resistenzen entwickeln können. Zur Verhinderung dieses Entfernungsvorganges wurde bei einigen Patienten die Promotorregion des MGMT-Gens methyliert, was eine Verminderung bis hin zur Stilllegung der Aktivität der MGMT zur Folge hatte (Malmstrom, Gronberg et al. 2012, Weathers and Gilbert 2014).

Die Blut-Hirn-Schranke sowie der erhöhte hydrostatische Druck stellen zusätzliche Barrieren für die Wirksamkeit der verabreichten Chemotherapeutika dar. Die Chemotherapeutika können aufgrund ihrer Größe die Blut-Hirn-Schranke nur eingeschränkt -bis zu einer

maximalen Größe von 500 Da- passieren. Der erhöhte hydrostatische Druck, welcher durch die erhöhte Gefäßpermeabilität des Tumors entsteht, setzt die Wirkstoffabgabe zusätzlich herab (Jain, di Tomaso et al. 2007, Pardridge 2007, Kesari 2011, Ramirez, Weatherbee et al. 2013).

Außerdem können hypoxische Areale in Glioblastomen die Wirksamkeit der ionisierenden Strahlung herabsetzen, da zur DNA-Schädigung freie Sauerstoffradikale benötigt werden. Studien haben gezeigt, dass CSC's im GBM ebenfalls zur Radiotherapieresistenz beitragen. Sie können durch eine bevorzugte Aktivierung der DNA damage checkpoint Antwort zu einem erhöhten DNA-Reparaturvorgang führen (Bao, Wu et al. 2006). Der Anteil an Zellen welche Prominin-1 (CD133) enthalten, ein Marker welcher sowohl für neuronale Stammzellen wie auch für Gehirntumorstammzellen spezifisch ist, ist nach Bestrahlung der Glioblastomen deutlich erhöht (Singh, Clarke et al. 2003, Singh, Hawkins et al. 2004). Bao et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass durch die Behandlung mit ionisierender Strahlung von humanen Glioblastom-Xenotransplantaten es zu einer vierfach höheren Anzahl der CD133-positiven Zellen kam. Die Bestrahlung führte jedoch bei CD133-negativen Tumorzellen zu keiner Bildung von CD133-positiven Zellen. Lediglich bei schon vorhandenen CD133-positiven Zellen kam es zu einer Anreicherung des ursprünglichen CD133-positiven Teilkollektivs. Eine erhöhte Anzahl CD133 positiver Zellen führte zu einer Verminderung der Tumorlatenzzeit und zu einem vermehrten Wachstum und Gefäßreichtum. Das bevorzugte Überleben der CD133-positiven Zellen nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung ist auf eine verminderte Apoptoserate durch eine eingeschränkte Aktivierung der Caspase-3 und durch die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen zurückzuführen (Bao, Wu et al. 2006).

Die aktuellen Therapien sind weit von einem kurativen Ansatz entfernt und dienen vielmehr, durch ihre nur vorübergehende Wirksamkeit, der palliativen Therapie mit Verbesserung der Lebensqualität (Bianco, Bastiancich et al. 2017).

4.2 Angiogenese

4.2.1 Physiologische und pathologische Angiogenese

Die Angiogenese - Ausbildung neuer Gefäße aus Vorbestehenden - spielt in der Entwicklung und Homöostase von Lebewesen sowie in manchen pathologischen Zuständen eine wichtige

Rolle. Von zentraler Bedeutung sind dabei die Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) und Ihre Rezeptoren (VEGFRs) (Veikkola and Alitalo 1999).

Während der embryologischen Vaskulogenese werden die Blutgefäße *de novo* gebildet. Die Angioblasten - Vorläuferzellen der Endothelzellen - versammeln sich zu einem primären kapillären Plexus, von welchem aus neue Blutgefäße entstehen können und somit ein differenziertes Netzwerk bilden. Dieser Prozess wird als Angiogenese bezeichnet (Bergers and Benjamin 2003, Hardee and Zagzag 2012). Im ausgewachsenen Organismus findet unter physiologischen Bedingungen keine Angiogenese mehr statt. Der Menstruationszyklus der weiblichen Geschlechtsorgane und der Wundheilungsprozess stellen dabei zwei Ausnahmen dar. Während dem physiologischen Vorgang der Angiogenese reifen die neu gebildeten Gefäße schnell aus und befinden sich anschließend in einem stabilen Ruhezustand. Bei der pathologischen Angiogenese stellt sich im Gegensatz dazu kein Ruhezustand ein, so dass die Tumorzellen zur konstanten Neubildung von Gefäßen befähigt sind (Bergers and Benjamin 2003).

Das GBM besitzt die Fähigkeit sich über verschiedene Mechanismen mit neuen Gefäßen zu versorgen und somit die ständige Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten: 1. Kooption von präexistenten Gefäßen, 2. Angiogenese von Kapillaren aus bestehenden Gefäßen, 3. Vaskulogenese durch Angliederung von zirkulierenden Endothelzellen, 4. Intussuszeption durch Einbringen interstitieller Gewebebrücken in Lumina von präexistenten Gefäßen, was somit zur Teilung eines Gefäßes führt, 5. „Vaskuläres Mimikry“ (VM) durch die Ausbildung von pseudovaskulären Kanälen welche aus Tumorzellen statt Endothelzellen bestehen und 6. die Ausbildung von Mikrogefäßen durch ausgewählte myeloide Stammzellen aus dem Knochenmark, welche den Tumor infiltrieren stellen die unterschiedlichen Mechanismen dar (Ausprunk and Folkman 1977, Holash, Maisonpierre et al. 1999, Kurz, Burri et al. 2003, Jain, di Tomaso et al. 2007, El Hallani, Boisselier et al. 2010, Ricci-Vitiani, Pallini et al. 2010, Wang, Chadalavada et al. 2010, Hardee and Zagzag 2012, Multhoff, Radons et al. 2014).

Das Vorhandensein von VM in malignen Tumoren wird mit einer erhöhten Patientenmortalität in Verbindung gebracht (Maniotis, Folberg et al. 1999, Liu, Li et al. 2011, Cao, Bao et al. 2013) . Das durch VM entstandene Gefäß besitzt zwar eine Basalmembran, an welche an der Außenseite Tumorzellen angelagert sind, an der Innerseite sind jedoch keine

20

Endothelzellen zu finden trotz intrakanalikulären vorhandenem Blutfluss (Maniotis, Folberg et al. 1999).

Die GBM-Angiogenese kommt immer dann zustande, wenn sich das streng geregelte Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Stimuli zu Gunsten der pro-angiogenen verschiebt. Dieser Prozess der Neoangiogenese wird als „Angiogener Switch“ bezeichnet. Proangiogene Mediatoren im GBM sind die Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF), der Fibroblast Growth Factor (FGF), der Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), der Tumornekrosefaktor, die Integrine und die Matrix Metalloproteinasen (MMP). Antiangiogene Mediatoren sind Angiostatin, die Thrombospondine und Endostatin. (Bergers and Benjamin 2003, Hicklin and Ellis 2005, Rahman, Smith et al. 2010). Unter den gesamten proangiogenen Faktoren, nimmt der VEGF-A eine zentrale Rolle ein, sowohl während der physiologischen als auch während der pathologischen Angiogenese ein (Senger, Galli et al. 1983, Ferrara 2009). Das rasche Tumorstadium erschöpft schnell die vorhandenen Sauerstoffreserven, was eine ausgeprägte Hypoxie zur Folge hat. Diese Veränderungen im Tumorgewebe stimulieren die Bildung des Hypoxia inducible factor (HIF) und somit die VEGF-Sekretion was wiederum zur Tumorgefäßneubildung führt (Shweiki, Itin et al. 1992, Ryan, Lo et al. 1998, D'Alessio, Proietti et al. 2016).

Zusätzlich zu VEGF-A kommt es zur Bindung weiterer Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren, wodurch Endothelzellen (EC) aktiviert werden. Als Folge wird die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran, welche die Endothelzellen umgeben, durch lokal aktivierte Proteasen zerstört. Dies ermöglicht es, den Endothelzellen in die umgebende Matrix einzuwandern und anschließend in dieser zu proliferieren und zu migrieren. Durch Polarisierung der migrierenden Zellen kommt es zur Ausbildung eines Lumens, welches sich durch Rekrutierung von muralen Zellen und Bildung von extrazellulärer Matrix in ein Gefäß umwandelt (Halin, Zardi et al. 2001, Ferrara, Gerber et al. 2003, Hillen and Griffioen 2007, Hardee and Zagzag 2012). Die neu entstandenen Tumorgefäße unterscheiden sich jedoch stark von den physiologischen Hirngefäßen. Sie besitzen eine stark gewundene Art, zeigen eine große Unordnung, eine hohe Permeabilität und eine ungewöhnliche Endothelwand. Zudem besitzen sie eine Perizytenummantelung und eine Basalmembran. Ein Merkmal dieser abnormen Gefäße ist Ihre typische Zusammenlagerung zu sogenannten „glomeruloid

tufts“, die aus mehrschichtigen, mitotisch aktiven perivaskulären und Endothel-Zellen bestehen (Plate, Breier et al. 1992, Jain, di Tomaso et al. 2007, Hardee and Zagzag 2012).

4.2.2 Lymphangiogenese

Die lymphatischen Gefäße unterscheiden sich morphologisch von den Blutgefäßen. Sie besitzen keine Perizyten, haben eine diskontinuierliche fenestrierte Basalmembran, weisen einen Mangel an interendothelialen Verbindungen auf und besitzen dadurch eine höhere Permeabilität (Pepper, Tille et al. 2003).

Während der embryologischen Entwicklung wird das lymphatische System erst nach der Anlage des Blutsystems ausgebildet. Unter physiologischen Bedingungen wird es nach kompletter Ausreifung, wie auch das Gefäßsystem, stillgelegt (Saharinen and Petrova 2004). Experimentelle Hinweise auf einen sogenannten „lymphangiogenen switch“ unter pathologischen Bedingungen fehlen bisher. Sowohl während der Entwicklung des lymphatischen Systems als auch unter pathologischen Bedingungen ist es bewiesen, dass der VEGFR-3 und seine Liganden VEGF-C und VEGF-D eine entscheidende Rolle spielen. *In vitro* stimuliert der VEGF-C die Proliferation, Migration und Überleben der lymphatischen Endothelzellen (Saharinen and Petrova 2004, Hillen and Griffioen 2007). Zum Nachweis der tragenden Rolle des VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3-Signalweges bei der Tumorlymphangiogenese wurden Tumormodelle mit VEGF-C und VEGF-D exprimierenden Zellen an Mäusen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Expression von VEGF-C wie auch die von VEGF-D mit einer erhöhten intratumoralen Lymphangiogenese und Metastasenbildung vergesellschaftet sind (Hillen and Griffioen 2007).

Stacker et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass es durch Blockade des VEGF-D mit einem monoklonalen Antikörper zu einer Abnahme der lymphatischen Ausbreitung kommt. Durch den Einsatz eines VEGFR-3 Fusionsproteins (auch VEGF-C/D-Fänger genannt) wurde zudem die Tumorlymphangiogenese und die Tumormetastasierung inhibiert (Stacker, Caesar et al. 2001).

4.2.3 Vascular Endothelial Growth Factors

Mit der Identifizierung und Isolierung des Vascular endothelial growth factor (VEGF) stellte man eine spezifische mitogene Aktivität der Endothelzellen fest, welche sie zur physiologischen und pathologischen Angiogenese befähigt. In einem anderen Kontext wurde

ein Faktor isoliert, welcher die vaskuläre Hyperpermeabilität förderte. Später stellte sich heraus, dass es sich ebenfalls um den VEGF handelte (Ferrara and Davis-Smyth 1997, Goel and Mercurio 2013). Dieser Faktor ist als VEGF-A bekannt und gehört zusammen mit dem VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und dem Plazenta Growth Factor zur Familie der sogenannten Wachstumsfaktoren. VEGFs sind dimerische Glykoproteine mit einer Molekülmasse von 34-45 kDa und strukturell mit der PDGF-Familie verwandt (Dvorak, Brown et al. 1995). Jeder dieser Wachstumsfaktoren besitzt sein eigenes Expressionsmuster, Rezeptoraffinität und biologische Funktion (Goel and Mercurio 2013).

VEGF-A

Der VEGF-A ist der wichtigste Regulator sowohl der physiologischen als auch der pathologischen Neovaskularisation (Ferrara and Davis-Smyth 1997). Er bindet an den VEGFR-1 und VEGFR-2 (Zachary 2001). *In vitro* besteht seine Hauptaufgabe darin, die Endothelzellen so zu stimulieren, dass sie die extrazelluläre Matrix degenerieren, migrieren und Tubes bilden (Dvorak 2000, Hillen and Griffioen 2007, Shibuya 2009). *In vivo* reguliert VEGF-A zusätzlich die Permeabilität der Gefäße, was als wichtiger Faktor für die Einleitung der Angiogenese angesehen wird (Hicklin and Ellis 2005, Clara, Marie et al. 2014). Zudem induziert VEGF-A die Expression von anti-apoptotischen Proteinen in Endothelzellen. Im erwachsenen Organismus wird VEGF-A mRNA im Gehirn, Niere, Lunge, Leber und der Milz exprimiert. Die Transkription der mRNA wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine induziert. Der VEGF-A Spiegel hängt stark von dem Sauerstoffpartialdruck im Gewebe ab (Veikkola and Alitalo 1999).

VEGF-B

Der VEGF-B ist sowohl im Herzen wie auch im Skelettmuskel vorhanden (Veikkola and Alitalo 1999). Er ist ein selektiver Ligand des VEGFR-1 (Olofsson, Korpelainen et al. 1998). Wenn die Bindung an Endothelzellen stattfindet, erhöhen sich die Expression und die Aktivität des Urokinase-Plasminogenaktivator-Typs sowie des Plasminogen Aktivator Inhibitors 1. Diese Tatsache lässt vermuten, dass VEGF-B eine entscheidende Rolle in der Regulation der extrazellulären Matrixdegeneration, der Zelladhäsion und der Migration spielt (Veikkola and Alitalo 1999).

VEGF-C

Während der Embryogenese reguliert VEGF-C die Entwicklung des lymphatischen Systems. Gleichzeitig ist er in pathologischen Prozessen wie Entzündungen, Störungen des lymphatischen Systems und maligner Tumormetastasierung involviert (Hicklin and Ellis 2005). Diverse Studien haben gezeigt, dass VEGF-C ein lymphangiogener Faktor ist, welcher selektiv die Hyperplasie von lymphatischen Gefäßen einleiten kann. Zudem zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen der VEGF-C-Expression im Tumorgewebe und dem lymphatischen Metastasierungsrisiko (Han, Li et al. 2010).

Im normalen erwachsenen Gewebe findet man die höchste Expression von VEGF-C im Herzen, den Muskeln, den Ovarien und im Dünndarm. VEGF-C führt in Zellkulturen zur Migration und Proliferation von Endothelzellen und stimuliert die Angiogenese in der Kornea und im ischämischen Muskel (Jeltsch, Kaipainen et al. 1997, Cunnick, Jiang et al. 2008). Die Expression des VEGFR-3 - Rezeptor für VEGF-C - ist weitgehend auf das lymphatische Gewebe beschränkt und spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von lymphatischen Gefäßen und Metastasen (Han, Li et al. 2010). VEGF-C besitzt jedoch auch die Fähigkeit den VEGFR-2 zu binden (Witmer, Dai et al. 2002).

Der VEGF-C₁₅₆ stellt eine rekombinante Form von dem VEGF-C dar, bei welchem das Cys156 gegen ein Serin Rest ausgetauscht wurde. Er ist ein selektiver Agonist des VEGFR-3 (Joukov, Kumar et al. 1998).

VEGF-D

Auch für den VEGF-D konnte eine mitogene Aktivität gegenüber Endothelzellen nachgewiesen werden (Veikkola and Alitalo 1999). Er bindet wie VEGF-C an den VEGFR-2 und VEGFR-3 (Zachary 2001). Im erwachsenen Gewebe findet man die VEGF-D mRNA ebenso wie die VEGF-C mRNA hauptsächlich im Herzen, Muskel, Ovarien und im Dünndarm (Cunnick, Jiang et al. 2008).

VEGF-E

Der zuständige Rezeptor für VEGF-E ist der VEGFR-2 (Witmer, Dai et al. 2002). *In vivo* besitzt VEGF-E die Fähigkeit Endothelzellen zur Teilung zu stimulieren und die Einleitung der vaskulären Permeabilität anzuregen (Veikkola and Alitalo 1999).

4.2.4 Vascular Endothelial Growth Factor Receptors

VEGFRs sind Tyrosinkinasen, welche in den Endothelzellen der Blut- und Lymphgefäße Signalwege vermitteln. Sie ermöglichen eine Zellproliferation und sichern das Überleben und die Differenzierung der Zellen. Diese Signalwege sind unerlässlich für die Ausbildung und Aufrechterhaltung des Gefäßsystems, sowie für die angiogenen Antworten unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Dabei werden drei verschiedene VEGFRs unterschieden: VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 (Witmer, Dai et al. 2002, Hicklin and Ellis 2005, Goel and Mercurio 2013).

In Mäusen führt eine gezielte Inaktivierung von VEGFR-1 und VEGFR-2 zu einer gestörten embryonalen Entwicklung und zu einer gestörten Vaskularisation. Mäuse, bei denen der VEGFR-2 komplett ausgeschaltet wurde, können weder differenzierte Endothelzellen noch organisierte Blutgefäße produzieren. Zudem besitzen diese Versuchsmäuse keine hämatopoetischen Vorläuferzellen. Aus diesen Gründen geht man davon aus, dass dieser Rezeptor bei der Ausbildung von hämatopoetischen- und Endothel-Vorläuferzellen eine essentielle Rolle spielt. Mäuse, bei denen eine komplette Ausschaltung des VEGFR-1 vorgenommen wurde, besitzen im Gegensatz dazu reife differenzierte Endothelzellen, welche jedoch große desorganisierte Gefäße bilden. Während der Embryogenese führt die VEGFR-3-Stimulation zur Entwicklung der Blutgefäße. Mit der Zeit beschränkt sich die Expression jedoch auf das lymphatische Gewebe und spielt eine tragende Rolle bei der Lymphangiogenese. Versuche zeigten, dass eine komplette Ausschaltung des VEGFR-3 in Mäusen weder die Gefäßneubildung noch die Lymphangiogenese verhindern. Vielmehr führte Sie zu Störungen in der normalen Gefäßentwicklung, was Flüssigkeitsablagerungen im Gewebe aus undichten Gefäßen zur Folge hatte (Zachary 2001).

4.3 Hypoxie

Unter Hypoxie versteht man ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf. Es ist ein Zustand, in dem der zur Verfügung stehende Sauerstoff den herrschenden Sauerstoffbedarf des Gewebes nicht decken kann, was eine Stresssituation für die Zellen bedeutet (Corroyer-Dulmont, Chakhoyan et al. 2015). Unter Anoxie versteht man wiederum den Zustand, in welchem kein Sauerstoffpartialdruck mehr messbar ist.

Unter physiologischen Bedingungen führt ein erhöhter O₂-Bedarf im Gewebe, durch fein abgestimmte Prozesse, zu einem erhöhten Blutfluss, sodass sich kein Hypoxie-Zustand einstellt (Hockel and Vaupel 2001). Versagt dieser feinregulierte Prozess, kommt es zur Hypoxie, ein sehr häufig vorkommender Zustand in schnellwachsenden Tumoren (Murat, Migliavacca et al. 2009). So beträgt der mittlere O₂ Partialdruck in Mamma Karzinomen 10mmHg, im normalen Brustgewebe dagegen 65mmHg (Ueda and Saji 2014).

Es ist bewiesen, dass Hypoxie die Aggressivität zahlreicher Tumore inklusive dem GBM fördert (Li, Bao et al. 2009, Bar, Lin et al. 2010, Thiebold, Luger et al. 2015). Klinische und experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass der Hypoxiezustand die GBM-Entwicklung begünstigt, zur Aufrechterhaltung von CSC's beiträgt, die Angiogenese und das VM aktiviert und die Transdifferenzierung von CSC in Endothelzellen fördert (Li, Bao et al. 2009, Soda, Marumoto et al. 2011, Mao, Xue et al. 2013, Joseph, Conroy et al. 2015, Xu, Rahimpour et al. 2015).

In Glioblastomen wird eine ausgeprägte räumliche Heterogenität mit streng hypoxischen Arealen und Infiltration peripherer Zonen durch mikrovaskuläre Proliferation beobachtet (Inda, Bonavia et al. 2014). Hypoxische Zustände führen zu einer Aktivierung von verschiedenen Signalwegen, welche das Überleben der Zellen unter diesen ungünstigen Bedingungen ermöglichen. Zu den frühen unter hypoxischen Bedingungen aktivierten Signalwegen gehören die sogenannten Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPKs) (Cross, Scheel-Toellner et al. 2000). MAPKs sind Serin/Threonin-Kinasen, welche verschiedene zelluläre Prozesse wie die Proliferation, die Differenzierung und die Apoptose regulieren (Pearson, Robinson et al. 2001). Die Extrazellulär Regulierte Kinase (ERK), eine Untergruppe der MAPKs, stellt ein Schlüsselmolekül für das Überleben unter Hypoxie dar, da sie die Bildung von „Hypoxia Inducible Factor-1“ (HIF-1) induziert. HIF-1 ist ein Heterodimer, welcher aus zwei Untereinheiten besteht, das HIF-1 α und das HIF1- β (Simiantonaki, Jayasinghe et al. 2008). Der Gehalt von HIF-1 β ist relativ konstant und unabhängig von der Sauerstoffkonzentration. Der Gehalt von HIF-1 α ist unter normoxischen Bedingungen sehr gering, er steigt jedoch unter hypoxischen Bedingungen stark an. Das HIF-1 α -Protein wird normalerweise durch das Tumorsuppressor Protein „von Hippel-Lindau“ (VHL) über einen kontinuierlichen ubiquitinylierungsabhängigen Degradierungsprozess und anschließender proteosomaler Degradation auf geringem Niveau gehalten. Studien haben jedoch gezeigt,

dass das VHL Protein erst seinen Ubiquitylierungsprozess beginnen kann, nachdem zuvor eine sauerstoffabhängige Hydroxylierung eines bestimmten Prolin-Restes des HIF-1 α stattgefunden hat. Demzufolge findet dieser Prozess unter hypoxischen Bedingungen, wegen einem Mangel an zellulärem Sauerstoff, nicht statt. Ein Entkommen von dem physiologischen Ubiquitylierungsprozess mit anschließender Akkumulation des HIF-1 α in den Zellen ist die Folge (Brat and Mapstone 2003). Das stabilisierte nicht hydroxylierte HIF-1 α wird in Folge dessen in den Zellkern transloziert, wo es an das „Hypoxia-response Element“ (HRE) bindet und somit die Expression von zahlreichen Hypoxiegene aktiviert (Murat, Migliavacca et al. 2009). Das Produkt einer dieser Gene ist unter anderem der VEGF-A (Simiantonaki, Jayasinghe et al. 2008). Gemeinsames Ziel der produzierten Faktoren ist durch die gesteigerte Angiogenese und erhöhter Apoptoseeinleitung die Hypoxiebedingungen zu überwinden (Tatusova, Ciufu et al. 2015). Die Überexpression von HIF-1 α wurde in mehreren Tumoren, wie dem Prostata-, Lungen-, Mamma- und Pankreas-Karzinom, beschrieben. Mehrere Studien haben außerdem gezeigt, dass eine erhöhte HIF-1 α Aktivität zu einem vermehrten Zellwachstum und Überleben führt und die Tumordinvasion und Aggressivität fördert (Garayoa, Martinez et al. 2000, Talks, Turley et al. 2000, Hockel and Vaupel 2001, Semenza 2003, Mendichovszky and Jackson 2011).

Außerdem hat die Hypoxie eine große Auswirkung auf die Therapiewirksamkeit. Studien haben gezeigt, dass das Ausmaß an Sauerstoffgehalt im Tumorgewebe eine entscheidende Rolle bei der Wirksamkeit der Radio- und Chemotherapie einnimmt (Peres, Gerault et al. 2015).

Unter normoxischen Bedingungen reagiert die ionisierende Strahlung unter der Anwesenheit von Sauerstoff mit intrazellulärem Wasser und führt so zur Bildung freier Sauerstoffradikale (Amberger-Murphy 2009). Diese durch Hydrolyse entstandene Hydroxylradikale können gravierende DNA-Schäden verursachen, welche nicht durch einfache Reparaturmechanismen behoben werden können. Bis zu zwei Drittel der DNA Schäden werden durch Hydroxylradikale verursacht. Unter hypoxischen Bedingungen stehen weniger freie Sauerstoffradikale zur Verfügung wodurch die DNA-Schädigung deutlich herab gesetzt ist (Ward 1988). Außerdem haben die wenigen freien Sauerstoffradikale erhöhte Affinität mit H⁺-Ionen zu reagieren und die Ursprungsstruktur H₂O wieder anzunehmen. Die DNA-Schädigung wird somit auf die direkte Strahleneinwirkung limitiert und dadurch werden ca.

drei Mal höhere Strahlendosen benötigt, um denselben Effekt zu erzielen. Zudem führt die ionisierende Strahlung zur Verstärkung der Hypoxiezustände da sie Gefäße zerstören kann, die Aktivierung des Gerinnungssystems hervorrufen kann und zu sekundärem ischämischen Tumorstress führen kann (Denham and Hauer-Jensen 2002). Studien haben gezeigt, dass es sich bei den überlebenden resistenteren Zellpopulation mit größter Wahrscheinlichkeit um CSC's oder um Zellen welche Tumorentstehungseigenschaften besitzen handelt (Mannino and Chalmers 2011).

Hypoxie stellt somit eine charakteristische Eigenschaft des GBM dar, mit pseudopalisadenartigen Nekrosen und vaskulärer Proliferation als pathognomonische Merkmale. Pseudopalisade Nekrosen sind hyperzelluläre Zonen die Nekroseareale umgeben. Diese Zonen mit Hyperzellularität wurden ausführlich in der Literatur beschrieben und sind nicht das Resultat von vermehrter Proliferation. Vielmehr sind diese Areale hoch hypoxisch und es handelt sich um Tumorzellen welche von einem vasookklusiven Ereignis mit deformierten, degenerierten oder thrombosierten Gefäßen im Zentrum weg migrieren (Brat, Castellano-Sanchez et al. 2004, Cavazos and Brenner 2016). Die hypoxischen Herde weisen erhöhte Konzentrationen von HIF1 auf was wiederum die Sekretion von VEGF nach sich zieht und somit zur Aufrechterhaltung der Gefäßproliferation führt. Allerdings sind diese neuen durch die VEGF-Stimulation gebildeten Gefäße hoch pathologisch, da das ausgezeichnete physiologische Gleichgewicht von pro- und antiangiogenen Wachstumsfaktoren bei Tumoren gestört ist (Jain 2013). Es entstehen stark gewundene und chaotische Gefäßstrukturen mit Lücken zwischen den Endothelzellen und Abwesenheit von Perizyten. Durch diese Fehlbildungen und Undichtigkeiten der Gefäße kommt es zu einem erhöhten interstitiellen Druck mit konsekutiver Stase des Blutflusses was wiederum zu einer Exazerbation des Hypoxiezustandes führt und zusätzlich zu vermehrten mikrovaskulären Thrombosen (Jain 2013).

Die kontinuierliche Gefäßneubildung, mit anschließendem Gefäßkollaps und Tumormigration hat zur Folge, dass es zu einer raschen Ausbreitung der Tumorzellen vom Tumorrand in die Peripherie und in das umgebende gesunde Hirngewebe kommt. Hier beginnt der komplette Prozess erneut, ein Circulus vitiosus der dem Glioblastoma multiforme das hoch aggressive Verhalten vermachet (Cavazos and Brenner 2016).

5 Fragestellung

In der Literatur wird die Existenz extrem hypoxischer bis anoxischer Areale in Glioblastomen beschrieben. Den Glioblastomzellen gelingt es jedoch durch Anpassungsmechanismen solch ungünstige Umgebungskonditionen zu überleben. Es existieren bereits viele Studien, welche das Verhalten von Glioblastomzellen im Zusammenhang mit intrazellulären Signalwegen unter Hypoxie erforscht haben. All die in der Literatur durchgeführten Studien wurden bei einem Sauerstoffgehalt von mindestens 1% durchgeführt. Wegen der ausgeprägten Überlebensfähigkeit des Glioblastoms, wurden bisher diverse „escape Mechanismen“ beschrieben, welche das Glioblastoma Multiforme nutzt, um Resistenzen gegen die aktuell eingesetzten Therapien zu entwickeln. Zahlreiche Studien haben bereits gezeigt, dass eine anti-VEGF-A Therapie mit Bevacizumab nur zu einem transienten Tumorregress führt und anschließend der Tumor eine Resistenz gegen die VEGF-A Blockade entwickelt. Deshalb wurde bereits die Rolle alternativer pro-angiogener Faktoren wie bspw. VEGF-C und VEGF-D in der Resistenzentwicklung postuliert. Initial war der VEGFR-3 und seine Liganden VEGF-C und -D nur der Lymphangiogenese zugeschrieben, es konnte jedoch bereits nachgewiesen werden, dass vor allem in intra-tumoralen Gefäßen von Glioblastomen diese Faktoren stark exprimiert werden. Da der VEGFR-3/VEGF-C potenzielle Kandidaten in der Vermittlung der Therapieresistenz darstellen könnten, war es Kernziel dieser Arbeit den Zusammenhang dieser Faktoren sowohl bei Tumor- als auch bei Endothelzellen unter extremer Langzeit-Hypoxie zu untersuchen. Dafür führten wir die Versuche über mehrere Tage unter extrem hypoxischen Bedingungen, mit einem Sauerstoffpartialdruck von 0,1%, durch und verglichen diese Ergebnisse mit dem Verhalten von Tumor- und isolierten Endothelzellen unter normoxischen Bedingungen. Wir untersuchten zudem den Einfluss von extremer Langzeit-Hypoxie auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von Tumor- und Endothelzellen sowie die Aktivität verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden auf das Verhalten von extremer Langzeit-Hypoxie.

6 Methoden

6.1 Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden als Monolayerkultur in Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für die Versuche unter Hypoxiebedingungen wurden die Zelllinien als Monolayerkultur in Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 0,1% O₂ kultiviert.

Kultivierung von isolierten humanen Endothelzellen

Die Kultivierung der isolierten humanen Endothelzellen, IEC 771, IEC 784 und IEC 787, erfolgte in kleinen bis mittleren Kulturflaschen. Die Zellen wurden mit speziellem Grundmedium versorgt. Im Anhang 11.1 wird die Zusammensetzung des Kulturmediums für die IEC aufgeführt. Je nach Größe der Kulturflasche, betrug das Endvolumen (Zellen + Medium) 5ml für die kleine und 10ml für die mittlere Flasche. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gehalten und täglich unter einem Lichtmikroskop inspiziert.

Um eine kontinuierliche Nahrungsversorgung der Zellen sicher zu stellen, erfolgte alle 72 Stunden ein Wechsel des Mediums. Nach Absaugen des verbrauchten Mediums aus der Zellkulturflasche wurden 3-8ml PBS-Puffer aufpipettiert und zum Spülen der Zellen verwendet. Hierzu wurde die Flasche vorsichtig hin und her geschwenkt, um die Serumproteine zu entfernen. Im Anschluss daran wurde der PBS-Puffer wieder abpipettiert und 5-10ml frisches Medium in die Zellkulturflaschen hineingegeben. Im Anhang 11.1 wird die Zusammensetzung des PBS-Puffers aufgeführt.

Kultivierung primärer humanen Endothelzellen HBMEC

Bei den HBMEC handelt es sich um mikrovaskuläre Zellen aus einem Normalhirn. Die Versorgung erfolgte analog zu den isolierten humanen Endothelzellen.

Kultivierung primärer humanen Tumorzellen U87 und U251

Die U87 und U251 sind kommerziell erwerbliche Tumorzelllinien, welche standardmäßig für Studien über das Glioblastoma multiforme benutzt werden.

Die Zellen wurden mit DMEM-Grundmedium versorgt. Im Anhang 11.1 wird die Zusammensetzung des Kulturmediums für die humanen Tumorzellen aufgeführt.

Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte analog zu den isolierten humanen Endothelzellen.

Passagieren von Zellen

Um eine Konfluenz der Zellen aufgrund des Monolayer-Wachstums in den Kulturflaschen zu vermeiden, wurden alle Zellen bei einer Dichte von ca. 90% aus dem Zellverband gelöst und in geringerer Zelldichte neu ausgesät. Ein durch die Konfluenz verursachter Stillstand der Zellteilung, eine Kontaktinhibition mit Verlust der Adhäsion oder sogar eine spontane Zelldifferenzierung konnte dadurch vermieden werden. Nach dem Absaugen des Mediums aus der Zellkulturflasche wurden 3-8ml PBS-Puffer aufpipettiert, um unter vorsichtigem schwenken der Flasche die Serumproteine aus zu spülen. Anschließend wurde der PBS-Puffer wieder abpipettiert und die Zellen mit 2-3ml Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet. Um die Zellen von dem Boden zu lösen, wurden die Kulturflaschen für ca. 2-4 Minuten in den Brutschrank gestellt. Zur Überprüfung wurde ein Lichtmikroskop verwendet. Konnte keine vollständige Zelllösung festgestellt werden, wurden die Zellen erneut für einige Minuten in den Brutschrank gestellt oder versucht durch sanftes Klopfen an der schmalen Längsseite der Kulturflasche die restlichen Zellen von dem Boden zu lösen. Um die Trypsin-Lösung zu inaktivieren und das toxische EDTA zu binden, wurde immer mindestens das doppelte Volumen an frischem Medium im Verhältnis zum Trypsin dazu pipettiert und mit der Pipette gut durchgemischt. Je nach gewünschter Zelldichte wurden 1-5ml dieses Gemisches in die Kulturflaschen zurück pipettiert und das Restvolumen mit frischem Nährmedium aufgefüllt. Der Rest wurde verworfen oder in eine neue Kulturflasche gefüllt.

Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen, trypsiniert, in 50ml Falcon Röhrchen pipettiert und bei 2000 U/min für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und das übrig gebliebene Zellpellet in 1ml frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden schonend auf- und abpipettiert bis eine homogene Lösung ohne Zellklumpen erreicht wurde. Zur Zählung der Zellen wurden diese mit Tryptanblau Solution 0,4% gefärbt, eine Verdünnungsreihe angesetzt und in einer Neubauer-Zählkammer mit einer Tiefe von 0,100mm und einer Fläche von 0,0025mm² ausgezählt. Tryptanblau ist

ein Farbstoff, der nur in poröse avitale Zellen eindringen kann und somit die Zellen dunkelblau färbt. Für vitale Zellen ist dieser Farbstoff hingegen impermeabel, so dass diese unter dem Mikroskop weiß erscheinen. Zur Berechnung der Zellzahl pro ml wurden alle 4 äußeren Quadranten der Zählkammer ausgezählt, der Mittelwert berechnet und die Dichte mit folgender Formel bestimmt:

$$\rho = m \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

ρ = Zellzahl/ml; m = Mittelwert aus allen 4 Quadranten

Kryokonservierung von Zellen

Sämtliche für die Versuche nicht benötigten Zellen wurden im Rahmen der Zellpassagierung eingefroren. Die Vorbehandlung der Zellen erfolgte analog zu Punkt 2.2.5. Ein Einfriermedium und die Zellsuspension (1×10^6 Zellen) wurden zu gleichen Teilen (500 μ l:500 μ l) homogen in je ein Nunc Röhrchen gegeben und mit einem Cryo-Einfriergerät eingefroren. Sie wurden für mindestens 12 Stunden im -80°C Schrank gelagert um anschließend in einen N_2 -Tank bei -195°C überführt zu werden. Im Anhang 11.1 wird die Zusammensetzung des Einfriermediums aufgeführt.

6.2 Sulforhodamine-B Assay

Der Sulforhodamin-B Assay ermöglicht die Beurteilung der zytotoxischen Effekte unterschiedlicher Substanzen. In diesem Verfahren wird, nach der Exposition von Zellen gegenüber den Substanzen, das verbleibende Lebensprotein im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle photometrisch analysiert. Unter leicht sauren Bedingungen bindet Sulforhodamin B an basische Aminosäuren der Zellproteine. Unter schwach alkalischen Bedingungen, kann der gebundene Farbstoff aus den Zellen extrahiert werden und bei einer Wellenlänge von 564 nm photometrisch vermessen werden.

Für die Durchführung des Assays wurden 3000 Zellen pro Well in einer 96-Well Platte ausgesät und je nach Versuchsdauer 24 Stunden bis 7 Tage lang in einem Brutschrank inkubiert. Es gab zwei verschiedene Inkubationsbedingungen, normoxische (37°C und 5% CO_2) und hypoxische (37°C , 5% CO_2 und 0,1% O_2). Alle 72 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Nach der gewünschten Inkubationszeit

wurden die lebenden Zellen durch Zugabe von 50 µl 50 %iger Trichloressigsäure pro Well fixiert. Nach einer Stunde Fixierung bei 4°C wurden die Wells mehrmals mit Leitungswasser gewaschen, um Zellreste und überschüssiges Medium zu entfernen. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Tag wurden die fixierten Zellen mit 0,4 %iger Sulforhodamin B-Lösung gefärbt und im Dunkeln für mindestens 30 Minuten inkubiert. Der nicht an das Zellprotein gebundene Farbstoff wurde durch mehrfaches Waschen mit Leitungswasser und 1%iger Essigsäure entfernt. Nach vollständiger Trocknung wurden die Zellen durch Zugabe von Tris-Base eluiert, und die Absorption wurde im Microplate-Reader bei 570 nm gegen Tris-Base als Leerwert gemessen. Zur Bestimmung der Zellwachstumsrate wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontroll- und Testwerte berechnet. Die Probenmittelwerte wurden im Verhältnis zum Mittelwert der 24 Stunden Normoxie-Kontrolle (T/C) gesetzt. (Gieser, Eugenie 2014).

Im Anhang 11.1 wird die Zusammensetzung der Lösungen, die für die Durchführung des SRB-Assay benötigt werden, aufgeführt.

Berechnung T/C:
$$T / C [\%] = ((T - C_N) / (C_B - C_N)) \times 100 \%$$

T/C: Test over Control - Wert

T: Optische Dichte der Testsubstanz

C_N: Optische Dichte der Normalreaktion

C_B: Optische Dichte des Blindwertes

6.2.1 Auswirkung von Normoxie-/Hypoxie-Bedingungen auf die Proliferation

Für die Zelllinien U87 und IEC771 wurden jeweils 144 Wells mit je 3000 Zellen/100µl Medium ausgesät. Es wurden Versuche mit 24 Wells für je zwei Bedingungen (Normoxie/Hypoxie) und für drei unterschiedliche Messzeitpunkte (24h, 72h, 7d) durchgeführt. Nach der Aussaat wurden die Platten in den jeweiligen Brutschränken platziert und dort für die vorgesehene Zeit inkubiert. Bei zwei 96-Well-Platten (Normoxie und Hypoxie) wurde nach 24 Stunden Inkubationszeit der SRB-Assay, zur Messung der Proliferation beider Zelllinien, durchgeführt. Nach 72 Stunden erfolgte eine SRB-Assay Messung an zwei weiteren 96-Well-Platten. Um eine Versorgung mit neuen Nährstoffen zu gewährleisten wurde bei den übrigen zwei Platten ein Wechsel des Mediums nach 72

Stunden und am sechsten Tag durchgeführt. Am siebten Tag wurden auch diese zwei Platten einem SRB-Assay unterzogen.

6.2.2 Auswirkung von Präkonditionierung mit Hypoxie und anschließender erneuter Kultivierung der Zellen in Normoxie auf die Proliferation

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Hypoxie mit anschließender erneuter Kultivierung in Normoxie auf die Proliferation wurden die Tumorzellen präkonditioniert. Die Präkonditionierung umfasste eine Inkubation unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen für 14 Tage. Nach Abschluss der Präkonditionierung wurden die Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. Zur Kontrolle füllte man 18 Wells mit je 3000 Zellen pro Zelllinie (U87 und U251) und Bedingung (Normoxie und Hypoxie). Diese wurden für 24 Stunden im jeweiligen Brutschrank erneut inkubiert und anschließend SRB-Tests unterzogen. Für den restlichen Versuchsaufbau wurden für beide Zelllinien 30 Wells mit je 3000 Zellen/100µl Medium ausgesät. Dafür wurden die Hälfte der Zellen, welche für 14 Tage unter Normoxie kultiviert wurden, nach der Aussaat erneut in den Normoxie Brutschrank zurück platziert und die andere Hälfte wurde nach der Aussaat unter Hypoxie-Bedingungen weiter inkubiert. Die andere Hälfte der Zellen, welche für 14 Tage unter Hypoxie kultiviert wurden, wurden nach der Aussaat erneut in den Hypoxie Brutschrank zurück platziert und die andere Hälfte wurde nach der Aussaat unter Normoxie-Bedingungen weiter inkubiert. Die Zellen wurden unter den neuen Bedingungen für weitere 7 Tage inkubiert. Alle 72 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und nach Ablauf des siebten Tages der SRB-Assay durchgeführt. Der gleiche Versuch erfolgte mit den U251 Zellen.

6.2.3 Einfluss von Vascular Endothelial Growth Factors auf die Proliferation von Hypoxie präkonditionierten Zellen

Um den Einfluss des Vascular Endothelial Growth Factors auf die Proliferation von Hypoxie präkonditionierten Zellen zu untersuchen, wurden die Tumorzellen U87 und die isolierten humanen Endothelzellen 787 vor der Aussaat für 72 Stunden unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen inkubiert. Nach Abschluss der Präkonditionierungsphase wurden 3000 Zellen/100µl FCS freien Mediums in 96-Well-Platten ausgesät. Zur Beurteilung der Proliferationsunterschiede wurden die Zellen sowohl unter Normoxie wie auch unter Hypoxie Bedingungen, zusätzlich mit den Wachstumsfaktoren VEGF-A (100ng/ml), VEGF-C

(200ng/ml), VEGF-D (200ng/ml) und VEGF-C156 (250ng/ml) versetzt. Zur Kontrolle wurden zudem Wells ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubiert. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurde der SRB-Assay durchgeführt.

6.2.4 Einfluss von VEGFR2- und VEGFR3-Inhibition auf die Proliferation von Hypoxie präkonditionierten Zellen

Um den Einfluss von VEGFR2- und VEGFR3- Inhibition auf die Proliferation von Hypoxie präkonditionierten Zellen zu bestimmen, wurden die Tumorzellen U87 und die isolierten humanen Endothelzellen 787 vor der Aussaat für 72 Stunden unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen präkonditioniert. Nach Abschluss der Präkonditionierung wurden 3000Zellen/100µl Medium in 96-Well-Platten ausgesät. Sowohl unter Normoxie wie auch unter Hypoxie Bedingungen wurden die Zellen noch zusätzlich mit 5µM Tyrphostin (VEGFR2-Inhibition) und 7µM MAZ51 (VEGFR3-Inhibition) versetzt. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne Zusatz von Tyrphostin und MAZ51 unter Normoxie und Hypoxie Bedingungen inkubiert. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurde der SRB-Assay durchgeführt.

6.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Träger (PVDF-Membran) übertragen werden. Hierbei wird eine Kopie des Gels produziert, wobei die Proteine durch verschiedene Bindungen auf dem Filter immobilisiert werden. Das ursprüngliche im Gel enthaltene Trennmuster der Protein-Moleküle bleibt nach der Übertragung erhalten, so dass eine exakte Replik des ursprünglichen Gels entsteht. Da die Proteine nach dem Transfer für die Behandlung mit verschiedenen Liganden oder Antikörpern zugänglich sind, erlaubt der Einsatz der Blotting-Technik (Übertragung von Proteinen auf die Trägermembran) neben einer einfachen qualitativen und quantitativen Bestimmung einzelner Proteine in einem komplexen Gemisch anderer Proteine, auch deren Identifikation.

Für den Vorgang der Proteinisolation wurden die zu untersuchenden Zelllinien (U87, U251, HBMEC und IEC784) passagiert, in frisches Medium aufgenommen und in ein 50ml großes Falcon Röhrchen pipettiert. Die Proben wurden bei 1200U/Min für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgekippt. Anschließend wurde 1ml PBS-Puffer hinzu pipettiert, zu einem homogenen Gemisch resuspendiert und in einen Eppendorf-Cup

übertragen. Das Gemisch wurde dann bei 4°C und 6,8rpm für 5 Minuten in einer Zentrifuge zentrifugiert, der Überstand wieder abpipettiert und jeweils 200µl Lyse-Puffer hinzugefügt. Im Anhang 11.1 wird die Zusammensetzung des Lyse-Puffers aufgeführt. Zur vollen Entfaltung der Lyse-Puffer Wirkung wurden die Proben für mindestens 15 Minuten auf Eis gelagert und alle 5 Minuten kurz gevortext. Auf diese Weise konnten sämtliche Proteine freigelegt werden. Zum Abschluss wurden die Proben bei 4°C und 16000rpm erneut für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand (Proteine) abpipettiert, in einen Eppendorfer-Cup überführt und die Proteinbestimmung durchgeführt.

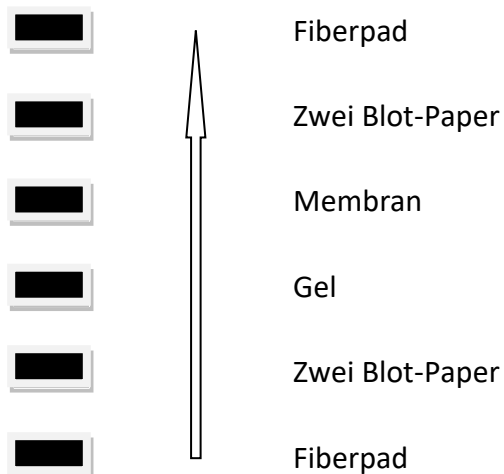
Die quantitative Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie® Brilliant Blue G-250 an Proteine. Nach Bildung eines Protein-Farbstoff-Komplexes im sauren Medium erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470nm nach 595 nm. Durch Erstellung einer Kalibrierungsgerade kann die Proteinkonzentration einer unbekannt Probe quantifiziert werden. Die Farbreaktion ist abhängig vom Gehalt an aromatischen und basischen Aminosäuren. Dadurch ergeben sich unterschiedlich starke Absorptionen bei verschiedenen Proteinen.

Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde in einer 96 Well-Platte durchgeführt. Zur Erstellung der Kalibrierungsgeraden wurden je 200µl Bradford Dye Reagenz mit je 1µl BSA-Standard (Rinderserumalbumin), für jede Konzentration im Doppelansatz, gemischt. Als Leerwert wurden nur 200µl Bradford Dye Reagenz ohne Zumischung von BSA-Standard verwendet. Die Proben wurden für die unterschiedlichen Versuche in Verhältnissen von 1:1, 1:20 und 1:50 mit Aqua destillata verdünnt und im Doppel- Drei- oder Vierfach-Ansatz in Wells pipettiert. Die fertig pipettierten Platten wurden ca. 3 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend im Biophotometer charakterisiert.

Alle zuvor gemessenen Proteine wurden auf die gleiche Konzentration eingestellt und mit 5µl Lämmli-Puffer vermischt, 10 Minuten im Heizblock inkubiert und kurz abzentrifugiert („short run“). Da reduzierte Gele verwendet wurden, erfolgte eine Zugabe von 5µl 5% β-Mercaptoethanol zu 95µl Lämmli-Puffer. Anschließend erfolgte das Beladen der Lanes der Gele mit dem Protein-Lämmli-Puffer Gemisch. Als Marker wurden 10µl PageRuler von Fermentas verwendet. Die übrigen leeren Taschen wurden mit einem Gemisch aus Lämmli-Puffer und Aqua destillata gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte 55 Minuten bei 30mA pro Gel in einer Blotkammer, gefüllt mit eiskaltem 1x Elektrophorese-Puffer. Kurz vor Ende der

Elektrophorese erfolgte die Aktivierung der Membran für 30 Sekunden in Methanol_{reinst}. Anschließend wurden die Membran sowie die Fiberpads und Blot-Papers 5 Minuten in 1x Transferpuffer eingeweicht. Die Gele wurden nach Ende der Elektrophorese entnommen und der Blot wie abgebildet aufgebaut.

Plus Pol



Minus Pol

Die fertige Sandwichkassette wurde mit einem CoolPack (-20°C) und einem Rührfisch in die Blotkammer eingesetzt, welche mit Transferpuffer gefüllt und in eine Wanne mit Eis gestellt war. Für eine Dauer von 70 Minuten lief der Aufbau bei 110 Volt auf einem Magnetrührer. Anschließend wurde die Membran aus dem Blot entnommen, 30 Sekunden lang in Methanol_{reinst} getaucht und danach 5 Minuten in 1x TTBS gewaschen. Geblockt wurde über Nacht in 5%iger Magermilch (2mg Magermilch auf 40ml 1x TTBS). Am nächsten Tag spülte man die Membran kurz in 1x TTBS, wusch sie dann 3x 5 Minuten in 1xTTBS und inkubierte sie über Nacht mit dem entsprechenden verdünnten Antikörper. Am 3. Tag wurde die Membran noch einmal kurz in 1x TTBS gespült und 3x 10 Minuten in 1x TTBS gewaschen um anschließend die Membran für 60 Minuten mit dem sekundären Antikörper (Konzentration 1:10.000) zu inkubieren. Ein letzter Waschschrift wurde vorgenommen um anschließend eine Detektion mittels Chemilumineszenzverfahren durchzuführen. Dafür wurde die Membran mit einem Gemisch aus 1ml Luminol und 1ml Peroxid-Puffer bedeckt und für 5 Minuten in der Dunkelheit inkubiert. Dann wurde die Membran in eine Filmkassette gelegt und entwickelt.

6.3.1 Einfluss von Hypoxie auf die Expression von VEGFRs

Um den Einfluss von Hypoxie auf die Expression von VEGFRs zu ermitteln, wurden für die Western Blots 10%ige Gele angefertigt und mit Tumor- und isolierten humanen Endothelzellen beladen. Es wurden U87 und IEC 784 Zellen in Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen kultiviert, wobei die Proteine nach 24 Stunden sowie nach 72 Stunden isoliert wurden. Die Lanes der Gele wurden mit Proteinen von U87 24h Normoxie, U87 24h Hypoxie, U87 72h Normoxie und U87 72h Hypoxie inkubierten Zellen beladen. Die restlichen Lanes wurden mit Lämmli und Aqua destillata gefüllt. Die Gele liefen für 55 Minuten und anschließend wurde 70 Minuten geblottet. Geblockt wurde über Nacht im Kühlschrank mit BSA-Lösung (2,5g BSA auf 50ml 1xTTBS) um am nächsten Tag die Membranen mit untenstehenden primären Antikörpern zu versetzen, über Nacht zu inkubieren und am nächsten Tag mit folgenden sekundären Antikörpern für eine Stunde zu inkubieren:

<u>primärer Antikörper</u>		<u>sekundärer Antikörper</u>	
Phospho-VEGFR-3	1:1000	Anti rabbit	1:10000
Phospho-VEGFR-2	1:1000	Anti rabbit	1:10000

Anschließend wurden die Membranen mit Luminol versetzt und für 5 Minuten im Dunkeln entwickelt.

6.3.2 Einfluss von Hypoxie auf die intrazellulären Signaltransduktionswege

Um den Einfluss von Hypoxie auf die Expression verschiedener MAPKs zu ermitteln, wurden für die Western Blots erneut 10%ige Gele angefertigt und mit Tumor- und Endothelzellen beladen. Es wurden U87, U251 und HBMEC Zellen für 14 Tage in Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen kultiviert und die Proteine anschließend isoliert. Die Lanes der Gele wurden mit einem Page Ruler und Proteine von U87 Normoxie, U87 Hypoxie, U251 Normoxie, U251 Hypoxie, HBMEC Normoxie und HBMEC Hypoxie inkubierten Zellen beladen. Die restlichen Lanes wurden mit Lämmli und Aqua destillata gefüllt. Die Gele liefen für 55 Minuten. Anschließend wurde für 70 Minuten geblottet. Geblockt wurde über Nacht im Kühlschrank mit BSA-Lösung (2,5g BSA auf 50ml 1xTTBS) um am nächsten Tag die Membranen mit folgenden untenstehenden primären Antikörper zu versetzen, über Nacht zu inkubieren und am nächsten Tag mit folgenden sekundären Antikörper für eine Stunde zu inkubieren:

<u>primärer Antikörper</u>		<u>sekundärer Antikörper</u>	
Phospho MAP 42/44-Kinase	1:1000	Anti mouse	1:10000
Phospho SAPK-JNK	1:2000	Anti mouse	1:10000
Phospho P38 MAP-Kinase	1:2000	Anti mouse	1:10000
Phospho AKT (Serin)	1:1000	Anti rabbit	1:10000

Anschließend wurden die Membranen mit Luminol versetzt und für 5 Minuten im Dunkeln entwickelt. Nach dem Entwickeln wurden die Membranen 3x 5 Minuten mit 1xTTBS gewaschen, zum Lösen der Antikörper und zur Wiederverwendbarkeit der Membrane 20 Minuten gestrippt und des Weiteren 3x 5 Minuten mit 1xTTBS gewaschen. Für 1,5 Stunden wurden die gestrippten und gewaschenen Membranen mit BSA-Lösung geblockt um sie anschließend wieder mit einem primären Antikörper über Nacht zu inkubieren und sie am nächsten Tag mit dem sekundären Antikörper für 1 Stunde wie folgt zu versetzen:

<u>primärer Antikörper</u>		<u>sekundärer Antikörper</u>	
MAP 42/44-Kinase	1:1000	Anti rabbit	1:10000
SAPK-JNK	1:1000	Anti rabbit	1:10000
P38 MAP-Kinase	1:1000	Anti rabbit	1:10000
Phospho-AKT (Thr)	1:1000	Anti rabbit	1:10000

Die Membranen wurden entwickelt und anschließend erneut für 20 Minuten gestrippt. Die Membran, welche mit Phospho-AKT (Thr) versetzt war, wurde für 1,5 Stunden mit BSA-Lösung geblockt um dann über Nacht den primären Antikörper AKT 1:1000 inkubieren zu lassen. Am nächsten Tag wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper Anti rabbit 1:10000 für eine Stunde versetzt, entwickelt und wieder gestrippt. Alle Membranen wurden ein letztes Mal für 1,5 Stunden mit Magermilch 5% geblockt, mit dem primären Antikörper β -Actin 1:1000 als Kontrolle für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert, anschließend mit dem sekundären Antikörper Anti mouse 1:10000 für 30 Minuten versetzt und schließlich entwickelt.

6.4 Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

mRNA Isolation

Zunächst wurde die RNA-Isolation mit dem RNeasy Mini Kit durchgeführt. Dafür wurden die gewonnenen Zellpellets 2 Mal mit PBS-Puffer gewaschen, bei 16000rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellpellets konnten durch Fingerschnippen gelöst werden und je Probe 350µl RLT-Puffer, welcher aus 1000µl RLT-Puffer und 10µl β-Mercapto bestand, hinzugegeben werden. Diese Mischung wurde zu einer homogenen Lösung resuspendiert, in QIAshredder spin Säulen pipettiert und anschließend für 2 Minuten bei 4°C und 16.000rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugierung wurden die Säulen entsorgt und 350µl Ethanol 70% in das untere Gefäß (Eppendorfer-Cup) hinzu pipettiert. Das neue Gemisch pipettierte man in RNeasy Säulen und zentrifugierte es für 15 Sekunden bei >10000rpm wodurch die RNS in der Säule gebunden blieb und der Durchlauf verworfen werden konnte. Diese verbliebenen Säulen mit der RNS wurden in neue Eppendorfer-Cups platziert, 700µl RW1-Puffer auf die Säule pipettiert, für 15 Sekunden bei >10000rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurden 500µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben, wieder für 15 Sekunden bei >10000rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dieser Schritt wurde 2 Mal durchgeführt. Beim zweiten Mal jedoch für mehr als 2 Minuten zentrifugiert, da bei diesem Schritt die Membran der Säule getrocknet und sämtlicher Alkohol entfernt wurde. Als letzter Schritt wurden die Säulen in 1,5ml Eppendorfer Cups platziert, auf Eis gelagert, mit 30µl RNase freiem Wasser für 1 Minute beschichtet und dann 1 Minute bei >10000rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde anschließend erneut wiederholt. Die Proben wurden mit einem Eppendorf Biophotometer vermessen. Um die Proben zu eichen wurde ebenfalls ein Leerwert vermessen. Für diesen Vorgang fügte man 5µl der jeweiligen Proben in eine Küvette mit 95µl von 10mM Tris/HCl hinzu.

Umschreibung der mRNA in cDNA

Um eine PCR durchführen zu können, musste die RNA in cDNA mit dem *Quanti Tect Reverse Transcription Kit* umgeschrieben werden. Wichtig bei all diesen Vorgängen war, dass sich die Proben während den einzelnen Schritten immer auf Eis befanden. Pro gewünschte Probe wurden 14µl des folgenden Gemisches hergestellt: *DNA Wipeout buffer* 7x 2µl + *Template RNA* 0,7-0,8µg + *RNAse free water* x µl.

Die *Template RNA* bezieht sich auf die gewünschte RNA, die in cDNA umgeschrieben werden soll.

Die fertig gemischten Proben wurden anschließend im *Eppendorf Cyclor*, Programm QuantRT, für 2 Minuten bei 42°C platziert. Während dessen wurde der *Master Mix* 6µl wie folgt hergestellt: *Quantiscript Reverse Transcriptase* 1µl + *Quantiscript RT Buffer* 4µl + *Quantiscript RT primer Mix* 1µl.

Der *Master Mix* wurde zu den Proben hinzu pipettiert, welche anschließend zurück in den *Eppendorf Cyclor* platziert und für 15 Minuten bei 42°C und danach für 3 Minuten bei 95°C erhitzt wurden.

Durchführung der RT-PCR

Nach der Umschreibung der Proben in cDNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dafür wurden die vorher bearbeiteten Proben mit dem *Hot star Taq Master Mix Kit* bestehend aus folgenden Substanzen, zusammen gemischt: *Taq Mix* 5µl + *Primer s* 0,5µl + *Primer as* 0,5µl + Wasser 3µl = 9µl + 1µl cDNA.

Der Primer waren für jeden, der zu untersuchenden Faktoren spezifisch. Je nach Abschnitt kodierender cDNA, welcher für einen bestimmten Faktor amplifiziert werden sollte, wurden 30-40 PCR-Zyklen im *Robocycler* bzw. *Eppendorf Cyclor* bei unterschiedlichen *annealing*-Temperaturen durchlaufen. Das fertige PCR-Produkt wurde anschließend mit 2µl Blaupuffer gemischt, kurz zentrifugiert und je Probe 6µl auf das Gel aufgetragen. 4µl wurden jeweils als Marker eingesetzt.

Elektrophorese der PCR

Das Gel lief bei 140 Volt für mindestens 55 Minuten. War der Marker nach dieser Zeit noch nicht vollständig aufgetrennt, lies man das Gel erneut laufen, bis die gewünschte Auftrennung zu sehen war. Zur Dokumentation wurde von den fertig durchgelaufenen Gelen ein Foto mit der digitalen Geldokumentation gemacht.

6.4.1 mRNA-Expression von VEGFR2, VEGFR3, VEGFA, VEGFC und VEGFD unter Normoxie- und Hypoxie Bedingungen

Für diesen Versuch wurden U87 und IEC787 Zellen für jeweils 24 Stunden und 72 Stunden unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen inkubiert, anschließend die mRNA isoliert, für jede Probe 0,7µg mRNA in cDNA umgeschrieben und wie folgt eine PCR im *Eppendorfer Cycler* durchgeführt:

β-Actin als Home Keeping Gen:	30 Zyklen; AT 60°C
VEGFR2:	34 Zyklen; AT 59°C
VEGFR3:	40 Zyklen; AT 64°C
VEGFA:	32 Zyklen; AT 58°C
VEGFC:	32 Zyklen; AT 58°C
VEGFD:	36 Zyklen; AT 61°C

Die Proben wurden auf die Gele aufgetragen, welche für 55 Minuten bei 140V liefen.

6.5 ELISA

Der ELISA-Test (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay) ist eine sehr empfindliche immunologische Methode, mit der man bestimmte Moleküle (hauptsächlich Proteine) nachweisen kann. Bei dieser Methode werden die Mechanismen des Immunsystems genutzt. Wenn eine Substanz (Antigen) von dem Immunsystem als fremd erkannt wird, werden spezifische Antikörper gebildet, welche an diese fremden Substanzen andocken und sie so für das restliche Immunsystem markieren. Diese entstandene Antigen-Antikörper Reaktion wird bei dem ELISA-Test genutzt. Soll ein bestimmtes Protein (Antigen) im Rahmen eines Versuches nachgewiesen werden, so müssen die Antikörper, welche für dieses Protein spezifisch sind, vorher durch verschiedene Verfahren hergestellt werden und für die Durchführung des Versuches verfügbar sein. Falls in den ausgewählten Proben das gesuchte Protein vorhanden ist, wird es durch die auf die Träger angebrachten spezifischen Antikörper gebunden und immobilisiert. In einem weiteren Schritt bindet ein zweiter Antikörper an eine andere freie Stelle des Antigens, wodurch ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Dieser zweite Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, wodurch eine Reaktion ausgelöst wird, welche zu einer messbaren Farbänderung führt.

Zunächst wurde der Boden von einer 96 Well-Platte mit dem Primären-Antikörper beschichtet. Dieser Antikörper war spezifisch für VEGF-A, welcher in einer Konzentration von 180µg/ml vorlag. Er wurde in 1ml PBS-Puffer verdünnt und je 100µl des homogenen Gemisches auf die gewünschte Anzahl der Wells pipettiert. Um eine Evaporation zu verhindern, wurde die beschichtete Platte abgedichtet. Damit sich der Antikörper fest am Boden der Wells befestigen konnte (coating), wurde er über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte 4 Mal mit Wasch-Puffer 0,05% Tween 20, in PBS-Puffer, pH7,4 gewaschen. Eine komplette Entfernung der Flüssigkeiten nach jedem durchgeführten Schritt war erforderlich, um ein gutes Resultat zu erzielen, dazu klopfte man die umgedrehten Platten nach jedem Waschschrift auf einem sauberen Papier aus. Nach dem letzten Waschschrift und Entfernung der restlichen Flüssigkeit von den Wells wurden die Platten mit 300µl/Well 10 Fach verdünntem *Reagent diluent* in Aqua destillata beschichtet. Dieser Schritt war notwendig, um ein Binden der später zugeführten Antigene oder anderer Störsubstanzen an freien Arealen zwischen den Antikörpern und eine damit verbundene Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern (*blocking*). Geblockt wurde für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Der oben erklärte Waschschrift wurde wiederholt und anschließend wurden die Platten mit den Standards und Proben beschichtet. Für die Standard-Reihe wurde ein Doppelansatz und für die gewünschten Proben ein Dreier- oder Viereransatz mit je 100µl/Well angesetzt. Die Platte wurde abgedichtet und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert. Dadurch konnte der Antikörper die gewünschten Antigene binden. Die Platten wurden daraufhin wie oben beschrieben gewaschen und anschließend 100µl/Well des in *Reagent Diluent* diluierten sekundären Antikörpers (*detection antibody*), welcher mit Biotin versetzt war, hinzu pipettiert. Die Platte wurde ein weiteres Mal abgedichtet und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert. Auf diese Weise konnte der sekundäre Antikörper an eine weitere freie Bindung des Antigens binden. Die Platten wurden erneut gewaschen und 100µl *Streptavidin-HRP*, welches in *Reagent diluent* zu 1:200 diluiert war, in jedes Well pipettiert. Um eine Koppelung von *Streptavidin-HRP* an den sekundären Antikörper zu ermöglichen, wurde die Lösung für 30 Minuten auf dem zuvor gebildeten „*Sandwich*“, bestehend aus primären Antikörper, Antigen und sekundären Antikörper, bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. *Streptavidin* weist eine sehr hohe Affinität für Biotin auf, wodurch es an den mit Biotin versetzten sekundären Antikörper band. Die Meerrettich-Peroxidase (HRP) ist ein häufig

benutztes Enzym, um Substrate zu modifizieren. Dieser Modifizierungsvorgang stellt sich in einer Verfärbung der Lösung dar. Der Waschschrift wurde ein letztes Mal durchgeführt und pro Well 100µl einer Detektion-Substrat-Lösung, bestehend aus einer 1:1 Mischung aus *Color Reagent A* (H₂O₂) und *Color Reagent B* (TMB), hinzu pipettiert. Die Mischung wurde 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 50µl/Well einer *Stop Solution*, welche die enzymatische Reaktion des Detektions-Vorganges unterbricht, wurde eine Verfärbung von blau zu gelb erreicht. Die optische Densität von jedem Well wurde anschließend mit dem ELISA-Reader gemessen und ausgewertet.

6.5.1 Protein-Expression von VEGF-A unter Normoxie- und Hypoxie Bedingungen

Um die Protein-Expression von VEGF-A zu untersuchen, wurden U87 Zellen und IEC787 Zellen für jeweils 24 Stunden, 72 Stunden und 7 Tage unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen mit FCS-freiem Medium inkubiert. Für jeden der oben genannten Zeitpunkte wurden je 500.000 Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde das Medium abpipettiert und der Gehalt von VEGFA mittels ELISA ermittelt.

6.6 Sphäroid Assay

Um das Wachstumsverhalten von isolierten humanen Endothelzellen innerhalb einer dreidimensionalen Matrix zu untersuchen, wurden Sphäroide mithilfe der „Liquid-Overlay“-Technik kultiviert. Dazu wurden 96-Well-Platten mit Agar beschichtet. Unter Zugabe von 0,5g Agar Noble in 50ml DMEM ohne Zusätze wurde die Mischung langsam in der Mikrowelle erhitzt, bis das Agar vollständig gelöst vorlag. Von diesem Gemisch wurden anschließend zügig je 60µl/Well in die Platten pipettiert. Nachdem die Beschichtung unter sterilen Bedingungen fest geworden war, wurden die Platten mit Alufolie bedeckt und im Kühlschrank bei 4°C über Nacht, mit den Öffnungen der Wells nach unten schauend, platziert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit PBS gewaschen und 5000 Zellen/well in je 100µl DMEM ausgesät. Die Zellen wurden anschließend bis zur vollständigen Ausbildung des Sphäroids im Normoxie- bzw. Hypoxie-Brutschrank inkubiert. Zusätzlich wurden die Platten, in denen anschließend die Sphäroide migrieren sollten, präpariert. Hierzu wurden die 24-Well-Platten mit je 400µl/Well einer Lösung bestehend aus 12ml Kollagen + 1,5ml 0,1 mol NaOH + 1,5ml 10xPBS (pH 7,4), beschichtet. Die Platten wurden mit Tesafilm luftdicht

verschlossen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C platziert. Am nächsten Tag wurden die ausgebildeten Sphäroide von den Agar-Platten gelöst, jedes Sphäroid wurde dazu mit einer Pipette aufgenommen und auf ein Well der Kollagen-Platten übertragen. Anschließend wurden nochmal 400µl/Well, der zuvor benutzen Kollagen-Lösung, auf die Sphäroide pipettiert und die Platten in den jeweiligen Brutschrank zur Inkubation wieder zurück platziert.

6.6.1 Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren auf die Migration aus den Sphäroiden bei Hypoxie präkonditionierten Zellen

Um den Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf das Migrationsverhalten der Zellen aus den Sphäroiden unter Hypoxie präkonditionierten Zellen zu untersuchen, wurden Sphäroide aus IEC787, welche für 72 Stunden unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen inkubiert wurden, generiert. Diese Zellen wurden nach Ausbildung des Sphäroides mit einer Pipette aufgenommen und auf mit Kollagen beschichtete Platten übertragen. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Sphäroid ohne Zugabe eines VEGFs belassen. Den restlichen Sphäroiden wurde jeweils VEGF-A 100ng/ml, VEGF-C 200ng/ml, VEGF-D 200ng/ml oder VEGF-C156 250ng/ml hinzugefügt. Die Sphäroide wurden anschließend für 72 Stunden in dem jeweiligen Brutschrank inkubiert. Um das Migrationsverhalten der unterschiedlich behandelten Zellen beurteilen zu können, wurden nach Ablauf der 72 Stunden Fotos der Sphäroide unter dem Lichtmikroskop gemacht.

6.6.2 Einfluss von VEGFR-2- und VEGFR-3-Inhibition auf die Migration aus den Sphäroiden bei Hypoxie präkonditionierten Zellen

Um den Einfluss von VEGFR-2- und VEGFR-3-Inhibition auf die Migration aus den Sphäroiden bei Hypoxie präkonditionierten Zellen zu untersuchen wurden Sphäroide aus IEC787, welche für 72 Stunden unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen inkubiert wurden, generiert. Diese Zellen wurden nach Ausbildung des Sphäroides auf Platten, welche mit Kollagen beschichtet waren, übertragen. Einige Wells der Platten waren ausschließlich mit der Kollagenlösung zur Kontrolle beschichtet, andere wurden zusätzlich noch mit Tyrphostin 5µM (VEGFR-2-Inhibitor) und MAZ51 7µM (VEGFR-3-Inhibitor) versetzt. Die Sphäroide wurden anschließend für 48 Stunden, 72 Stunden und 7 Tage wieder in den jeweiligen Brutschrank zurück platziert und dort inkubiert. Um das Migrationsverhalten der

unterschiedlich behandelten Zellen zu den oben genannten Zeitpunkten beurteilen zu können, wurden Fotos der Sphäroide unter dem Lichtmikroskop gemacht.

6.7 Auswertung der Western Blots und RT-PCRs mittels Image J

Die Versuchsansätze in dieser Arbeit wurden jeweils zwei bis drei Mal unabhängig voneinander wiederholt. Die PCR-Gele und die Western Blots wurden abfotografiert und die Densitometrie der Banden anschließend mittels dem Image J Programm quantifiziert. Die Werte für die untersuchten Faktoren unter Normoxie und Hypoxie wurden auf die jeweilige Expression des Housekeeping-Genes β -Actin bezogen. Berechnet wurde anschließend das Verhältnis der unterschiedlichen Faktoren-Expression unter hypoxischen Bedingungen zu der Faktoren-Expression unter normoxischen Bedingungen. Dazu wurde die Normoxie Bande als 100% Wert definiert und ins Verhältnis zur Hypoxie Bande gesetzt. Die Standardabweichung (SD) wurde bestimmt und die Signifikanz (p) mittels t-Test berechnet.

6.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test in MS Excel Student's und SPSS Programm. Die Signifikanzgrenze für die berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit (p) wurde als $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,005$ und $p^{***} < 0,0005$ definiert.

7 Ergebnisse

7.1 Einfluss von Hypoxie-Dauer und Hypoxie-Präkonditionierung auf das Proliferationsverhalten von Tumor- und humanen isolierten Endothelzellen

Um den Einfluss von extrem hypoxischen Bedingungen auf die Proliferation zu untersuchen, wurden die Zellen in einem Zeitraum von 24 Stunden bis zu 7 Tagen unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen kultiviert und die Proliferation zu verschiedenen Zeitpunkten mittels dem SRB-Test gemessen. Anschließend wurde ein Versuch durchgeführt, in welchem die Zellen vor der Ausplattierung für 14 Tage in Normoxie und Hypoxie präkonditioniert wurden, um dann für sieben weitere Tage sowohl im Ursprungsbrutschrank sowie im jeweils gegenteiligen Brutschrank weiter zu proliferieren. Ziel war die Untersuchung des Proliferationsverhaltens von Zellen, welche unter hypoxischen Bedingungen kultiviert und anschließend unter normoxischen Bedingungen weiter kultiviert wurden und umgekehrt.

7.1.1 Einfluss von Hypoxie-Dauer auf das Proliferationsverhalten von U87 und IEC771

Um den Einfluss der Hypoxie-Dauer auf das Proliferationsverhalten von U87 und IEC771 zu untersuchen, wurden die Zellen ohne vorherige Präkonditionierung ausgesät und deren Proliferation nach 24 Stunden (als Kontrollwert), 72 Stunden und 7 Tage mittels SRB-Assay gemessen. Bei den Tumorzellen U87 und bei den isolierten humanen Endothelzellen 771 (Abbildung 1, Abbildung 2) ist sowohl unter Normoxie- wie auch unter Hypoxie-Bedingungen zwischen der Dauer von 24 bis 72 Stunden eine deutlich höhere Proliferationsrate zu sehen als zwischen der Dauer von 72 Stunden bis 7 Tage. Bei den Tumorzellen U87 sieht man trotz schneller Proliferation unter beiden Bedingungen einen signifikanten Proliferationsunterschied zum Zeitpunkt 72 Stunden und 7 Tage. Zu beiden gemessenen Zeitpunkten proliferieren die Zellen unter Normoxie signifikant schneller als unter extremen Hypoxiebedingungen. Im Gegensatz dazu zeigen die isolierten humanen Endothelzellen 771 zum Kontrollzeitpunkt 24 Stunden eine signifikant höhere Proliferationsrate unter Hypoxie. Während der restlichen Inkubationszeit ist jedoch kein

signifikanter Unterschied im Proliferationsverhalten unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen zu sehen.

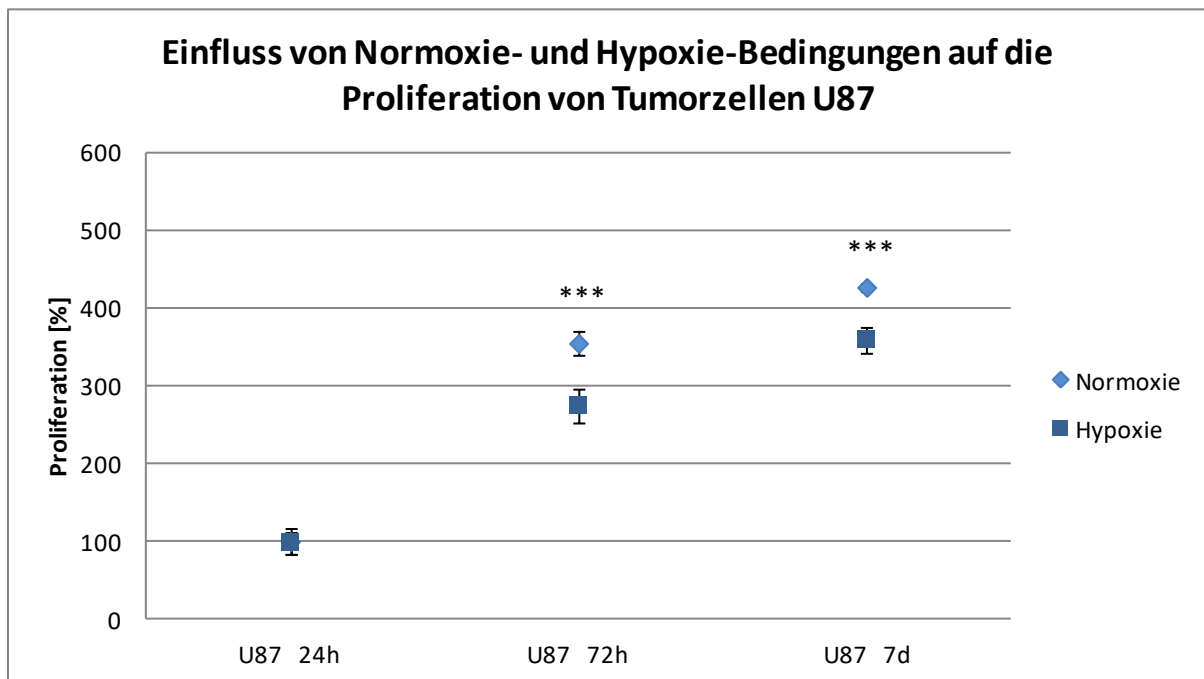


Abbildung 1: SRB-Assay. Einfluss von hypoxischen Bedingungen auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen U87. Die Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen kultiviert und anschließend in gleicher Anzahl in 96 Well-Platten ausgesät und für 24h, 72h und 7d im Normoxie- bzw. im Hypoxie-Brutschrank inkubiert. Das Proliferationsverhalten wurde mittels SRB-Assay gemessen. Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

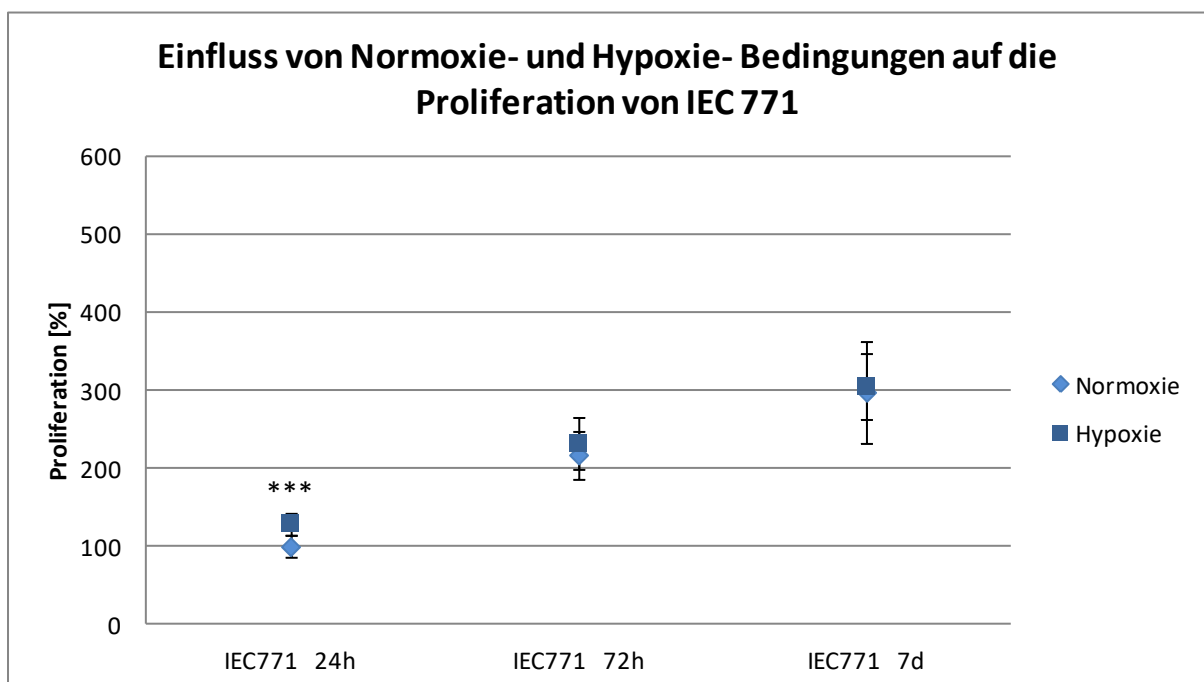


Abbildung 2: SRB-Assay. Einfluss von hypoxischen Bedingungen auf das Proliferationsverhalten von isolierten humanen Endothelzellen 771. Die Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen kultiviert und anschließend in gleicher Anzahl in 96 Well-Platten ausgesät und für 24h, 72h und 7d im Normoxie- bzw. im Hypoxie-Brutschrank inkubiert. Das Proliferationsverhalten wurde mittels SRB-Assay gemessen. Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

7.1.2 Einfluss von 14 Tagen Hypoxie-Präkonditionierung mit anschließender erneuter Kultivierung unter Normoxie-Bedingungen auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen U87 und U251

Um den Einfluss von 14 Tagen Hypoxie-Präkonditionierung mit anschließender erneuter Kultivierung unter Normoxie-Bedingungen auf das Proliferationsverhalten von U87 und U251 zu charakterisieren wurden die Zellen für 14 Tage unter Hypoxiebedingungen präkonditioniert, anschließend ausgesät und inkubiert.

Nach der Aussaat wurde ein Kontrollwert nach 24 Stunden erhoben. Nach Ablauf der sieben Tage wurde bei den Platten das Proliferationsverhalten mittels SRB-Assay gemessen.

Nach 24 Stunden Weiterinkubation im jeweiligen Brutschrank waren keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten zwischen den Zellen, welche unter Normoxie- bzw. Hypoxie-Bedingungen inkubiert wurden, sichtbar (Abbildung 3). Nach einer Dauer von 7 Tagen zeigte sich ein signifikant besseres Proliferationsverhalten der Zellen, welche unter Normoxie inkubiert wurden als der Zellen, welche unter Hypoxie inkubiert wurden. Die Zellen, welche für 14 Tage unter Normoxie und nach der Aussaat weiter in Hypoxie-Bedingungen kultiviert wurden, wiesen ein Proliferationsverhalten auf, welches gleichzusetzen war mit dem Proliferationsverhalten der Zellen, welche sich für die gesamte Versuchszeit über unter Hypoxie-Bedingungen befanden. Anders die Zellen, welche für 14 Tage unter Hypoxie-Bedingungen präkonditioniert und nach der Aussaat in Normoxie-Bedingungen weiter inkubiert wurden. Bei diesem Versuch erholten sich die Zellen von der Hypoxie-Präkonditionierung und proliferierten erneut unter den neuen normoxischen Bedingungen. Dieses Proliferationsverhalten war mit dem Proliferationsverhalten der Zellen, welche sich für die gesamte Versuchszeit über unter Normoxie-Bedingungen befanden, nahezu identisch. Zur Kontrolle wurde der gleiche Versuch mit den Tumorzellen U251 durchgeführt (Abbildung 4). Es zeigte sich eine Übereinstimmung des Proliferationsverhalten mit den U87 Zellen.

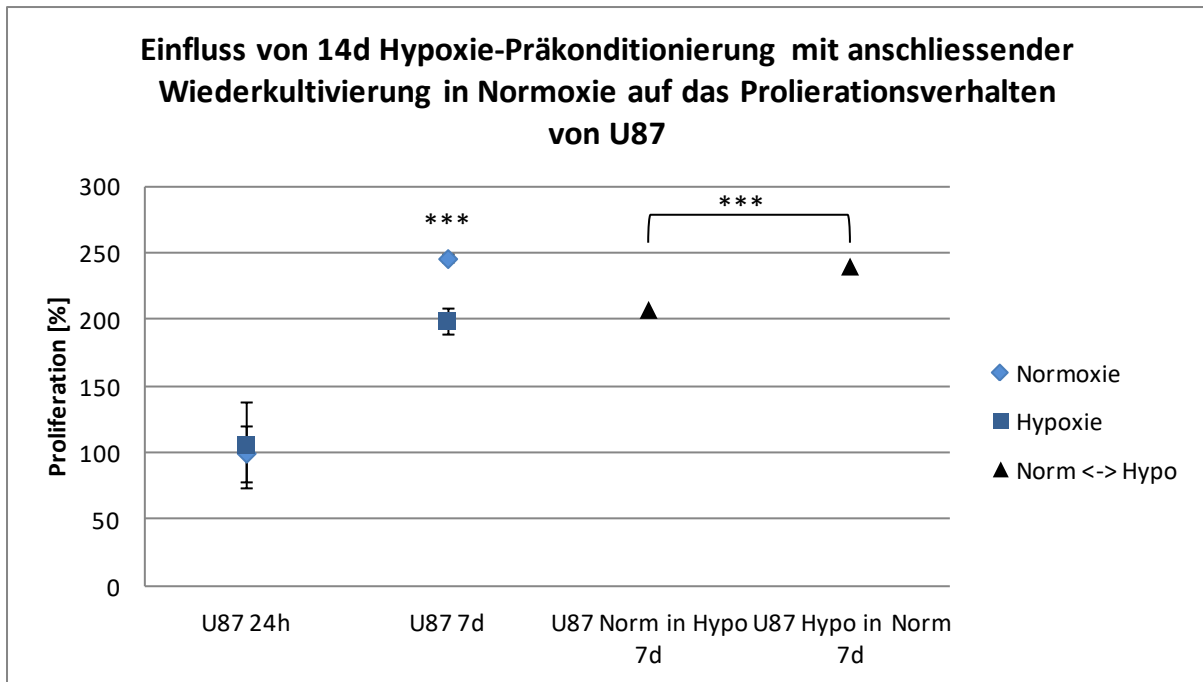


Abbildung 3: SRB-Assay. Einfluss von 14d Hypoxie-Präkonditionierung auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen U87. Die Zellen wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen kultiviert, in gleicher Anzahl in 96 Well-Platten ausgesät und anschließend für 7d im Normoxie- oder im Hypoxie-Brutschrank weiter inkubiert. Das Proliferationsverhalten wurde dann mittels SRB-Assay gemessen. Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

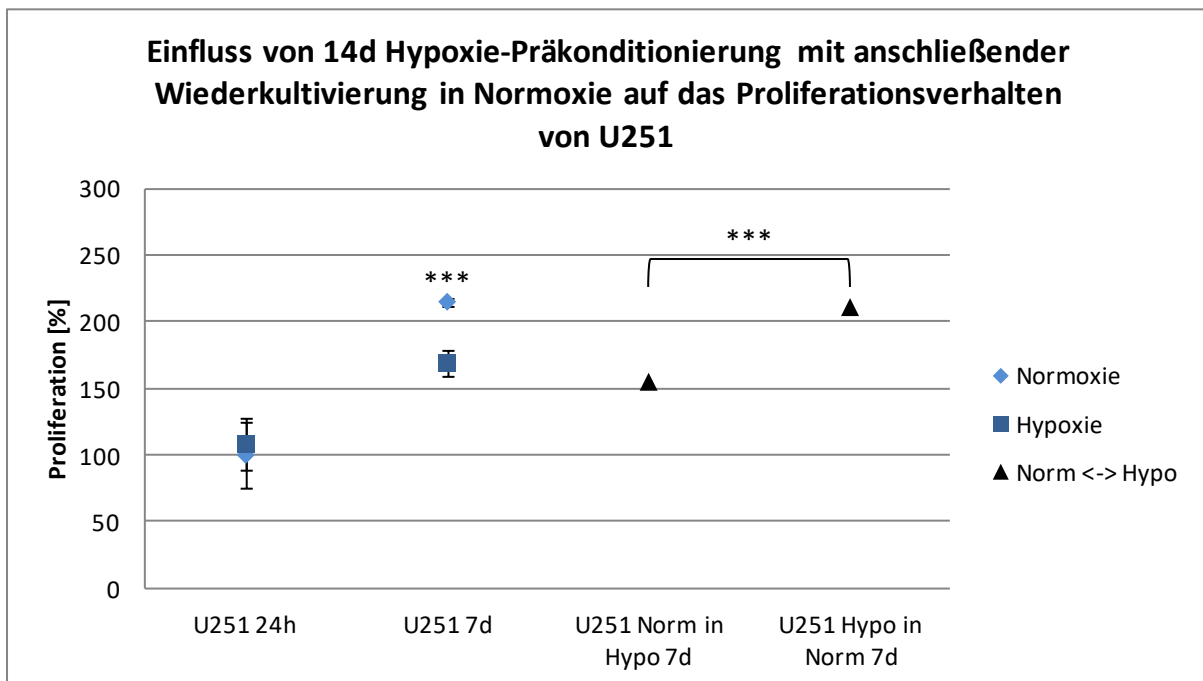


Abbildung 4: SRB-Assay. Einfluss von 14d Hypoxie-Präkonditionierung auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen U251. Die Zellen wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen kultiviert, in gleicher Anzahl in 96 Well-Platten ausgesät und anschließend für 7d im Normoxie- oder im Hypoxie-Brutschrank weiter inkubiert. Das Proliferationsverhalten wurde dann mittels SRB-Assay gemessen. Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

7.2 Expression von VEGFR2, VEGFR3, VEGFA, VEGFC und VEGFD unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen in Tumor- und isolierten humanen Endothelzellen

Um einen Unterschied in der Expression von VEGFR-2, VEGFR-3, VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen festzustellen, wurden Versuche sowohl für Tumor- wie auch für isolierte humane Endothelzellen auf RNA- und Protein-Ebene durchgeführt. Die RNA-Expression wurde mittels RT-PCR, die Protein-Expression mittels Western Blot und die Protein-Sekretion mittels ELISA gemessen.

7.2.1 Einfluss von Hypoxie-Bedingungen auf die Expression von VEGFR-2 und VEGFR-3 in Tumorzellen U87

Zur Untersuchung des Einflusses von Hypoxie-Bedingungen auf die Expression des VEGFR-2 und VEGFR-3 bei den Tumorzellen U87 wurde nach jeweils 24 und 72 Stunden Inkubationszeit die mRNA-Konzentration mittels RT-PCR und die Proteinkonzentration mittels Western Blot ermittelt.

7.2.1.1 Expression von VEGFR-2 in Tumorzellen U87

7.2.1.1.1 mRNA-Expression (RT-PCR)

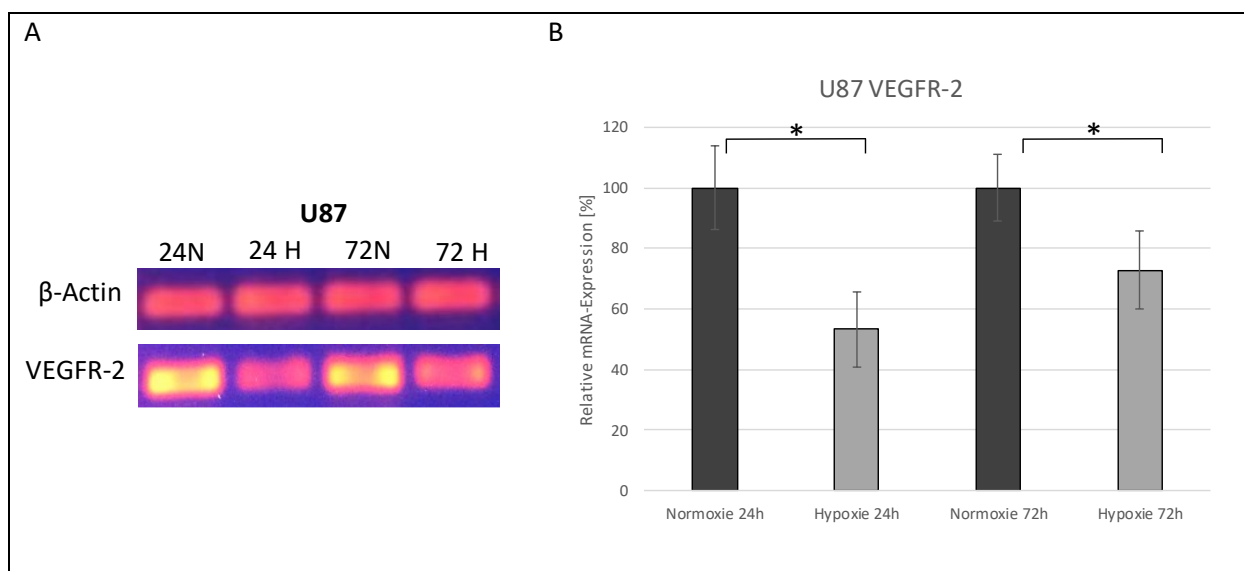


Abbildung 5: RT-PCR der U87 für den VEGFR-2. (A) Exemplarische RT-PCR der Tumorzellen U87 für den VEGFR-2 nach jeweils 24h und 72h Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β -Actin Kontrolle. (B) Relative mRNA-Expression (RT-PCR) von VEGFR-2 in U87 unter Normoxie und Hypoxie zum Zeitpunkt 24h und 72h. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante

Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

Abbildung 5 (B) zeigt die relative mRNA-Expression für den VEGFR-2 der U87 Zellen unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach jeweils 24 und 72 Stunden. Nach Inkubation der U87 Zellen für 24 Stunden hat sich die relative Expression von VEGFR-2 von $100\% \pm \text{SD } 13,77\%$ unter Normoxie auf $53,24\% \pm \text{SD } 12,54\%$ unter Hypoxie verringert ($p < 0,05$). Nach 72 Stunden hat sich die relative Expression von $100\% \pm \text{SD } 11,01\%$ unter Normoxie auf $72,82\% \pm \text{SD } 12,93\%$ unter Hypoxie ebenfalls verringert ($p < 0,05$). Zusammenfassend konnte sowohl nach 24 wie auch nach 72 Stunden eine unter Normoxie signifikant höhere VEGFR-2 Expression nachgewiesen werden.

7.2.1.1.2 Protein-Expression (Western Blot)

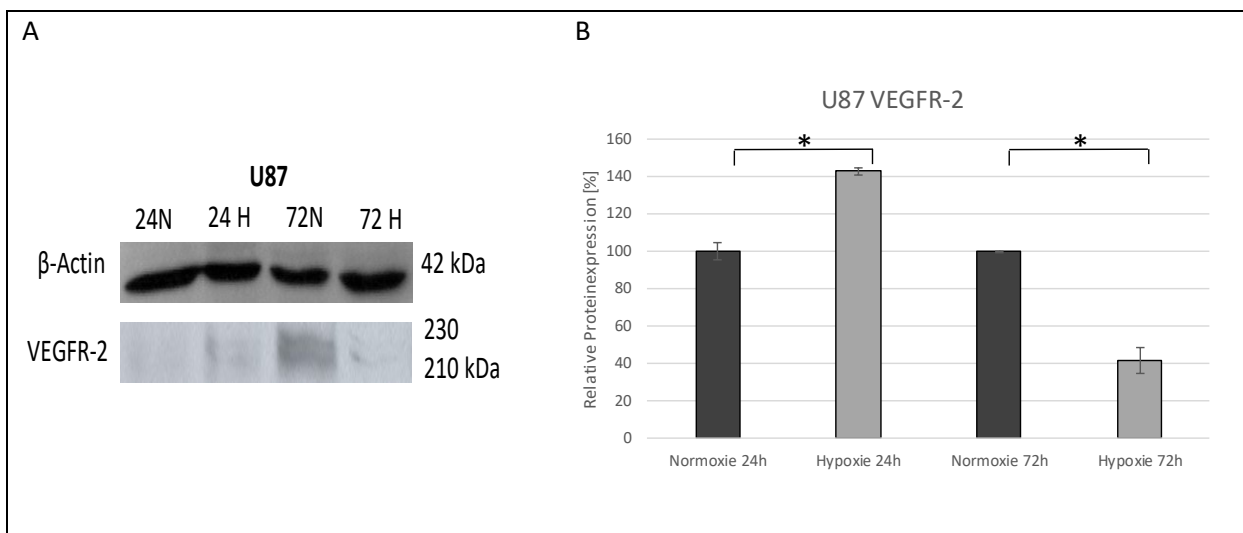


Abbildung 6: WB der U87 für den VEGFR-2. (A) Exemplarischer WB der Tumorzellen U87 für den VEGFR-2 nach jeweils 24h und 72h Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β -Actin Kontrolle. (B) Relative Protein-Expression (Western Blot) von VEGFR-2 in U87 unter Normoxie und Hypoxie zum Zeitpunkt 24h und 72h. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

Abbildung 6 (B) zeigt die relative Protein-Expression für den VEGFR-2 der U87 Zellen unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach jeweils 24 und 72 Stunden. Nach Inkubation der U87 Zellen für 24 Stunden hat sich die relative Expression von VEGFR-2 von $100\% \pm \text{SD } 4,41\%$ unter Normoxie auf $142,66\% \pm \text{SD } 1,94\%$ unter Hypoxie erhöht ($p < 0,05$). Nach 72 Stunden hat sich die relative Expression von $100\% \pm \text{SD } 1,05\%$ unter Normoxie wiederum auf $41,44\% \pm \text{SD } 6,9\%$ unter Hypoxie verringert ($p < 0,05$). Zusammenfassend konnte nach 24 Stunden eine unter Hypoxie signifikant höhere VEGFR-2 Expression nachgewiesen werden und nach 72 Stunden zeigte sich eine signifikant höhere Proteinexpression unter Normoxie.

7.2.1.2 Expression von VEGFR-3 in Tumorzellen U87

7.2.1.2.1 mRNA-Expression (RT-PCR)

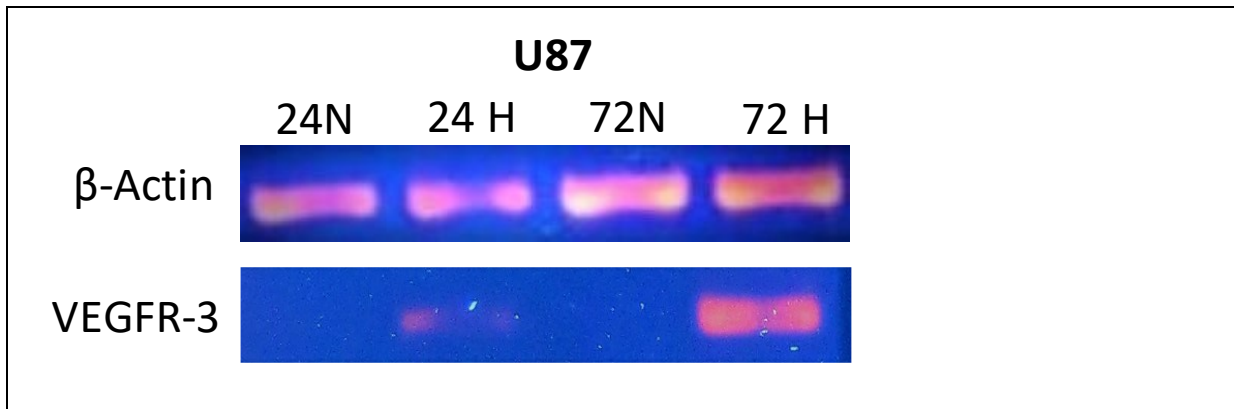


Abbildung 7: Exemplarische RT-PCR der Tumorzellen U87 für den VEGFR-3 nach jeweils 24h und 72h Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β -Actin Kontrolle.

Bei allen drei durchgeführten Versuchen war unter Normoxie keine Bande ersichtlich. Unter Hypoxie war jeweils nach 24h eine schwache Bande erkennbar und nach 72h eine intensive Bande zu sehen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die U87 Tumorzellen zu den gemessenen Zeitpunkten unter Hypoxie VEGFR-3-mRNA exprimieren und unter Normoxie nicht. Eine statistische Auswertung ist wegen nicht vorhandener VEGFR-3 -mRNA unter Normoxie nicht durchführbar.

7.2.1.2.2 Protein-Expression (Western Blot)

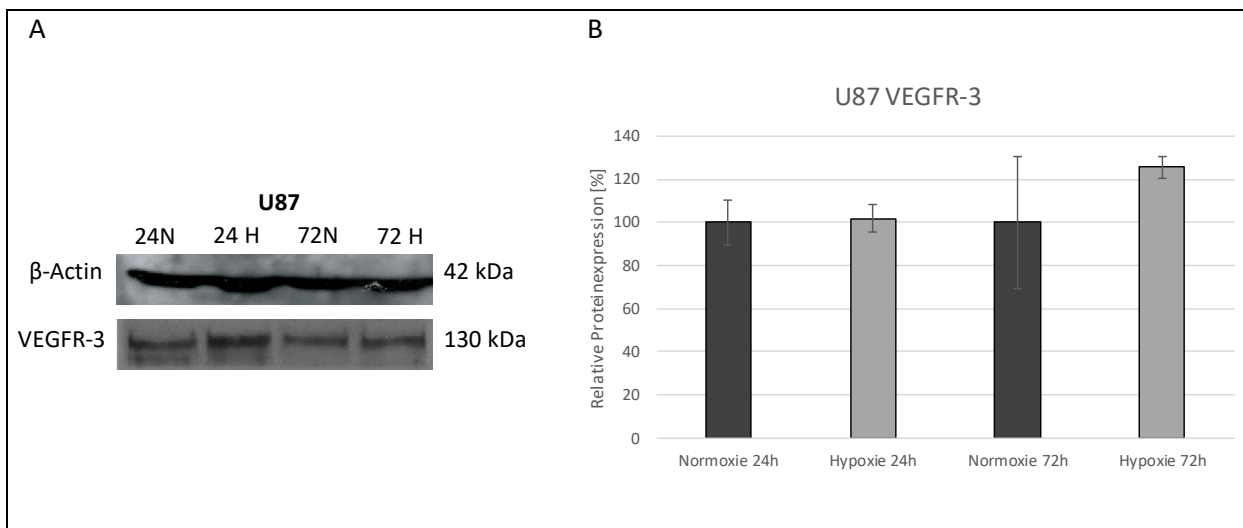


Abbildung 8: WB der U87 für den VEGFR-3. (A) Exemplarischer WB der Tumorzellen U87 für den VEGFR-3 nach jeweils 24h und 72h Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β -Actin Kontrolle. (B) Relative Protein-Expression (Western Blot) von VEGFR-3 in U87 unter Normoxie und Hypoxie zum Zeitpunkt 24h und 72h. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten \pm SD.

Abbildung 8 (B) zeigt die relative Protein-Expression für den VEGFR-3 der U87 Zellen unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach jeweils 24 und 72 Stunden. Nach Inkubation der U87 Zellen für 24 Stunden hat sich kein Unterschied in der relativen Expression des VEGFR-2 unter Normoxie $100\% \pm \text{SD } 10,16\%$ und Hypoxie $101,89\% \pm \text{SD } 6,43\%$ gezeigt. Nach 72 Stunden hat sich ebenfalls kein Unterschied in der relativen Expression unter Normoxie $100\% \pm \text{SD } 30,97\%$ und Hypoxie auf $125,62\% \pm \text{SD } 5,24\%$ gezeigt. Es konnte somit kein signifikanter Unterschied in der VEGFR-3 Expression unter Normoxie vs. Hypoxie nachwiesen werden.

7.2.2 Einfluss von Hypoxie-Bedingungen auf die Expression von VEGFR-2 und VEGFR-3 in isolierten humanen Endothelzellen

Zur Untersuchung des Einflusses von Hypoxie-Bedingungen auf die Expression des VEGFR-2 und VEGFR-3 bei den isolierten humanen Endothelzellen wurde nach jeweils 24 und 72 Stunden Inkubationszeit die mRNA-Konzentration mittels RT-PCR und die Proteinkonzentration mittels Western Blot ermittelt.

7.2.2.1 Expression von VEGFR-2 in isolierten humanen Endothelzellen

7.2.2.1.1 mRNA-Expression (RT-PCR)

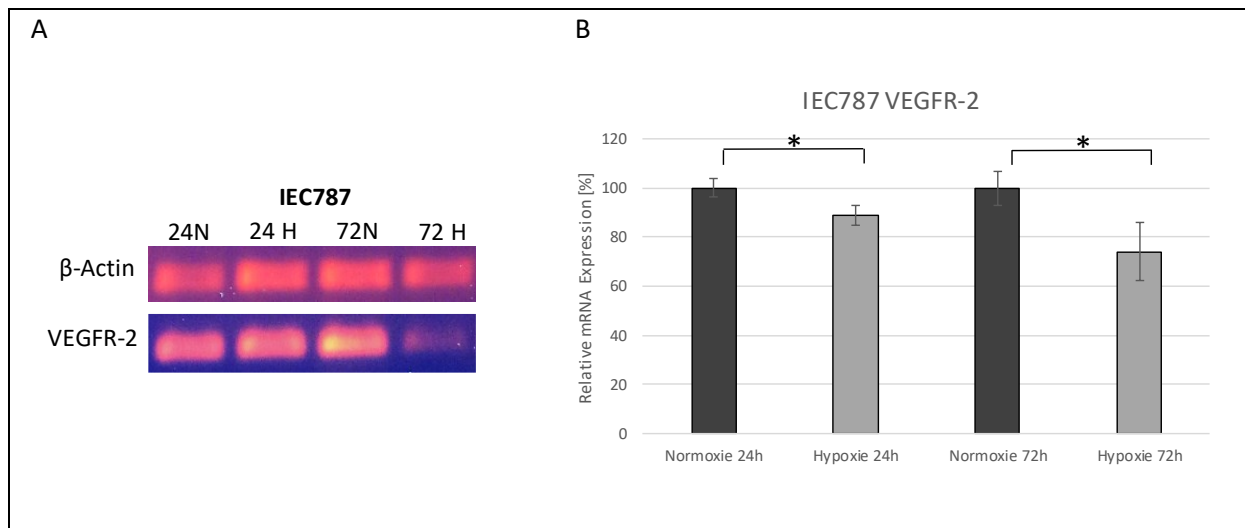


Abbildung 9: RT-PCR der IEC787 für den VEGFR-2. (A) Exemplarische RT-PCR der IEC787 für den VEGFR-2 nach jeweils 24h und 72h Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β-Actin Kontrolle. (B) Relative mRNA-Expression (RT-PCR) von VEGFR-2 in IEC787 unter Normoxie und Hypoxie zum Zeitpunkt 24h und 72h. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

Abbildung 9 (B) zeigt die relative mRNA-Expression für den VEGFR-2 der IEC787 unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach jeweils 24 und 72 Stunden. Nach Inkubation der IEC787 für 24 Stunden hat sich die relative Expression von VEGFR-2 von $100\% \pm \text{SD } 3,76\%$ unter Normoxie auf $89,04\% \pm \text{SD } 4,07\%$ unter Hypoxie verringert ($p < 0,05$). Nach 72 Stunden hat sich die relative Expression von $100\% \pm \text{SD } 6,88\%$ unter Normoxie auf $74,09\% \pm \text{SD } 11,94\%$ unter Hypoxie verringert ($p < 0,05$). Zusammenfassend konnte sowohl nach 24 wie auch nach 72 Stunden eine unter Normoxie signifikant höhere VEGFR-2 Expression nachgewiesen werden.

7.2.2.1.2 Protein-Expression (Western Blot)

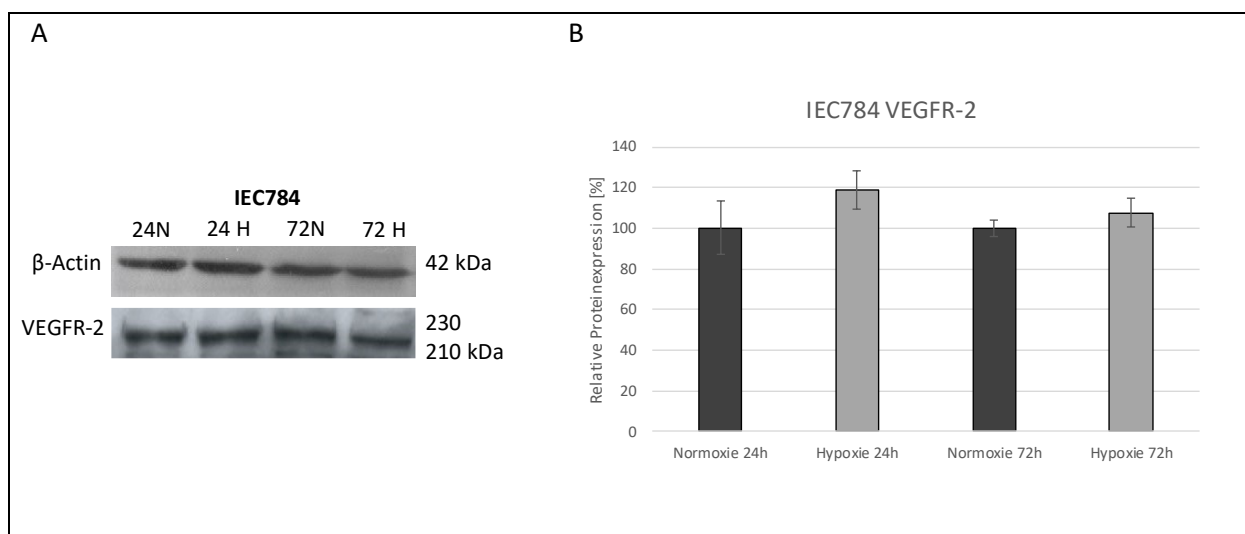


Abbildung 10: WB der IEC784 für den VEGFR-2. (A) Exemplarischer WB der IEC784 für den VEGFR-2 nach jeweils 24h und 72h Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β-Actin Kontrolle. (B) Relative Protein-Expression (Western Blot) von VEGFR-2 in IEC784 unter Normoxie und Hypoxie zum Zeitpunkt 24h und 72h. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

Abbildung 10 (B) zeigt die relative Protein-Expression für den VEGFR-2 der IEC784 unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach jeweils 24 und 72 Stunden. Nach Inkubation der IEC784 für 24 Stunden hat sich die relative Expression von VEGFR-2 von $100\% \pm \text{SD } 13,10\%$ unter Normoxie auf $118,76\% \pm \text{SD } 9,22\%$ unter Hypoxie erhöht ($p = 0,13$). Nach 72 Stunden hat sich die relative Expression von $100\% \pm \text{SD } 4,14\%$ unter Normoxie auf $107,53\% \pm \text{SD } 6,90\%$ unter Hypoxie ebenfalls erhöht ($p = 0,18$). Zusammenfassend konnte kein signifikanter Unterschied in der VEGFR-2 Expression unter Normoxie vs. Hypoxie nachgewiesen werden.

7.2.2.2 Expression von VEGFR-3 in isolierten humanen Endothelzellen

7.2.2.2.1 mRNA-Expression (RT-PCR)

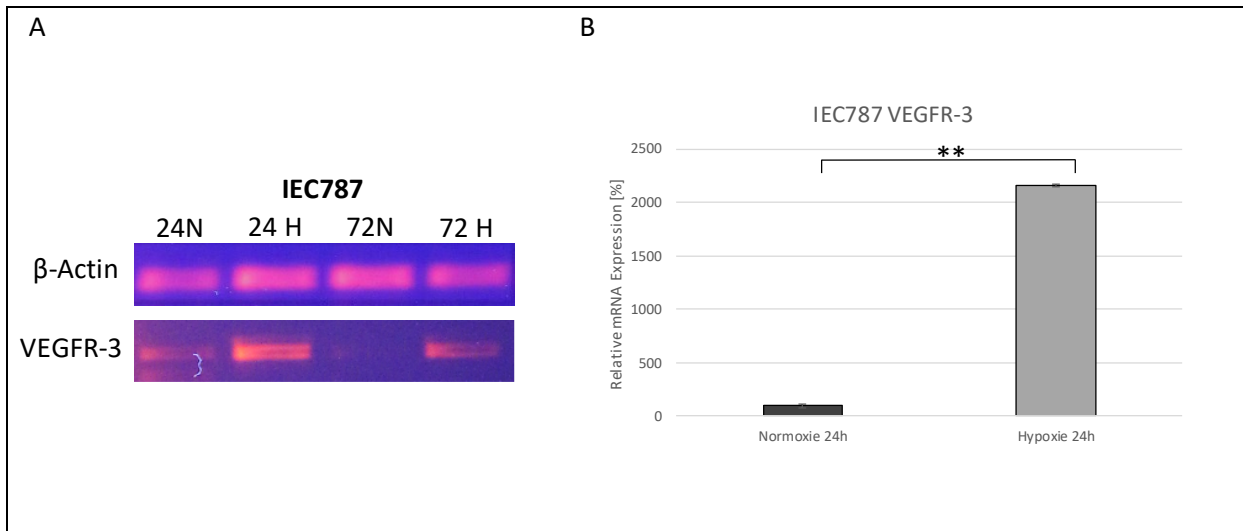


Abbildung 11: RT-PCR der IEC787 für den VEGFR-3. (A) Exemplarische RT-PCR der IEC787 für den VEGFR-3 nach jeweils 24h und 72h Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β -Actin Kontrolle. (B) Relative mRNA-Expression (RT-PCR) von VEGFR-3 in IEC787 unter Normoxie und Hypoxie zum Zeitpunkt 24h und 72h. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

Abbildung 11 (B) zeigt die relative mRNA-Expression für den VEGFR-3 der IEC787 unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach 24 Stunden. Die relative Expression von VEGFR-3 unter Normoxie $100\% \pm \text{SD } 19,77\%$ stieg auf $2163,32\% \pm \text{SD } 19,59\%$ unter Hypoxie ($p < 0,005$). Bei allen drei durchgeführten Versuchen war unter 72h Normoxie keine Bande ersichtlich. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die IEC787 zum gemessenen Zeitpunkt 72h unter Hypoxie VEGFR-3-mRNA exprimieren und unter 72h Normoxie nicht. Eine statistische Auswertung nach 72h ist wegen nicht vorhandener VEGFR-3-mRNA unter Normoxie nicht durchführbar.

7.2.2.2 Protein-Expression (Western Blot)

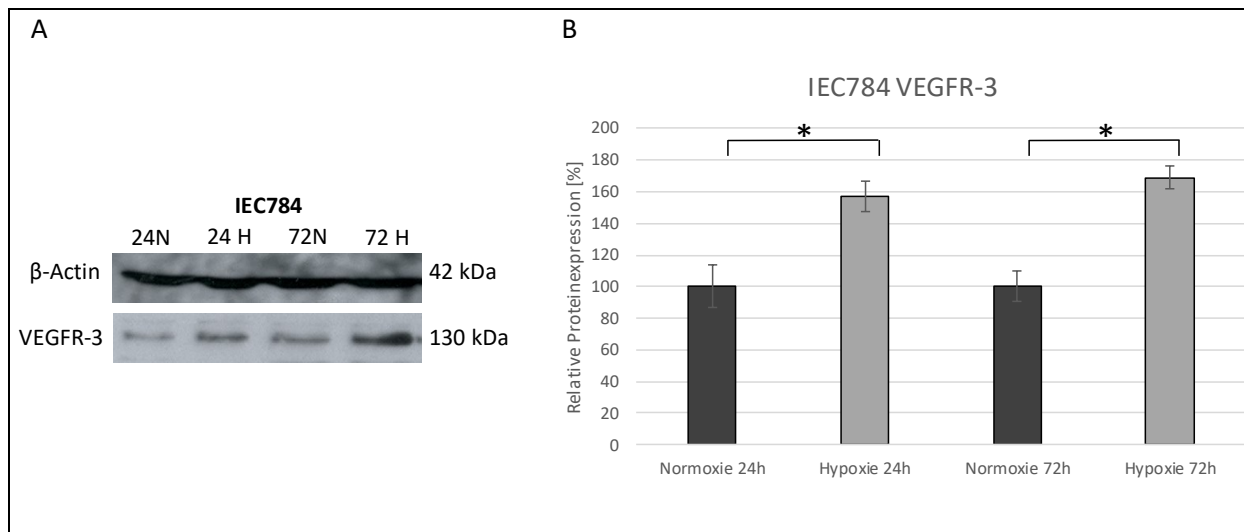


Abbildung 12: WB der IEC784 für den VEGFR-3. (A) Exemplarischer WB der IEC784 für den VEGFR-3 nach jeweils 24h und 72h Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β -Actin Kontrolle. (B) Relative Protein-Expression (Western Blot) von VEGFR-3 in IEC784 unter Normoxie und Hypoxie zum Zeitpunkt 24h und 72h. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* p <0,05; ** p <0,005; *** p <0,0005).

Abbildung 12 (B) zeigt die relative Protein-Expression für den VEGFR-3 der IEC784 unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach jeweils 24 und 72 Stunden. Nach Inkubation der IEC784 für 24 Stunden hat sich die relative Expression von VEGFR-3 von 100% \pm SD 13,44% unter Normoxie auf 157,07% \pm SD 9,37% unter Hypoxie erhöht (p <0,05). Nach 72 Stunden hat sich die relative Expression von 100% \pm SD 9,80% unter Normoxie auf 168,92% \pm SD 7,40% unter Hypoxie ebenfalls erhöht (p <0,05). Zusammenfassend konnte sowohl nach 24 wie auch nach 72 Stunden eine unter Hypoxie signifikant höhere VEGFR-2 Expression nachgewiesen werden.

7.2.3 Einfluss von Hypoxie-Bedingungen auf die Expression und Sekretion verschiedener VEGFs in Tumorzellen U87

Anschließend wurde bei den Tumorzellen U87 untersucht, ob ein Expressions-Unterschied in den Wachstumsfaktoren VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen vorhanden war. Dies wurde auf RNA-Ebene mittels RT-PCR und für die Protein-Sekretion mittels ELISA getestet. Beide Versuche wurden nach 24 Stunden und 72 Stunden Inkubationszeit durchgeführt. Für den ELISA Versuch wurden die Zellen noch zusätzlich für 7 Tage inkubiert.

7.2.3.1.1 mRNA-Expression (RT-PCR)

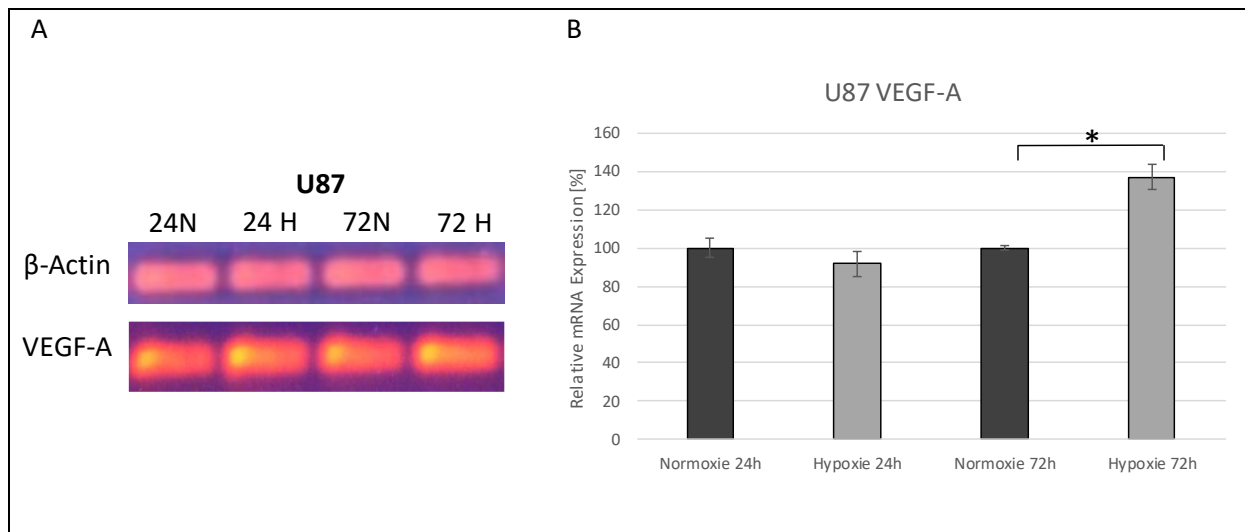


Abbildung 13: RT-PCR der U87 für den VEGF-A. (A) Exemplarische RT-PCR der Tumorzellen U87 für den VEGF-A nach jeweils 24h und 72h Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β -Actin Kontrolle. (B) Relative mRNA-Expression (RT-PCR) von VEGF-A in U87 unter Normoxie und Hypoxie zum Zeitpunkt 24h und 72h. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

Abbildung 13 (B) zeigt die relative mRNA-Expression für den VEGF-A der U87 Zellen unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach jeweils 24 und 72 Stunden. Nach Inkubation der U87 Zellen für 24 Stunden hat sich die relative Expression von VEGF-A von 100% \pm SD 5,15% unter Normoxie auf 91,68% \pm SD 6,56% unter Hypoxie verringert ($p = 0,07$). Nach 72 Stunden hat sich die relative Expression von 100% \pm SD 1,10% unter Normoxie auf 136,97% \pm SD 6,36% unter Hypoxie erhöht ($p < 0,05$). Zusammenfassend konnte nach 24 Stunden kein signifikanter Unterschied in der VEGF-A Expression unter Normoxie vs. Hypoxie gezeigt werden. Nach 72 Stunden zeigte sich allerdings unter Hypoxie eine signifikant höhere VEGF-A Expression als unter Normoxie.

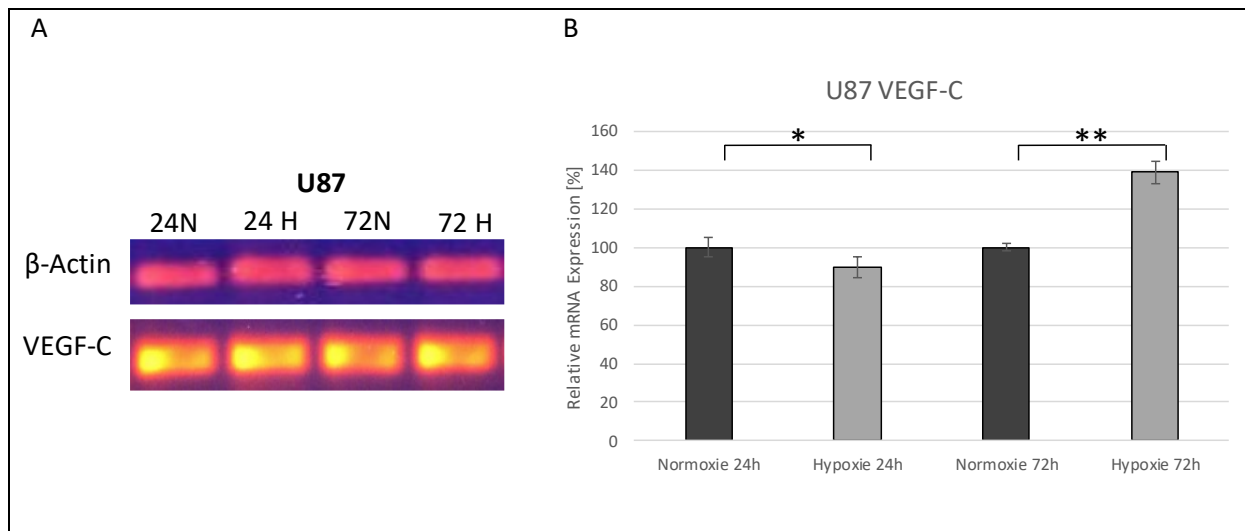


Abbildung 14: RT-PCR der U87 für den VEGF-C. (A) Exemplarische RT-PCR der Tumorzellen U87 für den VEGF-C nach jeweils 24h und 72h Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β -Actin Kontrolle. (B) Relative mRNA-Expression (RT-PCR) von VEGF-C in U87 unter Normoxie und Hypoxie zum Zeitpunkt 24h und 72h. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* p <0,05; ** p <0,005; *** p <0,0005).

Abbildung 14 (B) zeigt die relative mRNA-Expression für den VEGF-C der U87 Zellen unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach jeweils 24 und 72 Stunden. Nach Inkubation der U87 Zellen für 24 Stunden hat sich die relative Expression von VEGF-C von 100% \pm SD 4,75% unter Normoxie auf 89,61% \pm SD 5,23% unter Hypoxie verringert (p <0,05). Nach 72 Stunden hat sich die relative Expression von 100% \pm SD 2,09% unter Normoxie auf 138,79% \pm SD 5,63% unter Hypoxie erhöht (p <0,005). Zusammenfassend konnte nach 24 Stunden eine signifikant höhere VEGF-A Expression unter Normoxie im Vergleich zu Hypoxie nachgewiesen werden und nach 72 Stunden zeigte sich jedoch unter Hypoxie eine signifikant höhere VEGF-C Expression als unter Normoxie.

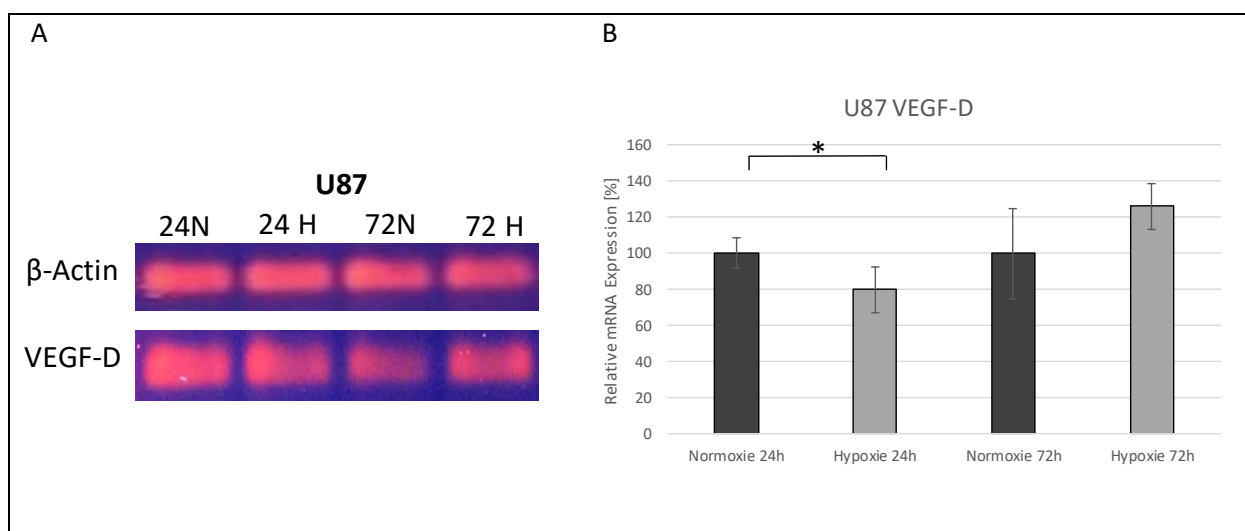


Abbildung 15: RT-PCR der U87 für den VEGF-D. (A) Exemplarische RT-PCR der Tumorzellen U87 für den VEGF-D nach jeweils 24h und 72h Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β -Actin Kontrolle. (B) Relative mRNA-Expression (RT-PCR) von VEGF-D in U87 unter Normoxie und Hypoxie zum Zeitpunkt 24h und 72h. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* p <0,05; ** p <0,005; *** p <0,0005).

Abbildung 15 (B) zeigt die relative mRNA-Expression für den VEGF-D der U87 Zellen unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach jeweils 24 und 72 Stunden. Nach Inkubation der U87 Zellen für 24 Stunden hat sich die relative Expression von VEGF-D von $100\% \pm \text{SD } 8,49\%$ unter Normoxie auf $79,87\% \pm \text{SD } 12,51\%$ unter Hypoxie verringert (p <0,05). Nach 72 Stunden hat sich die relative Expression von $100\% \pm \text{SD } 24,89\%$ unter Normoxie auf $126,15\% \pm \text{SD } 12,87\%$ unter Hypoxie erhöht ($p=0,10$). Zusammenfassend konnte nach 24 Stunden eine signifikant höhere VEGF-D Expression unter Normoxie vs. Hypoxie nachgewiesen werden. Nach 72 Stunden zeigte sich in der VEGF-D Expression kein signifikanter Unterschied.

7.2.3.1.2 Sekretion (ELISA)

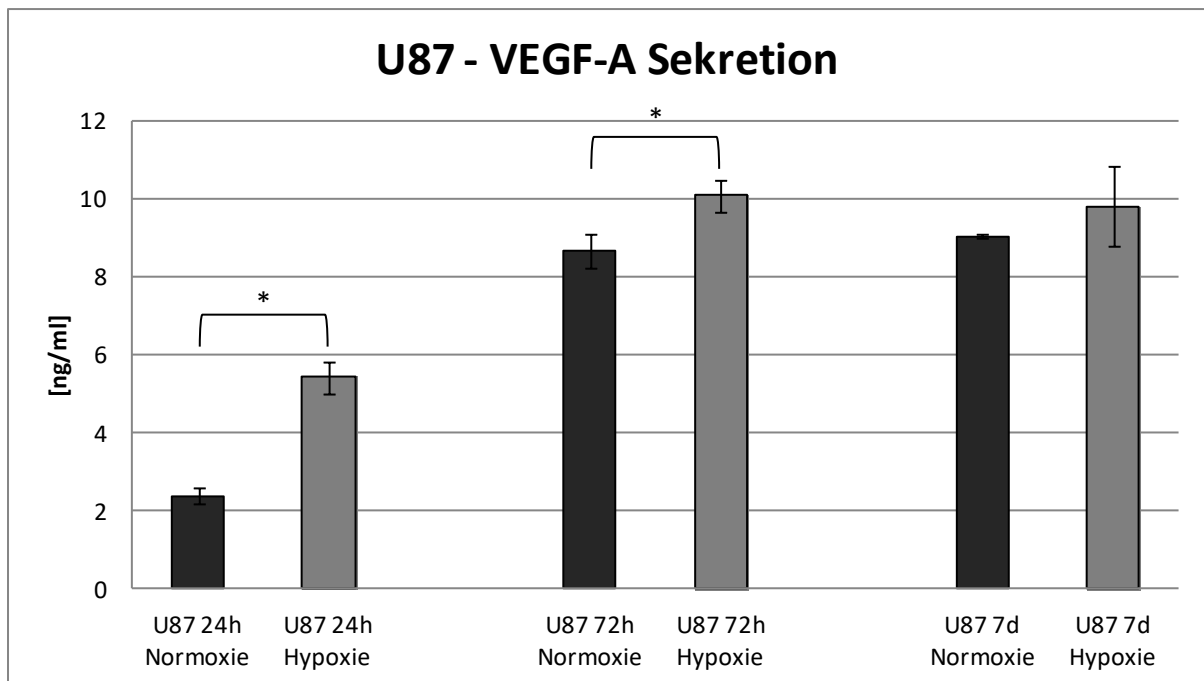


Abbildung 16: ELISA. VEGF-A Sekretion in Tumorzellen U87. Die Zellen wurden für 24h, 72h und 7d in serumfreiem Medium unter Normoxie- und Hypoxie- Bedingungen inkubiert und anschließend die Menge an sekretiertem VEGF-A zu den verschiedenen Zeitpunkten mittels ELISA-Reader gemessen. Die Balken geben die SD an. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* p <0,05; ** p <0,005; *** p <0,0005).

Abbildung 16 zeigt die VEGF-A Sekretion der U87 Zellen unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach 3 verschiedenen Inkubationszeiträumen. Nach 24 Stunden Inkubationszeit war die Konzentration von VEGF-A bei den U87 Zellen unter Normoxie $2,372\text{ng/ml} \pm 0,218\text{ng/ml}$ SD und unter Hypoxie $5,413\text{ng/ml} \pm 0,399\text{ng/ml}$ SD (p <0,05). Nach

72 Stunden Inkubationszeit betrug die Konzentration von VEGF-A unter Normoxie 8,664ng/ml \pm 0,422ng/ml SD und unter Hypoxie 10,06ng/ml \pm 0,432ng/ml SD ($p < 0,05$). Nach 7 Tagen Inkubationszeit betrug die Konzentration von VEGF-A unter Normoxie 9,02ng/ml \pm 0,056ng/ml SD und unter Hypoxie 9,79ng/ml \pm 1,02ng/ml SD ($p > 0,05$). Zusammenfassend konnte nach 24h und 72h eine unter Hypoxie signifikant höhere VEGF-A Sekretion nachgewiesen werden.

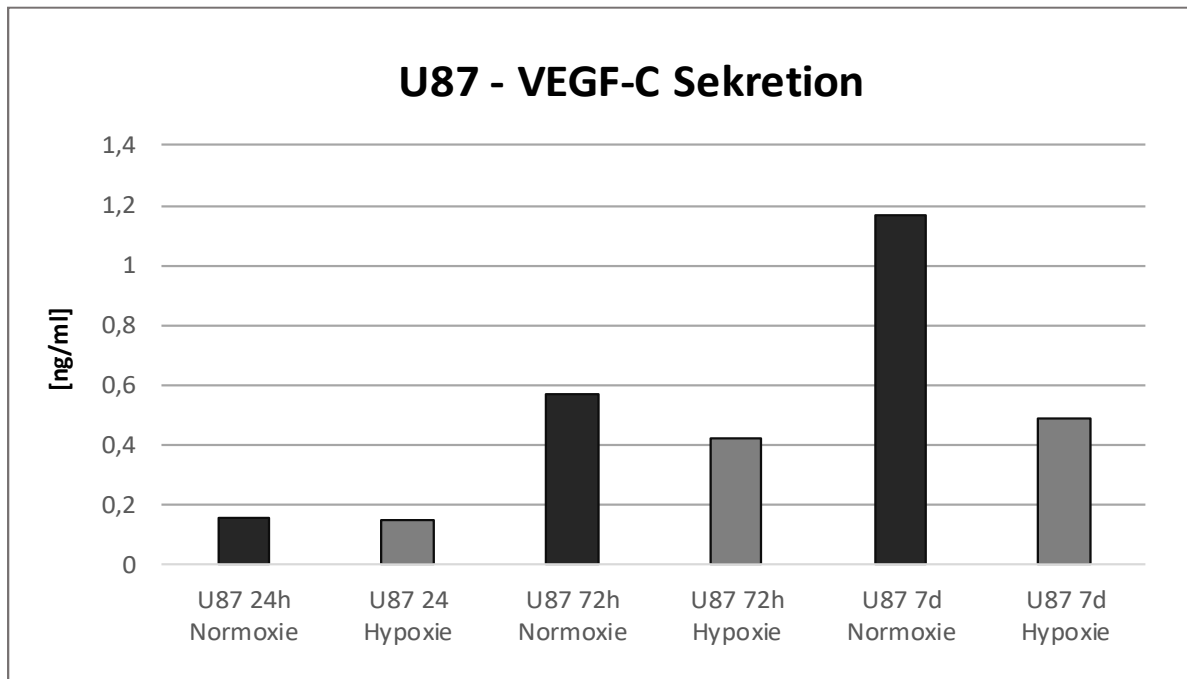


Abbildung 17: ELISA. VEGF-C Sekretion in Tumorzellen U87. Die Zellen wurden für 24h, 72h und 7d in serumfreiem Medium unter Normoxie- und Hypoxie- Bedingungen inkubiert und anschließend die Menge an sekretiertem VEGF-C zu den verschiedenen Zeitpunkten mittels ELISA-Reader gemessen.

Abbildung 17 zeigt die VEGF-C Sekretion der U87 Zellen unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach 3 verschiedenen Inkubationszeiträumen. Der Versuchsansatz wurde nur einmal durchgeführt. Deshalb ist eine statistische Auswertung nicht möglich.

Die VEGF-D Sekretion (Daten hier nicht aufgeführt) hat zu all den gemessenen Zeitpunkten nur eine sehr geringfügige Konzentration ergeben.

7.2.4 Einfluss von Hypoxie-Bedingungen auf die Expression und Sekretion verschiedener VEGFs in isolierten humanen Endothelzellen

Anschließend wurde auch bei den isolierten humanen Endothelzellen 787 untersucht, ob ein Expressionsunterschied in den Wachstumsfaktoren VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen vorhanden war. Dies wurde auf mRNA-Ebene mittels

RT-PCR und für die Protein-Sekretion mittels ELISA getestet. Beide Versuche wurden nach 24 Stunden und 72 Stunden Inkubationszeit durchgeführt. Für den ELISA Versuch wurden die Zellen noch zusätzlich für 7 Tage inkubiert.

7.2.4.1.1 mRNA-Expression (RT-PCR)

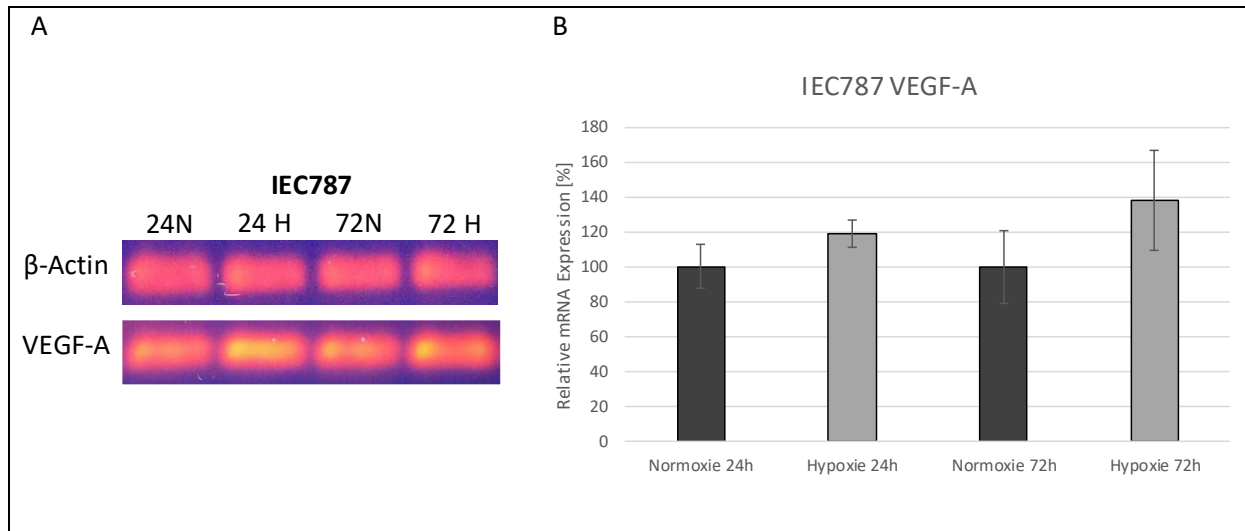


Abbildung 18: RT-PCR der IEC787 für den VEGF-A. (A) Exemplarische RT-PCR der IEC787 für den VEGF-A nach jeweils 24h und 72h Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β-Actin Kontrolle. (B) Relative mRNA-Expression (RT-PCR) von VEGF-A in IEC787 unter Normoxie und Hypoxie zum Zeitpunkt 24h und 72h. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten ± SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,005; ***p<0,0005).

Abbildung 18 zeigt die relative mRNA-Expression für den VEGF-A der IEC787 unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach jeweils 24 und 72 Stunden. Nach Inkubation der IEC787 für 24 Stunden hat sich die relative Expression von VEGF-A von 100% ± SD 12,51% unter Normoxie auf 118,97% ± SD 7,54% unter Hypoxie erhöht (p=0,05). Nach 72 Stunden hat sich die relative Expression von 100% ± SD 20,78% unter Normoxie auf 138% ± SD 28,83% unter Hypoxie erhöht (p=0,11). Zusammenfassend konnte kein signifikanter Unterschied in der VEGF-A Expression unter Normoxie vs. Hypoxie nachgewiesen werden.

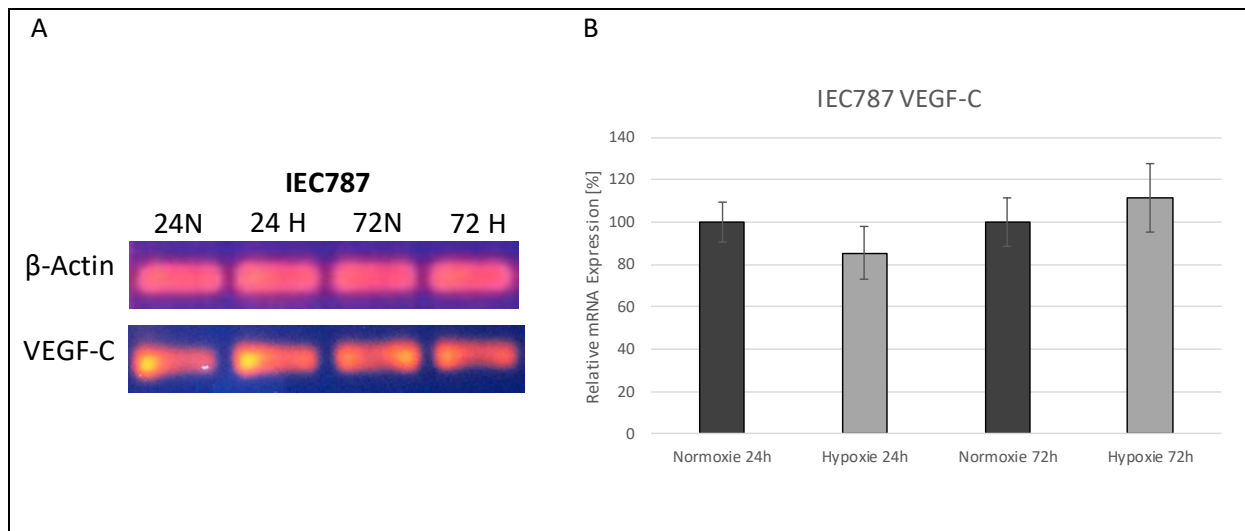


Abbildung 19: RT-PCR der IEC787 für den VEGF-C. (A) Exemplarische RT-PCR der IEC787 für den VEGF-C nach jeweils 24h und 72h Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β -Actin Kontrolle. (B) Relative mRNA-Expression (RT-PCR) von VEGF-C in IEC787 unter Normoxie und Hypoxie zum Zeitpunkt 24h und 72h. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

Abbildung 19 (B) zeigt die relative mRNA-Expression für den VEGF-C der IEC787 unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach jeweils 24 und 72 Stunden. Nach Inkubation der IEC787 für 24 Stunden hat sich die relative Expression von VEGF-C von 100% \pm SD 9,54% unter Normoxie auf 85,43% \pm SD 12,57% unter Hypoxie verringert ($p = 0,07$). Nach 72 Stunden hat sich die relative Expression von 100% \pm SD 11,31% unter Normoxie auf 111,29% \pm SD 16,3% unter Hypoxie erhöht ($p = 0,21$). Zusammenfassend konnte kein signifikanter Unterschied in der VEGF-C Expression unter Normoxie vs. Hypoxie nachwiesen werden.

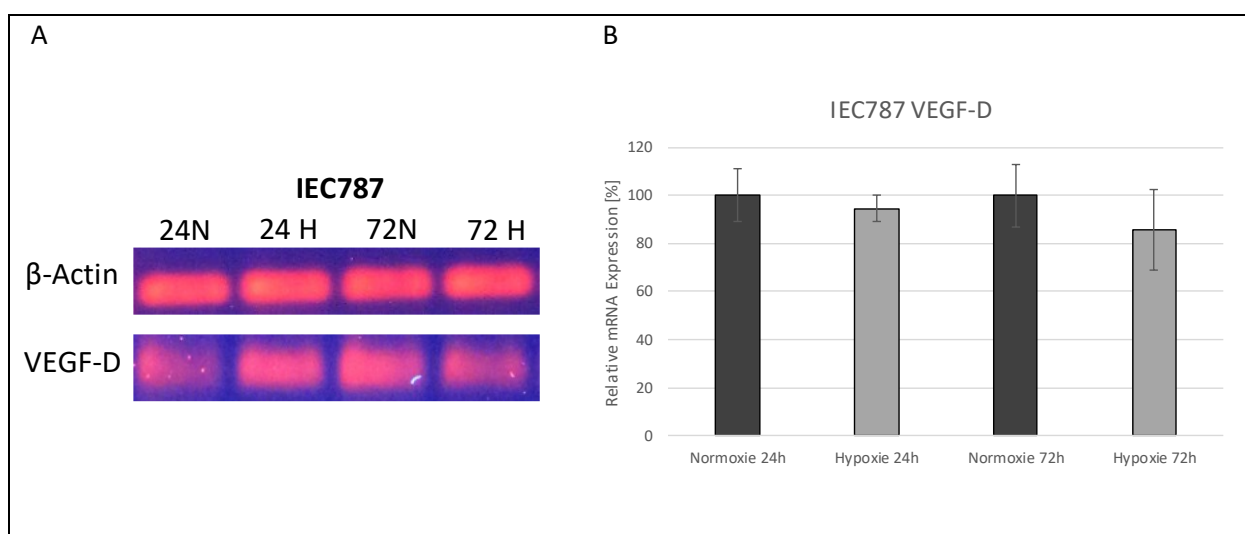


Abbildung 20: RT-PCR der IEC787 für den VEGF-D. (A) Exemplarische RT-PCR der IEC787 für den VEGF-D nach jeweils 24h und 72h Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β -Actin Kontrolle. (B) Relative mRNA-Expression (RT-PCR) von VEGF-D in IEC787 unter Normoxie und Hypoxie zum Zeitpunkt 24h und 72h.

Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

Abbildung 20 (B) zeigt die relative mRNA-Expression für den VEGF-D der IEC787 unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach jeweils 24 und 72 Stunden. Nach Inkubation der IEC787 für 24 Stunden hat sich die relative Expression von VEGF-D von $100\% \pm \text{SD } 10,93\%$ unter Normoxie auf $94,46\% \pm \text{SD } 5,64\%$ unter Hypoxie verringert ($p=0,24$). Nach 72 Stunden hat sich die relative Expression von $100\% \pm \text{SD } 12,96\%$ unter Normoxie auf $85,75\% \pm \text{SD } 16,79\%$ unter Hypoxie verringert ($p=0,13$). Zusammenfassend konnte kein signifikanter Unterschied in der VEGF-D Expression unter Normoxie vs. Hypoxie nachgewiesen werden.

7.2.4.1.2 Sekretion (ELISA)

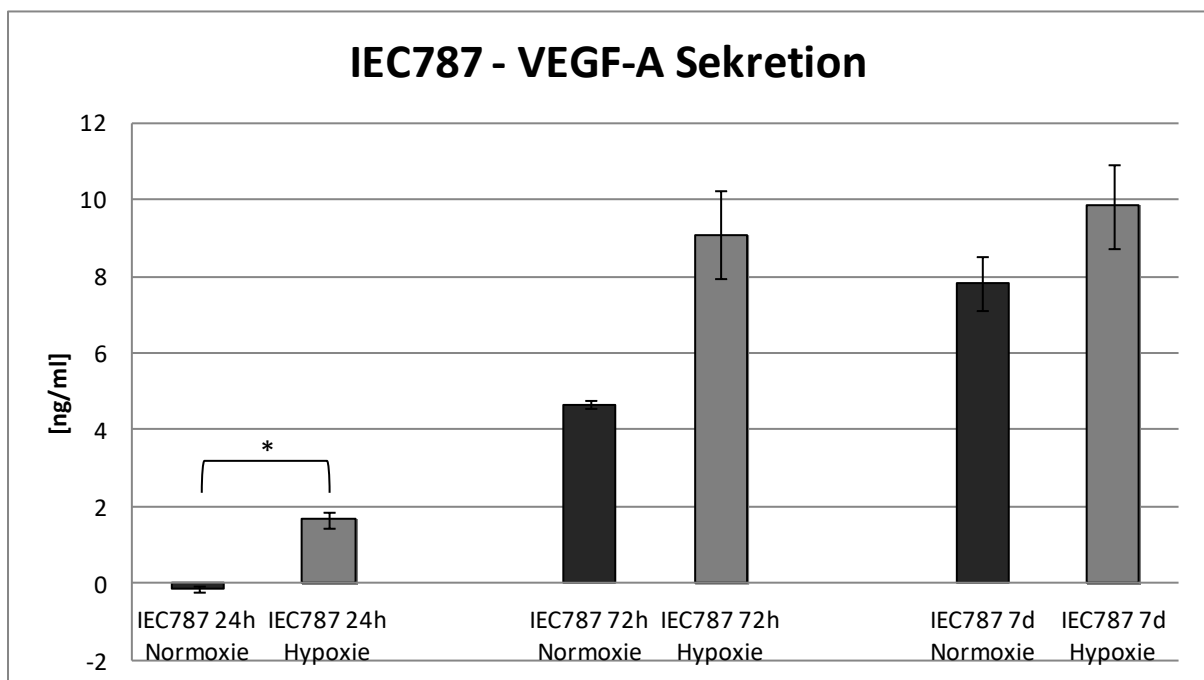


Abbildung 21: ELISA. VEGF-A Sekretion in isolierten humanen Endothelzellen 787. Die Zellen wurden für 24h, 72h und 7d in serumfreiem Medium unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Menge an sekretiertem VEGF-A zu den verschiedenen Zeitpunkten mittels ELISA-Reader gemessen. Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

Abbildung 21 zeigt die VEGF-A Sekretion der isolierten humanen Endothelzellen 787 unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach 3 verschiedenen Inkubationszeiträumen. Die Versuchsansätze wurden jeweils drei Mal unabhängig voneinander wiederholt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit war die Konzentration von VEGF-A bei den isolierten humanen Endothelzellen 787 unter Normoxie $-0,135\text{ng/ml} \pm 0,09\text{ng/ml}$ SD und unter Hypoxie $1,659\text{ng/ml} \pm 0,214\text{ng/ml}$ ($p < 0,05$). Nach 72 Stunden Inkubationszeit betrug die

Konzentration von VEGF-A unter Normoxie $4,668\text{ng/ml} \pm 0,119\text{ng/ml SD}$ und unter Hypoxie $9,084\text{ng/ml} \pm 1,146\text{ng/ml}$ Standardabweichung ($p>0,05$). Nach 7 Tagen Inkubationszeit betrug die Konzentration von VEGF-A unter Normoxie $7,823\text{ng/ml} \pm 0,689\text{ng/ml SD}$ und unter Hypoxie $9,822\text{ng/ml} \pm 1,09\text{ng/ml}$ Standardabweichung ($p>0,05$). Zusammenfassend konnte nur nach 24h eine unter Hypoxie signifikant höhere VEGF-A Sekretion nachgewiesen werden.

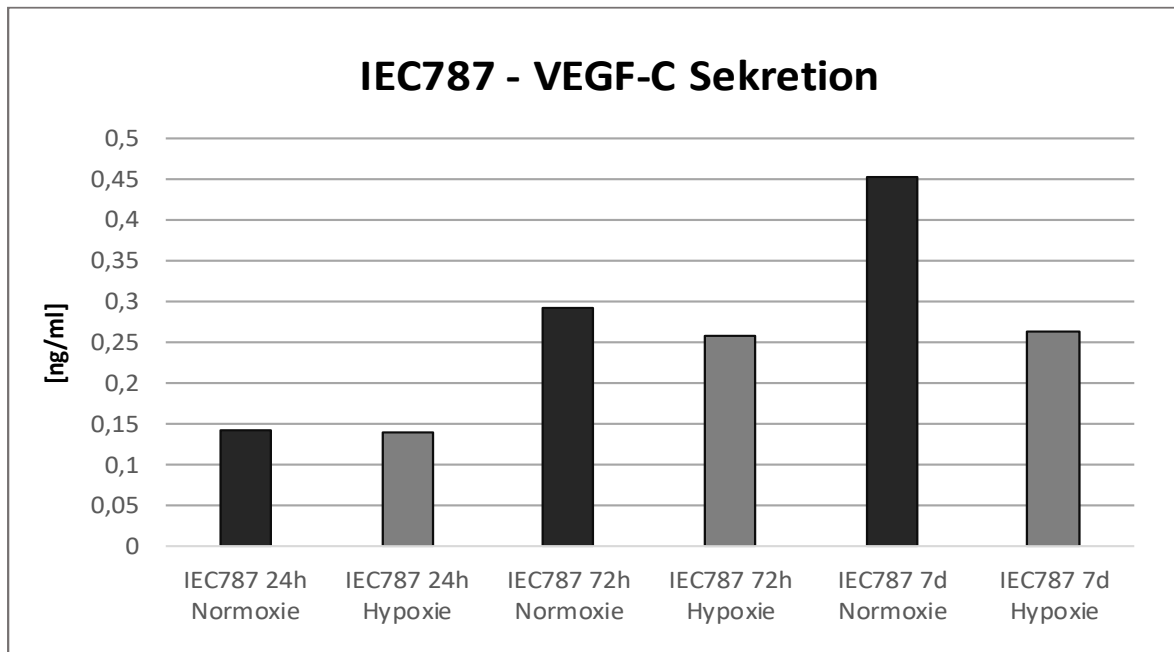


Abbildung 22: ELISA. VEGF-C Sekretion in isolierten humanen Endothelzellen 787 . Die Zellen wurden für 24h, 72h und 7d in serumfreiem Medium unter Normoxie- und Hypoxie- Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Menge an sekretiertem VEGF-C zu den verschiedenen Zeitpunkten mittels ELISA-Reader gemessen.

Abbildung 22 zeigt die VEGF-C Sekretion der isolierten humanen Endothelzellen 787 unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach 3 verschiedenen Inkubationszeiträumen. Der Versuchsansatz wurde nur einmal durchgeführt weshalb eine statistische Auswertung ist nicht möglich.

Die VEGF-D Sekretion (Daten hier nicht aufgeführt) hat zu all den gemessenen Zeitpunkten nur eine sehr geringfügige Konzentration ergeben.

7.3 Einfluss von VEGFs unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf das Migrationsverhalten von Tumor- und isolierten humanen Endothelzellen

Nachdem das Proliferationsverhalten, die Expression von Wachstumsrezeptoren und die Sekretion von Wachstumsfaktoren der Zellen anhand von Versuchen ermittelt wurden, war das Verhalten der Zellen nach zusätzlicher Gabe von verschiedenen Wachstumsfaktoren auf ihr Migrationsverhalten unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen von Interesse. VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-C_{Cys156} wurden für jeweils 72 Stunden eingesetzt. Die Migrationsversuche in dieser Arbeit wurden nur einmal durchgeführt, deshalb ist eine statistische Auswertung nicht möglich.

7.3.1 Einfluss von VEGFs auf die Migration von Hypoxie-Präkonditionierten IEC 787

Abbildung 23 zeigt Sphäroide von IEC 787, welche unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen bis zur vollständigen Ausbildung eines Sphäroides präkonditioniert wurden. Anschließend wurden die Sphäroide für 72 Stunden mit verschiedenen Wachstumsfaktoren im selben Brutschrank wie zuvor weiter inkubiert. Unter Normoxie-Bedingungen wurde nach 72 Stunden Inkubation weder bei der Kontrolle noch bei den Zellen, welche mit den verschiedenen Wachstumsfaktoren versetzt wurden, eine Migration der Zellen festgestellt. Unter Hypoxie erkennt man im Gegensatz dazu eine minimale Migration von einzelnen Zellen aus dem Sphäroid heraus bei den Zellen, welche mit VEGF-A inkubiert wurden. Bei den mit VEGF-D inkubierten Zellen stellt sich ein ähnlicher Effekt ein, jedoch sind es erneut nur wenige Zellen, welche aus dem Sphäroid heraus migrieren. Ganz anders verhalten sich die Zellen, welche mit VEGF-C_{Cys156} inkubiert wurden. Hier sieht man eine deutliche Migration von vielen Zellen aus dem Sphäroid heraus. Bei der Kontrolle und den Zellen, welche mit VEGF-C inkubiert wurden, ist keine Migration zu erkennen.



Abbildung 23: Sphäroid-Assay. Einfluss von VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-C_{Cys156} (ein spezifischer Ligand für VEGFR-3) unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf die Migration von IEC 787 nach 72h Inkubationszeit.

7.4 Einfluss von VEGFR-2- und VEGFR-3-Inhibition unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf das Migrationsverhalten von Tumor- und isolierten humanen Endothelzellen

Zusätzlich zu den bisher genannten Versuchen wurde der Einfluss von VEGFR-2- und VEGFR-3-Inhibition auf das Verhalten der Zellen untersucht. Hierfür wurden Tumorzellen U87 und IEC 787 unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen nach Gabe von Tyrphostin (R2-Inhibitoren) und MAZ51 (R3-Inhibition) auf deren Migrationsverhalten hin geprüft. Die Migrationsversuche in dieser Arbeit wurden nur einmal durchgeführt, weshalb eine statistische Auswertung nicht möglich ist.

7.4.1 Einfluss von 48 Stunden, 72 Stunden und 7 Tage VEGFR-2- und VEGFR-3-Inhibition unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf die Migration von IEC 787

Abbildung 24 zeigt die Sphäroide der Zellen, welche für 48 Stunden unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen mit Tyrphostin bzw. MAZ51 versetzt wurden. Bei der Normoxie-

Kontrolle migrieren die Zellen nach 48 Stunden minimal aus dem Sphäroid heraus. Unter Tyrphostin Gabe, welcher den VEGFR-2 blockiert, wird die Migration der Zellen nicht gehemmt, sondern gefördert. Hierdurch migrieren die Zellen deutlich aus dem Sphäroid heraus. Unter Gabe von MAZ51, welcher den VEGFR-3 blockiert, werden die Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit in ihrer Migration komplett gehemmt, so dass keine Zellen aus dem Sphäroid heraus migrieren. Unter Hypoxie-Bedingungen verhalten sich die Zellen nach 48 Stunden ähnlich. Die Zellen der Kontrollgruppe so wie die Zellen, welche mit Tyrphostin inkubiert wurden, migrieren deutlich aus dem Sphäroid heraus. Die Zellen der Sphäroide, welche mit MAZ51 inkubiert wurden, sind in ihrer Migration gehemmt und migrieren in Folge dessen nicht aus dem Sphäroid heraus.

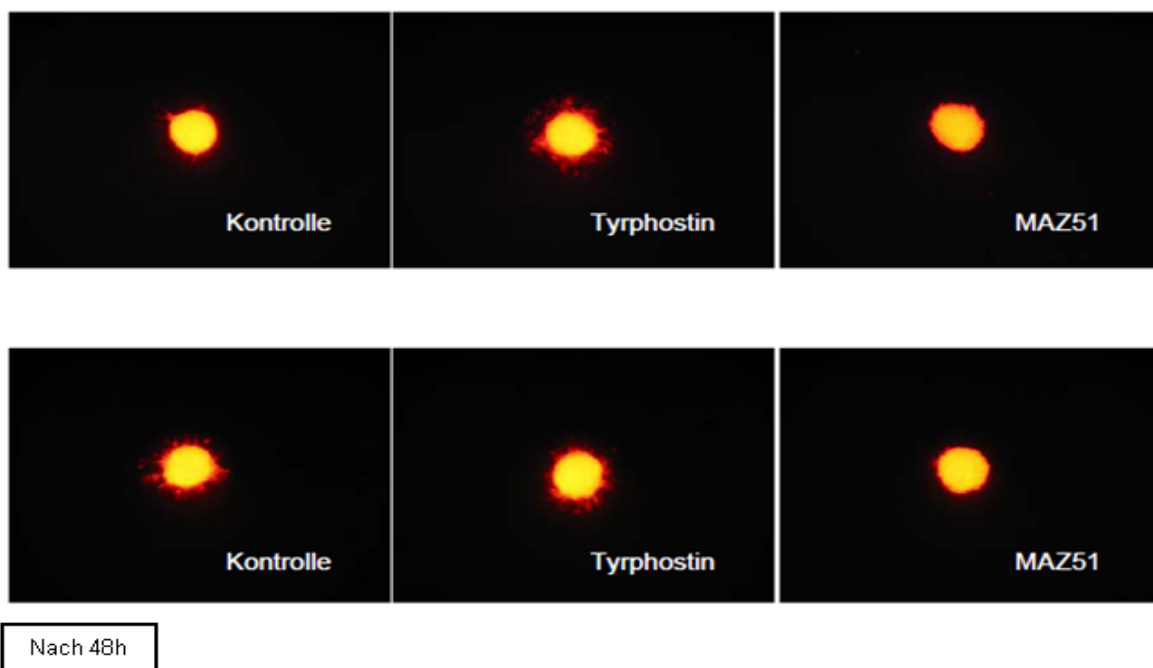


Abbildung 24: Sphäroid-Assay. Einfluss von Tyrphostin 5µM (R2-Inhibition) und Maz51 (R3-Inhibition) unter Normoxie- (oben) und Hypoxie- (unten) Bedingungen auf die Migration von IEC 787 nach 48h Inkubationszeit.

Nach 72Stunden Inkubationszeit ist der Migrationseffekt sowohl unter Normoxie- wie auch unter Hypoxie-Bedingungen bei den Kontrollsphäroiden und bei den Sphäroiden, welche mit Tyrphostin inkubiert wurden, noch deutlicher zu sehen. Die Migration der Zellen nimmt sowohl in ihrer Anzahl als auch in der Peripherieweite im Vergleich zu 48 Stunden eindeutig zu. Unter Gabe von MAZ51 ist nach 72 Stunden Inkubationszeit eine Migration zu sehen, welche jedoch deutlich schwächer als bei den anderen beiden Gruppen ausfällt.

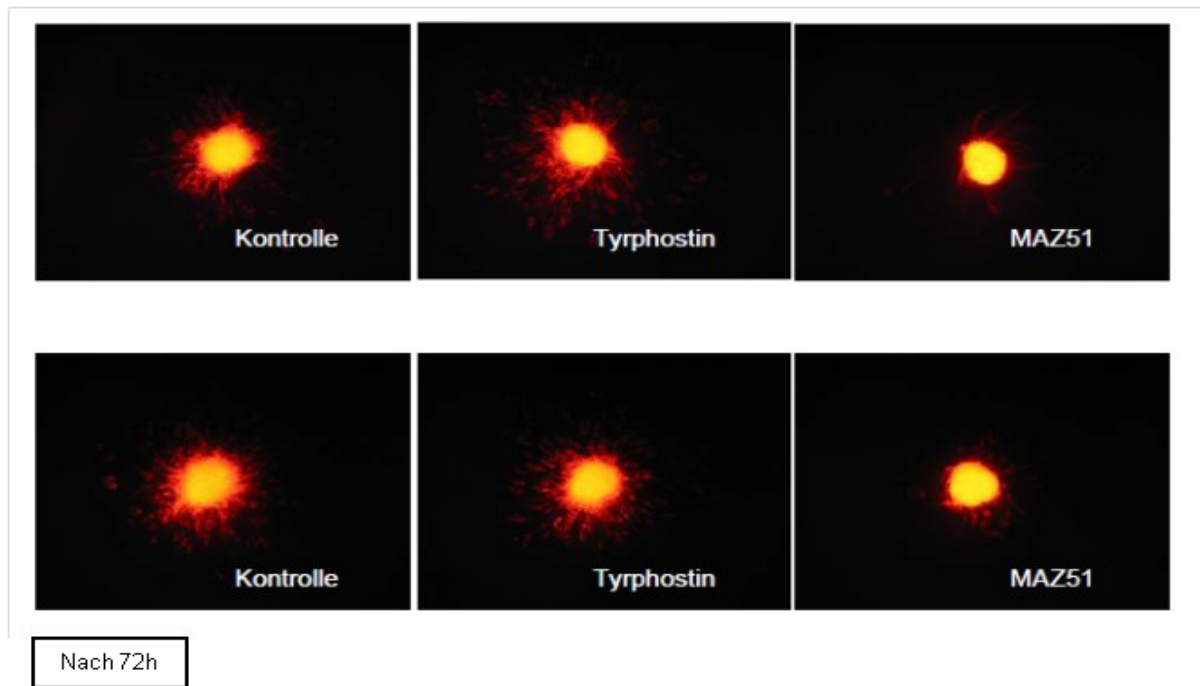


Abbildung 25: Sphäroid-Assay. Einfluss von Tyrphostin 5µM (R2-Inhibition) und Maz51 (R3-Inhibition) unter Normoxie- (oben) und Hypoxie- (unten) Bedingungen auf die Migration von IEC 787 nach 72h Inkubationszeit.

Nach 7 Tage Inkubationszeit migrieren die Zellen der Kontrollsphäroide sowie die Zellen, welche mit Tyrphostin versetzt wurden, noch stärker in die Peripherie aus dem Sphäroid heraus. Zusätzlich migrieren im Vergleich deutlich mehr Zellen aus den Sphäroiden heraus als nach 72 Stunden. Bei den Zellen der Sphäroide, welche mit MAZ51 versetzt wurden, ist ein weiterer Effekt zu sehen. Jene Zellen, welche nach 72 Stunden Inkubationszeit aus dem Sphäroid heraus migrierten, sind nach 7 Tage bis auf einzelne Zellen fast nicht mehr zu erkennen.

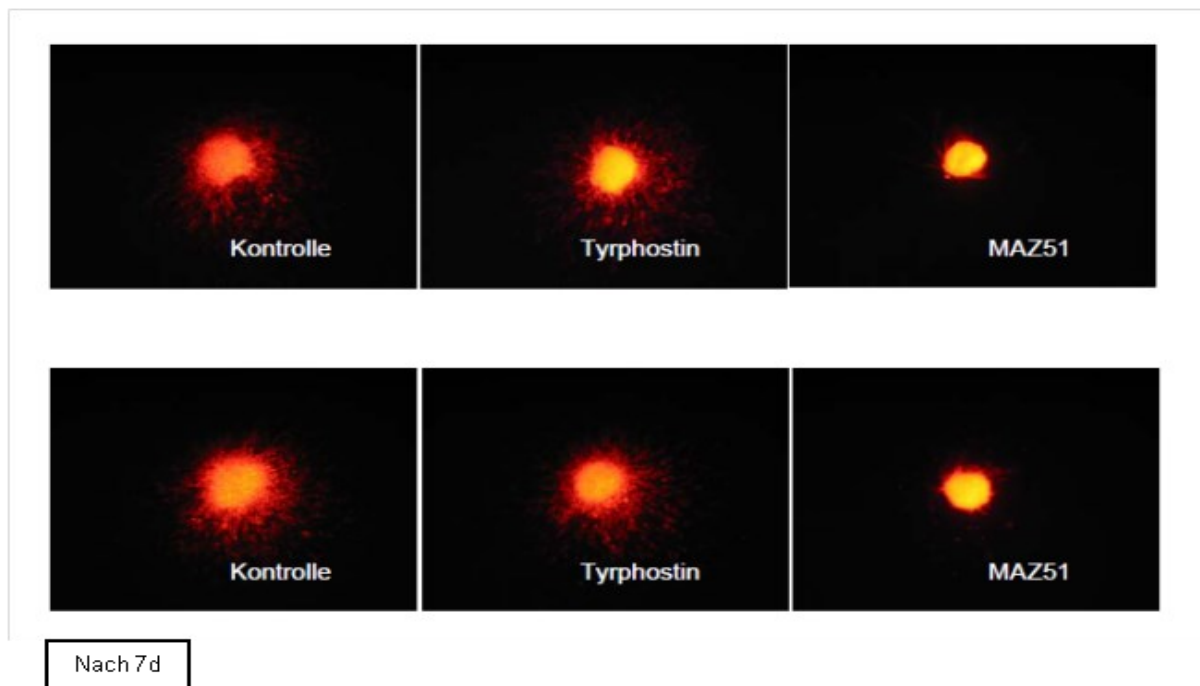


Abbildung 26: Sphäroid-Assay. Einfluss von Tyrphostin 5µM (R2-Inhibition) und Maz51 (R3-Inhibition) unter Normoxie- (oben) und Hypoxie- (unten) Bedingungen auf die Migration von IEC 787 nach 7d Inkubationszeit.

7.5 Einfluss von Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege bei Tumor und Endothelzellen.

In einem weiteren Versuch wurde auf Western Blot Ebene untersucht ob ein Unterschied zwischen verschiedenen intrazellulären Signaltransduktionswegen bei den Tumorzellen U87 und U251 und den Endothelzellen HBMEC unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen vorhanden war. Es wurden folgende intrazelluläre Signaltransduktionswege untersucht:

p42/44 MAPK	verantwortlich für das Wachstum, die Differenzierung und die Entwicklung der Zellen
SAPK-JNK und p38 MAPK	verantwortlich für das Überleben, die Apoptose und das Wachstum der Zellen
p38 MAPK	verantwortlich für die Migration, die Invasion und das Wachstum der Zellen
AKT	verantwortlich für das Überleben und die Inhibition der Apoptose der Zellen

7.5.1 Einfluss von Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf den intrazellulären Signaltransduktionsweg der p42/44 MAPK bei Tumor- und Endothelzellen

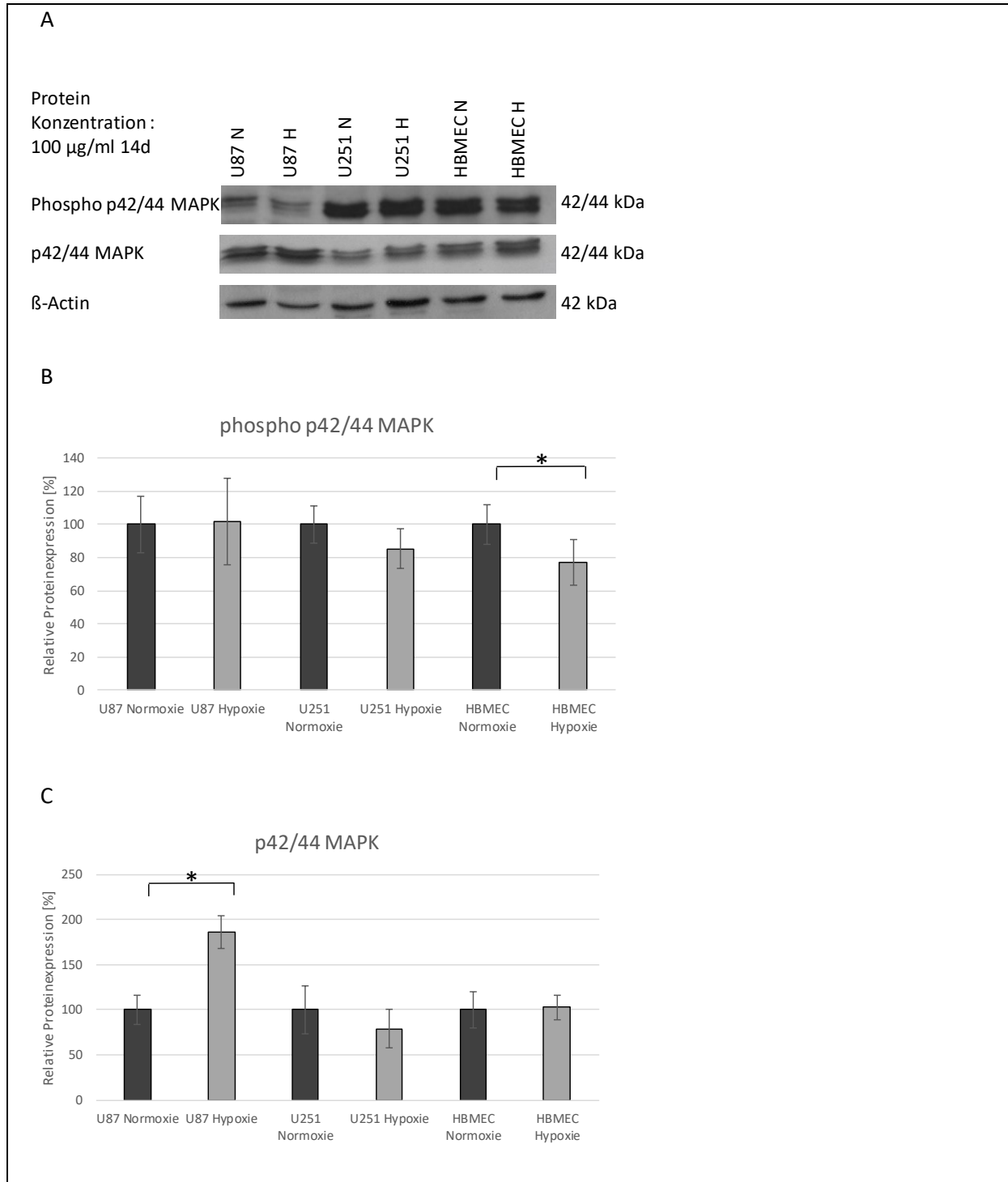
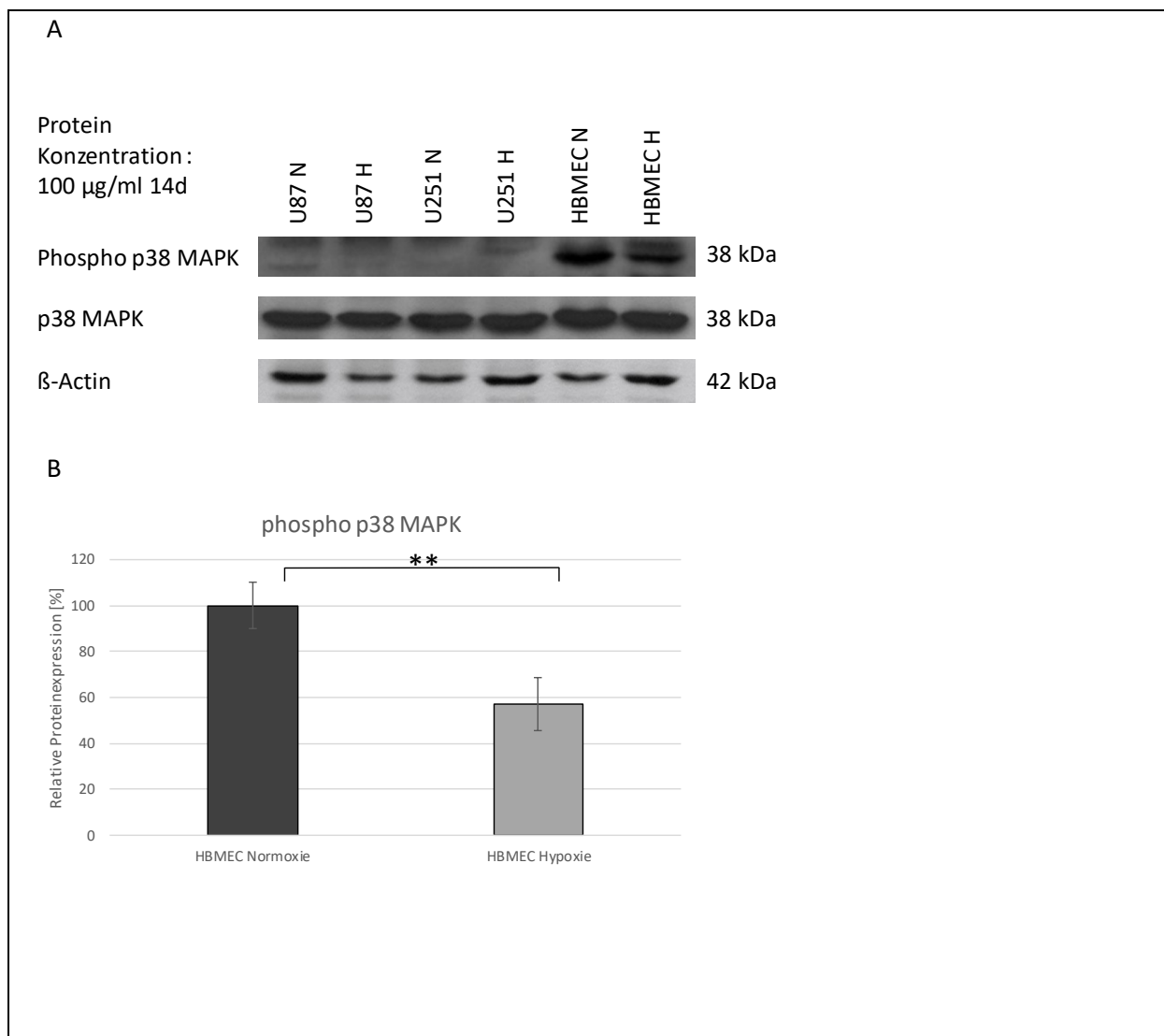


Abbildung 27: WB der 42/44 MAPK. (A) Exemplarischer WB der U87, U251 und HBMEC für die aktive phosphorylierte p42/44 MAPK und für die inaktive nicht phosphorylierte p42/44 MAPK nach jeweils 14 Tagen Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β-Actin Kontrolle. (B) Relative Protein-Expression der intrazellulären aktiven phosphorylierten p42/44 MAPK Protein Expression in U87, U251 und HBMEC unter Normoxie vs. Hypoxie zum Zeitpunkt 14 Tage. (C) Relative Protein-Expression (Western Blot) der intrazellulären

inaktiven nicht phosphorylierten p42/44 MAPK Expression in U87, U251 und HBMEC unter Normoxie vs. Hypoxie zum Zeitpunkt 14 Tage. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

In den durchgeführten WBs konnte nach 14 Tagen Inkubationszeit für die aktive phosphorylierte p42/44 MAPK eine signifikant höhere Proteinexpression bei den HBMEC unter Normoxie $100\% \pm \text{SD } 12,20\%$ im Vergleich zu Hypoxie $77,25\% \pm \text{SD } 13,76\%$ nachgewiesen werden ($p < 0,05$). Für die inaktive nicht phosphorylierte p42/44 MAPK konnte nach 14 Tagen Inkubationszeit eine signifikant höhere Proteinexpression bei den U87 unter Hypoxie $186\%,18\% \pm \text{SD } 17,65\%$ im Vergleich zu Normoxie $100\% \pm \text{SD } 16,31\%$ nachgewiesen werden ($p < 0,05$).

7.5.2 Einfluss von Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf den intrazellulären Signaltransduktionsweg der p38 MAPK bei Tumor- und Endothelzellen



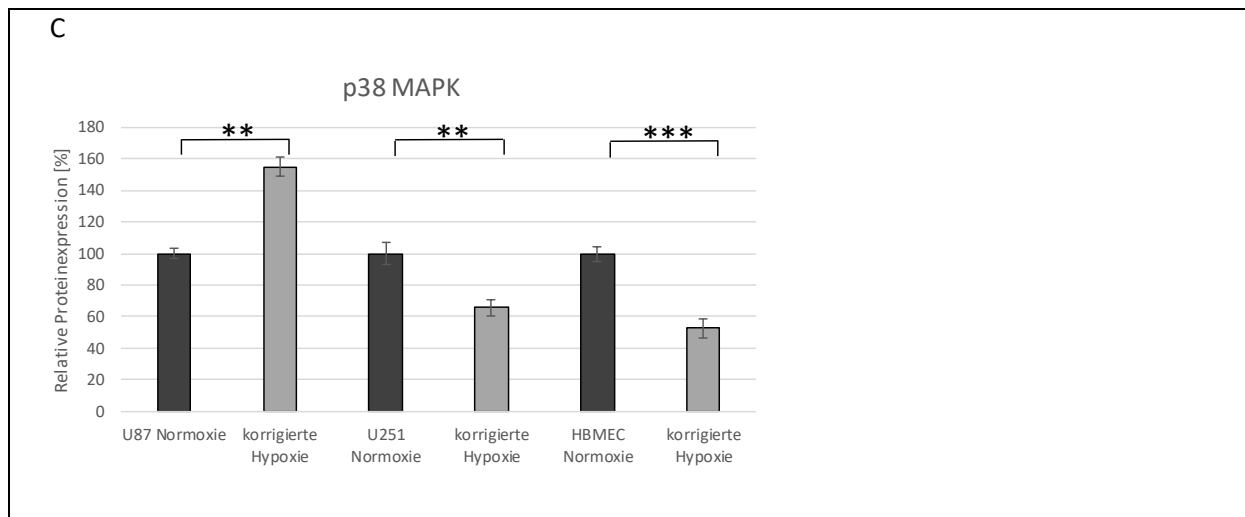


Abbildung 28: WB der p38 MAPK. (A) Exemplarischer WB der U87, U251 und HBMEC für die aktive phosphorylierte p38 MAPK und für die inaktive nicht phosphorylierte p38 MAPK nach jeweils 14 Tagen Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β -Actin Kontrolle. (B) Relative Protein-Expression der intrazellulären aktiven phosphorylierten p38 MAPK Protein Expression in HBMEC unter Normoxie vs. Hypoxie zum Zeitpunkt 14 Tage. (C) Relative Protein-Expression der intrazellulären inaktiven nicht phosphorylierten p38 MAPK Expression in U87, U251 und HBMEC unter Normoxie vs. Hypoxie zum Zeitpunkt 14 Tage. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

In den durchgeführten WBs konnte nach 14 Tagen Inkubationszeit für die aktive phosphorylierte p38 MAPK nur bei den HBMECs eine signifikant höhere Proteinexpression unter Normoxie $100\% \pm \text{SD } 10,11\%$ vs. Hypoxie $57,03\% \pm \text{SD } 11,76\%$ nachgewiesen werden ($p < 0,005$). Für die inaktive nicht phosphorylierte p38 MAPK konnte nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen bei den U87 eine signifikant höhere Proteinexpression unter Hypoxie $155,01\% \pm \text{SD } 5,71\%$ vs. Normoxie $100\% \pm \text{SD } 3,57\%$ nachgewiesen werden ($p < 0,005$). Für die U251 zeigte sich unter Normoxie $100\% \pm \text{SD } 7,19\%$ eine signifikant höhere Protein-Expression im Vergleich zu Hypoxie $65,76\% \pm \text{SD } 5,19\%$ ($p < 0,005$). Die HBMEC zeigten ebenfalls unter Normoxie $100\% \pm \text{SD } 4,71$ eine signifikant höhere Protein-Expression im Vergleich zu Hypoxie $52,73\% \pm \text{SD } 6,24\%$ ($p < 0,0005$). Bei allen drei durchgeführten Versuchen waren die Banden der aktiven phosphorylierten p38 MAPK für die U87 und U251 Zellen weder nach 24 noch nach 72h ersichtlich. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Tumorzellen zu den gemessenen Zeitpunkten keine aktive phosphorylierte p38 MAPK-mRNA exprimieren. Eine statistische Auswertung der aktivierten phosphorylierten p38 MAPK ist deshalb für die Tumorzellen wegen nicht vorhandener mRNA nicht durchführbar.

7.5.3 Einfluss von Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf den intrazellulären Signaltransduktionsweg der SAPK-JNK bei Tumor- und Endothelzellen

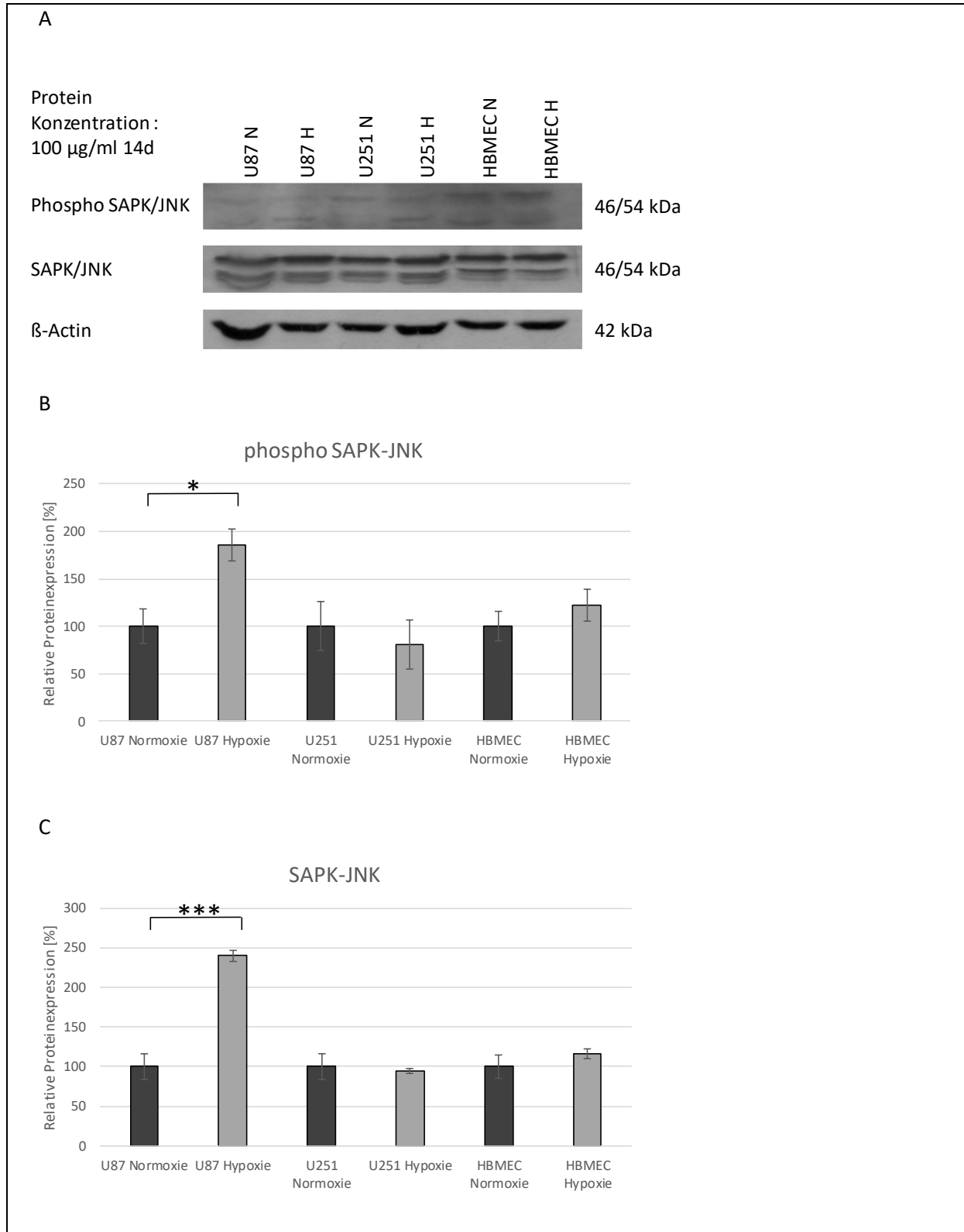
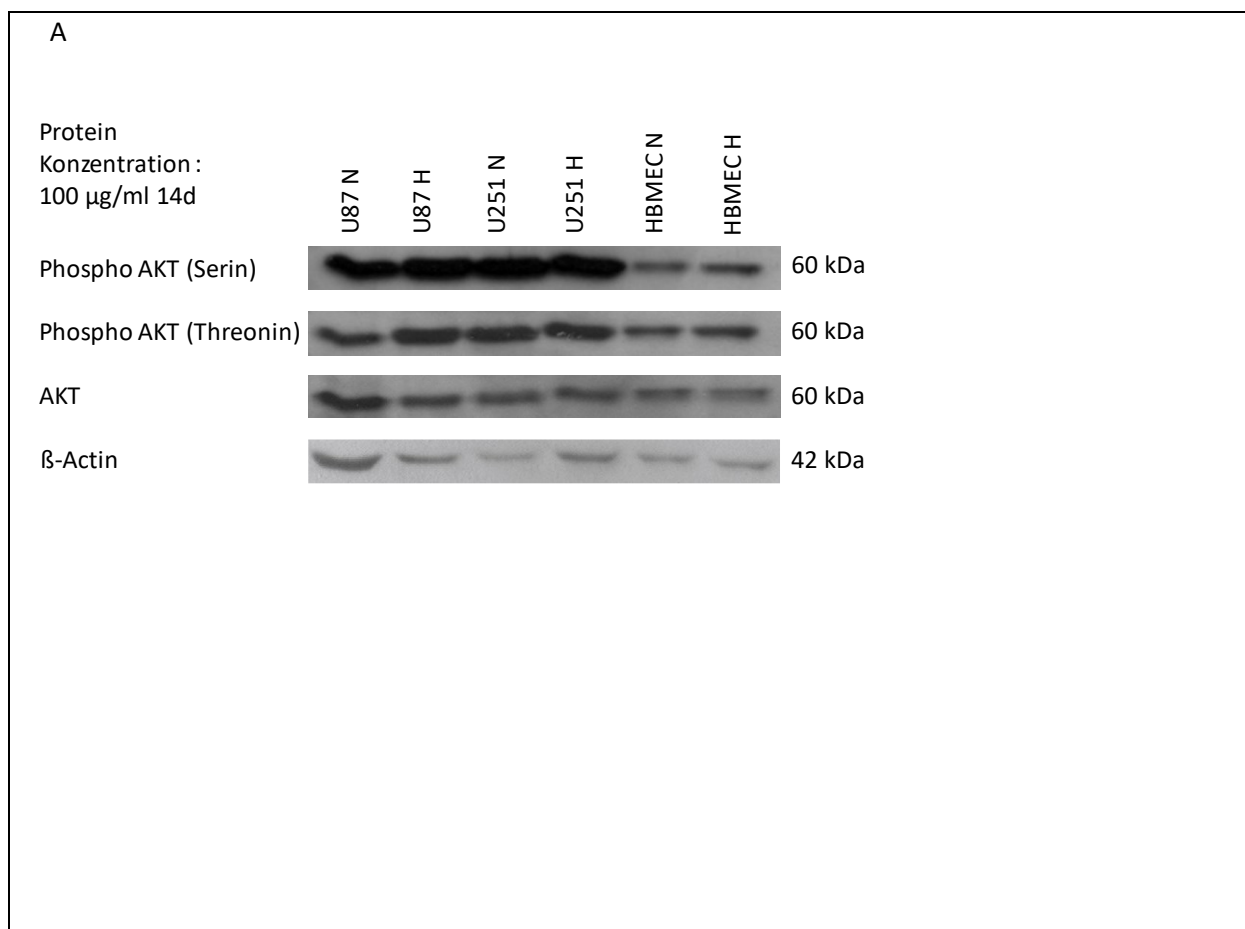


Abbildung 29: WB der SAPK/JNK. (A) Exemplarischer WB der U87, U251 und HBMEC für die aktive

phosphorylierte SAPK/JNK und für die inaktive nicht phosphorylierte SAPK/JNK nach jeweils 14 Tagen Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β -Actin Kontrolle. (B) Relative Protein-Expression der intrazellulären aktiven phosphorylierten SAPK/JNK Expression in U87, U251 und HBMEC unter Normoxie vs. Hypoxie zum Zeitpunkt 14 Tage. (C) Relative Protein-Expression der intrazellulären inaktiven nicht phosphorylierten SAPK/JNK Expression in U87, U251 und HBMEC unter Normoxie vs. Hypoxie zum Zeitpunkt 14 Tage. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

In den durchgeführten WBs konnte nach 14 Tagen Inkubationszeit sowohl für die aktive phosphorylierte SAPK/JNK sowie für die inaktive nicht phosphorylierte SAPK/JNK bei den U87 eine signifikant höhere Proteinexpression unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie nachgewiesen werden. Aktive phosphorylierte SAPK/JNK Normoxie $100\% \pm \text{SD } 18,22\%$ vs. Hypoxie $185,98\% \pm \text{SD } 17,2\%$ ($p < 0,05$). Inaktive nicht phosphorylierte SAPK/JNK Normoxie $100\% \pm \text{SD } 15,76\%$ vs. Hypoxie $239,99\% \pm \text{SD } 7,33\%$ ($p < 0,0005$).

7.5.4 Einfluss von Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen auf den intrazellulären Signaltransduktionsweg der AKT bei Tumor- und Endothelzellen



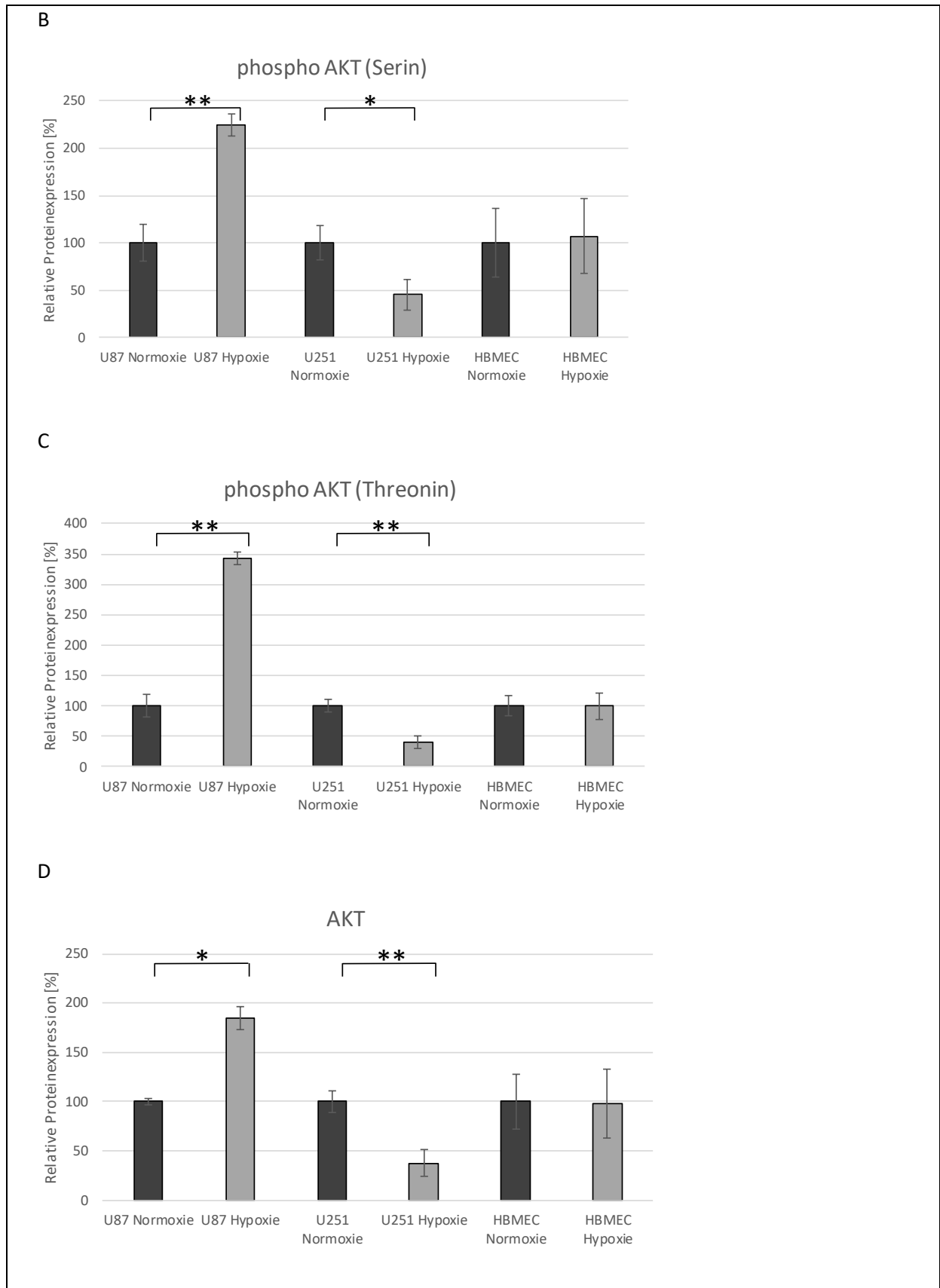


Abbildung 30: WB der AKT. (A) Exemplarischer WB der U87, U251 und HBMEC für die aktive phosphorylierte AKT (Serin) und AKT (Threonin) und für die inaktive nicht phosphorylierte AKT nach jeweils 14 Tagen Normoxie vs. Hypoxie sowie die dazugehörige β -Actin Kontrolle. (B) Relative Protein-Expression der intrazellulären aktiven phosphorylierten AKT (Serin) Expression in U87, U251 und HBMEC unter Normoxie vs. Hypoxie zum

Zeitpunkt 14 Tage. (C) Relative Protein-Expression der intrazellulären aktiven phosphorylierten AKT (Threonin) Expression in U87, U251 und HBMEC unter Normoxie vs. Hypoxie zum Zeitpunkt 14 Tage. (D) Relative Protein-Expression der intrazellulären inaktiven nicht phosphorylierten AKT Expression in U87, U251 und HBMEC unter Normoxie vs. Hypoxie zum Zeitpunkt 14 Tage. Angegebene Werte: normalisierte Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten \pm SD. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

In den durchgeführten WBs konnte nach 14 Tagen Inkubationszeit sowohl für die aktive phosphorylierte AKT (Serin) und AKT (Threonin) sowie für die inaktive nicht phosphorylierte AKT bei den U87 eine signifikant höhere Proteinexpression unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie nachgewiesen werden. Aktive phosphorylierte AKT (Serin) Normoxie 100% \pm SD 19,42% vs. Hypoxie 224,41% \pm SD 11,60% ($p < 0,005$). Aktive phosphorylierte AKT (Threonin) Normoxie 100% \pm SD 18,08% vs. Hypoxie 343,14% \pm SD 10,19% ($p < 0,005$). Inaktive nicht phosphorylierte AKT Normoxie 100% \pm SD 3,13% vs. Hypoxie 184,6% \pm SD 11,31% ($p < 0,05$). Die U251 zeigten bei allen durchgeführten WBs eine signifikant höhere Proteinexpression unter Normoxie im Vergleich zu Hypoxie. Aktive phosphorylierte AKT (Serin) Normoxie 100% \pm SD 18,03% vs. Hypoxie 45,23% \pm SD 16,5% ($p < 0,05$). Aktive phosphorylierte AKT (Threonin) Normoxie 100% \pm SD 9,64% vs. Hypoxie 39,86% \pm SD 10,07% ($p < 0,005$). Inaktive nicht phosphorylierte AKT Normoxie 100% \pm SD 11,06% vs. Hypoxie 37,36% \pm SD 13,96% ($p < 0,005$).

8 Diskussion

8.1 Antiangiogene Therapie und Hypoxie

Glioblastome weisen eine große intratumorale Vielfalt auf, wobei einige Studien zeigen, dass 50% der Rezidivtumorproben nur die Hälfte ihrer genetischen Mutationen mit dem Primärtumor teilen. Darüber hinaus weisen Läsionen je nach Lokalisation im Gehirn, genomische Unterschiede auf (Johnson, Mazar et al. 2014). In einer Studie, die gepaarte Proben von Primärtumoren und Metastasen untersuchte, wurde sogar unter denselben Onkogenen eine breite genomische Variation gefunden (Kim, Lee et al. 2015). Diese Heterogenität stellt eine besondere Herausforderung für eine gezielte Therapie dar, da die Therapie mit einem alleinigen Wirkstoff nicht alle Tumorphysologien erreichen kann (Noch, Ramakrishna et al. 2018).

Um der hohen Proliferationsrate und dem hohen Metabolismus Stand zu halten, spielt bei diesem schnellwachsenden Tumor die Hypoxie und die Angiogenese eine tragende Rolle (Russell, Elliott et al. 2009). Bereits viele Studien konnten eine Korrelation zwischen der Malignität des Tumors und der peritumoralen Hypoxie aufgrund dem Vorhandensein abnormaler Gefäße und einer schnellen Zellproliferation nachweisen (Hockel and Vaupel 2001). Die sich schnell vermehrenden GBM-Zellen können die Integrität der Gefäße beeinträchtigen und schließlich zum Kollaps derselben führen. Die daraus resultierende reduzierte Tumordurchblutung führt zunächst zum Untergang einiger GBM-Zellen, während einige andere sich an die hypoxischen Bedingungen anpassen, überleben und einen stammzell-ähnlichen Phänotypen aufweisen (Nico, Crivellato et al. 2010, Keith, Johnson et al. 2011, Colwell, Larion et al. 2017, Mahase, Rattenni et al. 2017, Yu, Tang et al. 2017). Als unabhängiger Prädiktor für eine schlechte Prognose stellt die Hypoxie somit einen kritischen Faktor bei der Bestimmung der Aggressivität und Invasion des Glioblastoms dar. Durch den niedrigen Sauerstoffpartialdruck führt die Induktion des HIF1 α -Faktors zu einer Vielzahl von nachgeschalteten Signalereignissen, einschließlich einer gesteigerten Angiogenese, u.a. durch die Induktion der VEGF-A Expression, einer gesteigerten Migration und Invasion, die Induktion eines stammzellartigen Phänotypen sowie eine Chemo- und Strahlen-Therapie Resistenz (Kathagen-Buhmann, Schulte et al. 2016, Mahase, Rattenni et al. 2017).

Die bedeutendste Rolle in der aktuellen Forschungslage kommt dem Medikament Bevacizumab zu. Dieses Medikament ist ein monoklonaler Antikörper, welcher VEGF-A bindet (Cohen, Shen et al. 2009). In ersten vielversprechenden *in vivo* Experimenten konnte gezeigt werden, dass Bevacizumab im GBM zu einer vorübergehenden „Normalisierung“ der Blutgefäßarchitektur und einer Abdichtung der Blut-Hirn-Schranke führt. Nach einer kurzen transitorischen Phase konnte jedoch die weiterführende Therapie weder die lokale Aggressivität noch die Invasivität der Tumorzellen verhindern (Narayana, Kunnakkat et al. 2012). 2009 wurde Bevacizumab von der US-amerikanischen Lebensmittel- und Arzneimittelbehörde auf der Grundlage von Ergebnissen aus zwei Phase-2-Studien bei rezidivierendem Glioblastom beschleunigt zugelassen (Kreisl, Kim et al. 2009). Anschließend zeigten zwei randomisierte Placebo kontrollierte Phase-3-Studien mit Bevacizumab in Kombination mit Bestrahlung und Temozolomid bei neu diagnostiziertem Glioblastom keinen Nutzen für das Gesamtüberleben, obwohl Patienten, die mit Bevacizumab behandelt wurden, ein längeres progressionsfreies Überleben hatten (Chinot, Wick et al. 2014, Gilbert, Dignam et al. 2014). Durch die beschriebene Resistenz gegen die anti-VEGF-A Therapie suggeriert die aktuelle Studienlage, dass andere angiogene Faktoren oder Signalwege möglicherweise eine „second wave of angiogenesis“ auslösen (di Tomaso, Snuderl et al. 2011, Carpenter, Paw et al. 2015).

Abdollahi et al. diskutieren in ihrer Studie mindestens fünf verschiedene Resistenzmechanismen der Tumorzellen gegen die antiangiogene Monotherapie: 1. Die *evolutionäre Auswahl* postuliert, dass die inhärente Heterogenität innerhalb der genetisch instabilen Tumorzellen zur Koexistenz verschiedener angiogener Wachstumsfaktoren-Expression führen könnte (z.B. VEGF, bFGF oder PDGF). Die Behandlung mit einem Monosignal-Inhibitor, wie beispielsweise einem VEGF-Inhibitor, könnte daher zur Selektion von Tumorzellen führen, die einen oder mehrere der alternativen proangiogenen Faktoren überexprimieren. 2. Der *genetische switch* besagt, dass Tumore während der Therapie die Fähigkeit erlangen könnten, die Expression von angiogenen Faktoren aufgrund genetischer oder epigenetischer Veränderungen der Gene, zu verändern. Zum Beispiel können zusätzliche aktivierende Mutationen in Onkogenen, wie z.B. *ras*, zu einer Überexpression von VEGF führen. 3. Der *hypoxische switch* postuliert, dass die antiangiogene therapieinduzierte Hypoxie, die Expression von hypoxieempfindlichen angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF hochregulieren könnte. 4. Der *kompensatorische switch* behauptet, dass die

physiologisch koordinierten Kompensationsprogramme in Reaktion auf eine Störung der Homöostase aktiviert werden. 5. Neben der direkten Modulation angiogener Signale durch die Tumorzellen, deuten neue Daten auf eine Schlüsselrolle der Tumorstromazellen bei der Tumorumgehung gegen die antiangiogene Therapie hin, der sogenannte *stroma switch*. Verschiedene Zelltypen innerhalb des Tumorstromas könnten an der Modulation angiogener Signale, als Reaktion auf die antiangiogene Therapie, beteiligt sein (Abdollahi and Folkman 2010). Die Integration der Stromazellen in dieses Szenario erhöht die Komplexität der systemischen Untersuchung von Ausweichsignalwege innerhalb der Tumorendothelachse. So könnte beispielsweise die experimentelle Ausschaltung angiogener Gene in Tumorzellen durch die Freisetzung derselben Faktoren durch Tumorstromazellen gut kompensiert werden, was wiederum das Scheitern der aktuellen Therapien erklären würde (Abdollahi and Folkman 2010, Nduom, Weller et al. 2015, Mangani, Weller et al. 2017).

Aufgrund der aktuellen Datenlage der Literatur war es Ziel dieser Arbeit einige Faktoren und Signalwege, sowohl unter Normoxie wie auch unter extremen Hypoxie-Bedingungen, zu diversen Zeitpunkten bei Tumorzellen und Endothelzellen zu untersuchen. Ebenfalls wurde das Proliferations- und Migrationsverhalten dieser Zellen unter extrem hypoxischen Bedingungen analysiert.

8.2 Proliferationsverhalten von Tumor- und isolierten humanen Endothelzellen unter Einfluss von Hypoxie

Das *in vitro* Verhalten der Endothelzellen unter Hypoxie wird kontrovers diskutiert. In einigen Studien konnte eine Steigerung der Proliferationsrate der Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden (Nomura, Yamagishi et al. 1995). Unsere Ergebnisse zeigten ebenfalls über einen Zeitraum von 7 Tagen eine Steigerung der Proliferationsrate unter hypoxischen Bedingungen. Andere Studien zeigten gegenteilige Ergebnisse, so wurde eine Reduktion der Endothelzellenzahl respektive eine Stilllegung des Zellzyklus auf die G₀/G₁-Phase unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen (Iida, Mine et al. 2002, Peters, Schmidt et al. 2005). Ezhilarasan et al. konnten in ihrer Studie eine Reduktion der Zellzahl bei einer erhöhten Anzahl von Zellen in der subG₁-Phase des Zellzyklus zeigen. Ebenfalls konnten Sie in den Experimenten nachweisen, dass die durch Hypoxie ausgelöste Proliferationsminderung der Endothelzellen gehemmt werden kann,

wenn diese mit Tumor- (U87) konditioniertem Medium versehen wurden (Ezhilarasan, Mohanam et al. 2007).

Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass die U87 Tumor- und die IEC771 sowohl unter Normoxie- wie auch unter Hypoxie-Bedingungen zu den gemessenen Zeitpunkten 72 Stunden und 7 Tagen eine Steigerung der Proliferationsrate im Vergleich zu 24 Stunden aufwiesen. Bei den U87 konnte eine signifikante Proliferationssteigerung der Zellen, welche unter Normoxie kultiviert worden sind im Vergleich zu den Zellen unter Hypoxie beobachtet werden. Die IEC771 zeigten nach 72 Stunden und 7 Tagen keinen signifikanten Proliferationsunterschied zwischen Normoxie und Hypoxie. Wir deuteten dieses Verhalten auf eine höhere Resistenz der IEC771 gegenüber hypoxischen Bedingungen als die der Tumorzellen U87 hin. Dieses Verhalten der IEC771 und der U87 Tumorzellen konnte nach einer 14-tägigen Präkonditionierung mit Hypoxie bestätigt werden. Die Eigenschaft solch ungünstige Umgebungskonditionen zu überleben, signalisiert die Resistenzbereitschaft der GBM-Zellen. Die erhöhte Widerstandskraft der Endothelzellen gegenüber Hypoxie spiegelt wider, dass *in vivo* ggf. eine weitere Bildung von Gefäßen sichergestellt und so das Tumorüberleben gewährleistet werden kann.

8.3 Migrationsverhalten von isolierten humanen Endothelzellen unter Hypoxie und Einfluss von VEGFs

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens der IEC unter normoxischen und hypoxischen Zuständen, wurde in den vorliegenden Versuchen der Sphäroid-Assay eingesetzt. Bezüglich der jeweiligen hinzugefügten VEGFs, haben wir die in der Literatur empfohlenen Konzentrationen verwendet. Unter Normoxie-Bedingungen zeigten die IEC sowohl bei der Kontrolle -ohne Zugabe von VEGFs- als auch unter Zugabe von verschiedenen VEGFs keine Migrationstendenz aus den Sphäroiden heraus. Unter Hypoxie-Bedingungen zeigten die Zellen ein anderes Verhalten. Nach Zugabe von VEGF-C migrierten keine Zellen aus dem Sphäroid heraus. Nach Zugabe von VEGF-A und VEGF-D migrierten einige Zellen aus dem Sphäroid heraus. Nach Zugabe von VEGF- C_{Cys156} (selektiver Ligand von VEGFR-3) zeigten die Zellen unter hypoxischen Bedingungen eine extrem hohe Migrationstendenz aus dem Sphäroid heraus, welche bis weit in die Peripherie reichte. Durch dieses starke Migrationsverhalten der Zellen vermuten wir, dass sich das Ansprechen der IEC unter

hypoxischen Bedingungen auf VEGF-C_{Cys156} verändert. In der Literatur existieren Versuche, bei welchen deutlich höhere VEGF-C-Konzentrationen als VEGF-A-Konzentrationen benötigt wurden, um dasselbe Migrationsverhalten der Endothelzellen zu erzielen (Joukov, Pajusola et al. 1996, Lee, Gray et al. 1996). Wir konnten somit zeigen, dass die Zellen unter hypoxischen Bedingungen eine gesteigerte Migration als unter normoxischen Bedingungen aufweisen. Vor allem die additive Wirkung von Hypoxie und verschiedener Wachstumsfaktoren scheint eine entscheidende Rolle zu spielen.

Um das Ansprechen des VEGFR-3-Rezeptors unter Hypoxie hinsichtlich der Migration der GBM-Zellen zu untersuchen, wurden die Sphäroid-Assays mit Antikörper vermittelter VEGFR-2- und VEGFR-3-Blockierung behandelt. Bei den Kontroll-Sphäroiden (ohne Zugabe von weiteren Substanzen) konnten wir unter Hypoxie eine hohe Migrationstendenz aus dem Sphäroid heraus beobachten im Vergleich zu den Zellen unter Normoxie. Zu allen gemessenen Zeitpunkten migrierten die Zellen der Kontrollsphäroide und der Sphäroide, welche mit Tyrphostin (Blockade des VEGFR-2) behandelt wurden, aus den Sphäroiden in die Peripherie kontinuierlich heraus. Eine alleinige Blockade des VEGFR-2 führte somit zu keiner Migrationseinschränkung der IEC. Unter Blockade des VEGFR-3 konnten wir kaum Migrationsverhalten aus den Sphäroiden heraus beobachten. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese des veränderten Ansprechens der IEC auf VEGFR-3-Blockade.

In der Literatur gibt es bereits Studien, welche die Migration von Glioblastomzellen unter Hypoxie untersuchen. Einig sind sie sich, dass die Aktivierung des HIF1- α eines der wichtigsten zellulären Ereignissen darstellt, welche durch Hypoxie-Exposition hervorgerufen wird (Yang, Lin et al. 2012). Es wurde bereits postuliert, dass die HIF1- α Aktivierung als Reaktion auf hypoxische Reize die Expression verschiedener Gene, wie z.B. die Matrixmetalloproteinase und die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren in den Glioblastomzellen hochregulieren, um so die Zellmigration, Invasion und Angiogenese zu steuern (Shi, Zheng et al. 2015). Die molekularen Mechanismen der hypoxieinduzierten Migration und Invasion von Glioblastomzellen sind jedoch noch nicht geklärt (Zhang, Liu et al. 2013, Joseph, Conroy et al. 2015, Xu, Zhang et al. 2017). Huang et al. konnten in ihren in vitro Versuchen zeigen, dass Hypoxie sowohl die Migration als auch die Invasion von U87 Zellen stimulieren kann (Huang, Ding et al. 2018). Wie zuvor erwähnt ist bereits bekannt, dass sich Tumorzellen durch eine erhöhte Synthese von HIF1- α an Hypoxie Bedingungen

anpassen können. Insbesondere in den pseudopalisaden Zellen um nekrotische Areale und in den Tumorzellen welche das gesunde Gehirngewebe am invasivem Rand vom Tumors aus infiltrieren wird HIF1- α überexprimiert (Joseph, Conroy et al. 2015). Huang et al. konnten in ihrer Studie ebenfalls zeigen, dass die HIF1- α Proteinspiegel unter Hypoxie signifikant höher exprimiert sind als unter Normoxie. Nach Zugabe eines HIF1- α Inhibitors und HIF1- α siRNA kam es zu einem signifikanten Rückgang der hypoxieinduzierten Migration und Invasion der U87 Zellen. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Überexpression von HIF1- α zur hypoxiestimulierten Invasivität von Glioblastomen beiträgt (Huang, Ding et al. 2018). Bisher existiert keine Studie, die diesbezüglich den VEGFR-3 und seine Liganden untersucht hat.

8.4 Änderung der Rezeptorexpression und Aktivierung der Signalkaskaden in Tumor- und Endothelzellen unter Hypoxie

VEGFR-3 und -2 Expression, VEGF-A, -C und -D Expression und VEGF-A Sekretion in Tumorzellen und isolierten Endothelzellen

In der Literatur gibt es wenige Studien, welche sie mit den unterschiedlichen Subtypen der vascular endothelial growth factors als Therapieziel in der Tumorbehandlung des Glioblastoms befassen (Hamerlik, Lathia et al. 2012). Hohe Expressionsraten des VEGF-A, ein starker angiogener Faktor, konnte mit einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht werden. Im Gegensatz dazu, ist die potenzielle Rolle von VEGF-C und VEGF-D, beides primäre lymphangiogene Faktoren, in der menschlichen Hirntumorbiologie noch weites gehen unerforscht (Jenny, Harrison et al. 2006). VEGF-C und VEGF-D binden den VEGFR-3 und sind primär in der Bildung und Aufrechterhaltung von lymphatischen Zellen beteiligt, welche im menschlichem Gehirn nicht vorkommen (Achen, Jeltsch et al. 1998, Veikkola, Jussila et al. 2001). Studien konnten zeigen, dass VEGF-C und VEGF-D unter gewissen Umständen ebenfalls an den VEGFR-2 binden können, diesen aktivieren und somit einen angiogenen Effekt hervorrufen können (Achen, Jeltsch et al. 1998, Mandriota, Jussila et al. 2001). Die Expression von VEGF-A und VEGFR-1 und VEGFR-2 in Glioblastomen wurde bereits durch mehrere Forschungsgruppen beschrieben (Plate, Breier et al. 1994, Machein and Plate 2000). Sie konnten nachweisen, dass die VEGF-A Expression in einem positiven Zusammenhang mit der Tumorgefäßdichte um dem Malignitätsgrad steht (Chaudhry, O'Donovan et al. 2001, Brockmann, Ulbricht et al. 2003). Eine Überexpression des VEGF-A

konnte vor allem in perinekrotischen Arealen in den sogenannten Pseudopalisadenzellen nachgewiesen werden (Shweiki, Itin et al. 1992, Zagzag, Lukyanov et al. 2006). Wir konnten in dieser Arbeit zum ersten Mal eine erhöhte VEGF-A Expression auf Proteinebene bei U87 Tumorzellen unter extrem hypoxischen Bedingungen nachweisen. Wir konnten ebenfalls eine signifikant höhere Proteinexpression im Western Blot unter hypoxischen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen nachweisen. Diese Ergebnisse unterstützen die bereits in der Literatur vorhandenen Studien welche ebenfalls zeigen konnten, dass der VEGF-A eine entscheidende Rolle in der Malignitätsentwicklung des Glioblastoma Multiforme einnimmt (Brockmann, Ulbricht et al. 2003). Die Ergebnisse bezüglich des VEGF-A konnten wir mittels ELISA bestärken, da wir auch hier eine erhöhte Sekretion unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie bei den U87 Tumorzellen nachweisen konnte. Bei den isolierten Endothelzellen IEC787 konnten wir für die VEGF-A Protein-Expression keinen signifikanten Unterschied unter Normoxie vs. Hypoxie nachweisen, was darauf hindeuten könnte, dass die Endothelzellen unter Hypoxie sich alternative Wachstumsfaktoren bzw. Signalkaskaden zu Nutze machen, um solch ungünstige Umgebungskonditionen zu überleben. Die Ergebnisse bezüglich der VEGF-A Sekretion bei den IEC787 zeigten nach 72 Stunden konkordante Ergebnisse zur Proteinexpression. Allerdings zeigte sich nach 24 Stunden unter Hypoxie eine signifikant höhere VEGF-A Sekretion als unter Normoxie. Dies könnte sich dadurch erklären, dass die Endothelzellen initial versuchen, die extremen Umgebungskonditionen ebenfalls durch eine erhöhte VEGF-A Sekretion zu überleben, nach dieser anfänglichen Zeit jedoch sich alternative Wege zu Nutze machen. Weitere Studien sollten auf diesem Gebiet durchgeführt werden und auch längere Inkubationszeiträume sollten untersucht werden.

Bezüglich der Expression und Lokalisierung des VEGF-C und VEGF-D oder dem VEGFR-3 in Glioblastomen ist jedoch wenig bekannt. Jenny et al. führten deshalb im Jahr 2006 eine Studie durch, um mehr über den Einfluss dieser Faktoren beim Glioblastom zu erfahren. Sie konnten in ihren Versuchen das Vorhandensein von VEGF-C und VEGFR-3 in Glioblastomen nachweisen obwohl sie in den untersuchten Proben keinerlei lymphatische Gefäße finden konnten. Sie konnten hohe Mengen VEGF-C mRNA in manchen Glioblastom Proben nachweisen, vor allem erneut in den Pseudopalisadenzellen welche nekrotische Areale umgeben, eine Region die für ihre hohe proliferative Angiogenese bekannt ist (Jenny, Harrison et al. 2006). Auch Xu et al. konnten 2013 in ihren Versuchen eine erhöhte VEGF-C Konzentration in Glioblastomzellen nachweisen (Xu, Zhong et al. 2013). Da VEGF-C an

VEGFR-2 binden kann und somit die Angiogenese stimulieren kann, wird vermutet, dass der VEGF-C in der Angiogenese des Glioblastoms eine entscheidende Rolle einnimmt (Kadambi, Mouta Carreira et al. 2001, Tille, Wang et al. 2003). Jenny et al. haben anschließend eine detailliertere Analyse der VEGF-C Expression in Glioblastomen durchgeführt. Diese zeigte, dass mindestens 50% der VEGF-C exprimierenden Zellen Makrophagen/Monozyten sind, welche sich in einem Entzündungszwischenstadium befinden (Jenny, Harrison et al. 2006). Diese VEGF-C Expression in Makrophagen konnte bereits in anderen Tumorarten nachgewiesen werden (Ogawa, Takenaka et al. 2004). Ebenso wurde bereits beschrieben, dass Glioblastome eine höhere Monozyten Infiltration im Vergleich zu anderen primären Gehirntumoren aufweisen und dass sie eine umfangreiche Infiltration von Entzündungszellen aufweisen können (Black, Chen et al. 1992, Strik, Stoll et al. 2004). Die Ergebnisse von Jenny et al. deuten somit auf eine entscheidende Rolle des VEGF-C während der entzündlichen Prozesse innerhalb des Glioblastoms hin. Zusammen mit der Tatsache, dass das zentrale Nervensystem frei von Lymphgefäßen ist, sprechen die o.g. Daten für eine entscheidende Rolle des VEGF-C und VEGF-D sowie des VEGFR-3 im Entzündungsprozess beim Glioblastom, entweder als Ursache oder als Folge der Tumorangiogenese (Jenny, Harrison et al. 2006).

Unsere Ergebnisse untermauern die These, dass der VEGFR-3 eine entscheidende Rolle in der Malignitätsentwicklung der GBM-Zellen einnimmt. Wir konnten zum ersten Mal unter extrem hypoxischen Bedingungen VEGFR-3 mRNA und Proteinexpression sowohl bei U87 Tumorzellen wie auch bei isolierte Endothelzellen nachweisen. Die Tatsache, dass wir bei den U87 Tumorzellen unter Normoxie keine VEGFR-3 mRNA bei unseren Versuchen nachweisen konnten, jedoch unter Hypoxie, war bemerkenswert. In unseren Versuchen bezüglich der Proteinexpression des VEGFR-3 konnten wir keine signifikanten Unterschiede für die U87 Tumorzellen zwischen Normoxie vs. Hypoxie nachweisen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die kurze Inkubationszeit von nur 24 bzw. 72 Stunden noch nicht ausgereichend war, um die erhöhte mRNA-Expression in Protein umzuschreiben, deshalb wäre es in einer weiteren Arbeit interessant zu untersuchen, wie sich die VEGFR-3 mRNA- und Protein-Expression bei längerer Inkubationszeit auswirkt. Bezüglich dem VEGF-C, konnten wir ebenfalls unter Hypoxie eine signifikant höhere Proteinexpression nachweisen. Somit konnten wir die Ergebnisse von Jenny et al. bekräftigen. Der VEGFR-3 scheint für die IEC ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Malignitätsentwicklung und Überlebensstrategie unter extremen Bedingungen einzunehmen. Wir konnten für die IEC787

nach 24 Stunden eine signifikant höhere mRNA Expression unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie nachweisen. Nach 72 Stunden konnte lediglich unter Hypoxie eine mRNA Expression nachgewiesen werden. Auf Proteinebene konnten wir für die IEC784 zu beiden gemessenen Zeitpunkten eine unter hypoxischen Bedingungen signifikant erhöhte VEGFR-3 Expression nachweisen. Bezüglich der VEGF-C Proteinexpression konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen Normoxie vs. Hypoxie feststellen, was sich dadurch erklären könnte, dass die IEC über andere Faktoren bzw. Signalwege die Hochregulierung des VEGFR-3 steuern. Bezüglich VEGFR-2 konnten wir zwar die Expression auf mRNA und Proteinebene unter Normoxie und Hypoxie nachweisen, es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expression. Diese Tatsache könnte daraufhin deuten, dass sowohl die Tumor- als auch die isolierte Endothelzellen unter Hypoxie vermehrt den VEGFR-3 Signalweg nutzen. Auch hier wäre es interessant in einer weiteren Arbeit zu untersuchen, wie sich die VEGFR-3 bzw. VEGF-C Expression unter längerer Inkubationszeit auswirkt.

Im Jahr 2013 wurde eine bisher unbekannte Achse in Tumorzellen erforscht, bei welcher die Aktivierung von VEGF-C/VEGFR-3 über einen E2F1-abhängigen Mechanismus erfolgt. Engelmann et al. konnten zeigen, dass sowohl die Aktivierung vom Rezeptor wie auch vom Liganden, E2F1 abhängig über direkte Interaktion mit ihren Gen-Promotoren stattfindet. Die E2F1 ausgelöste Koregulierung von VEGF-C/VEGFR-3 stimulierte bei kultivierten Endothelzellen die *in vitro* Entwicklung röhrenförmiger Gebilde und begünstigte bei *in vivo* Versuchen die Bildung neuer Blutgefäße. Eine Aktivierung oder erhöhte Expression von E2F1 führte in Tumorzellen zu einer Hochregulierung von VEGFR-3 und seinem Liganden VEGF-C. Parallel dazu führte die Inhibierung von E2F1 oder auch VEGFR-3 zu einer Beeinträchtigung der Tumorneoangiogenese in Melanomxenograften (Engelmann, Mayoli-Nussle et al. 2013). Die identifizierte E2F1/VEGF-C/VEGFR-3-Achse ist daher ein zentraler Mechanismus bei der Tumurvaskularisation (Engelmann, Mayoli-Nussle et al. 2013). Dies hat klinisch eine entscheidende Bedeutung, da die heutzutage eingesetzte antiangiogene Therapie unter anderem zu hypoxischen Zuständen im Tumor führt, was eine Reihe von Anpassungsvorgängen nach sich zieht und schlussendlich zu einem resistenten Phänotypen führt (Abdollahi and Folkman 2010). Studien haben gezeigt, dass es in verschiedenen Tumorzelllinien unter hypoxischen Bedingungen zu einer E2F1 vermittelter Hochregulierung von VEGF-C/VEGFR-3 kommt, was unter anderem erklären könnte, warum die derzeitige

antiangiogene Behandlung vielmehr zur Tumorprogression statt zur Erhöhung der Überlebenszeit der Patienten führt (Engelmann, Mayoli-Nussle et al. 2013).

Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden unter Hypoxie

MAP-Kinasen

Zellulärer Stress, wie z.B. Hypoxie führt zur Aktivierung von diversen Signalwegen, welche das Überleben der Zellen auch unter solch ungünstigen Bedingungen gewährleisten. Die MAPK zählen unter anderem zu den am schnellsten aktivierten Signalwege (Cross, Scheel-Toellner et al. 2000). Bei den MAPK handelt es sich um Serin/Threonin Kinasen, welche gewisse intrazelluläre Signalwege wie z.B. Proliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren (Pearson, Robinson et al. 2001). Viele Studien haben gezeigt, dass ein signifikanter Anteil von GBM hohe Spiegel der phosphorylierten MAPK (p-MAPK) aufweisen (Mawrin, Diete et al. 2003). Patil et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass erhöhte Spiegel aktivierter MAPKs einen starken unabhängigen prognostischen Faktor darstellen, welcher mit einer schlechteren Überlebensrate der GBM Patienten einhergeht. Die Überlebensrate dieser Patienten sank mit zunehmender Konzentration aktivierter MAPKs. Je nachdem wie hoch die gemessenen p-MAPK Konzentrationen waren (gering, mittel, hoch), ergab die Einjahres Überlebensrate jeweils 87%, 63% und 52%. Diese Erkenntnis könnte eine MAPK-abhängige Resistenz gegen die aktuelle GBM-Therapie darstellen (Patil, Nuno et al. 2013).

p42/44 MAPK Signalweg

Der p42/44 MAPK Signalweg ist für das Wachstum, die Differenzierung und für die Entwicklung der Zellen zuständig.

In den vorliegenden durchgeführten Versuchen wurde nach 14-tägiger Kultivierung der Zellen unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen die inaktive und aktive Form der p42/44 MAPK auf Proteinebene untersucht. Wir konnten zeigen, dass nach 14 Tagen die inaktive und die phosphorylierte aktive Form sowohl bei Tumor wie auch bei HBMECs exprimiert wird. In den durchgeführten Western Blots konnte für die aktive phosphorylierte p42/44 MAPK eine signifikant höhere Proteinexpression bei den HBMEC unter Normoxie nachgewiesen werden und für die inaktive nicht phosphorylierte p42/44 MAPK konnte eine signifikant höhere Proteinexpression bei den U87 unter Hypoxie nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch nach 14 Tagen extrem hypoxischen Umgebungskonditionen, sowohl die Tumor- wie auch die Endothelzellen weiterhin intrazelluläre Signalwege exprimieren. Durch die Aktivierung der p42/44 MAPK wird ein weiteres Wachstum und die Entwicklung der Zellen sichergestellt. Diese Expression scheint nebst vielen anderen Signalwegen ein Grund für die erhöhte Malignität der GBM-Zellen zu sein. Denn es zeigte sich, dass die Aktivierung von p42/44 MAPK neben ihrer schon bekannten Funktion, der Kontrolle von Wachstum und Differenzierung der Zellen, auch eine entscheidende Rolle während diverser Schritte der Angiogenese zukommt. Die forcierte Aktivierung der p42/44 MAPK bewirkt einen Apoptoseschutz der Zellen, der Zellzyklus der Endothelzellen wird eingeleitet und es kommt zu einer erhöhten VEGF-A Expression durch entsprechender Hochregulierung seiner Transkription (Berra, Milanini et al. 2000).

p38-MAPK und SAPK/JNK Signalwege

Der p38-MAPK Signalweg ist für das Überleben der Zellen mittels Apoptoseregulation und das Wachstum der Zellen verantwortlich. Ebenfalls reguliert die p38-MAPK das Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen.

Wir konnten in unseren Versuchen zum Zeitpunkt 14 Tage keine aktivierte Form der p38-MAPK in Tumorzellen nachweisen, weder unter Normoxie- noch Hypoxie-Bedingungen. Dies lässt sich mit der zeitgebundenen Aktivierung der verschiedenen MAPK erklären. Da die aktuelle Studienlage nur Versuche beinhaltet, bei welchen die Zellen für deutlich kürzere Zeiten inkubiert wurden, konnten wir in unseren Versuchen zeigen, dass sowohl die Tumorzellen U87 wie auch die Tumorzellen U251 nach 14 Tagen nur die nicht aktive Form der p38-MAPK auf Proteinebene exprimieren.

Die untersuchten HBMEC exprimierten zum Zeitpunkt 14 Tage sowohl die nicht aktive wie auch die aktive Form der p38-MAPK diese zeigte jedoch eine signifikant höhere Proteinexpression unter Normoxie vs. Hypoxie. Für die inaktive nicht phosphorylierte p38 MAPK konnte bei den U87 eine signifikant höhere Proteinexpression unter Hypoxie vs. Normoxie nachgewiesen werden und für die U251 und HBMEC zeigte sich ein umgekehrtes Verhältnis, die Proteinexpression unter Normoxie war signifikant höher im Vergleich zur Proteinexpression unter Hypoxie. Dies deutet daraufhin, dass die untersuchten Endothelzellen im Vergleich zu den untersuchten Tumorzellen einen zeitlich unterschiedlich

regulierten Ablauf der Aktivierung der p38-MAPK aufweisen. Die Tatsache, dass die Endothelzellen die aktivierte Form ebenfalls unter extrem hypoxischen Bedingungen exprimieren, könnte mit den Ergebnissen unserer zuvor durchgeführten Versuchen, bei welchen wir zeigen konnten, dass die Endothelzellen zu den gemessenen Zeitpunkten anpassungsfähiger und apoptose-resistenter als Tumorzellen sind und ein deutlich höheres Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten als die Tumorzellen aufweisen, zusammenhängen.

Dies entspricht den Ergebnissen von Zhang et al. welche in ihrer Studie die Rolle von Bcl-2, ein antiapoptotisches Protein, welches auch angiogene Fähigkeiten besitzt, in der durch Hypoxie induzierten Angiogenese von Endothelzellen untersuchten. Sie konnten zeigen, dass unter Hypoxieinkubation eine zeitabhängige Hochregulierung der Bcl-2-Expression nach 2 bis 72 Stunden auftrat, mit einem Konzentrationspeak nach 12 Stunden. Ebenfalls zeigte die Studie, dass in HAECs (human aortic endothelial cells) die Hypoxie induzierte Bcl-2-Expression durch die p38-MAPK vermittelt wird. Durch die p38-MAPK-Inhibition kam es zu einer Blockierung der Bcl-2 Expression. Während der Knockdown von Bcl-2 zu einer verminderten Proliferation und Migration der HAECs führte, zeigte die Überexpression von Bcl-2 eine erhöhte Bildung röhrenartiger Formationen derselben (Zhang, Song et al. 2010). Daher scheint die p38-MAPK eine entscheidende Rolle im Vorgang der Angiogenese einzunehmen.

Ähnliche Ergebnisse zeigte die durchgeführte Studie von Lee et al. an hMSC's (human umbilical cord blood mesenchymal stem cell). Die VEGF gesteuerte FAK (focal adhesion kinase)-Phosphorylierung führte zu einer erhöhten Migration der hMSC's. Hypoxie (2,2% O₂) führte in dieser Studie zu einer frühen, transienten erhöhten Phosphorylierung der p38-MAPK und der SAPK/JNK. Die Aktivierung war Zeitgebunden, in den ersten 60 Minuten kam es zu einer deutlichen Hochregulierung der phosphorylierten Formen, während es anschließend zu einer erneuten leichten Abnahme kam. Die Versuche wurden allerdings nur über insgesamt 180 Minuten Hypoxie durchgeführt (Lee, Lee et al. 2010).

Der SAPK/JNK Signalweg ist zusammen mit dem p38-MAPK Signalweg für das Überleben der Zellen mittels Apoptoseregulation und für das Wachstum der Zellen verantwortlich.

Wir konnten in unseren Versuchen die aktive Form der SAPK/JNK sowohl in Tumor- wie auch in Endothelzellen nachweisen. Dafür wurden wie bei den zuvor durchgeführten Versuchen die Zellen für 14 Tage unter Normoxie- und extremen Hypoxie-Bedingungen inkubiert und anschließend auf das Vorhandensein der SAPK auf Proteinebene untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass beide Zellarten auch nach 14 Tagen extrem hypoxischen Umgebungskonditionen weiterhin den SAPK/JNK Signalweg exprimieren. In den durchgeführten Western Blots konnte sowohl für die aktive phosphorylierte SAPK/JNK sowie für die inaktive nicht phosphorylierte SAPK/JNK bei den U87 eine signifikant höhere Proteinexpression unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie nachgewiesen werden.

Der SAPK/JNK ist ein weiterer Signalweg, durch welchen die GBM-Zellen ein Überleben der Zellen gewährleisten können. Durch die additive Aktivierung der p38-MAPK und der SAPK/JNK könnte es zu einem verstärkten Apoptoseschutz der Zellen kommen, was wiederum die erhöhte Malignität und das Überleben und Wachstum der GBM Zellen erklären könnte.

In diversen Studien an anderen Hirntumoren konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung des SAPK/JNK Signalweges in astrozytären Tumoren mit dem Malignitätsgrad der WHO-Klassifikation korreliert (Li, Wang et al. 2008). Es wird diskutiert, dass das GBM sein malignes Potential sogenannter Tumorstammzellen verdankt und dass diese sowohl Stammzeleigenschaften (wie die Selbsterneuerungskapazität und multipotente Differenzierung) wie auch Tumorinitiierungs-Potential besitzen (Clevers 2011, Daniele, Costa et al. 2015). Matsuda et al. konnten in ihrer Studie den SAPK/JNK Signalweg als den entscheidenden Regulator der Selbsterneuerungs- und Tumorinitiierungs-Eigenschaft der Stammzellen im Glioblastom identifizieren. Ihren Ergebnissen zur Folge gehen sie davon aus, dass der gezeigte Antitumor-Effekt des SAPK-Inhibitors wegen seiner spezifischen Aktivität zur Verminderung von Tumorstammzellen führt. Sie konnten in ihren später durchgeführten *in vivo* Versuchen ebenfalls zeigen, dass die kurzfristige Gabe eines reversiblen SAPK-Inhibitors ausreicht um auf längere Sicht einen präventiven Einfluss gegen die sekundäre Tumorbildung aufzuweisen (Matsuda, Sato et al. 2012).

AKT Signalweg

Der AKT-Signalweg ist für das Überleben der Zellen durch Inhibition der Apoptose verantwortlich.

Wir konnten zeigen, dass nach 14 Tagen die inaktive und beide phosphorylierte aktive Formen sowohl bei Tumor wie auch bei HBMECs exprimiert werden. In den durchgeführten Western Blots konnte sowohl für die aktive phosphorylierte AKT (Serin) und AKT (Threonin) sowie für die inaktive nicht phosphorylierte AKT bei den U87 eine signifikant höhere Proteinexpression unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie nachgewiesen werden. Somit sind die Zellen unter extrem hypoxischen Bedingungen zu diesem Zeitpunkt, unter anderem über den AKT-MAPK Signalweg, stark gegen Apoptose geschützt, was zu einem Überleben der Zellen führt. Dieser Signalweg scheint eine tragende Rolle bei der malignen Wachstumsentwicklung der GBM-Zellen einzunehmen. In unseren vorherigen Versuchen konnten wir bereits zeigen, dass die Tumor- und Endothelzellen zu dem gemessenen Zeitpunkt unter extremen Hypoxie-Bedingungen über eine Vielfalt aktivierter Signalwege verfügen, welche zum Überleben der Zellen beitragen. Die Tatsache, dass sie sich über diesen Signalweg ebenfalls schützen, zeigt erneut die Fähigkeit dieser Zellen, sich an ungünstige Umgebungskonditionen über die Aktivierung verschiedenster Signalwege, zu adaptieren.

Salev et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Mehrzahl der von ihnen untersuchten GBM erhöhte Spiegel von AKT aufwiesen, was wiederum eine Amplifikation der antiapoptotischen Signale und eine Blockierung der Tumorsuppressorgene (unter anderem p53) zur Folge hat (Haas-Kogan, Shalev et al. 1998). Der Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 kommt in der Malignitätsentstehung des GBM eine tragende Rolle zu, da somit gewisse Zellen verschiedene Kontrollpunkte des Zellzyklus entkommen können (Mayo and Donner 2001).

Blum et al. zeigte das Vorhandensein von E2F1 im GBM. Sie konnten zeigen, dass FTS (farnesylthiosalicylic acid) -ein Ras-Inhibitor- zwei verschiedene Signalwege, welche entscheidend für die Energieproduktion und Proliferation der U87 GBM-Zellen sind, supprimiert. Bei den zwei gehemmten Signalwegen handelt es sich um Raf/MEK/ERK und PI3K/AKT/GSK3 β . Die Inhibition von Ras führt zu verminderten Konzentrationen von ERK und

AKT, was wiederum eine Verminderung von HIF-1 α und E2F1 zur Folge hat. Sie konnten zeigen, dass eine Verminderung des HIF-1 α zur Stilllegung der Glykolyse und dass eine Verminderung des E2F1 zum Zellzyklusarrest der Zellen führte (Blum, Nakdimon et al. 2006). Unsere durchgeführten Versuche bezüglich des AKT-Signalweges konnten ähnliche Ergebnisse zeigen. Wir konnten nach 14 tägiger Kultivierung unter extremen Hypoxie-Bedingungen bei den Tumorzellen eine Hochregulierung des AKT-Signalweges feststellen. Somit könnte die Inhibition von Ras, mit einer konsekutiven Herunterregulierung von HIF-1 α , E2F1 und VEGF-C, einen möglichen neuen Therapieansatz zur Behandlung des GBM darstellen.

9 Zusammenfassung

Das Glioblastoma Multiforme stellt den häufigsten und invasivsten Tumor des zentralen Nervensystems bei Erwachsenen dar. Ein kennzeichnendes Merkmal ist die ausgeprägte Angiogenese. Die Prognose ist trotz Goldstandard-Therapie nach dem Stupp-Schema mit 15 Monaten weiterhin infaust. Die Erkenntnis, dass der VEGF-A-Signalweg eine essenzielle Rolle für die Tumorangio-genese spielt, führte zur Entwicklung neuer Therapiestrategien, welche auf einer Inhibition dieses Signalweges beruhen. Allerdings war die zufriedenstellende Reaktion des Tumors auf die Therapie nur transient. Die eingesetzte antiangiogene Therapie führt unter anderem zu hypoxischen Zuständen im Tumor. Ein Zustand, welcher nach einer gewissen Latenzzeit, zu einer Resistenzentwicklung der Zellen gegenüber der Therapie und somit zu Rezidiven und weiterer Progression führt. Die Aggressivität und die Invasivität der Tumorzellen ist bei Rezidiven erhöht und die Fähigkeit der Tumorzellen in distante Regionen zu migrieren und zu invadieren, ist gesteigert. Unzählige Mechanismen, die es den GBM-Zellen ermöglicht sich an ungünstige Umgebungsbedingungen zu adaptieren und damit zur Resistenzentwicklung gegen die aktuellen Therapien beitragen, sind bereits beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war es das Proliferations- und Migrationsverhalten, sowie die Expression des VEGFR-3 bei Tumor- und Endothelzellen unter extrem hypoxischen Bedingungen und dem Einfluss von VEGFs zu untersuchen. Ebenfalls wollten wir das Verhalten verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden unter extremer Langzeithypoxie analysieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Proliferationsverhalten der Tumor- und Endothelzellen unter extrem hypoxischen Bedingungen, O₂-Gehalt von nur 0,1% zum ersten Mal untersucht. Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass die untersuchten Zelllinien unter diesen Bedingungen eine gesteigerte Proliferationsrate aufweisen. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass durch die additive Wirkung gewisser VEGFs und extremer Hypoxie das Migrationsverhalten der Endothelzellen gesteigert wird.

In der Literatur wurde bereits die Expression des VEGFR-3 unter Hypoxie-Bedingungen (bis O₂ Konzentrationen von mind. 1%) untersucht. In dieser Arbeit konnte jedoch zum ersten Mal die Expression auch unter nur 0,1% O₂-Gehalt nachgewiesen werden. In unseren Versuchen konnten wir sogar zu den gemessenen Zeitpunkten nur unter extremen Hypoxie-Bedingungen eine VEGFR-3 mRNA Expression sowohl in Tumorzellen wie auch in

Endothelzellen nachweisen, während wir unter Normoxie-Bedingungen keine VEGFR-3 mRNA Expression nachweisen konnten. In Kongruenz dazu, konnten wir bei den U87 Zellen nach 72 Stunden Hypoxie eine signifikant höhere VEGF-C mRNA Expression, dem zuständigen Liganden von VEGFR-3, nachweisen. Dies könnte darauf hindeuten, dass der VEGFR-3/VEGF-C Signalweg eine entscheidende Rolle in der Malignitätsentwicklung der GBM-Zellen einnimmt.

Abschließend konnten wir in unserer Studie das Vorhandensein aktiver intrazellulärer Signalwege nach extremer Langzeithypoxie zum ersten Mal nachweisen. Durch diese Aktivierung schützen sich die Tumor- und Endothelzellen vor dem Apoptose Vorgang und besitzen ein erhöhtes Proliferations- und Migrationspotential. Wir konnten zeigen, dass die Tumorzellen U87 für alle inaktivierten MAPKs signifikant höhere mRNA Expressionen unter Hypoxie Bedingungen aufwiesen. Bei der aktiven phosphorylierten SAPK/JNK und beider aktiven phosphorylierten AKTs (Serin und Threonin) konnte bei den U87 Tumorzelllinien ebenfalls eine signifikant höhere mRNA Expression unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu Normoxie nachgewiesen werden. Dies könnte daraufhin deuten, dass diese Signalwege unter extrem hypoxischen Bedingungen durch Hochregulierung im Glioblastom bei den U87 Tumorzellen eine entscheidende Rolle in der Resistenzentwicklung spielen.

Unsere Ergebnisse unterstützen die aktuelle Studienlage. Das GBM ist ein extrem anpassungsfähiger und resistenter Tumor, welcher unter hypoxischen Bedingungen zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege und die Expression von verschiedenen Rezeptoren und dessen Liganden führt. Diese multiplen Ausweichmechanismen könnten das Scheitern der aktuellen Therapieansätze erklären.

10 Literaturverzeichnis

Abakumov, M. A., et al. (2015). "VEGF-targeted magnetic nanoparticles for MRI visualization of brain tumor." Nanomedicine **11**(4): 825-833.

Abdollahi, A. and J. Folkman (2010). "Evading tumor evasion: current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy." Drug Resist Updat **13**(1-2): 16-28.

Achen, M. G., et al. (1998). "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): 548-553.

Amberger-Murphy, V. (2009). "Hypoxia helps glioma to fight therapy." Curr Cancer Drug Targets **9**(3): 381-390.

Arita, H., et al. (2013). "Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss." Acta Neuropathol **126**(2): 267-276.

Aum, D. J., et al. (2014). "Molecular and cellular heterogeneity: the hallmark of glioblastoma." Neurosurg Focus **37**(6): E11.

Ausprunk, D. H. and J. Folkman (1977). "Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis." Microvasc Res **14**(1): 53-65.

Awad, A. W., et al. (2017). "Impact of removed tumor volume and location on patient outcome in glioblastoma." J Neurooncol.

Bao, S., et al. (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." Nature **444**(7120): 756-760.

Bar, E. E., et al. (2010). "Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres." Am J Pathol **177**(3): 1491-1502.

Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nat Rev Cancer **3**(6): 401-410.

Berra, E., et al. (2000). "Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia." Biochem Pharmacol **60**(8): 1171-1178.

Bhat, K. P. L., et al. (2013). "Mesenchymal differentiation mediated by NF-kappaB promotes radiation resistance in glioblastoma." Cancer Cell **24**(3): 331-346.

Bianco, J., et al. (2017). "On glioblastoma and the search for a cure: where do we stand?" Cell Mol Life Sci.

Black, K. L., et al. (1992). "Inflammatory leukocytes associated with increased immunosuppression by glioblastoma." J Neurosurg **77**(1): 120-126.

Bleeker, F. E., et al. (2010). "The prognostic IDH1(R132) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma." Acta Neuropathol **119**(4): 487-494.

Blum, R., et al. (2006). "E2F1 identified by promoter and biochemical analysis as a central target of glioblastoma cell-cycle arrest in response to Ras inhibition." Int J Cancer **119**(3): 527-538.

Brat, D. J., et al. (2004). "Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population." Cancer Res **64**(3): 920-927.

Brat, D. J. and T. B. Mapstone (2003). "Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and its role in tumor progression." Ann Intern Med **138**(8): 659-668.

Brennan, C. W., et al. (2013). "The somatic genomic landscape of glioblastoma." Cell **155**(2): 462-477.

Brockmann, M. A., et al. (2003). "Glioblastoma and cerebral microvascular endothelial cell migration in response to tumor-associated growth factors." Neurosurgery **52**(6): 1391-1399; discussion 1399.

Cao, Z., et al. (2013). "Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: a systemic review and meta-analysis." Eur J Cancer **49**(18): 3914-3923.

Carpenter, R. L., et al. (2015). "The gain-of-function GLI1 transcription factor TGLI1 enhances expression of VEGF-C and TEM7 to promote glioblastoma angiogenesis." Oncotarget **6**(26): 22653-22665.

Cavazos, D. A. and A. J. Brenner (2016). "Hypoxia in astrocytic tumors and implications for therapy." Neurobiol Dis **85**: 227-233.

Chaudhry, I. H., et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor expression correlates with tumour grade and vascularity in gliomas." Histopathology **39**(4): 409-415.

Chen, R., et al. (2016). "Targeted Therapeutics in Patients With High-Grade Gliomas: Past, Present, and Future." Curr Treat Options Oncol **17**(8): 42.

Chen, R., et al. (2015). "Molecular features assisting in diagnosis, surgery, and treatment decision making in low-grade gliomas." Neurosurg Focus **38**(3): E2.

Chinot, O. L., et al. (2011). "AVAglio: Phase 3 trial of bevacizumab plus temozolomide and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme." Adv Ther **28**(4): 334-340.

Chinot, O. L., et al. (2014). "Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma." N Engl J Med **370**(8): 709-722.

Clara, C. A., et al. (2014). "Angiogenesis and expression of PDGF-C, VEGF, CD105 and HIF-1alpha in human glioblastoma." Neuropathology **34**(4): 343-352.

Clevers, H. (2011). "The cancer stem cell: premises, promises and challenges." Nat Med **17**(3): 313-319.

Cohen, M. H., et al. (2009). "FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme." Oncologist **14**(11): 1131-1138.

Colwell, N., et al. (2017). "Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells." Neuro Oncol **19**(7): 887-896.

Corroyer-Dulmont, A., et al. (2015). "Imaging Modalities to Assess Oxygen Status in Glioblastoma." Front Med (Lausanne) **2**: 57.

Cross, T. G., et al. (2000). "Serine/threonine protein kinases and apoptosis." Exp Cell Res **256**(1): 34-41.

Cunnick, G. H., et al. (2008). "Lymphangiogenesis and lymph node metastasis in breast cancer." Mol Cancer **7**: 23.

D'Alessio, A., et al. (2016). "Analysis of angiogenesis related factors in glioblastoma, peritumoral tissue and their derived cancer stem cells." Oncotarget **7**(48): 78541-78556.

Daga, A., et al. (2011). "New perspectives in glioma immunotherapy." Curr Pharm Des **17**(23): 2439-2467.

Dang, L., et al. (2009). "Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate." Nature **462**(7274): 739-744.

Daniele, S., et al. (2015). "Combined inhibition of AKT/mTOR and MDM2 enhances Glioblastoma Multiforme cell apoptosis and differentiation of cancer stem cells." Sci Rep **5**: 9956.

Denham, J. W. and M. Hauer-Jensen (2002). "The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'." Radiother Oncol **63**(2): 129-145.

di Tomaso, E., et al. (2011). "Glioblastoma recurrence after cediranib therapy in patients: lack of "rebound" revascularization as mode of escape." Cancer Res **71**(1): 19-28.

Dixit, S. and M. Hingorani (2015). "Comparative efficacy of bevacizumab and PCV chemotherapy in recurrent glioblastoma." Clin Oncol (R Coll Radiol) **27**(4): 246-247.

Dullea, A. and L. Marignol (2016). "MGMT testing allows for personalised therapy in the temozolomide era." Tumour Biol **37**(1): 87-96.

Dvorak, H. F. (2000). "VPF/VEGF and the angiogenic response." Semin Perinatol **24**(1): 75-78.

Dvorak, H. F., et al. (1995). "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis." Am J Pathol **146**(5): 1029-1039.

Eckel-Passow, J. E., et al. (2015). "Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors." N Engl J Med **372**(26): 2499-2508.

El Hallani, S., et al. (2010). "A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry." Brain **133**(Pt 4): 973-982.

Ellor, S. V., et al. (2014). "Glioblastoma: background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations." J Law Med Ethics **42**(2): 171-182.

Engelmann, D., et al. (2013). "E2F1 promotes angiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 axis in a feedback loop for cooperative induction of PDGF-B." J Mol Cell Biol **5**(6): 391-403.

Ezhilarasan, R., et al. (2007). "Glioma cells suppress hypoxia-induced endothelial cell apoptosis and promote the angiogenic process." Int J Oncol **30**(3): 701-707.

Farias-Eisner, G., et al. (2012). "Glioblastoma biomarkers from bench to bedside: advances and challenges." Br J Neurosurg **26**(2): 189-194.

Ferrara, N. (2009). "VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth." Eur Cytokine Netw **20**(4): 158-163.

Ferrara, N. and T. Davis-Smyth (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." Endocr Rev **18**(1): 4-25.

Ferrara, N., et al. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-676.

Furnari, F. B., et al. (2007). "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment." Genes Dev **21**(21): 2683-2710.

Gaelzer, M. M., et al. (2016). "Hypoxic and Reoxygenated Microenvironment: Stemness and Differentiation State in Glioblastoma." Mol Neurobiol.

Garayoa, M., et al. (2000). "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis." Mol Endocrinol **14**(6): 848-862.

Gieser, Eugenie (2014). "VEGF-Rezeptor 3 als vielversprechendes Target im malignen Gliom." Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät.

Gilbert, M. R., et al. (2014). "A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma." N Engl J Med **370**(8): 699-708.

Goel, H. L. and A. M. Mercurio (2013). "VEGF targets the tumour cell." Nat Rev Cancer **13**(12): 871-882.

Goldman, S. (2003). "Glia as neural progenitor cells." Trends Neurosci **26**(11): 590-596.

Haas-Kogan, D., et al. (1998). "Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC." Curr Biol **8**(21): 1195-1198.

Halin, C., et al. (2001). "Antibody-based targeting of angiogenesis." News Physiol Sci **16**: 191-194.

Hamerlik, P., et al. (2012). "Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth." J Exp Med **209**(3): 507-520.

Han, F. H., et al. (2010). "The effect of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor-3 on the clinical outcome in patients with gastric carcinoma." Eur J Surg Oncol **36**(12): 1172-1179.

Hardee, M. E. and D. Zagzag (2012). "Mechanisms of glioma-associated neovascularization." Am J Pathol **181**(4): 1126-1141.

Hegi, M. E., et al. (2005). "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 997-1003.

Hicklin, D. J. and L. M. Ellis (2005). "Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis." J Clin Oncol **23**(5): 1011-1027.

Hillen, F. and A. W. Griffioen (2007). "Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond." Cancer Metastasis Rev **26**(3-4): 489-502.

Hockel, M. and P. Vaupel (2001). "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." J Natl Cancer Inst **93**(4): 266-276.

Holash, J., et al. (1999). "Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF." Science **284**(5422): 1994-1998.

Hou, L. C., et al. (2006). "Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options." Neurosurg Focus **20**(4): E5.

Huang, F., et al. (2008). "When temozolomide alone fails: adding procarbazine in salvage therapy of glioma." Can J Neurol Sci **35**(2): 192-197.

Huang, W., et al. (2018). "Hypoxia enhances the migration and invasion of human glioblastoma U87 cells through PI3K/Akt/mTOR/HIF-1alpha pathway." Neuroreport **29**(18): 1578-1585.

Huang, W. J., et al. (2016). "Glioblastoma multiforme: Effect of hypoxia and hypoxia inducible factors on therapeutic approaches." Oncol Lett **12**(4): 2283-2288.

Ichimura, K. (2012). "Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas." Brain Tumor Pathol **29**(3): 131-139.

Iida, T., et al. (2002). "Hypoxia-inducible factor-1alpha induces cell cycle arrest of endothelial cells." Genes Cells **7**(2): 143-149.

Inda, M. M., et al. (2014). "Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature." Cancers (Basel) **6**(1): 226-239.

Jaber, M., et al. (2016). "The Value of 5-Aminolevulinic Acid in Low-grade Gliomas and High-grade Gliomas Lacking Glioblastoma Imaging Features: An Analysis Based on Fluorescence, Magnetic Resonance Imaging, 18F-Fluoroethyl Tyrosine Positron Emission Tomography, and Tumor Molecular Factors." Neurosurgery **78**(3): 401-411; discussion 411.

Jaenisch, R. and A. Bird (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." Nat Genet **33** Suppl: 245-254.

Jain, R. K. (2013). "Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers." J Clin Oncol **31**(17): 2205-2218.

Jain, R. K., et al. (2007). "Angiogenesis in brain tumours." Nat Rev Neurosci **8**(8): 610-622.

Jeltsch, M., et al. (1997). "Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice." Science **276**(5317): 1423-1425.

Jenny, B., et al. (2006). "Expression and localization of VEGF-C and VEGFR-3 in glioblastomas and haemangioblastomas." J Pathol **209**(1): 34-43.

Johnson, B. E., et al. (2014). "Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma." Science **343**(6167): 189-193.

Joseph, J. V., et al. (2015). "Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1alpha-ZEB1 axis." Cancer Lett **359**(1): 107-116.

Joukov, V., et al. (1998). "A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities." J Biol Chem **273**(12): 6599-6602.

Joukov, V., et al. (1996). "A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases." EMBO J **15**(2): 290-298.

Jovcevska, I., et al. (2013). "Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know?" Mol Clin Oncol **1**(6): 935-941.

Kadambi, A., et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C differentially affects tumor vascular function and leukocyte recruitment: role of VEGF-receptor 2 and host VEGF-A." Cancer Res **61**(6): 2404-2408.

Kaloshi, G., et al. (2007). "Temozolomide for low-grade gliomas: predictive impact of 1p/19q loss on response and outcome." Neurology **68**(21): 1831-1836.

Karamboulas, C. and L. Ailles (2013). "Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors." Biochim Biophys Acta **1830**(2): 2481-2495.

Kathagen-Buhmann, A., et al. (2016). "Glycolysis and the pentose phosphate pathway are differentially associated with the dichotomous regulation of glioblastoma cell migration versus proliferation." Neuro Oncol **18**(9): 1219-1229.

Keith, B., et al. (2011). "HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression." Nat Rev Cancer **12**(1): 9-22.

Kesari, S. (2011). "Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments." Semin Oncol **38 Suppl 4**: S2-10.

Kim, J., et al. (2015). "Spatiotemporal Evolution of the Primary Glioblastoma Genome." Cancer Cell **28**(3): 318-328.

Kreisl, T. N., et al. (2009). "Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma." J Clin Oncol **27**(5): 740-745.

Krex, D., et al. (2007). "Long-term survival with glioblastoma multiforme." Brain **130**(Pt 10): 2596-2606.

Kurz, H., et al. (2003). "Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function." News Physiol Sci **18**: 65-70.

Lee, J., et al. (1996). "Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 1988-1992.

Lee, S. H., et al. (2010). "Role of FAK phosphorylation in hypoxia-induced hMSCS migration: involvement of VEGF as well as MAPKS and eNOS pathways." Am J Physiol Cell Physiol **298**(4): C847-856.

Li, J. Y., et al. (2008). "Constitutive activation of c-Jun N-terminal kinase correlates with histologic grade and EGFR expression in diffuse gliomas." J Neurooncol **88**(1): 11-17.

Li, P., et al. (2013). "Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an in vitro study." Int J Med Sci **10**(4): 399-407.

Li, Z., et al. (2009). "Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells." Cancer Cell **15**(6): 501-513.

Liu, X., et al. (2013). "Highly prevalent TERT promoter mutations in bladder cancer and glioblastoma." Cell Cycle **12**(10): 1637-1638.

Liu, Z., et al. (2011). "Demonstration of vasculogenic mimicry in astrocytomas and effects of Endostar on U251 cells." Pathol Res Pract **207**(10): 645-651.

Louis, D. N., et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.

Louis, D. N., et al. (2016). "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary." Acta Neuropathol **131**(6): 803-820.

Machein, M. R. and K. H. Plate (2000). "VEGF in brain tumors." J Neurooncol **50**(1-2): 109-120.

Mahase, S., et al. (2017). "Hypoxia-Mediated Mechanisms Associated with Antiangiogenic Treatment Resistance in Glioblastomas." Am J Pathol **187**(5): 940-953.

Malmstrom, A., et al. (2012). "Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial." Lancet Oncol **13**(9): 916-926.

Mandriota, S. J., et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis." EMBO J **20**(4): 672-682.

Mangani, D., et al. (2017). "The network of immunosuppressive pathways in glioblastoma." Biochem Pharmacol **130**: 1-9.

Maniotis, A. J., et al. (1999). "Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry." Am J Pathol **155**(3): 739-752.

Mannino, M. and A. J. Chalmers (2011). "Radioresistance of glioma stem cells: intrinsic characteristic or property of the 'microenvironment-stem cell unit'?" Mol Oncol **5**(4): 374-386.

Manrique-Guzman, S. (2016). "[Biomarkers in high-grade gliomas: A systematic review]." Gac Med Mex **152**(1): 87-93.

Mao, P., et al. (2013). "Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(21): 8644-8649.

Mao, X. G., et al. (2013). "CDH5 is specifically activated in glioblastoma stemlike cells and contributes to vasculogenic mimicry induced by hypoxia." Neuro Oncol **15**(7): 865-879.

Matsuda, K., et al. (2012). "Targeting JNK for therapeutic depletion of stem-like glioblastoma cells." Sci Rep **2**: 516.

Mawrin, C., et al. (2003). "Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme." Int J Oncol **23**(3): 641-648.

Mayo, L. D. and D. B. Donner (2001). "A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11598-11603.

Mendichovszky, I. and A. Jackson (2011). "Imaging hypoxia in gliomas." Br J Radiol **84 Spec No 2**: S145-158.

Miller, C. R. and A. Perry (2007). "Glioblastoma." Arch Pathol Lab Med **131**(3): 397-406.

Millward, C. P., et al. (2016). "The impact of MGMT methylation and IDH-1 mutation on long-term outcome for glioblastoma treated with chemoradiotherapy." Acta Neurochir (Wien) **158**(10): 1943-1953.

Multhoff, G., et al. (2014). "Critical role of aberrant angiogenesis in the development of tumor hypoxia and associated radioresistance." Cancers (Basel) **6**(2): 813-828.

Murat, A., et al. (2009). "Modulation of angiogenic and inflammatory response in glioblastoma by hypoxia." PLoS One **4**(6): e5947.

Nakano, I. (2015). "Stem cell signature in glioblastoma: therapeutic development for a moving target." J Neurosurg **122**(2): 324-330.

Narayana, A., et al. (2012). "Change in pattern of relapse after antiangiogenic therapy in high-grade glioma." Int J Radiat Oncol Biol Phys **82**(1): 77-82.

Narayana, A., et al. (2006). "Intensity-modulated radiotherapy in high-grade gliomas: clinical and dosimetric results." Int J Radiat Oncol Biol Phys **64**(3): 892-897.

Nduom, E. K., et al. (2015). "Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma." Neuro Oncol **17 Suppl 7**: vii9-vii14.

Nestler, U., et al. (2015). "Anatomic features of glioblastoma and their potential impact on survival." Acta Neurochir (Wien) **157**(2): 179-186.

Nico, B., et al. (2010). "Intussusceptive microvascular growth in human glioma." Clin Exp Med **10**(2): 93-98.

Noch, E. K., et al. (2018). "Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance." World Neurosurg **116**: 505-517.

Noell, S., et al. (2015). "Experiences in surgery of primary malignant brain tumours in the primary sensori-motor cortex practical recommendations and results of a single institution." Clin Neurol Neurosurg **136**: 41-50.

Nomura, M., et al. (1995). "Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes." J Biol Chem **270**(47): 28316-28324.

Ogawa, E., et al. (2004). "Clinical significance of VEGF-C status in tumour cells and stromal macrophages in non-small cell lung cancer patients." Br J Cancer **91**(3): 498-503.

Ohgaki, H., et al. (2004). "Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study." Cancer Res **64**(19): 6892-6899.

Ohgaki, H. and P. Kleihues (2013). "The definition of primary and secondary glioblastoma." Clin Cancer Res **19**(4): 764-772.

Oike, T., et al. (2013). "Radiotherapy plus concomitant adjuvant temozolomide for glioblastoma: Japanese mono-institutional results." PLoS One **8**(11): e78943.

Olofsson, B., et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11709-11714.

Ostrom, Q. T., et al. (2014). "CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011." Neuro Oncol **16** **Suppl 4**: iv1-63.

Pardridge, W. M. (2007). "Blood-brain barrier delivery." Drug Discov Today **12**(1-2): 54-61.

Patil, C. G., et al. (2013). "High levels of phosphorylated MAP kinase are associated with poor survival among patients with glioblastoma during the temozolomide era." Neuro Oncol **15**(1): 104-111.

Pearson, G., et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-183.

Pepper, M. S., et al. (2003). "Lymphangiogenesis and tumor metastasis." Cell Tissue Res **314**(1): 167-177.

Peres, E. A., et al. (2015). "Silencing erythropoietin receptor on glioma cells reinforces efficacy of temozolomide and X-rays through senescence and mitotic catastrophe." Oncotarget **6**(4): 2101-2119.

Perry, J., et al. (2006). "The use of prophylactic anticonvulsants in patients with brain tumours-a systematic review." Curr Oncol **13**(6): 222-229.

Peters, K., et al. (2005). "Paradoxical effects of hypoxia-mimicking divalent cobalt ions in human endothelial cells in vitro." Mol Cell Biochem **270**(1-2): 157-166.

Plate, K. H., et al. (1994). "Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis." Brain Pathol **4**(3): 207-218.

Plate, K. H., et al. (1992). "Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo." Nature **359**(6398): 845-848.

Rahman, R., et al. (2010). "Antiangiogenic therapy and mechanisms of tumor resistance in malignant glioma." J Oncol **2010**: 251231.

Ramirez, Y. P., et al. (2013). "Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance." Pharmaceuticals (Basel) **6**(12): 1475-1506.

Reardon, D. A., et al. (2011). "A review of VEGF/VEGFR-targeted therapeutics for recurrent glioblastoma." J Natl Compr Canc Netw **9**(4): 414-427.

Reitman, Z. J. and H. Yan (2010). "Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism." J Natl Cancer Inst **102**(13): 932-941.

Ricci-Vitiani, L., et al. (2010). "Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells." Nature **468**(7325): 824-828.

Rizvi, S., et al. (2010). "Gliosarcoma: a rare variant of glioblastoma multiforme." J Pak Med Assoc **60**(9): 773-775.

Rong, Y., et al. (2006). "'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis." J Neuropathol Exp Neurol **65**(6): 529-539.

Russell, S. M., et al. (2009). "Glioma vascularity correlates with reduced patient survival and increased malignancy." Surg Neurol **72**(3): 242-246; discussion 246-247.

Ryan, H. E., et al. (1998). "HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization." EMBO J **17**(11): 3005-3015.

Saharinen, P. and T. V. Petrova (2004). "Molecular regulation of lymphangiogenesis." Ann N Y Acad Sci **1014**: 76-87.

Sasaki, H. and K. Yoshida (2017). "Treatment Recommendations for Adult Patients with Diffuse Gliomas of Grades II and III According to the New WHO Classification in 2016." Neurol Med Chir (Tokyo).

Schiff, D., et al. (2015). "Medical management of brain tumors and the sequelae of treatment." Neuro Oncol **17**(4): 488-504.

Schuessler, A., et al. (2014). "Cellular immunotherapy directed against human cytomegalovirus as a novel approach for glioblastoma treatment." Oncoimmunology **3**: e29381.

Scully, S., et al. (2012). "Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas." J Neurosci **32**(37): 12950-12960.

Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(10): 721-732.

Senger, D. R., et al. (1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." Science **219**(4587): 983-985.

Shi, H., et al. (2015). "Ubiquitin ligase Siah1 promotes the migration and invasion of human glioma cells by regulating HIF-1 α signaling under hypoxia." Oncol Rep **33**(3): 1185-1190.

Shibuya, M. (2009). "Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: therapeutic aspects of vascular endothelial growth factor." FEBS J **276**(17): 4636-4643.

Shweiki, D., et al. (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." Nature **359**(6398): 843-845.

Simiantonaki, N., et al. (2008). "Hypoxia-induced epithelial VEGF-C/VEGFR-3 upregulation in carcinoma cell lines." Int J Oncol **32**(3): 585-592.

Singh, S. K., et al. (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res **63**(18): 5821-5828.

Singh, S. K., et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.

Soda, Y., et al. (2011). "Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(11): 4274-4280.

Soomro, S. H., et al. (2017). "Molecular biology of glioblastoma: Classification and mutational locations." J Pak Med Assoc **67**(9): 1410-1414.

Stacker, S. A., et al. (2001). "VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics." Nat Med **7**(2): 186-191.

Staedtke, V., et al. (2016). "Actionable Molecular Biomarkers in Primary Brain Tumors." Trends Cancer **2**(7): 338-349.

Stavrovskaya, A. A., et al. (2016). "Problems of Glioblastoma Multiforme Drug Resistance." Biochemistry (Mosc) **81**(2): 91-100.

Strik, H. M., et al. (2004). "Immune cell infiltration of intrinsic and metastatic intracranial tumours." Anticancer Res **24**(1): 37-42.

Stummer, W. (2016). "Commentary: Combining 5-Aminolevulinic Acid Fluorescence and Intraoperative Magnetic Resonance Imaging in Glioblastoma Surgery: A Histology-Based Evaluation." Neurosurgery **78**(4): 484-486.

Stummer, W., et al. (2008). "Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias." Neurosurgery **62**(3): 564-576; discussion 564-576.

Stupp, R., et al. (2009). "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial." Lancet Oncol **10**(5): 459-466.

Stupp, R., et al. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 987-996.

Sul, J. and H. A. Fine (2010). "Malignant gliomas: new translational therapies." Mt Sinai J Med **77**(6): 655-666.

Swamydas, M., et al. (2013). "Mesenchymal stem cell-derived CCL-9 and CCL-5 promote mammary tumor cell invasion and the activation of matrix metalloproteinases." Cell Adh Migr **7**(3): 315-324.

Szabo, E., et al. (2016). "Autocrine VEGFR1 and VEGFR2 signaling promotes survival in human glioblastoma models in vitro and in vivo." Neuro Oncol **18**(9): 1242-1252.

Szopa, W., et al. (2017). "Diagnostic and Therapeutic Biomarkers in Glioblastoma: Current Status and Future Perspectives." Biomed Res Int **2017**: 8013575.

Talks, K. L., et al. (2000). "The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages." Am J Pathol **157**(2): 411-421.

Tatusova, T., et al. (2015). "RefSeq microbial genomes database: new representation and annotation strategy." Nucleic Acids Res **43**(7): 3872.

Thiebold, A. L., et al. (2015). "Perioperative cerebral ischemia promote infiltrative recurrence in glioblastoma." Oncotarget **6**(16): 14537-14544.

Tille, J. C., et al. (2003). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 signaling mediates VEGF-C(deltaNdeltaC)- and VEGF-A-induced angiogenesis in vitro." Exp Cell Res **285**(2): 286-298.

Ueda, M. and H. Saji (2014). "Radiolabeled Probes Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1-Active Tumor Microenvironments." ScientificWorldJournal **2014**: 165461.

Veikkola, T. and K. Alitalo (1999). "VEGFs, receptors and angiogenesis." Semin Cancer Biol **9**(3): 211-220.

Veikkola, T., et al. (2001). "Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice." EMBO J **20**(6): 1223-1231.

Wang, R., et al. (2010). "Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium." Nature **468**(7325): 829-833.

Ward, J. F. (1988). "DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **35**: 95-125.

Weathers, S. P. and M. R. Gilbert (2014). "Advances in treating glioblastoma." F1000Prime Rep **6**: 46.

Wen, P. Y. and S. Kesari (2008). "Malignant gliomas in adults." N Engl J Med **359**(5): 492-507.

Wilson, T. A., et al. (2014). "Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics." Surg Neurol Int **5**: 64.

Witmer, A. N., et al. (2002). "Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3 in quiescent endothelia." J Histochem Cytochem **50**(6): 767-777.

Xu, H., et al. (2015). "Activation of hypoxia signaling induces phenotypic transformation of glioma cells: implications for bevacizumab antiangiogenic therapy." Oncotarget **6**(14): 11882-11893.

Xu, W., et al. (2011). "Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases." Cancer Cell **19**(1): 17-30.

Xu, X., et al. (2004). "Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity." J Biol Chem **279**(32): 33946-33957.

Xu, Y., et al. (2017). "Procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 promotes hypoxia-induced glioma migration and invasion." Oncotarget **8**(14): 23401-23413.

Xu, Y., et al. (2013). "Collaborative overexpression of matrix metalloproteinase-1 and vascular endothelial growth factor-C predicts adverse prognosis in patients with gliomas." Cancer Epidemiol **37**(5): 697-702.

Yang, L., et al. (2012). "Hypoxia and hypoxia-inducible factors in glioblastoma multiforme progression and therapeutic implications." Exp Cell Res **318**(19): 2417-2426.

Young, R. M., et al. (2015). "Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma." Ann Transl Med **3**(9): 121.

Yu, S. C., et al. (2008). "Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87." Cancer Lett **265**(1): 124-134.

Yu, T., et al. (2017). "Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy." Yonsei Med J **58**(3): 489-496.

Zachary, I. (2001). "Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor." Am J Physiol Cell Physiol **280**(6): C1375-1386.

Zagzag, D., et al. (2006). "Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion." Lab Invest **86**(12): 1221-1232.

Zhang, C. L., et al. (2010). "Hypoxia-induced Bcl-2 expression in endothelial cells via p38 MAPK pathway." Biochem Biophys Res Commun **394**(4): 976-980.

Zhang, J., et al. (2012). "Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance." Curr Mol Pharmacol **5**(1): 102-114.

Zhang, Y., et al. (2013). "Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1alpha." J Pineal Res **55**(2): 121-130.

11 Anhang

11.1 Material

Geräte

Gerät

Autoklav

BioPhotometer

Brutschrank CD150

Brutschrank

Digitale Geldokumentation

Digitalkamera Power Shot G2

Entwicklermaschine Scopix LR 5200

Folienschweißgerät Folio

Gefrierschrank -80°C HFU 86 450

Gefrierschrank Premium

Handstückzähler mechanisch

Kühlschrank Comfort

Kühlschrank Economy

Kurzzeitmesser (Stoppuhr)

Laminar flow hood Hera safe

Magnetrührer VMS-C7

Microplate Reader Versa max

Mikroskop Axiovert 25

Mikroskop Axiovert 35

Mikrowellenherd

Minishaker MS2

Multipette

pH-Elektrode pH 526

Hersteller

KSG

Eppendorf

Binder

Heraeus

Serva

Canon

Agfa

Severin

Heraeus

NoFrost

VWR

Liebherr

Liebherr

VWR

Heraeus

VWR

Molecular Devices

Zeiss

Zeiss

Siemens

IKA Labortechnik

Eppendorf

WTW

Pipetten (10, 20, 200, 1000µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf
Power Pac 3000-Elektrophorese	BioRad
Röhrchengestell	TPP
Schüttler Polymax 1040	Heidolph
Stickstofftank Chronos	Messer
Thermocycler vapo. protect	Eppendorf
Vortex-Mixer	VWR
Waage AG204 Mettler	Toledo
Waage PB 3002 Mettler	Toledo
Wasserbad	Memmert
Zählkammer, Neubauer improved	VWR
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich

Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Becherglas 50ml	Schott Duran
Becherglas 150ml	Schott Duran
Becherglas 250ml	Schott Duran
Becherglas 400ml	Schubert & Weiß
Becherglas 600ml	VWR
Becherglas 1000ml	VWR
Combitips plus-Biopur steril	Eppendorf
Deckgläser für Haemotom (für Neubauer Zählkammer)	ZEFA Laborservice
Entsorgungsbox gelb (für spitze, kontaminierte Gegenstände)	Heisig
Laborflasche klar mit Schraubverschluss 100ml	Schott Duran
Laborflasche klar mit Kappe und Gewinde 250ml	Schott Duran
Laborflasche klar mit Kappe und Gewinde 500ml	Schott Duran
Messzylinder 100ml	ZEFA Laborservice
Messzylinder 1000ml	Wagner & Munz
Müllbehälter 50L gelb	Wirtschaftslager

Objektträger 76x26 Superfrost	Wagner & Munz
Pipettenspitzen blau 1000µl steril	Sarstedt
Pipettenspitzen crystal 0,5-20µl steril	Eppendorf
Pipettenspitzen DIAMOND Tower Pack	Gilson
Reaktionsgefäß 1,5ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß safe lock 0,5ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß safe lock 2ml	Eppendorf
Falconröhrchen 15ml	TPP
Falconröhrchen blau 50ml	BD
Stripetten (5, 10, 25ml)	Schubert & Weiß
BD Microlance Kanülen gelb 20G 0,9 x 40mm	BD
BD Microlance Kanülen grau 22G 0,7 x 30mm	BD
Nitrilhandschuhe Puder- und Latex-frei S	Cardinal Health

Zellkultur

Produkt

Collagenase
 Dimethylsulfoxid (DMSO)
 DMEM-Medium 1,0 g/l + L-Glutamin
 Einfrierbox für Kryoröhrchen
 Fetales Kälberserum
 Kryoröhrchen
 Medium 199 Earl's BSS
 MEM Eagle NEAA (100x)
 Noble Agar
 PBS pH 7,4
 Penicillin / Streptomycin-Lösung
 Sulforhodamin-B
 Trypsin / EDTA (10x) (0,5% / 0,2%)
 Tryptan-Blau
 Zellkulturflasche mit Filter 25cm²
 Zellkulturflasche mit Filter 75cm²

Hersteller

Serva
 Merck
 Biochrom AG
 Nunc
 Biochrom AG
 Kisker
 LONZA
 Gibco
 Sigma
 Apotheke
 Gibco
 Sigma
 Biochrom AG
 Sigma
 TPP
 TPP

Zellkulturflasche mit Filter 150cm ²	TPP
Zellkulturtestplatte 6-well	TPP
Zellkulturtestplatte 12-well	TPP
Zellkulturtestplatte 24-well	TPP
Zellkulturtestplatte 96-well	TPP

Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Produkt	Hersteller
Agarose	Sigma
Borsäure	Sigma
DEPC Treated Water Pyrogen-free	Invitrogen
Ethidiumbromid	Sigma
Gene Ruler 50bp DNA-Leiter	Thermo Scientific
HotStarTaq Master Mix Kit 1000 units	Qiagen
PCR-Reaktionsgefäße 0,2ml	Biozym
Pipettenspitzen gefiltert (10, 20, 200, 1000µl) Max. Recovery	Abimed
Qiashredder (50)	Qiagen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen
Reaktionsgefäße-Soft Tubes (1,5 und 2ml) PCR clean	Eppendorf
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen
Tris-HCl	Sigma
UVette®	Eppendorf
6x Loading Buffer	Novagen

Primer

Zielgen	Sequenz	AT	Produktgröße
VEGF-A	AGGGCAGAATCATCACGAAGT (s)	58°C	73 bp
	GGTCTCGATTGGATGGCAGTA (as)		
VEGF-C	CACGGCTTATGCAAGCAAAGA (s)	58°C	121 bp
	TCCTTTCCTTAGCTGACACTTGT (as)		
VEGF-D	AGCATCCCATCGGTCCACTA (s)	61°C	106 bp
	CGTTTCTCTAGGGCTGCACT (as)		

VEGF-R2	AGTGATCGGAAATGACACTGGA (s) GCACAAAGTGACACGTTGAGAT (as)	59°C	213 bp
VEGF-R3 short	TCCTCCAGGATGAAGACATTTGAG (s) TGCTCCACCAGCTTCTTG (as)	64°C	420 bp

GAPDH

Western Blot

Produkt	Hersteller
Acrylamid	Thermo Scientific
β-Mercaptoethanol	Sigma
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma
Fiberpads (8 x 11cm)	BioRad
Flachbeutel PE 115 x 155mm	Boll
Immunstar Luminol Enhancer ECL und HRP Peroxid-Puffer	Thermo Scientific
Immun-Blot PVDF-Membran (26cm x 3,3 m)	BioRad
Lämmli Puffer	BioRad
Magermilchpulver	Roth
Marker: Precision Plus Protein Marker	Invitrogen
Methanol reinst	Roth
Mini Trans Blot Electrophoretic Transfercell	Biorad
Mini Trans Blot Filter Papier (7,5 x 10cm)	BioRad
Natriumdodecylsulfat	Sigma
Nonidet P40	Roche
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
Phosphatase Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma
PIC I (Protease-Inhibitor-Cocktail)	Sigma
PIC II (Protease-Inhibitor-Cocktail)	Sigma
Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate	BioRad
Quickstart Bradford Dye Reagent	BioRad
Quickstart BSA Standard Set	BioRad
Rinderalbumin (BSA)	Sigma

Long R3 IGF-1
VEGF-A
Heparin
Hydrocortisone
5% FKS

5ml Pen / Strep (Gibco)

DMEM + 10% FKS (für humane Gliomzelllinien U87 und U251)

435ml Dulbecco's MEM (Biochrom AG)

5ml Pen / Strep (Gibco)

5ml Nichtessentielle Aminosäuren (Gibco)

50ml FKS (Biochrom AG)

Einfriermedium

40ml Dulbecco's MEM (Biochrom AG) ohne Antibiotika

40ml FKS (Biochrom AG)

20ml DMSO (Merck)

Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Ursprungsgewebe	Firma
U87	human	Tumorzelllinie aus GBM	ATTC
U251	human	Tumorzelllinie aus GBM	ATTC
HBMEC	human	Mikrovaskuläre Zellen aus Normalhirn	ScienceCell RL
IEC	human	isolierte Endothelzellen aus GBM	Tumorbiologisches Labor Klinikum Großhadern

Lösungen für RT-PCR

TBE-Puffer (5x TBE)

54g Tris-Base

27,5g Borsäure

20ml 0,5M EDTA

ad 1l H₂O

RNA-Puffer zur photometrischen Vermessung 10nM TRIS-HCl

77,8mg TRIS-HCl

ad 50ml DEPC-H₂O

Lösungen für SRB-Assay

TCA-Lösung

50% Trichloressigsäure

ad H₂O_{dest.}

Sulforhodamin-B-Lösung

0,4% SRB

ad 1% Essigsäure

Tris-Base

10mM Tris in H₂O_{dest.}, pH=10,5

Lösungen für Western Blot

Lysepuffer NP40 + Protease Inhibitor Cocktail + Phosphatase Inhibitor Cocktail

0,16g 20mM Tris-HCl

0,40g 137mM NaCl

0,037g 2mM EDTA

5ml 10% Glycerol

500µl 1% Non-idet P40

90µl Protease Inhibitor Cocktail

90µl Phosphatase Inhibitor Cocktail

ad 50ml H₂O_{dest.}

Elektrophorese-Puffer (1x EP)

3,94g/l Tris-HCl

14,4g/l Glycin

10ml/l 10%ige SDS-Lösung

ad 1l H₂O_{dest.}

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

10x Transferpuffer (10x TB)

29,3g 390mM Glycin

58,2g 480mM Tris-Base

1,3mM (0,3%) SDS

37,5ml einer 10%igen SDS-Lösung

ad 1l H₂O

1x Transferpuffer (1x TB)

100ml 10x TB

200ml Methanol

700ml H₂O_{dest.}

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

20mM Tris-HCl 29,1g

500mM NaCl 58,2g

ad 1l H₂O_{dest.}

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

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

100ml 10x TBS

900ml H₂O_{dest.}

350µl Tween 20

Blockierlösung

Milchpulver 3g

60ml TTBS

Inkubationslösung

Blockierlösung 10ml

TTBS 190ml

7,5%-iges Trenngel

85ml H₂O_{dest.}

2,5ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8

100µl 10%-ige SDS-Lösung

2,5ml 30%-iges Acrylamid

100µl 10%-iges Ammoniumpersulfat (APS)

10µl TEMED

Stripping-Puffer

12,5ml 0,5M Tris-HCl

20ml 10%-ige SDS-Lösung

800µl β-Mercaptoethanol

ad 67,5ml H₂O_{dest.}

12 Vortrag

Einzelne Ergebnisse dieser Arbeit wurden in der 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie im Juni 2012 in Leipzig vorgetragen:

VEGFR-3 ist unter Hypoxie in Endothel- und Tumorzellen aus dem Glioblastom hochreguliert und dient somit als Mediator für Tumorresistenz

VEGFR-3 is upregulated in glioblastoma-derived endothelial cells and tumor cells under hypoxic conditions and is a mediator for tumorresistance

Jun Thorsteinsdottir, **Juliette Puymann**, Jörg-Christian Tonn, Christian Schichor (München)

13 Danksagung

An Herrn Prof. Tonn für die Ermöglichung meine experimentelle Doktorarbeit im Tumorbiologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik durchführen zu dürfen.

An meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Christian Schichor für die ausdauernde Betreuung und die zahlreichen Projektbesprechungen meiner Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Jun Thorsteinsdottir. Sie hat mich bei der Projektplanung sowie bei der Durchführung meiner Arbeit mit wissenschaftlichen Ratschlägen und Diskussionen stets unterstützt.

An das komplette Team des Tumorbiologische Labor welches mich in die zahlreichen Labortechniken eingewiesen haben, mich für das wissenschaftliche Arbeiten im Labor begeistern konnten, sowie zu jeder Zeit ein offenes Ohr hatten.

An meinen Mann, an meine Mutter und an meine Schwiegereltern, welche mich während des kompletten Studiums unterstützt haben und mir immer zur Seite standen.

14 Eidesstattliche Versicherung

Runtsch, Juliette Ann-Catrin

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Die Rolle des VEGFR-3-Rezeptor- und Signaltransduktionssystem als Mediator für gesteigerte Invasivität und Migration bei Tumor- und isolierten humanen Endothelzellen des Glioblastoms unter Langzeit-Hypoxie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 24.10.2023

Juliette Ann-Catrin Runtsch