

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik

Neurochirurgische Forschung

Klinikum Großhadern

der Ludwig-Maximilians-Universität München

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

**VEGF-Rezeptor 3 als vielversprechendes Target im
malignen Gliom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Eugenie Gieser

aus Duschambe

2014

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Glaß

Zweitgutachter: Priv. Doz. Dr. Christian Ries

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

Tag der mündlichen Prüfung: 23.09.2014

Für meine Eltern!

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Physiologische Angiogenese	5
1.1.1 Tumorangiogenese "angiogenic switch"	7
1.1.2 Angiogene Faktoren	9
1.1.3 VEGF/ VEGF-Rezeptor-System	10
1.1.4 Anti-angiogene Therapie	15
1.2 Gliome	18
1.2.1 Glioblastoma multiforme	19
1.3 Neoangiogenese im GBM	21
1.3.1 Anti-angiogene Therapie im GBM	22
2 Fragestellung	25
3 Material und Methoden	28
3.1 Materialien	28
3.1.1 Geräte	28
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	29
3.1.3 Zellkultur	30
3.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	31
3.1.4.1 Primer	31
3.1.5 Immunhistochemie /-cytochemie	31
3.1.6 Western Blot	32
3.1.7 Antikörper	33
3.1.8 Inhibitoren	34
3.1.9 Transformation/ Transfektion	34
3.1.10 Tierversuch	34
3.1.11 Medium	35
3.1.12 Zelllinien	35
3.1.13 Lösungen für PCR	35
3.1.14 Lösungen für Transformation	36
3.1.15 Lösungen für IHC	36
3.1.16 Lösungen für SRB-Assay	36

3.1.17	Lösungen für Western Blot.....	37
3.1.18	Kryopräservativ zur Aufbewahrung von geschnittenem Maushirngewebe- „Floating Sections“	38
3.2	Methoden	39
3.2.1	Isolierung von Tumorendothelzellen aus dem GBM (gbEC) mit Hilfe der Dyna- beads	39
3.2.2	Zellkultivierung	40
3.2.3	Passagieren von Monolayerkulturen	40
3.2.4	Sulforhodamin B-Assay (Cytotoxizität).....	41
3.2.4.1	Durchführung des SRB-Assays.....	41
3.2.4.2	Auswertung.....	42
3.2.5	Proliferationsassay (Zellzählung)	42
3.2.6	Molekularbiologische Methoden.....	43
3.2.6.1	RNA-Isolierung aus Zellen	43
3.2.6.2	Reverse Transkription: cDNA-Synthese	43
3.2.6.3	Semiquantitative PCR.....	44
3.2.6.4	Agarose-Gelelektrophorese	45
3.2.7	Mikrobiologische Methoden	45
3.2.7.1	Kultivierung von Bakterien.....	45
3.2.7.2	Kultivierung von <i>E.coli</i> auf Agar.....	45
3.2.7.3	IRES2-eGFP-VEGF-R3 Plasmid.....	46
3.2.7.4	Transformation von <i>E.coli</i> mittels Hitzeschock.....	46
3.2.7.5	Isolation und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	47
3.2.7.6	Transiente Transfektion mittels MATra (<i>Magnet Assisted Transfection</i>)	47
3.2.8	Proteinanalytische Methoden.....	48
3.2.8.1	Proteinisolation aus Zellen	48
3.2.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	48
3.2.8.3	SDS-Page	48
3.2.8.4	Western Blot	49
3.2.8.4.1	Detektion der Proteinbanden	49
3.2.8.4.2	„Strippen“ der Membran.....	50
3.2.9	Immunologische Methoden	50
3.2.9.1	Immunhistochemie (IHC)-Hopschnitte	50
3.2.9.2	Paraffinschnitte	51
3.2.9.3	Immuncytochemie (ICC).....	52

3.2.10	Funktionelle Assays.....	52
3.2.10.1	Tube Formation Assay (TFA).....	52
3.2.10.2	Wound Healing Assay (WHA).....	53
3.2.11	Durchflusszytometrie (FACS)	54
3.2.11.1	Durchführung einer FACS-Analyse.....	55
3.2.11.2	Auswertung.....	55
3.2.12	<i>In vivo</i> -Mausmodell.....	56
3.2.12.1	Narkose	57
3.2.12.2	Stereotaktisches orthotopes Mausmodell.....	57
3.2.12.3	Versuch 1: einfache Applikation	59
3.2.12.4	Versuch 2: Chronische Infusion über osmotische Pumpen	59
3.2.12.5	Perfusion und Organentnahme	61
3.2.12.6	Kryoschnitte („Floating Sections“).....	62
3.2.12.7	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	62
3.2.12.8	Tumorzellen Bestimmung	63
3.2.13	Statistik.....	63
4	Ergebnisse.....	64
4.1	VEGF-R3 im Glioblastom	64
4.1.1	VEGF-R3 Expression im GBM pre- und post-Bevacizumab Behandlung	64
4.1.2	mRNA-Expression von VEGF-R2, -R3, -A, -C und -D in gbECs.....	68
4.1.3	Bevacizumab besitzt keinen Einfluss auf die VEGF-R3 mRNA-Expression	70
4.1.4	GbECs exprimieren VEGF-R3.....	70
4.2	VEGF-R3 Blockade mit MAZ51 auf gbECs.....	72
4.2.1	Einfluss von MAZ51, Bevacizumab und spezifischen VEGF-R2 und VEGF-R3 blockierenden Antikörpern auf die <i>in vitro</i> -Angiogenese von HUVECs und gbECs.....	72
4.2.2	MAZ51 wirkt cytotoxisch auf gbECs	77
4.2.3	MAZ51 reduziert das Migrationsverhalten von gbECs	80
4.3	VEGF-R3 Expression in Gliomzellen.....	82
4.3.1	VEGF-R3 wird nicht nur im GBM-Endothel exprimiert.....	82
4.3.2	mRNA-Expression von VEGF-R2, -R3, -A, -C und -D in Gliomzellen.....	84
4.3.3	VEGF-R3 Expression auf Proteinebene in Gliomzelllinien	85
4.3.4	VEGF-R3 Expression auf Proteinebene mittels Western Blot.....	86
4.4	Überexpression von VEGF-R3	88
4.4.1	FACS-Sorting	88
4.4.2	Stabile VEGF-R3 Überexpression	88

4.4.3	VEGF-R3 Überexpression führt zu Proliferationssteigerung	90
4.4.4	VEGF-R3 Blockade mit MAZ51 reduziert wiederum die Gesamtzellmenge von Gliomzellen	91
4.5	Einfluss von MAZ51, Bevacizumab und spezifischen VEGF-R2/-R3 Antikörpern auf die intrazelluläre Signalkaskade.....	93
4.6	MAZ51 reduziert <i>in vivo</i> das Tumolvolumen.....	95
4.6.1	MAZ51 reduziert das Tumolvolumen unter Einsatz von Brain Infusion Kits	96
5	Diskussion.....	98
5.1	Anti-angiogene Therapie im GBM.....	98
5.2	Resistenzmechanismen nach anti-angiogener Therapie im GBM.....	100
5.3	VEGF-R3 als alternativer pro-angiogener Mechanismus.....	101
5.3.1	VEGF-R3 Expressionsanalyse nach anti-VEGF-A Therapie mit Bevacizumab 103	
5.3.2	VEGF-R3 Expression in gbECs.....	104
5.4	VEGF-R3 Blockade	106
5.4.1	Einfluss der VEGF-R3 Blockade auf die <i>in vitro</i> -Angiogenese.....	107
5.4.2	Cytotoxischer Einfluss der VEGF-R3 Blockade mit MAZ51	108
5.4.3	Einfluss der VEGF-R3 Blockade auf das Migrationsverhalten von gbECs.....	109
5.5	VEGF-R3 Expression in Gliomzellen.....	110
5.5.1	Einfluss einer VEGF-R3 Überexpression auf das Proliferationsverhalten.....	112
5.5.2	Einfluss der VEGF-R3 Blockade auf die intrazelluläre Signalkaskade	113
5.6	Einfluss von MAZ51 <i>in vivo</i>	114
6	Zusammenfassung	116
	Summary.....	118
7	Literaturverzeichnis	119
	Danksagung	132
	Eidesstattliche Versicherung.....	133

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Darstellung der Bildung von Blutgefäßen.</i>	<i>6</i>
<i>Abb. 2: Die VEGF-Familie umfasst eine Reihe von strukturell verwandten sezernierten Glykoproteinen, die an transmembrane VEGF-Rezeptoren binden.</i>	<i>12</i>
<i>Abb. 3: Darstellung des aktiven und dimeren VEGF-R3.</i>	<i>14</i>
<i>Abb. 4: Konzept der anti-angiogenen Therapie mit anschließender Gefäßnormalisierung. ...</i>	<i>16</i>
<i>Abb. 5: Relative Häufigkeiten von Gliomen.</i>	<i>18</i>
<i>Abb. 6: Humanes VEGF-R3 Plasmid.</i>	<i>46</i>
<i>Abb. 7: Die μ-Slides von ibidi ermöglichen eine Darstellung von 2D-in vitro-Angiogenese.</i>	<i>53</i>
<i>Abb. 8: Verwendung der ibidi μ-Dishes.</i>	<i>54</i>
<i>Abb. 9: Beispiel für eine FACS- Auswertung.</i>	<i>56</i>
<i>Abb. 10: Stereotaktischer Rahmen und Darstellung der stereotaktischen Operation am Kopf.</i>	<i>58</i>
<i>Abb. 11: Schematische Darstellung der osmotischen Minipumpe mit dem Brain Infusion Kit (ALZET).</i>	<i>60</i>
<i>Abb. 12: VEGF-R3 Expression in humanem GBM-Gewebe vor und nach Bevacizumab-Therapie.</i>	<i>66</i>
<i>Abb. 13: VEGF-C Expression in humanem GBM-Gewebe vor und nach Bevacizumab-Therapie.</i>	<i>68</i>
<i>Abb. 14: mRNA-Expression von VEGF-R2, VEGF-R3 (short und long) und deren Liganden VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D mittels semiquantitativer PCR.</i>	<i>69</i>
<i>Abb. 15: VEGF-R3 Expression auf repräsentativen gbECs I-III in drei verschiedenen GBM-Fällen.</i>	<i>71</i>
<i>Abb. 16: Effekt von Bevacizumab, blockierenden VEGF-R2/-R3 Antikörpern und MAZ51 auf die in vitro-Angiogenese bzw. Gefäßformation von HUVECs (n=7).</i>	<i>73</i>
<i>Abb. 17: Effekt von Bevacizumab, blockierenden VEGF-R2/-R3-Antikörpern und MAZ51 auf die in vitro-Angiogenese bzw. Gefäßformation von gbEC I (n=7), gbEC II (n=5), gbEC III (n=4), gbEC IV (n=4) und gbEC V (n=7).</i>	<i>76</i>
<i>Abb. 18: Cytotoxischer Einfluss von MAZ51 und Bevacizumab auf die Gesamtzellmenge von gbECs und HUVECs.</i>	<i>78</i>
<i>Abb. 19: Kein Einfluss von blockierenden VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörpern auf die Gesamtzellmenge von gbECs.</i>	<i>79</i>
<i>Abb. 20: Einfluss von MAZ51 und Bevacizumab auf die Migrationsaffinität von gbECs.</i>	<i>81</i>
<i>Abb. 21: Starke VEGF-R3- und CD31-Expression auf humanem GBM-Gewebe.</i>	<i>83</i>

<i>Abb. 22: VEGF-R3 Expression im GBM-Gefäßendothel und -Tumorzellen seitab von Tumorgefäßen.....</i>	<i>84</i>
<i>Abb. 23: Expression von VEGF-R2, VEGF-R3 (short und long) und deren Liganden VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D auf Genebene.</i>	<i>85</i>
<i>Abb. 24: VEGF-R3 Expression auf Proteinebene in Gliomzelllinien U87, U251 und U373....</i>	<i>86</i>
<i>Abb. 25: VEGF-R3 Expression auf Proteinebene sowohl in Gliomzelllinien U87, U251 und U373 als auch in HUVECs, HBMECs und einem Fall von isolierten GBM-Endothelzellen. ...</i>	<i>87</i>
<i>Abb. 26: VEGF-R3 Expression in U251-Wildtypzellen (U251wt) und transfizierten U251-Zellen mit Kontroll-eGFP- (U251eGFP) und eGFP-VEGF-R3-Plasmid (U251eGFP-R3).....</i>	<i>89</i>
<i>Abb. 27: Überexpression von VEGF-R3 in U251 Zellen führt zu einer signifikanten Viabilitätssteigerung.</i>	<i>90</i>
<i>Abb. 28: Cytotoxischer Einfluss von MAZ51 und Bevacizumab auf Gliomzelllinien.</i>	<i>91</i>
<i>Abb. 29: Kein cytotoxischer Einfluss von blockierenden VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörpern auf Gliomzelllinien.</i>	<i>92</i>
<i>Abb. 30: Einfluss von MAZ, Bevacizumab und blockierenden VEGF-R2/-R3 Antikörpern auf die intrazelluläre Signalkaskade von U251 Gliomzellen.....</i>	<i>94</i>
<i>Abb. 31: Einfluss von MAZ51, blockierenden VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörpern im C57-Bl6-Mausmodell.</i>	<i>96</i>
<i>Abb. 32: MAZ51 reduziert signifikant das Tumolvolumen unter Verwendung von osmotischen Minipumpen im C57/Bl6-Mausmodell.....</i>	<i>97</i>

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazole
APS	Ammoniumpersulfat
AT	Annealing-Temperatur
ATP	Adenosintriphosphat
ATTC	American Type Culture Collection
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BP	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAB	3,3´Diaminobenzidine
DEPC	Diethyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
ECM	Endothelzellmedium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäur
EGFR	Endothelial Growth Factor Receptor
EP	Elektrophoresepuffer
ERK	extrazelluläre Signal-regulierten Kinasen
FACS	Fluoreszenz aktivierte Durchflusszytometrie
FDA	Federal Drug Administration
FKS	fetales Kälberserum
Flk-	fetal liver kinase-1
Flt	fms-like tyrosine kinase 1
Flt 4	fms-like tyrosine kinase 4
GAPDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastome multiforme
gbEC	isolierte Tumorendothelzellen aus GBM
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HBMEC	mikrovaskuläre Endothelzellen aus Normalhirn
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor α
H ₂ O	Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase
HUVEC	Endothelzellen aus der Nabelschnur
ICC	Immuncytochemie
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie

ICM	Isolationsmedium
KD	kinase insert domain-containing receptor
LB	lysogeny broth
LOH	loss of heterozygosity
LSAB	Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinasen
MGMT	O-Methyl Guanine-Methyl Transferase-Gen
MM	Master Mix
MMP	Matrix Metalloprotease
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NCI	National Cancer Institute
NEAA	Nichtessentielle Aminosäuren
NP1	Neuropilin 1
NP2	Neuropilin 2
ORF	offener Leserahmen
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PIC	Potease-Inhibitor Cocktail
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIGF	Plazenta Wachstumsfaktor -1
PVDF	Polyvinylfluorid
PVP	Polyvinyl-Pyrrolidone
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SRB	Sulforhodamine B
TB-Puffer	Transfer-Puffer
TBS	TRIS buffered saline
T/C	Test over control
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tertamethylethylendiamin
TFA	Tube Formation Assay
TKI	Tyrosin-Kinasen Inhibitoren
TMZ	Temozolomid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor
WHA	Wound Healing Assay
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Physiologische Angiogenese

Eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen über ein intaktes Blutgefäßsystem ist für eine normale Funktion der verschiedenen Gewebe des Organismus essentiell [1]. Der Begriff Angiogenese beschreibt den Prozess der Blutgefäßbildung [2]. Blutgefäße stellen eine Permeabilitätsbarriere zwischen Blut und umgebendem Gewebe dar und regulieren somit den lebensnotwendigen Stoffaustausch zwischen diesen beiden Komponenten [3]. Ein komplexes Netzwerk aus Gefäßen, über den gesamten Organismus verteilt, sichert die Energie- und Nährstoffzufuhr für jede einzelne Zelle [4]. Das vaskuläre Endothel stellt auf Grund zahlreicher Anforderung an das Gefäßsystem im Organismus eine heterogene Zellpopulation dar [3, 5, 6]. Während der Embryonalentwicklung spielt die Bildung von Blutgefäßen eine zentrale Rolle. Das kardiovaskuläre System ist das erste funktionierende Organsystem [7]. Dabei dominieren zwei Prozesse, die *Vaskulogenese* und die *Angiogenese*. Ersteres beschreibt die Bildung von Endothelzellen aus einer Ansammlung von endothelialen Vorläuferzellen, den Angioblasten [8]. Die Angiogenese beschreibt im Gegensatz dazu die Bildung neuer Gefäße aus bereits existierenden Blutgefäßen und umfasst bislang vier bekannte Mechanismen [9]. Am besten untersuchten angiogenen Mechanismen sind die Sprossung von Gefäßen und die Längsteilung durch Einstülpungen von sich gegenüber liegenden Endothelflächen (Intussuszeption) [7]. Während bei der Angiogenese durch Aussprossung die Basalmembran stellenweise aufgelöst wird, bleibt sie bei der Intussuszeption vollständig erhalten. Die Basalmembran besteht hauptsächlich aus Fibronektin, Kollagen Typ IV, Laminin und Proteoglykanen [10]. Die Basalmembran kann Prozesse wie die Zelldifferenzierung, Adhesion, Migration, Polarisierung und das Überleben von Blutgefäßen direkt oder indirekt beeinflussen [4]. Aussprossung sowie Intussuszeption können parallel in demselben Gewebe stattfinden. Weitere Mechanismen der Angiogenese beinhalten die Bildung transendothelialer Zellbrücken mit darauffolgender Auftrennung in einzelne Kapillaren [11] und die Fusion mehrerer kleiner Gefäße zu einem größeren [7]. Angiogenese ist primär ein Prozess der Embryonal- und Fetalphase, der aber beim Wachstum von Organen auch postnatal vorkommt. Die postnatale Vaskulogenese lässt sich durch zirkulierende, aus dem Knochenmark stammende Vorläuferzellen

ableiten [12]. Wie in *Abbildung 1* dargestellt werden letztlich Perizyten und glatte Muskelzellen rekrutiert, welche die Gefäßwände stabilisieren und die Arteriogenese definieren [13].

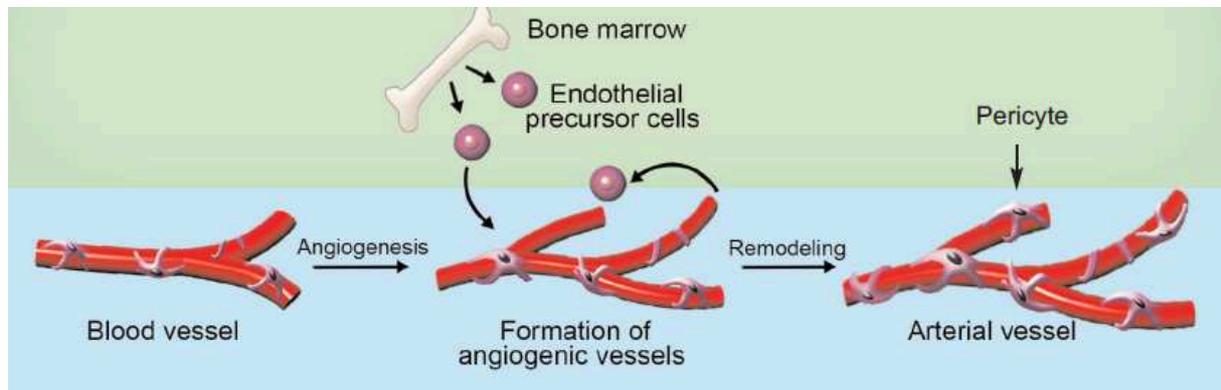


Abb. 1: Darstellung der Bildung von Blutgefäßen.

Das Wachstum von Blutgefäßen, durch Sprossungs- oder Spaltungsvorgänge aus bereits vorgebildeten Blutgefäßen (Angiogenese). Hiervon zu unterscheiden ist die Neubildung von Blutgefäßen aus dem Knochenmark stammenden endothelialen Vorläuferzellen (Vaskulogenese). [14]

Im adulten Organismus ist die physiologische Angiogenese weitgehend abgeschlossen und die Gefäßneubildung bzw. die Zellteilung der Endothelzellen limitiert [15-17]. Die Wundheilung [18, 19] und das Reproduktionssystem des weiblichen Körpers im Verlauf des Menstruationszyklus und der Schwangerschaft stellen eine Ausnahme davon dar [20, 21]. Davon abgesehen ist die adulte Angiogenese vor allem bei pathologischen Prozessen anzutreffen. Neben Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, Psoriasis, Diabetes mellitus und Retinopathie findet man angiogene Vorgänge bei der Bildung von Kollateralen nach hypoxischer Schädigung bzw. ischämischen Situationen des Myokards oder arteriellen Verschlusskrankheiten in Extremitäten [19]. Obwohl die Liste der Erkrankungen, bei denen die Angiogenese von Bedeutung ist, immer weiter wächst [11], hat sich insbesondere die Tumorangiogenese als Fokus der Tumorforschung etabliert, da die Beeinflussung der Angiogenese oder die Zerstörung bestehender Gefäße eine vielversprechende Tumorthherapie darstellt [22].

1.1.1 Tumorangiogenese “angiogenic switch”

Bereits vor über 100 Jahren erkannten Wissenschaftler wie Virchow [23], dass wachsende Tumoren ein stark ausgeprägtes vaskuläres Netzwerk aufweisen. Die Arbeit von Ide et al. [24] und später von Algire et al. [25] bekräftigten die Bedeutung einer größeren Blutversorgung bei Tumorstadium [26]. Judah Folkman zeigte zum ersten Mal, dass ein Anschluss an das Blutgefäßsystem essentiell für das Wachstum und die Metastasierung von soliden Tumoren ist [22, 27, 28]. Maligne entartete Zellen können sich bis zu einem Durchmesser von ca. 1-2 mm durch Diffusion aus dem umliegenden Gewebe ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen [22, 29]. Ein Tumor muss aber Angiogenese induzieren, um über diese Größe hinauswachsen zu können [22, 30, 31]. Tumore entstehen ohne angiogene Aktivierung und befinden sich in der sogenannten „Tumor Dormancy“ (Ruhezustand) [32]. In dieser Ruhephase sind zwar Tumorzellen vorhanden, eine Tumorstadium ist jedoch klinisch nicht wahrnehmbar [32]. Zahlreiche Autopsie Studien zeigten, dass viele Menschen, die an keiner Tumorerkrankung gelitten hatten, mikroskopisch kleine Tumoren in unterschiedlichen Organen aufwiesen [22, 33, 34]. Diese Ruhephase, in der die Krebszellen sich unterhalb der Detektionsschwelle konventioneller Diagnostik befinden, kann Monate bis mehrere Jahrzehnte andauern [35]. Ohne eine Aktivierung der Neoangiogenese und somit auch ohne die Bereitstellung einer größeren Menge an Nährstoffen und Sauerstoff wachsen diese Tumorstadium jedoch nicht weiter. Angiogene und nicht ruhende menschliche Tumore sind beispielsweise charakterisiert durch [32]:

1. Exponentielles Tumorstadium.
2. Fähigkeit angiogene Aktivität zu induzieren indem Blutgefäße vom umliegenden Stroma rekrutiert werden und/ oder die Neubildung neuer Blutgefäße im Tumorgewebe.
3. Signifikant erhöhte Expression von pro-angiogenen Proteinen.
4. Spontane Metastasierung in vielen Organen.

Im Verhältnis zur Gesamtzahl von Mikro-Tumoren geschieht die Aktivierung aus dem Ruhezustand interessanterweise recht selten. Die initialen Schritte zur Tumorentstehung und zum späten Tumorstadium beinhalten die Co-Option [36]. Dabei handelt es sich um die Übernahme bestehender Gefäße durch Tumorstadium

unter Verdrängung von normalen. Dadurch können sich Tumorzellen entlang bestehender Blutgefäße bewegen und in das umliegende Gewebe infiltrieren [37]. Bei diesem Prozess ist das Tumorwachstum zunächst Angiogenese-unabhängig [36]. Neben den pro-angiogenen Faktoren, die die Angiogenese fördern und überhaupt erst ermöglichen, existieren eine Reihe von anti-angiogenen Faktoren, die der Angiogenese entgegenwirken. Diese pro- und anti-angiogenen Faktoren stehen bei der Gefäßhomöostase in einem Gleichgewicht [13, 38]. Wird nun aber dieses Gleichgewicht zugunsten der Konzentration der pro-angiogenen Faktoren verschoben, beispielsweise im Falle eines Tumors, so beginnt die Gefäßneubildung [39]. Hanahan und Folkman bezeichneten dieses Ungleichgewicht zugunsten der Angiogenese als „angiogenic switch“ [40]. Auf Grund der Gefäßneubildung im Tumorwachstum stellt die Hemmung der Tumorangiogenese einen vielversprechenden Angriffspunkt in der Tumorthherapie dar [11, 41]. Jedoch bedeutet die Tumorangiogenese nicht nur einfach eine Zunahme an neugebildeten Blutgefäßen. Ferner ändern diese hochgradig aberranten Blutgefäße das Tumor Mikro-Milieu drastisch [11, 42]. Die Endothelschicht ist oft inhomogen mit übereinander ins Lumen hineinwachsenden Endothelzellen und stellt zum Teil ein Mosaik aus Endothel- und Tumorzellen dar [11]. Die Gefäße sind im Gewebe unorganisiert, dilatiert und besitzen stark schwankende Durchmesser oder zum Teil gar kein Lumen [42]. Es finden sich viele Verzweigungen und blind endende Stümpfe, so dass der Blutfluss sehr irregulär verläuft [13]. Ultrastrukturell findet man in Tumorgefäßen vermehrt transendotheliale Löcher, Vesikel und Fenestrierungen sowie erweiterte interendotheliale Lücken [43, 44]. Eine Basalmembran fehlt oder ist unvollständig ausgebildet [4]. Daraus ergibt sich eine stark erhöhte Permeabilität der Gefäßwand, die eine hämatogene Metastasierung erleichtert [11]. Der Austritt von Plasma aus den neu gebildeten Gefäßen eines Tumors führt zu einem erhöhten interstitiellen Druck. Kleinere Gefäße im Innern eines Tumors werden dabei sogar so stark komprimiert, dass sich eine zentrale Nekrose im Tumor bildet. Der Transport von Substanzen in den Tumor ist erschwert, da ein hoher Sauerstoff- sowie Kohlendioxid-Partialdruck und ein damit verbundener Abfall des pH-Wertes (Azidose) innerhalb des Tumors herrscht, der durch z.B. Hypoxie hervorgerufen wird [45, 46]. Dadurch wird das Tumorwachstum und dessen Entwicklung, das Umgehen des eigenen Immunsystems, die Metastasierung und vor allem die Antwort auf Tumorthérapien maßgeblich beeinflusst [26].

1.1.2 Angiogene Faktoren

Der angiogene Prozess ist ein sehr komplexer und dynamischer Prozess, der durch eine Reihe von pro- und anti-angiogenen Molekülen reguliert wird [47]. Dabei können die meisten Faktoren sowohl stimulierend als auch inhibierend wirken und besitzen untereinander synergistische als auch antagonistische Eigenschaften. Der bereits erwähnte "angiogenic switch" gilt als Kennzeichen eines malignen Prozesses, bei dem pro-angiogene Mechanismen dominieren und/oder anti-angiogene Regulatoren umgangen werden [48]. Den ersten Schritt auf solch einen Stimulus kann die Degradation der Basalmembran eines existierenden Gefäßes durch Proteasen, z.B. Mitglieder der Matrix Metalloproteasen-Familie (MMPs), Chymasen und Heparanasen darstellen [49]. Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren mit unterschiedlichen Signalinduktionen ist heute bekannt [50]. Angiogene Faktoren können zum Teil frei oder gebunden an Moleküle in der extrazellulären Matrix vorliegen. Um die Adhäsion unter den Endothelzellen sowie an Bestandteile der extrazellulären Matrix zu gewährleisten, werden sogenannte Adhäsionsmoleküle exprimiert. Dabei handelt es sich vornehmlich um Moleküle aus der Familie der Integrine wie z.B. $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ [51]. Ebenso führt eine Mutation der p53-Tumorsupressor-Gene oder deren komplette Zerstörung zur Unterdrückung der Produktion von Thrombospondin-1, eines Inhibitors der Angiogenese [52]. Viele angiogene Faktoren gehören zu der großen Familie der so genannten vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren [47]. Dabei geht es um eine Gruppe von Polypeptiden und Proteinen, die durch Sekretion in das umliegende Gewebe und über die Aktivierung spezifischer Rezeptoren auf bestimmte Zell- oder Gewebetypen wirken. Im Tumorstadium zeigt sich vor allem eine verstärkte Bildung des VEGF-A-Proteins (Vascular Endothelial Growth Factor-A), der für die Induktion der Angiogenese ausschlaggebend ist [47, 53]. Ist der Vorgang der Tumorangiogenese einmal in Gang gesetzt, so geschieht es nur selten, dass die Gefäßneubildung wieder auf ein physiologisches Maß zurück versetzt wird [54]. Die bereits erwähnte Hypoxie wirkt sich aktivierend über Hypoxia-Inducible Factors (insb. HIF-1 α) auf den VEGF-Promoter aus, was wiederum eine vermehrte Expression von VEGF-Proteinen nach sich zieht [55-57]. Da insbesondere die Expression des VEGF-A und dessen Rezeptor eine entscheidende Rolle für die Aktivierung der Tumorangiogenese spielt [58], soll im Folgenden dieser Mechanismus näher beschrieben werden.

1.1.3 VEGF/ VEGF-Rezeptor-System

In den letzten Jahren wurde in zahlreichen Forschungsarbeiten das VEGF/VEGF-Rezeptor-System als wichtigster Regulator in der physiologischen und der pathologischen Angiogenese nachgewiesen [58-60]. Zur VEGF-Familie gehören sechs Glykoproteine mit einer Molekülmasse von etwa 40 kDa: VEGF-A oder auch VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und Plazenta Wachstumsfaktor -1 und -2 (PlGF) [47].

Einer der wichtigsten Vertreter dieser Faktoren für die Angiogenese ist VEGF-A. Neben der zentralen Rolle in der embryonalen Gefäßbildung [47], hat VEGF-A unter anderem im postnatalen Angiogenese-Prozess eine entscheidende Bedeutung einschließlich Wundheilung, Ovulation, Menstruation, Erhaltung des normalen Blutdrucks und Schwangerschaft [47, 61]. Fünf verschiedene VEGF-Isoformen (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) wurden bislang in der Literatur beschrieben [59]. Die VEGF-Isoformen unterscheiden sich alle durch ihre unterschiedlichen C-Termini, die bei den höhermolekularen Isoformen Heparin-bindende Sequenzen enthalten. Der N-Terminus hingegen ist bei allen Formen gleich und ist für die hochaffine Bindung an die VEGF-Rezeptoren (VEGF-R) verantwortlich [62]. Es wurde gezeigt, dass bestimmte VEGF-Isoformen gewebsspezifisch exprimiert werden. Diese Isoformen haben folglich festgelegte Rollen in der Vaskulogenese und höchstwahrscheinlich in der Tumorigenese [63-65]. Bereits die Deletion von einem VEGF-Allel in Mäusen führt zur embryonalen Letalität [13]. Die Überexpression von VEGF ist assoziiert mit Tumorwachstum und schlechter Prognose in mehreren Tumorsystemen wie bspw. Dickdarm-, Magen-, Pankreas-, Mamma-, Prostata-, Lungenkarzinom und Melanom [47]. Bei PlGF handelt es sich um ein VEGF-verwandtes Protein, das vor allem bei der pathologischen Angiogenese im adulten Organismus eine Rolle spielt [47]. Hauptsächlich wirken diese Faktoren auf Endothelzellen, sie können aber auch an VEGF-Rezeptoren auf hämopoetischen Stammzellen, Monozyten, Osteoblasten und Neuronen binden [66]. Während VEGF-B hauptsächlich bei der Entwicklung der Herzkranzgefäße und Durchblutung des Herzens und bei der inflammatorischen Angiogenese von Bedeutung ist, sind VEGF-C und VEGF-D für die Bildung des lymphatischen Systems mit verantwortlich [67]. VEGF-C und -D sind ebenfalls dimere Glykoproteine, die strukturell mit VEGF-A verwandt sind [47]. Ihre Expression findet sich im humanen Organismus in Herz, Plazenta, Muskel, Ovar, Dünndarm und

Lymphgefäßen [68]. VEGF-C und -D spielen bei der Embryogenese und vor allem bei der postnatalen Lymphangiogenese eine Rolle [47]. Außerdem wirken sie migrationssteigernd sowie mitogen auf Endothelzellen und erhöhen die Gefäß-Permeabilität. Dabei ist diese Wirkung schwächer als mit VEGF-A [69]. VEGF-E besitzt eine mitotische Aktivität ohne Heparin-bindende Domäne [47]. VEGF-A und -E scheinen ähnliche biologische Aktivitäten zu beeinflussen wie z.B. die Proliferation und Chemotaxis *in vitro* und die Angiogenese *in vivo* [70].

Als Rezeptoren für die VEGF-Familie fungieren drei Typ III Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, die aus sieben extrazellulären Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen, einer transmembranen und einer intrazellulären Domäne mit Kinase-Aktivität bestehen [71]. Bisher bekannt sind die Rezeptoren VEGF-R1, -R2 und -R3. VEGF-R3 hingegen besitzt anstelle der fünften Ig-Domäne eine Disulfid-Brücke [72]. Für die spezifische Ligandenerkennung werden allerdings nur die ersten drei N-terminalen Ig-ähnlichen Domänen benötigt [62]. Die Rezeptoren weisen intrazellulär nach Liganden-Bindung eine Tyrosin-Kinase-Aktivität auf. Bindet ein korrespondierender Ligand an den Rezeptor so ändert sich dessen räumliche Konformation. Die Bildung von Homodimeren oder Heterodimeren wird induziert. Hierdurch werden die Tyrosin-Kinasen, die am cytosolischen Teil des Rezeptors sitzen, aktiviert und phosphorylieren die Hydroxygruppe bestimmter Tyrosine des Rezeptors [72]. Dieser setzt daraufhin die Signaltransduktion in der Endothelzelle in Gang [73]. Die Mitglieder der VEGF-Familie unterscheiden sich in ihrer spezifischen Bindungsaktivität zu den VEGF-Rezeptoren (*Abb. 2*) [74]. Alle fünf VEGF-A Isoformen binden sowohl an den VEGF-R1, als auch an VEGF-R2. VEGF-A, VEGF-B, PlGF-1 und -2 aktivieren VEGF-R1. Im Gegensatz dazu interagieren VEGF-C und VEGF-D mit VEGF-R2 und dem VEGF-R3. VEGF-E hingegen bindet spezifisch an VEGF-R2 [47]. Zusätzlich zu den drei beschriebenen Rezeptoren besitzen einige Mitglieder der VEGF-Familie (VEGF₁₆₅, PlGF-2) Bindungsaffinität zu Neuropilin-1 und -2 [75]. Dabei handelt es sich um Rezeptoren, die vor allem an der Embryonalentwicklung und der Tumorangio-genese beteiligt sind. Sie wirken als VEGF-Co-Rezeptoren und können die Wirkung von VEGF-A potenzieren [76].

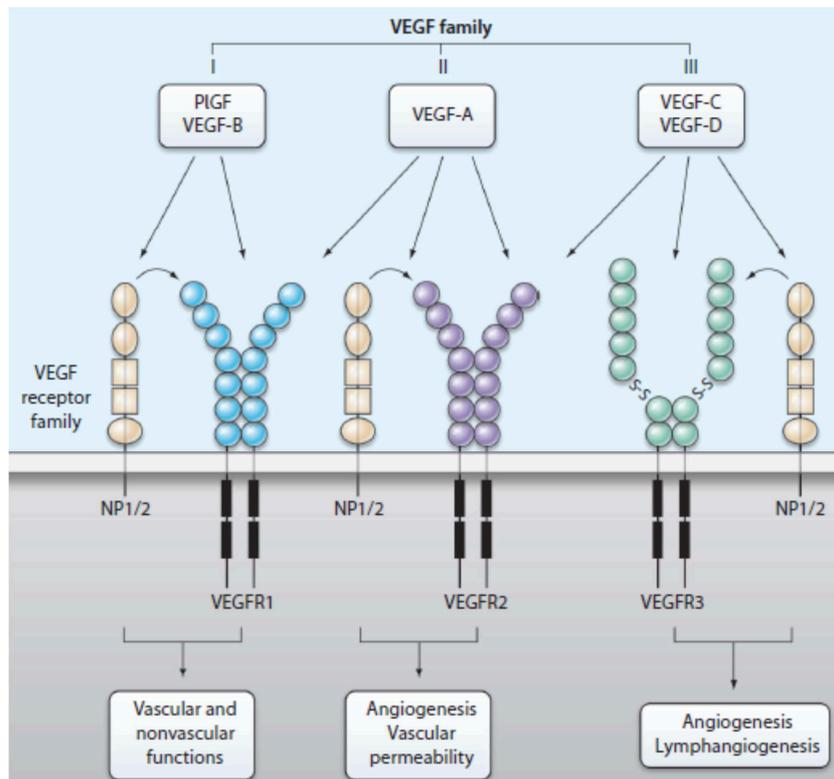


Abb. 2: Die VEGF-Familie umfasst eine Reihe von strukturell verwandten sezernierten Glykoproteinen, die an transmembrane VEGF-Rezeptoren binden.

Viele zelluläre Prozesse, einschließlich Angiogenese und Lymphangiogenese, werden dadurch moduliert. Bestimmte Isoformen binden ebenfalls an Neuropilin (NP1 und NP2) Co-Rezeptoren, die zur zellulären Antwort mitwirken. Die extrazelluläre Region bzw Ig-ähnliche Domäne der VEGF-Rezeptoren sind in der Abbildung als gefüllte Kreise dargestellt. Die schwarzen Rechtecke geben die intrazellulären Tyrosin-Kinase Domänen wieder. [74]

VEGF-R1, auch als Flt 1 (fms-like tyrosine kinase 1) bezeichnet, ist ein 180kDa großes Glykoprotein und besitzt die höchste Affinität für VEGF-A. Dabei ist VEGF-R1 der am häufigsten vorkommende Rezeptor in embryonalen und adulten Endothelzellen [77]. Sein Vorkommen sowohl in ruhenden, als auch in proliferierenden Endothelzellen, lässt auf eine Rolle für die Erhaltung von Endothelzellen schließen [78]. In vielen Studien sind für VEGF-R1 für verschiedene Zelltypen mehrere Funktionen nachgewiesen, wie z.B. die Beteiligung an der Migration von Monozyten [79, 80], die Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen [81], die Steigerung der Expression von MMPs von Blutgefäßen [77] und der Adhäsionseigenschaften von natürlichen Killerzellen [82].

VEGF-R2, auch als KDR (kinase insert domain-containing receptor) und das murine Homolog als Flk-1 (fetal liver kinase-1) [33] bekannt, besitzt eine Molekülmasse von 220kDa. VEGF-R2 ist hauptsächlich für die Transmitterfunktion von VEGF-Signalen in die Endothelzellen verantwortlich [67] und damit Hauptmediator für angiogene und permeabilitätsauslösende Effekte von VEGF-A [83]. Durch Dimerisierung und ligandenabhängige Tyrosin-Phosphorylierung von VEGF-R2 in intakten Zellen werden mitogene, chemotaktische und anti-apoptische Signale ausgelöst [66]. *In vivo* werden beide Rezeptoren in hypoxischen Zuständen verstärkt exprimiert [84, 85]. Stimulation durch VEGF-A induziert ebenfalls eine erhöhte Expression des VEGF-R2 Gens und steigende intrazelluläre VEGF-R2 Konzentrationen [86]. Dabei wird VEGF-R2 wie VEGF-R1 vorwiegend auf vasculärem Endothel exprimiert [65].

Von VEGF-R3, auch als Flt-4 (fms-like tyrosine kinase 4) bezeichnet, sind beim Menschen bisher zwei Isoformen (*Abb. 3*) bekannt [87]. VEGF-R3s-*short* und VEGF-R3l-*long* unterscheiden sich in ihren Carboxyl-Enden [88, 89]. Der *short*-Isoform fehlen 65 C-terminale Aminosäuren [72]. Überwiegend ist die *long*-Isoform exprimiert [90]. Der *short*-Isoform fehlen folglich zwei der am häufigsten phosphorylierten C-terminalen Positionen. Diese wichtigen Phosphorylierungsstellen der *long*-Isoform werden nur im Homodimer des VEGF-R3 phosphoryliert, jedoch nicht im Heterodimer mit VEGF-R2 [91]. Bindet VEGF-C oder VEGF-D an VEGF-R3 führt das zu einer Aktivierung und Phosphorylierung der VEGF-R3-Kinase an mindestens fünf C-terminalen Tyrosin-Positionen des VEGF-R3 (Tyr¹²³⁰, Tyr¹²³¹, Tyr¹²⁶⁵, Tyr¹³³⁷ und Tyr¹³⁶³) [91]. Eine Co-Lokalisation mit VEGF-R2 in Kapillaren sowie die Interaktion durch Heterodimerisierung konnte festgestellt werden [92]. VEGF-C fördert diese Heterodimerisierung von VEGF-R2 und -R3, wobei Tyr¹³³⁷ und Tyr¹³⁶³ nicht mehr phosphoryliert werden können (*Abb. 3*) [93].

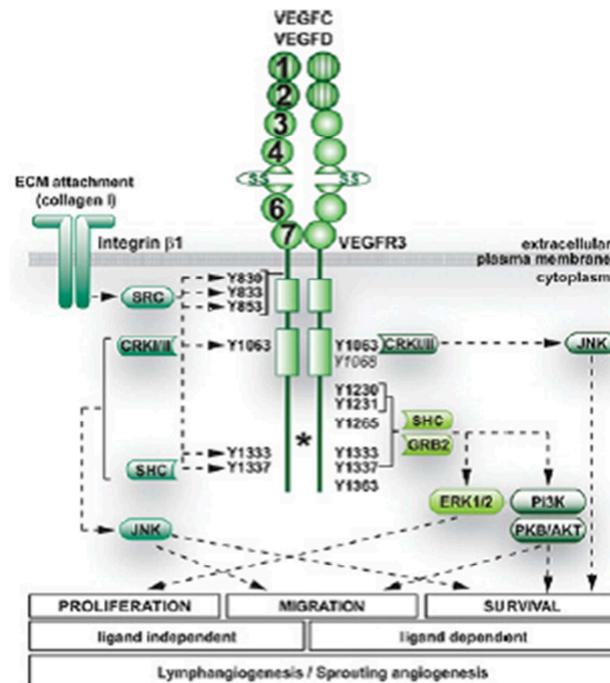


Abb. 3: Darstellung des aktiven und dimeren VEGF-R3.

Tyr¹⁰⁶⁸ ist entscheidend für die Phosphorylierung. VEGF-R3 kommt als *short*- und *long*-Isoform (die Länge variiert in der gekennzeichneten Region mit *). Tyr¹³³⁷ und Tyr¹³⁶³ werden nur in der langen Isoform im Homodimer des VEGF-R3, aber nicht im Heterodimer mit VEGF-R2, durch Kinasen phosphoryliert. VEGF-R3 kann durch ligandenabhängige oder -unabhängige Mechanismen zu Proliferation, Migration und Überleben von Lymphendothelzellen beitragen. ECM- Extrazelluläre Matrix. [72]

Des Weiteren ist VEGF-R3 in gefensterten Kapillaren von einigen Organen exprimiert, z.B. Knochenmark, kleineren Blutgefäßen der Milz und Leber, Glomeruli der Niere und endokrine Drüsen. Zusätzlich zeigen einige Studien, dass VEGF-R3 auf nicht-endothelialen Zellen exprimiert wird wie bspw. Osteoblasten [94] und Makrophagen [95]. VEGF-R3, und die dazugehörigen Liganden VEGF-C und -D spielen vor allem in der Embryogenese und der Lymphangiogenese eine tragende Rolle [96]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass VEGF-R3-defiziente Mäuse Herz-Kreislauf-Versagen und frühembryonale Letalität an E9.5 aufweisen [97]. Es wird angenommen, dass während der Embryogenese lymphatische Zellen auch aus zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen aus dem systemischen Kreislauf rekrutiert werden und sich in Lymphgefäße differenzieren [98]. Die gesteigerte Expression von VEGF-R3 ist im Mammakarzinom und Melanom zu beobachten und

fördert die Lymphangiogenese sowie die Metastasierung in regionale Lymphknoten und andere Organe [47, 69]. In Pankreastumoren führt die Aktivierung des VEGF-R3-Signalwegs in Tumorzellen zu einer gesteigerten Migrations- und Invasionsrate und somit auch zur Tumorprogression [99-101]. Auch in einer Vielzahl anderer Studien wird davon ausgegangen, dass VEGF-C, VEGF-D und VEGF-R3 die Lymphangiogenese bösartiger Tumoren und ihre Metastasierung über das Lymphsystem erleichtern [100, 102-104].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass fast alle Tumorzellen in der Lage sind verschiedene VEGF-Liganden zu produzieren. Die Expression dieser dimeren Glykoproteine kann durch viele Faktoren wie Hypoxie, Azidose, eine Vielzahl von Hormonen, Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Onkogenen und glykosylierten Proteinen gesteigert werden [3]. Aus der VEGF-Familie zeigt in Tumorzellen insbesondere VEGF-A eine erhöhte Expression. Die Aktivierung des VEGF/VEGF-Rezeptor-Systems startet ein komplexes Signalnetzwerk, das letztlich zur Bildung von Blutgefäßen führen kann. Zum einen wird direkt die Invasion, Proliferation und Migration der Endothelzellen gesteigert und zum anderen wird durch VEGF-A-Induktion die Hyper-Permeabilisierung der Gefäße gesteigert. Und schafft so ein optimales Umgebungsmilieu für die Gefäßneubildung im Tumor [47, 66, 105]. Das VEGF-/VEGF-R-System bietet demnach einen sehr günstigen Angriffspunkt für anti-angiogene Therapieformen in der Krebsforschung.

1.1.4 Anti-angiogene Therapie

Die angiogenen Signalwege bieten multiple potentielle Angriffspunkte für eine Hemmung der Tumorangiogenese als vielversprechende Therapiestrategie. Im Gegensatz zur konventionellen Behandlung ist bei der Hemmung der Angiogenese (*Abb. 4*) nicht eine direkte Zerstörung der malignen Zellen das Ziel, sondern die Möglichkeit pathologische Gefäßstrukturen sowie -funktionen zu „normalisieren“ um folglich eine Unterbindung der Nährstoffversorgung im Tumor und des Abtransportes von Stoffwechselmetaboliten zu ermöglichen [26]. Dabei soll das Gleichgewicht der verschobenen pro- und anti-angiogenen Faktoren wiederhergestellt werden.

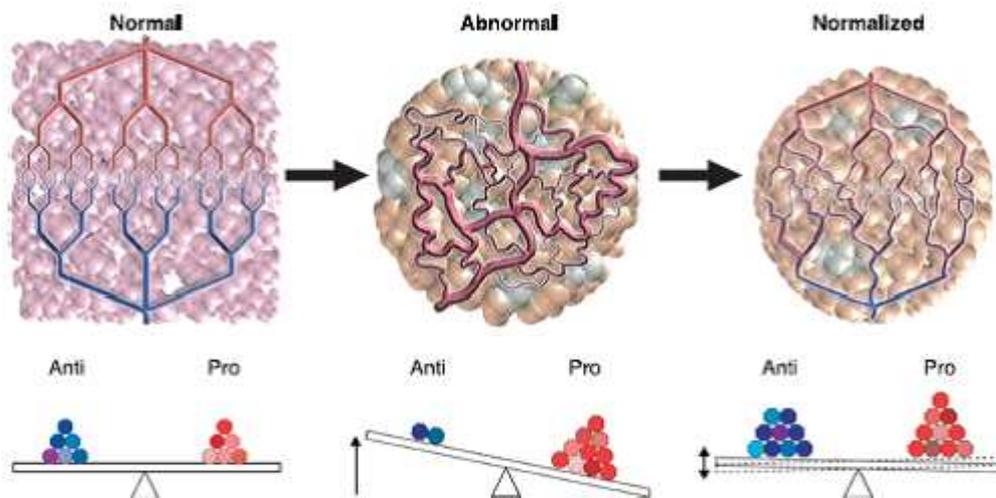


Abb. 4: Konzept der anti-angiogenen Therapie mit anschließender Gefäßnormalisierung.

Tumorgefäße verhalten sich sowohl strukturell als auch funktionell abnormal. Es wird postuliert, dass anti-angiogene Therapien die Struktur und die Funktionalität von Tumorgefäßen verbessern. Die phenotypischen Veränderungen in der Vaskularisierung spiegeln das verschobene Gleichgewicht von pro- und anti-angiogenen Faktoren im Gewebe wider. [106]

Anti-angiogene Substanzen können einen Einfluss auf den Basalmembranabbau, die Endothelzellmigration und -proliferation oder die Zellmatrix-Interaktion besitzen. Im Mittelpunkt sind vor allem Moleküle, die den Signalweg an den Rezeptoren blockieren. Dabei handelt es sich sowohl um Antikörper, die direkt an die Liganden oder Rezeptoren binden, als auch um Substanzen, die den intrazellulären Signalweg beeinflussen [107]. VEGF-R2 und VEGF-R3 Antagonisten im Folgenden sind Gegenstand zahlreicher anti-angiogener Therapien und der vorliegenden Arbeit. DC101, ein monoklonaler Antikörper, der gegen VEGF-R2 in der Maus gerichtet ist, konnte effizient Tumorwachstum in mehreren Xenograft-Modellen [108, 109]. Die vollständig humanisierte Variante des monoklonalen anti-VEGF-R2, IMC-1121B auch als Ramucirumab bekannt, wurde anschließend für klinische Studien entwickelt. Studien mit diesem Antikörper belegen anti-tumorale Effekte in murinen Xenograft-Modellen [110, 111]. Auch Phase I-II Studien in verschiedenen Malignitäten belegen den anti-tumoralen Effekt. Persaud et al. demonstrierten die stark inhibierende

Wirkung von IMC-3C5, Antagonist von humanem VEGF-R3 [112]. Die Blockade von VEGF-R3 in der Maus mit mF4-31C1-Antikörper reduzierte die Bildung von Lymph-Metastasen, die durch VEGF-D stimuliert wurden [113]. Weitere Studien belegten, durch Blockierung des VEGF-R3 Systems in Mäusen kann die Tumorlymphangiogenese und die Metastasierungsquote in Tumoren reduziert werden [114-116]. Angiogenese-Inhibitoren werden auf Grund ihres Wirkprinzips in verschiedene Klassen eingeteilt. Um VEGF-Rezeptoren gezielt und effektiv hemmen zu können bietet insbesondere die Blockade der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) eine vielversprechende Möglichkeit die tumorinduzierte Angiogenese zu unterbinden [117-119]. Für einige Tyrosin-Kinasen befinden sich hochselektive Inhibitoren (TKIs) derzeit in der klinischen Phase [120, 121]. TKIs sind kleine Moleküle, die eine Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungsstelle in der intrazellulären Domäne der RTKs besetzen. Dadurch wird sowohl die nach der Bindung von Liganden induzierte Dimerisierung und anschließende Phosphorylierung als auch mögliche Autophosphorylierungen der Rezeptoren unterbunden [122, 123]. Autophosphorylierungen sind Reaktionen, in denen die Kinase als ihr eigenes Substrat dient. Solche ligandenunabhängige Reaktionen können auf unterschiedlichen Wegen ablaufen. Einerseits kann eine Protein-Kinase sich selbst phosphorylieren oder wenn eine Protein-Kinase eine weitere Kinase derselben Herkunft phosphoryliert. Folglich kann eine Veränderung der enzymatischen Aktivität allgemein oder bezüglich bestimmter Substrate sein. Weiteres „Downstream Signaling“- z.B. über den MAP-Kinase- oder den PI3/Akt-Signalweg wird durch TKIs unterbunden. Verschiedene TKI-Grundgerüste werden verwendet, z.B. Quinazoline, Phenylamino-Pyrimidine, Pyrido(d)pyrimidine und Indoline [118]. Das kleine Molekül MAZ51 gehört zur Gruppe der Indoline. Diese tragen Aldehyd-Substituenten an der dritten Position, die eine hohe spezifische Bioaktivität aufweisen und in der Lage sind die Aktivität von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen zu hemmen. Kristallographie-Experimente deuten darauf hin, dass das Oxindol-Grundgerüst an die ATP-Bindungstasche der Tyrosin-Kinasen bindet, wobei der Indolin-Aldehyd-Substituent spezifisch mit den Tyrosin-Kinasen interagiert [124, 125]. MAZ51 wird in der vorliegenden Arbeit zur effektiven Blockade von VEGF-R3 eingesetzt. Das Glioblastom stellt eins der am meisten vaskularisierten Tumore dar und bietet sich dementsprechend für eine anti-angiogene Therapie an. Dazu soll im folgenden Abschnitt Bezug genommen werden:

1.2 Gliome

Gliome stellen Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS) dar. Sie entstehen durch die bösartige Entartung von Zellen des Gehirns oder Rückenmarks [126]. Sie werden nach der aktuellen World Health Organisation (WHO)-Klassifikation hinsichtlich Histologie, zellulären Ursprungs und genetischer Alterationen in vier Grade (WHO I-IV) (Abb. 5) eingestuft. [127, 128].

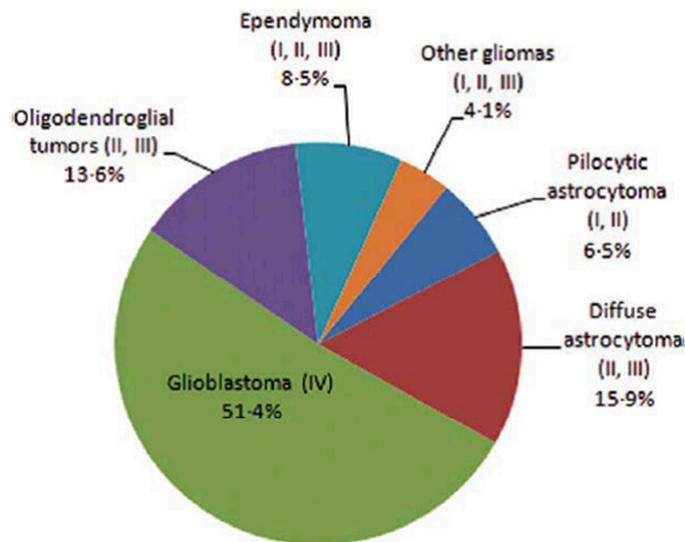


Abb. 5: Relative Häufigkeiten von Gliomen.

WHO-Tumorgrading erscheint jeweils in Klammern. Bevölkerungsbezogene Daten sind aus dem österreichischen Hirntumorregister zur Verfügung gestellt. [129]

Mehr als 70% der primären Hirntumore des Erwachsenen sind neuroepithelialen Ursprungs. Sie gehen von den Stützzellen bzw. Gliazellen des ZNS aus. Im ZNS gibt es verschiedene Gliazelltypen: Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen und Zellen des Plexus choroideus, sodass die Gliome in Astrozytome, Oligodendrogliome, Mischformen (Oligoastrozytome) und Ependymome untergruppiert werden [130]. Der WHO Grad wird bestimmt durch histologische Kriterien wie die Zelldifferenzierung, Zelldichte, nukleäre Polymorphie, mitotische Aktivität, Invasion des umgebenden Hirnparenchyms, mikrovaskuläre Endothelproliferate und Gewebnekrosen [127, 131]. Da alle Tumoren ab dem WHO Grad II diffus infiltrierend wachsen, sind diese chirurgisch nicht mehr vollständig entfernbar und neigen daher im Verlauf fast immer zur Rezidiv-Bildung. Des

Weiteren neigen Gliome des WHO Grades II zur malignen Progression. Als Folge entstehen Tumoren des WHO Grades III und des WHO Grades IV [132]. Man unterscheidet von den häufigen Astrozytomen die Ependymome und Oligodendrogliome. Ependymome treten häufig im Kindes- und Jugendalter auf [133]. Oligodendrogliome und die Mischform der Oligoastrozytome sind häufig im Alter zwischen 40 und 50 Jahren und sind oft mit Epilepsien verbunden. Gemeinsam mit den Ependymomen weisen sie maximal den WHO Grad III auf und machen nicht mehr als 10% der Gliome aus [128, 134]. Das Glioblastom (WHO IV) ist die aggressivste Hirntumorerkrankung bei Erwachsenen [128]. Auf Grund der Bedeutung des Glioblastoms in der Klinik soll im folgenden Abschnitt detailliert darauf eingegangen werden.

1.2.1 Glioblastoma multiforme

Das Astrozytom (WHO IV) oder Glioblastoma multiforme (GBM) zeigt den höchsten Malignitätsgrad und ist gleichzeitig die häufigste Hirntumorentität. Es macht die Hälfte aller Gliome aus (Abb. 4) [129]. GBMs treten bevorzugt im höheren Lebensalter (zwischen 65 und 70 Jahren) auf. Mit einer Letalität von 50% nach Diagnosestellung führt es innerhalb von durchschnittlich 13-15 Monaten zum Tode [135, 136]. Die jährliche Inzidenz liegt bei 3 bis 5 neu diagnostizierten Fällen pro 100.000 Einwohner [134, 137]. Glioblastome sind häufig in der subkortikalen weißen Substanz im frontotemporalen Bereich der Großhirnhemisphären lokalisiert, können jedoch auch in bis zu 10% der Fälle multifokal auftreten [138, 139]. Häufige Symptome sind fokale neurologische Zeichen (Sprachlosigkeit, Parästhesien, Hemiparese, Sehstörungen), Stimmungsschwankungen und Persönlichkeitsveränderungen, Krämpfe, oder Symptome durch erhöhten Hirndruck wie z.B. Übelkeit, Erbrechen oder Kopfschmerzen [129]. Auf Grund ihres schnellen und invasiven Wachstums führen GBMs zu einer drastischen Kompression des angrenzenden Hirnparenchyms. Des Weiteren können diffus migrierende Tumorzellen vorwiegend entlang myelinisierter Bahnen nahezu das gesamte Gehirn infiltrieren. Kennzeichnend für das GBM und die histologische Diagnosestellung sind ausgeprägte Gewebs- und Zellpolymorphien mit flächenhaften Gewebsnekrosen, Einblutungen und mikrovaskuläre Gefäßproliferate [138]. Klinisch kann der Tumor ohne vorherige weniger bösartige Läsion auftreten, man spricht dann vom primären oder „*de novo*“ Glioblastom [140]. Die andere Möglichkeit ist die Diagnose als rezidivierender Folge-Tumor eines

bekanntes Astrozytoms des WHO-Grades II oder III, wobei die Dauer der Progression von Grad II zu IV etwa 5 Jahre, von Grad III zu IV etwa 2 Jahre beträgt [134, 141]. In über 95% aller Gliom-Fälle wird ein primäres GBM diagnostiziert, jedoch kann es der Fall sein, dass ein sekundäres GBM durchaus aus einem vormals auf Grund fehlender klinischer Symptomatik nicht diagnostizierten langsam wachsenden Astrozytom niedrigeren Malignitätsgrades hervorgegangen ist [128, 132, 134, 141-143].

Mittlerweile sind einige molekulare Marker und genetische Muster bekannt, die zur Entstehung, Identifizierung des Gliomtyps und zur Wahl der Therapie beitragen [129, 141]. Beim primären Glioblastom wird der loss of heterozygosity (LOH, Verlust des heterozygoten Zustands) des gesamten Chromosoms 10, das Sitz verschiedener Tumorsuppressorgene ist, sowie eine „Endothelial Growth Factor Receptor“ (EGFR)-Amplifikation im Zusammenhang mit der Tumorentstehung diskutiert [141].

Mutationen der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH-1 und -2) lassen Glioblastome in Subtypen klassifizieren und möglicherweise prospektiv eine Aussage über die Diagnose, Prognose und Behandlungsformen treffen. Zwischen 50% und 86% aller sekundären Glioblastome und 4% bis 21% primärer Glioblastome ist eine IDH-1 Mutation nachweisbar [144]. Da die Mutation auch in niedriggradigen Astrozytomen und Oligodendrogliomen auftritt, vermutet man eine wichtige Rolle in sekundär entstandenen Glioblastomen. Diese Mutation tritt vornehmlich bei jüngeren Patienten auf und ist mit einer besseren Prognose assoziiert [144]. Das Vorhandensein von IDH-Mutationen ist häufig gleichzeitig mit p53-Tumorsuppressorgen-Mutationen und Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p) und dem langen Arm von Chromosom 19 (19q) assoziiert, welche wahrscheinlich in der frühen Gliomgenese auftreten [138, 144].

Das O6-Methyl Guanine Methyl Transferase (MGMT) ist ein DNA-Reparatur-Protein, das spezifisch pro-mutagene Alkylgruppen von der O6-Position von Guanin in der DNA entfernt [141]. Eine Promotor-Methylierung konnte vorwiegend in sekundären Glioblastomen als in primären Glioblastomen gezeigt werden [141]. MGMT trägt dazu bei, dass die Zellen unempfindlich gegenüber alkylierenden Substanzen [141] und damit resistent gegen Nitrosoharnstoffe und andere alkylierende Chemotherapeutika, wie z.B. Temozolomide (TMZ) reagieren. Die Hypermethylierung seiner Promotorregion führt zum Funktionsverlust des Gens. Sie führt bei den betroffenen Patienten zu einem verlängerten progressionsfreien Intervall und zu einer längeren

Lebenserwartung, sofern sie mit Nitrosoharnstoffen behandelt werden [145]. Dies ist ein molekulares Merkmal, welches von klinischer Relevanz ist und eine Einschätzung des weiteren Verlaufs der Erkrankung erlaubt.

Der operative Eingriff ist die initiale Therapie der Wahl. Die Entfernung der Hauptmasse des Tumors kann das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen und die Symptome lindern, aber nicht dauerhaft verhindern. Einzelne Tumorzellen haben das gesunde Gehirngewebe infiltrativ durchwandert. Deswegen ist eine vollständige Tumorentfernung nicht möglich [129]. Verbleibende Tumorzellen im Parenchym führen fast immer zu Rezidiven. Die Behandlung des GBMs wird durch Strahlen- und Chemotherapie ergänzt [129]. Die Strahlentherapie ist ein wichtiger Bestandteil der adjuvanten und additiven Therapie von Gliomen, die sowohl in der Primär-, Rezidiv als auch Palliativbehandlung zur Verbesserung der Überlebenszeit eingesetzt wird. [146] Das einzige evidenzbasierte Chemotherapeutikum für Glioblastome ist derzeit TMZ. Das Alkylanz TMZ zeichnet sich durch eine gute Verträglichkeit und hohe orale Verfügbarkeit mit guter Penetration der Blut-Hirn-Schranke aus und konnte die mediane Überlebenszeit in Kombination mit Strahlentherapie von zwölf auf 15 Monate verlängern. Die kombinierte Radiochemotherapie mit TMZ gefolgt von einer TMZ- Monotherapie gilt derzeit als Standardtherapie [147]. Eine Kombination mit Radio- und Chemotherapie konnte eine Wachstumshemmung des Tumors sowie eine Prognoseverbesserung der Patienten erreichen [47]. Die Suche nach alternativen Therapieansätzen soll die neuroonkologische Therapie verbessern und das Gesamtüberleben der Patienten verlängern. GBM-Patienten haben heute trotz operativer, strahlen- und chemotherapeutischer Behandlung eine sehr schlechte Prognose [129]. Es muss deswegen intensiv nach neuen Therapieoptionen gesucht werden.

1.3 Neoangiogenese im GBM

Die Neoangiogenese, der Übergang in eine angiogene Wachstumsphase („angiogenic switch“), der eine starke Vaskularisierung zur Folge hat, ist im Glioblastom ein charakteristisches Kennzeichen. Die GBM-Entstehung und das Fortschreiten des Tumors beinhalten die Co-Option, diese ermöglicht Tumorzellen an existierenden Blutgefäßen zu migrieren um von der Tumormasse in die weiße Substanz und kortikale Areale zu infiltrieren [36, 37]. Die neu gebildeten Tumor-Gefäße sind strukturell und funktionell abnormal, mit unorganisierten Verbindungen

und einer lokal beschädigten Blut-Hirn-Schranke. Dies bewirkt einen instabilen Blutfluss und ein Ausströmen von Proteinen in den interstitiellen Raum, was wiederum zu Hypoxie, Azidose und erhöhtem Hirndruck führt [148, 149]. Zur Neovaskularisierung im GBM tragen insbesondere Faktoren wie Hypoxie und Nekrose bei, die zur vermehrten Expression des pro-angiogenen Faktors VEGF-A in GBM-Zellen führt [150]. Im GBM sind VEGF-A und VEGF-R2 vermehrt zu finden in Pseudopalisaden-Bereichen um die Nekrosen sowie in den infiltrierenden Zellen um den Tumor [139, 151]. Der VEGF-A Signalweg stimuliert auch die Rekrutierung von Knochenmark-Vorläuferzellen, diese sezernieren pro-angiogene Faktoren, die das Ungleichgewicht zugunsten der laufenden Tumorangiogenese verschieben [152]. Die hohe Gefäßdichte im GBM korreliert dabei in verschiedenen Tumoren mit der Malignität des Tumors [153]. Demzufolge bietet sich die anti-angiogene Therapiestrategie insbesondere im GBM an.

1.3.1 Anti-angiogene Therapie im GBM

VEGF-A im GBM hat sich zum Hauptfokus der anti-angiogenen Therapie etabliert [154]. Die Expression von VEGF-A ist im GBM mehrfach gesteigert und korreliert auch mit der Malignität [139, 155, 156]. Demzufolge scheint dieser pro-angiogene Faktor ein sinnvoller Ansatz für die GBM-Therapie zu sein [106, 157]. Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der alle Isoformen des humanisierten VEGF-A zielgerichtet hemmt und somit die Bindung des Liganden an VEGF-R2 verhindert [158]. Mit der Erstzulassung in den USA für fortgeschrittenen Dickdarm- bzw. Enddarmkrebs im Jahr 2004 war Bevacizumab das erste anti-angiogen wirkende Krebsmedikament, das für die Behandlung eines größeren Kreises von Patienten mit fortgeschrittenem Krebs zur Verfügung stand [159, 160]. Mehrere Studien haben die Vorteile von Bevacizumab als adjuvante Therapie bei GBM-Patienten untersucht [154, 161]. Auf Grund seiner gezielten VEGF-A-Blockade kann Bevacizumab als adjuvante Therapie mit einem breiten Spektrum verschiedener Chemotherapien und anderer Krebsbehandlungen effektiv kombiniert werden, ohne die Nebenwirkungen dieser Therapien wesentlich zu verstärken. Im Jahr 2009 wurde daraufhin Bevacizumab als Monotherapie bei der Behandlung von progressivem GBM genehmigt [154, 161]. Die anti-VEGF-A Blockade besitzt folgende mutmaßliche anti-neoplastische Mechanismen im malignen Gliom [162]:

1. Blockade der Neoangiogenese. Folglich fehlen Nährstoffe und Sauerstoff für das Tumorwachstum [163].
2. „Normalisierung“ der undichten Gefäße und des irregulären Blutflusses [106].
3. Unterbindung von unreifen Blutgefäßen, so dass nur reife und funktionsfähige zurückbleiben. Verbesserter Transport von Chemotherapeutika [164].
4. Wirkt dem Anstieg von VEGF-A nach Bestrahlung und Chemotherapie entgegen [165, 166].
5. Ergänzung der anti-vaskulären Wirkung von Chemotherapien, indem Teilmengen von Tumor-Endothelzellen zerstört werden. Dadurch wird die Mobilisierung, Funktion und Lebensfähigkeit von endothelialen Vorläuferzellen beeinträchtigt [167, 168].

Während VEGF-A-Hemmer zur klinischen Behandlung im Fokus stehen, wird immer deutlicher, dass nicht alle Patienten von dieser Therapie profitieren. Anfänglich ist zwar ein Erfolg zu verzeichnen, jedoch entsteht eine Resistenz und es ist kein klinischer Erfolg durch die anti-VEGF-A Therapie zu sehen [60]. Nach einer gewissen Latenzzeit entwickelt das „normalisierte“ Tumorgefäßsystem eine Resistenz gegenüber der anti-angiogenen Therapie, was zu erneutem Tumorwachstum führt [169, 170]. Dieses Erscheinungsbild und die Hochregulation alternativer pro-angiogener Faktoren nach anti-VEGF-A Therapie wird als „second wave of angiogenesis“ bezeichnet [171]. Mehrere Fragen verlangen Aufklärung, einschließlich Mechanismen der Resistenz gegen anti-angiogene Behandlung. Hierbei werden nach Blockierung des VEGF-A/-R2 Signalwegs offensichtlich alternative Signalwege aktiviert, die einen zweiten kompensatorischen Schub einer Angiogenesewelle auslösen, die sonst unter physiologischen Bedingungen eine untergeordnete Rolle spielen. Interessanterweise werden die VEGF-R3 assoziierenden Liganden VEGF-C und VEGF-D, die eigentlich primär eine wichtige Rolle in der Lymphangiogenese spielen [172-174] im malignen Gliom exprimiert [175-177]. Das ZNS ist jedoch frei von lymphatischen Gefäßen. Es ist deutlich, dass das VEGF-A/-R2-System nicht die einzigen Mediatoren der Tumorangiogenese sind. Die Vorgänge der Neoangiogenese im GBM können offensichtlich nicht durch Hemmung einzelner Faktoren wie VEGF-A begrenzt werden. Alternative pro-angiogene Mechanismen wie VEGF-R3 könnten im GBM auf Grund gradabhängiger VEGF-R3 Expression in Gliomen eine tragende Rolle besitzen [175]. Das Vorkommen von

VEGF-R3 im malignen Gliom, jedoch nicht im „gesunden“ Hirngewebe [175] stellt ein äußerst interessantes Target im GBM dar. VEGF-R3 als vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt im GBM wurde demnach bisher noch nicht gezeigt.

2 Fragestellung

Tumore, die aus Zellen des Rückenmarks und des Gehirns hervorgehen, stellen einige der aggressivsten Krebsformen des Zentralen Nervensystems im Menschen dar. Diese Tumore werden zusammenfassend als Gliome bezeichnet [127]. Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist, mit 95% der Gliom-Fälle, der am häufigsten diagnostizierte hochgradige Gliomtyp [132]. Eine Letalität von 50% nach der Diagnose führt innerhalb von durchschnittlich 13-15 Monaten zum Tode [135, 136, 147, 178]. Trotz kombinierter Therapien sind GBMs nicht heilbar [178]. Gründe für ein Therapieversagen bei GBMs ist die extreme Invasivität der Tumore. Durch diese Invasivität ist eine vollständige Resektion des Tumors nicht möglich und erschwert eine effektive Strahlentherapie [179, 180]. Zusätzlich zeugen GBMs von sehr großer Heterogenität. Subpopulationen an chemo-resistenten Zellen können während der Chemotherapie expandieren und nach relativ kurzer Zeit ein Rezidiv bilden [147, 181]. Im Gegensatz zur konventionellen Behandlung ist bei der Hemmung der Angiogenese nicht eine direkte Zerstörung der malignen Zellen das Ziel, sondern die Möglichkeit pathologische Gefäßstrukturen sowie -funktionen zu „normalisieren“ um folglich eine Unterbindung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zu ermöglichen [26]. Um GBM-Patienten einen erweiterten und verbesserten Therapieansatz bieten zu können wird immer häufiger diskutiert das Mikro-Milieu von Tumoren in Tumortherapien einzubeziehen. Anti-angiogene Therapien beziehen sich auf die Hemmung der Tumorangiogenese und werden zur Behandlung von tumor-assoziierten Blutgefäßen auch schon klinisch eingesetzt [182]. Die anti-angiogene Therapie mit dem VEGF-A Antagonisten Bevacizumab ist im Moment die wichtigste Adjuvans-Therapie gegen GBM [106]. Trotz anfänglichem Enthusiasmus für diese Form der Therapie zeigt sich aber, dass ein komplexer Vorgang wie die Angiogenese nicht mit einem einzelnen Medikament auf Dauer kontrollierbar ist [183]. Zahlreiche Beobachtungen haben gezeigt, dass eine anti-VEGF-A Therapie nur zu einem transienten Tumorregress geführt hat [106]. Das augenscheinliche Therapieversagen und das therapeutische Nutzen von Bevacizumab werden dadurch eingeschränkt, dass der Tumor in relativ kurzer Zeit gegen eine VEGF-A Blockade resistent wird. Und alternative pro-angiogene Faktoren [26] wie beispielsweise VEGF-C und VEGF-D kompensatorisch nutzt [184]. Dabei drängt sich vor allem die Frage in den

Vordergrund, inwiefern andere zelluläre Targets relevant sind um den Fortschritt in der Behandlung von GBM-Patienten zu erzielen. Interessanterweise konnten Studien zeigen, dass VEGF-R3 und seine Liganden VEGF-C und -D, die eigentlich der Lymphangiogenese zugeschrieben werden, vor allem in intra-tumoralen Gefäßen von Glioblastomen [175-177], jedoch nicht im nicht-neoplastischen Hirngewebe exprimiert werden [175]. Demzufolge erscheint VEGF-R3 als ein potentieller Kandidat, der die Therapieresistenz gegen Bevacizumab vermitteln könnte.

Ein Aspekt dieser Arbeit war zunächst zu prüfen inwieweit der Effekt einer anti-angiogenen Therapie mittels Bevacizumab das VEGF-R3-Rezeptorsystem im GBM kompensatorisch nutzt. Die Wirkung einer anti-VEGF-A-Therapie wurde sowohl auf humanem GBM-Gewebe als auch auf molekularbiologischer Ebene in selbstisolierten GBM-Endothelzellen (gbECs) und Gliomzellen hinsichtlich des VEGF-R3 Signalsystems untersucht.

Kernpunkt dieser Arbeit war es zu überprüfen, welche Funktion VEGF-R3 im malignen Gliom einnimmt und ob eine alleinige oder simultane Blockade des VEGF-A/-R2 und VEGF-C/-R3 Signaltransduktionsweges signifikante anti-angiogene und anti-tumorale Unterschiede aufweist. Dafür sollten zunächst gbECs und Gliomzellen hinreichend auf VEGF-R3 Expression geprüft werden. Außerdem diente zur weiteren Untersuchung der VEGF-R3 Rolle im GBM eine Überexpression von VEGF-R3. Mittels MAZ51, einem zellpermeablen Molekül oder mit VEGF-R3 blockierendem Antikörper konnte VEGF-R3 wirkungsvoll inhibiert werden. Für die effektive VEGF-A und VEGF-R2 Blockade dienten Bevacizumab und ein VEGF-R2 blockierender Antikörper. Schließlich wurde der Einfluss von MAZ51, blockierenden VEGF-R2/-R3 Antikörpern und Bevacizumab auf die *in vitro*-Angiogenese und Migrationsfähigkeit von gbECs sowie Proliferation von gbECs und Gliomzellen untersucht.

Für die präklinische Untersuchung von neuartigen Therapiekonzepten, wie die Hemmung der Tumorangiogenese, ist die Etablierung von Tiermodellen zunächst zur Bestimmung der Wirkung und Verträglichkeit neuer Substanzen sehr wichtig. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war es zu klären inwieweit die intrazelluläre Blockade von VEGF-R3 mit MAZ51 einen therapeutischen Effekt aufweist. Hierfür sollte ein Gliom-Modell an C57/Bl6-Mäusen optimiert und evaluiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollten schließlich Gliomzellen in die Maus orthotop inokuliert und eine experimentelle anti-angiogene Therapie mit MAZ51 sowie den Antagonisten von VEGF-R2 und VEGF-R3 mittels blockierenden Antikörpern durchgeführt werden.

Dabei sollte der Einfluss auf das Tumolvolumen bestimmt werden. Letztlich sollte auch der anti-tumorale Effekt nach intracerebraler Gabe von MAZ51 über osmotische Minipumpen bestimmt werden.

Die vorliegende Arbeit soll VEGF-R3 als vielversprechendes Target im malignen Gliom demonstrieren. Außerdem soll aufgezeigt werden wie die Therapie im GBM durch den Einsatz von VEGF-R3 Kinase-Inhibitor MAZ51 und VEGF-R3 Blockade bereichert werden könnte.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	KSG
BioPhotometer	eppendorf
Blockthermostat BT 1301	HLC
Brutschrank CD150	Binder
Brutschrank	Heraeus
Digitale Geldokumentation	Serva
Digitalkamera Power Shot G2	Canon
FACSCalibur Durchflusszytometer	BD Biosciences
Entwicklermaschine Scopix LR 5200	Agfa
Fluoreszenzfilterset	Zeiss
Folienschweißgerät Folio	Severin
Gefrierschrank -80 °C HFU 86 450	Heraeus
Gefrierschrank Premium	NoFrost
Glashomogenisator	Braun
Handstückzähler mechanisch	VWR
Kühlschrank Comfort	Liebherr
Kühlschrank Economy	Liebherr
Kühlschrank Premium No Frost	Liebherr
Kurzzeitmesser (Stoppuhr)	VWR
Laminar flow hood Hera safe	Heraeus
Magnet Particle Separator	Roche
Magnetrührer VMS-C7	VWR
Mikroplate Reader Versa max	Molecular Devices
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikroskop Axiovert 35	Zeiss
Mikrotom	Pfm medicals
Mikrowellenherd	Siemens
MilliQ-biocel A10	Millipore
Minishaker MS2	IKA Labortechnik
Multipette	eppendorf
OP-Besteck	Medizinisches Lager
pH-Elektrode pH 526	WTW
Pipetten (10, 20, 200, 1000µl)	eppendorf
Pipettierhilfe Easypet	eppendorf
Power Pac 3000-Elektrophorese	BioRad
Quecksilberlampe mbq 52 ac	Zeiss
Röhrchengestell	TPP
Schüttler Polymax 1040	Heidolph
Stickstofftank Chronos	Messer
Thermocycler vapo. protect	eppendorf

Vakuumpumpe	BioRad
Vortex-Mixer	VWR
Waage AG204 Mettler	Toledo
Waage PB 3002 Mettler	Toledo
Wärmeschrank	Heraeus
Wasserbad	Memmert
Zählkammer, Neubauer improved	VWR
Zellsuspensionsrotator	Labor Brand
Zentrifuge 1-15	Sigma
Zentrifuge 5415 R	eppendorf
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich
3CCD Color Video Camera	Sony

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
5L Kanister schwarz zur Entsorgung / Abfallbehälter	Wirtschaftslager
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 Kanülen etc.)	Heisig
Injektionsspritzen	Braun
Präzisionstuch Kimwipes Lite 115x215mm (rote Boxen)	ZEFA Laborservice
Laborflasche klar mit Kappe und Gewinde 500ml	Schott Duran
Laborflasche klar mit Kappe und Gewinde 250ml	Schott Duran
Laborflasche klar mit Schraubverschluss 100ml	Schott Duran
Messzylinder 1000ml	Wagner & Munz
Messzylinder 100ml	ZEFA Laborservice
Müllbehälter 50L gelb	Wirtschaftslager
Objektträger 76x26 Superfrost	Wagner & Munz
Petrischale	Sarstedt
Pipettenspitzen blau 1000µl steril	Sarstedt
Pipettenspitzen Eppendorf crystal 0,5-20µl steril	eppendorf
Pipettenspitzen DIAMOND Tower Pack	gilson
Präparate Kasten schwarz f. 100 Objektträger	ZEFA Laborservice
Präparatmappe grau mit Deckel für 20 OT (Pappe)	Wagner & Munz
Reaktionsgefäß 1,5ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß safe lock 2ml	eppendorf
Reaktionsgefäß safe lock 0,5ml	eppendorf
Falconröhrchen 15ml	TPP
Falconröhrchen blau 50ml	BD
Spritzenfilter 0,22µm	Roth
Stripetten (5, 10, 25ml)	Schubert & Weiß

Wägebepapier 133 x 100 mm	ZEFA Laborservice
Wägeschiffchen klein Polystyrol	Schubert & Weiß
Wägeschiffchen mittel Polystyrol	VWR
Zellstofftücher Kimberly/Clark (blau)	Bauer Papier
Poly-Flachbeutel 80 x 120 mm transparent	Günther D.U.E.
BD Microlance Kanülen gelb 20G 0,9 x 40 mm	BD
BD Microlance Kanülen grau 22G 0,7 x 30 mm	BD
Krankenunterlage 40x60cm Molinea Plus-E	Molinea
Krankenunterlagen 60x90cm Molinea Plus	Molinea
Nitrilhandschuhe pud.fr. latexfrei S	Cardinal Health
Handschuhe klein S semper care	SATRA Technology Centre
Skalpelle steril Größe 15, 20, 23	Feather
Spritzen (5, 10ml)	BD

3.1.3 Zellkultur

Produkt	Hersteller
Kryoröhrchen	Kisker
Zellsieb 40µm blau	BD Falcon
Zellsieb 70µm weiß	BD Falcon
Fetales Kälberserum (FKS) (Charge 0344X)	Biochrom AG
DMEM - Medium 1,0 g/l + L-Glutamin	Biochrom AG
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma
Trypsin/ EDTA (10x) (0,5%/0,2%)	Biochrom AG
Medium 199 Earl's BSS	LONZA
PBS pH 7,4	Apotheke
MEM Eagle NEAA (100x)	Gibco
Penicillin/ Streptomycin- Lösung	Gibco
G418-Sulfat	CalbioChem.
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Einfrigerbox für Kryoröhrchen	Nunc
Matrigel growth-factor-reduced	BD
Microvascular endothelial cell growth medium, enhanced + Kit	PELO Biotech
Collagenase	Serva
Trypan-Blau	Sigma
Sulforhodamin-B	Sigma
Dextran	Sigma
Zellkulturflasche TPP mit Filter 25cm ²	TPP
Zellkulturflasche TPP mit Filter 75cm ²	TPP
Zellkulturflasche TPP mit Filter 150cm ²	TPP
Zellkulturtestplatte 6-well	TPP
Zellkulturtestplatte 12-well	TPP
Zellkulturtestplatte 24-well	TPP
Zellkulturtestplatte 96-well	TPP
µ-slides Angiogenese	ibidi
Culture-Insert für Wound Healing Assay	ibidi

3.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

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

3.1.4.1 Primer

Zielgen	Sequenz	AT	Produktgröße (bp)
VEGF-A	AGGGCAGAATCATCACGAAGT (s) GGTCTCGATTGGATGGCAGTA (as)	58 °C	73
VEGF-C	CACGGCTTATGCAAGCAAAGA (s) TCCTTTCCTTAGCTGACACTTGT (as)	58 °C	121
VEGF-D	AGCATCCCATCGGTCCACTA (s) CGTTTCTCTAGGGCTGCACT (as)	61 °C	106
VEGF-R2	AGTGATCGGAAATGACACTGGA (s) GCACAAAGTGACACGTTGAGAT (as)	59 °C	213
VEGF-R3 <i>short</i>	TCCTCCAGGATGAAGACATTTGAG (s) TGCTCCACCAGCTTCTTG (as)	59,2 °C	420
VEGF-R3 <i>long</i>	CCCACGCAGACATCAAGACG (s) TGCAGAACTCCACGATC (as)	59,2 °C	380
GAPDH	TCCAAAATCAAGTGGGGCGATGCT (s) ACCACCTGGTGCTCAGTGTAGCCC (as)	59 °C	420

3.1.5 Immunhistochemie /-cytochemie

Produkt	Hersteller
AEC-Kit	Sigma
AquaTex	Merck

Antikörper Verdünnungsmedium	Dako
Brij	Merck
Citratpuffer (10x), pH 6	Dako
Cryomatrix (Tissue-Tek [®])	Thermo Scientific
Eosin	Sigma
Entellan	Merck
Ethylen Glycol	Sigma
DAB Substrat-Chromogen System	Dako
Fluoreszenz Eindeckmedium	Dako
Glycerol	Sigma
Hope I+II Lösung	DCS LabLine
Universal LSAB2- Kit	Dako
Universal LSAB Plus Kit (<i>System HRP+Chromogen</i>)	Dako
Paraffin	DCS LabLine
Peroxidase Blocking Reagenz	Dako
Protein Blocking Reagenz	Dako
Roti-Histol	Roth
Streptavidin HRP konjugiert	Dako
Tween 20	Sigma
LSAB Biotinylated AB	Dako
Aceton reinst	Roth
Citronensäure Monohydrat	Sigma
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Sigma
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O)	Sigma
3-(Triethoxysilyl)-propylamine (= Silan)	Sigma
Kaisers Glyceringelatine	Merck
Mayer`s Hämalalaun Lösung	Merck
Perhydrol (Wasserstoffperoxid) 30%ig	Merck
Methanol P.A.	Roth/ Merck
Ethanol absolut (vergällt)	Apotheke
Ethanol 96% (vergällt)	Apotheke
Ethanol 70% (vergällt)	Apotheke
PBS Puffer pH 7,4 (10x)	Apotheke
2-Propanol	Roth

3.1.6 Western Blot

Produkt	Hersteller
Immun-Blot PVDF-Membran (26 cm x 3,3 m)	BioRad
Immunstar Luminol Enhancer ECL und HRP Peroxid-Puffer	Thermo Scientific
Marker: Presicion Plus Protein Marker	Invitrogen
Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate	BioRad
Lämmli Puffer	BioRad
Quickstart BSA Standard Set	BioRad
Quickstart Bradford Dye Reagent	BioRad
Mini Trans Blot Electrophoretic Transferecell	BioRad

Mini Trans Blot Filter Paper (7,5 x 10 cm)	BioRad
Fiberpads (8 x 11 cm)	BioRad
Flachbeutel PE 115 x 155 mm	Boll
Tween 20	Sigma
Röntgenfilm Super X-Ray RX 18 x 24 cm	Fuji
Methanol reinst	Roth
Salzsäure (HCl) 2 mol/l	Merck
Nonidet P40	Roche
Magermilchpulver	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma
Rinderalbumin (BSA)	Sigma
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma
Acrylamid (AA)	Thermo Scientific
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
PIC I (Protease-Inhibitor-Cocktail)	Sigma
PIC II (Protease-Inhibitor-Cocktail)	Sigma
Tris (TRIZMA-Base)	Sigma
TRIZMA hydrochloride	Sigma
Phosphatase Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma

3.1.7 Antikörper

Antikörper	Zusatz		Firma
gbEC-Isolation			
CD31	mouse anti-human		Serotec
CD105	mouse anti-human		Serotec
CD34	mouse anti-human		Serotec
IHC			
VEGF-R3	goat anti-human	5µg/ml	R&D AF349
VEGF-C	goat anti-human	2µg/ml	R&D AF752
CD31	goat anti-human	1:100	Dako
ICC			
VEGF-R3	rabbit anti-human		Abcam
WB			
VEGF-R3	rabbit anti-human	1:300	Abcam
VEGF-R3	mouse anti human	1:100	R&D
VEGF-R3	rabbit anti-human	1:300	Cell Signaling 2485
p38-MAPK, -Phospho, XP	rabbit anti-human	1:1000	Cell Signaling 8690
P44/42 MAPK (Erk1/2), Phospho	rabbit anti-human	1:1000	Cell Signaling 4695
β-Aktin	mouse anti human	1:5000	Sigma
FACS			
VEGF-R3-PE	mouse anti-human		R&D

3.1.8 Inhibitoren

Produkt	Zusatz	Firma
Bevacizumab	monoklonaler anti-VEGF-A Antikörper	Hausapotheke Großhadern
MAZ51	VEGF-R3 Kinase-Inhibitor	Santa-Cruz
VEGF-R2	anti-human IMC-1121b	von B. Pytowski
VEGF-R2	anti-mouse DC101	freundlicherweise
VEGF-R3	anti-human IMC-3C5	zur Verfügung
VEGF-R3	anti-mouse mF4-31C1	gestellt

3.1.9 Transformation/ Transfektion

Produkt	Zusatz	Firma
VEGF-R3 Plasmid	FLT4, transcript Variant2, pReceiver-M61	GeneCopoeia EX-M0928
<i>E.coli</i>	JM 109 kompetente Zellen	Promega
LB		Sigma
Agar		Sigma
Plasmid Maxi Kit	Maxi-Prep	Qiagen
MATra-Platten	Universal Magnetplatten	Promokin
MATra-A Reagent	1µl/1µg DNA	Promokin

3.1.10 Tierversuch

Produkt	Firma/ Hersteller
HAMILTON Serie 700 MICROLITER®-Spritze	Roth
Augen-und Nasensalbe	Bepanthen
Desinfektionsmittel Braunol	Braun
Rompun (2%) + Xylazin Injektionslösung	Bayer
Ketavet (100mg/ml) Injektionslösung	Pfizer
Narcoren 16g/100ml	Merial GmbH
Stereotaxirahmen	Stoelting Co.
Injektionsspritzen	Braun
Nahtmaterial Ethibond Excel	Ethicon LLC.
Wundkleber Indermil x fine	Henkel
BD Microlance Kanülen gelb 20G 0,9 x 40mm	BD
BD Microlance Kanülen orange 25G 0,5 x25mm	BD
Krankenunterlagen 60x90cm Molinea Plus	Molinea
Handschuhe klein S semper care	SATRA Technology Centre
Skalpelle steril Größe 23	Feather
Spritzen (5, 10ml)	BD
Spritzen Perfusor 50ml	BD
Osmotische Minipumpen 1002	ALZET
Brain Infusion Kit 2	ALZET

3.1.11 Medium

Endothelzellmedium (ECM) + Supplements (für HBMEC, HUVEC und gbECs)

500ml Microvascular endothelial cell growth medium, enhanced

50ml Supplement Kit (PELObiotech): bFGF (basic fibroblast growth factor),
EGF
Long R3 IGF-1
VEGF-A
Heparin
Hydrocortisone
5% FKS

5ml Pen/ Strep (Gibco)

DMEM + 10% FKS (für humane Gliomzelllinien U87, U251, U373 und Maus-Gliomzelllinie GI261)

435ml Dulbecco's MEM (Biochrom AG)

5ml Pen/ Strep (Gibco)

5ml Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA) (Gibco)

50ml FKS (Biochrom AG)

Einfriermedium

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

40ml FKS (Biochrom AG)

20ml DMSO (Merck)

Isolationsmedium

437,5ml M199 (LONZA)

50ml FKS (Biochrom AG)

12,5ml Pen/ Strep (Gibco)

3.1.12 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Ursprungsgewebe	Firma
U87	human	Tumorzelllinie aus GBM	ATTC
U251	human	Tumorzelllinie aus GBM	ATTC
U373	human	Tumorzelllinie aus GBM	ATTC
GI261	Maus	Gliomzelllinie aus der Maus	NCI
HBMEC	human	Mikrovaskuläre Zellen aus Normalhirn	ScienceCell RL
HUVEC	human	Endothelzellen aus der Nabelschnur	Provitro
gbECs	human	selbstisolierte Endothelzellen aus GBM	

3.1.13 Lösungen für 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

0,0778g TRIS -HCl
ad 50ml DEPC- H₂O

3.1.14 Lösungen für Transformation

LB-Medium

25g LB
ad 1l H₂O

LB-Medium (Agar-Platten)

25g LB
15g Agar
ad 1l H₂O

3.1.15 Lösungen für IHC

Citratlösung- Stammlösung A

18 ml 0.1M Citronensäure Monohydrat

Stammlösung B

82 ml 0.1M Tri-Natriumcitrat
900 ml H₂O_{dest.}

Tris-Puffer

50mM Tris
0,3M NaCl
0,1% Tween; pH= 7,6

3.1.16 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

3.1.17 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%ig 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

4%-iges Sammelgel:

6,1ml H₂O_{dest}

2,5ml 0,5M Tris-HCl pH 6,8

100µl 10%-ige SDS-Lösung

1,3ml 30%-iges Acrylamid

100µl 10%-iges APS

10µl TEMED

Stripping-Puffer

12,5 ml 0,5M Tris-HCl

20 ml 10%-ige SDS-Lösung

800µl β-Mercaptoethanol

ad 67,5ml H₂O_{dest}

3.1.18 Kryopräservativ zur Aufbewahrung von geschnittenem Maushirngewebe- „Floating Sections“

300g Sucrose

10g Polyvinyl-Pyrrolidone (PVP-40)

500ml 0,1M PB

300ml Ethylenglycol

ad 1l 0,1M PB; -20 °C

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung von Tumorendothelzellen aus dem GBM (gbEC) mit Hilfe der Dyna-beads

Nach Einverständniserklärung der Patienten und im Einklang mit dem Votum der Ethikkommission wurde das jeweilige Tumorgewebe von einem Neurochirurgen während eines operativen Eingriffs mikroskopisch identifiziert und sorgfältig reseziert [146]. Die histopathologische Klassifikation des Tumors erfolgte gemäß WHO-Kriterien durch Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, Klinikum der Universität München. Der Transport des Tumorgewebes aus dem OP-Saal erfolgte unmittelbar nach Resektion unter sterilen Bedingungen auf Eis.

Das Zerkleinern des Tumorgewebes erfolgte unter Zugabe von 5-10ml Isolationsmedium (IM) und die Herstellung einer homogenen Suspension mit Hilfe eines Glashomogenisators. Die Suspension wurde mit Collagenase (1mg/ml) versetzt und in eine Zellkulturflasche (175cm²) überführt. Die Herstellung einer Einzelzellsuspension erfolgte durch eine Inkubation von maximal 2h bei 37°C mit 150U/min auf einem Rüttler im Wärmeschrank. Die gewonnene Einzelzellsuspension wurde über 40µm und 70µm Zellsiebe filtriert und anschließend für 10min bei 1500rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Letztlich wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet je nach Größe in 500-1000µl kaltem IM sanft suspendiert.

Die Isolierung von Endothelzellen oder von spezifischen Zellen aus GBM-Gewebe erfolgte schließlich durch Antikörper-beladene Dynabeads® (4,5µm Magnetkügelchen) und anschließender Extraktion der entsprechenden Zellen mit Hilfe eines Magnetic Particle Separator. Nach Resuspension der zweiphasigen Dynabeads®-Lösung wurden 25µl der Lösung in ein 1,5ml Eppendorf-Cup gegeben und in einen Magnetic Particle Separator gestellt, so dass die Beads aufgrund der Magnetkraft innerhalb des Eppendorf-Cups in Richtung des Magnetic Particle Separator angezogen wurde und die überschüssige Lösung problemlos abpipettiert werden konnte. Die Reinigung der Beads mit 1000µl einer PBS/0,1%BSA-Lösung (Waschlösung) nach oben beschriebenem Prinzip wurden die Dynabeads mit entsprechenden Antikörper gekoppelt. Zur Kopplung der Beads wurden 1µg Antikörper (CD31 und CD34) in 50µl der Waschlösung gelöst und die Antikörper-Beads-Suspension bei 20°C für 30min bei mittlerer Geschwindigkeit im Rotator durchmischt. Für die Entfernung überschüssiger Antikörper-Lösung wurden drei

Waschschritte mit PBS vollzogen. Die Zellpellet-Suspension wurde im Rotator mit den Antikörper-gekoppelten Beads für 30min bei 4 °C inkubiert, um eine Phagozytose der Beads durch die Zellen zu verhindern. Die gewünschten CD31 und CD34-positiven Endothelzellen wurden mit Hilfe des Magnetic Particle Separator in mehreren Reinigungsvorgängen unter maximaler Ausbeute extrahiert. Die Beads mit den Zellen wurden anschließend im Endothelzellmedium (ECM) in Gelatine-beschichteten Flaschen kultiviert. Die Beads konnten durch Subkultivierung vollständig entfernt werden [185].

3.2.2 Zellkultivierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien werden als Monolayerkultur in Kulturflaschen mit einer Fläche von 175cm² im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Unter diesen *in vitro*-Bedingungen müssen den Zellen essentielle Substanzen zugeführt und Abbauprodukte so lange wie möglich neutralisiert werden. Diese Aufgaben werden von dem Kulturmedium übernommen. Die Kultivierung der Gliomzelllinien (U87, U251, U373 und Gl261) erfolgt in 10% FKS/ Dulbecco`s modified eagle medium (DMEM). Als Medium für Endothelzellen (HUVEC, HBMEC und gbECs) wird das mit Zusätzen versetzte ECM (s. Kapitel 3.1.11) verwendet. Um die Zellen und das Medium vor eventuellem Bakterienbefall zu schützen, wird eine Kombination aus Penicillin/Streptomycin-Antibiotika (PS) zugegeben. Die Inkubation der Zellen erfolgt folglich im FKS-haltigen Nährmedium mit 1% PS und 1% nichtessentieller Aminosäuren (NEAA). Alle zur Zellkultivierung verwendeten Medien werden zuvor im Wasserbad auf 37°C temperiert. Sämtliche Arbeiten werden unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank durchgeführt.

3.2.3 Passagieren von Monolayerkulturen

Wenn Zellen zu konfluent wachsen, verändert sich ihr Stoffwechsel. Einzelne Zellen sterben ab oder hören auf, sich zu teilen, auch Kontaktinhibition genannt. Nach dem Erreichen von ca. 80% Konfluenz der Zellen ist eine Subkultivierung (Passage) der Zellen erforderlich. Da es sich bei den verwendeten Zelllinien um Monolayerzellen handelt, müssen sie zum Passagieren vom Boden der Kulturflaschen abgelöst werden. Dazu wird zunächst das verbrauchte Medium mit einer sterilen Stripette abgesaugt. Um Mediumreste zu entfernen, werden die Zellen mit 5ml sterilem PBS

gewaschen. Anschließend überschichtet man mit etwa 3ml Trypsin-EDTA-Lösung und inkubiert bei 37°C, bis ein Ablösen der Zellen zu erkennen ist. Die Wirkung des Trypsins wird dann durch Zugabe von 6ml frischem serumhaltigem Medium inaktiviert, da eine längere Einwirkzeit zu irreversiblen Zellschäden führen kann. Nachdem die Zellen durch mehrmaliges Resuspendieren mit der Stripette vereinzelt wurden, wird eine entsprechende Menge der Zellsuspension weiterkultiviert. Der Rest der Zellsuspension kann für Versuche eingesetzt oder verworfen werden.

3.2.4 Sulforhodamin B-Assay (Cytotoxizität)

Der Sulforhodamin B (SRB)-Assay ermöglicht die Bestimmung der cytotoxischen Wirkung von Substanzen. Hierbei wird das Lebendprotein nach Substanzeinwirkung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle photometrisch bestimmt. Unter mild sauren Bedingungen bindet Sulforhodamin B mit seiner anionischen Sulfonsäuregruppe an basische Aminosäuren der Zellproteine. Der gebundene Farbstoff kann unter schwach alkalischen Bedingungen wieder aus den Zellen extrahiert und photometrisch bei einer Wellenlänge von 564nm vermessen werden [186].

3.2.4.1 Durchführung des SRB-Assays

In eine 96-Well Platte werden 3000 Zellen pro Well, d.h. pro 100µl Medium, ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ zum Anwachsen belassen. Das Medium wird anschließend abgesaugt und durch frisches Inkubationsmedium mit den entsprechenden Substanzkonzentrationen ersetzt. Sind Substanzen in DMSO gelöst, muss ein Kontrollansatz mit der entsprechenden DMSO-Konzentration mitgeführt werden. Nach 24 Stunden im Brutschrank werden die noch lebenden Zellen durch Zugabe von 50µl 50%iger Trichloressigsäure (TCA)-Lösung (4°C) pro Well am Plattenboden fixiert. Nach mindestens einer Stunde Fixierung bei 4°C werden alle Wells 4x vorsichtig unter schwach fließendem Leitungswasser zur Entfernung von Zellresten und überschüssigem Medium gewaschen. Die Trocknung der Platten erfolgt über Nacht bei RT oder bei ca. 30°C für eine Stunde im Trockenschrank. Nach dem Trocknen werden die fixierten Zellen mit 100µl einer 0,4%-igen (w/v) SRB-Lösung pro Well für mindestens 30min im Dunkeln angefärbt. Der nicht an das Zellprotein gebundene Farbstoff wird durch zweimaliges Waschen mit Leitungswasser sowie zweimaliges Waschen mit 1%-iger (v/v) Essigsäure entfernt.

Nach Trocknung der Platten wird durch Zugabe von 300µl TRIS-Base der Farbstoff eluiert und anschließend im Microplate-Reader photometrisch gegen TRIS-Base als Leerwert bei einer Wellenlänge von 570nm vermessen.

3.2.4.2 Auswertung

Um die Wachstumsrate der Zellen zu bestimmen, werden die Mittelwerte und die Standardabweichung der Kontroll- und der Testwerte gebildet. Die Mittelwerte der Proben werden auf den Mittelwert der DMSO-Kontrolle bezogen (T/C).

$$\text{Berechnung T/C: } T/C [\%] = ((T-CN) / (CB-CN)) \times 100\%$$

T/C: Test over Control-Wert

T: Optische Dichte der Testsubstanz

CN: Optische Dichte der Normalreaktion

CB: Optische Dichte des Blindwertes

3.2.5 Proliferationsassay (Zellzählung)

Für diesen Versuch wurden die Zellen in kleinen Zellkulturflaschen ausgesät. Nach aufsteigenden Anwachstagen wurde der Zellrasen mit warmem PBS gewaschen. Nun wurden die in der Zellkulturflasche angewachsenen Zellen mit 1500µl Trypsin-Lösung bei RT für einige Minuten abgelöst. Die trypsinisierten Zellen wurden mit einem doppelten Volumen an FKS-haltigen Medium aufgenommen um die Trypsinaktivität zu unterbinden. Anschließend in ein 15ml Falcon überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in einem Milliliter FKS-haltigem Medium sanft resuspendiert. Ein 20µl Aliquot der Zellsuspension wurde mit 20µl Trypan-Blau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer wie in Abschnitt 3.2.5 ausgezählt. Tote Zellen können den Farbstoff Trypan-Blau nicht aus ihrem Zytoplasma ausschleusen, er reichert sich in den Zellen an. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop farblos, tote Zellen erscheinen blau. Über das Verhältnis aus toten, blauen Zellen und farblosen, lebenden Zellen wurde die Proliferationsrate ermittelt.

3.2.6 Molekularbiologische Methoden

3.2.6.1 RNA-Isolierung aus Zellen

Die Methode der Firma QIAGEN beruht auf der Verbindung zweier Techniken, der spezifischen Bindungsfähigkeit von RNA an einer Silicamembran und der Microspinttechnologie. Nach der Bindung der RNA an der Membran, wurde die gebundene RNA mit den mitgelieferten Puffern gewaschen und mit den Elutionspuffern von der Membran eluiert. Hierbei wurde das Zellpellet wie beschrieben gewonnen. Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt und das RNA-Extrakt auf Eis gekühlt. Die RNA-Konzentration wurde durch die Messung der Absorption bei 260nm mittels Biophotometer in Einwegküvetten bestimmt, wobei jeweils 5µl Probe mit 95µl Puffer vermischt wurden. Als Referenz wurden nur 100µl Puffer eingesetzt.

3.2.6.2 Reverse Transkription: cDNA-Synthese

Die reverse Transkription ist eine hoch empfindliche Methode, um die Genexpression auf RNA-Ebene zu untersuchen oder mRNA zu quantifizieren. Diese Methode macht die gleichzeitige Analyse einer großen Zahl an mRNAs möglich. Mit Hilfe eines Oligo-dT-Primers, der an die Poly(A)-Struktur am 3'-Ende der einzelsträngigen mRNA hybridisiert, oder eines spezifischen Primers, kann die Reverse Transkriptase die komplementäre cDNA synthetisieren.

Für diesen Schritt wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen verwendet. An Hand der photometrisch bestimmten RNA-Konzentrationen (c) wurde das Volumen (V) der RNA-Lösung berechnet, welches genau 0,8µg RNA enthält: $V_{0,8\mu\text{g RNA}} = 0,8 / c_{\text{RNA}}$. Jeweils 2µl gDNA Wipeout Puffer, $V_{0,8\mu\text{g RNA}}$, und RNase-freies Wasser ad 14µl wurden zusammen pipettiert, kurz (3s) zentrifugiert und für 2min bei 42°C im Thermocycler inkubiert, dann sofort auf Eis gelagert. Der Reverse Transkriptions-Mastermix (MM) wurde wie folgt hergestellt: pro RNA-Probe 1µl der Reversen Transkriptase, 4µl des RT-Puffers und 1µl des Primer-Mixes plus ca. 10% extra Volumen um den Verlust beim Pipettieren zu kompensieren. So wurde z.B. bei 10 vorhandenen Proben 11x MM hergestellt. Der MM, 6µl pro Probe, wurde auf die entsprechende Template-RNA hinzu pipettiert. Die so gewonnene cDNA wurde im

Thermocycler bei 42°C 15min, dann 3min bei 95° C lang inkubiert und im Anschluss bei 4° C gelagert.

3.2.6.3 Semiquantitative PCR

Dieses Verfahren ermöglicht enzymatisch von bestimmten Nukleotidsequenzen *in vitro* millionenfache Kopien herzustellen. Diesen Vorgang nennt man Amplifikation und er ermöglicht, dass auch sehr geringe Mengen von DNA einer Analyse schnell zugänglich sind.

Die durch die Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mittels PCR als semi-quantitative Messmethode untersucht, um etwaige eindeutige Unterschiede in der Expression von der mRNA des VEGF-Systems in den verschiedenen Zelllinien nachzuweisen. Dabei werden die DNA-Stränge durch Hitze getrennt (Denaturierung), durch gezielte Wahl der Annealing-Temperatur (AT) die spezifische Anlagerung der Primer ermöglicht. Durch weitere Temperatur-Einstellung kann die Bindung und Aktivierung der Taq-Polymerase und somit die Elongation der cDNA Stränge bewirkt werden. Durch Wiederholung der Zyklen wurden die gewünschten Abschnitte exponentiell vervielfältigt. Pro Ansatz des Qiagen-QuantiTect Reverse Transcription Kits wurden verwendet:

- 2µl 10x konzentrierter Puffer
 - 1µl 5' Primer 1:10 verdünnt (10 pmol/µl)
 - 1µl 3' Primer 1:10 verdünnt (10pmol/µl)
 - 2µl dNTPs (10mM)
 - 1µl Taq Polymerase (10U/ µl)
 - 2µl MgCl₂
 - 9µl RNase-freies H₂O
- sowie 2µl cDNA-Template

Die verwendeten PCR-Programme waren:

- 1) 15min 94 °C
- 2) 30s 94 °C
- 3) 30s AT des jeweiligen Primer-Paares
- 4) 30s 72 °C
- 5) 10min 72 °C
- 6) ∞ 4 °C

Die Anzahl der Wiederholungen der Zyklen (Schritte 2, 3 und 4) betrug für VEGF-A, -C und -D cDNA 30 x, für VEGF-R2 cDNA 35 x, für VEGF-R3 (*short* und *long*) cDNA 35 x und für GAPDH cDNA 25 x.

3.2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosegele bestanden aus 0,5% Agarose in TBE-Puffer, die in der Mikrowelle zum Kochen gebracht wurden. Bevor die Gele bei RT auspolymerisieren konnten wurde zur Färbung Ethidiumbromid in einem Verhältnis von 1:50 hinzugefügt. 10µl Probe wurde mit 5µl Loading Buffer vermischt. Die Taschen wurden mit insgesamt 15µl Probe-Puffer Gemisch beladen. Als Größenstandard wurde die erste Geltasche stets mit einer 50bp-DNA Leiter beladen. Die Gele wurden bei einer kontinuierlichen Spannung von 110V etwa 55min laufen gelassen. Die Gele wurden schließlich unter UV-Licht in einer digitalen Gel-Dokumentationskammer fotografiert und das Foto elektronisch gespeichert.

3.2.7 Mikrobiologische Methoden

3.2.7.1 Kultivierung von Bakterien

Das LB-Medium wurde entsprechend den Angaben des Herstellers in H₂O gelöst und bei 121 °C autoklaviert. Die Anzucht des Escherichia coli (*E.coli*)-Stammes wurde in flüssigem LB-Medium bei 37 °C durchgeführt. Die Selektion Ampicillin-resistenter Transformanten erfolgte mit 100µg/ml Ampicillin im Medium. Die Flüssigkulturen wurden unter Schütteln bei 250U/min inkubiert.

3.2.7.2 Kultivierung von *E.coli* auf Agar

Zur Agar-Platten-Herstellung wurde LB-Agar entsprechend den Angaben des Herstellers angesetzt. Auch der noch flüssige LB-Agar wurde für die erfolgreiche Selektion von Ampicillin-resistenten Transformanten mit 100µg/ml Ampicillin versetzt. Die Platten wurden bei RT belassen damit der Agar aushärten konnte und anschließend bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Als Kontrolle dienten LB-Agar-Platten (LB_{Amp}) ohne Ampicillin-Zusatz (LB_{ØAmp}).

3.2.7.3 IRES2-eGFP-VEGF-R3 Plasmid

Das IRES2-eGFP-VEGF-R3 Plasmid (Abb. 6) wurde wie im Folgenden beschrieben in *E.coli*-Zellen transformiert und aufgereinigt.

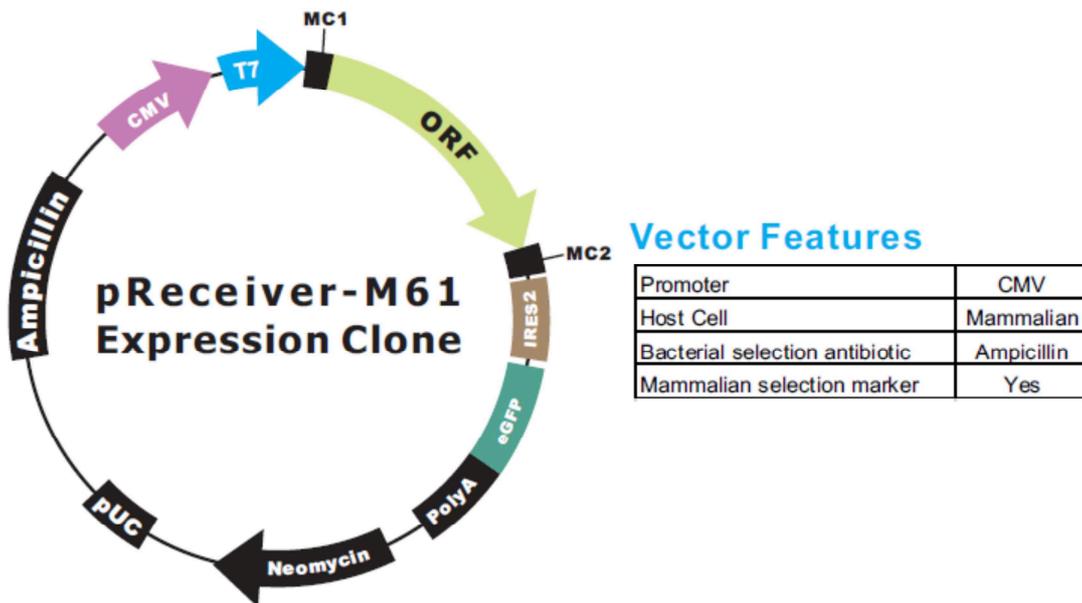


Abb. 6: Humanes VEGF-R3 Plasmid.

Vektor mit folgenden Informationen: Cytomegalovirus-(CMV)-Promoter, Open Reading Frame (ORF, offener Leserahmen), IRES2 (Interne Ribosomale Eintrittsstelle), eGFP, Neomycin-Sequenz zur Zellselektion und Ampicillin-Sequenz zur bakteriellen Selektion. Gesamtlänge: 10432 BP. (Quelle: www.genecopoeia.de)

Das Plasmid konnte anschließend mit Hilfe einer Magnet assoziierenden Transfektion (s. Abschnitt 3.2.7.6) in U251-Zellen eingeschleust werden. Die erfolgreich transfizierten Zellen wurden zunächst mit G418 versetztem Medium selektiert. Um schließlich eine Reinkultur zu erhalten, wurden diese Zellen mit Hilfe von Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 3.2.11) hinsichtlich des GFP-Signals aussortiert.

3.2.7.4 Transformation von *E.coli* mittels Hitzeschock

Je Transformationsansatz wurde ein Reaktionsgefäß mit kompetenten *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der DNA wurden die Zellen bei 4°C für 5min

inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45sec und eine erneute Inkubation bei 4°C für 5min. Es wurden 1ml LB-Medium hinzugegeben und die *E.coli*-Zellen für 30-60min bei 37°C kultiviert, damit die auf der eingesetzten DNA kodierte Antibiotikaresistenz ausgeprägt wird. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf zwei LB_{Amp}-Agarplatten und einer Kontroll-LB_{ØAmp}-Platte ausplattiert. Es folgte eine Kultivierung der drei Platten über Nacht bei 37°C. Am darauffolgenden Tag wurden die Einzelkolonien mit einer Pipettenspitze von den LB_{Amp}-Platten gepickt und in 5ml Ampicillin versetztes LB-Medium in 15ml-Falconröhrchen überführt. Es wurden bis zu zehn Einzelkolonien gepickt und bei 37°C und Rütteln kultiviert. Nach mindestens 8h sollte sich das LB-Medium trüb gefärbt haben, ein weiterer Indikator für Ampicillin-resistente Bakterien und somit erfolgreiche Aufnahme des Plasmids. Anschließend wurde ein Milliliter dieser Flüssigkultur in ein Erlenmeyerkolben mit 200ml LB_{Amp}-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und Schütteln kultiviert, woraufhin eine Isolation des eingesetzten Plasmides aus der Flüssigkultur möglich war.

3.2.7.5 Isolation und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Für die Transfektionen wurden größere Plasmid Mengen benötigt, deren Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen Maxi-Preparation-Kits nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

3.2.7.6 Transiente Transfektion mittels MATra (*Magnet Assisted Transfection*)

Bei der *Magnet Assisted Transfection* (MATra) werden Nukleinsäuren wie DNA oder Oligonukleotide an positiv geladene magnetische Partikel gebunden und anschließend der Nukleinsäure-Partikel-Komplex durch magnetische Kraft in die Zellen gezogen, wodurch eine effiziente Transfektion von adhären Zellen erreicht wird. Die Transfektion von $1,5 \times 10^5$ adhären Zellen in 6-Well-Platten wurde mit folgendem Transfektionsansatz pro Well durchgeführt:

200µl DMEM (Ø FKS)

3,3µl DNA (1µg)

1µl MATra

Die MATra-Lösung wurde vor Gebrauch gut gevortext. Das VEGF-R3-Plasmid (siehe Abschnitt 3.2.7.3) wurde in DMEM-Medium ohne Zusätze aufgenommen und mit der MATra-Lösung versetzt. Durch leichtes Schnipsen wurde die Lösung vermischt und 20min bei RT inkubiert. Währenddessen konnte das Medium in den vorbereiteten 6-Well-Platten abgenommen und mit 1,8ml frischem Medium (10% FKS und 1% PS) versetzt werden. Anschließend wurde der Transfektionsansatz zugegeben, sanft geschwenkt und 15min im Brutschrank auf Magnet-Platten inkubiert. Nach weiteren 10min ohne Magnetplatten konnte das Medium vorsichtig entfernt werden und durch frisches Medium mit Zusätzen ersetzt werden. Frühestens 12h nach der Transfektion konnte das Medium mit 0,5mg/ml G418-Medium ausgetauscht werden. Stabile Zellen konnten schließlich trypsinisiert und umgesetzt werden.

3.2.8 Proteinanalytische Methoden

3.2.8.1 Proteinisolation aus Zellen

Zunächst wurden die Proteine in 100µl Gemisch aus NP40-Lysepuffer, Proteinase Inhibitor Cocktail und Phosphatase Inhibitor Cocktail für 15min auf Eis gelöst. Um die Proteine von den Zelltrümmern zu trennen wurde bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert und das Proteinlysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Eichkurve wurde im Doppelansatz durch aufsteigendes BSA-Standardprotein im erzeugt. 1µl der einzelnen Proben im Doppelansatz und BSA-Standardreihe wurden mit Bradford-Dye-Reagenz resuspendiert und für einige Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Extinktion wurde mittels eines Biophotometers im Bereich von 595nm gemessen und anhand der Eichkurve quantifiziert.

3.2.8.3 SDS-Page

Für die Detektion von Proteinen war eine Proteinmenge von mindestens 50µg erforderlich. Das jeweilige Volumen der Probe wurde mit 5µl der Lösung aus Lämmli-Puffer/ 5% Mercaptoethanol gemischt und bei 95°C für 10min erhitzt, so dass die Sekundärstruktur der Proteine zerstört wurde.

Verwendet wurden 4%-ige Sammel- und 7,5%-ige Trenngele. Nach dem Waschen und Reinigen der Gussformen mit Alkohol wurden diese zusammengesetzt. Unter dem Abzug wurden in einem 50ml-Falcon die Zusätze für das Trenngel pipettiert. Das Gel wurde dann vorsichtig zwischen die Glasplatten pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach 30min wurde das Isopropanol entfernt, das Gel optional in feuchte Tücher geschlagen und in einem Entsorgungsbeutel über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert oder direkt eingesetzt. Das 4%-ige Sammelgel wurde ebenfalls unter dem Abzug angesetzt. Das Sammelgel wurde nun vorsichtig auf das Trenngel pipettiert und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Die Polymerisation dauerte etwa 30min bei RT. Die Gele konnten nun verwendet werden. Die Blotkammer mit der Gel-Kassette wurde mit eiskaltem Elektrophorese-Puffer (EP) gefüllt und in eine Wanne mit Eis gestellt. Die Geltaschen wurden sorgfältig mit 4µl der Marker-Protein Leiter sowie 27µl jeder Probe beladen. Um einen gleichmäßigen Transfer zu gewährleisten wurden leere Taschen mit 27µl Lämmli-Puffer befüllt. Danach wurde die SDS-Page für 55min an eine Stromquelle mit 30mA pro Gel angeschlossen.

3.2.8.4 Western Blot

Zuerst wurde die PVDF-Membran auf die Größe der Gele zugeschnitten. Danach wurde sie für 30sec in Methanol aktiviert und danach für 10min in Transfer-Puffer (TB) inkubiert. Für jedes Gel wurden zwei in TB-Puffer angefeuchtete Fiberpads und vier Whatman-Papiere verwendet. Die Gele wurden aus den Kammern entfernt, die Geltaschen abgeschnitten und das Gel in TB-Puffer von der Plastikplatte gelöst. Nach dem Zusammensetzen der Blotkammer-Kassette entsprechend dem Spannungsgefälle wurden die Proteine vom Gel auf die Membran transferiert. Hierzu wurde die Kassette in eine mit Eis gefüllte Wanne gestellt und für 50min an eine Spannung von 110Volt angeschlossen. Nach dem Transfer wurde die Membran in Waschpuffer (TTBS) gewaschen.

3.2.8.4.1 Detektion der Proteinbanden

Um unspezifische Bindungen zu maskieren wurden die Membranen in einer 5%-igen Magermilch-TTBS-Lösung für mindestens eine Stunde bei RT auf einem Rüttler inkubiert. Die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern erfolgte in einer

2,5%-igen Milchlösung bei 4°C über Nacht auf einem Rotator. Die Membranen wurden anschließend in TTBS gewaschen und mit spezies-spezifischen Sekundär-Antikörper (1:10.000) für maximal eine Stunde inkubiert. Im Anschluss folgten weitere Waschschriffe. Das gesuchte Protein wurde mit Hilfe eines Chemiluminiszenz-Verstärkersystems in der Filmkassette auf einem hochempfindlichen Röntgenfilm je nach Sensitivität für eine Dauer von ungefähr 5min inkubiert und mit Hilfe eines Entwicklers auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

3.2.8.4.2 „Strippen“ der Membran

Um die Membran wiederzuverwenden und mit einem neuen Antikörper zu inkubieren, wurde die Membran zwei Mal mit TTBS gewaschen und für 15min in Stripping-Puffer auf einem Rüttler inkubiert. Nach drei erneuten Waschschriffen mit TTBS, wurde die Membran in die entsprechende Block-Lösung für mindestens 1h bei RT getaucht. Die weiteren Schritte erfolgten analog wie oben beschrieben.

3.2.9 Immunologische Methoden

3.2.9.1 Immunhistochemie (IHC)-Hopschnitte

Unmittelbar nach Resektion des Tumorgewebes wurden die ca. 1,5 x 1,5cm großen Gewebestücke in einer eiskalten Hope I-Lösung für mindestens zwei Nächte im Kühlschrank fixiert. Um das Gewebe zu dehydrieren wurde es in eine eiskalte Hope II-Lösung überführt und für mindestens zwei Stunden im Kühlschrank aus -20°C gehalten. Danach wurde die Flüssigkeit vollständig entfernt und mit reinem eiskaltem Aceton aufgefüllt. Diese zweistündige Inkubation wurde anschließend ebenfalls mit frischem Aceton wiederholt. Das Gewebe wurde schließlich von dem Aceton vollständig befreit und in flüssiges Paraffin eingebettet. Nach Abkühlung und Lagerung auf -20°C wurden mit Hilfe des Mikrotoms aus dem Paraffinblock 5µm dünne Schnitte hergestellt und auf Objektträger fixiert.

Für das Entparaffinieren erfolgte Rehydratation der Gewebeschnitte in folgender Abfolge: 1 x 20min in Isopropanol bei 37°C, 1 x 10min frisches Isopropanol bei 37°C, bei RT kurz trocknen lassen, 1 x 10min eiskaltes 70%-iges Aceton, kurz trocknen bei RT und anschließend 3 x 5min in 1 x PBS waschen. Die Schnitte durften während der gesamten Prozedur niemals austrocknen. Die Aktivität der endogenen Peroxidase wurde durch eine 0,5%-iges Wasserstoffperoxid-Lösung blockiert. Die

Einwirkzeit betrug 10min mit anschließenden 3 x 5min 1 x PBS-Waschschritten. Für die Färbung wurde teilweise das Dako-Cytomation LSAB-System verwendet. Unspezifische Antigene und somit unspezifischer Hintergrund wurden durch Protein Blocking Reagenz mindestens ein Stunde maskiert. Der primäre Antikörper wurde in adäquater Menge in Antibody Diluent gelöst und über Nacht bei einer Temperatur von 4°C inkubiert. Für die Negativ-Kontrolle diente nur das Antibody Diluent. Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger sehr gründlich gewaschen, mindestens 3 x 10min in einer PBS/ Brij- Lösung. Das Antikörper-Signal wurde amplifiziert durch den Sekundär-Antikörper „Biotinylated anti-mouse + anti-rabbit-Ig“ für 30min bzw. Spezies-spezifische 1:800- in Antibody Diluent verdünnte sekundäre Antikörper. Im Anschluss folgte wieder 3 x 5min Waschen. Als weiteres Konstruktgerüst wurde die Streptavidin-HRP für 20min inkubiert. Für die Visualisierung des braunen Signals diente die lichtgeschützte 10-minütige Inkubation mit einem DAB-Chromogen bzw. des roten Signals die Inkubation mit einem AEC-Chromogen mit anschließender Gegenfärbung für maximal 5min in einer Hämalaun-Lösung. Die Gewebeschnitte wurden bei DAB-Färbung einer aufsteigenden Alkoholreihe unterzogen: jeweils 2min-Inkubation in 2 x 70%-, 2 x 96%-, 2 x 100%- Ethanol und für 15min in Histol inkubiert. Zuletzt mit Entellan® fixiert und einem Deckglas eingedeckt. Handelte es sich um eine AEC-Färbung wurden die Gewebeschnitte mit Leitungswasser gründlich gewaschen und vor der Gegenfärbung kurz in 70%-iges Ethanol gehalten, anschließend 10min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und zuletzt mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

3.2.9.2 Paraffinschnitte

Der Entparaffinierungsvorgang (s.o.) wurde analog wie bei Hopeschnitten durchgeführt. Die Antigen-Demaskierung erfolgte durch 20-minütiges Aufkochen der Gewebeschnitte in einer Mikrowelle bei 360 Watt in einer Citrat-Lösung bestehend aus Stammlösung A und B. Nach Abkühlen der Küvette wurden die Objektträger 2x 5min in TRIS-Puffer getaucht. Die restliche Färbeprozedur wurde wie schon bei den Hopeschnitten beschrieben durchgeführt.

3.2.9.3 Immuncytochemie (ICC)

Nach Kultivierung der gewünschten Zellen in einer 75cm²-Zellkulturflasche wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Jeweils 2000 bis 3000 Zellen wurden im Arbeitsvolumen von 1,5ml auf einen Objektträger pipettiert und in einer Petrischale zum Anwachsen über Nacht im Brutschrank belassen. Nach anschließender Spülung in PBS, erfolgte die Fixierung der Zellen bei membranständigen Antigenen durch 4%-iges PFA und Inkubation für 15min bei 4°C im Kühlschrank. Anschließend folgte ein Waschschrift mit PBS. Die weiteren Färbeschritte sind analog zu der Immunhistochemie durchgeführt worden.

3.2.10 Funktionelle Assays

3.2.10.1 Tube Formation Assay (TFA)

Nach Vorkühlung der Pipettenspitzen und μ -Slides von ibidi bei -20°C wurden 50 μ l Growth-reduced-Matrigel, das vorher auf Eis aufgetaut wurde, in ein Well eines μ -Slide pipettiert und anschließend zur Polymerisation bei RT für mindestens 30min bei RT belassen. 10.000 Zellen HUVEC und gbECs wurden pro Well für das Experiment verwendet (*Abb. 7*). Folgende Zellen wurden untersucht: physiologische Endothelzellen im Vergleich zu selbstisolierten gbECs nach 24h Inhibitor-Behandlung in den adäquaten Konzentrationen. Nach einer 24h-Inkubation der Zellen im Matrigel erfolgte die Fotodokumentation mit zehnfacher Vergrößerung. Pro Gruppe wurden zwei Wells angesetzt und ausgewertet.

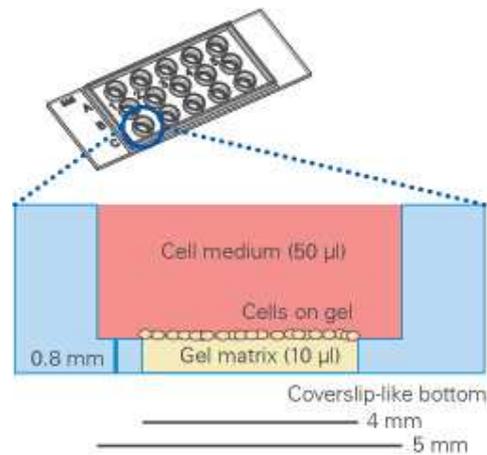


Abb. 7: Die μ -Slides von ibidi ermöglichen eine Darstellung von 2D-in vitro-Angiogenese.

Pro Well wurden 10 μ l Matrigel und 50 μ l Zellsuspension eingesetzt. Nach 24h erfolgte die Fotodokumentation. [187]

Die Analyse erfolgte durch ein spezielles Software-Programm namens WimTube der Firma Wimasis. Die Bilder wurden an die Firma versendet und bestimmte Kriterien wurden durch die Firma analysiert, im Vordergrund dieser Arbeit stehen die Summe der gefäßähnlichen Strukturen (Tubes), die durchschnittliche Tubelänge und die Anzahl der Verzweigungspunkte innerhalb eines Wells.

3.2.10.2 Wound Healing Assay (WHA)

Das ibidi μ -Dish ist eine kleine biokompatible Silikon-Kammer, die wiederum in zwei Kammern unterteilt ist, in die ein definiertes Volumen Zellsuspension gefüllt wurde. Die Silikon-Kammer wurde zu Beginn der Migrationsanalyse entfernt (Abb. 8), dabei wurde ein definierter Spalt bzw. Wunde zwischen den Zellrasen hinterlassen in den die Zellen migrieren können.

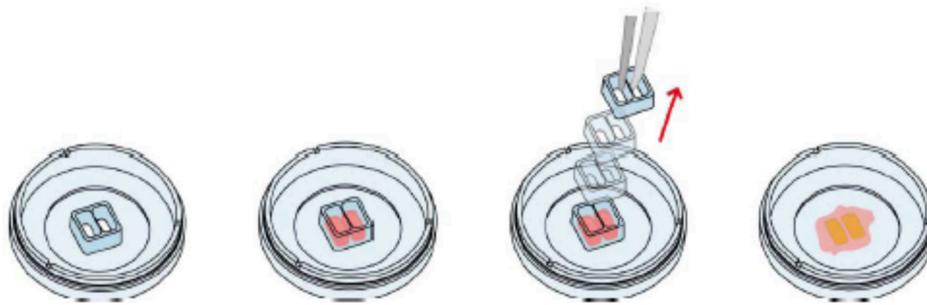


Abb. 8: Verwendung der ibidi μ -Dishes.

Die Kammern wurden luftblasenfrei mit Zellsuspension befüllt. Nach Anwachsen im Brutschrank wurde die Silikonkammer entfernt und eine Fotodokumentation zur Migrationsanalyse durchgeführt. [187]

Es wurden 25000 Zellen in 70 μ l Medium aufgenommen und luftblasenfrei in jede Kammer pipettiert. Dadurch konnte ein gleichmäßiger Zellrasen erzeugt werden. Anschließend wurde die 24-Well-Platte über Nacht im Brutschrank zum Anwachsen der Zellen belassen. Mit einer sterilen Pipette wurde die Silikonbegrenzung entfernt und die Zellen mit 1,5ml Medium mit oder ohne Inhibitor-Behandlung überschichtet. Direkt nach der Präparation der Platten, sowie nach 7 und 24 Stunden wurden Fotoaufnahmen der Wundflächen gemacht. Zur Fotodokumentation wurde ein Inversmikroskop mit aufgesetzter Kamera verwendet. Bei einer zehnfachen Vergrößerung konnte die Größe der Wundfläche erfasst und ausgewertet werden. Auf konstante Ausrichtung und Position der Schalen bei den einzelnen Zeiten wurde geachtet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der WEGA-Image-Viewer Software, mit der die noch offene Fläche vermessen werden konnte. Der Ausgangspunkt an dem die Wundfläche am größten ist, d.h. direkt nach Zugabe des Medium mit oder ohne Behandlung, entsprach dem Nullpunkt. Die Darstellung der Ergebnisse im zeitlichen Verlauf zeigt die prozentuale Wundschließung bzw. die Migrationsfähigkeit.

3.2.11 Durchflusszytometrie (FACS)

In dieser Arbeit wurde das Analyse-Durchflusszytometer FACSCalibur verwendet. Dabei konnten bis zu vier Wellenlängenbereiche (FL-1 bis FL-4) erfasst werden. Für die Experimente waren die Detektion von Grünfluoreszierendes Protein (GFP) (FL-1)

und PE-Fluoreszenz und Propidiumiodid (FL-2) von besonderer Bedeutung. Mit GFP als Transgen konnte die Funktionstüchtigkeit der Transfektion und die VEGF-R3 Expression überprüft werden. Propidiumiodid (PI) wurde als Marker für tote Zellen benutzt.

3.2.11.1 Durchführung einer FACS-Analyse

Zu messende Zellen wurden wie beschrieben kultiviert und geerntet. Nach mindestens einstündiger Inkubation der primären Antikörper bzw. Fluoreszenz gekoppelten Antikörper und zweimaliger Waschschriffe mit PBS folgte gegeben falls eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde. Als Negativkontrollen wurde entweder nur der Sekundär-Antikörper oder die jeweilige IgG-Kontrolle inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, abzentrifugiert und das Zellpellet in 200µl EDTA/1%-igem BSA/PBS-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert. Zum Anfärben der toten Zellen wurde 1µg/ml PI kurz vor der Messung hinzugegeben.

3.2.11.2 Auswertung

Die Messung am FACSCalibur erfolgte dann mit zellspezifischen Einstellungen für Signalverstärkung, Kompensation und Grenzwerte. Die gemessenen Signale wurden über einen „Density Dot Plot“ (im Folgenden als Dot-Blot bezeichnet) ausgewertet. *Abbildung 9* zeigt einen solchen Dot Plot:

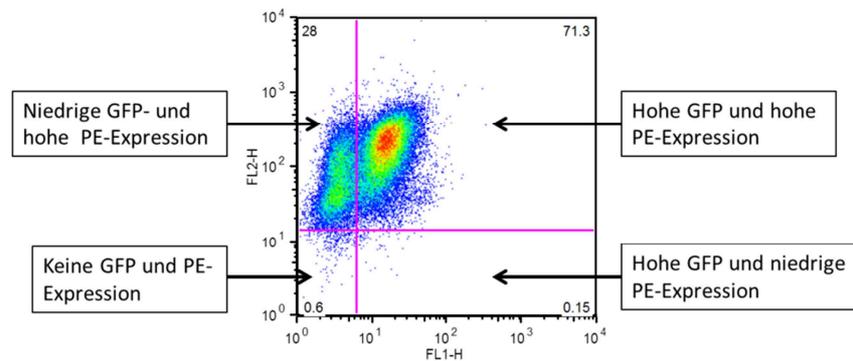


Abb. 9: Beispiel für eine FACS- Auswertung.

Jeder Punkt steht für eine gemessene Zelle. Es wurde die Software „FlowJo“ verwendet. Zur Auswertung gehören folgende Statistiken:

- % Total: % der Zellen, die in den ausgewählten Bereich fallen
- X Mean: durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität in dem ausgewählten Bereich in Bezug auf die Negativkontrollen.

3.2.12 *In vivo*-Mausmodell

Alle *in vivo*-Versuche fanden im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, Abteilung Neurochirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München statt. Die Haltung der Versuchstiere und die Arbeiten wurden nach dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und waren von der Regierung Oberbayern genehmigt. Für die Versuche wurden ausschließlich weibliche, 60 Tage alte C57-Black-6-Inzuchtmäuse vom Charles River Stamm (C57/Bl6) verwendet, dabei wogen alle Mäuse nicht weniger als 20g. Die Versuchstiere wurden im konventionellen Kleintierstall des Neurozentrums gehalten. Hierbei wurden Standardkäfige (bis zu 5 Mäusen pro Käfig) verwendet, es fand ein regelmäßiger Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden statt. Wasser und Futter standen *ad libitum* zur Verfügung.

3.2.12.1 Narkose

Die operativen Eingriffe an Versuchstieren wurden immer unter tiefer Vollnarkose durchgeführt. Die Körpergewicht abhängige Narkose wurde mit Hilfe einer intraperitoneale Injektion von:

0,36ml Rompun 2%-ig

1,02ml Ketanest 10%-ig

4,86ml NaCl 0,9%ig

durchgeführt. Vor jeder Operation wurde die Narkosetiefe der Maus geprüft. Um ein Austrocknen der Netzhaut zu verhindern, da die Mäuse unter Narkose die Augen nicht verschließen, wurde Bepanthen Augen- und Nasensalbe aufgetragen.

3.2.12.2 Stereotaktisches orthotopes Mausmodell

Nach Desinfektion der Kopfhaut erfolgte ein Hautschnitt von etwa 1cm Länge und der Kopf wurde waagrecht in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt. Der Rahmen fixiert den Schädelknochen und ist mit einem Arm ausgestattet, der mit einer Genauigkeit von 0,1mm in alle drei Raumrichtungen bewegt werden kann (*Abb. 10*). Nach Einspannen des Kopfes und Spreizen des Hautschnitts wurden die relevanten Knochenpunkte zur Orientierung dargestellt [188]. Der Implantationspunkt auf der rechten Hemisphäre liegt 1,2mm vor dem Bregmapunkt und 1,2mm seitlich von der mittleren Knochennaht. An diesen Koordinaten wurde mit einer Kanülenspitze die Schädeldecke vorsichtig durchbohrt. Die eingesetzten murinen Gl261-Gliomzellen wurden wie beschrieben kultiviert und geerntet. Dabei wurde das Zellpellet in reinem DMEM-Medium ohne Zusätze suspendiert. Pro Versuchstier wurden mit einer Hamiltonspritze 100 000 Zellen/1µl okuliert. Dabei wurde die Hamiltonspritze bis zu einer Tiefe von 4mm in die Hemisphäre langsam penetriert. Bei einer Tiefe von 3mm wurden schließlich die Tumorzellen langsam eingeführt. Anschließend wurde die Wunde mit Nahtmaterial vernäht. Um eine Unterkühlung vorzubeugen wurden die Tiere bis zur Aufwachphase auf einer Heizplatte gewärmt. Das Narkosemittel war so dosiert, dass die Versuchstiere in der Regel nach einer Stunde aufgewacht sind.



Abb. 10: Stereotaktischer Rahmen und Darstellung der stereotaktischen Operation am Kopf.

Links oben: Stereotaktischer Rahmen. Man erkennt die drei Stellschrauben, über die der Arm in den drei Raumrichtungen gesteuert werden kann. Rechts oben: Fixierter Kopf mit injizierter 1µl Hamiltonspritze für Tumorzell-Implantation. Der Kopf muss für die OP genau waagrecht eingespannt werden. Dazu werden die Schneidezähne und die Nase leicht durch einen Bügel fixiert. Bei stereotaktischen Operationen am Kopf dient das Bregma als Referenz. Wenn Lambda und Bregma auf gleicher Höhe sind, ist der Kopf der Maus waagrecht [188, 189].

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass das injizierte Volumen an Tumorzellen und 10 Tage für die Tumorentwicklung optimal sind. Nach dem operativen Eingriff wurde an jedem zweiten Tag das Wohlergehen kontrolliert.

3.2.12.3 Versuch 1: einfache Applikation

Für jede Versuchsgruppe wurden sechs gleichaltrige C57/Bl6-Mäuse eingesetzt. Die Injektion erfolgte intraperitoneal (i.p.) an jedem dritten Tag bis zu einer Dauer von zwei Wochen. Die eingesetzten Substanz-Mengen sind aus der *Tabelle 1* zu entnehmen. Nach zehn Tagen Tumorwachstum wurden die Substanzen nach folgendem Schema appliziert:

Gruppe	Zellen pro Maus	Substanz-Applikation
Kontrollgruppe	1 x 10 ⁵ GI261	-
Gruppe 1	1 x 10 ⁵ GI261	anti-VEGF-R2/ 0,625 mg; i.p.
Gruppe 2	1 x 10 ⁵ GI261	anti-VEGF-R3/ 0,625 mg; i.p.
Gruppe 3	1 x 10 ⁵ GI261	anti-VEGF-R2/ -R3/ 0,625 mg; i.p.
Gruppe 4	1 x 10 ⁵ GI261	MAZ51/ 8mg/kg; i.p.

Tabelle 1: Erste Versuchsgruppen mit einfacher Applikation.

Alle Versuchstiere der Versuchsgruppen wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit entsprechenden Antikörpern und MAZ51 unter gleichen Bedingungen behandelt.

3.2.12.4 Versuch 2: Chronische Infusion über osmotische Pumpen

Mittels ALZET-osmotischer Minipumpen über ein Brain Infusion Kit (*Abb. 11*) ist es möglich, im Tiermodell über einen längeren Zeitraum Wirkstofflösungen zu applizieren. Die Dauer der Infusion hängt zum einen vom Volumen der Pumpe ab, zum anderen vom Durchmesser des „Flow-Moderators“, eines kleinen Metallrohrs, das dem Pumpendruck einen definierten Widerstand entgegensetzt und so die Flussgeschwindigkeit festlegt. In der Pumpe befindet sich eine besonders hochosmolare Schicht, die durch eine semipermeable Membran von der umgebenden Flüssigkeit getrennt ist. Die extrazelluläre Gewebeflüssigkeit folgt dem Konzentrationsgradienten ins Innere der Pumpe, so dass das Volumen der hyperosmolaren Schicht zunimmt [188]. Da die semipermeable Außenmembran der Pumpe starr ist, führt die Volumenzunahme in dieser Schicht zu einer Volumenabnahme im inneren Reservoir der Pumpe. Die zu applizierende Lösung wird so aus der Pumpe gedrückt.

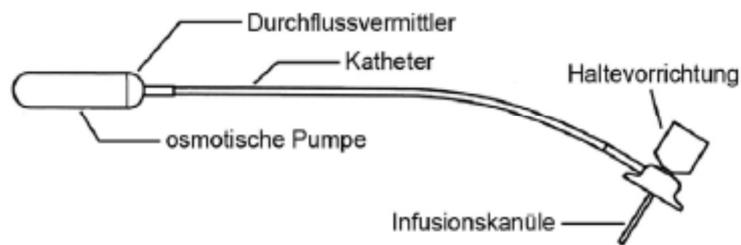


Abb. 11: Schematische Darstellung der osmotischen Minipumpe mit dem Brain Infusion Kit (ALZET).

Pumpe und Infusionssystem (Durchflussvermittler, Katheter, Kanüle) werden luftblasenfrei mit der Substanzlösung befüllt, anschließend wird beides zusammengesteckt. Eine Vorinkubation für 5h in steriler NaCl-Lösung bei RT stellt eine gleichmäßige Substanzabgabe zum Zeitpunkt der OP sicher [190]

Die Tiere wurden hierzu wie in Abschnitt 3.2.12.1 beschrieben narkotisiert. Die Augen wurden wieder während des Eingriffs mit Augen- und Nasensalbe vor dem Austrocknen geschützt. Nach Desinfektion der Haut wurde mit einem Skalpell ein etwa 2,5cm langer Hautschnitt beginnend zwischen den Augen und endend zwischen den Ohren geführt. Mit Hilfe einer Aesculapschere wurde stumpf zwischen den Schulterblättern eine subkutane Tasche für die Pumpe gebildet. Die Schädeldecke wurde an derselben Stelle wie für die Tumorzellimplantation mit einer dünnen Kanüle für die Kanüle des Brain Infusion Kits (Außendurchmesser 0,36mm) vorsichtig durchstoßen. Anschließend wurde die Pumpe zwischen den Schulterblättern eingeführt und die Kanüle wurde mit Hilfe der Haltevorrichtung platziert und mit Wundkleber fixiert. Mit einer Schere wurde die Haltevorrichtung (Abb. 11) vorsichtig entfernt. Abschließend wurde die Wunde vernäht. Die Substanzapplikation dauerte 14 Tage, wobei die Versuchstiere jeden zweiten Tag hinsichtlich Wundheilung und Verhalten beobachtet wurden. Für diesen zweiten Versuchsansatz wurden erneut pro Versuchsgruppe 6 gleichaltrige C57/Bl6-Mäuse eingesetzt:

Gruppe	Zellen pro Maus	Substanz-Applikation
Kontrollgruppe	1 x 10 ⁵ GI261	ALZET-Pumpe; nur DMSO
Gruppe 1	1 x 10 ⁵ GI261	ALZET-Pumpe; MAZ51/ 100µM

Tabelle 2: Zweite Versuchsgruppe, Substanz-Applikation mit Hilfe von ALZET-osmotischen Minipumpen.

Allen Versuchstieren wurden osmotische Minipumpen implantiert. Als Substanz wurde MAZ51 appliziert und als Kontrolle diente eine DMSO-haltige Lösung.

Da das eingesetzte MAZ51 nur in DMSO löslich war mussten somit DMSO-beständige Katheter verwendet werden. Auf Grund geringer Löslichkeitsgrenze von MAZ51 war die höchste einsetzbare MAZ51-Konzentration 100µM. Die Pumpen wurden laut Herstellerangaben befüllt und wie schon beschrieben implantiert.

3.2.12.5 Perfusion und Organentnahme

Für histologische Untersuchungen des Gehirngewebes benötigt man fixiertes und blutleeres Gewebe. Die Fixierung dient dazu, das zu untersuchende Gewebe in seiner Gesamtheit zu erhalten. Dafür wird eine 4%-ige wässrige Lösung von Paraformaldehyd (PFA) in PBS verwendet. PFA wird beim Lösungsvorgang wieder zu Formaldehyd gespalten, welches dann Proteine im Gewebe vernetzt. Um das Hirngewebe der Versuchstiere optimal zu fixieren, wurde diese Lösung direkt in das Herz des Tieres infundiert und gelangte über das Blutgefäßsystem in das Gehirn. Diese Technik erzielt eine bessere Gewebserhaltung.

Für die transkardiale Perfusion wurden die Tiere mit dem Narkosemittel Narcoren betäubt. In sehr tiefer Narkose wurde der Brustkorb des Versuchstiers geöffnet, das Zwerchfell durchtrennt und so das Herz freigelegt. Die rechte Vorkammer des Herzens wurde mit einem kleinen Schnitt geöffnet, um den Blutkreislauf zu öffnen und dem verdrängten Blut eine Abflussmöglichkeit zu geben. In den linken Ventrikel wurde über ein Infusionssystem mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe zunächst PBS infundiert, bis das gesamte Blut ausgespült war. Anschließend wurde maximal 25ml der Fixierlösung (4% PFA in PBS) infundiert. Nach erfolgter Perfusion wurde das Gehirn freipräpariert und für zwei Tage zum Nachfixieren bei 4°C in der Fixierlösung

gehalten. Nach zwei Tagen wurden die Gehirne in eine 30%-ige Sucrose-Lösung überführt und konnten so gelagert werden.

3.2.12.6 Kryoschnitte („Floating Sections“)

Hierzu wurden die Gehirne von der Sucrose-Lösung und dem Cerebellum befreit und mit Tissue-Tek[®] in flüssigem Stickstoff eingebettet. Der Kühlblock am Kryostaten wurde währenddessen mit Trockeneis gekühlt. Sobald der Kühlblock kalt genug war, wurden die eingebetteten Gehirne mit Tissue-Tek[®] angebracht. Nach Ausrichtung des Objektisches wurden horizontale Schnitte mit einer Schnittdicke von 40µm hergestellt. Die Schnitte wurden in einer speziellen kryopräservierenden Lösung in einer 24-Well-Platte gesammelt. Dabei wurde streng auf die Reihenfolge geachtet, in jedes Well folgte ein Gewebeschnitt (Well A1 bis D6). Sobald die Platte mit der ersten Durchgang befüllt war, wurde wieder bei A1 begonnen um einen gesamten Querschnitt des Gehirns zu erhalten. Pro Gehirn befanden sich ungefähr vier Gewebeschnitte in jedem Well. Die Gewebeschnitte konnten in dieser Form für längere Zeiträume bei -20°C gelagert werden.

3.2.12.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Für die histologische Untersuchung wurden die in einem Well befindlichen Gewebeschnitte in Brij-haltigem PBS aufgefangen, um gestreckt und glatt auf einen Objektträger aufgezogen werden zu können. Dabei wurde beginnend mit dem ersten Well, jedes sechste Well der 24-Well-Platte auf Objektträger aufgezogen um eine genaue Übersicht über die Tumorgröße zu erzielen. Die aufgezogenen Schnitte wurden über Nacht bei RT getrocknet.

Um Gewebeschnitte histologisch besser beurteilen zu können und den Tumor erkennbar hervorzuheben, werden Gewebeschnitte mit unterschiedlichen Farbstoffen angefärbt. Eine der Standardfärbungen, in denen basische und saure Proteine angefärbt werden, ist die HE-Färbung. Dabei werden Zellkerne blauviolett und Zytoplasma und Kollagenfasern durch Eosin rosa angefärbt. Die Kryoschnitte wurden in 70%-igem Ethanol für 20sec rehydriert. Nach Anfärben in einer Hämalaun-Lösung für 5min, wurden die Schnitte für 5min in fließendem Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden wieder kurz in 70%-igem Ethanol gehalten. Die weitere Färbung erfolgte in alkoholischem Eosin für 2min und anschließender Spülung in 70%-igem

Ethanol. Nach abschließendem kurzen Bad in H₂O_{dest.} wurden die Schnitte mit Kaiser`s Glyceringelatine eingedeckt.

3.2.12.8 Tumorvolumen Bestimmung

Die gefärbten Tumorschnitte wurden mit einer AxioVision-Software fotografiert und die Tumorflächen ausgemessen. Auf jedem Schnitt wurde die Fläche des Tumors bestimmt und die gesamten Werte eines Tieres gemittelt. Ein Atlas für das gesamte Mausgehirn diente anschließend zur Bestimmung der Tumorphöhe. Das Tumorvolumen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Tumorvolumen (mm}^3\text{)} = \frac{\sum_n \text{Tumorflächen (mm}^2\text{)} \times \text{Tumorphöhe (mm)}{n \text{ vermessene Tumorflächen}}$$

3.2.13 Statistik

Die Ausreißer wurden mit Hilfe des Nalimov-Test bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels MS Excel Student`s T-Test. Die Signifikanzgrenze für die berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit (p) wurde als p* < 0,05; p** < 0,005; p*** < 0,0005 definiert.

4 Ergebnisse

4.1 VEGF-R3 im Glioblastom

4.1.1 VEGF-R3 Expression im GBM pre- und post-Bevacizumab Behandlung

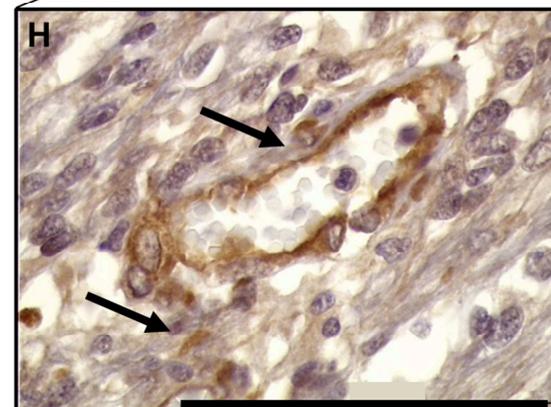
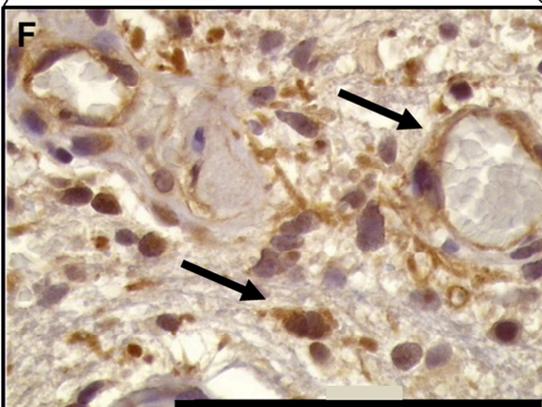
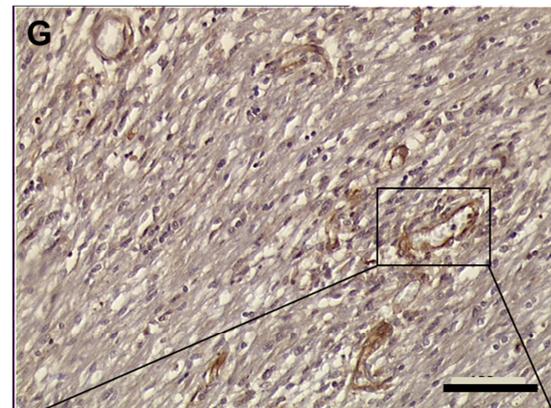
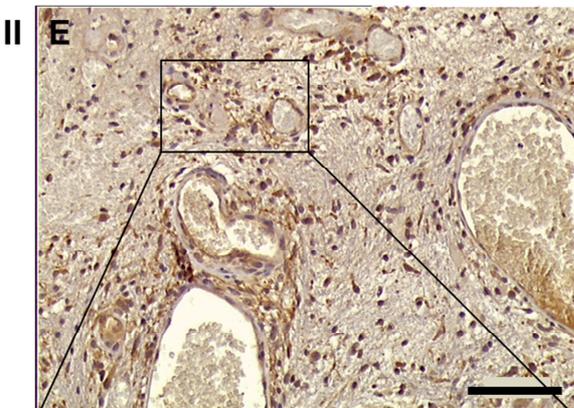
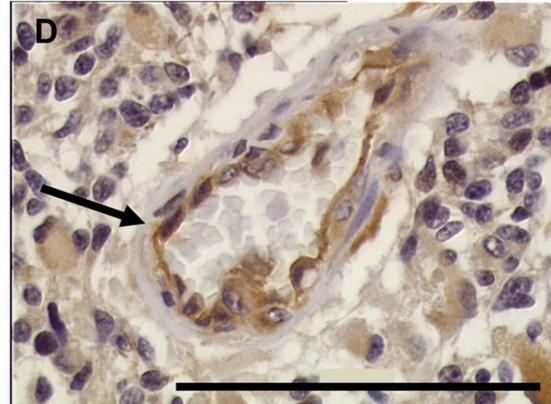
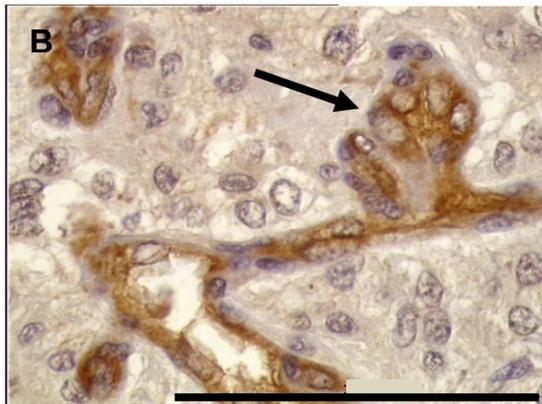
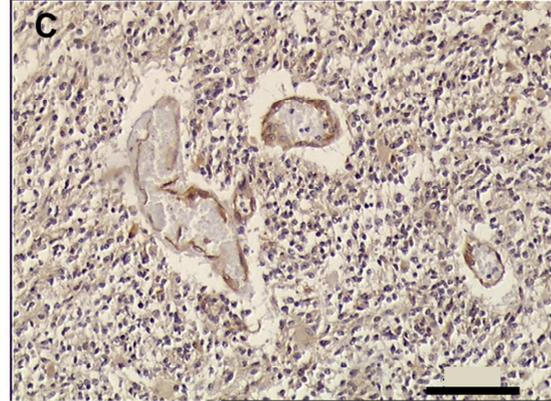
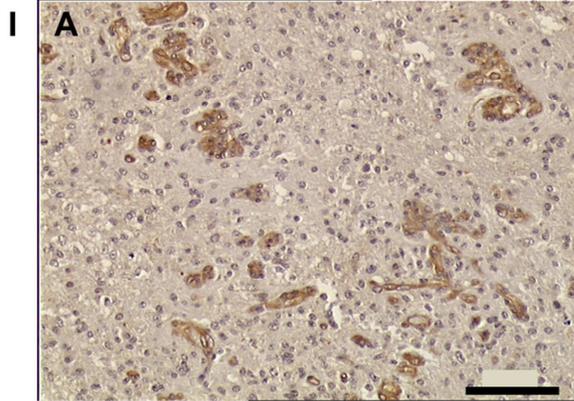
Um den Einfluss von Bevacizumab hinsichtlich VEGF-R3 Expression auf humanem Glioblastomgewebe zu untersuchen, wurden zunächst mehrere GBM-Fälle (n=6) pre- und post-Bevacizumab immunhistochemisch analysiert. Die Paraffinschnitte wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Mittelbronn vom Neurologischen Institut (Edinger Institut) der Goethe-Universitätsklinik Frankfurt bereitgestellt. Die Patienten haben nach der ersten GBM-Resektion eine Monotherapie mit Bevacizumab erhalten.

In der Immunhistochemie der Paraffinschnitte aus humanem GBM-Gewebe lässt sich sowohl vor als auch nach anti-VEGF-A-Therapie mit Bevacizumab ein starkes positives Signal für VEGF-R3 nachweisen. VEGF-R3 Expression zeigt sich hauptsächlich im Gefäßendothel aber auch in perivaskulären Zellen (*Abb. 12*). Die Expression von VEGF-C ist sowohl auf Gefäß-Endothelzellen als auch auf Zellen, die im Tumorparenchym lokalisiert sind, zu beobachten (*Abb. 13*).

Die Blockade einzelner Faktoren wie VEGF-A durch eine Therapie mit Bevacizumab begrenzt die Vorgänge der Tumorangiogenese im GBM nicht ausreichend. Die hinreichende Expression von VEGF-R3 und dessen Ligand VEGF-C vor und nach Bevacizumab-Therapie demonstriert ein alternatives Target im GBM. Der VEGF-R3 Signaltransduktionsweg bietet sich demnach als alternatives Zielprotein für eine gegen VEGF-R3 gerichtete Therapie an.

pre-Bevacizumab

post-Bevacizumab



VEGF-R3

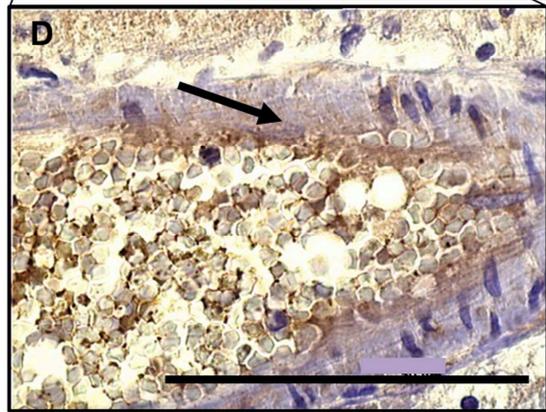
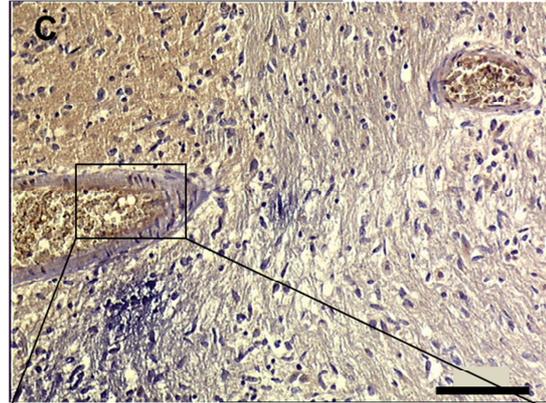
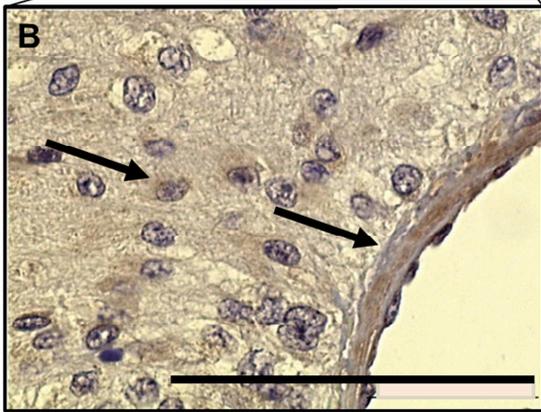
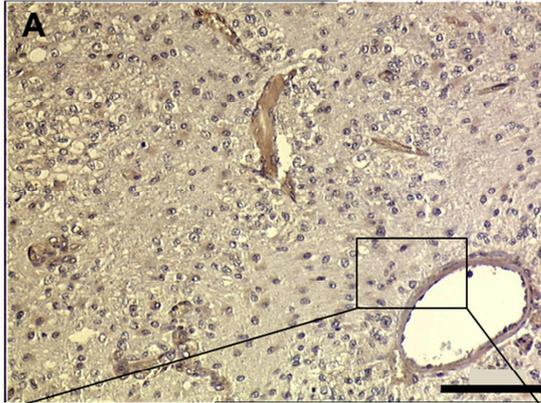
Abb. 12: VEGF-R3 Expression in humanem GBM-Gewebe vor und nach Bevacizumab-Therapie.

Auf Paraffinschnitten von zwei unabhängigen repräsentativen Patienten (I und II) ist der immunhistochemische Nachweis mittels Diaminobenzidene-(DAB)-Färbung mit dem VEGF-R3 Antikörper dargestellt (Bild A-H). Bild A und B: Patient I, braune Färbung für VEGF-R3 vor allem im Gefäßendothel (schwarzer Pfeil) nach der ersten unbehandelten Tumorresektion. Bild C und D: Patient I, braune DAB-Färbung für VEGF-R3 hauptsächlich im Gefäßendothel nach Bevacizumab-Therapie (schwarzer Pfeil). Bild E und F: Patient II, braune DAB-Färbung für VEGF-R3 insbesondere im Gefäßendothel vor Bevacizumab-Behandlung nach der ersten Tumorresektion. Bild G und H: Patient II, positive DAB-Färbung für VEGF-R3 insbesondere im Gefäßendothel und einigen Zellen im Tumorparenchym (schwarze Pfeile) nach Mono-Therapie mit Bevacizumab. Zellkerne sind mit Hilfe von Hämalaun blau markiert. Der Maßstabsbalken entspricht immer 100µm.

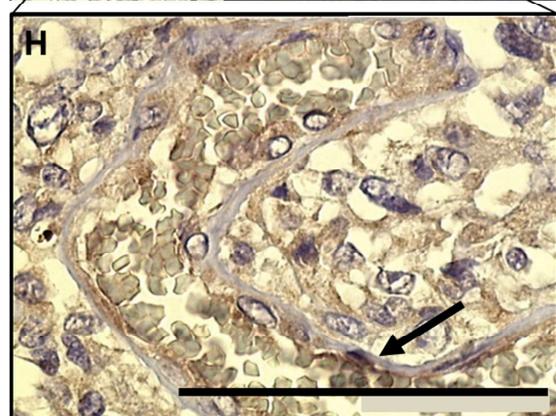
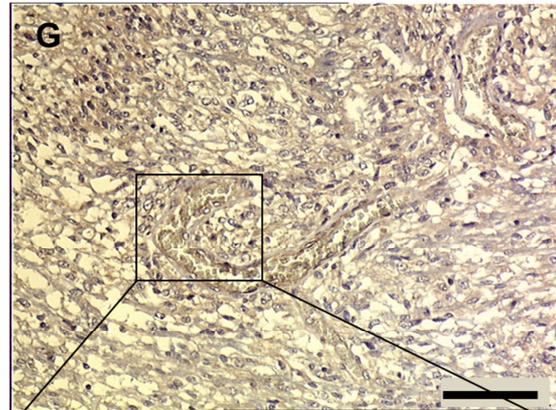
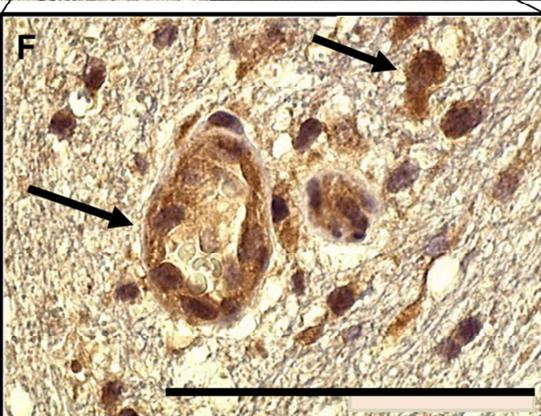
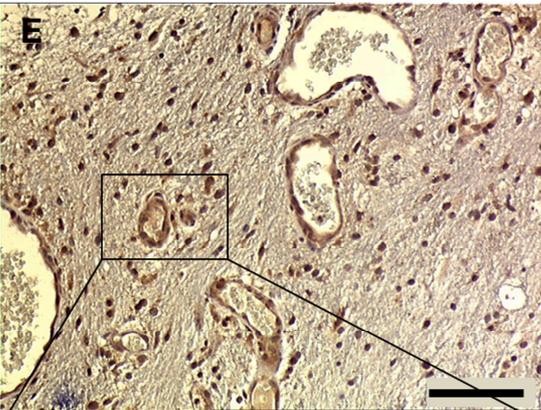
pre-Bevacizumab

post-Bevacizumab

I



II



VEGF-C

Abb. 13: VEGF-C Expression in humanem GBM-Gewebe vor und nach Bevacizumab-Therapie.

Auf Paraffinschnitten von zwei unabhängigen Fällen (I und II) ist der immunhistochemische Nachweis (braun) mittels Diaminobenzidene-(DAB)-Färbung mit dem VEGF-C Antikörper dargestellt (Bild A bis H). Bild A und B: Patient I, positives Signal für VEGF-C nach der ersten unbehandelten Tumorresektion ist nicht nur auf Gefäßendothelzellen beschränkt, sondern findet sich auch auf Zellen, die im Tumorparenchym lokalisiert sind. Bild C und D: Patient I, braune DAB-Färbung für VEGF-C vor allem im Gefäßendothel. Bild E und F: Patient II, braune DAB-Färbung für VEGF-C im Gefäßendothel und Zellen außerhalb von vaskulären Arealen vor Bevacizumab-Behandlung nach der ersten Tumorresektion. Bild G und H: Patient II, positive DAB-Färbung für VEGF-C insbesondere im Gefäßendothel und einigen Zellen im Tumorparenchym nach Mono-Therapie mit Bevacizumab. Die VEGF-C Expression in den Bildern A bis H, die durch schwarze Pfeile hervorgehoben ist, ist nicht nur auf Gefäßendothelzellen beschränkt, sondern findet sich auch auf Zellen, die im Tumorparenchym lokalisiert sind. Zellkerne sind mit Hilfe von Hämalaun blau markiert. Der Maßstabsbalken entspricht immer 100µm.

4.1.2 mRNA-Expression von VEGF-R2, -R3, -A, -C und -D in gbECs

Für die nachfolgenden Experimente wurden Endothelzellen aus Glioblastomgewebe (gbECs) isoliert. Die Isolation erfolgte durch die für Endothelzellen charakteristischen Marker CD31 und CD34. Um die Reinheit der Population nachzuweisen, wurden die gbECs hinsichtlich CD31, CD34, von-Willebrand-Faktor und VE-Cadherin gefärbt. Alle in dieser Arbeit aufgeführten gbECs zeigen in der Immunocytochemie für die genannten Marker ein positives Signal (Daten nicht aufgeführt). Alle Zellen wurden nach verschiedenen Passagen gefärbt und für die nachfolgenden Experimente verwendet.

Abbildung 14 zeigt die vorhandene Expression von VEGF-R2, VEGF-R3, VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D auf Genebene in isolierten Tumorendothelzellen aus dem GBM und in mikrovaskulären Zellen aus menschlichem tumorfreiem Gehirn (HBMEC). In allen aufgeführten Zellen werden beide Isoformen von VEGF-R3 exprimiert, dabei zeigt in allen aufgeführten Zellen die kurze Isoform (*short*) von VEGF-R3 auf Genebene im Vergleich zur langen VEGF-R3 Variante (*long*) eine

geringere Expression. Das Expressionslevel variiert in einigen Fällen, zum Teil zeigt die VEGF-R2 Expression von gbEC II und die VEGF-D Expression von gbEC I und gbEC IV eine niedrigeres Expressionslevel im Vergleich zu den anderen gbECs. Als Positivkontrolle dienten die physiologischen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC). Wie die immunhistochemischen Färbungen von VEGF-R3 und VEGF-C vornehmlich auf das tumor-assoziierte Gefäßendothel verweisen, bestätigen die Untersuchungen auf Genebene eine gut nachweisbare Expression vor allem von VEGF-R3 und VEGF-C in isolierten GBM-Endothelzellen.

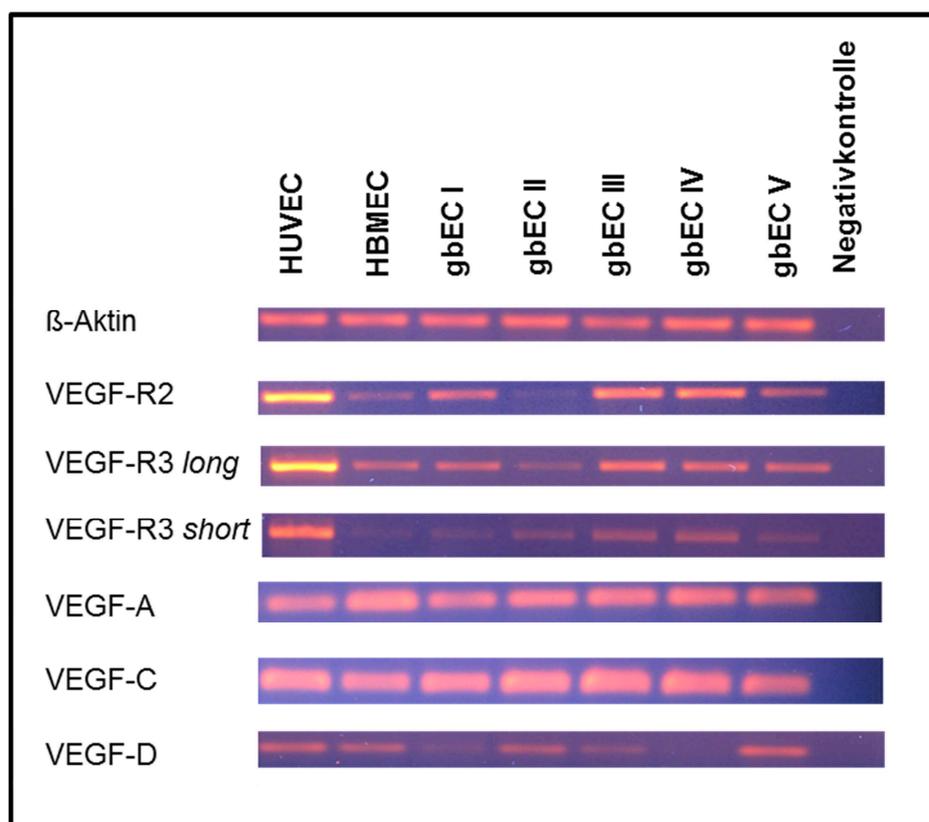


Abb. 14: mRNA-Expression von VEGF-R2, VEGF-R3 (short und long) und deren Liganden VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D mittels semiquantitativer PCR.

Alle aufgeführten gbECs, HUVECs und HBMECs exprimieren den VEGF-R2 und -R3 und die dazugehörigen Liganden VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D. Die Genexpression der kurzen Isoform von VEGF-R3 ist in allen Zellen geringer als die lange Isoform. HUVEC: Endothelzellen aus der Nabelschnur; HBMEC: mikrovaskuläre Endothelzellen aus Normalhirngewebe; gbEC I-V: isolierte Endothelzellen aus GBM-Gewebe.

4.1.3 Bevacizumab besitzt keinen Einfluss auf die VEGF-R3 mRNA-Expression

Isolierte GBM-Endothelzellen wurden auch nach Bevacizumab-Inkubation hinsichtlich VEGF-R3, VEGF-C und VEGF-D Expression mit Hilfe semiquantitativer PCR untersucht. Bevacizumab erzielt nach verschiedenen Inkubationszeiten (1h, 5h, 24h und 72h) keinen Einfluss auf die Genregulation von VEGF-R3 in gbECs. Es lassen sich keine semiquantitativen Aussagen über den Effekt von Bevacizumab auf die Regulation des VEGF-R3 Gens treffen. Daher wurde die PCR-Dokumentation hier nicht aufgeführt.

4.1.4 GbECs exprimieren VEGF-R3

Zur Analyse von VEGF-R3 Expression auf Proteinebene wurden isolierte gbECs immunocytochemisch untersucht. *Abbildung 15* zeigt den immunocytochemischen Nachweis von VEGF-R3 in drei repräsentativen gbECs (I-III). Die VEGF-R3 Expression erstreckt sich über die gesamte Zellmembran der GBM-Endothelzellen, wobei ein verstärktes Signal in der Nähe des Zellkerns zu erkennen ist. Die entsprechenden Negativkontrollen zeigen, abgesehen von der Anfärbung der Zellkerne durch Hämalaun, keinerlei positives Signal. VEGF-R3 wird sowohl auf Gen- als auch Proteinebene in selbstisolierten GBM-Endothelzellen exprimiert. Diese Ergebnisse bekräftigen die Erkenntnisse aus den vorherigen immunhistochemischen Studien, dass VEGF-R3 exprimierende Zellen im GBM-Gefäßendothel vorhanden sind.

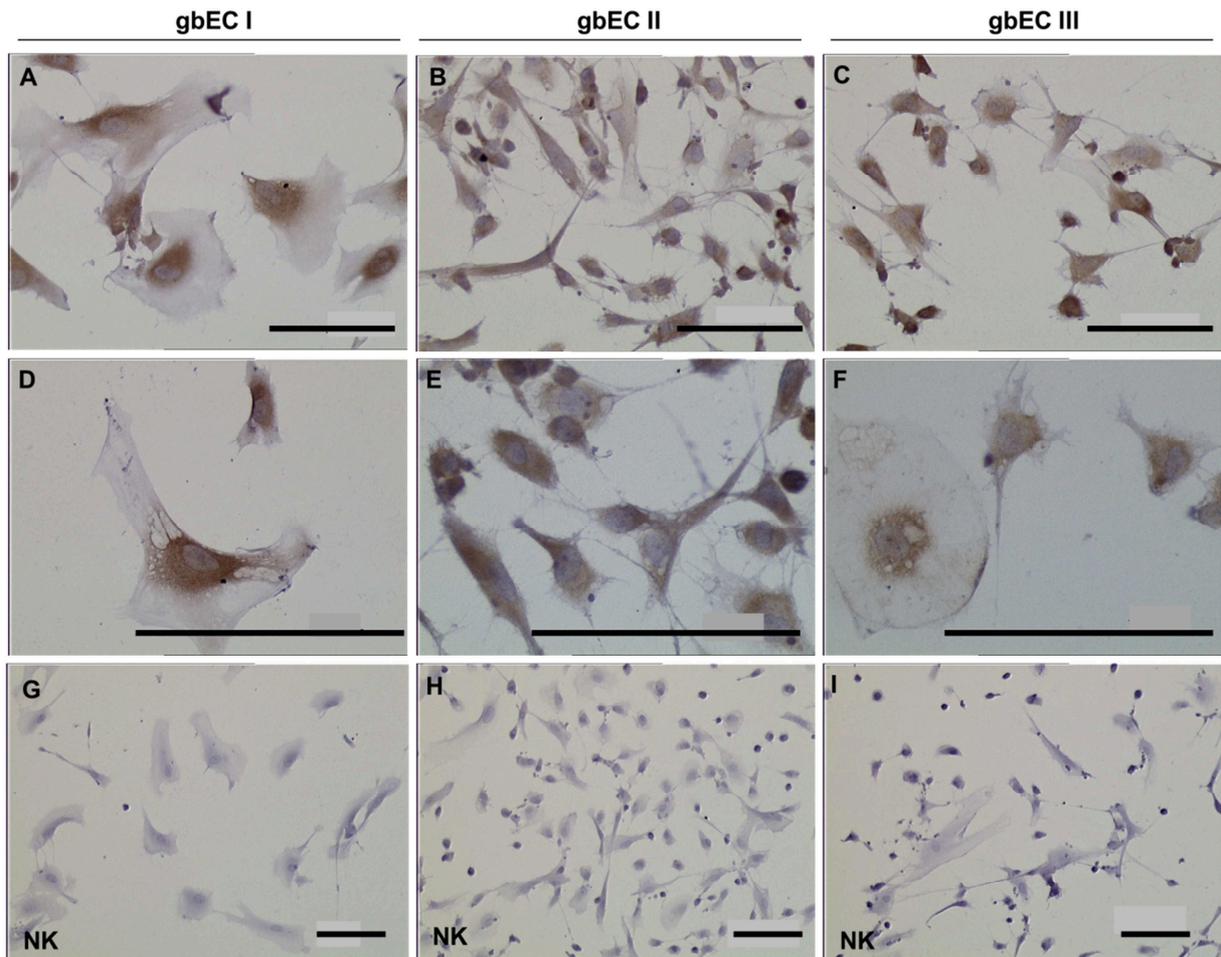


Abb. 15: VEGF-R3 Expression auf repräsentativen gbECs I-III in drei verschiedenen GBM-Fällen.

Dargestellt ist der immuncytochemische Nachweis von VEGF-R3 mittels einer DAB-Färbung (braun) mit dazugehöriger Negativkontrolle (NK). Bild A bis F: VEGF-R3 ist exprimiert über die gesamte Zellmembran der selbstisolierten GBM-Endothelzellen I-III. Bild F bis H: Die Negativkontrollen zeigen kein positives Signal in gbEC I-III. Die Zellkerne sind mit Hämalaun blau gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht immer 100µm.

4.2 VEGF-R3 Blockade mit MAZ51 auf gbECs

4.2.1 Einfluss von MAZ51, Bevacizumab und spezifischen VEGF-R2 und VEGF-R3 blockierenden Antikörpern auf die *in vitro*-Angiogenese von HUVECs und gbECs

Um den Einfluss von MAZ51, Bevacizumab und spezifischen VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörpern in einem *in-vitro*-Angiogenese Modell zu untersuchen, wurden physiologische und Endothelzellen aus pathologischem Gewebe in einem Tube Formation Assay (TFA) beobachtet. Als Tube wird im Folgenden eine gefäßähnliche Struktur bzw. Gefäßröhre gemeint (*Abb.16 A*). Drei Charakteristika zur TFA-Auswertung stehen im Vordergrund: die durchschnittliche Tube Länge, Summe der Tubes und durchschnittliche Verzweigungspunkte. *Abbildung 16* (Bild A) zeigt eine Fotodokumentation von HUVECs mit den jeweiligen Inhibitoren. In *Abb. 16* (B) ist die quantifizierte Ausbildung von gefäßähnlichen Strukturen von HUVECs dargestellt. Wie schon bisherige Studien zeigen konnten werden durch die Addition von 5µM Bevacizumab, 20µg/ml VEGF-R2- und VEGF-R3-Antikörper und die kombinierte Blockade von VEGF-R2/-R3 alle drei Kriterien signifikant reduziert [112, 191]. Folglich repräsentieren die erzielten Ergebnisse mit HUVECs die Validität des Assays. Im Gegensatz dazu weist die VEGF-R3 Blockade mit dem zellpermeablen Molekül MAZ51 keinen reduzierenden Effekt bei physiologischen Zellen auf (*Abb. 16* Bild A und B jeweils rot markiert). Dabei wurde eine MAZ51-Konzentration von 7µM gewählt. Es konnte gezeigt werden, dass MAZ51, ein effektiver TKI von VEGF-R3 eine konzentrationsabhängige Wirkung besitzt. Mit einer Konzentration von 5µM inhibierte MAZ51 die VEGF-C induzierte VEGF-R3 Phosphorylierung. Eine zehnfach höhere Konzentration konnte schließlich auch VEGF-R2 Phosphorylierungen hemmen [192]. Der Einsatz von MAZ51 mit einer Konzentration von 7µM sollte somit nur VEGF-R3 effektiv blockieren.

Im physiologischen Zustand wird durch die Blockade der pro-angiogenen Faktoren VEGF-A, VEGF-R2 bzw. VEGF-R3 mit blockierenden Antikörpern ein anti-angiogener Effekt erreicht, wohingegen die intrazelluläre Hemmung der VEGF-R3-Kinase mittels MAZ51 keinen Einfluss im *in vitro*-Angiogenese Assay von physiologischen Zellen (HUVECs) besitzt.

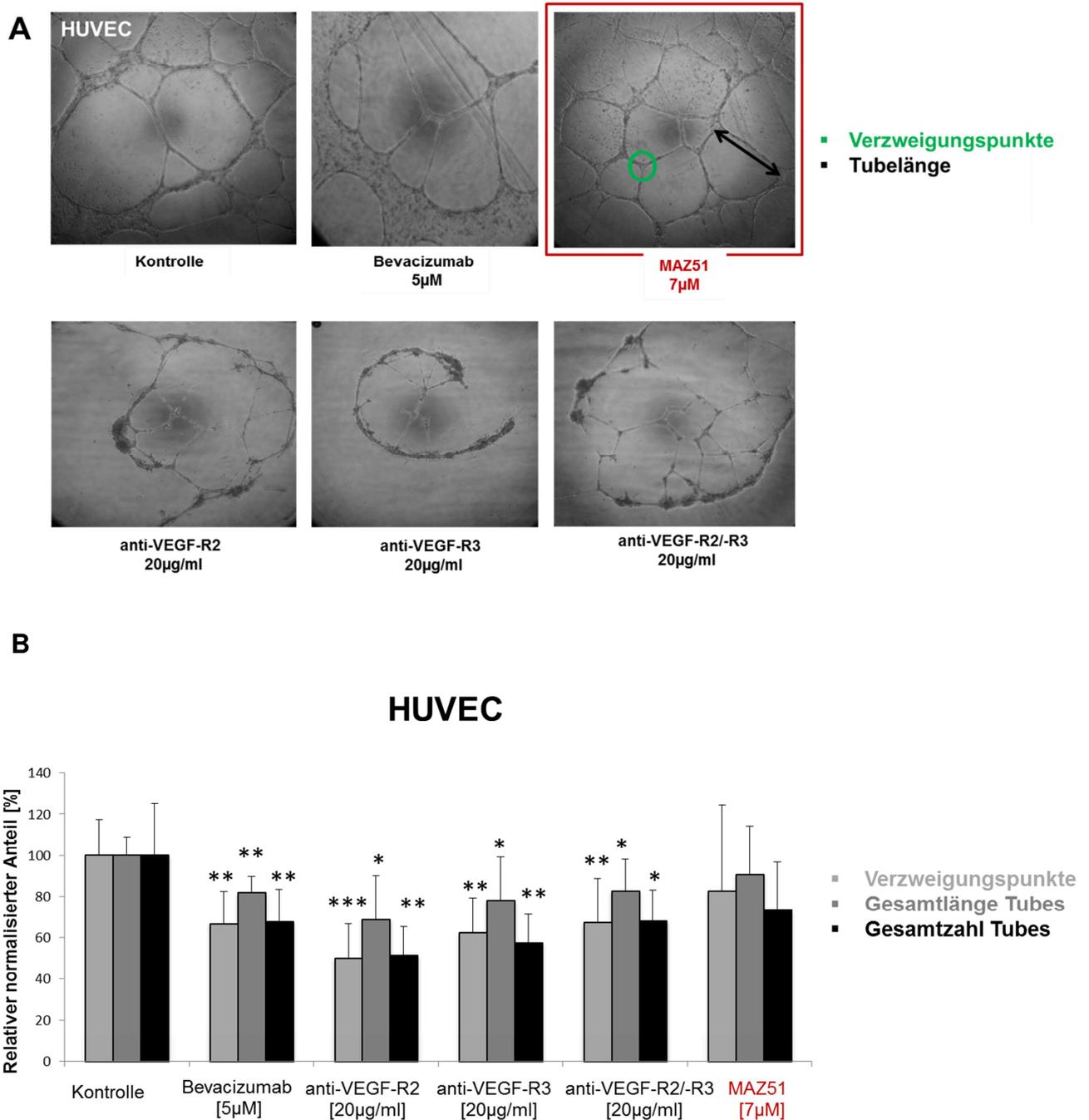
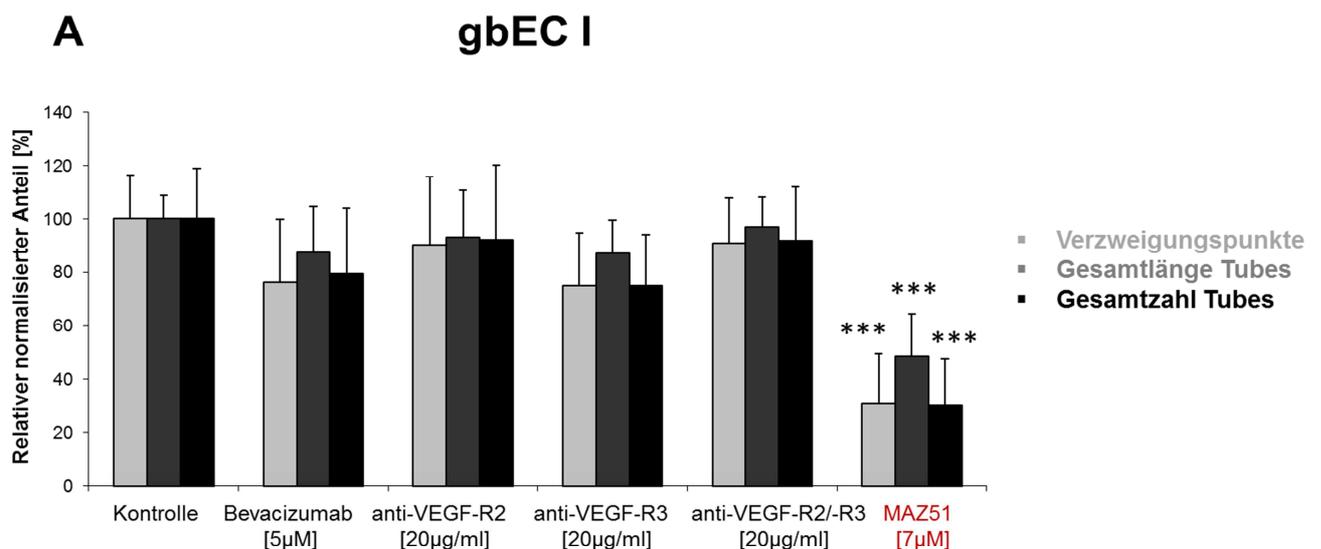


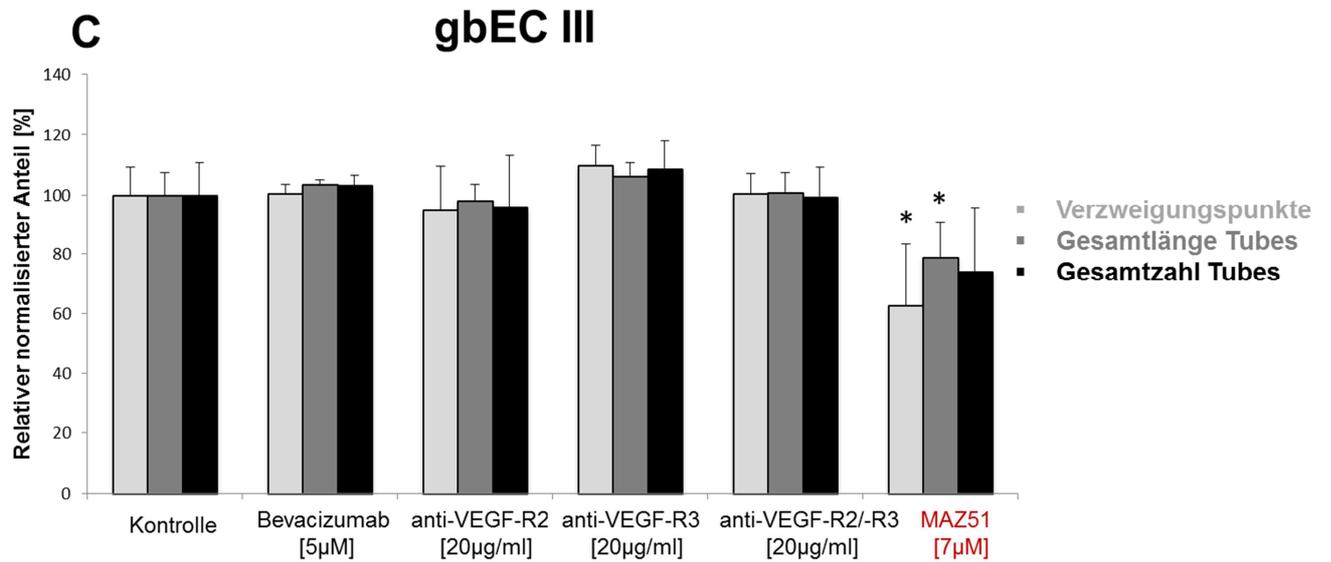
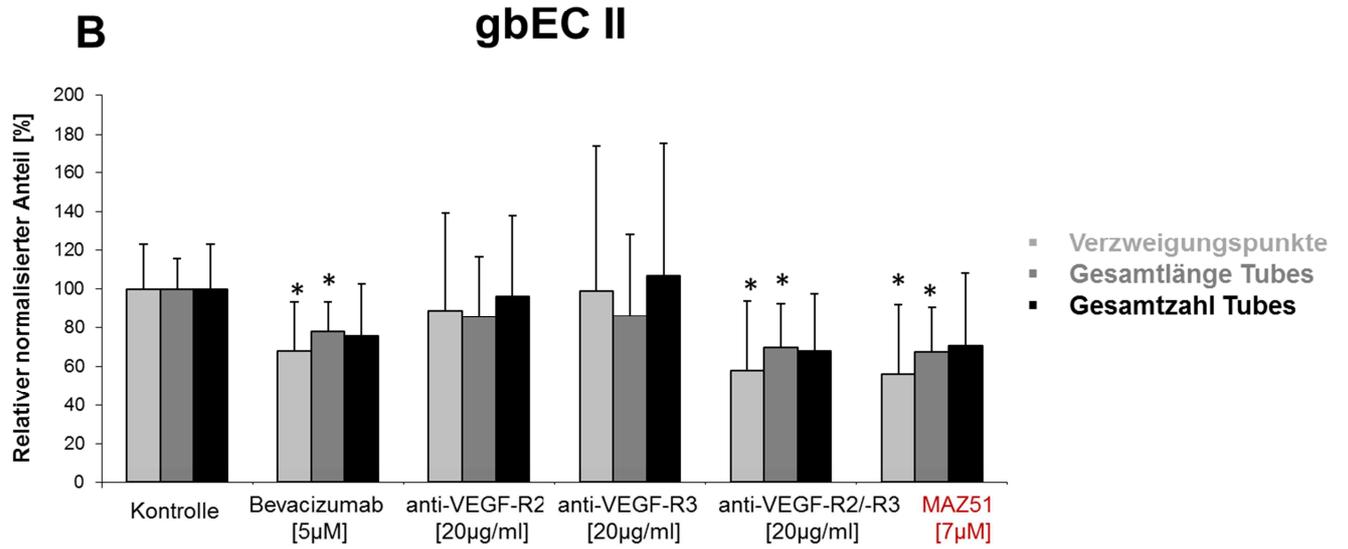
Abb. 16: Effekt von Bevacizumab, blockierenden VEGF-R2/-R3 Antikörpern und MAZ51 auf die *in vitro*-Angiogenese bzw. Gefäßformation von HUVECs (n=7).

Dargestellt ist der Tube Formation Assay nach 24h-Inkubation. Bild A: repräsentative Fotodokumentation der Gefäßausbildung von HUVECs nach jeweiliger Inhibition. Abbildung B: Quantifizierung der Fotodokumente hinsichtlich der aufgeführten Kriterien. Die Blockade mit MAZ51 beeinflusst die Gefäßformation nicht. Die Inhibition mit Bevacizumab und blockierenden VEGF-R2/-R3 Antikörpern zeigen eine signifikante Reduktion der Gefäßausbildung. Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede

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

Im Gegensatz dazu führt die Inkubation mit MAZ51 in einer Konzentration von $7\mu\text{M}$ für vier von fünf gbECs-Fällen zu einem signifikanten anti-angiogenen Effekt (Abb. 17 A, B, C und D). Es wird insbesondere die Gesamtzahl der Verzweigungspunkte und die Gesamtlänge der Tubes signifikant vermindert. Im Falle von gbEC I (Abb. 17 A) besitzt nur die Zugabe von MAZ51 einen stark signifikanten Effekt auf alle drei aufgeführten Kriterien. Eine signifikante Reduktion der Verzweigungspunkte und der durchschnittlichen Gesamtlänge der gefäßähnlichen Strukturen durch MAZ51 zeigen gbEC II (Abb. 17 B) und gbEC III (Abb. 17 C). Eine signifikante Abnahme der Verzweigungspunkte durch MAZ51 ist in gbEC IV (Abb. 17 D) deutlich zu sehen, wohingegen die extrazelluläre Inhibition mit blockierenden Antikörpern nur bedingt Einfluss auf die Gefäßformation nimmt. In gbEC II (Abb. 17 B) und gbEC III (Abb. 17 C) lässt sich nur eine signifikante Abnahme der Verzweigungspunkte und der durchschnittlichen Gesamtlänge der Tubes beobachten. Die VEGF-A Blockade mit Bevacizumab zeigt nur in gbEC II und gbEC V (Abb. 17 B und E) einen signifikanten Effekt auf die Verzweigungspunkte und die Gesamtlänge der Tubes.





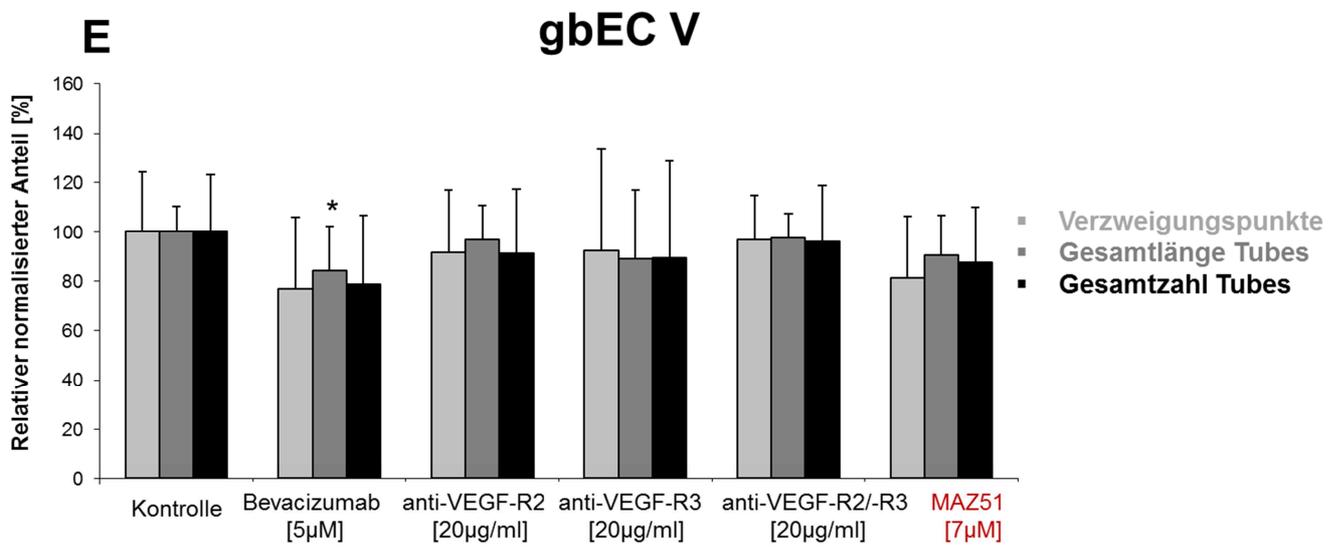
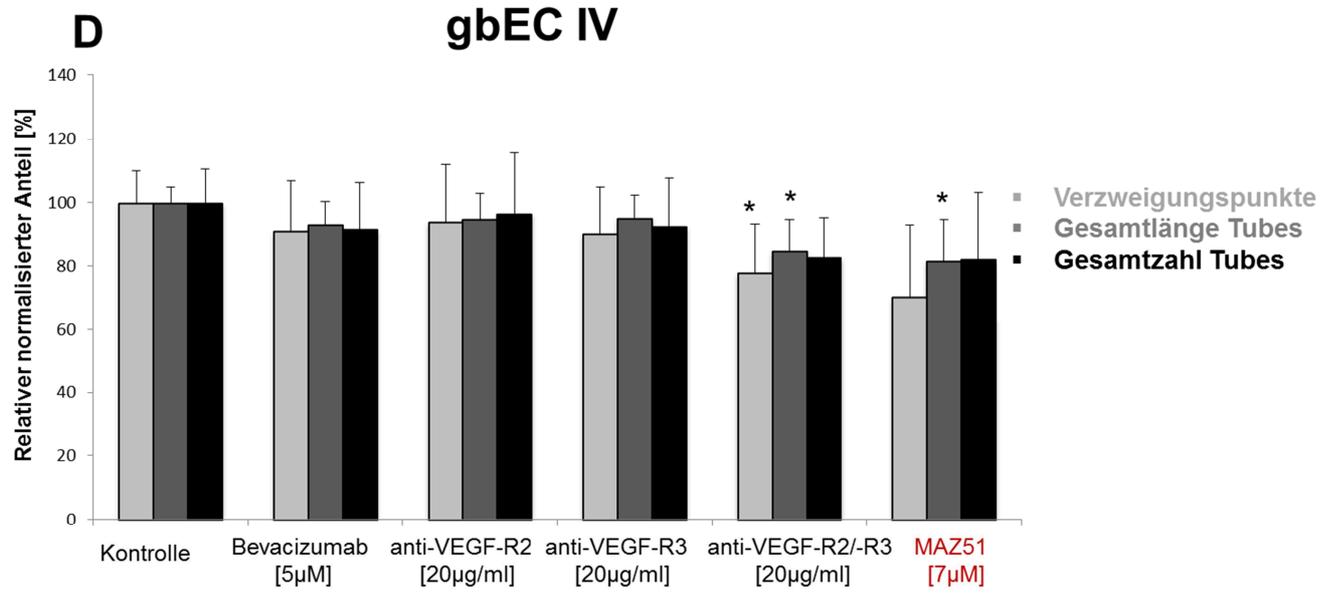


Abb. 17: Effekt von Bevacizumab, blockierenden VEGF-R2/-R3-Antikörpern und MAZ51 auf die *in vitro*-Angiogenese bzw. Gefäßformation von gbEC I (n=7), gbEC II (n=5), gbEC III (n=4), gbEC IV (n=4) und gbEC V (n=7).

Dargestellt ist der quantifizierte Tube Formation Assay nach 24-stündiger Inkubation der jeweiligen Inhibitoren. Abbildung A-E: Quantifizierung des TFA von gbEC I-V nach 24h-Inkubation mit blockierenden VEGF-A, VEGF-R2/-R3 Antikörpern und MAZ51.

Insbesondere die MAZ51-Inkubation weist eine signifikante Reduktion der *in vitro*-Gefäßausbildung in gbECs auf, wohingegen die spezifische Blockade von VEGF-A/-R2/-R3 nur bedingt einen Effekt aufweist. Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass blockierende Antikörper, die gegen VEGF-A (Bevacizumab), VEGF-R2 und VEGF-R3 gerichtet sind, in physiologische Zellen (HUVECs) einen signifikant reduzierenden Effekt auf alle angiogenen Kriterien (Verzweigungspunkte, Gesamtzahl der Tubes und Tubeslänge) haben. Wohingegen der anti-angiogene Effekt im Falle der pathologischen Zellen (gbECs) fast vollständig ausbleibt. Nur in zwei von fünf Fällen lässt sich durch Bevacizumab (*Abb. 17 B* und *E*) und durch die kombinierte Blockade von VEGF-R2/-R3 mit Antikörpern (*Abb. 17 B* und *D*) eine Abnahme einzelner angiogener Kriterien darstellen. Interessanterweise wird in vier von fünf Fällen durch die Blockade von VEGF-R3 mit MAZ51 ein signifikant anti-angiogener Effekt auf die Gefäßformation von pathologischen Zellen (gbECs) erzielt. Vice versa wird die *in vitro*-Gefäßbildung von physiologischen Endothelzellen durch VEGF-R3 Blockade mit MAZ51 nicht gehemmt. Die bisher unbekannt pro-angiogene Rolle von VEGF-R3 in der GBM-Angiogenese kann durch MAZ51 effizient inhibiert werden. Dadurch wird die Ausbildung Tube-ähnlicher Strukturen pathologischer GBM-Endothelzellen auf einer künstlichen Zellmatrix angegriffen bzw. reduziert. Die Blockade von VEGF-R3 mit MAZ51 kann einen anti-angiogenen Effekt in pathologischen Zellen (gbECs) aber nicht physiologischen HUVECs erzielen. Demzufolge lässt sich hier ein erster therapeutischer Effekt mit MAZ51 erkennen.

4.2.2 MAZ51 wirkt cytotoxisch auf gbECs

Mit Hilfe des Sulforhodamin B-Assays wurde untersucht, in welchem Maß MAZ51 und Bevacizumab Einfluss auf die Gesamtzellmenge von gbECs und HUVECs besitzen. Die Zellen wurden mit 7 μ M MAZ51 und 200 μ g/ml Bevacizumab inkubiert. Der Assay wurde für drei voneinander unabhängigen gbECs durchgeführt und für die abschließende Quantifizierung zusammengeführt. Bezogen auf die Kontrolle zeigt sich im SRB-Assay für gbECs nach 24h keine erhebliche Abnahme der vitalen Zellen (*Abb. 18 A*). Erst nach 72h ist eine statistisch signifikante Abnahme der

Gesamtzellmenge durch MAZ51 (Abb. 18 B) zu verzeichnen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die anti-angiogene Wirkung von MAZ51 im *in vitro*-Angiogenese-Modell (vorheriger Abschnitt; Endpunkt 24h) unabhängig vom cytotoxischen Effekt ist, der erst nach 72h eintritt. In *Abbildung 18 (C)* hat MAZ51 zudem in physiologischen Endothelzellen(HUVECs) keinen cytotoxischen Effekt. Die 72h-Inkubation mit Bevacizumab weist keine Auswirkung auf die Cytotoxizität von gbECs und HUVECs auf.

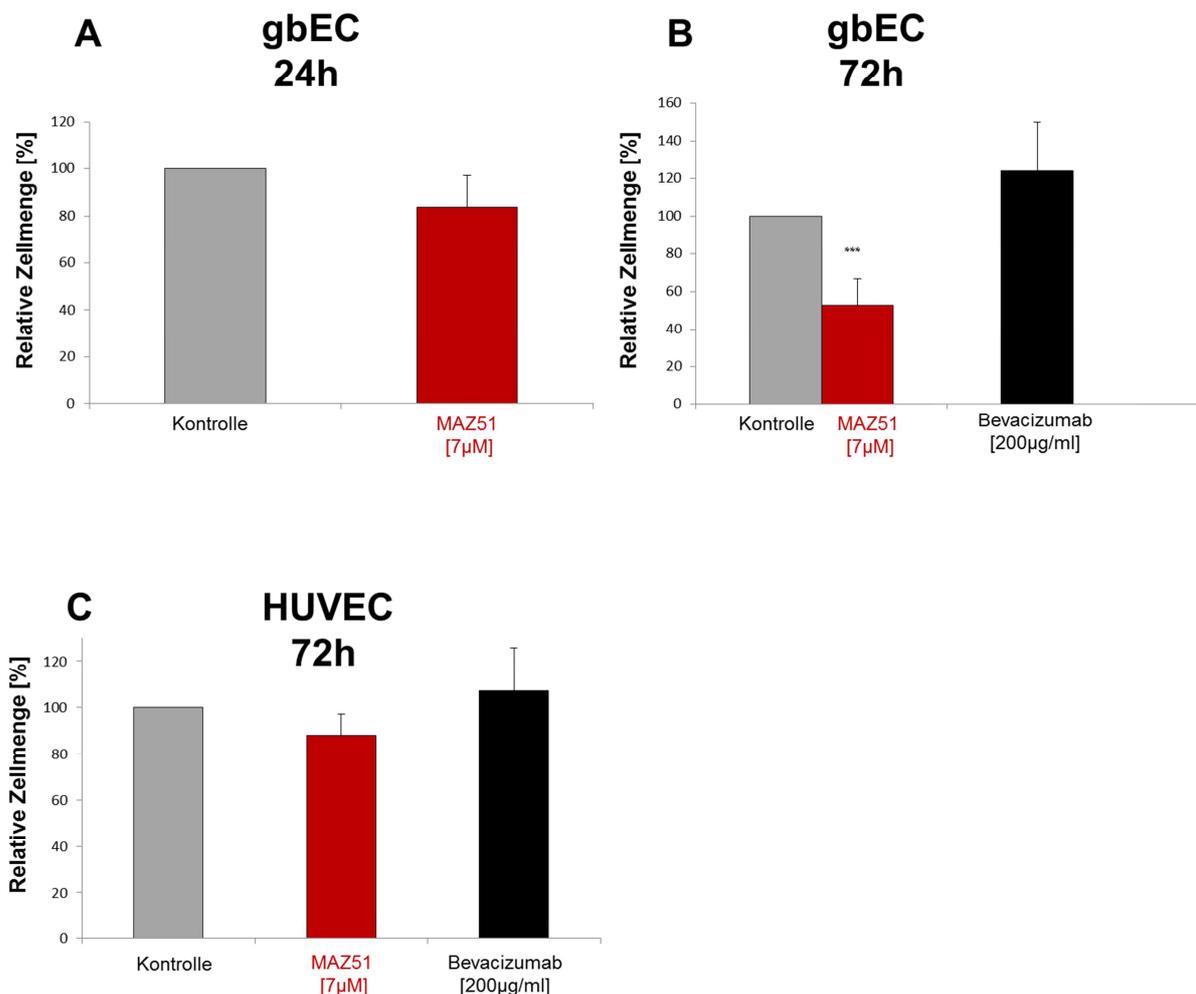


Abb. 18: Cytotoxischer Einfluss von MAZ51 und Bevacizumab auf die Gesamtzellmenge von gbECs und HUVECs.

Abbildung A und B: isolierte GBM-Endothelzellen wurden mit 7µM MAZ51 bzw. 200µg/ml Bevacizumab für 24h (n=3) und 72h inkubiert (n=5). MAZ51 weist im Vergleich zur Kontrolle (graue Säule) erst nach 72h (B, rote Säule) eine stark signifikante Reduktion der vitalen Zellen in gbECs auf. Inkubation mit Bevacizumab (schwarze Säule) zeigt keinen

reduzierenden Effekt auf die gbEC-Zellmenge. Abbildung C: MAZ51 und Bevacizumab haben keinen Einfluss auf HUVECs nach 72h (n=4). Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (**p<0,0005).

Auch die Untersuchung der Blockade mittels blockierenden VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörpern hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Cytotoxizität von gbECs. *Abbildung 19* stellt ebenfalls die 72h-Inkubation von VEGF-R2-, VEGF-R3 und die Kombination aus VEGF-R2/-R3-Antikörpern in vier unabhängigen gbECs (I bis IV) dar.

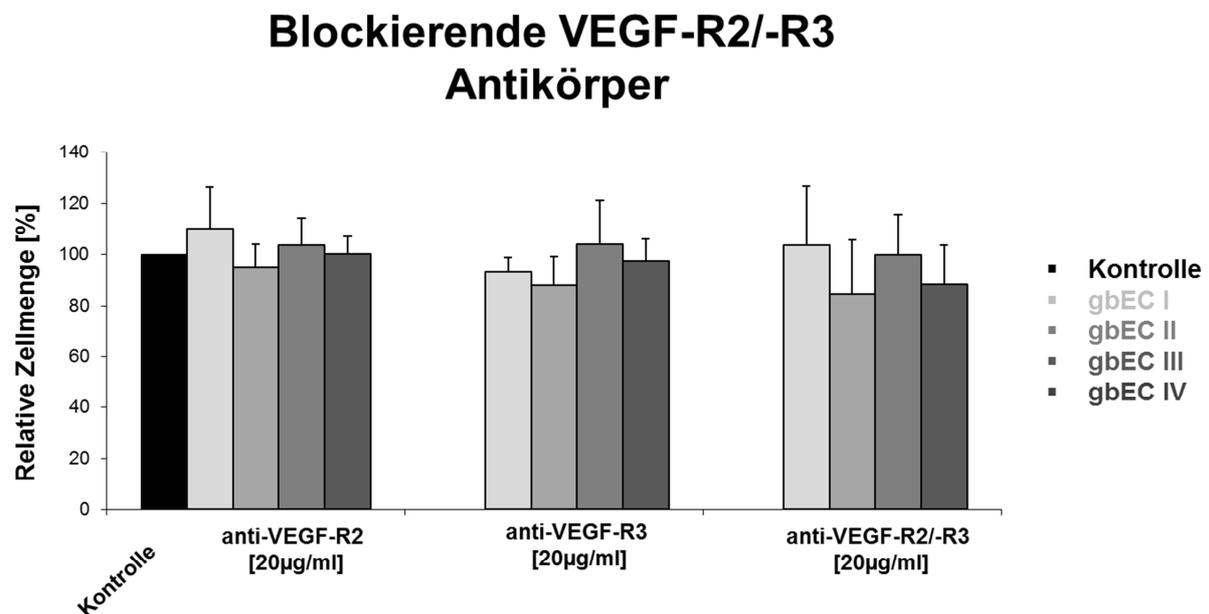


Abb. 19: Kein Einfluss von blockierenden VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörpern auf die Gesamtzellmenge von gbECs.

Im SRB-Assay wurden gbECs I-IV mit 20µg/ml anti-VEGF-R2 und VEGF-R3 für 72h inkubiert (n=4). Die Applikation von blockierenden VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörpern (graue Säulen) zeigt keinen Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe (schwarze Säule). Die Balken geben die Standardabweichung an.

Somit besitzt nur MAZ51 einen signifikant cytotoxischen Effekt in isolierten Endothelzellen aus pathologischem Gewebe. Durch die Inhibierung von VEGF-R3

mit MAZ51 ist ein deutlich erkennbarer cytotoxischer Effekt in gbECs, jedoch nicht in physiologischen HUVECs, nachweisbar. Die Blockade mit blockierenden VEGF-A, VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörpern hat keine cytotoxische Wirkung. Durch MAZ51 kann in isolierten GBM-Tumorendothelzellen ein anti-angiogener und cytotoxischer Effekt gezeigt werden. Wohingegen in physiologischen Endothelzellen (HUVECs) mit MAZ51 weder die *in vitro*-Gefäßformation im TFA noch die Lebendzellzahl angegriffen wird. Somit bestärkt der cytotoxische Einfluss mit MAZ51 nur auf pathologischen Zellen einen therapeutischen Effekt.

4.2.3 MAZ51 reduziert das Migrationsverhalten von gbECs

Im Wound Healing Assay (WHA) wurde der Einfluss von MAZ51 auf das Migrationsverhalten untersucht, dabei wurden die gbECs mit MAZ51, Bevacizumab und spezifischen VEGF-R2/-R3 blockierenden Antikörpern behandelt. *Abb. 20* (Bild A) zeigt eine Fotodokumentation von repräsentativen gbECs mit entsprechender Behandlung auf. In *Abb. 20* B ist die quantifizierte Auswertung des WHA dargestellt. Das Resultat gibt die Auswertung von drei verschiedenen gbECs wider, deren Wundflächen ausgemessen und gemittelt wurden. Auch hier zeigt nur die Addition von MAZ51 eine signifikant verminderte Migrationsaffinität im Vergleich zur Kontrollgruppe und mit Bevacizumab behandelten Gruppe. Die Validität des Wound Healing Assays zeigt sich dadurch, dass der letzte Zeitpunkt der WHA-Dokumentation nach 24h erfolgt und MAZ51(s. Abschnitt 4.2.2) erst nach 72h einen cytotoxischen Effekt aufweist. Nach 24h-Inkubation mit MAZ51 ist keine signifikante Reduktion von lebenden gbECs zu erkennen, jedoch wird die Fähigkeit zu migrieren von gbECs signifikant gehemmt. Die Wundfläche der MAZ51 behandelten gbECs ist nach 24h nicht zugewachsen. Dieser signifikant gehemmte Effekt ist unter anti-VEGF-A Blockade oder Kontrollbedingungen nicht feststellbar.

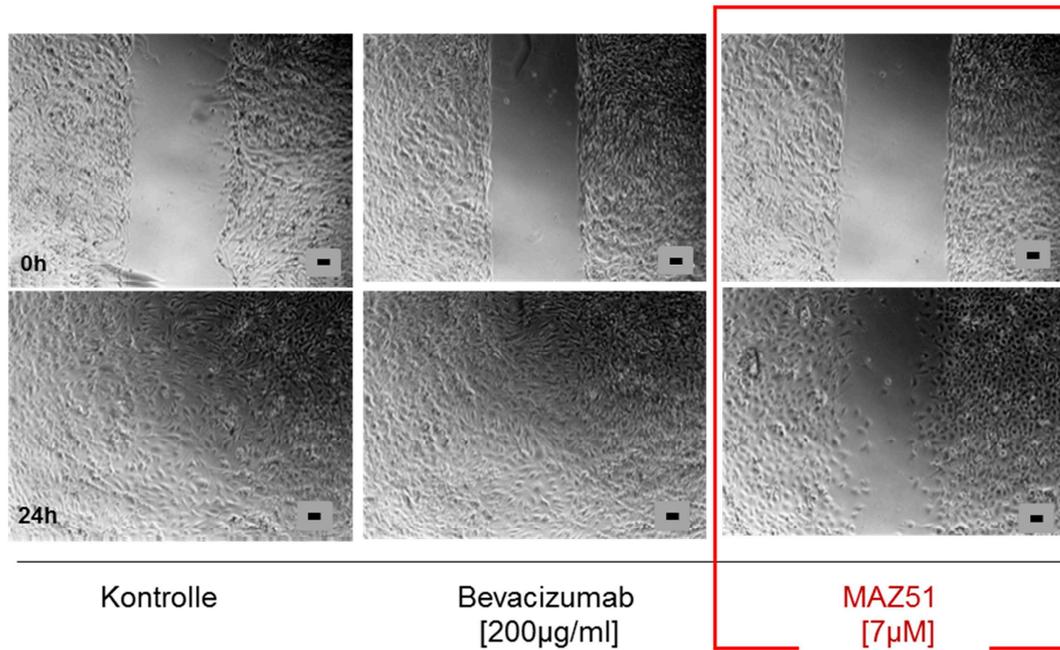
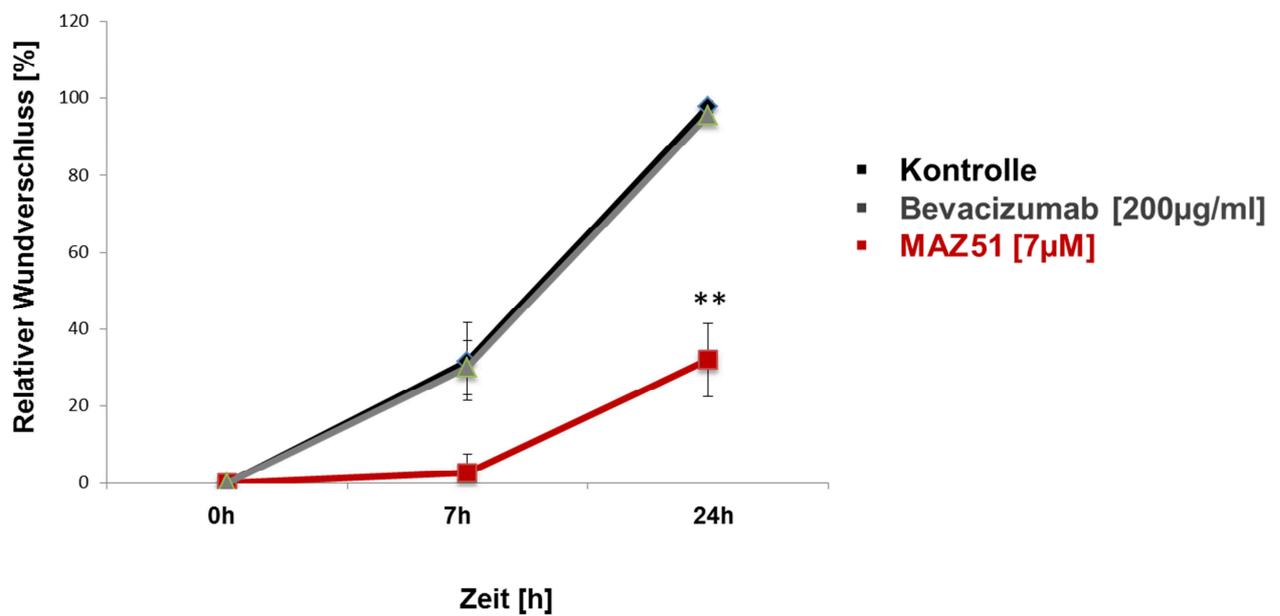
A**B****gbECs**

Abb. 20: Einfluss von MAZ51 und Bevacizumab auf die Migrationsaffinität von gbECs.

Aufgeführt ist der durchgeführte und quantifizierte Wound Healing Assay. Bild A: Fotodokumentation von repräsentativen GBM-Endothelzellen unter Einfluss von MAZ51 (rot

umrandet) bzw. Bevacizumab nach 0h- und 24h-Inkubation im direkten Vergleich zu Kontrollbedingungen. Der Maßstabsbalken entspricht 100µm. Abbildung B: Quantifizierung von MAZ51 in drei gbECs (I-III) im Vergleich zur Bevacizumab- und Kontroll-Gruppe nach 0h, 7h und 24h (n=3). Die Wundfläche der MAZ-Gruppe (rot) ist im Vergleich zur Kontroll- (schwarz) bzw. Bevacizumab-Gruppe (grau) nach 24h nicht zugewachsen, demzufolge reduziert MAZ51 im Gegensatz zu Bevacizumab signifikant das Migrationsverhalten von gbECs. Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (**p<0,005).

Des Weiteren wird das Migrationsverhalten durch die extrazelluläre Inhibition mit blockierenden VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörpern nach 24h nicht beeinflusst. Die gbECs migrieren äquivalent zur Bevacizumab-Inkubation (Daten nicht aufgeführt). Demgemäß wirkt sich nur die VEGF-R3 Blockade mit MAZ51 reduzierend auf das Migrationsverhalten aus. Wohingegen blockierende VEGF-A, VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörper keinen Effekt auf die Migrationsaffinität darstellen.

4.3 VEGF-R3 Expression in Gliomzellen

4.3.1 VEGF-R3 wird nicht nur im GBM-Endothel exprimiert

Die Immunhistochemie von Gewebeschnitten aus humanem GBM-Gewebe (vergleichbar mit Abschnitt 4.1) zeigt ein stark positives Signal für VEGF-R3 hauptsächlich im intra-tumoralen Gefäßendothel (*Abb. 21* Bild A-D). In *Abbildung 21* ist die VEGF-R3 (Bild A und B) und CD31-Färbung (Bild C und D) von GBM-Gewebe gegenübergestellt. Hier ist zu erkennen, dass vornehmlich vaskuläre Areale ein positives VEGF-R3 Signal aufweisen. Vaskuläre Strukturen wurden mit Hilfe einer CD31-Färbung sichtbar gemacht. Dabei korreliert die Lokalisation der positiven VEGF-R3 Expression mit der CD31-Färbung.

Auffällig sind jedoch VEGF-R3 positive Zellen, die im Tumorparenchym abseits der Gefäße lokalisiert sind (*Abb. 22*, Bild C und D). Da der Fokus anfänglich den GBM-Endothelzellen galt, soll im Folgenden dargelegt werden ob und inwiefern VEGF-R3 eine Funktion in GBM-Tumorzellen besitzt.

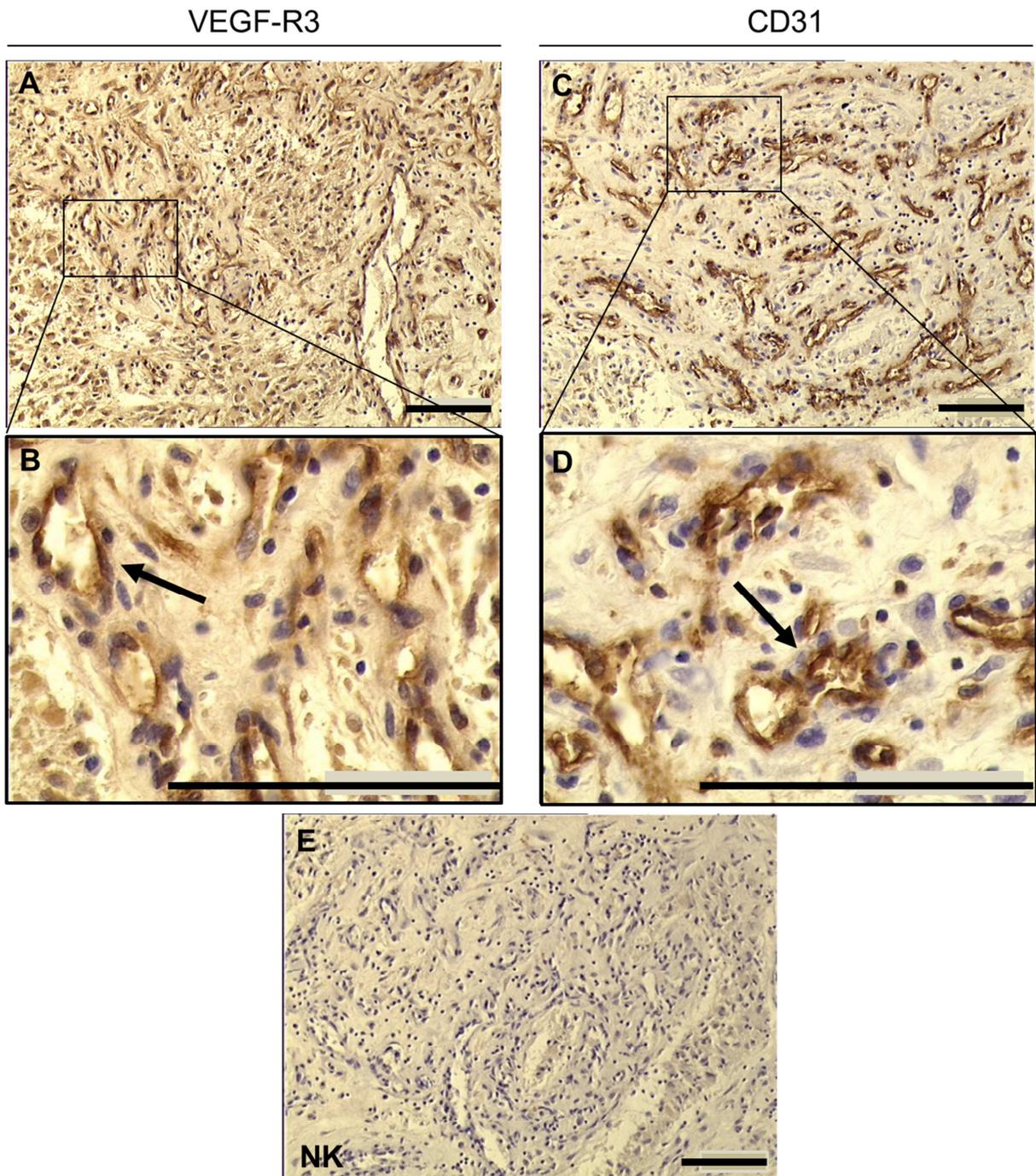
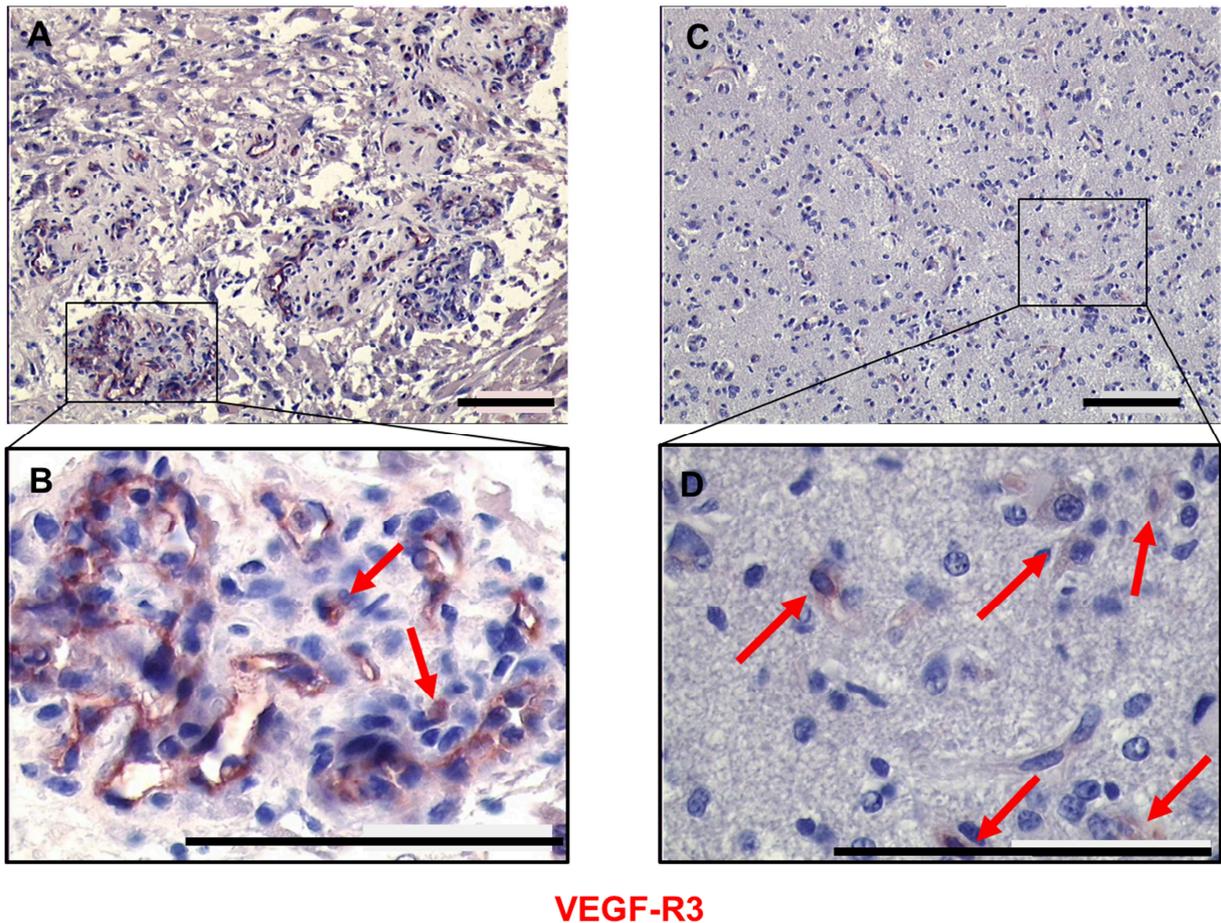


Abb. 21: Starke VEGF-R3- und CD31-Expression auf humanem GBM-Gewebe.

Dargestellt ist der immunhistochemische Nachweis mittels Diaminobenzidene-(DAB)-Färbung mit dem VEGF-R3 und CD31 Antikörper (braun) und die Negativkontrolle (NK). Bild A bis D: VEGF-R3- (links) und CD31-Expression (rechts) vor allem im Gefäßendothel (schwarzer Pfeil). Bild E: Negativkontrolle (NK) zeigt kein positives Signal. Zellkerne sind mit Hilfe von Hämalaun blau markiert. Der Maßstabsbalken entspricht immer 100µm.



VEGF-R3

Abb. 22: VEGF-R3 Expression im GBM-Gefäßendothel und -Tumorzellen seitab von Tumorgefäßen.

Immunhistochemische Aminoethylcarbazol-(AEC)-Färbung von VEGF-R3 (rot) in Gewebeschnitten von humanem GBM. Bild A und B: VEGF-R3-Expression insbesondere im Gefäßendothel und einigen Tumorzellen, die im Parenchym lokalisiert sind. Bild C und D: VEGF-R3 positive Tumorzellen (rote Pfeile), die sich außerhalb von Tumorgefäßen befinden. Zellkerne sind mittels Hämalaun blau markiert. Der Maßstabsbalken entspricht immer 100µm.

4.3.2 mRNA-Expression von VEGF-R2, -R3, -A, -C und -D in Gliomzellen

Um die Funktion von VEGF-R3 in Tumorzellen zu analysieren wurde zunächst die VEGF-R3 Expression in immortalisierten Gliomzelllinien hinsichtlich VEGF-R2, -R3, -A, -C und -D auf Genebene untersucht. *Abbildung 23* zeigt die hinreichend vorhandene mRNA-Expression von VEGF-R2, VEGF-R3, VEGF-A, VEGF-C und

VEGF-D in den Gliomzelllinien U87, U251 und U373. Es wurde die kurze (*short*) und lange Isoform (*long*) von VEGF-R3 untersucht. Dabei wird die kurze Isoform in U251 und U373 vernachlässigbar exprimiert und in U87 ist die Expression nicht nachweisbar.

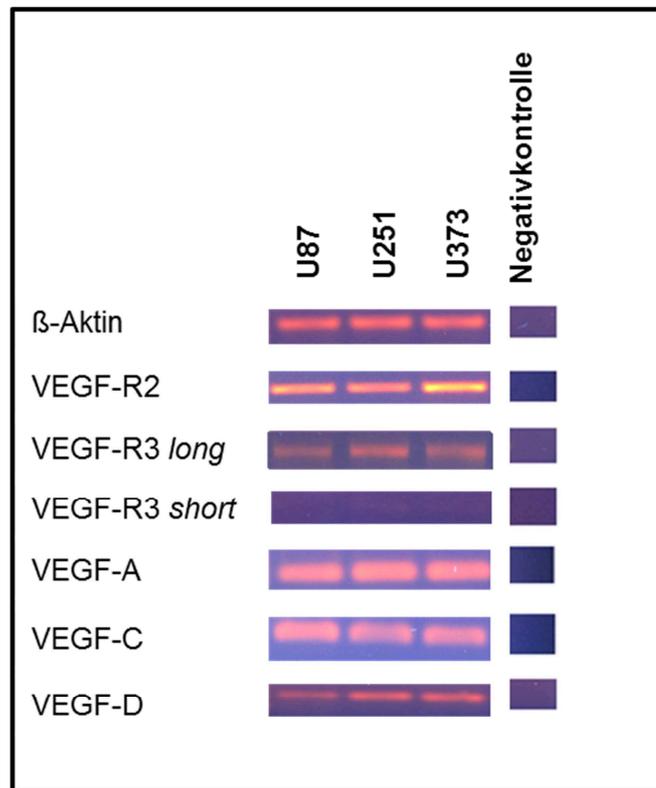


Abb. 23: Expression von VEGF-R2, VEGF-R3 (*short* und *long*) und deren Liganden VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D auf Genebene.

Veranschaulicht ist die m-RNA Expression, die durch eine semiquantitative PCR ermittelt wurde. Alle aufgeführten Gliomzelllinien U87, U251 und U373 exprimieren VEGF-R2 und VEGF-R3 und die korrespondierenden Liganden VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D. Die Genexpression der kurzen Isoform (*short*) von VEGF-R3 ist in U87 nicht nachweisbar und in U251 und U373 weitaus geringer vorhanden als die lange Isoform (VEGF-R3 *long*).

4.3.3 VEGF-R3 Expression auf Proteinebene in Gliomzelllinien

Darüber hinaus wurde die VEGF-R3 Expression auf Proteinebene in Gliomzelllinien untersucht. Abb. 24 zeigt den Nachweis von VEGF-R3 mit Hilfe von Immunocytochemie in den Gliomzelllinien U87, U251 und U373. Alle drei aufgeführten

Zelllinien weisen ein positives Signal für VEGF-R3 auf. Vergleichbar mit GBM-Endothelzellen erstreckt sich das Signal für VEGF-R3 auf der gesamten Zellmembran von Gliomzellen. Die entsprechenden Negativkontrollen zeigen keinerlei positives Signal. Alle Zellen sind nach unterschiedlichen Passagen hinsichtlich VEGF-R3 gefärbt und für die nachfolgenden Experimente verwendet worden.

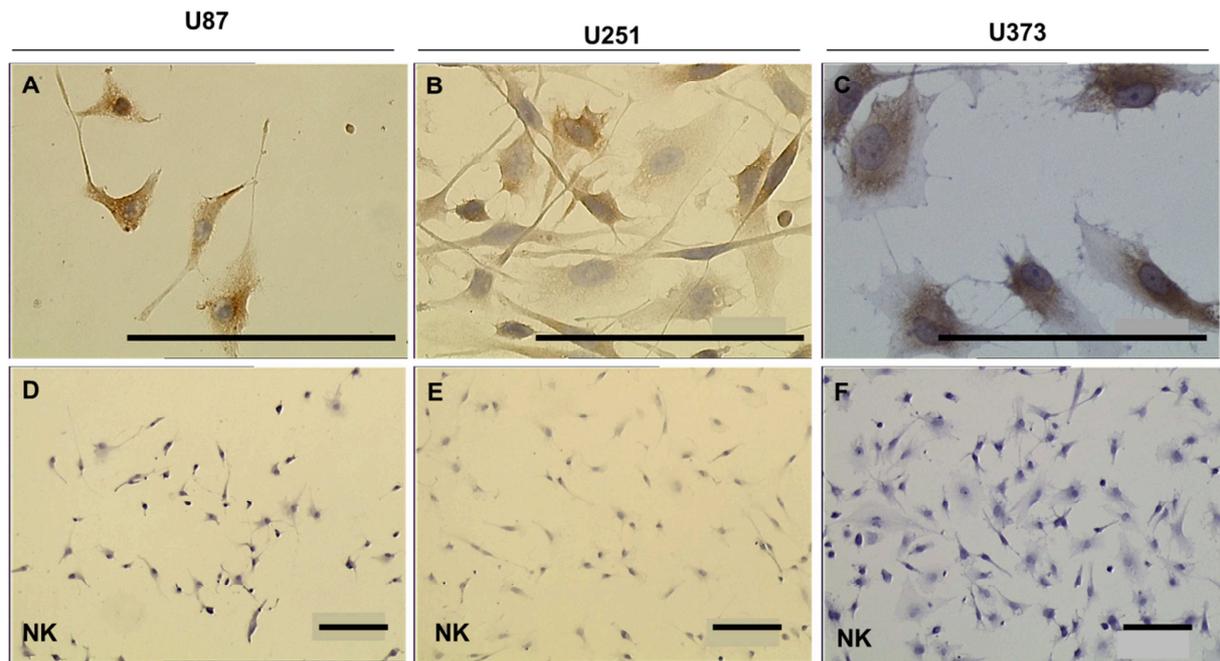


Abb. 24: VEGF-R3 Expression auf Proteinebene in Gliomzelllinien U87, U251 und U373.

Dargestellt ist die immunocytochemische Färbung mit dem VEGF-R3-Antikörper mittels DAB (braun) mit dazugehöriger Negativkontrolle (NK). Bild A bis C: VEGF-R3 Expression erstreckt sich über die gesamte Zellmembran der Gliomzellen U87 (A), U251 (B) und U373 (C). Bild E bis F: Die entsprechenden Negativkontrollen zeigen kein positives Signal. Die Zellkerne sind mit Hämalaun blau gefärbt. Der Maßstab balken entspricht immer 100µm.

4.3.4 VEGF-R3 Expression auf Proteinebene mittels Western Blot

Es existieren unterschiedliche Angaben hinsichtlich der detektierbaren Banden von VEGF-R3. VEGF-R3 ist prinzipiell auf einer Höhe von 195kDa und 170kDa sowie in zwei denaturierten Formen bei 125kDa und 70kDa nachweisbar. In den durchgeführten Western Blots ist die Bande von VEGF-R3 auf Höhe von 170kDa,

125kDa und 70kDa detektierbar. *Abb. 25* zeigt die vorhandene Expression von VEGF-R3 sowohl in Gliomzelllinien U87, U251 und U373 als auch in HUVEC, HBMEC und einem repräsentativen Fall von gbECs. VEGF-R3 konnte mit verschiedenen Antikörpern (s. Abschnitt 3.1.7) bei 170kDa, 125kDa und 70kDa identifiziert werden. Als Positivkontrolle diente ein rekombinantes VEGF-R3 Protein, hierfür ist die Bande bei 170kDa zu erkennen. Als Ladekontrolle für die eingesetzten 100µg/ml der Proben ist β -Aktin auf einer Höhe von 42kDa dargestellt.

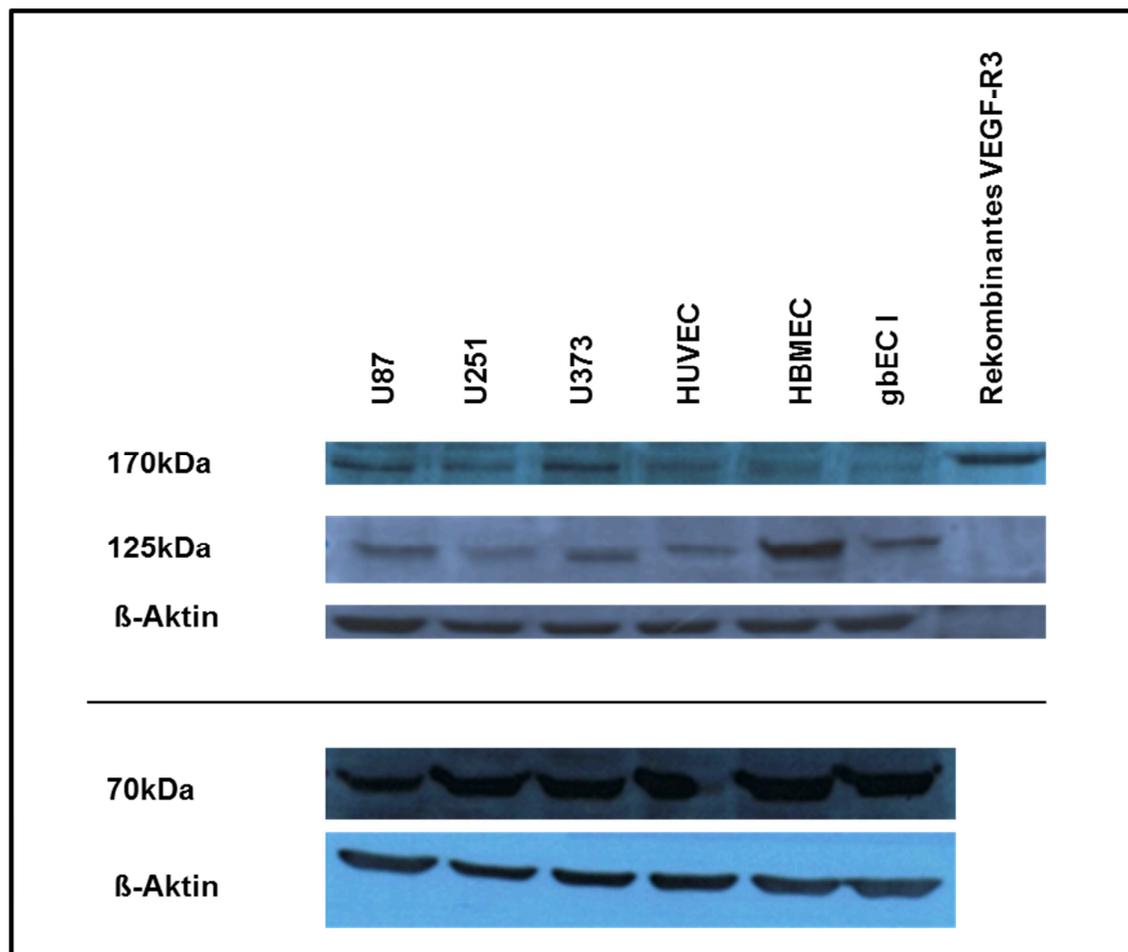


Abb. 25: VEGF-R3 Expression auf Proteinebene sowohl in Gliomzelllinien U87, U251 und U373 als auch in HUVECs, HBMECs und einem Fall von isolierten GBM-Endothelzellen.

Aufgeführt sind Western Blots mit unterschiedlichen VEGF-R3 Antikörpern. Abhängig vom Antikörper sind die Banden auf drei unterschiedlichen Höhen (170kDa, 125kDa und 70kDa) nachweisbar. Als Referenz diente ein rekombinantes VEGF-R3-Protein, dessen Bande bei einer Höhe von 170kDa zu sehen ist. Die Ladekontrolle der Proben erfolgte durch β -Aktin (42kDa). Belichtungszeit für VEGF-R3: 5min, für β -Aktin: 1min.

4.4 Überexpression von VEGF-R3

Für die weiteren Untersuchungen der VEGF-R3 Funktion in Gliomzellen wurde eine Transfektion durchgeführt um eine gleichmäßige VEGF-R3 Überexpression sicherzustellen. Die erfolgreich transfizierten U251-Zellen mittels Magnet assoziierter Transfektion wurden zunächst mit entsprechendem Antibiotikum versetztem Medium selektiert. Um schließlich eine Reinkultur zu erhalten, wurden diese Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie sortiert.

4.4.1 FACS-Sorting

Mittels Durchflusszytometrie (FACS) wurde eine erhöhte Transfektionseffizienz von VEGF-R3 erzielt. U251-Wildtypzellen (wt) dienten als Referenzzellen. Zudem wurden U251-Zellen mit einem Kontroll-eGFP-Plasmid transfiziert (Kontrollgruppe). Diese Kontrollgruppe und überexprimierende VEGF-R3 U251-Zellen (U251eGFP-R3) wurden im FACS sortiert, kultiviert und für die weiteren Experimente verwendet.

4.4.2 Stabile VEGF-R3 Überexpression

Um die bisher erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurden die Zellen nach Transfektion und FACS-Sorting nochmals mittels Fluoreszenz aktivierter Durchflusszytometrie hinsichtlich VEGF-R3 Expression analysiert. Die Analyse mit einem PE-gekoppelten VEGF-R3-Antikörper zeigt in *Abbildung 26* eine nachweisbare Überexpression von VEGF-R3 (U251eGFP-R3; Bild A und B rechts außen) im Vergleich zu U251wt-Zellen (Bild A und B links außen) und Kontrollgruppe (U251-eGFP; Bild A und B mittig). Verglichen mit U251wt-Zellen (*Abb. 26* Bild A links außen), die eine durchschnittliche PE-Fluoreszenzintensität von 35,6 aufweisen, ist eine durchschnittliche PE-Fluoreszenzintensität von 173 der transfizierten U251eGFP-R3-Zellen (*Abb.26* Bild A rechts außen) zu verzeichnen. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Kontrollgruppe (U251-eGFP; *Abb. 26* Bild A mittig) von 34,7 stimmt mit U251wt-Zellen überein. Darüber hinaus exprimieren 98% der VEGF-R3 überexprimierenden U251-Zellen VEGF-R3 (*Abb. 26* Bild B rechts außen). Der Dot-Plot in *Abbildung 26* (Bild C mittig und rechts außen) veranschaulicht die positiven Zellen für GFP- und PE-Signal und gibt die Transfektionseffizienz wieder. In der Kontrollgruppe (U251-eGFP; Bild C mittig) exprimieren 92,7% der Zellpopulation GFP. Daneben sind 71,3% der U251eGFP-R3-

Zellen (Abb. 26 Bild C rechts außen) positiv sowohl für GFP als auch für VEGF-R3 (PE).

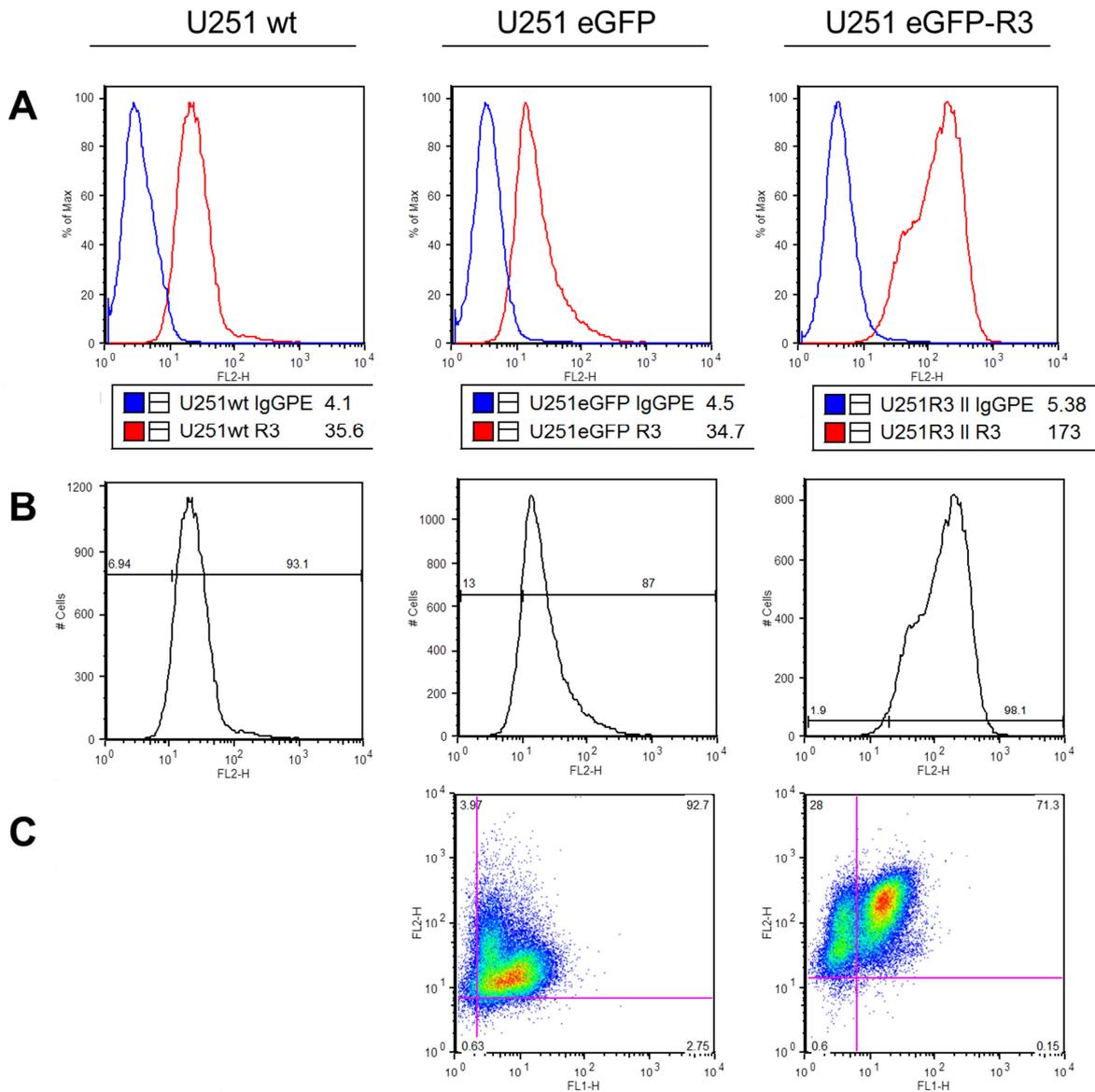


Abb. 26: VEGF-R3 Expression in U251-Wildtypzellen (U251wt) und transfizierten U251-Zellen mit Kontroll-eGFP- (U251eGFP) und eGFP-VEGF-R3-Plasmid (U251eGFP-R3).

Dargestellt ist eine Durchflusszytometrische Analyse. Es wurden jeweils 50 000 Zellen in der Durchflusszytometrie hinsichtlich VEGF-R3 (PE-gekoppelt, FL2) und GFP-Signal (FL1) untersucht. Bild A: durchschnittliche FL2-Fluoreszenzintensität des PE-Signals für VEGF-R3 (rot) von U251wt-, U251eGFP- und U251eGFP-R3-Zellen bezogen auf die IgG-Negativkontrolle (blau). Bild B: prozentuale Auswertung der VEGF-R3 Expression von

U251wt und U251eGFP (links außen und mittig) versus durch Transfektion erzielte VEGF-R3 Expression (U251eGFP-R3; rechts außen). Bild C: der Dot-Plot zeigt korrelierende prozentual positive Zellen für GFP- und PE-Signal von U251eGFP (mittig) und U251eGFP-R3 (rechts außen).

4.4.3 VEGF-R3 Überexpression führt zu Proliferationssteigerung

Erst die eindeutig bestimmten VEGF-R3 überexprimierenden U251-Zellen wurden für die folgenden Experimente eingesetzt. *Abbildung 27* veranschaulicht welchen Einfluss die durch Transfektion erzielte VEGF-R3-Überexpression auf die Generationsfolge von U251 Zellen besitzt. Nach 7 Tagen ist mit Hilfe der Zellzahlbestimmung eine signifikant erhöhte Viabilität von VEGF-R3 überexprimierenden Gliomzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar. VEGF-R3 trägt zur gesteigerten Proliferation von Gliomzellen bei. Diese Aussage kann anhand der VEGF-R3 Überexpression und der daraus resultierenden signifikanten Proliferationssteigerung in der Generationsfolge dargelegt werden.

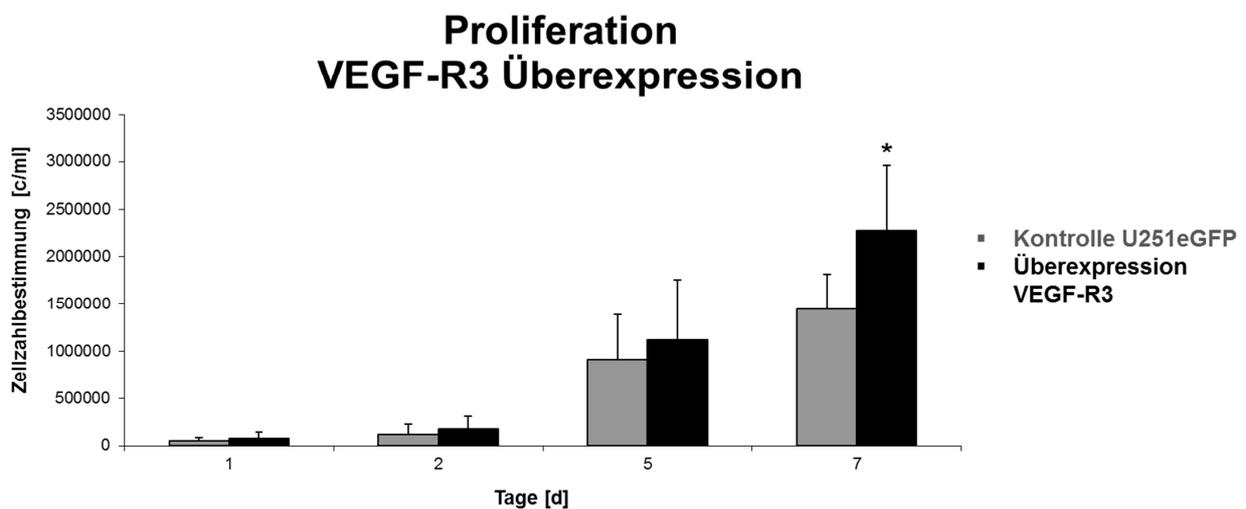


Abb. 27: Überexpression von VEGF-R3 in U251 Zellen führt zu einer signifikanten Viabilitätssteigerung.

Dargestellt ist die Quantifizierung der Proliferation nach Zellzählbestimmung mit Trypan-Blau nach vier Zeitpunkten (1, 2, 5 und 7 Tage; n=6). Die VEGF-R3 Überexpression

(schwarze Säule) führt zu einem signifikant erhöhten Proliferationsverhalten nach 7 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe (graue Säule). Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$).

4.4.4 VEGF-R3 Blockade mit MAZ51 reduziert wiederum die Gesamtzellmenge von Gliomzellen

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine Inkubation mit MAZ51 (7 μ M) und Bevacizumab (200 μ g/ml) die Zellmenge von Gliomzellen beeinflusst. Die Cytotoxizität wurde nach 72h mittels SRB-Assay bestimmt. Bevacizumab hat nach einer 72h-Inkubation keinen Effekt auf die Gliomzelllinien (Abb. 28 A-C). MAZ51 bewirkt eine starke Abnahme der vitalen Tumorzellen, so dass die Gesamtzellmenge von U87, U251 und U373 signifikant verringert ist. Ebenso ließ sich der reduzierende Effekt von MAZ51 für überexprimierende U251-Zellen nachweisen (Abb. 28 D).

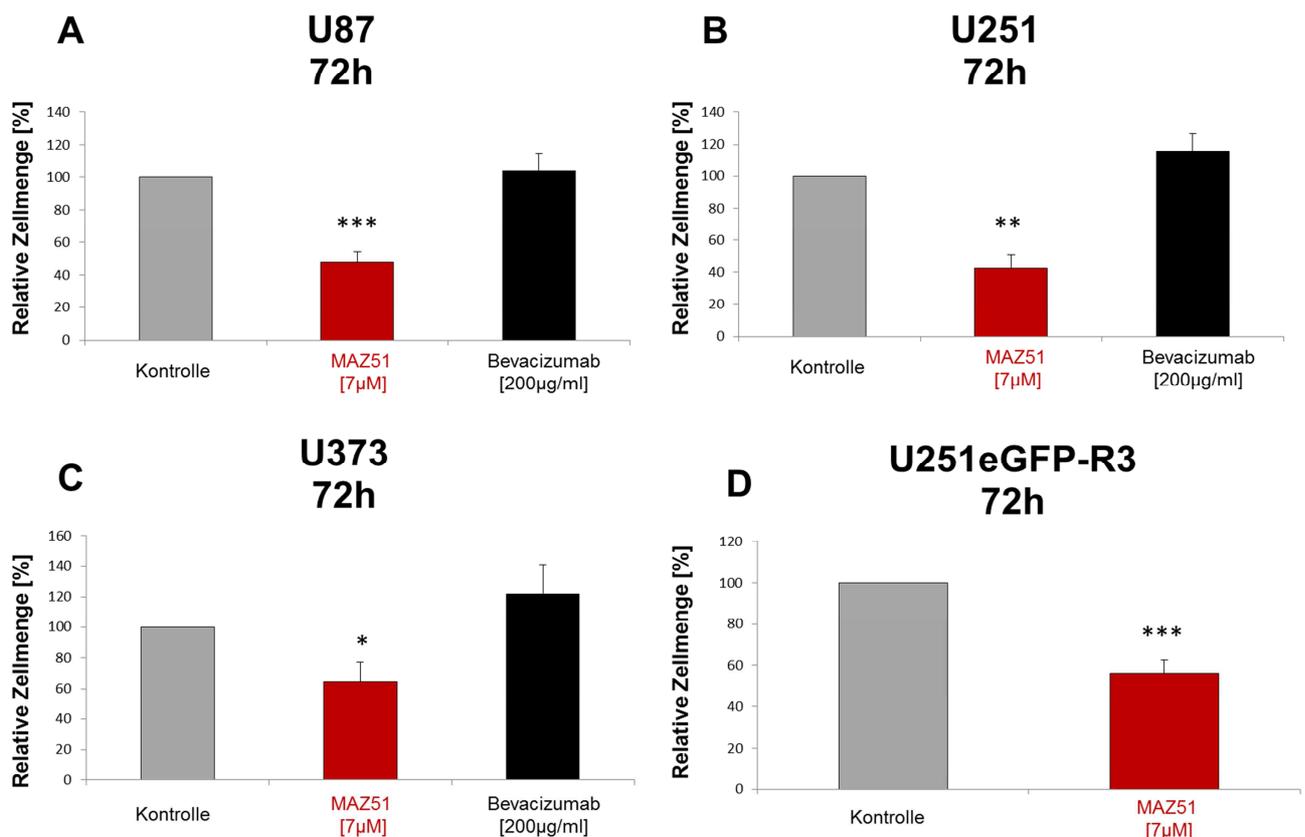


Abb. 28: Cytotoxischer Einfluss von MAZ51 und Bevacizumab auf Gliomzelllinien.

In Abbildung A, B und C wurden die Tumorzellen U87, U251 und U373 mit 7µM MAZ51 und 200µg/ml Bevacizumab für 72h inkubiert (n=4). MAZ51 weist in allen drei Gliomzelllinien eine signifikant verminderte Gesamtzellzahl auf. Abbildung D: überexprimierende VEGF-R3 U251-Zellen nach MAZ51-Inkubation mit signifikanter Reduktion der vitalen Zellen. Die Inkubation mit Bevacizumab zeigt in allen vier Fällen keinen reduzierenden Effekt. Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (**p<0,0005, **p<0,005, *p<0,05).

Zudem zeigt der SRB-Assay mit blockierenden VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörper keinen erkennbaren Einfluss auf die Lebendzellbestimmung von U87, U251 und U373. *Abbildung 29* veranschaulicht das Resultat der 72h-Inkubation mit blockierenden VEGF-R2, VEGF-R3 und die Kombination aus VEGF-R2/R3-Antikörper.

Blockierende VEGF-R2/-R3 Antikörper

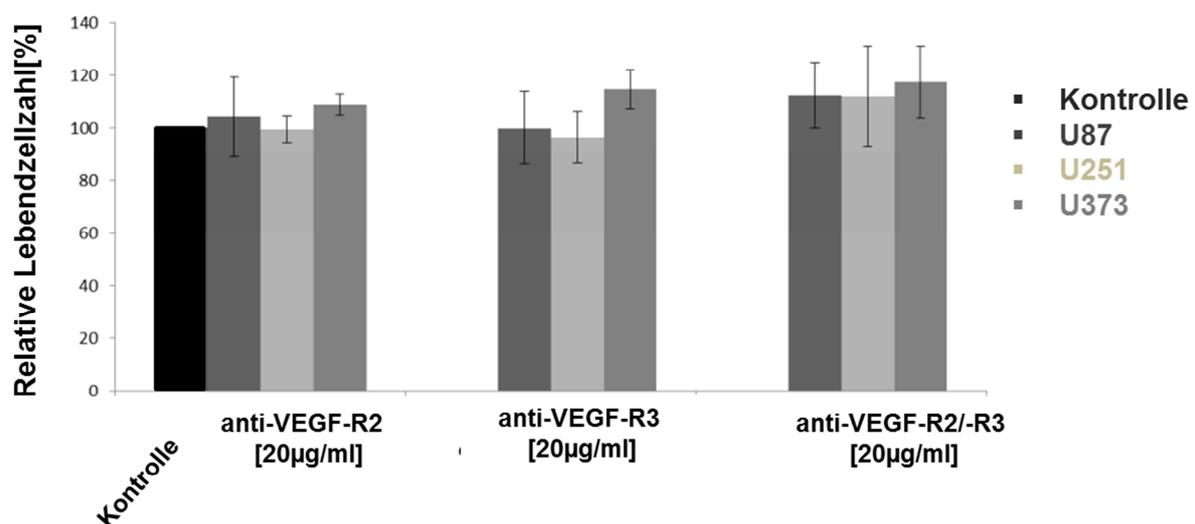


Abb. 29: Kein cytotoxischer Einfluss von blockierenden VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörpern auf Gliomzelllinien.

Die Tumorzellen U87, U251 und U373 wurden mit 20µg/ml anti-VEGF-R2, VEGF-R3 und kombinierte Gabe von VEGF-R2/-R3 für 72h inkubiert (n=4). Die Inkubation mit blockierenden Antikörpern (graue Säulen) bezogen auf Kontrollbedingungen (schwarze

Säule) zeigt keinen Effekt auf die Lebendzellzahl. Die Balken geben die Standardabweichung an.

Im Wesentlichen eignet sich VEGF-R3 als äußerst potentieller Angriffspunkt im GBM. Die VEGF-R3 Blockade mit MAZ51 zeigt einen signifikant reduzierenden Einfluss auf GBM-Endothelzellen (gbECs) und auf Gliomzellen. Die Überexpression von VEGF-R3 in Gliomzellen führt zu einer gesteigerten Viabilität. Umgekehrt hemmt die VEGF-R3 Blockade mit MAZ51 signifikant das Zellwachstum von Gliomzellen. Blockierende VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörper besitzen *in vitro* auf gbECs und Gliomzellen keinen Effekt. MAZ51 ist der Hemmung mit blockierenden VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörpern offensichtlich überlegen.

4.5 Einfluss von MAZ51, Bevacizumab und spezifischen VEGF-R2/-R3 Antikörpern auf die intrazelluläre Signalkaskade

Für jedes zu untersuchende Protein wurde jeweils der Gesamtanteil des entsprechenden Proteins und der aktivierte phosphorylierte Anteil sowie eine Ladekontrolle (β -Aktin) von U251-Zellen dargestellt. Folgende Proteine der Signalwege der Rezeptor-Tyrosinkinase VEGF-R3 wurden untersucht: Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) p38-MAPK und p42/44-MAPK (ERK1/ ERK2). Die Inkubation mit den Inhibitoren MAZ1, Bevacizumab und spezifischen VEGF-R2/-R3 Antikörpern erfolgte für 1h, um eine ausreichende Phosphorylierung nachweisen zu können. In *Abbildung 30* ist zu erkennen, dass der phosphorylierte Anteil der p38-MAP-Kinase in allen behandelten U251-Zellen im Vergleich zur Kontrolle vermindert ist, während der Gesamtanteil der p38-MAP-Kinase bei allen gleich ist. Der Gesamtanteil der p42/44-MAPK (ERK1/ERK2) ist im Falle der MAZ51-Inkubation größer als in der Kontrolle und den behandelten U251-Zellen. Jedoch ist der phosphorylierte Anteil der p42/44-MAPK (ERK1/ERK2) der mit MAZ51 behandelten U251 deutlich niedriger als in den restlichen, so dass insgesamt eine deutlich reduziertes Phosphorylierungs-Level der p42/44-MAPK in der MAZ51-Behandlung nachweisbar ist. Die Untersuchung des Akt- und MAPKAPK-2- Signalweges zeigt keinen Einfluss der Inhibitoren in U251-Zellen (Daten nicht aufgeführt).

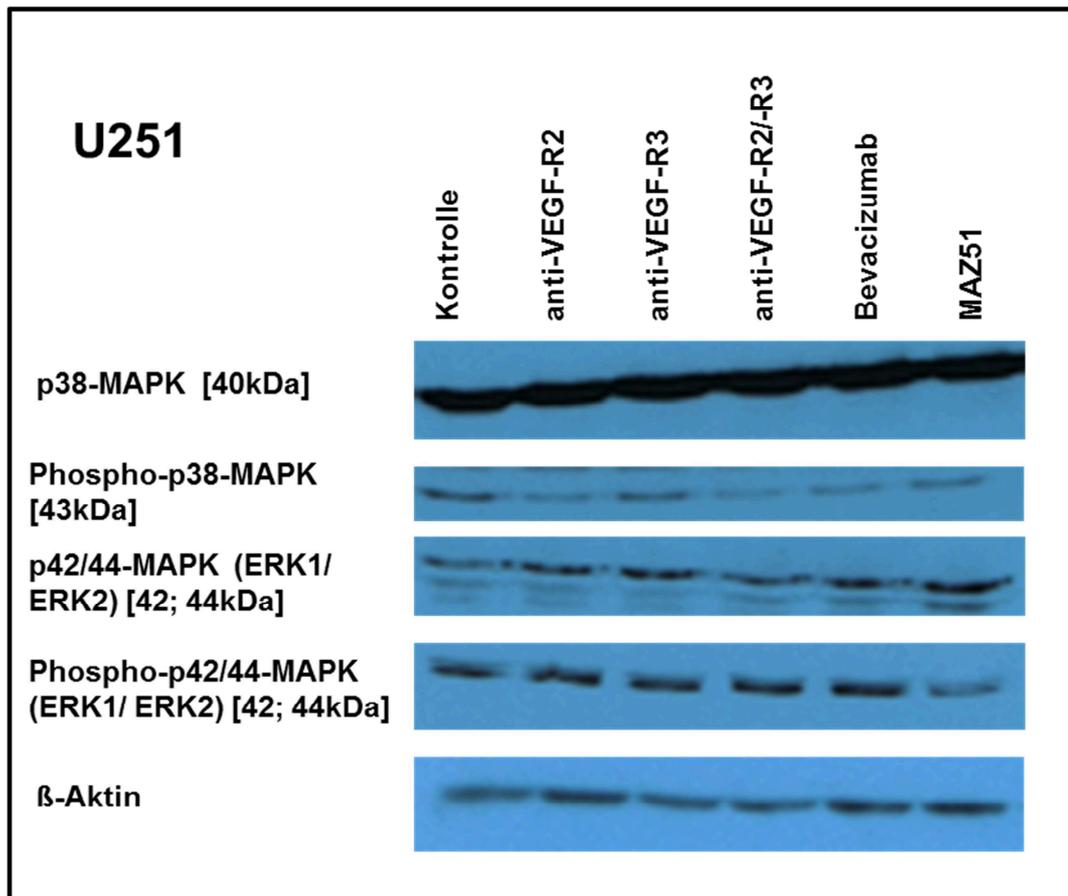


Abb. 30: Einfluss von MAZ, Bevacizumab und blockierenden VEGF-R2/-R3 Antikörpern auf die intrazelluläre Signalkaskade von U251 Gliomzellen.

Dargestellt sind Western Blots von p38-MAPK und p44/42-MAPK (ERK1/ERK2) (phosphorylierter Anteil und Gesamtprotein-Anteil) nach einer einstündigen Behandlung. Die Applikation der aufgeführten Inhibitoren reduziert den phosphorylierten Anteil von p38-MAPKinase im Vergleich zur Kontrolle in U251. Der Phospho-Status der p44/42-MAPKinase (ERK1/ERK2) wird nur durch die Addition von MAZ51 reduziert. Die Ladekontrolle ist dargestellt durch β -Aktin (42kDa). Belichtungszeit von p38-MAPK, p44/42-MAPK (ERK1/ERK2) und β -Aktin: 1min.

Die Blockade des VEGF-A/VEGF-R2 und VEGF-C/VEGF-R3 Signaltransduktionsweges mit blockierenden Antikörpern und MAZ51 zeigt eine inhibierte Phosphorylierung der p38-MAPKinase in U251 Zellen. Die p38-MAPKinase hängt demnach mit dem nachgeschalteten Signalweg von VEGF-R2 und VEGF-R3 zusammen. Des Weiteren ist durch die Zugabe von MAZ51 der phosphorylierte

Anteil von p42/44-MAPKinase (ERK1/ERK2) nachweisbar reduziert. Die Hemmung von VEGF-R3 mit blockierendem Antikörper hat wiederum keinen Einfluss auf die p42/44-MAPK-Phosphorylierung und würde einen möglichen ligandenunabhängigen Signaltransduktionsweg von VEGF-R3 darstellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *in vitro*-Untersuchungen mit MAZ51 und blockierenden VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörpern ein eindeutiges Ergebnis aufweisen. Die VEGF-R3 Blockade mit MAZ51 in GBM-Endothelzellen zeigt einen anti-angiogenen, cytotoxischen und Migrationshemmenden Einfluss. Im Falle der Gliomzellen kann ebenfalls ein cytotoxischer Effekt durch VEGF-R3 Blockade mittels MAZ51 verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu zeigen weder die VEGF-A-Blockade mit Bevacizumab noch die extrazelluläre Rezeptorblockade von VEGF-R2 und VEGF-R3 mit blockierenden Antikörpern einen vergleichbar reduzierenden Einfluss auf die untersuchten Kriterien.

4.6 MAZ51 reduziert *in vivo* das Tumolvolumen

Im Fokus dieser Arbeit stand letztlich, ob eine Blockade des extrazellulären VEGF-R2/-R3-Systems mit blockierenden Antikörpern und eine intrazelluläre Blockade des VEGF-R3 mittels MAZ51 sich auf das Tumolvolumen im Gliom-Mausmodell auswirken. Dadurch soll auch die Verträglichkeit und Wirksamkeit von MAZ51 im *in vivo*-Modell getestet werden. Nach orthotoper Inokulation von Mausgliomzellen (syngen) und einem Tumorstadium von 10 Tagen wurde C57/Bl6-Mäusen der VEGF-R3-Kinase Inhibitor MAZ51 (8 mg/kg) und die spezifischen murinen VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörper (alleinige und simultane Blockade, je 27,2mg/kg) über einen Zeitraum von 14 Tagen intraperitoneal injiziert. Der Einfluss der intrazellulären versus extrazelluläre Rezeptorblockade auf das Tumolvolumen wurde mittels HE-Färbung und anschließender Tumorflächenbestimmung analysiert und quantifiziert. Insgesamt lässt sich im Mausmodell beobachten, dass in Bezug zur Kontrollgruppe durch die Therapie mit MAZ51 eine signifikante Abnahme des Tumolvolumens verglichen mit der anti-VEGF-R2- und der kombinierten anti-VEGF-R2/-R3-Behandlung mit blockierenden Antikörpern nachweisbar ist (*Abb. 31*).

C57/Bl6 Tumorzvolumen

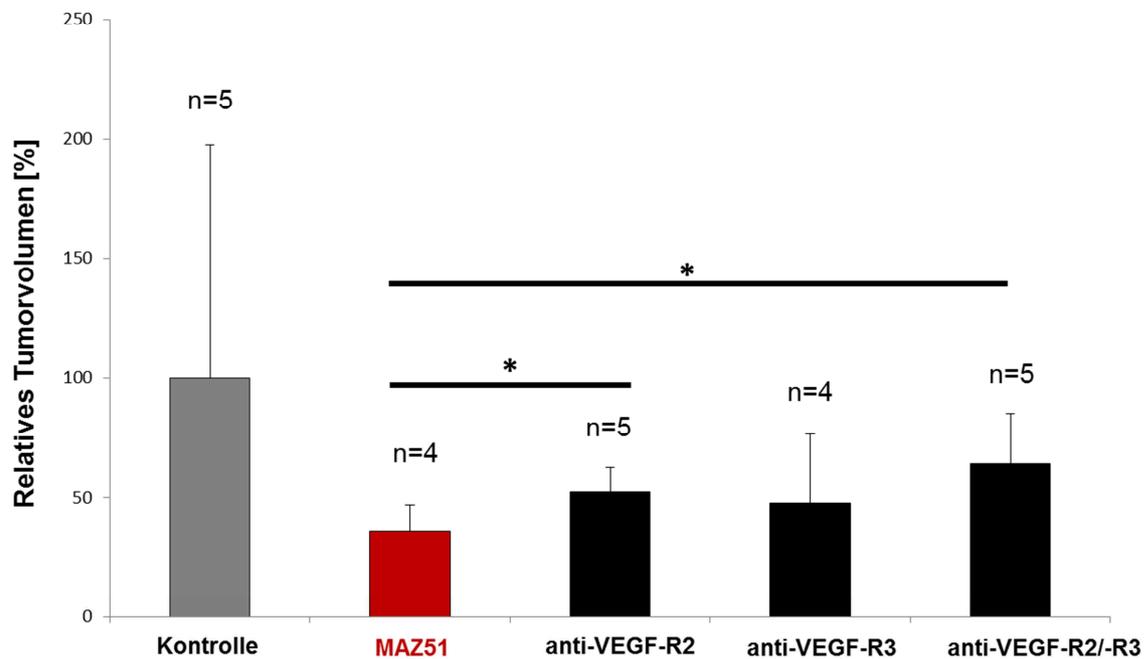


Abb. 31: Einfluss von MAZ51, blockierenden VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörpern im C57-Bl6-Mausmodell.

Die Behandlung mit MAZ51 (rote Säule) zeigt eine signifikante Reduktion im Vergleich zur anti-VEGF-R2 und der kombinierten Blockade von VEGF-R2 und VEGF-R3 (schwarze Säulen) mit blockierenden Antikörpern. Die anti-VEGF-R3 Blockade mit blockierendem Antikörper besitzt keinen signifikanten Effekt. Kontrollgruppe (graue Säule). Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$).

4.6.1 MAZ51 reduziert das Tumorzvolumen unter Einsatz von Brain Infusion Kits

Immunkompetente C57/Bl6-Mäuse erhielten 14d lang Infusionen von MAZ51 (100 μ M) oder DMSO-haltige Kontrolllösung über osmotische Minipumpen bzw. Brain Infusion Kits. Die Verwendung von osmotischen Minipumpen erspart den Tieren die belastende intraperitoneale Injektion der zu verabreichenden Substanz. Zusätzlich wird MAZ51 über das Brain Infusion Kit intracerebral lokal in den Tumor appliziert. Die Minipumpen wurden schließlich entfernt. Das Tumorzvolumen wurde wie schon

beschrieben über Tumorfläche und -höhe ermittelt und in Bezug zur Kontrolle quantifiziert. *Abbildung 32* demonstriert das signifikant reduzierte Tumolvolumen in Bezug zu den Kontrolltieren. Die MAZ51-Applikation über osmotische Minipumpen bzw. Brain Infusion Kits reduziert signifikant das Tumolvolumen in C57/Bl6-Mäusen und ist somit konform mit den erzielten Ergebnissen der i.p.-MAZ51-Applikation.

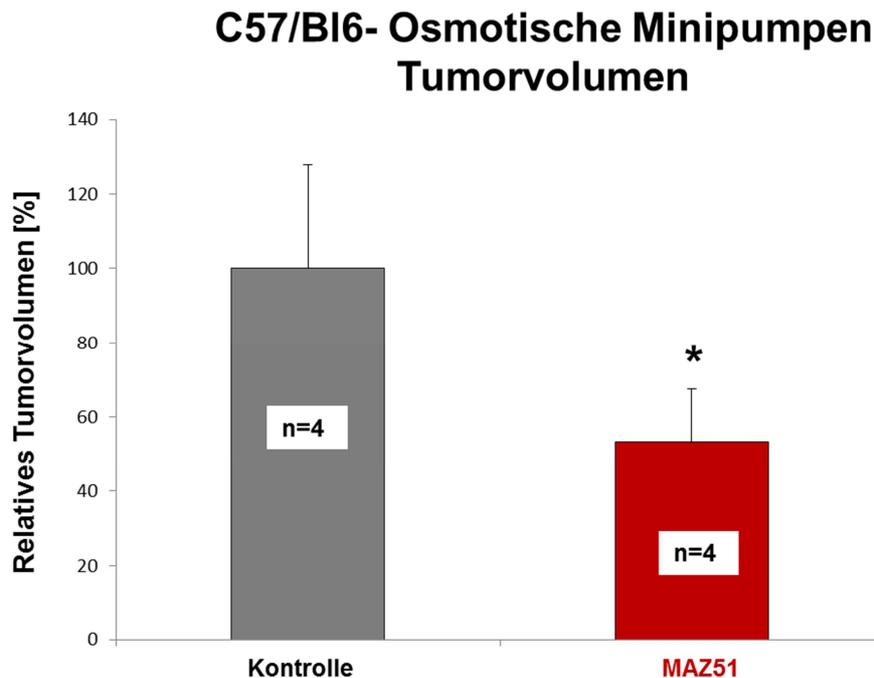


Abb. 32: MAZ51 reduziert signifikant das Tumolvolumen unter Verwendung von osmotischen Minipumpen im C57/Bl6-Mausmodell.

Die Behandlung mit MAZ51 (rote Säule) zeigt eine signifikante Tumolvolumenreduktion in Bezug zur Kontrollgruppe (graue Säule). Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$).

Alles in allem bekräftigen die tierexperimentellen Arbeiten im Mausgliom die Annahme, dass VEGF-R3 ein potentielles Target im malignen Gliom darstellt. Die Untersuchungen im Tiermodell zeigen, dass durch die Blockade von VEGF-R3 mit MAZ51, zumindest im Hinblick auf die Untersuchung des Tumolvolumens, ein anti-tumoraler und somit therapeutischer Effekt erzielt werden kann.

5 Diskussion

5.1 Anti-angiogene Therapie im GBM

Die Nährstoff- und Sauerstoff-Versorgung eines Gehirntumors, wie auch anderer Tumore ist jenseits eines Tumordurchmessers von etwa 1-2 mm allein durch Diffusion nicht mehr möglich [32]. Diese erste determinierte Grenze für die Tumorexpansion wird durch den „angiogenic switch“ (s. ab Kapitel 1.1.1) überwunden [40, 54]. Im Gegensatz zur Tumorangiogenese kann während der Embryonalentwicklung oder der Wundheilung das verschobene Ungleichgewicht von angiogenen Faktoren zu Gunsten der pro-angiogenen Proteine wieder auf ein physiologisches Maß zurück versetzt werden [13]. Nicht umsonst werden Tumore als „unheilbare Wunden“ beschrieben [18]. Die Antwort auf das Ungleichgewicht mit folgender Induktion der eigenen Blutversorgung im Tumor zieht drastische morphologische Veränderungen im Tumor Mikro-Milieu mit sich. Die verfügbare Sauerstoffversorgung ist bei wachsendem Tumor schnell erschöpft und führt zu hypoxischen Zuständen. Hypoxie bewirkt die Hochregulation von HIF-1 α , das die Mobilisierung von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und die vermehrte Produktion von VEGF-A auslöst [56, 193, 194], um durch Gefäßwachstum den Sauerstoffbedarf des Tumors auszugleichen. VEGF-A ist wohl der am besten untersuchte pro-angiogene vaskuläre Wachstumsfaktor und dient als der wichtigste Regulator der physiologischen und pathologischen Angiogenese (s. ab Kapitel 1.1) [195]. Die Expression von VEGF-A ist im GBM mehrfach höher als in niedriggradigen Gliomen und korreliert direkt mit der Tumor-Aggressivität [139, 155, 156]. Die Expression von VEGF-A und dessen spezifischer Rezeptor VEGF-R2 fördern durch einen parakrinen Effekt die Zellproliferation, Invasion, Migration und das Überleben von hochgradigen Gliomzellen [139, 196]. Auf Grund der charakteristischen Neoangiogenese im GBM (s. Kapitel 1.3) stellt die Blockade des VEGF-A/VEGF-R2 Signaltransduktionswegs ein Grundpfeiler der anti-angiogenen Therapie im GBM dar. Um die Gefäßneubildung durch VEGF-A in Tumoren zu hemmen wurde ein spezifischer monoklonaler Antikörper Bevacizumab entwickelt, der gegen menschliches VEGF-A gerichtet ist. Bevacizumab (Handelsname Avastin) bindet VEGF-A und verhindert so die Stimulation von VEGF-R2. So wird ein wichtiger Signaltransduktionsweg der Neoangiogenese im GBM und anderen Tumoren

inhibiert. Eine anti-angiogene Therapie mit Bevacizumab soll unter anderem Vorteile wie die Abnahme der mikrovaskulären Gefäßdichte, der Gefäßdurchmesser, von Perizyten, der interstitiellen Hypertension und die Normalisierung des irregulären Blutflusses besitzen [197, 198]. Viele Studien zeigen jedoch moderate Ergebnisse mit zahlreichen Nebenwirkungen, indem die VEGF-A Blockade durch Bevacizumab nicht nur tumor-assoziierte sondern auch gesunde Gefäße schädigt [199, 200]. Häufig auftretende Nebenwirkungen sind Hypertension, Proteinurie, schlechte Wundheilung und eine venöse und arterielle Thromboembolie [201]. Arterielle Hypertonie ist eine immer häufiger auftretende Nebenwirkung bei der Verwendung von Bevacizumab. Die Hemmung des VEGF-A Signalweg nimmt die Produktion von Stickstoffmonoxid, ein potenter Vasodilatator und fördert somit eine Vasokonstriktion. Darüber hinaus wird eine funktionelle Abnahme der Anzahl von Arteriolen und Kapillaren induziert. Zusammenfassend führen diese Effekte zu einer Zunahme des peripheren Gefäßwiderstands, was wiederum zu Hypertension führt [202].

Bevacizumab wurde durch die FDA als adjuvante Therapie für GBM-Rezidive zugelassen. Die Gefäßnormalisierung durch die anti-VEGF-A Therapie erschien als ein vielversprechender Therapieansatz um eine sensitivere Strahlentherapie und einen effizienteren Chemotherapeutika-Transport zu ermöglichen [26]. Basierend auf weiteren zwei Phase-II-Studien erteilte die FDA im Mai 2009 eine beschleunigte Zulassung von Bevacizumab als Mono-Therapie bei der Behandlung von wiederkehrendem GBM [203, 204]. Gegenwärtig wurden zwei große randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Phase-III-Studien (RTOG 9825 und AVAGLIO) zur Beurteilung der Wirksamkeit und des Sicherheitsprofils von Bevacizumab als Mono-Therapie und in Kombination mit Strahlen- und TMZ-Behandlung nach einer Operation oder Biopsie bei Patienten mit neu diagnostiziertem GBM durchgeführt. Das AVAGLIO-Ergebnis nach Mono-Therapie mit Bevacizumab war zwar positiv für ein längeres progressionfreies Überleben, mit anderen vielversprechenden Ergebnissen der sekundären Endpunkte wie Lebensqualität. Das mediane Überleben erreichte jedoch keine statistische Signifikanz [160]. Des Weiteren zeigte die RTOG 9825-Studie im Gegensatz dazu keine signifikanten Überlebensvorteile nach Bevacizumab Mono-Therapie [205]. Nachdem Bevacizumab eine größere Anwendung bei GBM-Patienten fand, wird deutlich, dass die Gabe dieser anti-angiogenen Therapie keinen signifikanten Beitrag zu einer Verbesserung der Überlebensrate führt.

Trotz der scheinbaren anfänglichen Erfolge bei der bildgebenden Diagnostik mussten die Patienten nahezu unverändert mittels chirurgischer Eingriffe gegen Rezidive behandelt werden. Grund für diesen anfänglichen Enthusiasmus kann darin liegen, dass VEGF-A Inhibitoren wie Bevacizumab die Permeabilität der Gefäße vermindern und die Blut-Hirn-Schranke (BHS) stabilisieren, was die Diagnose einer Tumorprogression mit Hilfe der Magnetresonanztomographie (MRT)-Bildgebung folglich erschwert [206]. Unter Verringerung der Kontrastmittel (Gadolinium)-Anreicherung im Tumorgewebe kann es zu einer Überschätzung der Therapieantwort führen, ein Phänomen, das als "Pseudoantwort" bekannt ist [207, 208]. Die BHS ist eine physiologische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und ZNS. Sie hält die Gefäßhomöostase im Gehirn aufrecht. Im Gliom ist die BHS nicht mehr voll funktionsfähig und passierbar für größere Moleküle [209]. Dieser Zusammenbruch der BHS ist ein wichtiger Bestandteil zur Diagnose von GBMs und dient gleichzeitig zur Tumorlokalisation im Gehirn. Bevacizumab vermindert zunächst die Gefäßneubildung, anschließend „normalisiert“ es die abnormalen Blutgefäße und verbessert somit die Funktion der Blut-Hirnschranke, so dass im MRT ein Therapiererfolg sichtbar scheint [210]. Ein weiterer Aspekt für das Scheitern der anti-VEGF-A Therapie liegt darin, dass der Tumor in relativ kurzer Zeit resistent gegenüber dieser Form von Behandlung wird.

5.2 Resistenzmechanismen nach anti-angiogener Therapie im GBM

Patienten, die zunächst auf anti-angiogene Behandlung reagieren, entwickeln fast zwangsläufig eine erneute Tumorprogression. Anti-angiogene Therapie erzielten anfänglich bei Gliomen in Tiermodellen und in ersten klinischen Studien eine Tumorregression und eine knappe Verlängerung des progressionsfreien Intervalls [203, 204, 206, 211]. Jedoch zeigen Therapien, die vornehmlich gegen das VEGF-A/VEGF-R2 System gerichtet sind, in zahlreichen Studien nach einer gewissen Behandlungsperiode einen Rückfall mit erneutem Angiogeneseschub [13, 212, 213]. Ferner gibt es auch Hinweise, dass die anti-VEGF-A Therapie fortgeschrittene Gliome zu einem invasiveren, weniger Angiogenese-abhängigen Phänotyp umwandeln [157, 212, 214]. In der Tat zeigte eine präklinische Mausgliom-Studie, dass eine gegen VEGF-R2 gerichtete anti-angiogene Therapie kleine Satellitentumoren in der Nähe des Haupttumors verursachte [215].

Zwei allgemeine Mechanismen der Resistenz nach anti-angiogener Therapie werden angenommen [162]. Einerseits die Anwesenheit einer intrinsischen oder bereits bestehenden Resistenz der Tumorzellen abhängig von der Behandlungsform, ihrer Progressionsstufe und ihrem Genotyp. Der zweite Mechanismus ist die adaptive Resistenz oder „Ausweichmodus“, indem der Tumor alternative pro-angiogene Wachstumsfaktoren freisetzt, die die Wirkung von VEGF-A ersetzen können [106, 210, 216-219]. Um der angiogenen Blockade ausweichen zu können, aktivieren Tumore alternative Wege zum Überleben und um das Tumorstadium aufrecht zu erhalten [162]. Es ist nicht vollständig geklärt, welche pro-angiogenen Faktoren für dieses resistente Verhalten ausschlaggebend sind. Das komplexe Netzwerk der Tumorangio-genese (s. Kapitel 1.1.1-1.1.3) kann jedenfalls nicht nur auf einen Faktor wie VEGF-A beschränkt werden um dem Tumorstadium Einhalt zu gebieten [47]. Die heterogene abnormale Neovaskularisierung und das Tumor-Mikro-Milieu beeinflussen gravierend die Antwort auf anti-angiogene Therapien [26, 47]. Die Identifikation und die Blockade möglicher Resistenzmechanismen oder alternativer pro-angiogener Faktoren im GBM würden die anti-angiogene Therapie bereichern, indem die Resistenz überwunden und neue Strategien zur Bekämpfung hochgradiger Gliome ermöglicht werden könnten.

5.3 VEGF-R3 als alternativer pro-angiogener Mechanismus

Obwohl viele anti-angiogene Substanzen hinsichtlich VEGF-A und VEGF-R2 gerichtet sind, werden nach anfänglichem Ansprechen der Therapie alternative molekulare Signalwege aktiviert [106]. Ein wesentlicher Kandidat für einen alternativen pro-angiogenen Faktor, der unter anderem das Fehlen von VEGF-A kompensiert, könnte VEGF-R3 sein. VEGF-R3 und seine Liganden VEGF-C und VEGF-D, von denen man zunächst annahm, dass diese nur in lymphatischen Gefäßen vorkämen (s. Kapitel 1.1.3), besitzen eine wichtige Funktion in der Angiogenese [97]. Ein Tiermodell mit Affen zeigte eine durch VEGF-A induzierte Gefäßneubildung in der Iris, dabei wurde simultan eine VEGF-R3 Expression in den aussprossenden Gefäßen beobachtet. Da die Iris kein lymphatisches System besitzt, wurde postuliert, dass VEGF-R3 neben VEGF-R2 die Angiogenese unterstützt [220]. Studien von Tammela et al. verweisen auf die tragende Rolle von VEGF-R3 während der Angiogenese [221]. Vermittelt durch die Blockade vom Notch-Signalweg wurde die VEGF-R3 Expression hochreguliert und auf endothelialen Tip-Zellen in

aussprossenden Gefäßen vermehrt exprimiert [71]. Laakkonen et al. zeigten, dass VEGF-C und VEGF-R3 eine wichtige Rolle in der Tumorangiose besitzen, indem einige Tumorsysteme auf die VEGF-R3 Blockade ansprechen [69, 222]. Die Inhibierung von VEGF-R3 konnte die Anzahl der Gefäßverzweigungen und die Sprossung von Endothelzellen während der Entwicklungsphase und in Tumoren reduzieren. Die Folge war eine verminderte vaskuläre Dichte. Außerdem konnte der VEGF-R3 Signalweg trotz VEGF-R2-Blockade ein gewisses Angiogenese-Level aufrechterhalten [221]. Darüber hinaus wurde von Su et al. gezeigt, dass VEGF-R3 auf Krebszellen exprimiert wird und die VEGF-R3 Blockade zu einem direkten anti-tumoralen Effekt führen kann [223]. Eine weitere Studie zeigte anhand der Ausschaltung der VEGF-A-Expression in einem Gliom-Tiermodell eine nicht vollständig inhibierte Angiogenese. Ein alternativer Signalweg durch VEGF-D wurde verstärkt exprimiert, der zu einem Tumorgefäßsystems mit gesteigerter Gefäßdichte und erhöhtem Blutfluss führte [197]. Des Weiteren konnte VEGF-C unter *in vitro*-Bedingungen die Funktion von VEGF-A während einer anti-VEGF-A Therapie ersetzen. Das VEGF-R3-System wurde als alternativer Signalweg vermutet, der bei VEGF-A Mangel im Medium die Apoptose von vaskulären und lymphatischen Endothelzellen verhinderte [224]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde VEGF-R3 als eventuell neues Target der anti-angiogenen Therapie diskutiert [222].

In Gliomen sind VEGF-R3 und dessen Liganden VEGF-C und VEGF-D ein bisher wenig erforschtes Thema. Das Fundament für die vorliegende Arbeit bilden jedoch Ergebnisse, die demonstrierten, dass sowohl die Liganden VEGF-C und VEGF-D als auch VEGF-R3 mit Hirntumoren in Verbindung gebracht werden können. Debinski et al. zeigte die Expression von VEGF-D in malignen Gliom-Zelllinien und Primärkulturen aus malignen Gliomen [225]. Des Weiteren zeigte die Ausschaltung der VEGF-A-Expression im Gliom-Tiermodell eine nicht vollständig inhibierte Angiogenese. Vielmehr wurde ein alternativer Signalweg durch VEGF-D verstärkt exprimiert [197]. VEGF-R3 und seine Liganden VEGF-C und VEGF-D konnten erstmals von Jenny et al. in verschiedenen Gliomtypen einschließlich GBM dargestellt werden [176]. Grau et al. bestätigten, dass VEGF-R3 mit seinen Liganden in Gliomen exprimiert werden. Diese Expression war nicht im nicht-neoplastischem Hirngewebe nachweisbar. Vielmehr korrelierte die VEGF-R3 Expression mit dem Malignitätsgrad. Die VEGF-R3 Expression war vor allem in den GBM-typischen glomeruloiden Gefäßproliferaten lokalisiert, die sich in der Nähe von nekrotischen

Arealen befinden, was auf eine Rolle in der Tumorangiogenese hinweist [146, 175]. Zudem wurde gezeigt, dass eine 14-tägige Bevacizumab-Behandlung zu einer Hochregulation der VEGF-C und VEGF-D m-RNA Expression in humanen Gliomzelllinien führte. Bevacizumab induzierte eine gesteigerte angiogene und proliferative Reaktion auf VEGF-C und VEGF-D in GBM-Endothelzellen [184].

VEGF-R3 stellt ein äußerst interessantes gliomspezifisches Target dar. Vor allem für die GBM-Therapie von großer Bedeutung, da VEGF-R3 nicht im „gesunden“ Hirngewebe aber in Endothelien von Glioblastomen exprimiert wird. Die Möglichkeit besteht, dass die Therapieresistenz gegen Bevacizumab durch den VEGF-C/-R3 Signaltransduktionsweg vermittelt werden kann. Demnach könnten GBM-Zellen pro-angiogene Mechanismen via VEGF-R3 besitzen. Die Erforschung des VEGF-R3/VEGF-C/VEGF-D-Transduktionswegs könnte zum besseren Verständnis der komplexen Zusammenhänge der GBM-Tumorangiogenese beitragen. Eine Untersuchung von GBM-Gewebe vor und nach anti-VEGF-A Therapie hinsichtlich VEGF-R3 würde einen weiteren Hinweis zu Klärung der VEGF-R3 Rolle im GBM geben. Deshalb wurde überprüft, ob die intratumorale VEGF-R3 und VEGF-C Expression bei Glioblastompatienten während einer Bevacizumab-Therapie erhalten bleibt.

5.3.1 VEGF-R3 Expressionsanalyse nach anti-VEGF-A Therapie mit Bevacizumab

Diese immunhistochemischen Studien in dieser Arbeit konnten nur an einer kleinen Kohorte Patienten durchgeführt werden (n=6), da bei Glioblastompatienten ein Rezidiv (Situation nach Bevacizumab-Therapie) nicht in jedem Fall resektiert wird. Die Gewinnung der post-therapeutischen Biopsien war hier also der limitierende Faktor. Es konnte schließlich zum ersten Mal die VEGF-R3 und VEGF-C Expression im direkten Vergleich der vor und nach Bevacizumab-Behandlung anhand von GBM-Patientengewebe gezeigt werden. Eine ausgeprägte Expression von VEGF-R3 und dessen Ligand VEGF-C war vor und nach anti-VEGF-A Therapie mit Bevacizumab nachweisbar. Die VEGF-R3 Expression zeigte sich hauptsächlich im tumor-assoziierten Gefäßendothel und auf einigen Zellen in perivaskulären Arealen. Die Expression von VEGF-C ist sowohl auf dem Gefäßendothel als auch auf Zellen, die im Tumorparenchym lokalisiert sind zu beobachten. Wie schon erwähnt konnte eine

14-tägige Bevacizumab Behandlung die VEGF-C mRNA Expression in zwei Gliomzelllinien hochregulieren [184]. Demzufolge wäre eine gesteigerte VEGF-C Protein-Expression im Tumorparenchym anzunehmen. Es war jedoch keine stärkere VEGF-C und VEGF-R3 Expression nach Bevacizumab-Therapie im GBM-Gewebe zu erkennen. Möglicherweise unterscheiden sich zum einen die *in vitro*-Kulturbedingungen vom Tumorgewebe. Zum anderen können komplexe biologische Prozesse, wie Transkription, translationale Regulation und Modifikationen die relativen Mengen von mRNA- und Proteinexpression in verschiedenen Graden beeinflussen [226], die zu keiner Korrelation zwischen VEGF-C Gen- und Proteinexpression im GBM-Gewebe führen könnten. Dennoch stellt die präsente VEGF-R3 Expression vor und insbesondere nach Bevacizumab-Therapie VEGF-R3 als ein alternatives zelluläres Target bzw. ein potentielles Zielprotein in der anti-angiogenen Therapie im GBM dar. Dabei stellt sich die Frage, ob die Blockade des VEGF-C/VEGF-R3 Signaltransduktionswegs oder die synergistische Blockade von VEGF-A/-R2 Signalweg und VEGF-R3 klinisch sinnvoll wäre. Im Einklang mit vorherigen Studien ist VEGF-C und VEGF-R3 hauptsächlich im tumor-assoziierten GBM-Gefäßendothel lokalisiert [175, 176]. Zur erweiterten Expressionsanalyse von VEGF-R3 dienten deshalb isolierte Endothelzellen aus primärem GBM-Gewebe (gbECs).

5.3.2 VEGF-R3 Expression in gbECs

Zunächst wurden gbECs auf mRNA-Ebene hinsichtlich VEGF-R2, VEGF-R3 und dessen Liganden VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D untersucht. Beim Menschen sind wie bereits erwähnt bisher zwei Isoformen von VEGF-R3 identifiziert worden, eine lange und eine kurze (*short*)- Isoform (s. Kapitel 1.1.3) [87]. Prinzipiell wird die lange VEGF-R3 (*long*)-Isoform exprimiert, jedoch konnte bspw. in Schilddrüsenerkrankungen die Expression der kurzen VEGF-R3 Isoform verstärkt nachgewiesen werden [90]. Beide VEGF-R3 Isoformen waren in der Positivkontrolle (HUVECs), in physiologischen mikrovaskulären Endothelzellen aus Normalhirngewebe (HBMECs) und fünf unabhängigen gbECs nachweisbar. Damit konnte zum ersten Mal die kurze Isoform von VEGF-R3 in isolierten GBM-Endothelzellen gezeigt werden. In den aufgeführten Zellen war die kurze Isoform im Vergleich zur langen Isoform geringer exprimiert. In gbECs zeigten dabei drei von fünf Fällen im Vergleich zu

physiologischen HBMECs eine stärkere Expression der kurzen VEGF-R3 Variante. Inwiefern die gesteigerte m-RNA Expression der kurzen VEGF-R3 Isoform mit dem Ursprung aus pathologischem Gewebe von gbECs zusammenhängt, bleibt jedoch unklar. Die VEGF-A und VEGF-C Expression ist in allen aufgeführten Zellen gleich stark exprimiert, wohingegen das VEGF-D Expressionslevel in zwei Fällen der gbECs vermindert ist. In einigen Studien wurde schon beobachtet, dass in verschiedenen Tumoren-Entitäten die VEGF-D m-RNA im Vergleich zum Normalgewebe geringer exprimiert war [69, 176]. Außerdem wurde die VEGF-R2 Expression untersucht. Dabei zeigen die HBMECs und ein Fall von fünf gbECs in den aufgeführten Zellen eine geringere VEGF-R2 Expression. HUVECs als Positivkontrolle zeigten die größte VEGF-R2 Expression. Das VEGF-A Expressionslevel war in den getesteten Zellen untereinander gleich. Die immunhistochemischen Färbungen von GBM-Gewebe zeigten bereits eine starke VEGF-R3 und VEGF-C Expression hauptsächlich im GBM-Gefäßendothel. Diese Beobachtung konnten die *in vitro*-Untersuchungen von isolierten GBM-Endothelzellen durch eine gut nachweisbare VEGF-R3 und VEGF-C Expression auf Genebene bestätigen.

Isolierte GBM-Endothelzellen und Gliomzelllinien wurden auch nach unterschiedlicher Bevacizumab-Behandlungsdauer hinsichtlich VEGF-R3, VEGF-C und VEGF-D Expression auf m-RNA Ebene untersucht. Bevacizumab erzielte jedoch keinen Einfluss auf die Genregulation von VEGF-R3 und dessen Liganden. Eine bereits erwähnte Studie zeigte zwar, dass die Behandlung mit Bevacizumab nach 14 Tagen eine Hochregulation von VEGF-C und VEGF-D m-RNA Expression in Gliomzelllinien bewirken konnte [184]. Jedoch lassen die Experimente in der vorliegenden Arbeit keine Aussagen über den Effekt von Bevacizumab auf die Regulation des VEGF-R3 Gens und dessen Liganden in Gliomzelllinien und gbECs zu. Grund für dieses Kontroverse könnte die Behandlungsdauer sein. In der hier vorliegenden Arbeit wurde nämlich unter anderem eine Inkubationszeit von maximal drei Tagen gewählt.

Des Weiteren wurden gbECs mit Hilfe von Immunocytochemie untersucht. VEGF-R3 konnte auf Proteinebene in zahlreichen gbECs nachgewiesen werden. Dabei war die VEGF-R3 Expression auf der gesamten Zellmembran verteilt. Dieses Ergebnis stimmt mit vorherigen Erkenntnissen überein. Die Immunocytofluoreszenz von

isolierten VEGF-R3/CD31-positiven Endothelzellen aus GBM-Gewebe zeigte eine positive Korrelation von CD31 und VEGF-R3 Expression [175]. Die Isolation in der vorliegenden Arbeit erfolgte ausschließlich durch die für Endothelzellen charakteristischen Marker CD31 und CD34. Um die Reinheit der Population nachzuweisen, wurden anschließend die gbECs hinsichtlich CD31, CD34, von-Willebrand-Faktor und VE-Cadherin überprüft. Die isolierten GBM-Endothelzellen zeigten daraufhin eine starke VEGF-R3 Expression in der Immunocytochemie.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass VEGF-R3 auf Grund positiver Expressionsanalysen nach anti-VEGF-A Therapie im GBM als alternativer pro-angiogener Faktor in Frage kommt. Die starke VEGF-R3 Expression sowohl auf Gen- als auch Proteinebene in isolierten GBM-Endothelzellen bekräftigt die Beobachtung, dass VEGF-R3 exprimierende Zellen im GBM-Gefäßendothel vorhanden sind. Die ausgeprägte VEGF-R3 Expression auf Gen- und Proteinebene in gbECs ist ein weiteres Indiz dafür, dass der VEGF-C/VEGF-R3 Signaltransduktionsweg ein vielversprechendes Target und einen potentiellen Angriffspunkt in der anti-angiogenen Therapie im GBM darstellen könnte. Basierend darauf galt es als nächstes den VEGF-C/VEGF-R3 Signaltransduktionsweg effizient zu hemmen und mit der VEGF-A/-R2-Blockade zu vergleichen. Hierfür wurden spezifische Inhibitoren der Rezeptoren zum Einsatz gebracht.

5.4 VEGF-R3 Blockade

Um insbesondere VEGF-R3 gezielt und effektiv hemmen zu können bietet die Inhibition der Tyrosin-Kinasen (TKIs, s. Kapitel 1.3.1) eine vielversprechende Möglichkeit. Hierfür wurde das Indol MAZ51 eingesetzt. MAZ51 kann die Zellmembran problemlos passieren und die Liganden induzierte Phosphorylierung von VEGF-R3 mit einer geringen MAZ51-Konzentration stark inhibieren. Die Spezifität kann jedoch konzentrationsabhängig variieren. Bei höherer *in vitro*-Konzentration (~50µM) können weitere VEGF-Rezeptoren wie VEGF-R2 gehemmt werden [192]. Die Blockade von VEGF-R3 mit MAZ51 zeigte eine inhibierende Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Mammakarzinom [124]. Zusätzlich wurde in mehreren Arbeiten mit Hilfe von MAZ51 der autokrine Loop von VEGF-C und VEGF-R3 nachgewiesen [227-230]. Schließlich konnten Benedito et al. durch MAZ51 die Bedeutung von ligandenunabhängiger Aktivierung bzw. Autophosphorylierung

des VEGF-R3 zeigen. Die spezifische Blockade der VEGF-R3-Kinase mit MAZ51 hemmte die VEGF-C-induzierte und -unabhängige VEGF-R3 Phosphorylierung in kultivierten Endothelzellen. Im Gegensatz dazu zeigte der Einsatz eines blockierenden VEGF-R3 Antikörpers (mF4-31C1) keine vollständige Inhibierung der VEGF-R3 Phosphorylierung [231]. In der vorliegenden Arbeit wurde MAZ51 für die Blockade von VEGF-R3 eingesetzt um Liganden induzierte Rezeptor-Aktivierung einschließlich ligandenunabhängige Autophosphorylierungen ausschließen zu können. Zudem kamen spezifische VEGF-R2 und VEGF-R3 blockierende Antikörper und Bevacizumab für die VEGF-A Blockade zum Einsatz.

5.4.1 Einfluss der VEGF-R3 Blockade auf die *in vitro*-Angiogenese

Mittels *in vitro*-Angiogenese Assays wurde zunächst untersucht, ob die VEGF-R3 Blockade mittels MAZ51 und die anti-VEGF-A Hemmung durch Bevacizumab einen anti-angiogenen Effekt in gbECs besitzt. Gleichzeitig wurde die alleinige und simultane Blockade von VEGF-R2 und VEGF-R3 mit blockierenden Antikörpern untersucht. Für die Beurteilung der *in vitro*-Angiogenese anhand des Tube Formation Assay wurden drei Kriterien herangezogen. Kriterien wie durchschnittliche Länge von gefäßähnlichen Strukturen (Tubes), die Summe der Tubes und die durchschnittliche Anzahl der Verzweigungspunkte innerhalb des Netzwerks wurden bestimmt. Dabei wandern Endothelzellen in das Matrigel ein und bilden tubuläre verzweigte Strukturen zu einem Netzwerk. Die Häufigkeit dieser Strukturen stellt ein Maß für die stattgefundene Angiogenese dar [232]. Zunächst wurde durch blockierende Antikörper, die gegen VEGF-A (Bevacizumab), VEGF-R2 und VEGF-R3 gerichtet sind, auf physiologischen Zellen (HUVECs) hinsichtlich der oben genannten drei Kriterien untersucht. Durch die Blockade von VEGF-A, VEGF-R2 und VEGF-R3 mit blockierenden Antikörpern wurde ein anti-angiogener Effekt in HUVECs erzielt. Dabei wurden alle drei untersuchten Kriterien (durchschnittliche Länge von gefäßähnlichen Tubes, die Summe der Tubes und die durchschnittliche Anzahl der Verzweigungspunkte) signifikant reduziert. Dieses Ergebnis war konform mit bisherigen Studien und demonstriert die Validität des Assays [112, 191]. Interessanterweise blieb dieser anti-angiogene Effekt im Falle der Endothelzellen aus pathologischem Gewebe (gbECs) fast vollständig aus. In zwei Fällen von fünf gbECs ließ sich durch die extrazelluläre Hemmung mit blockierenden Antikörpern ein signifikant reduzierender Effekt erzielen. In gbEC II konnte durch Bevacizumab sowie durch kombinierte Blockade von VEGF-R2/-R3 mit blockierenden Antikörper eine

signifikante Abnahme der Verzweigungspunkte und durchschnittlichen Gesamtlänge der Tubes gezeigt werden. In gbEC IV wurden durch die simultane VEGF-R2/-R3 Hemmung mit blockierenden Antikörpern die Verzweigungspunkte und durchschnittliche Gesamtlänge der Tubes signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu wurde mit MAZ51 die *in vitro*-Gefäßformation von physiologischen Endothelzellen (HUVECs) nicht gehemmt. Wohingegen in vier von fünf gbEC-Fällen (gbEC I-IV) durch die intrazelluläre Blockade von VEGF-R3 mit MAZ51 ein statistisch signifikanter anti-angiogener Effekt auf die allgemeine Gefäßformation von gbECs erzielt wurde. Es wurde insbesondere die Gesamtzahl der Verzweigungspunkte und die durchschnittliche Gesamtlänge der gefäßähnlichen Strukturen durch MAZ51 signifikant reduziert, was zu einer fast vollständigen Auflösung des Netzwerkes führte. Nur ein Fall (gbEC V) von fünf war resistent gegenüber der intrazellulären VEGF-R3 Blockade mit MAZ51.

Folglich besitzt der VEGF-R3 eine pro-angiogene Rolle im GBM. Durch Hemmung von VEGF-R3 in GBM-Endothelzellen ließ sich die Fähigkeit gefäßähnliche Strukturen zu bilden in vier von fünf Fällen signifikant reduzieren. Die intrazelluläre Blockade durch das zellpermeable Molekül MAZ51 war der extrazellulären Blockade durch blockierende VEGF-A, VEGF-R2 oder VEGF-R3 Antikörper überlegen. Bevacizumab und die kombinierte Blockade von VEGF-R2 und VEGF-R3 mit blockierenden Antikörpern erzielte nur in einem Fall (gbEC II) ein vergleichbares signifikantes Ergebnis. Der beschriebene synergistische Effekt einer kombinierten Blockade von VEGF-R2 und VEGF-R3, der zu vermindertem Gefäßwachstum führte [233], konnte nur in einem Fall von fünf gbECs bestätigt werden. Interessanterweise hatte MAZ51 einen signifikant reduzierenden Effekt auf Endothelzellen aus pathologischem Gewebe, wohingegen physiologische Zellen keinen anti-angiogenen Effekt durch MAZ51 aufweisen. Um diesen Sachverhalt weiter zu analysieren, wurde das cytotoxische Wirkprofil von MAZ51 in physiologischen Zellen und gbECs analysiert.

5.4.2 Cytotoxischer Einfluss der VEGF-R3 Blockade mit MAZ51

MAZ51 zeigte mit der anti-angiogen wirksamen Konzentration von 7 μ M nach 24h keine cytotoxische Wirkung auf gbECs. Somit sind die Ergebnisse der beiden Experimente (TFA und SRB) unabhängig voneinander. Der anti-angiogene Effekt in

gbECs lässt sich nicht auf die cytotoxische Wirkung von MAZ51 zurückführen. Da erst nach 72h ein signifikant verminderter Effekt der Gesamtzellmenge von gbECs nachweisbar war. Im Gegensatz dazu zeigten HUVECs keinen signifikanten Effekt auf die lebende Gesamtzellmenge selbst nach dreitägiger MAZ51-Behandlung. Zudem wurde die anti-VEGF-A Blockade mit Bevacizumab zum Vergleich herangezogen. Diese erzielte weder in HUVECs noch in gbECs einen cytotoxischen Einfluss auf die Gesamtzellmenge. Der Einsatz von VEGF-R2 und VEGF-R3 blockierenden Antikörpern erzielte ebenso keinen cytotoxischen Einfluss auf mehrere gbECs.

Die intrazelluläre Blockade von VEGF-R3 mit MAZ51 in gbECs erzielte einen anti-angiogenen Effekt nach 24h und eine Cytotoxizität nach 72h-Inkubation. Im Gegensatz zu isolierten GBM-Endothelzellen war weder ein signifikant anti-angiogener noch cytotoxischer Effekt in physiologischen HUVECs zu erkennen. Das therapeutische Nutzen von MAZ51 wird dadurch bekräftigt. Da nur Endothelzellen aus pathologischem Gewebe durch die MAZ51-Behandlung in ihrer angiogenen Fähigkeit und Gesamtzellmenge angegriffen und folglich reduziert wurden.

5.4.3 Einfluss der VEGF-R3 Blockade auf das Migrationsverhalten von gbECs

Einige Studien zeigten, dass die Hemmung der VEGF-A-abhängigen Neovaskularisierung im GBM zu einem invasiven Tumor-Phänotyp führte. In einem orthotopen GBM-Modell führte der genetische Knock-out von pro-angiogenen Faktoren wie HIF-1 α zu migrationsfähigeren Tumorzellen. Entlang der perivaskulären Bereiche von normalen Blutgefäßen migrierten die Tumorzellen tief in das Hirnparenchym. Dieses Erscheinungsbild wurde auch als perivaskuläre Tumorerkrankung bezeichnet [234]. Die anti-VEGF-A Therapie zeichnete ein aggressives und infiltratives Muster ohne Anzeichen der Angiogenese [235]. In einem GBM-Xenograft-Modell verursachte die anti-VEGF-A Therapie eine metabolische Veränderung im Tumor hinsichtlich Glykolyse zusammen mit der Induktion von HIF-1 α . Was wiederum zu einer verbesserten Zellinvasion in das Normalhirngewebe führte [236]. Dieses Erscheinungsbild deutet ein Resistenzmechanismus im GBM an, der durch Inhibition des relevanten pro-angiogenen Faktors VEGF-A alternative pro-angiogene Faktoren aktiviert. Diese führen zu einem pro-migratorischen Einfluss. Ob VEGF-R3 als pro-angiogener Faktor hinsichtlich Migrationsaffinität im GBM in Frage kommt wurde anhand gbECs und

VEGF-R3 Inhibition mit Hilfe eines Wound Healing Assay überprüft. Die VEGF-R3 Blockade mit MAZ51 konnte die Migration von gbECs signifikant reduzieren. Im Gegensatz dazu bewirkte die Inhibierung von VEGF-A mit Bevacizumab und von VEGF-R2 sowie VEGF-R3 mit blockierenden Antikörpern keinen reduzierenden Effekt auf die Migrationsfähigkeit von gbECs. Die Fähigkeit zu migrieren war unter extrazellulärer Blockade mit blockierenden Antikörpern vergleichbar mit der Kontrollgruppe bzw. -bedingungen. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass VEGF-R3 am Migrationsverhalten von GBM-Endothelzellen involviert ist, das durch die intrazelluläre Blockade von VEGF-R3 mit MAZ51 dargestellt werden konnte. Der Versuchs-Endpunkt des Wound Healing Assay und der bereits beschriebenen Lebendzellbestimmung wurde nach 24h festgehalten. Laut Lebendzellbestimmung bewirkte MAZ51 nach 24h keinen signifikant cytotoxischen Effekt auf gbECs. Demzufolge konnte das signifikant verlangsamte Migrationsverhalten nicht durch eine verminderte Anzahl vitaler Zellen verursacht werden. Die intrazelluläre Blockade von VEGF-R3 mit MAZ51 könnte dementsprechend die Mobilität von Tumorendothelzellen im GBM effektiv einschränken.

5.5 VEGF-R3 Expression in Gliomzellen

Bisher beschränkte sich die VEGF-R3 Forschung in Gliomen vor allem auf das Gefäßendothel. Vorherige Forschungsergebnisse einschließlich dieser vorliegenden Arbeit verwiesen insbesondere auf die VEGF-R3 Expression im GBM-Gefäßendothel. Es wurden zwar VEGF-R3 positive Zellen in perivaskulären Arealen und im Tumorparenchym abseits von Tumorgefäßen erwähnt [175], jedoch galt der Fokus derweil den GBM-Endothelzellen. Weitere durchgeführte immunhistochemische Färbungen konnten die bisher erzielten Beobachtungen bestätigen. Vermehrte VEGF-R3 positive Tumorzellen konnten außerhalb von vaskulären GBM-Bereichen lokalisiert werden. Schließlich stellte sich die Frage ob und welche Rolle VEGF-R3 in Tumorzellen zugeteilt werden könnte.

Für die weiteren Untersuchungen wurden immortalisierte Gliomzelllinien U87, U251 und U373 verwendet. Es wurde wie bei den gbECs die VEGF-R2, VEGF-R3 und deren Liganden VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D Expression analysiert. Beide VEGF-R3 Isoformen wurden in den genannten Gliomzelllinien untersucht. Dabei war die lange VEGF-R3 Isoform in allen drei aufgeführten Zelllinien vergleichbar stark

exprimiert. Die kurze VEGF-R3 Variante liegt unter der Nachweisgrenze. Das VEGF-R2 Expressionslevel war innerhalb der untersuchten Gliomzelllinien ungefähr vergleichbar. Nur in U373 war die VEGF-R2 Expression etwas stärker vorhanden. Die Expression der Liganden VEGF-A und VEGF-C zeigte in allen Gliomzellen ein vergleichbares starkes Signal. Die VEGF-D m-RNA Expression war in U87, U251 und U373 untereinander gleich stark nachweisbar. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal die VEGF-R3 Expression in Gliomzelllinien auf Genebene gezeigt werden.

Die VEGF-R3 Proteinexpression konnte anschließend mittels Immunocytochemie gezeigt werden. Für alle drei genannten Gliomzelllinien war VEGF-R3 vergleichbar mit gbECs. Zum einen korrelierte die VEGF-R3 Lokalisation, indem das VEGF-R3 Signal auf der gesamten Zellmembran verteilt war. Zum anderen korrelierte die VEGF-R3 Signalstärke bzw. Expression von Gliomzelllinien und gbECs

Zum weiteren VEGF-R3 Nachweis auf Proteinebene wurden Western Blots durchgeführt. Die prozessierten VEGF-R3 Banden konnten mit Hilfe unterschiedlicher Antikörper auf unterschiedlichen Höhen detektiert werden. Die VEGF-R3 Proteinexpression konnte anhand eines Western Blots für alle drei Gliomzelllinien (U87, U251 und U373) sowie eine repräsentative gbEC gezeigt werden. Detektierbare VEGF-R3 Expression konnte auch für HUVECs und HBMECs nachgewiesen werden.

Demzufolge ist VEGF-R3 nicht nur auf gbECs sondern auch Gliomzellen auf Gen- und Proteinebene exprimiert. Die starke VEGF-R3 Expression auf beiden Zelltypen stellt VEGF-R3 als aussichtsreiches therapeutisches Zielprotein für eine anti-angiogene Therapie im malignen Gliom dar. Eine zielgerichtete VEGF-R3 Blockade würde sich somit nicht allein gegen GBM-Endothelzellen richten sondern könnte auch Tumorzellen angreifen, die sich außerhalb vom GBM-Gefäßendothel befinden. Zunächst war es aber zu prüfen, welche Rolle VEGF-R3 in Gliomzellen einnehmen könnte. Dafür wurde mittels Transfektion eine VEGF-R3 Überexpression in U251 Zellen erzielt. Die VEGF-R3 Überexpression wurde sorgfältig überprüft (s.Kapitel 4.4) und schließlich das Proliferationsverhalten analysiert.

5.5.1 Einfluss einer VEGF-R3 Überexpression auf das Proliferationsverhalten

Ob VEGF-R3 überhaupt einen proliferativen Einfluss in Gliomzellen haben könnte wurde mit einem Viabilitäts-Assay analysiert. Die Proliferation von VEGF-R3 überexprimierenden U251 Zellen wurde nach sieben Tagen im Vergleich zur Kontrolle signifikant gesteigert. Dieses Ergebnis demonstriert eine proliferationsfördernde Funktion von VEGF-R3 in U251 Zellen zurückzuführen auf die VEGF-R3-Überexpression.

Wenn sich folglich VEGF-R3 Überexpression proliferationssteigernd auswirkt, dann wäre bei einer VEGF-R3 Blockade in Gliomzellen ein Gegenteiliges Ergebnis zu erwarten. Um diese Frage beantworten zu können, wurde die gezielte VEGF-R3 Blockade mit MAZ51 im direkten Vergleich zur VEGF-A Blockade mit Bevacizumab in allen drei Gliomzelllinien durchgeführt und anschließend die Gesamtzellmenge bestimmt. Die Lebendzellbestimmung zeigte eine statistisch signifikant reduzierte Anzahl an vitalen Zellen für U87, U251 und U373. Ebenfalls in VEGF-R3 überexprimierenden U251 Zellen zeigte MAZ51 eine cytotoxische Wirkung. Eine anti-VEGF-A Behandlung mit Bevacizumab erzielte in allen Gliomzelllinien vergleichbar mit gbECs keinen cytotoxischen Effekt. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit bereits beschriebenem Einfluss von Bevacizumab. Es wurde gezeigt, dass Bevacizumab nach dreitägiger Inkubation keinen erkennbaren reduzierenden Effekt auf die Zellproliferation in U87 und U373 im MTT-Test aufweist [184]. Außerdem zeigte auch die Inkubation mit blockierenden VEGF-R2 und VEGF-R3 Antikörpern keinen anti-tumoralen Effekt.

Zusammenfassend bewirkte die VEGF-R3 Blockade mit MAZ51 nicht nur in gbECs sondern auch in Gliomzellen einen signifikant cytotoxischen Effekt. Einen ähnlichen Einfluss auf die Vitalität konnte weder die VEGF-A Hemmung, die VEGF-R2 und VEGF-R3 Blockade mit blockierenden Antikörpern noch die simultane VEGF-R2/-R3 Blockade mit blockierenden Antikörpern erzielen. Die Blockade der VEGF-R3 Kinase und die Inhibierung von möglichen ligandenunabhängigen Autophosphorylierungen mit MAZ51 ergab eine signifikant anti-tumorale Wirkung in Gliomzellen und VEGF-R3 überexprimierenden U251 Zellen. Inwiefern die intrazelluläre (MAZ51) und extrazelluläre Blockade (Antikörper gerichtet gegen VEGF-A, -R2 und -R3) durch Auto- oder ligandeninduzierte Phosphorylierung von VEGF-Rezeptoren den

nachgeschalteten Signalweg beeinflussen sollte daraufhin mittels Western Blot in U251 Zellen untersucht.

5.5.2 Einfluss der VEGF-R3 Blockade auf die intrazelluläre Signalkaskade

In der Literatur wird beschrieben, dass die aktivierten VEGF-Tyrosin-Kinasen durch Wachstumsfaktoren über den Ras-Raf-MAP-Kinase Weg zur Expression von verschiedenen Proteasen wie Serinproteasen, Cysteinproteasen, MMPs und zur Bildung von spezifischen Integrinen auf der Oberfläche der Endothelzellen führen. Diese Expression initiiert schließlich die Proliferation und Migration dieser Zellen in Richtung des angiogenen Stimulus [237-239]. VEGF-A induziert über die Aktivierung von VEGF-R2 und nachfolgende Signalwege einschließlich der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) und der extrazellulären Signal-regulierten Kinase (ERK). Dadurch wird die endotheliale Zellproliferation, die Migration und das Überleben angeregt [240, 241]. Die Signalkaskade von VEGF-R3 ist jedoch im Vergleich zu VEGF-R2 wenig untersucht. Um einen Einblick in die nachgeschaltete Signalkaskade zu erhalten wurden U251 Zellen nach intrazellulärer und extrazellulärer Inhibition hinsichtlich p38-MAPK und p42/p44-MAPK (ERK1/ERK2) untersucht.

Die Phosphorylierung von p38-MAPK wurde im Vergleich zur Kontrolle durch die VEGF-R3 Inhibierung mit MAZ51 reduziert. Derselbe reduzierende Effekt war durch die VEGF-A Blockade mit Bevacizumab sowie VEGF-R2 und VEGF-R3 Hemmung durch blockierende Antikörper zu erkennen. VEGF-R3 und VEGF-R2 besitzen dementsprechend Einfluss auf den p38-MAPK „downstream“-Signalweg in Gliomzellen.

Interessanterweise zeigte die Blockade von VEGF-R3 mit MAZ51 einen reduzierten Phosphorylierungs-Status der p42/p44-MAPK im Vergleich zur Kontrolle und zu den extrazellulären Blockaden. Demzufolge beeinflusst die intrazelluläre Blockade der VEGF-R3-Kinase stärker den Signalweg von p42/p44-MAPK in U251 Zellen. Der Einfluss von blockierenden Antikörpern war mit der Kontrolle vergleichbar. Trotz extrazellulärer Blockade konnte demnach eine Aktivierung von p42/p44-MAPK stattfinden. Aktivierung der p42/p44-MAPK (ERK1/ERK2) ist in vielen Zellen mit einer Proliferationssteigerung verbunden. Darüber hinaus kann dieser Signalweg zu einem erhöhten Zellüberleben durch stimulierte Transkription von Genen führen. Diese Transkription steigert das Überleben durch post-translationale Modifikation sowie

Inaktivierung von Komponenten der Zelltod-Maschinerie [242, 243]. Makinen et al zeigten, dass VEGF-C in lymphatischen Endothelzellen über die Aktivierung von p42/p44-MAPK die Zellmigration induzierte und bei VEGF-A Mangel vor Apoptose schützte [102]. Es konnte trotz VEGF-A, VEGF-R2 und VEGF-R3 Hemmung mit blockierenden Antikörpern eine ligandenunabhängige Aktivierung bzw. Nachschaltung des p42/p44-MAPK-Signaltransduktionswegs stattfinden. Dadurch könnte die Proliferation und Migration von gbECs und Gliomzellen aufrechterhalten werden. Die VEGF-R3 Blockade mit MAZ51 konnte wiederum sowohl die Migration in gbECs als auch Lebendzellzahl in Gliomzellen und gbECs beeinflussen, somit kann dieser Effekt mit dem reduzierten Phosphorylierungs-Status der p42/p44-MAPK auf Proteinebene in Verbindung gebracht werden. Insgesamt lässt sich durch die Western Blot Untersuchungen zeigen, dass das VEGF-Rezeptorsystem in Gliomzellen zur intrazellulären Signalweiterleitung p38-MAPK und p42/p44-MAPK nutzen. Wie Bahram et al. schon angedeutet haben, teilen VEGF-R2 und VEGF-R3 einige Signaltransduktionswege [244].

5.6 Einfluss von MAZ51 *in vivo*

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass VEGF-R3 als wichtiges Target in gbECs und Gliomzellen fungiert. Das konnte mit Hilfe der VEGF-R3 Blockade mit MAZ51 *in vitro* gezeigt werden. Interessant ist vor allem, dass dieses kleine permeable Molekül einen therapeutischen Effekt ausschließlich auf pathologischen Zellen (Gliomzelllinien und GBM-Endothelzellen) zeigte, jedoch nicht auf physiologischen Zellen (HUVECs). Ob sich der anti-tumorale Einfluss auch *in vivo* reproduzieren lässt, wurde zu guter Letzt in einem orthotopen Gliom-Mausmodell dargestellt werden. Dabei wurde der Einfluss von MAZ51 im direkten Vergleich zur VEGF-R2 und VEGF-R3 Blockade oder der kombinierten Blockade von VEGF-R2/-R3 mit blockierenden Antikörpern auf das Tumolvolumen untersucht. Jede behandelte Gruppe einschließlich Kontrollgruppe umfasste 6 Versuchstiere. Nach einer 14-tägigen Behandlung der jeweiligen Inhibitoren wurde das Tumolvolumen bestimmt, gemittelt und auf die Kontrollgruppe bezogen.

Im ersten Applikationsschema wurden die Inhibitoren intraperitoneal injiziert. MAZ51 zeigte im Vergleich zu der VEGF-R2 Blockade und der simultanen Inhibition von VEGF-R2/-R3 mit blockierenden Antikörpern ein signifikant reduziertes

Tumorvolumen. Die große Standardabweichung innerhalb der Kontrollgruppe basiert auf den großen Unterschieden der ermittelten Tumorvolumina. In zwei von fünf Kontroll-Versuchstieren war fast keine Tumorentwicklung nachweisbar. Daher konnte die Kontrollgruppe nicht in die statistische Signifikanz mit einbezogen werden. Hierzu bedarf es weiterer Untersuchungen mit weiteren Stichproben. Nichts desto trotz erzielte die Behandlung mit MAZ51 das am stärksten reduzierte Tumorvolumen. Insbesondere zeigte sich ein signifikant verringertes Tumorvolumen gegenüber der VEGF-R2 Blockade und der simultanen Blockade mit blockierenden Antikörpern.

Auf Grund der signifikanten Ergebnisse der i.p.-Injektion mit MAZ51 wurde der Fokus im Weiteren auf diese Substanz gelegt. Der Einsatz von osmotischen Minipumpen ermöglichte die intracerebrale Gabe von MAZ51 direkt in den Tumor. Die Behandlung mit MAZ51 im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne MAZ51-Applikation zeigte ebenfalls ein signifikant vermindertes Tumorvolumen.

Dabei muss erwähnt werden, dass alle Versuchstiere die Operationen einschließlich Tumorimplantation, den Einsatz von Minipumpen sowie die anschließende Therapie gut überlebt haben. Durch die Gabe von MAZ51 waren keine erkennbaren Nebenwirkungen zu erkennen.

Schlussfolgernd erzielte die Blockade von VEGF-R3 mittels MAZ51 im Vergleich zur VEGF-R2 und VEGF-R3 Blockade mit blockierenden Antikörpern nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* anti-tumorale Effekte. Die vorliegende Arbeit demonstriert VEGF-R3 als vielversprechendes therapeutisches Target im malignen Gliom. Diese Erkenntnisse könnten zur Verbesserung anti-angiogener Therapien im GBM beitragen.

6 Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist ein invasiver und stark vaskularisierter Gehirntumor mit einer sehr schlechten Prognose. VEGF-A und VEGF-R2 besitzen eine pro-angiogene Schlüsselrolle in der Regulation von physiologischer und pathologischer Angiogenese. Anti-angiogene Therapien, die gegen das VEGF-A/-R2 System gerichtet sind, führen jedoch zur Ausbildung von Resistenzmechanismen im GBM. Ein besseres Verständnis der molekularen Komponenten verantwortlich für Tumorangiogenese und Invasion soll zur Entwicklung von neuen Behandlungsmethoden im malignen Gliom führen. Interessanterweise konnten vorherige Studien zeigen, dass die hauptsächlich der Lymphangiogenese zugeschriebenen Liganden VEGF-C und VEGF-D und deren Rezeptor VEGF-R3 gradabhängig im malignen Gliom exprimiert werden. Des Weiteren konnte unter anti-VEGF-A Behandlung mit Bevacizumab durch VEGF-C und VEGF-D unter anderem die Proliferation in Tumor- und Endothelzellen gesteigert werden. Es wurde postuliert, dass das VEGF-R3 System im GBM als pro-angiogener Mechanismus kompensatorisch genutzt wird. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal die VEGF-R3 und VEGF-C Expression vor und nach anti-VEGF-A Therapie in humanem GBM-Gewebe nachgewiesen werden. Die starke VEGF-C und VEGF-R3 Expression in GBM-Endothelzellen (gbECs) und Gliomzelllinien konnte auf Gen- und Proteinebene bestätigt werden. Es wurde gezeigt, wie das Indolin MAZ51, ein bereits beschriebener potenter Inhibitor der VEGF-R3 Tyrosin-Kinase, signifikant die Lebendzellzahl von gbECs und Gliomzellen reduziert. Dabei wurden physiologische Zellen von MAZ51 nicht angegriffen. Zudem konnte diese VEGF-R3 Blockade die *in vitro*-Angiogenese sowie Migrationsfähigkeit von gbECs signifikant inhibieren. Im Gegensatz dazu konnte dieser signifikant reduzierende Einfluss von MAZ51 durch VEGF-A, VEGF-R2 und VEGF-R3 Blockade mit blockierenden Antikörpern in gbECs nicht erzielt werden. *In vivo* war MAZ51 bei i.p.-Injektion in der Lage das Tumolvolumen bei bereits entwickelten GL261-Tumoren im Vergleich zur VEGF-R2 und VEGF-R3 Behandlung mit blockierenden Antikörpern statistisch signifikant zu reduzieren. Auch die intracerebrale MAZ51-Gabe unter Einsatz von osmotischen Minipumpen reduzierte signifikant das Tumolvolumen. Diese Daten deuten auf VEGF-R3 als vielversprechendes therapeutisches Target im malignen Gliom hin und demonstrieren das Anwendungspotenzial von MAZ51. Die Erkenntnisse der

vorliegenden Arbeit könnten zur Verbesserung anti-angiogener Therapien im GBM beitragen.

Summary

Glioblastoma multiforme (GBM) is an invasive and hypervascularized brain tumor with a very poor prognosis. VEGF-A and VEGF-R2 play a pivotal role as pro-angiogenic factors in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. Anti-angiogenic therapies directed against the VEGF-A/-R2 system, however, lead to resistance mechanisms in GBM. A better understanding of the molecular components responsible for tumor angiogenesis and invasion will hopefully lead to treatment development in malignant glioma. Interestingly, previous studies have shown that ligands like VEGF-C and VEGF-D and their respective receptor VEGF-R3, which are mainly attributed to lymphangiogenesis, are expressed in malignant glioma grade dependently. Furthermore, anti-VEGF-A treatment with bevacizumab could induce the reactivity to VEGF-C and VEGF-D in tumor derived endothelial cells and glioma cells, which led for instance to increased proliferation. It has been postulated that VEGF-R3 system in GBM is used compensatory as a pro-angiogenic factor. In the present work, VEGF-R3 and VEGF-C expression was detected before and after anti-VEGF-A therapy in human GBM-tissue, for the first time. The strong VEGF-C and VEGF-R3 expression could be confirmed at gene and protein level in tumor derived endothelial cells out of GBM (gbECs) as well as glioma cell lines. It has been shown how the indoline MAZ51, an already described potent inhibitor of VEGF R3-kinase, significantly reduced the cell amount of gbECs and glioma cells. Additionally, physiological cells were not attacked by MAZ51. Moreover, this VEGF-R3 inhibition could significantly reduce *in vitro*-angiogenesis and migration ability of gbECs. In contrast, the influence of MAZ51 in gbECs could not be achieved by using VEGF-A, VEGF-R2 and VEGF-R3 inhibition with blocking antibodies. *In vivo*, after i.p.-injection, MAZ51 significantly reduced the tumor volume in already developed GL261-tumors compared to VEGF-R2 and VEGF-R3 treatment with blocking antibodies. Also using osmotic minipumps for intracerebral MAZ51-application significantly reduced tumor volume. These findings identify VEGF-R3 as a promising target in malignant glioma and MAZ51 demonstrates the potential for further development as a therapeutic agent. The presented data could contribute to the improvement of anti-angiogenic therapies in GBM.

7 Literaturverzeichnis

1. Pittman, R.N., *Oxygen transport and exchange in the microcirculation*. Microcirculation, 2005. **12**(1): p. 59-70.
2. Folkman, J. and M. Klagsbrun, *Angiogenic factors*. Science, 1987. **235**(4787): p. 442-7.
3. Soltau, J., *Evaluation der Wirkung von Bisphosphonaten auf die Tumorangio-genese und ihre Bedeutung in der adjuvanten Tumorthherapie in Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften 2005*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.
4. Claesson-Welsh, L., *Blood vessels as targets in tumor therapy*. Ups J Med Sci, 2012. **117**(2): p. 178-86.
5. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 653-60.
6. Jain, R.K., *Molecular regulation of vessel maturation*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 685-93.
7. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
8. Risau, W. and I. Flamme, *Vasculogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 73-91.
9. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
10. Sottile, J., *Regulation of angiogenesis by extracellular matrix*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1654**(1): p. 13-22.
11. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
12. Kopp, H.G., C.A. Ramos, and S. Rafii, *Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue*. Curr Opin Hematol, 2006. **13**(3): p. 175-81.
13. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 401-10.
14. Cao, Y., *Therapeutic angiogenesis for ischemic disorders: what is missing for clinical benefits?* Discov Med, 2010. **9**(46): p. 179-84.
15. Breier, G., et al., *Angiogenesis in embryos and ischemic diseases*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 678-83.
16. Hanahan, D., et al., *Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(14): p. 2386-93.
17. Kubota, Y., *Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy*. Keio J Med, 2012. **61**(2): p. 47-56.
18. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
19. Polverini, P.J., *The pathophysiology of angiogenesis*. Crit Rev Oral Biol Med, 1995. **6**(3): p. 230-47.
20. Ma, J. and D.J. Waxman, *Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(12): p. 3670-84.
21. Goodger, A.M. and P.A. Rogers, *Endometrial endothelial cell proliferation during the menstrual cycle*. Hum Reprod, 1994. **9**(3): p. 399-405.
22. Folkman, J., et al., *Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis*. J Exp Med, 1971. **133**(2): p. 275-88.

23. Ferrara, N., *VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(10): p. 795-803.
24. Ide AG, B.N., Warren SL, *Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber*. Am J Pathol, 1939. **42**: p. 891-899.
25. Algire GH, C.H., *Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vasculare reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants*. J Natl Cancer Inst, 1945. **6**: p. 73-85.
26. Goel, S., et al., *Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases*. Physiol Rev, 2011. **91**(3): p. 1071-121.
27. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth*. Ann Intern Med, 1975. **82**(1): p. 96-100.
28. Folkman, J., P. Cole, and S. Zimmerman, *Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment*. Ann Surg, 1966. **164**(3): p. 491-502.
29. Folkman, J., et al., *Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia*. Nature, 1989. **339**(6219): p. 58-61.
30. Ehrmann, R.L. and M. Knoth, *Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy*. J Natl Cancer Inst, 1968. **41**(6): p. 1329-41.
31. Greenblatt, M. and P. Shubi, *Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique*. J Natl Cancer Inst, 1968. **41**(1): p. 111-24.
32. Naumov, G.N., et al., *Tumor-vascular interactions and tumor dormancy*. APMIS, 2008. **116**(7-8): p. 569-85.
33. Black, W.C. and H.G. Welch, *Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy*. N Engl J Med, 1993. **328**(17): p. 1237-43.
34. Nielsen, M., et al., *Breast cancer and atypia among young and middle-aged women: a study of 110 medicolegal autopsies*. Br J Cancer, 1987. **56**(6): p. 814-9.
35. Yefenof, E., et al., *Cancer dormancy: isolation and characterization of dormant lymphoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1829-33.
36. Holash, J., et al., *Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF*. Science, 1999. **284**(5422): p. 1994-8.
37. Leenders, W.P., B. Kusters, and R.M. de Waal, *Vessel co-option: how tumors obtain blood supply in the absence of sprouting angiogenesis*. Endothelium, 2002. **9**(2): p. 83-7.
38. Pepper, M.S., *Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(4): p. 605-19.
39. Griscelli, F., et al., *Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6698-703.
40. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
41. Carmeliet, P. and D. Collen, *Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease*. J Pathol, 2000. **190**(3): p. 387-405.
42. Fukumura, D. and R.K. Jain, *Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization*. Microvasc Res, 2007. **74**(2-3): p. 72-84.

43. Benjamin, L.E., et al., *Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal*. J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 159-65.
44. Morikawa, S., et al., *Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors*. Am J Pathol, 2002. **160**(3): p. 985-1000.
45. Folkman, J., *Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview*. EXS, 1997. **79**: p. 1-8.
46. Shweiki, D., et al., *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis*. Nature, 1992. **359**(6398): p. 843-5.
47. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. J Clin Oncol, 2005. **23**(5): p. 1011-27.
48. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
49. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
50. Distler, J.H., et al., *Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis*. Q J Nucl Med, 2003. **47**(3): p. 149-61.
51. Bazzoni, G., E. Dejana, and M.G. Lampugnani, *Endothelial adhesion molecules in the development of the vascular tree: the garden of forking paths*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(5): p. 573-81.
52. Masood, R., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors*. Blood, 2001. **98**(6): p. 1904-13.
53. Figueras, A., et al., *The impact of KRAS mutations on VEGF-A production and tumour vascular network*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 125.
54. Folkman, J., *A new family of mediators of tumor angiogenesis*. Cancer Invest, 2001. **19**(7): p. 754-5.
55. Simiantonaki, N., et al., *Hypoxia-induced epithelial VEGF-C/VEGFR-3 upregulation in carcinoma cell lines*. Int J Oncol, 2008. **32**(3): p. 585-92.
56. Carmeliet, P., et al., *Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis*. Nature, 1998. **394**(6692): p. 485-90.
57. Dachs, G.U., et al., *Targeting gene expression to hypoxic tumor cells*. Nat Med, 1997. **3**(5): p. 515-20.
58. Veikkola, T., et al., *Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors*. Cancer Res, 2000. **60**(2): p. 203-12.
59. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress*. Endocr Rev, 2004. **25**(4): p. 581-611.
60. Ellis, L.M. and D.J. Hicklin, *VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(8): p. 579-91.
61. Brown, L.F., et al., *Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing*. J Exp Med, 1992. **176**(5): p. 1375-9.
62. Marme, D., [In Process Citation]. Chirurg, 1999. **70**(1): p. 30-5.
63. Ferrara, N., *Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor*. J Mol Med (Berl), 1999. **77**(7): p. 527-43.
64. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis*. Recent Prog Horm Res, 2000. **55**: p. 15-35; discussion 35-6.
65. Cross, M.J., et al., *VEGF-receptor signal transduction*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(9): p. 488-94.

66. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
67. Tammela, T., et al., *The biology of vascular endothelial growth factors*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(3): p. 550-63.
68. Partanen, T.A. and K. Paavonen, *Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans*. Microsc Res Tech, 2001. **55**(2): p. 108-21.
69. Laakkonen, P., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth*. Cancer Res, 2007. **67**(2): p. 593-9.
70. Meyer, M., et al., *A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases*. EMBO J, 1999. **18**(2): p. 363-74.
71. Tammela, T., et al., *VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(10): p. 1202-13.
72. Koch, S., et al., *Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors*. Biochem J, 2011. **437**(2): p. 169-83.
73. Ferrara, N. and B. Keyt, *Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications*. EXS, 1997. **79**: p. 209-32.
74. Cao, Y., *Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands*. Sci Signal, 2009. **2**(59): p. re1.
75. Scavelli, C., et al., *Crosstalk between angiogenesis and lymphangiogenesis in tumor progression*. Leukemia, 2004. **18**(6): p. 1054-8.
76. Tallquist, M.D., P. Soriano, and R.A. Klinghoffer, *Growth factor signaling pathways in vascular development*. Oncogene, 1999. **18**(55): p. 7917-32.
77. Robinson, C.J. and S.E. Stringer, *The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 5): p. 853-65.
78. Fong, G.H., et al., *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 66-70.
79. Barleon, B., et al., *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1*. Blood, 1996. **87**(8): p. 3336-43.
80. Clauss, M., et al., *The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17629-34.
81. Lyden, D., et al., *Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth*. Nat Med, 2001. **7**(11): p. 1194-201.
82. Chen, W.S., R.P. Kitson, and R.H. Goldfarb, *Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR-1 (FLT-1)*. In Vivo, 2002. **16**(6): p. 439-45.
83. Dvorak, H.F., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy*. J Clin Oncol, 2002. **20**(21): p. 4368-80.
84. Tudor, R.M., B.E. Flook, and N.F. Voelkel, *Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide*. J Clin Invest, 1995. **95**(4): p. 1798-807.

85. Li, J., et al., *VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis*. *Am J Physiol*, 1996. **270**(5 Pt 2): p. H1803-11.
86. Shen, B.Q., et al., *Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(45): p. 29979-85.
87. Borg, J.P., et al., *Biochemical characterization of two isoforms of FLT4, a VEGF receptor-related tyrosine kinase*. *Oncogene*, 1995. **10**(5): p. 973-84.
88. Aprelikova, O., et al., *FLT4, a novel class III receptor tyrosine kinase in chromosome 5q33-qter*. *Cancer Res*, 1992. **52**(3): p. 746-8.
89. Galland, F., et al., *The FLT4 gene encodes a transmembrane tyrosine kinase related to the vascular endothelial growth factor receptor*. *Oncogene*, 1993. **8**(5): p. 1233-40.
90. Shushanov, S., et al., *VEGFc and VEGFR3 expression in human thyroid pathologies*. *Int J Cancer*, 2000. **86**(1): p. 47-52.
91. Dixelius, J., et al., *Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(42): p. 40973-9.
92. Alam, A., et al., *Heterodimerization with vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) is necessary for VEGFR-3 activity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **324**(2): p. 909-15.
93. Shibuya, M., *Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases*. *J Biochem*, 2013. **153**(1): p. 13-9.
94. Orlandini, M., et al., *Vascular endothelial growth factor-D activates VEGFR-3 expressed in osteoblasts inducing their differentiation*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(26): p. 17961-7.
95. Schmeisser, A., et al., *Apoptosis of human macrophages by Flt-4 signaling: implications for atherosclerotic plaque pathology*. *Cardiovasc Res*, 2006. **71**(4): p. 774-84.
96. Kaipainen, A., et al., *Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(8): p. 3566-70.
97. Dumont, D.J., et al., *Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3*. *Science*, 1998. **282**(5390): p. 946-9.
98. Suzuki, H., et al., *Roles of vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling in differentiation of mouse embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells into endothelial cells*. *Blood*, 2005. **105**(6): p. 2372-9.
99. Su, J.L., et al., *The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells*. *Cancer Cell*, 2006. **9**(3): p. 209-23.
100. Stacker, S.A., et al., *VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics*. *Nat Med*, 2001. **7**(2): p. 186-91.
101. Hoshida, T., et al., *Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications*. *Cancer Res*, 2006. **66**(16): p. 8065-75.
102. Makinen, T., et al., *Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3*. *EMBO J*, 2001. **20**(17): p. 4762-73.
103. Skobe, M., et al., *Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis*. *Nat Med*, 2001. **7**(2): p. 192-8.

104. Mandriota, S.J., et al., *Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis*. EMBO J, 2001. **20**(4): p. 672-82.
105. Marme, D., *The impact of anti-angiogenic agents on cancer therapy*. J Cancer Res Clin Oncol, 2003. **129**(11): p. 607-20.
106. Jain, R.K., *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy*. Science, 2005. **307**(5706): p. 58-62.
107. Folkman, J., *Angiogenesis research: from laboratory to clinic*. Forum (Genova), 1999. **9**(3 Suppl 3): p. 59-62.
108. Bruns, C.J., et al., *Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases*. Cancer, 2000. **89**(3): p. 488-99.
109. Krupitskaya, Y. and H.A. Wakelee, *Ramucirumab, a fully human mAb to the transmembrane signaling tyrosine kinase VEGFR-2 for the potential treatment of cancer*. Curr Opin Investig Drugs, 2009. **10**(6): p. 597-605.
110. Prewett, M., et al., *Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors*. Cancer Res, 1999. **59**(20): p. 5209-18.
111. Zhu, Z., et al., *Inhibition of human leukemia in an animal model with human antibodies directed against vascular endothelial growth factor receptor 2. Correlation between antibody affinity and biological activity*. Leukemia, 2003. **17**(3): p. 604-11.
112. Persaud, K., et al., *Involvement of the VEGF receptor 3 in tubular morphogenesis demonstrated with a human anti-human VEGFR-3 monoclonal antibody that antagonizes receptor activation by VEGF-C*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 13): p. 2745-56.
113. Matsumoto, M., et al., *Signaling for lymphangiogenesis via VEGFR-3 is required for the early events of metastasis*. Clin Exp Metastasis, 2013.
114. Alitalo, K. and P. Carmeliet, *Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease*. Cancer Cell, 2002. **1**(3): p. 219-27.
115. Alitalo, K., T. Tammela, and T.V. Petrova, *Lymphangiogenesis in development and human disease*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 946-53.
116. He, Y., et al., *Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(11): p. 819-25.
117. Garcia-Echeverria, C., P. Traxler, and D.B. Evans, *ATP site-directed competitive and irreversible inhibitors of protein kinases*. Med Res Rev, 2000. **20**(1): p. 28-57.
118. Hamby, J.M. and H.D. Showalter, *Small molecule inhibitors of tumor-promoted angiogenesis, including protein tyrosine kinase inhibitors*. Pharmacol Ther, 1999. **82**(2-3): p. 169-93.
119. Arteaga, C.L., et al., *Unliganded epidermal growth factor receptor dimerization induced by direct interaction of quinazolines with the ATP binding site*. J Biol Chem, 1997. **272**(37): p. 23247-54.
120. Laird, A.D., et al., *SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors*. Cancer Res, 2000. **60**(15): p. 4152-60.
121. Fry, D.W., et al., *A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase*. Science, 1994. **265**(5175): p. 1093-5.
122. Seshacharyulu, P., et al., *Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy*. Expert Opin Ther Targets, 2012. **16**(1): p. 15-31.

123. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
124. Kirkin, V., et al., *MAZ51, an indolinone that inhibits endothelial cell and tumor cell growth in vitro, suppresses tumor growth in vivo*. Int J Cancer, 2004. **112**(6): p. 986-93.
125. Mohammadi, M., et al., *Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors*. Science, 1997. **276**(5314): p. 955-60.
126. Bradley, D. and J. Rees, *Updates in the management of high-grade glioma*. J Neurol, 2013.
127. Kleihues, P., et al., *Histopathology, classification, and grading of gliomas*. Glia, 1995. **15**(3): p. 211-21.
128. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
129. Preusser, M., et al., *Current concepts and management of glioblastoma*. Ann Neurol, 2011. **70**(1): p. 9-21.
130. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Epidemiology and etiology of gliomas*. Acta Neuropathol, 2005. **109**(1): p. 93-108.
131. Kleihues, P., P.C. Burger, and B.W. Scheithauer, *The new WHO classification of brain tumours*. Brain Pathol, 1993. **3**(3): p. 255-68.
132. Maher, E.A., et al., *Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter*. Genes Dev, 2001. **15**(11): p. 1311-33.
133. Staneczek, W. and W. Janisch, *[Epidemiology of primary tumors of the central nervous system in children and adolescents. A population-based study]*. Pathologie, 1994. **15**(4): p. 207-15.
134. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. **64**(6): p. 479-89.
135. Dolecek, T.A., et al., *CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009*. Neuro Oncol, 2012. **14 Suppl 5**: p. v1-49.
136. Crocetti, E., et al., *Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe*. Eur J Cancer, 2012. **48**(10): p. 1532-42.
137. Wohrer, A., et al., *The Austrian Brain Tumour Registry: a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry*. J Neurooncol, 2009. **95**(3): p. 401-11.
138. Miller, C.R. and A. Perry, *Glioblastoma*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(3): p. 397-406.
139. Plate, K.H., et al., *Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo*. Nature, 1992. **359**(6398): p. 845-8.
140. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *The definition of primary and secondary glioblastoma*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(4): p. 764-72.
141. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1445-53.
142. Bhowmick, D.A., et al., *A functional polymorphism in the EGF gene is found with increased frequency in glioblastoma multiforme patients and is associated with more aggressive disease*. Cancer Res, 2004. **64**(4): p. 1220-3.
143. Ohgaki, H., et al., *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6892-9.

144. Kim, W. and L.M. Liau, *IDH mutations in human glioma*. Neurosurg Clin N Am, 2012. **23**(3): p. 471-80.
145. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents*. N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1350-4.
146. Thorsteinsdottir, J., *Effekte einer anti-VEGF-A-Therapie (Bevacizumab) auf humane cerebrale Endothelzellen sowie Tumor- und Endothelzellen in humanen Gliomen*, in *Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik*
- 2011, Ludwig-Maximilians-Universität München: Tumorbiologisches Labor Klinikum Großhadern.
147. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
148. Jain, R.K., et al., *Angiogenesis in brain tumours*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(8): p. 610-22.
149. Fukumura, D., et al., *Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo*. Cancer Res, 2001. **61**(16): p. 6020-4.
150. Kargiotis, O., J.S. Rao, and A.P. Kyritsis, *Mechanisms of angiogenesis in gliomas*. J Neurooncol, 2006. **78**(3): p. 281-93.
151. Ding, H., et al., *Expression and hypoxic regulation of angiopoietins in human astrocytomas*. Neuro Oncol, 2001. **3**(1): p. 1-10.
152. Peters, B.A., et al., *Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature*. Nat Med, 2005. **11**(3): p. 261-2.
153. Sharma, S., M.C. Sharma, and C. Sarkar, *Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprogenostic perspective and significance of neoangiogenesis*. Histopathology, 2005. **46**(5): p. 481-9.
154. Friedman, H.S., et al., *Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(28): p. 4733-40.
155. Samoto, K., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors*. Cancer Res, 1995. **55**(5): p. 1189-93.
156. Takano, S., et al., *Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients*. Cancer Res, 1996. **56**(9): p. 2185-90.
157. Sandstrom, M., et al., *Effects of the VEGFR inhibitor ZD6474 in combination with radiotherapy and temozolomide in an orthotopic glioma model*. J Neurooncol, 2008. **88**(1): p. 1-9.
158. Ferrara, N., et al., *Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(5): p. 391-400.
159. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
160. Onishi, M., et al., *Mechanisms of Tumor Development and Anti-angiogenic Therapy in Glioblastoma Multiforme*. Neurol Med Chir (Tokyo), 2013. **53**(11): p. 755-63.
161. Kreisl, T.N., et al., *Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(5): p. 740-5.
162. Jo, J., D. Schiff, and B. Purow, *Angiogenic inhibition in high-grade gliomas: past, present and future*. Expert Rev Neurother, 2012. **12**(6): p. 733-47.

163. Sathornsumetee, S. and J.N. Rich, *Antiangiogenic therapy in malignant glioma: promise and challenge*. *Curr Pharm Des*, 2007. **13**(35): p. 3545-58.
164. Jain, R.K., et al., *Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer*. *Nat Clin Pract Oncol*, 2006. **3**(1): p. 24-40.
165. Gorski, D.H., et al., *Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation*. *Cancer Res*, 1999. **59**(14): p. 3374-8.
166. Shaked, Y. and R.S. Kerbel, *Antiangiogenic strategies on defense: on the possibility of blocking rebounds by the tumor vasculature after chemotherapy*. *Cancer Res*, 2007. **67**(15): p. 7055-8.
167. Browder, T., et al., *Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(7): p. 1878-86.
168. Bertolini, F., et al., *Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(15): p. 4342-6.
169. Ebos, J.M., et al., *Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(3): p. 232-9.
170. Mancuso, M.R., et al., *Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(10): p. 2610-21.
171. di Tomaso, E., et al., *Glioblastoma recurrence after cediranib therapy in patients: lack of "rebound" revascularization as mode of escape*. *Cancer Res*, 2011. **71**(1): p. 19-28.
172. Lee, J., et al., *Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(5): p. 1988-92.
173. Joukov, V., et al., *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*, 1996. **15**(7): p. 1751.
174. Jeltsch, M., et al., *Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice*. *Science*, 1997. **276**(5317): p. 1423-5.
175. Grau, S.J., et al., *Expression of VEGFR3 in glioma endothelium correlates with tumor grade*. *J Neurooncol*, 2007. **82**(2): p. 141-50.
176. Jenny, B., et al., *Expression and localization of VEGF-C and VEGFR-3 in glioblastomas and haemangioblastomas*. *J Pathol*, 2006. **209**(1): p. 34-43.
177. Grau, S.J., et al., *Lymphatic phenotype of tumour vessels in malignant gliomas*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2008. **34**(6): p. 675-9.
178. Stupp, R., M. Hegi, and M. Weller, *Neuro-oncology, a decade of temozolomide and beyond*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010. **10**(11): p. 1675-7.
179. Wilson, C.B., *Glioblastoma: the past, the present, and the future*. *Clin Neurosurg*, 1992. **38**: p. 32-48.
180. Eisele, G. and M. Weller, *Targeting apoptosis pathways in glioblastoma*. *Cancer Lett*, 2013. **332**(2): p. 335-45.
181. Giese, A., et al., *Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(8): p. 1624-36.
182. Cea, V., C. Sala, and C. Verpelli, *Antiangiogenic therapy for glioma*. *J Signal Transduct*, 2012. **2012**: p. 483040.
183. Gil-Gil, M.J., et al., *Bevacizumab for the treatment of glioblastoma*. *Clin Med Insights Oncol*, 2013. **7**: p. 123-35.

184. Grau, S., et al., *Bevacizumab can induce reactivity to VEGF-C and -D in human brain and tumour derived endothelial cells*. J Neurooncol, 2011. **104**(1): p. 103-12.
185. Miebach, S., et al., *Isolation and culture of microvascular endothelial cells from gliomas of different WHO grades*. J Neurooncol, 2006. **76**(1): p. 39-48.
186. Skehan, P., et al., *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(13): p. 1107-12.
187. ibidi. Available from: <http://ibidi.com/>.
188. Müller, M.C., *Morphologische, molekulare und funktionelle Untersuchungen zur Entstehung der Körnerzelldispersion in einem Mausmodell für Temporallappenepilepsie* in Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften 2008, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br. .
189. Cetin, A., et al., *Stereotaxic gene delivery in the rodent brain*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 3166-73.
190. ALZET. Available from: <http://www.alzet.com/>.
191. Han, Y.S., et al., *Inhibitory effects of bevacizumab on angiogenesis and corneal neovascularization*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2009. **247**(4): p. 541-8.
192. Kirkin, V., et al., *Characterization of indolinones which preferentially inhibit VEGF-C- and VEGF-D-induced activation of VEGFR-3 rather than VEGFR-2*. Eur J Biochem, 2001. **268**(21): p. 5530-40.
193. Du, R., et al., *HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion*. Cancer Cell, 2008. **13**(3): p. 206-20.
194. Norden, A.D., J. Drappatz, and P.Y. Wen, *Antiangiogenic therapies for high-grade glioma*. Nat Rev Neurol, 2009. **5**(11): p. 610-20.
195. Ferrara, N., *VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth*. Eur Cytokine Netw, 2009. **20**(4): p. 158-63.
196. Schmidt, N.O., et al., *Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis*. Int J Cancer, 1999. **84**(1): p. 10-8.
197. Moffat, B.A., et al., *Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A causes a paradoxical increase in tumor blood flow and up-regulation of VEGF-D*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(5): p. 1525-32.
198. Tong, R.T., et al., *Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3731-6.
199. Verheul, H.M. and H.M. Pinedo, *Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 475-85.
200. Ratner, M., *Genentech discloses safety concerns over Avastin*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(10): p. 1198.
201. Armstrong, T.S., et al., *Management of treatment-associated toxicities of anti-angiogenic therapy in patients with brain tumors*. Neuro Oncol, 2012. **14**(10): p. 1203-14.
202. Kamba, T. and D.M. McDonald, *Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer*. Br J Cancer, 2007. **96**(12): p. 1788-95.
203. Vredenburgh, J.J., et al., *Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(4): p. 1253-9.
204. Vredenburgh, J.J., et al., *Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme*. J Clin Oncol, 2007. **25**(30): p. 4722-9.

205. Nagane, M. and R. Nishikawa, *Bevacizumab for glioblastoma-a promising drug or not?* *Cancers (Basel)*, 2013. **5**(4): p. 1456-68.
206. Pope, W.B., et al., *MRI in patients with high-grade gliomas treated with bevacizumab and chemotherapy.* *Neurology*, 2006. **66**(8): p. 1258-60.
207. Clarke, J.L. and S. Chang, *Pseudoprogression and pseudoresponse: challenges in brain tumor imaging.* *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2009. **9**(3): p. 241-6.
208. Brandsma, D. and M.J. van den Bent, *Pseudoprogression and pseudoresponse in the treatment of gliomas.* *Curr Opin Neurol*, 2009. **22**(6): p. 633-8.
209. Lampson, L.A., *Monoclonal antibodies in neuro-oncology: Getting past the blood-brain barrier.* *MAbs*, 2011. **3**(2): p. 153-60.
210. Batchelor, T.T., et al., *AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients.* *Cancer Cell*, 2007. **11**(1): p. 83-95.
211. Macdonald, D.R., et al., *Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma.* *J Clin Oncol*, 1990. **8**(7): p. 1277-80.
212. Huang, T.T., et al., *Targeted therapy for malignant glioma patients: lessons learned and the road ahead.* *Neurotherapeutics*, 2009. **6**(3): p. 500-12.
213. Casanovas, O., et al., *Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors.* *Cancer Cell*, 2005. **8**(4): p. 299-309.
214. Kunkel, P., et al., *Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2.* *Cancer Res*, 2001. **61**(18): p. 6624-8.
215. Lamszus, K., et al., *Inhibition of glioblastoma angiogenesis and invasion by combined treatments directed against vascular endothelial growth factor receptor-2, epidermal growth factor receptor, and vascular endothelial-cadherin.* *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(13): p. 4934-40.
216. Kerbel, R.S., *Therapeutic implications of intrinsic or induced angiogenic growth factor redundancy in tumors revealed.* *Cancer Cell*, 2005. **8**(4): p. 269-71.
217. Bergers, G. and D. Hanahan, *Modes of resistance to anti-angiogenic therapy.* *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(8): p. 592-603.
218. Ellis, L.M. and D.J. Hicklin, *Pathways mediating resistance to vascular endothelial growth factor-targeted therapy.* *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(20): p. 6371-5.
219. Tanase, C.P., et al., *Anti-cancer Therapies in High Grade Gliomas.* *Curr Proteomics*, 2013. **10**(3): p. 246-260.
220. Witmer, A.N., et al., *VEGFR-3 in adult angiogenesis.* *J Pathol*, 2001. **195**(4): p. 490-7.
221. Tammela, T., et al., *Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation.* *Nature*, 2008. **454**(7204): p. 656-60.
222. Padera, T.P. and R.K. Jain, *VEGFR3: a new target for antiangiogenesis therapy?* *Dev Cell*, 2008. **15**(2): p. 178-9.
223. Su, J.L., et al., *Further evidence for expression and function of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer cells.* *Cancer Cell*, 2008. **13**(6): p. 557-60.
224. Matsumura, K., et al., *Modulation of VEGFR-2-mediated endothelial-cell activity by VEGF-C/VEGFR-3.* *Blood*, 2003. **101**(4): p. 1367-74.
225. Debinski, W., et al., *VEGF-D is an X-linked/AP-1 regulated putative onco-angiogen in human glioblastoma multiforme.* *Mol Med*, 2001. **7**(9): p. 598-608.

226. Guo, Y., et al., *How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008. **40**(5): p. 426-36.
227. Breslin, J.W., et al., *Vascular endothelial growth factor-C stimulates the lymphatic pump by a VEGF receptor-3-dependent mechanism*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H709-18.
228. Breslin, J.W., S.Y. Yuan, and M.H. Wu, *VEGF-C alters barrier function of cultured lymphatic endothelial cells through a VEGFR-3-dependent mechanism*. Lymphat Res Biol, 2007. **5**(2): p. 105-13.
229. Matsuura, M., et al., *Autocrine loop between vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor-3 positively regulates tumor-associated lymphangiogenesis in oral squamoid cancer cells*. Am J Pathol, 2009. **175**(4): p. 1709-21.
230. Lin, C.I., et al., *Lysophosphatidic acid up-regulates vascular endothelial growth factor-C and lymphatic marker expressions in human endothelial cells*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(17): p. 2740-51.
231. Benedito, R., et al., *Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling*. Nature, 2012. **484**(7392): p. 110-4.
232. Reimer, C.L., et al., *Antineoplastic effects of chemotherapeutic agents are potentiated by NM-3, an inhibitor of angiogenesis*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 789-95.
233. Jimenez, X., et al., *A recombinant, fully human, bispecific antibody neutralizes the biological activities mediated by both vascular endothelial growth factor receptors 2 and 3*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(3): p. 427-34.
234. Blouw, B., et al., *The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment*. Cancer Cell, 2003. **4**(2): p. 133-46.
235. Miletic, H., et al., *Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms*. Expert Opin Ther Targets, 2009. **13**(4): p. 455-68.
236. Keunen, O., et al., *Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(9): p. 3749-54.
237. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 320-44.
238. Baccarini, M., *Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase"*. FEBS Lett, 2005. **579**(15): p. 3271-7.
239. Meloche, S. and J. Pouyssegur, *The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3227-39.
240. Petrova, T.V., T. Makinen, and K. Alitalo, *Signaling via vascular endothelial growth factor receptors*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 117-30.
241. Shibuya, M., N. Ito, and L. Claesson-Welsh, *Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **237**: p. 59-83.
242. Bonni, A., et al., *Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1358-62.
243. Gupta, K., et al., *VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling*. Exp Cell Res, 1999. **247**(2): p. 495-504.

244. Bahram, F. and L. Claesson-Welsh, *VEGF-mediated signal transduction in lymphatic endothelial cells*. *Pathophysiology*, 2010. **17**(4): p. 253-61.

Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörg-Christian Tonn für die freundliche Aufnahme und Ermöglichung der Dissertation im Tumorbioologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik in München-Großhadern.

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Rainer Glaß, bedanken, der diese Dissertation durch konstruktive Diskussionen und seine große wissenschaftliche Kompetenz bei der Fertigstellung unterstützt und ermöglicht hat.

Herrn PD Dr. Christian Schichor danke ich für regelmäßige Treffen, zahlreiche Diskussionen und Ratschläge, die meine Dissertation bereichert haben.

Herrn Dr. Stefan Grau danke ich herzlich für die Möglichkeit zum VEGF-R3-Projekt beitragen zu können. Das wissenschaftliche Fachwissen und die positive Einarbeitung in dieses Forschungsthema haben mir den Einstieg in München erleichtert.

An Herrn Prof. Dr. Mittelbronn und Herr Dr. Patrick Harter aus dem Edinger Institut (Neurologischen Institut), Goethe-Universitätsklinikum Frankfurt gilt ein großer Dank für die Bereitstellung der histologischen GBM-Schnitte aus der Avastin-Studie.

Ich danke all meinen Kollegen/-innen und Studenten aus dem Labor. Christoph Barth danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft und die lustige Zeit. Besonders hervorheben möchte ich meine Kolleginnen und Freundinnen Valerie Albrecht und Sabrina Lakotta. Ohne Euch wäre diese Zeit nur halb so schön gewesen. Der Spaß an der Arbeit, der Zusammenhalt, das offene Ohr, die notwendige Ablenkung und die Hilfsbereitschaft in allen Belangen sind unbezahlbar.

Last but not least gilt der größte Dank von ganzem Herzen meiner Familie. An meine Eltern, meinen Bruder und meine Schwägerin weil sie immer für mich da sind, mich fördern, an mich glauben, mich motivieren und jederzeit unterstützen. Eure grenzenlose Liebe und Unterstützung lässt sich nicht in Worte fassen.

Eidesstattliche Versicherung

Gieser, Eugenie

Name, Vorname

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

VEGF-Rezeptor 3 als vielversprechendes Target im malignen Gliom

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.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand