

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. J.-C. Tonn

Expression von mesenchymalen und lymphangiogenen Markern im malignen Gliom

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

vorgelegt von
Sophia Antonia Vieth

aus
Hamburg
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Schichor

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jochen Herms

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Valerie Albrecht

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2020

Für meine Eltern, meine Brüder
und Moritz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Physiologie und Funktion des Lymphsystems</i>	1
1.2	<i>Entwicklung des Lymphsystems</i>	2
1.3	<i>Lymphspezifische Marker</i>	3
1.3.1	Vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3)	4
1.3.2	Podoplanin	4
1.3.3	Prospero related homeobox Gen-1 (Prox-1)	5
1.3.4	Lymphatic vessel endothelial hyaluronen Receptor-1 (LYVE-1)	5
1.4	<i>Mesenchymale Stammzellen (MSC)</i>	6
1.5	<i>Glioblastoma multiforme</i>	7
1.6	<i>Angiogenese im Glioblastoma multiforme</i>	8
1.7	<i>Tumor-Lymph-Angiogenese</i>	9
2	Zielsetzung	10
3	Material/Methoden	11
3.1	<i>Geräte</i>	11
3.2	<i>Zellen</i>	11
3.2.1	Glioblastomzellen/U87	11
3.2.2	Mesenchymale Stammzellen	12
3.3	<i>Zellkultur</i>	13
3.3.1	DMEM 10% und 20% FCS Medium	14
3.3.2	Tumor-konditioniertes Medium	14
3.3.3	DMEM Medium mit IL-3 Zusatz	14
3.3.4	Co-Kultur U87 und mesenchymale Stammzellen	14
3.4	<i>Differenzierungsassay</i>	14
3.4.1	Färbung der Differenzierungsassays	16
3.5	<i>Durchflusszytometrie zur Bestätigung der mesenchymalen Stammzellmarker</i>	16
3.6	<i>Antikörper für FACS</i>	17
3.7	<i>Antikörper für die Immunzyto- und Immunhistochemie</i>	17
3.8	<i>Floureszenz-Antikörper</i>	17
3.9	<i>Immunzytochemie</i>	18
3.10	<i>Immunzytochemie-Floureszenz</i>	19
3.11	<i>Hope-Schnitte</i>	20
3.12	<i>Immunhistochemie</i>	20
3.13	<i>Lymphgefäßfärbung</i>	20

4 Ergebnisse	21
4.1 Färbung von lymphangiogenen Markern am Gewebeschnitt des Menschen	21
4.2 Immunhistochemie von Glioblastomgewebe	22
4.3 Färbung der U87-Zelllinie	23
4.4 Differenzierungsassay	24
4.5 FACS-Analyse der mesenchymalen Stammzellen	25
4.6 Immunzytochemie mesenchymaler Stammzellen (bmMSC) ohne Tumor-konditioniertes Medium	26
4.7 Immunzytochemie von bmMSC mit 2, 4 und 5 Tagen Tumor-konditioniertem Medium	27
4.8 Co-Kulturversuche mit bmMSC und U87 Zellen AEC-Färbung	30
4.9 Inkubation von bmMSC mit IL-3 Zusatz	30
4.10 Immunfluoreszenz	31
5 Diskussion	33
6 Zusammenfassung	41
Literaturverzeichnis	42

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Immunhistochemie von Lymphgefäßen eines Menschen aus der Axilla	22
Abbildung 2 Immunhistochemie von Glioblastoma multiforme Gewebe	23
Abbildung 3 Immuncytochemie von U87 Zellen	24
Abbildung 4 Differenzierungsassay	25
Abbildung 5 Immuncytochemie von bmMSC ohne Tumor-konditioniertes Medium (TKM)	27
Abbildung 6 Immuncytochemie von bmMSC BM6, BM7 und BM8	28
Abbildung 7 Immuncytochemie von bmMSC BM6, BM7 und BM8	29
Abbildung 8 Immuncytochemie von bmMSC mit DAB Chromogen und Antikörper LYVE-1	29
Abbildung 9 DAB-Färbung von bmMSC mit IL-3 Mediumzusatz	31
Abbildung 10 Immunzytochemie von bmMSC unter dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop	32

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEC	aminoethyl carbazole
bmMSC	bone marrow mesenchymale Stammzellen
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of Differentiation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylinol
E9,5	Embryonal Tag 9,5
etOh	Ethanol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
HOPE	Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Proection Effect
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IDH	isocitrat dehydrogenase
kDa	Kilo Dalton
LYVE-1	lymphatic vessel endothelial hyaluronan Receptor-1
MSC	mesenchymale Stammzellen
MEM	Minimum Essential Medium
NEAA	Non-Essential Amino Acids Solution
Nacl	Natriumchlorid
Prox-1	Prospero homeobox protein 1
PBS	Phosphate buffered saline
TKM	tumor-konditioniertes Medium
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-3	Vascular endothelial growth factor receptor-3
ZNS	Zentrales Nerven System

1 Einleitung

1.1 Physiologie und Funktion des Lymphsystems

Das Lymphsystem spielt eine wichtige Rolle in der Flüssigkeits-Homöostase (Scallan et al., 2016) der Gewebe, in der Immunantwort des Körpers sowie in der Metastasierung von Tumoren (Al-Rawi et al., 2005). Es bildet mit lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Tonsillen, dem Peyerischen Patch, der Milz und dem Thymus das lymphatische System des Menschen (Oliver and Detmar, 2002). In fast allen Geweben und Organen sind Lymphgefäße vorhanden, ausgenommen sind Epidermis, Knorpel und Kornea, das Zentralnervensystem, die Retina und der Knochen (Alitalo et al., 2005). Das Lymphsystem ist kein geschlossenes zirkuläres System, wie das Blutgefäßsystem mit seinen Arterien und Venen, sondern es beginnt mit blind endenden, kleinen, dünnwandigen Kapillaren im distalen Bindegewebe. Die Lymphkapillaren bestehen aus einschichtig angeordneten Lymphendothelzellen, welche sich teilweise lose überlappen und so intraendotheliale Klappen bilden, die den Eintritt von Gewebeflüssigkeit, Zellen (z.B. dendritische Zellen), Lipiden und Makromolekülen erlauben. Die Kapillaren besitzen eine perforierte, unvollständige Basalmembran und sind durch elastische Filamente mit ihrem umliegenden Gewebe verbunden, um bei erhöhten Gewebedrücken die Durchlässigkeit der Kapillaren zu erhöhen (Karpanen and Alitalo, 2008). Die Kapillaren vereinigen sich zu so genannten Präkollektoren, die wiederum in Kollektoren übergehen. Der histologische Aufbau der Präkollektoren ähnelt dem der Kapillaren. Sie besitzen eine gefensterte Basalmembran und Filamente, die sie im umliegenden Gewebe befestigen. Der Unterschied zu den Kapillaren liegt in den unregelmäßig in die Gefäßwand eingelagerten glatten Muskelzellen sowie in dem Vorkommen von Klappen im Gefäßverlauf. Die Abschnitte des Gefäßes, in denen eine dichte Muskelschicht vorhanden ist, wechseln sich mit Bereichen ab, in denen die Muskelzellen vereinzelt in die Wand eingestreut sind. Dieser Wandaufbau lässt darauf schließen, dass die Präkollektoren nicht nur für den Weitertransport der Lymphe verantwortlich sind, sondern, dass es trotz Vorkommen von Muskelzellen und Klappen zur Flüssigkeits- und Proteinabsorption kommt (Sacchi et al., 1997). Die Kollektoren, die den Präkollektoren nachgeschaltet sind, haben einen dreischichtigen Wandaufbau sowie eine kontinuierlich durchgängige Basalmembran. Sie besitzen ebenso wie die Präkollektoren Klappen, um den Rückfluss

der Lymphe zu verhindern. Diese sind regelmäßig angeordnet und geben dem Gefäß eine gewisse Struktur (Sacchi et al., 1997). Die aus der unteren und linken oberen Körperhälfte kommende Lymphe mündet im linken Venenwinkel (Vena jugularis und Vena subclavia) und aus der rechten oberen Körperhälfte kommend im rechten Venenwinkel.

1.2 Entwicklung des Lymphsystems

Die erste Beschreibung von Lymphgefäßen wurde von Gasparo Asellius 1627 formuliert. Er beschrieb in seinem Buch „milchige Venen“ (Asellius, 1627). Die weitere Erforschung der Lymphgefäße und vor allem deren Entwicklung war lange Zeit schwierig, da es an spezifischen Markern für Lymphgefäße mangelte. Erst durch die Entdeckung von Prox-1, einem Transkriptionsfaktor der eine wichtige Rolle in der Lymphangiogenese spielt (Wigle and Oliver, 1999) und weiteren Markern wie Podoplanin, vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) und lymphatic vessel endothelial hyaluronen receptor-1 (LYVE-1), konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden. Anfang des 20. Jahrhunderts sorgten zwei Hypothesen über die Entstehung des Lymphgefäßsystems für Diskussionen. Die damals von Sabin entwickelte Hypothese ist bis heute anerkannt (1902, 1904). Sabin formulierte die Hypothese, basierend auf seinen Versuchen mit Tusche-Injektionen an Schweineembryos, dass sich der primäre Lymphsack durch Aussprossen von Endothelzellen aus kardialen Venen bildet (Sabin, 1902). Die jugulären Lymphsäcke entstehen in der frühen Entwicklung in der Vereinigungszone von Vena subclavia und Vena jugularis. In der weiteren Entwicklung bilden sich weitere Lymphsäcke in der Region der mesenterialen Venen und retroperitoneal an der Vena cava inferior (Sabin, 1904). Die alternative Hypothese von Huntington et al. beschreibt, dass sich der Lymphsack unabhängig von den Venen im Mesoderm entwickelt und erst später Anschluss an die Venen erhält (Huntington, 1914). Unterstützung bekommt diese Hypothese durch die Arbeiten von Schneider et al. und Wilting et al., die durch Versuche an Vogelembryos den unabhängigen Ursprung des Lymphsystems beschrieben (Schneider et al., 1999, Wilting et al., 2006).

Die Lymphangiogenese beginnt in Mäuseembryos am Embryonaltag 9.5 (E9.5) mit der Expression von Prox-1 in einer Subpopulation von Zellen in der vorderen kardialen Vene (Wigle and Oliver, 1999). Diese Zellen wandern in der weiteren Entwicklung in einer polarisierten Ordnung in die Umgebung aus und bilden den primären Lymphsack. Diese Entdeckungen untermauern die Hypothese von Sabin und damit des venösen Ursprungs

des Lymphgefäßsystems. Die gerichtete Aussprossung der Prox-1-positiven Zellen lässt darauf schließen, dass die Zellen einem Signalgradienten folgen. Die Arbeitsgruppe um Karkkainen konnte in Versuchen an Mäuseembryos zeigen, dass der Wachstumsfaktor VEGF-C, der schon am Tag E8.5 in der Region der Vena jugularis vorhanden ist, für die Aussprossung der Prox-1 positiven Zellen verantwortlich ist. In VEGF-C defizienten Mäusen kommt es zu keiner Auswanderung von Prox-1-positiven Zellen aus der kardialen Vene (Karkkainen et al., 2004). VEGF-C vermittelt seine Wirkung durch den Tyrosinkinaserzeptor 3 (VEGFR-3), der ein Produkt des Transkriptionsfaktors Prox-1 ist. In der frühen Entwicklung ist VEGFR-3 auch auf Blutgefäßen exprimiert, wird jedoch im Laufe der Entwicklung lymphendothelspezifisch (Karkkainen et al., 2004). VEGF-C ist nicht verantwortlich für die Differenzierung der Endothelzellen in Lymphendothelzellen, wohl aber für die Aussprossung von Prox-1-positiven Zellen und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Lymphgefäßen und von Lymphknotenmetastasen einiger maligner Tumore. Die Schlüsselfunktion der Differenzierung in Lymphendothelzellen lässt sich Prox-1 zuschreiben. Es konnte an Prox-1-defizienten Mäusen zwar eine ungerichtete Aussprossung von einigen Zellen am Tag E10,5 beobachtet werden, jedoch keine weitere Entwicklung in den Lymphsack, in das Lymphgefäßsystem oder Expression von Lymphspezifischen Markern wie LYVE-1, Podoplanin und VEGFR-3 (Wigle et al., 2002). LYVE-1 lässt sich am Tag E10.5 ebenfalls in den Endothelzellen der kardialen Vene detektieren. Er zeigt anfänglich eine weniger gerichtete Expression als Prox-1, ist aber nach Aussprossen der Zellen lymphendothelspezifisch (Wigle et al., 2002). Die Prox-1 und LYVE-1 positiven Zellen sprossen aus der kardialen Vene, getriggert durch VEGF-C und dessen Rezeptor VEGFR-3 aus. Darauf hin kommt es zur Differenzierung in Lymphendothelzellen und Bildung des Lymphsacks, von dem aus die weitere Entwicklung des Lymphgefäßnetzes ausgeht.

1.3 Lymphspezifische Marker

Die Erforschung des Lymphsystems war lange Zeit schwierig, weil es an spezifischen Markern zur genauen Unterscheidung von Blut- und Lymphgefäßen fehlte. Erst durch die Entdeckung der Marker VEGFR-3, Prox-1, Podoplanin und LYVE-1, welche alle eine starke Lymphspezifität aufweisen, konnte eine genaue Beschreibung von Lymphgefäßen und ihrer Entwicklung vorangebracht werden.

1.3.1 Vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3)

Ein Marker in der Lymphangiogenese sowie in der Bestimmung von Lymphgefäßen ist der Tyrosinkinaserzeptor VEGFR-3. VEGFR-3 gehört zur Familie der Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie VEGFR-1 und -2. VEGFR-3 ist ein wichtiger Faktor während der frühen embryonalen Entwicklung des Gefäßsystems. VEGFR-3 knockout Mäuse sterben am Tage E.10 aufgrund von Herzkreislaufversagen (Dumont et al., 1998). Das anfängliche duale Vorhandensein von VEGFR-3 auf Blut- und Lymphgefäßen verändert sich im Laufe der Entwicklung durch eine verminderte Expression auf Blutgefäßen und einer Zunahme auf den Lymphgefäßen, sodass VEGFR-3 als lymphgefäßspezifisch angesehen werden kann (Kaipainen et al., 1995). Die Liganden des Rezeptors VEGFR-3 sind die Wachstumsfaktoren VEGF-C und D, welche wichtige Mediatoren der Lymphangiogenese aber auch Angiogenese sind (Kukk et al., 1996). Witmer und Kollegen untersuchten den Einfluss von VEGFR-3 in der Angiogenese im adulten Gewebe. Sie konnten zeigen, dass es durch Stimulation von VEGF-A in der avaskulären Kornea des Affen zur Ausbildung von VEGFR-3 positiven Gefäßen kam. Im Glioblastom und Kolonkarzinom konnten Witmer et al VEGFR-3 positive Gefäße um Nekroseareale nachweisen. Aufgrund der Beobachtungen beschrieben Sie eine Beteiligung von VEGFR-3 an der Angiogenese nicht nur während der embryonalen Entwicklung sondern auch im adulten Gewebe (Witmer et al., 2001).

1.3.2 Podoplanin

Podoplanin ist ein 38 kDa-transmembranes Glykoprotein, welches vornehmlich auf Lymphendothelzellen exprimiert wird, aber nicht auf Blutgefäßen (Breiteneder-Geleff et al., 1999). Erstmals wurde Podoplanin auf Podocyten der Niere beschrieben (Breiteneder-Geleff et al., 1997). In anderen Geweben wie Skelettmuskel, Plazenta, Lunge, Herz, Mesothelzellen und Osteoblasten wird Podoplanin ebenfalls exprimiert (Martin-Villar et al., 2005). Podoplanin wird eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Lunge vor allem der Epithelzellen Typ 1 der Alveolen zugeschrieben, da Podoplanin defiziente Mäuse nach der Geburt an Lungenversagen sterben (Ramirez et al., 2003). Auch scheint Podoplanin einen wichtigen Einfluss auf die Organisation und Transportfunktion des Lymphsystems zu haben. Schacht et al. konnten nachweisen, dass in Podoplanin defizienten Mäusen die Architektur des Lymphgefäßnetzes und der Transport gestört waren. Es zeigte sich, dass das Blutgefäßsystem im Gegensatz zum Lymphsystem durch das Fehlen von Podoplanin nicht beeinträchtigt wurde (Schacht et al., 2003). In einer neueren Studie wurde Podoplanin auf aus dem Knochenmark isolierten Stammzellen

nachgewiesen. Diese Zellen sollen eine wichtige Quelle für die sogenannte Lymphendothel-Progenitorzellen darstellen (Park et al., 2011). Die Expression von Podoplanin ist in einigen malignen Tumoren wie dem Plattenepithelkarzinom, im Mesotheliom aber auch in Tumoren des ZNS heraufreguliert und scheint einen Einfluss auf das invasive Wachstum der Tumore zu nehmen (Wicki and Christofori, 2007).

1.3.3 Prospero related homeobox Gen-1 (Prox-1)

Prox-1 ist ein Transkriptionsfaktor. Er stellt das Homologon zu dem Homeobox Gen Prospero der Drosophila Fliege dar. Expressionsanalysen haben gezeigt, dass Prox-1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung verschiedener Gewebe wie der Linse des Auges, des Herzens, der Leber und des Zentralen Nervensystems spielt (Oliver et al., 1993). Wie schon im vorherigen Abschnitt beschrieben, lässt sich Prox-1 in einer Subpopulation von Zellen der kardialen Vene nachweisen, welche durch das Aussprossen die Ausgangszellen des Lymphsystems bilden. Weil Prox-1 in verschiedenen Transkriptionswegen eingeschaltet ist und die Proliferation und Differenzierung von Zellen kontrolliert, wird Prox-1 eine tumorsuppressive Funktion und bei Fehlen eine onkogene Funktion zugeschrieben (Elsir et al., 2010). Betschinger et al. konnten zeigen, dass das Drosophila homologon zu Prox-1, Prospero einen tumorsuppressiven Effekt hat, da es die Selbsterneuerung von Neoblasten im ZNS der Drosophila Fliege kontrolliert. In Abwesenheit von Prospero kam es zur Bildung von Hirntumoren im ZNS der Drosophila Fliege (Betschinger et al., 2006). Prox-1 wird eine ähnliche Funktion in der Karzinogenese beim Menschen zugeschrieben. Im hepatozellulären Karzinom konnte eine verminderte Expression von Prox-1 beschrieben werden (Shimoda et al., 2006), wo hingegen in der Karzinogenese von kolorektalen Karzinomen eine Zunahme von Prox-1 beobachtet wurde (Petrova et al., 2008). Die Expression von Prox-1 in Gliomen des ZNS scheint einen Einfluss auf die Prognose und das Überleben der Patienten zu haben. Im Glioblastom konnte im Gegensatz zu einem Astrozytom Grad 2 eine erhöhte Expression von Prox-1 nachgewiesen werden (Elsir et al., 2011).

1.3.4 Lymphatic vessel endothelial hyaluronen Receptor-1 (LYVE-1)

LYVE-1 ist ein Transmembran Protein und gehört zur Familie der Link Proteine. LYVE-1 ist lymphgefäßspezifisch und homolog zu dem Hyaluronsäure Rezeptor CD44, welcher vornehmlich auf Epithelzellen und Leukozyten exprimiert wird (Banerji et al., 1999). LYVE-1 wird eine Funktion in der Aufnahme von Hyaluronsäure und Leukozyten in die Lymphgefäße zugeschrieben (Prevo et al., 2001). Die Expression von LYVE-1 beginnt früh

in der Entwicklung, gemeinsam mit der Expression von Prox-1. In LYVE-1 knockout Mäusen konnte hingegen keine Veränderung in der Entwicklung und Funktion des Lymphsystems nachgewiesen werden (Gale et al., 2006).

1.4 Mesenchymale Stammzellen (MSC)

Mesenchymale Stammzellen sind multipotente Zellen, die zur Selbsterneuerung und unter bestimmten Bedingungen zur Ausdifferenzierung in verschiedene Gewebe fähig sind (Horwitz et al., 2005). Im 19. Jahrhundert studierte der deutsche Pathologe Coheim in Tierversuchen die Wundheilung und beobachtete, dass Fibroblasten aus dem Knochenmark in die Wunde einwanderten und beschrieb das Knochenmark als ein mögliches Reservoir für nicht hämatopoetische Stammzellen (Prockop, 1997). Friedenstein kultivierte Knochenmarkaspirationen in Zellkulturflaschen. Die adhären wachsenden Zellen waren zur Zellteilung und Bildung von Knochen- und Knorpelgewebe fähig. Sie waren multipotent und in der Lage, sich zu Osteoblasten und Chondrozyten zu differenzieren (Friedenstein et al., 1966). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass diese mesenchymalen Stammzellen unter bestimmten Bedingungen auch zur Differenzierung in Adipozyten, Tenozyten, Myozyten, Endothelzellen und Neuronen fähig sind (Pittenger et al., 1999, Wakitani et al., 1995, Woodbury et al., 2000). Nicht nur aus dem Knochenmark konnten mesenchymale Stammzellen isoliert werden; es zeigte sich, dass auch in anderen Geweben wie im Fettgewebe, in der Amnionflüssigkeit, dem Periosteum und im fetalen Gewebe mesenchymale Stammzellen vorhanden sind (Campagnoli et al., 2001, Nakahara et al., 1991, Zuk et al., 2002). Bis heute fehlt es an einzelnen spezifischen Markern zur Identifizierung von MSC. Es ist viel mehr eine Kombination aus dem Vorhandensein und dem Fehlen bestimmter Marker, die zur Beschreibung von MSC herangezogen werden. Adulte mesenchymale Stammzellen sind negativ für die hämatopoetischen Marker CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 und HLA-DR, aber positiv für die Stammzellmarker CD105, CD90, CD73, CD106 (Dominici et al., 2006). Mesenchymale Stammzellen können durch von geschädigtem oder malignem Gewebe sezernierten Stoffen wie Chemokinen aus dem Knochenmark mobilisiert werden und in das Gewebe einwandern. Dort tragen sie zur Regeneration und Vaskularisation bei. Jackson und Kollegen untersuchten das Verhalten von MSC nach Transplantation in ein durch einen Herzinfarkt geschädigtes Gewebe und konnten zeigen, dass die MSC an der Regeneration des Gewebes ihren Anteil hatten (Jackson et al., 2001). Eine andere

Arbeitsgruppe konnte ähnliche Vorgänge nach einem ischämischen Hirninfarkt zeigen. Hier wanderten MSC in das geschädigte Hirngewebe ein und es kam zu einer Verbesserung der Symptome (Chen et al., 2001). Durch dieses Migrationsverhalten sind MSC mögliche Vektoren für zielgerichtete Gentherapie von malignen Tumoren wie dem Glioblastom. Schichor und Kollegen untersuchten das Migrationsverhalten von MSC und konnten zeigen, dass unter anderem der Wachstumsfaktor VEGF-A ein wichtiger Faktor für die Einwanderung von MSC in das maligne Glioblastom darstellt (Schichor et al., 2006). VEGF-A wird vom Glioblastom sezerniert und scheint nicht nur einen großen Einfluss auf das Migrationsverhalten von MSC, sondern ebenfalls auf die starke Vaskularisation des Tumor zu haben (Kargiotis et al., 2006). In der Lymphangiogenese scheinen die MSC ebenfalls eine Rolle zu spielen. Conrad und Kollegen konnten zeigen, dass MSC unter Kultivierung mit Überstand von Lymphendothelzellen und VEGF-C bestimmte Lymphendothelzellmarker wie Podoplanin oder Prox-1 exprimierten und, dass sich im Mausmodell nach Injektion von MSC in ein artifizielles Lymphödem der Abfluss der Lymphe im Gegensatz zur Kontrollgruppe besserte (Conrad et al., 2009).

1.5 Glioblastoma multiforme

Das Glioblastom ist der häufigste maligne Hirntumor im Erwachsenenalter. Der Tumor geht von den Gliazellen/Astrozyten des Gehirns aus und zählt wie die Oligodendrogliome und Ependymome zu den neuroepithelialen Tumoren. In der aktuellen WHO Klassifikation von 2016 werden die ZNS Tumore neben ihrem histologischen Differenzierungsgrad (Grade I-IV) auch anhand von molekularen Markern wie Isocitrat Dehydrogenase (IDH-mutant/IDH-wildtype) eingeteilt (Louis et al., 2016). Das Glioblastom ist ein hoch maligner, schnell und infiltrativ wachsender, sehr stark vaskularisierter Tumor. Die Therapie besteht in einer möglichst vollständigen chirurgischen Entfernung, die auf Grund des infiltrativen Wachstums meist unmöglich ist, sowie in adjuvanter Radio- und Chemotherapie. Die Prognose der Patienten ist trotz der Therapie infaust. Das mediane Überleben liegt bei 10-12 Monaten (Sathornsumetee et al., 2007). Das Glioblastom wird auf Grund seiner Entstehung in das primäre Glioblastom, welches „de novo“ entsteht und in das sekundäre Glioblastom welches sich aus einem low-grade Astrozytom entwickelt, eingeteilt. Das primäre Glioblastom kommt vor allem bei älteren Patienten vor, das mediane Erkrankungsalter liegt bei 50-55 Jahren. Diese Tumore zeigen vor allem den molekularen Marker IDH-wildtype, welcher mit einer

deutlich schlechteren Prognose assoziiert ist (Cohen et al., 2013). Das sekundäre Glioblastom zeigt sich eher bei jüngeren Patienten. Hier liegt das mediane Erkrankungsalter bei 40 Jahren (Dropcho and Soong, 1996, Watanabe et al., 1996). Im histologischen Schnitt zeigt sich die namensgebende Struktur des Glioblastoma multiforme aus einem Nebeneinander von Nekrosearealen mit vitalem Tumorgewebe mit hoher Mitoserate und Zellpolymorphie. Weitere Malignitätskriterien des Glioblastoms sind seine sehr starke Vaskularisation und die weitgehende Chemo- und Radiotherapieresistenz, die zum einem mit der Hypoxie-assoziierten Angiogenese aber auch mit dem Vorhandensein von Tumorstammzellen in Verbindung gebracht wird (Hjelmeland et al., 2011).

1.6 Angiogenese im Glioblastoma multiforme

Viele Studien beschäftigen sich mit dem Thema der Angiogenese und Vasculogenese auch im Bezug auf neue Therapieoptionen zur Behandlung des Glioblastoms. Die Angiogenese beschreibt den Vorgang der Entstehung von neuen Blutgefäßen ausgehend von schon vorbestehenden Blutgefäßen, die Vasculogenese hingegen die Entstehung von Blutgefäßen unabhängig von existierenden Blutgefäßen (Lyden et al., 2001). Beide Vorgänge scheinen einen Einfluss auf die starke Vascularisation des Glioblastoms zu nehmen. Das Glioblastom ist ein Tumor, in dem in hohem Maße VEGF exprimiert wird. VEGF-A und seine Rezeptoren VEGFR-1 und -2 sind bekannte Wachstumsfaktoren der Angiogenese in der embryonalen Entwicklung aber auch während der Neovascularisation (Plate et al., 1992). Hypoxie innerhalb des Tumors, vor allem aber im Randbereich der Nekroseareale, induziert die Synthese von HIF-1. Dies führt zu Transkription von VEGF und weiteren proangiogenen Faktoren wie SDF-1 α (Zagzag et al., 2000), was zur Proliferation und Migration von Endothelzellen und Progenitorzellen führt. VEGF-A ist bei der Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen in das Glioblastom beteiligt. Schichor et al. konnten nachweisen, dass durch VEGF-A getriggerte MSC in das Glioblastom einwandern und so mögliche Faktoren für eine antiangiogene Therapie sein könnten (Schichor et al., 2006). Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF-A, der in der Therapie verschiedener Tumore wie dem metastasierten Kolonkarzinom, beim Mammakarzinom, beim Glioblastoma multiforme eingesetzt wird und antiangiogene Effekte zeigt (Braghiroli et al., 2012, Jubb et al., 2006). Bevacizumab ist in den letzten Jahren zu einem Element der Therapie bei rezidivierenden Glioblastomen

geworden (Nagpal et al., 2011). Den anfänglichen Optimismus trübende Beobachtung nach Therapie mit Bevacizumab ist, dass es nach der Therapie zu einer Zunahme der Invasivität sowie einer wieder einsetzenden Angiogenese kommt. Es wird vermutet, dass der Tumor durch Blockade der verminderten Angiogenese durch VEGF-A andere Mechanismen aktiviert, die die so genannte „second wave of angiogenesis“ fördern (Keunen et al., 2011).

1.7 Tumor-Lymph-Angiogenese

Neben der Angiogenese hat auch die Lymphangiogenese einen wichtigen Einfluss auf Malignität und Metastasierung vieler solider Tumore. Die Mechanismen die zur Lymphangiogenese und Lymphknotenmetastasierung führen sind Gegenstand vieler Studien. VEGF-C konnte durch Versuche von Karpanen et al. an VEGF-C überexprimierenden Brustkrebszellen eine wichtige Rolle in der Tumor-Lymphangiogenese nachgewiesen werden (Karpanen et al., 2001). Durch die Expression von VEGF-C zeigt sich eine Zunahme von Lymphgefäßen innerhalb des Tumors sowie eine Zunahme der Lymphknotenmetastasen in der Peripherie des Tumors. VEGF-C vermittelt seine Wirkung durch VEGFR-3, welcher in der frühen Entwicklung auf Blutgefäßen exprimiert wird, später aber lymphgefäßspezifisch wird. Durch die Blockierung von VEGFR-3 konnten He und Kollegen eine Verringerung der Lymphgefäße innerhalb des Tumormodells (Bronchialkarzinom) und eine Verminderung der Lymphknotenmetastasen zeigen (He et al., 2002, He et al., 2005). Obwohl das Zentrale Nervensystem des Menschen eines der Gewebe des Menschen ist, welches keine Lymphgefäße aufweist, konnten im Glioblastom lymphgefäßspezifische Marker wie VEGFR-3 und Podoplanin nachgewiesen werden (Grau et al., 2008). Interleukin-3 (IL-3) stimuliert die Differenzierung, das Überleben und die Proliferation von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. IL-3 konnte ein stimulierender Einfluss auf die Expression von Prox-1 und Podoplanin in Lymphendothelzellen (LEC) nachgewiesen werden (Groger et al., 2004).

2 Zielsetzung

Durch die Beschreibung von Lymphgefäßmarkern wie VEGFR-3 und Podoplanin wurde die Hypothese eines möglichen lymphangiogenen Phänotyps neu gebildeter Gefäße innerhalb des Glioblastoms formuliert. Das Ziel dieser Arbeit ist, vor dem Hintergrund des lymphangiogenen Phänotyps maligner Gliome den Zusammenhang mit mesenchymalen Progenitorzellen zu erforschen.

Dazu wurden folgende Fragestellungen formuliert:

- Besteht eine Expression von lymphangiogenen Markern im histologischen Gewebeschnitt des Glioblastoms?
- Werden lymphangiogene Marker von mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks gesunder Probanden exprimiert?
- Haben sezernierte Faktoren der Glioblastomzellen einen Einfluss lymphangiogene Marker in Knochenmark-isolierten MSC (bmMSC) zu induzieren?
- Können lymphangiogene Marker in bmMSC durch IL-3 induziert werden?

3 Material/Methoden

3.1 Geräte

Gerätename	Hersteller
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss
Axioskop 2 Mikroskop	Zeiss
LSCM SP2 Laser Scanning Konfokal Mikroskop	Leica
PowerShot A620	Canon
LightCycler 2.0	Roche

3.2 Zellen

Im nachfolgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Zellreihen, die Bestimmung der Zellzahl, die Inkubation und die Isolierung der mesenchymalen Stammzellen beschrieben.

3.2.1 Glioblastomzellen/U87

Für die Versuche mit Glioblastomzellen wurde die Zelllinie U87 MG (ACCT) verwendet. Die Zellen wurden mit 10%igem FCS DMEM-Medium in Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂-angereicherter Atmosphäre bei hoher Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Für die Zusammensetzung des Mediums siehe Punkt 3.3.1.2. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. In regelmäßigen Abständen mussten die Zellen gesplittet werden um optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen. Das Medium wurde abpipettiert und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen wurden die Zellen für 2-3 min je nach Flaschengröße mit 2-8 ml Trypsin/EDTA behandelt. Lösten sich die Zellen vom Boden ab, wurden sie mit der doppelten Menge Medium ohne Antibiotikazusatz aufgenommen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das gewonnene Pellet wurde in 1 ml Medium aufgenommen. Je nach Menge der Zellen wurden die Zellen auf zwei oder mehr Kulturflaschen aufgeteilt, weggefroren oder für Versuche auf Objektträger ausgesät. Die minimale Zahl von Zellen, die zurück in die Kulturflasche gegeben wurden, sollte nicht unter 200.000 Zellen bei einer mittelgroßen Flasche liegen.

3.2.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl zu ermitteln, wurden die Zellen mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer gezählt. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe mit 20 µl Trypanblau und 20 µl Zellsuspension in Mikrotiterplatten angesetzt. Von dieser Verdünnungsreihe wurden 8-10 µl in die Zählkammer gefüllt. Alle vier äußeren Quadranten der Zählkammer wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und der Mittelwert M der vier Quadranten errechnet. Die Zellzahl wird anhand der Formel $M \times \text{Verdünnung} \times 10^4$ errechnet.

3.2.2 Mesenchymale Stammzellen

Als mesenchymale Stammzellen wurden selbst isolierte mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (bmMSC) verwendet. Das Protokoll zur Isolierung der Stammzellen ist im Labor etabliert. Die Knochenmarkspende erfolgte nach Aufklärung und einer Einverständniserklärung des Spenders. Die isolierten Stammzellen wurden nach ihrem Herkunftsort, dem Knochenmark und ihrer Charge benannt. In dieser Arbeit wurde mit den Stammzellreihen bone marrow BM6, BM7 und BM8 gearbeitet. Die isolierten mesenchymalen Stammzellen wurden mit 20%igem FCS DMEM-Medium bei 37 °C in Kulturflaschen im Brutschrank kultiviert.

3.2.2.1 Inkubation mesenchymaler Stammzellen mit tumor-konditioniertem Medium

Die mesenchymalen Stammzellen wurden auf Objektträgern ausgesät. Auf die Objektträger wurde eine 1:1 Mischung aus 20%igem FCS DEME-Medium und tumor-konditioniertem Medium geben. Die Zellen wurden je nach Versuchsaufbau für 2, 4 oder 5 Tage mit dieser Mischung aus 20%igem FCS Medium und tumor-konditioniertem Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels Immunocytochemie angefärbt, um die Auswirkung des tumor-konditionierten Mediums auf die Expression lymphangiogener Marker zu untersuchen.

3.2.2.2 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen

Produktname	Hersteller	Artikelnummer
HistoPack	Sigma Aldrich	H 8889
Zellsieb 70µm	BD Bioscience Falcon	352350
Zellsieb 40µm	BD Bioscience Falcon	352340

Das Knochenmark wurde mit PBS-Puffer versetzt und die Suspension über Filter mit Porengröße 70 µm in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Suspension wurde erneut über einen Filter mit Porengröße 40 µm in ein zweites Falcon-Röhrchen umgefüllt. Zur Anreicherung von mononukleären Zellen wurde die Zell-Medium-Suspension mit HistoPak im Verhältnis 2:1 aufeinander geschichtet, d. h. es wurden 1 Teil HistoPak (15 ml) und 2 Teile Zell-Medium-Suspension (30 ml), vorsichtig aufeinander geschichtet, so dass sich die Phasen nicht vermischt haben. Das Falcon-Röhrchen wurde 20 min bei 12 °C und 1500 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen. Die mittlere Phase wurde vorsichtig abgesaugt und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und mit 10 ml DMEM-Medium (20% FCS) vermischt. Das Falcon wurde erneuert für 10 min bei 12 °C und 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml DMEM aufgenommen. Es wurde erneut 10 min bei 12 °C und 1500 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml DMEM resuspendiert und in eine mittlere Zellkulturflasche überführt. Um zu zeigen, dass es sich bei den isolierten Zellen um multipotente Stammzellen handelt, wurden Differenzierungsversuche durchgeführt. Die weitere Charakterisierung erfolgte über die Analyse der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie.

3.3 Zellkultur

Produktname	Hersteller	Artikelnummer
Dulbeccos MEM	Biochrom	F 0455
MEM NEAA Mediumzusatz	Invitrogen/Gibco	11140-035
Pen/Strep/Glut Lösung	Invitrogen/Gibco	10378-016
Trypsin/EDTA (0.5%/0,2%)	Biochrom	L 2153
FCS Fötale Kälberserum	Biochrom	S 0115
PBS Puffer		
Zellkulturflasche	TPP	90026
Zentrifugenröhrchen PP Falcon 15 ml	TPP	91015
Zentrifugenröhrchen PP Falcon 50 ml	TPP	91051
Zählkammer nach Neubauer	Roth	T728.1
Deckglas 24x50 mm	VWR/Merck	631-0146

3.3.1 DMEM 10% und 20% FCS Medium

Das 10% FCS DME-Medium wurde wie folgt zusammengesetzt.

- 440 ml Dulbecco's MEM-Grundmedium
- + 5,0 ml MEM NEAA
- + 5,0 ml Pen/Strep/Glut
- + 50 ml FCS (für 10%) oder + 100 ml FCS (für 20 %)

3.3.2 Tumor-konditioniertes Medium

U87 Zellen wurden in große Zellkulturflaschen ausgesät und über Nacht mit 10% FCS DMEM Medium im Brutschank bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Nun wurde den Zellen ein Medium ohne FCS gegeben und ein bis zwei Tage inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und bei 1500 U/min 5 min zentrifugiert um Zellreste zu entfernen. Der Überstand wurde in 5 ml Aliquots abgefüllt und eingefroren.

3.3.3 DMEM Medium mit IL-3 Zusatz

Für den IL-3 Medium Zusatz wurde eine 0,1%ige BSA/PBS-Lösung hergestellt. 0,5% BSA wurden mit 50 ml PBS vermischt, dies ergab eine 1%ige Lösung. Von dieser Lösung wurden 2 ml in 18 ml PBS gegeben, was einer 0,1%igen Lösung entsprach. Von der 0,1%igen Lösung wurden 100 µl mit 10 µl IL-3 vermischt. Pro Milliliter Medium wurden 1 µl IL-3 0,1%ige BSA/PBS-Lösung verwendet.

3.3.4 Co-Kultur U87 und mesenchymale Stammzellen

Um die direkte Beeinflussung der mesenchymalen Stammzellen durch Tumorzellen des Glioblastoms zu untersuchen, wurden Co-Kulturversuche angesetzt. Dazu wurden die Zellen in einer 6-Well-Co-Kulturschale ausgesät. In die untere Schale wurden die mesenchymalen Stammzellen und in die obere die U87-Tumorzellen ausgesät. Beide Zellreihen wurden mit 20%igem DMEM-Medium behandelt und dieses alle zwei Tage gewechselt.

3.4 Differenzierungsassay

Produktname	Hersteller	Artikelnummer
Dexamethasone	Sigma	D-4902
Indomethacin	Sigma	I-7378
Isobutylmethyanthin	Sigma	I-7018

Oil Red O	Sigma	O-0625
L-Ascorbic Acid	Sigma	A-5960
Silver nitrat	Sigma	S-6506
Sodium Thiosulfat	Sigma	S-7026
Neural Red Solution	Sigma	N-2889
β -Glycerophosphate	Fluka	50020
Insulin	Sigma	I-9278
Petrischalen		

Die Differenzierungsfähigkeit der isolierten Stammzellen zur Osteo- und Adipogenese wurde durch Inkubation mit verschiedenen Medien getestet. Für jede der drei Zelllinien BM6, BM7 und BM8 wurden 6 Petrischalen mit je 50.000 Zellen ausgesät. Je 2 Schalen wurden mit 4 ml FCS DMEM-Medium 20% FCS ohne Zusätze behandelt. Zwei wurden mit 4 ml 20%igen FCS DMEM Medium mit Zusätzen für Osteogenese und zwei Schalen mit 4 ml Medium mit Zusätzen für Adipogenese behandelt. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt und die Zellmorphologie unter dem Mikroskop kontrolliert.

Osteogenese Medium:

- 100 ml 20%iges FCS DMEM Medium
- 10 μ l Dexamethason
- 1 ml β -Glycerophosphat
- 100 μ l L-Ascorbic Acid

Adipogenese Medium:

- 100 ml 20%iges FCS DMEM Medium
- 100 μ l Dexamethasone
- 10 μ l Isobutylmethylxanthine
- 150 μ l Indomethacin
- 100 μ l Insulin

3.4.1 Färbung der Differenzierungsassays

Um die Differenzierung hin zu Osteoblasten mit Bildung von Calcium-Depots und Adipozyten mit der Einlagerung von Fetttropfen zu zeigen, wurde die nachfolgend beschriebenen Färbungen durchgeführt.

3.4.1.1 Osteogenese

Das Medium wurde abpipettiert und die Zellen mit 4%igem PFA pro Petrischale für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Aqua dest. wurden die Zellen mit einer Silbernitrat-Lösung (0,25 mg Silbernitrat in 20 ml Aqua dest.) unter UV-Licht für 60 min behandelt. Vor dem nächsten Schritt wurde erneut einmalig mit Aqua dest. gewaschen und die Zellen nun mit einer 5%igen Natriumthiosulfat-Lösung für 10 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Aqua dest. wurden die Zellen für 8 min mit Neutral Red Solution behandelt und erneut mit Aqua dest. gewaschen und getrocknet.

3.4.1.2 Adipogenese

Das Medium wurde abpipettiert und die Zellen mit 4%igem PFA bei Raumtemperatur fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Zellen für 10 min mit 60%igem Isopropanol (60 ml Isopropanol + 40 ml Millipore Wasser) behandelt. Nach 30 min Trocknen wurden die Zellen mit Oil-Red-O-Arbeitslösung gefärbt.

- Oil-Red-O-Arbeitslösung: 700 mg Oil Red O + 200 ml Isopropanol gut mischen. Davon werden 60 ml mit 40 ml Aqua dest. gemischt und 20 min stehen gelassen. Hiervon werden 30 ml über einen Filter auf die Zellen gegeben.

Die Oil-Red-O-Arbeitslösung wurde für 10 min auf den Zellen belassen. Nach dem Abgießen der Oil-Red-O-Arbeitslösung wurden die Zellen mit Aqua dest. gewaschen und getrocknet. Die angefärbten Zellen wurden zur Dokumentation der stattgefundenen Differenzierung unter dem Mikroskop mit einer PowerShot-Kamera von Canon fotografiert.

3.5 Durchflusszytometrie zur Bestätigung der mesenchymalen Stammzellmarker

Mittels Durchflusszytometrie können bestimmte Oberflächenmarker von einzelnen Zellen bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie neben den Differenzierungs-Versuchen zur Bestimmung der selbst isolierten mesenchymalen Stammzellen angewandt. Die Zellen wurden auf die Oberflächenmarker CD45, CD90, CD105, CD31 und CD34 untersucht. Nach Lösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche mit Trypsin/EDTA wurden diese in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei

1200 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in PBS mit 1% BSA resuspendiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit Propidiumiodid behandelt. Anschließend erfolgte die Messung in dem FACS Calibur.

3.6 Antikörper für FACS

Antikörper	Hersteller	Artikelnummer
CD45	Serotec	MAC87PE
CD90	Serotec	MAC90PE
CD105	Serotec	MAC1557PE
CD31	Serotec	MAC1738PE
CD34	BD	555822
Mouse IgG1 PE	Serotec	MAC928PE
IgG2a PE	Serotec	MAC929PE

3.7 Antikörper für die Immunzyto- und Immunhistochemie

Antikörper			Hersteller	Artikelnr.	Menge
Prox-1	rabbit IgG	polyclonal	Abcam	ab119401	
VEGF-R3	rabbit IgG	polyclonal	Abcam	ab15295	2 µg/ml
Podoplanin	mouse IgG1	monoclonal	Acris	DM3500P	0,5 ng/ml
LEVE-1	rabbit IgG	polyclonal	Arcis	DP3500PS	0,5 mg/ml
CD90	mouse IgG1	monoclonal	Dianova	DIA100	0,2 ng/ml
CD105	mouse IgG1	monoclonal	Serotec	MCA155t	
IgG1	mouse IgG1	monoclonal	Chemicon	CBC309	0,5 ng/ml
IgG2a	Mouse IgG2a	monoclonal	Serotec	MCA691	0,1 ng/ml

3.8 Fluoreszenz-Antikörper

Produktname		Hersteller	Artikelnr.	Menge
Texas Red		Vector Labs	TI-1000	1,5 mg/ml
Fitc		Sigma	F9137	

Alex Flour 488	goat anti-rabbit IgG	Invitrogen	A11034	2 mg/ml
Alex Flour 647	goat anti-rabbit IgG	Invitrogen	A11001	2 mg/ml
VEGF-R3	goat IgG	R+D	AF349	0,2 mg/ml
CD90-PE		Serotec		

3.9 Immunzytochemie

Produktname	Hersteller	Artikelnummer
DAB+Substrat-Chromogen	Dako	K 3468
ACE Substrat-Chromogen	Dako	K 3464
Universal LSAB Plus Kit	Dako	K 0690
Antibody Diluent	Dako	S 3022
Protein Block	Dako	X 0909
Peroxidase Blocking reagent	Dako	S 2001
Biotinylated Link	Dako	0675
Eosin	Dako	HAT 110-1128
Methanol reinst	Roth	8388.1
Hisol	Roth	6640.1
2-Propanol	Roth	9866.1
Aceton	VWR/Meck	179124
Brij 24 Lösung	VWR/Merck	1.01894.0100
Mayer's Häkalaun Lösung	VWR/Merck	1.09249.0500
Entellan	VWR/Merck	1.07961.0100
OT Superfrost Ultra Plus 76x26 mm	Wagner&Munz	J3800AMNZ
Markierungsstift PAP Pen Hydrophob	Wagner&Munz	-888
Tris	Sigma	T1503
NaCl 0,3 M	VWR/Merck	1.06404.1000

Die Immunzytochemie dient dem Nachweis von Proteinen, welche mittels spezifischen Antikörpern mit einem Chromogen oder Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörpern sichtbar gemacht werden können.

Die Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach Abwaschen nicht angewachsener Zellen wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert. Nun wurden die Zellen für 10 min mit Peroxidase-Blocking-Reagenz bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert und mit PBS gewaschen. Um die unspezifische Bindung der Antikörper zu blockieren, wurden die Zellen für mindestens 1 h mit dem Protein Block behandelt. Es erfolgte kein Waschschrift nach dem Protein-Block. Im nächsten Schritt wurden die primären Antikörper (Prox-1, LYVE-1, Podoplanin, VEGF-R3, CD90, CD105) mit Antibody diluent verdünnt auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden nach Inkubation mit dem primären Antikörper mit TRIS/Brij gewaschen. Nun wurde für je 10 min erst mit Biotinylated Link und dann mit Streptavidin-HRP inkubiert und jeweils mit TRIS/Brij gewaschen. Für die Färbung der gebundenen Antikörper wurde AEC oder DAB verwendet. AEC-Chromogen (Merk, #1.20017.0001) wurde für max. 10 min unter Mikroskopkontrolle inkubiert, mit Aqua dest. abgespült und dann mit Hämatoxillin für maximal 1 min gegengefärbt. DAB wurde unter Mikroskopkontrolle auf die Schnitte gegeben und, sobald sich der Schnitt rot-braun färbte, mit Aqua dest. abgespült. Es wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxillin durchgeführt. Die Schnitte mit der DAB Färbung wurden zur Dehydratisierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (5 min 70% EtOH, 5 min 96% EtOH, 5 min 100% EtOH und 15 min in Histol) geführt. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckelt und unter dem Mikroskop analysiert und fotografiert.

3.10 Immunzytochemie-Fluoreszenz

Für die immunzytochemische Fluoreszenzfärbung wurden die Zellen bis zum primären Antikörper wie bei der oben beschriebenen Immunzytochemie behandelt. Nach dem primären Antikörper wurden die Objektträger für 3 mal 10 min mit Tris/Brij gewaschen. Nun wurden die Zellen mit einem Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Tris/Brij für 3 mal 10 min wurde eine Kernfärbung mit DAPI für 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einem weiteren Waschgang mit Tris/Brij wurden die Zellen mit Mounting Medium eingedeckelt. Die Immunfluoreszenz wurde am LEICA LCSM SP2 Konfokal-Mikroskop ausgewertet.

3.11 Hope-Schnitte

Die Glioblastom-Gewebe wurden nach Gewinnung in HOPE (Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect) fixiert und die gehärteten Paraffinblöcke im Kühlschrank gelagert. Zum Schneiden der Paraffinblöcke wurde ein Mikrotom verwendet. Die 5 µm dünnen Schnitte wurden mit Hilfe eines Seidenpapiers vom Mikrotom abgenommen und in ein 39 °C warmes Wasserbad gegeben. Die Schnitte wurden auf einem Objektträger aufgenommen. Diese wurden bei 37 °C über Nacht getrocknet. In diesem Zustand konnten die Schnitte im Kühlschrank gelagert werden.

3.12 Immunhistochemie

Zur Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte für 10 min und für 20 min in 60 °C Isopropanol getaucht und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Um die Schnitte wieder zu fixieren, wurden sie für 10 min in 70%iges, eiskaltes Aceton getaucht. Das Aceton wurde auf Filterpapier abgetropft und die Schnitte für weitere 10 min in Aqua dest. gewaschen.

Die Schnitte wurden 3 x 5 min mit PBS gewaschen und danach für 10 min mit Peroxidase-Blocking-Reagenz inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrritten mit PBS wurde die Schnitte für 1h mit Protein Block behandelt. Es folgte kein Waschschrtritt nach dem Protein-Block. Die primären Antikörper, verdünnt mit Antibody diluent, wurden auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach den primären Antikörpern wurde wiederum mit TRIS/Brij 3 x 5 min gewaschen. Als sekundäre Antikörper wurde für 10 min mit Biotinylated Link inkubiert, erneut mit TRIS/Brij gewaschen und weitere 10 min mit Streptavidin inkubiert. Zur Farbreaktion wurde DAB (1 Tropfen DAB Chromogen in 1 ml DAB-Substratpuffer) verwendet. Die DAB Färbung wurde wie in Abschnitt 2.9. beschrieben durchgeführt.

3.13 Lymphgefäßfärbung

Die Lymphgefäße wurden vom Pathologischen Institut der LMU zur Verfügung gestellt. Die Lymphgefäße wurde mit der HOPE-Methode fixiert und Gewebeschnitte angefertigt. Die Lymphgefäße wurden mit DAB gefärbt und die Antikörper VEGF-R3, LYVE-1, Podoplanin und CD105 in ihrer Eigenschaft als Lymphgefäßmarker getestet.

4 Ergebnisse

4.1 Färbung von lymphangiogenen Markern am Gewebeschnitt des Menschen

Die Lymphgefäße wurden mit DAB-Chromogen und den Antikörpern VEGFR-3, LYVE-1, Podoplanin und CD105 gefärbt. Die Färbung dient dem Nachweis von lymphspezifischen Markern und zur Differenzierung von Gefäßanfärbungen innerhalb der Immunhistochemie von Glioblastomschnitten. In Abbildung 1 sind die Färbungen dargestellt. Im Vergleich zur Negativkontrolle erkennt man bei der VEGFR-3-Färbung ein deutliches Signal. Die rotbraun Färbung der Gefäßwand deutet auf eine Expression von VEGFR-3 in der Gefäßwand der in diesem Schnitt sichtbaren Gefäße hin (Abb. 1 F und I). Im Gegensatz zur VEGFR-3-Färbung sieht man bei der Podoplanin-Färbung nur wenige gefärbte Abschnitte des Gefäßes, diese sind Podoplanin positiv (Abb. 1 D und G). Die LYVE-1 Färbungen zeigen ein gering erkennbares Signal (Abb. E und H). Es lässt sich erkennen, dass sich einige Zellen innerhalb der Gefäßwand rotbraun anfärben ließen. LYVE-1 wird von diesen Zellen exprimiert. CD105 – vor allem ein Marker für Endothelzellen und Stammzellen und nicht spezifisch für Lymphgefäße – lässt sich mit einer Betonung der äußeren Schichten der Lymphgefäße nachweisen (Abb. 1 C). In der Elastica-van-Gieson-Färbung sieht man die dunkel gefärbten elastischen Fasern der Gefäßwand (Abb. 1 A).

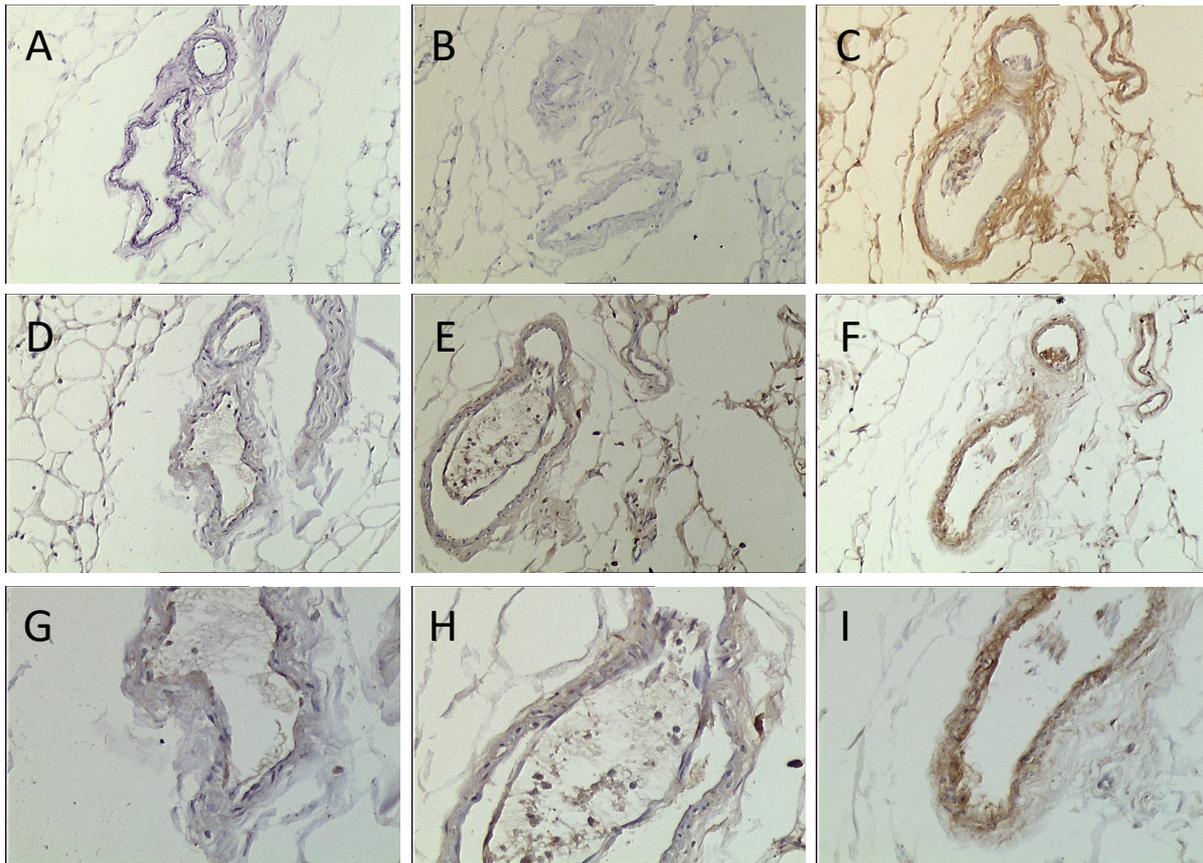


Abbildung 1 Immunhistochemie von Lymphgefäßen eines Menschen aus der Axilla

A: Elastica van Gieson Färbung, B: Negativ Kontrolle, C: CD105. D und G: Podoplanin, E und H: LYVE-1, F und I: VEGFR-3

4.2 Immunhistochemie von Glioblastomgewebe

In Übereinstimmung mit Arbeiten anderer Autoren lassen sich die lymphspezifischen Marker VEGFR-3 und Podoplanin im Gegensatz zum Normalhirn in Glioblastomgewebe nachweisen (Grau et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit werden neben den genannten Marker zusätzlich die lymphspezifischen Marker LYVE-1 und Prox-1 sowie die Endothel- und Stammzellmarker CD90 und CD105 untersucht. Vor allem in gefäßreichen Bereichen des Tumorgewebes, aber auch in einzelnen Zellen in der Gefäßwand, konnte VEGFR-3 nachgewiesen werden (Abb. 2 A und B). Podoplanin positive Zellen zeigten sich vor allem dicht um die Gefäße herum, aber schwächer ausgeprägt als bei VEGF-R3 (Abb. 2 C und D). Erstmals konnte auch eine positive Färbung für den lymphspezifischen Marker LYVE-1 im Glioblastomschnitt nachgewiesen werden. In einigen sehr kleinen Gefäßen innerhalb des Tumors, vor allem in den inneren Schichten des Gefäßes, zeigte sich ein umschriebenes Signal für den Antikörper LYVE-1 (Abb. 2 E und F). Die Prox-1-Färbung zeigte kein sicher zu verwertendes Signal. An einigen Schnitten lagen etwas kräftiger

gefärbte Zellen vor, welche nicht klar als positiv gewertet werden konnten (Abb. 2 G und H). Die Marker CD90 und CD105 konnten in Glioblastomgewebe nachgewiesen werden. CD90 zeigte ein kräftiges rotbraunes Signal der Gefäßwände ohne Beteiligung des umliegenden Gewebes, wobei die äußeren Zellen der Gefäßwände ein starkes Signal zeigen. (Abb. 2 K und L). Bei der CD105-Färbung fand sich eine Betonung der Färbung der Zellen an der inneren Gefäßwand (Abb. 2 I und J). IgG1- und IgG2a-Färbungen dienten als Negativkontrolle und um unspezifische Bindung der Antikörper auszuschließen. Bei IgG1 und IgG2a ließen sich keine Signale nachweisen (Abb. 2 M und P).

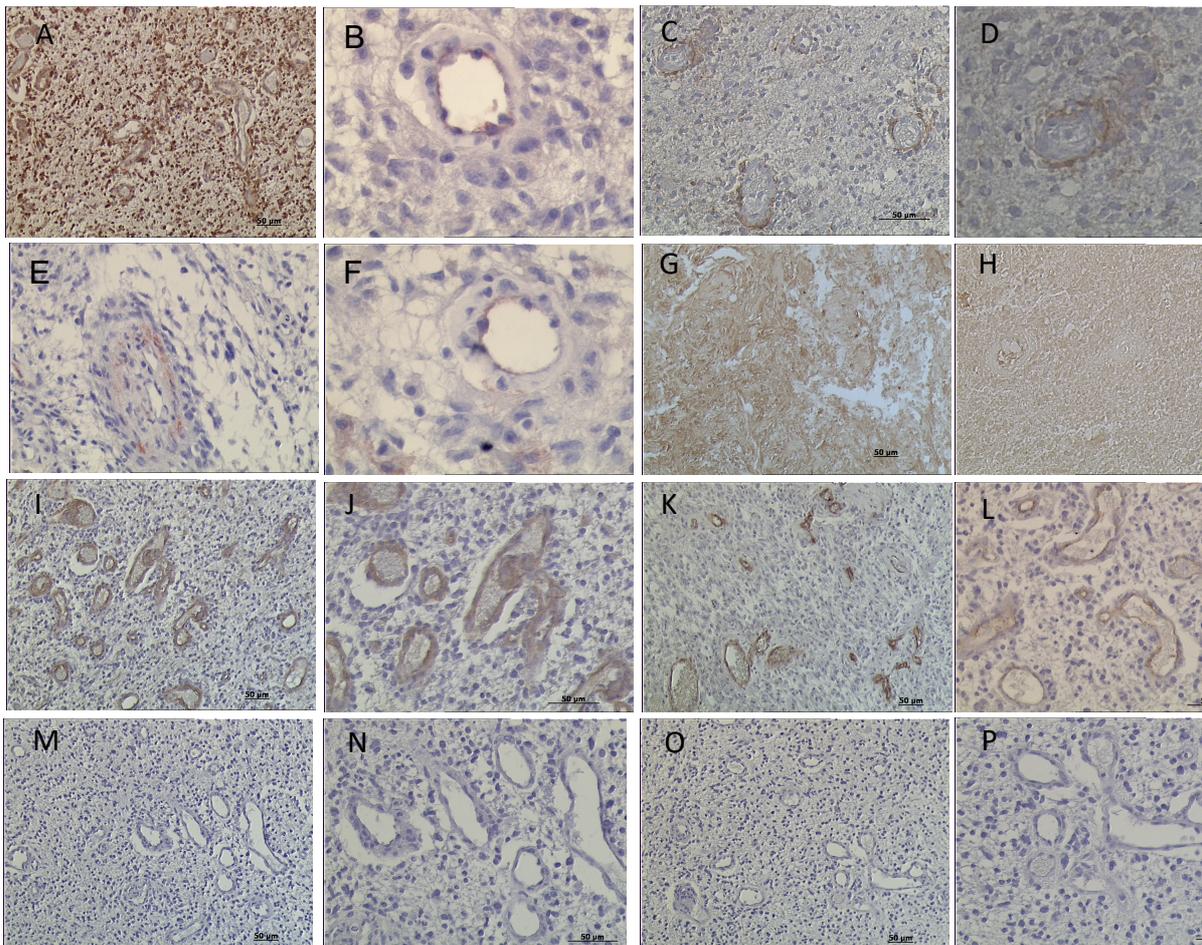


Abbildung 2 Immunhistochemie von Glioblastoma multiforme Gewebe

A/B: VEGFR-3 positiv, C/D: Podoplanin positiv, E/F: LYVE-1 positiv, G/H: Prox-1 positiv, I/J: CD105 positiv, K/L: CD90 positiv, M/N: IgG1 Negativkontrolle, O/P: IgG2a Negativkontrolle

4.3 Färbung der U87-Zelllinie

Die U87-Zellen wurden nach Anwachsen auf Objektträgern mit AEC und den Antikörpern VEGFR-3, Podoplanin, LYVE-1, Prox-1, CD90, CD105, IgG1 und IgG2a gefärbt. Untersucht werden sollte, ob die Tumorzellen selbst Lymphmarker exprimieren und um einen

Vergleich zu den bmMSC zu haben. In Abbildung 3 sind die Ergebnisse der U87-Färbung dargestellt. VEGFR-3 konnte auf den meisten Tumorzellen nachgewiesen werden (Abb. 3 A und B), wohingegen die ebenfalls lymphspezifischen Marker Podoplanin und LYVE-1 negativ waren (Abb. 3 C bis F). Der nukleäre Marker Prox-1 konnte in einigen Zellen nachgewiesen werden. Um die Zellkernmembran herum zeigte sich ein dunkelroter Saum sowie innerhalb des Kerns kleine rötliche runde Signale (Abb. 3 G und H). Für die Stammzellmarker CD90 und CD105 waren die U87-Tumorzellen negativ (Abb. 3 I bis L). Bei den Negativkontrollen mit IgG1 und IgG2a konnten ebenfalls keine Signale der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3 M bis P).

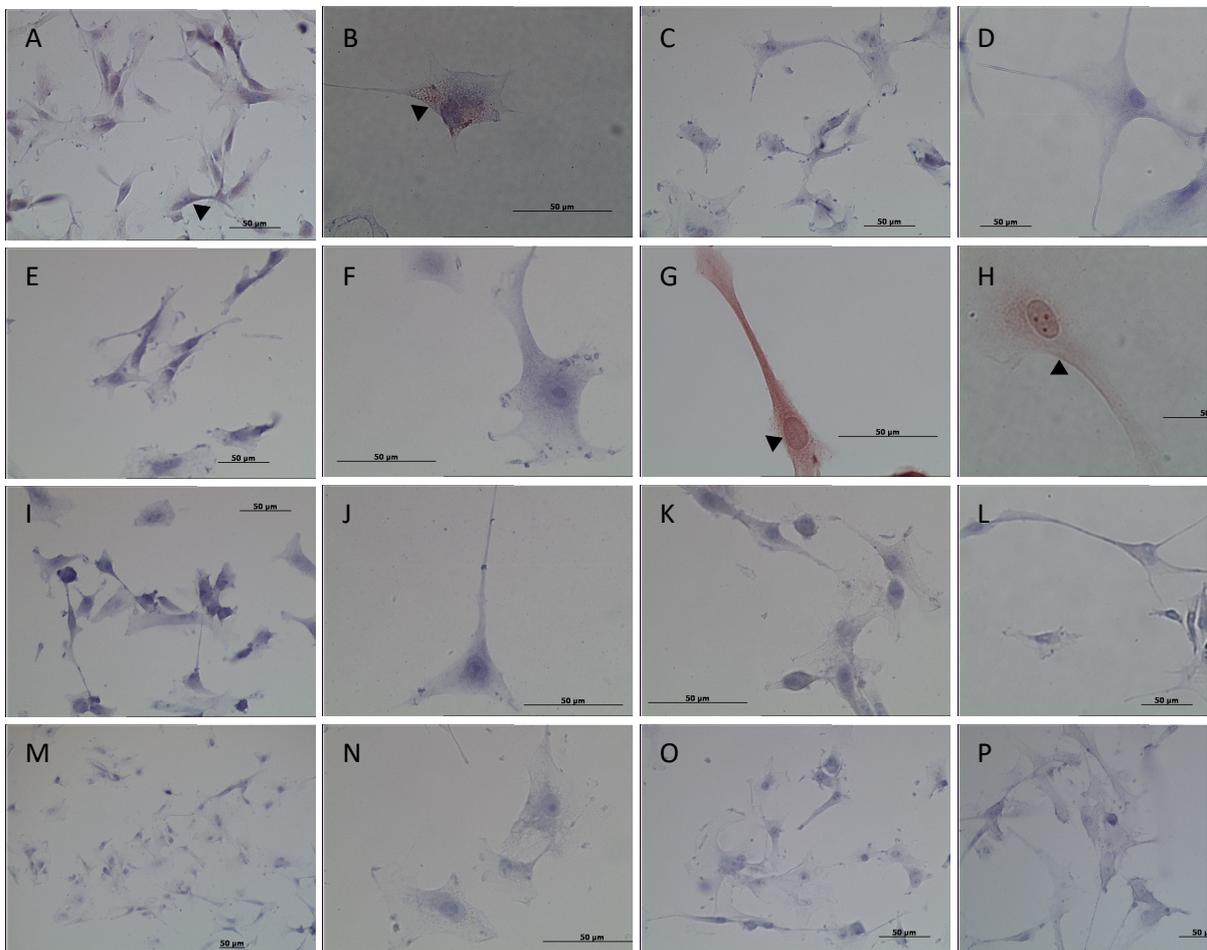


Abbildung 3 Immunzytochemie von U87 Zellen

A/B: VEGFR-3, C/D: Podoplanin, E/F: LYVE-1, G/H: Prox-1, I/J: CD90, K/L: CD105, M/N: IgG1, O/P: IgG2a

4.4 Differenzierungsassay

Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten mesenchymalen Stammzellen wurden, zum Nachweis der multipotenten Differenzierbarkeit, wie in den Abschnitten 3.4. und 3.4.1.

beschrieben inkubiert und gefärbt. Nach ca. 5 Wochen konnte durch die Färbung im Osteogenese-Ansatz die Einlagerung von Calcium Depots in den Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4 A bis C). Die Adipogenese dauerte ca. eine Woche länger, aber auch hier konnten kleine Fetttropfen in einigen Zellen färberisch nachgewiesen werden (Abb. 4 D bis F). Dies bestätigt, dass es sich bei den isolierten Zellen um multipotente mesenchymale Stammzellen handelt, da sich die Zellen im Stimulationsmedium differenzieren ließen.

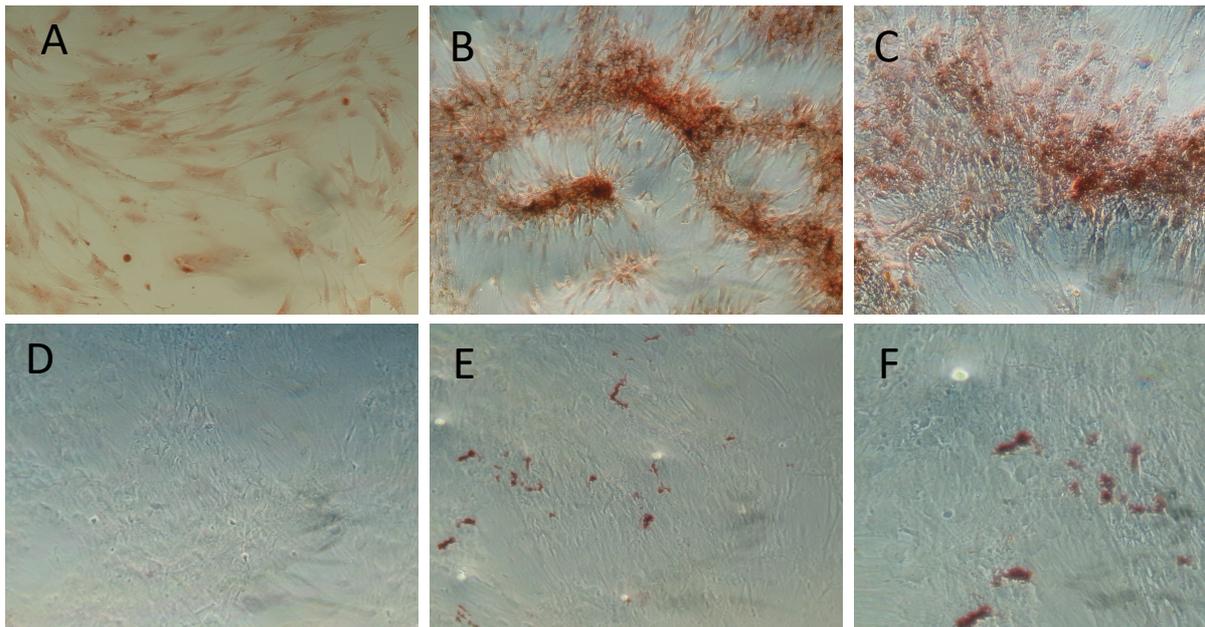


Abbildung 4 Differenzierungsassay

A: Osteogenese, Negativkontrolle, B und C: Osteogenese positive Färbung, D: Adipogenese, Negativkontrolle, E und F: Adipogenese positive Färbung

4.5 FACS-Analyse der mesenchymalen Stammzellen

Zum Nachweis, dass es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit isolierten mesenchymalen Stammzellen um mesenchymale Stammzellen handelt, wurden die Zellen mittels Facs-Analyse auf verschiedene Zellmarker analysiert. Durch Gegenwart oder Abwesenheit dieser Marker können mesenchymalen Stammzellen klassifiziert werden. Es wurden die Marker CD14, CD31, CD34, CD45, CD73, CD90 und CD105 verwendet. Es zeigte sich ein typisches Markerprofil für mesenchymale Stammzellen: CD14 99% negativ, CD31 100% negativ, CD34 95,4% negativ, CD45 99,9% negativ, CD73 99,7% positiv, CD90 100% positiv, CD105 100% positiv. In Zusammenschau mit den positiven Differenzierungsversuchen konnte somit belegt werden, dass es sich bei den selbst isolierten Zellen um mesenchymale Stammzellen handelt.

4.6 Immunzytochemie mesenchymaler Stammzellen (bmMSC) ohne Tumorkonditioniertes Medium

Bei 7 der 10 Färbungen, die mit dem Antikörper VEGFR-3, konnten wir eine Positivität der Zellen auf VEGFR-3 zeigen, (Abb. 5 A und B). Vor allem in der DAB-Färbung sieht man eine Braunverfärbung der Zellmembran, am stärksten im Bereich des Kerngebietes. In den Färbungen für den Marker Podoplanin zeigten sich die meisten Zellen negativ, nur an wenigen Zellen konnte ein schwach positives Signal beobachtet werden. Auf Bild C (Abb. 5) sind die Zellen vornehmlich blau gefärbt; man erkennt in einigen Zellen leichte rote Verfärbungen, die auf eine Expression von Podoplanin in diesen Zellen hinweisen. In der DAB-Färbung (Abb. 5 D) ist die Färbung des Antikörpers für Podoplanin noch deutlicher erkennbar. Die Färbung mit dem Antikörper LYVE-1 verlief bei allen 10 Färbereihen der bmMSC ohne TKM negativ (Abb. 5 E und F). Für den Marker Prox-1 konnte bei den bmMSC eine Expression innerhalb des Zellkerns färberisch nachgewiesen werden. Auf den Bildern G und H (Abb. 5) erkennt man ein Signal des Kerns und seiner Nucleoli. Die Stammzellmarker CD90 und CD105 sind auf den bmMSC exprimiert; dies konnte mit den Färbungen bestätigt werden, Bilder I bis L (Abb. 5). Die Negativkontrollen mit den Antikörpern IgG1 und IgG2a zeigten keine Signale, was die spezifische Bindung der anderen gefärbten Antikörper bestätigte (Abb. 5, Bilder M bis P).

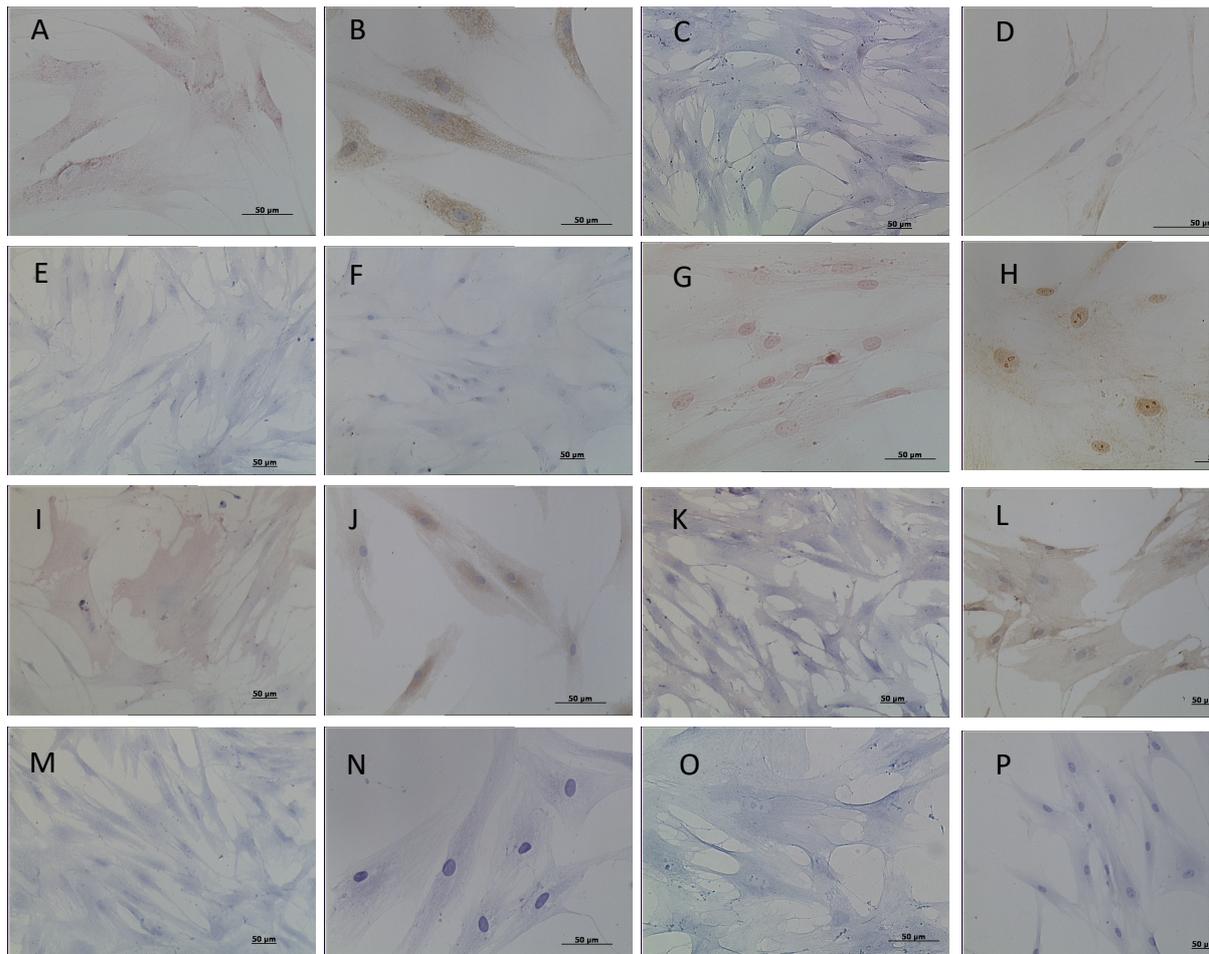


Abbildung 5 Immunzytochemie von bmMSC ohne Tumor-konditioniertes Medium (TKM)

A: AEC Färbung mit VEGFR-3. B: DAB Färbung mit VEGFR-3. C: AEC, Podoplanin. D: DAB, Podoplanin. E: AEC, LYVE-1. F: DAB, LYVE-1. G: AEC, Prox-1. H: DAB, Prox-1. I: AEC, CD90. J: DAB, CD90. K: AEC, CD105. L: DAB, CD105. M: AEC, IgG1. N: DAB, IgG1. O: AEC, IgG2a. P: DAB, IgG2a.

4.7 Immunzytochemie von bmMSC mit 2, 4 und 5 Tagen Tumor-konditioniertem Medium

Nachdem die mesenchymalen Stammzellen mit Tumor-konditioniertem (TKM) Medium für 2, 4 oder 5 Tage behandelt wurden, wurden immunzytochemische Färbungen mit den Markern VEGFR-3, Podoplanin, LYVE-1, Prox-1, CD90, CD105, IgG1 und IgG2a durchgeführt, um den Einfluss des TKM auf die Expression von lymphspezifischen Markern bei bmMSC zu untersuchen. VEGFR-3 konnte wie bei den Färbungen der bmMSC ohne TKM auch nach Inkubation mit TKM nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich eine Zunahme der Färbeintensität der VEGFR-3 positiven Zellen je länger mit TKM inkubiert wurde (Abb. 6 A bis C). Bei den Färbungen mit dem Antikörper gegen Podoplanin zeigte sich eine Zunahme an Podoplanin positiven Zellen. Von Tag 2 mit TKM bis zu Tag 5 mit

TKM nahm die Zahl der Podoplanin positiven Zellen zu (Abb. 6 D bis F). Der lymphspezifische Marker LYVE-1, der in den Färbungen ohne TKM stets negativ ausfiel, zeigte nach 4 Tagen ein deutlich positives Signal (DAB-Chrom, Abb. 8). Die Expression des im Zellkern befindlichen Markers Prox-1 zeigt keine Änderung nach 2, 4 oder 5 Tagen Inkubation mit TKM (Abb. 6 J bis L). Die Stammzellmarker CD90 und CD105 zeigten nach Behandlung mit 2, 4 und 5 Tagen TKM ein positives Signal, wobei die Intensität von Tag 2 TKM bis Tag 5 TKM allenfalls geringfügig Abnahm (Abb. 7 M bis O CD90 und P bis R CD105). Die Negativkontrollen mit IgG1 und IgG2a zeigten keine unspezifischen Bindungen der Antikörper, die Zellfärbung war negativ (Abb.7 S bis U IgG1 und W bis Y IgG2a).

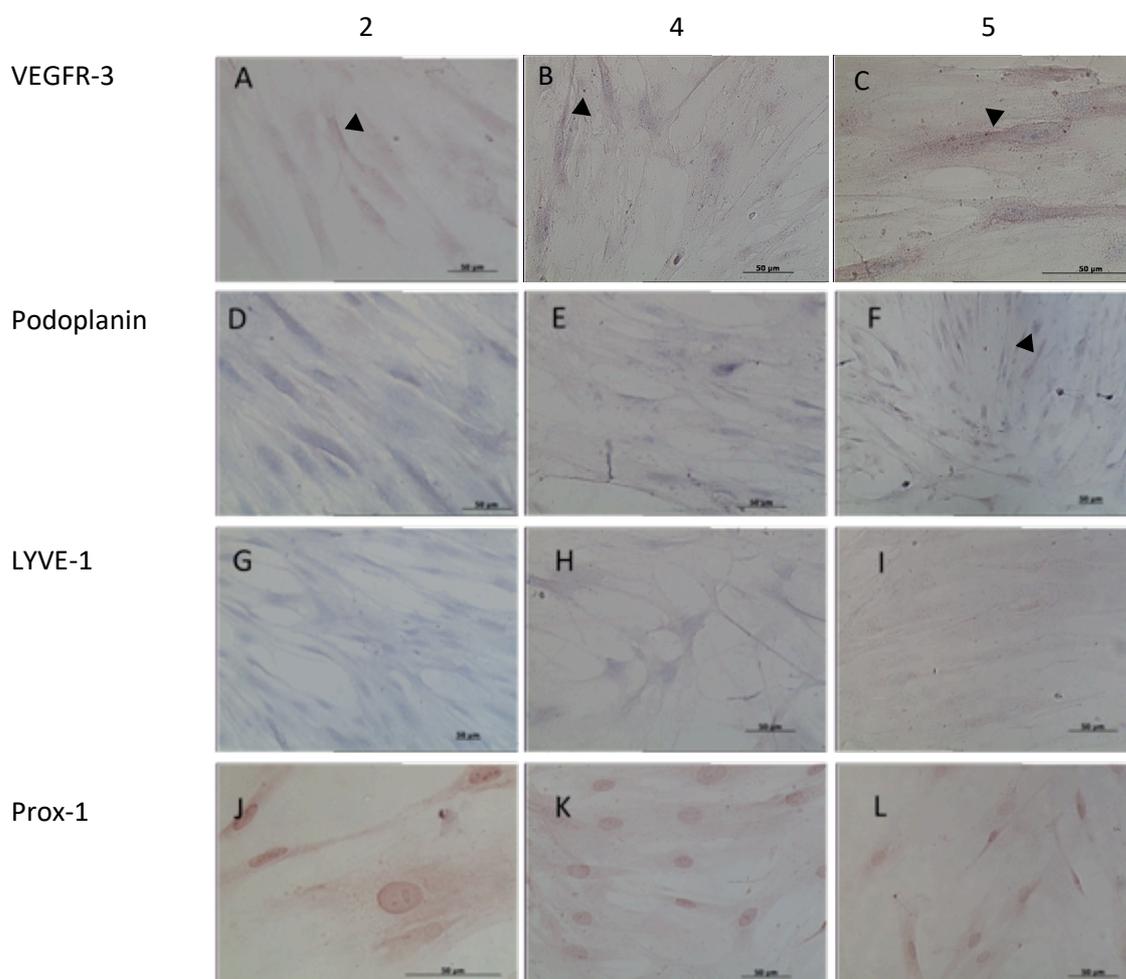


Abbildung 6 Immunzytochemie von bmMSC BM6, BM7 und BM8

Bild A: AEC Färbung mit VEGFR-3 und TKM Für 2 Tage. **B:** VEGFR-3 mit TKM für 4 Tage. **C:** VEGFR-3 mit TKM für 5 Tage. **D:** Podoplanin mit TKM für 2 Tage. **E:** Podoplanin mit TKM für 4 Tage. **F:** Podoplanin mit TKM für 5 Tage. **G:** LYVE-1 mit TKM für 2 Tage. **H:** LYVE-1 mit TKM für 4 Tage. **I:** LYVE-1 mit TKM für 5 Tage. **J:** Prox-1 mit TKM für 2 Tage. **K:** Prox-1 mit TKM für 4 Tage. **L:** Prox-1 mit TKM für 5 Tage.

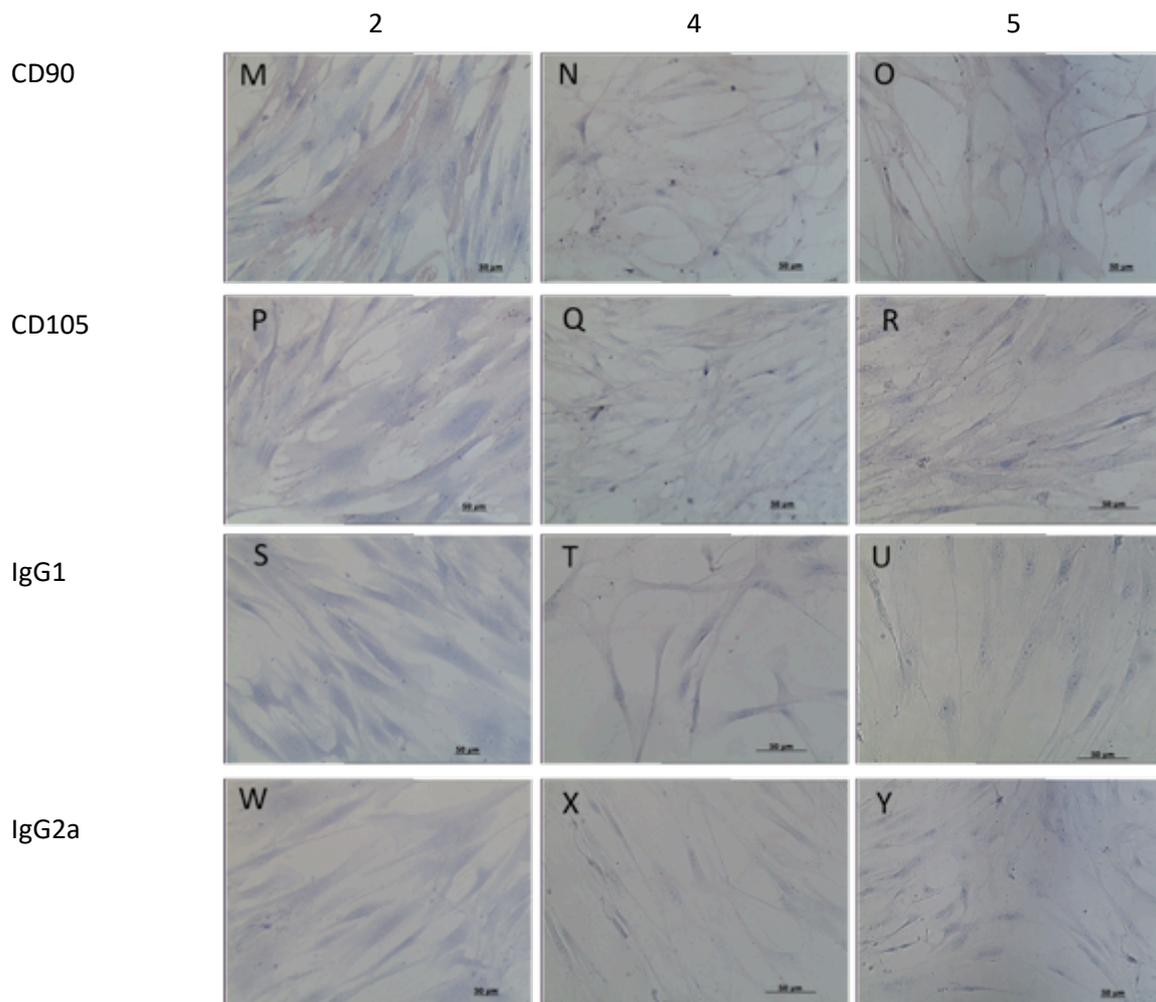


Abbildung 7 Immunzytochemie von bmMSC BM6, BM7 und BM8

Bild M: CD90 mit 2Tagen TKM, N: CD90 mit 4 Tagen TKM, O: CD90 mit 5 Tagen TKM, P: CD105 mit 2 Tagen TKM, Q: CD105 mit 4 Tagen TKM, R: CD105 mit 5 Tagen TKM, S: IgG1 mit 2 Tagen TKM, T: IgG1 mit 4 Tagen TKM, U: IgG1 mit 5 Tagen TKM, W: IgG2a mit 2 Tagen TKM, X: IgG2a mit 4 Tagen TKM, Y: IgG2a mit 5 Tagen TKM

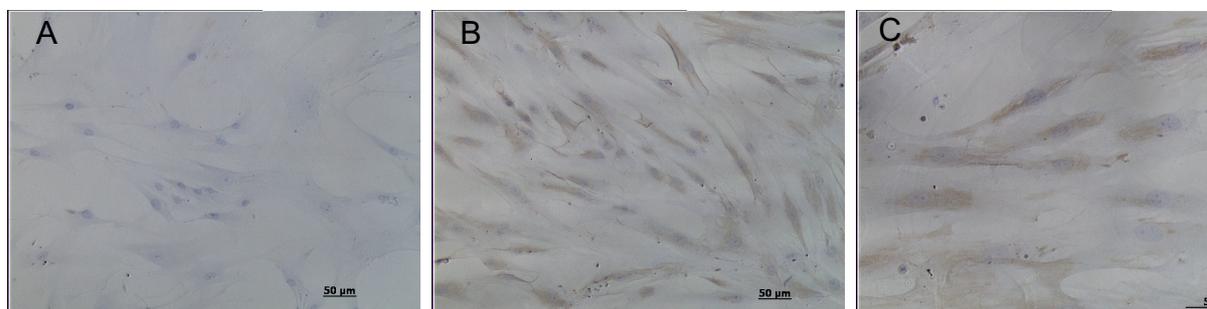


Abbildung 8 Immunzytochemie von bmMSC mit DAB Chromogen und Antikörper LYVE-1

A: ohne TKM und B-C: mit 4 Tage TKM

4.8 Co-Kulturversuche mit bmMSC und U87 Zellen AEC-Färbung

Wie in Abschnitt 3.3.4. beschrieben, wurden die mesenchymalen Stammzellen mit U87-Zellen für 6 Tage in Co-Kultur inkubiert. Ziel war es, eine direkte Beeinflussung der mesenchymalen Stammzellen durch U87-Zellen zu untersuchen. Trotz zahlreicher Replikationen konnte keine konklusive Färbung erstellt werden, welche belastbare Rückschlüsse auf eine Induktion lymphangiogener Marker in Co-Kultur zuließ (Daten nicht gezeigt).

4.9 Inkubation von bmMSC mit IL-3 Zusatz

IL-3 wird ein Einfluss auf die Expression von Podoplanin und Prox-1 auf Lymphendothelzellen zugeschrieben (Grogger et al., 2004). Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die bmMSC durch IL-3 wie durch TKM zur Expression von Lymphendothelzellmarkern stimuliert werden können. In Abbildung 9 sind die Färbungen abgebildet. Bild A und B zeigen ein positives Signal auf VEGFR-3. Podoplanin und Prox-1 sind ebenfalls positiv (Abb. 9 C, D, G und H). Für LYVE-1 ist nach IL-3 Stimulation kein Signal detektierbar. Die bmMSC zeigen auch nach der Behandlung mit IL-3 eine Positivität für die Stammzellmarker CD90 und CD105 (Abb. 9 I und L). Die Negativkontrollen mit IgG1 und IgG2a zeigen keine unspezifische Bindung (Abb. 9 M bis P).

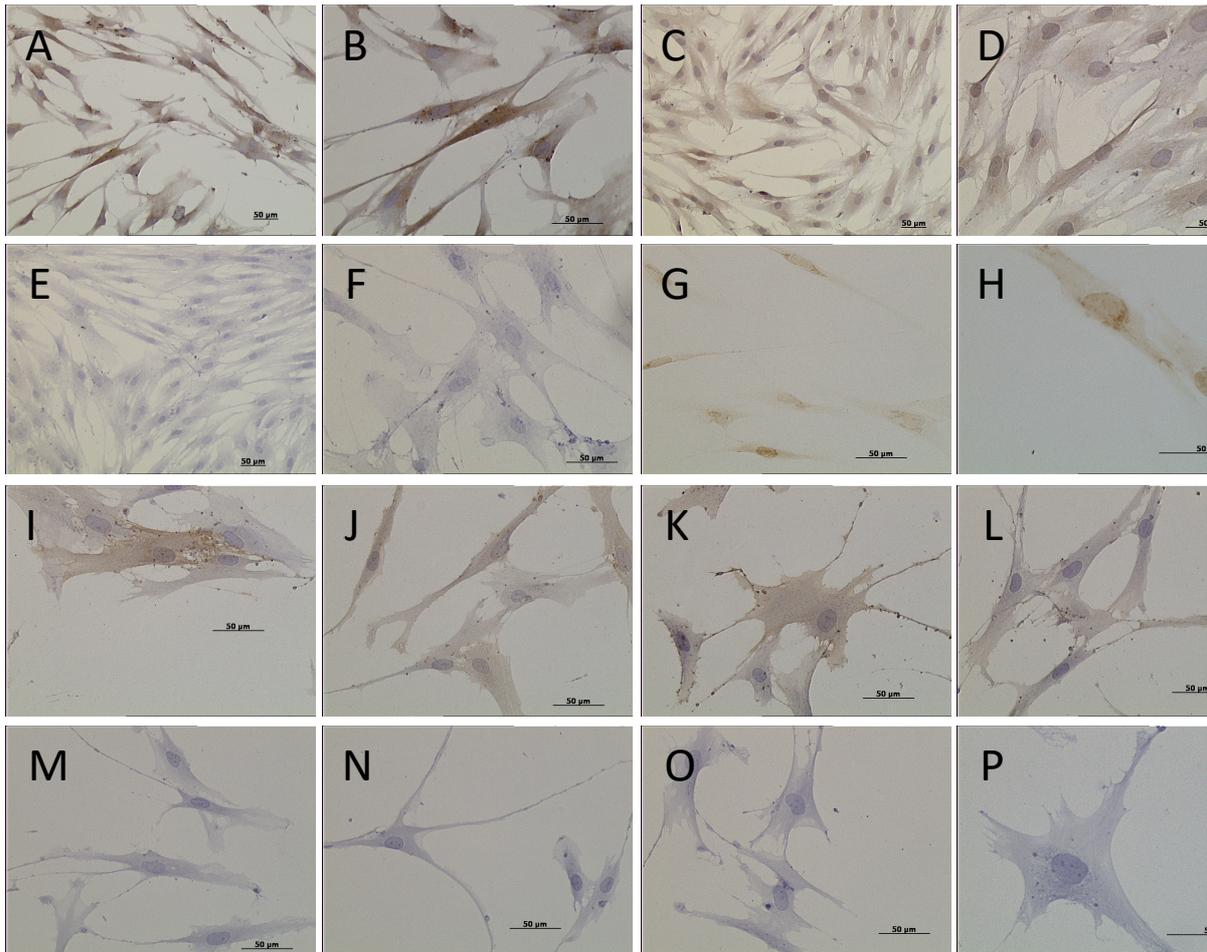


Abbildung 9 DAB-Färbung von bmMSC mit IL-3 Mediumzusatz

A/B: VEGFR-3 positiv, C/D: Podoplanin positiv, E/F: LYVE-1 negativ, G/H: Prox-1 positiv, I/J: CD90 positiv, K/L: CD105 positiv, M-P: Negativkontrolle IgG1 und IgG2a

4.10 Immunfluoreszenz

Die Fluoreszenzfärbung wurde mit dem Marker Prox-1 durchgeführt, um den Einfluss von TKM auf die Expression von Prox-1 im Zellkern zu untersuchen. Unter dem konfokalen Laser Scanning Mikroskope ließ sich ein positives Signal für Prox-1 detektieren (Abb. 10). Bild A zeigt Prox-1 positive Signale, lokalisiert im Zellkern (Abb. 10 A). Nach 2 Tagen Inkubation mit TKM war das Signal im Zellkern etwas stärker nachzuweisen. Dieser Effekt ließ sich nicht weiter Quantifizieren.

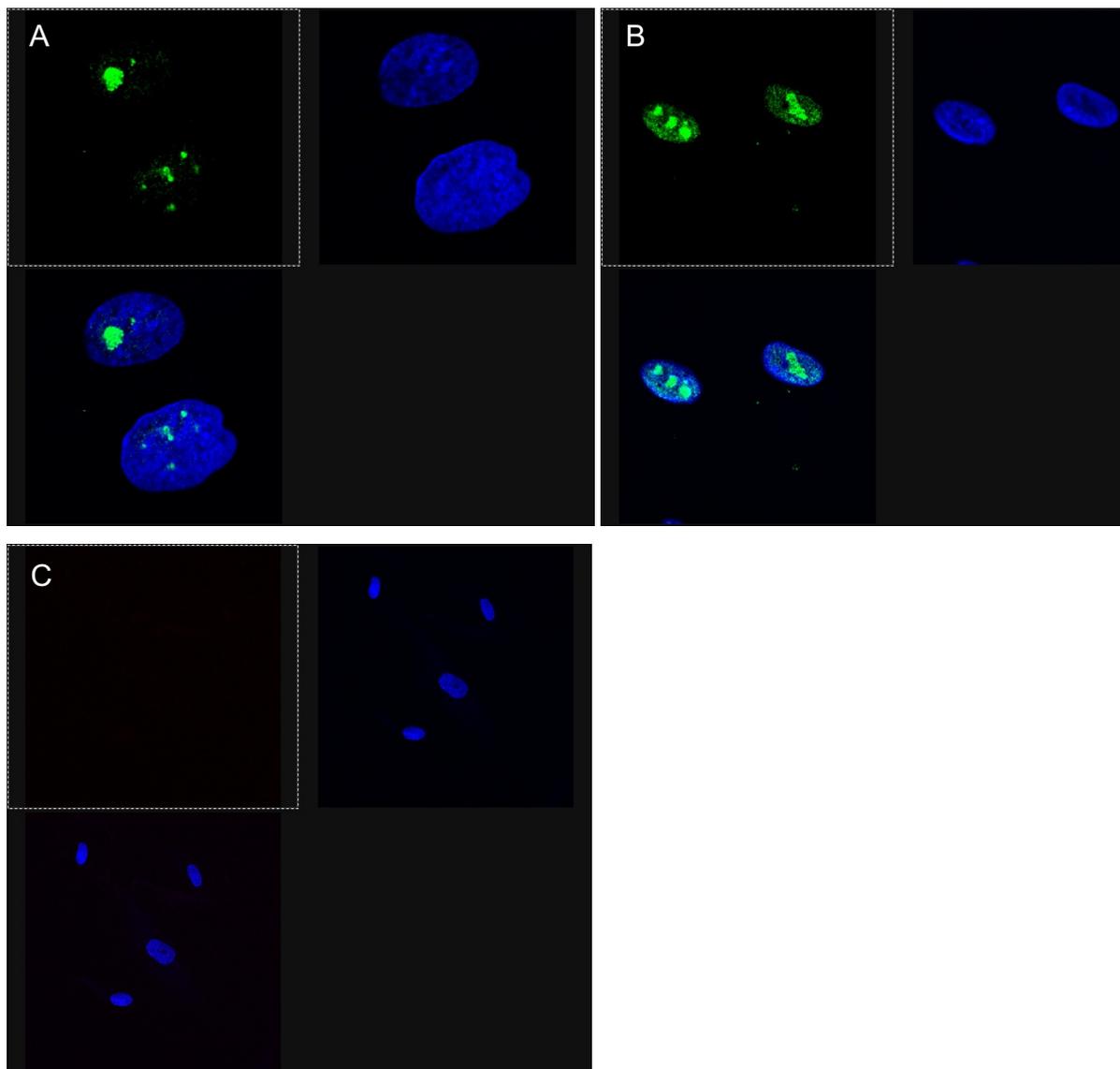


Abbildung 10 Immunzytochemie von bmMSC unter dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop
A: Prox-1 positiv im Zellkern, B: Prox-1 positiv mit TKM, C: Negativkontrolle

5 Diskussion

Die Expression von lymphspezifischen Markern in Glioblastomgewebeschnitten nachzuweisen ist eine der Fragestellungen dieser Arbeit.

In den immunhistologischen Färbungen der Glioblastomgewebeschnitte konnte, analog zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, eine positive Expression von VEGFR-3 und Podoplanin gezeigt werden. – Jenny et al. konnten auf Protein- sowie auch auf mRNA-Ebene eine Expression von VEGFR-3 und dessen Liganden VEGF-C vor allem im Randbereich von Nekrosen innerhalb des Glioblastoms nachweisen (Jenny et al., 2006). Grau et al. untersuchten ebenfalls die Expression von VEGFR-3 in Gefäßen innerhalb des Glioblastoms und konnten eine Korrelation von VEGFR-3 Expression und dem histologischen Tumorgrad zeigen (Grau et al., 2007). In einem weiteren Projekt unserer Arbeitsgruppe konnte neben VEGFR-3 eine positive Expression von Podoplanin auf Gefäßen des Glioblastoms nachgewiesen werden. Diesen Gefäßen, welche positiv auf VEGFR-3 und Podoplanin getestet wurden, wurde ein lymphatischer Phänotyp zugeschrieben (Grau et al., 2008). Um eine mögliche, durch das Glioblastom induzierte Lymphangiogenese innerhalb des sonst lymphgefäßfreien ZNS zu untersuchen, wurden die Glioblastomschnitte in der vorliegenden Arbeit zusätzlichen mit den für Lymphendothelzellen spezifischen Marker LYVE-1 und Prox-1 gefärbt. Wie Versuche an Knockout-Mäusen für LYVE-1 zeigten, scheint LYVE-1 keinen Einfluss auf die normale Entwicklung und Funktion des Lymphsystems zu haben (Gale et al., 2006). LYVE-1 ist auf physiologischen sowie auf Tumorlymphgefäßen exprimiert. Im Brustkrebsmodell konnte eine positive Korrelation von LYVE-1-positiven Lymphgefäßen und Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden (Bono et al., 2004). Welche Funktion die Expression von LYVE-1 auf Gefäßen des Glioblastoms hat, ist ungewiss, da das ZNS normalerweise lymphgefäßfrei ist und auch Lymphknotenmetastasen äußerst selten auftreten (Moon et al., 2004). Schledzewski und Kollegen beschrieben die LYVE-1 Expression auf CD11b+ Makrophagen und konnten am Mausmodell zeigen, dass die CD11b+ LYVE-1+ Makrophagen in nicht gliale, maligne Tumore immigrierten und an der Lymphangiogenese beteiligt waren (Schledzewski et al., 2006). In Kultur mit Überstand von B16F1 melanomkonditioniertem Medium, IL-4 und Dexamethason konnte eine Zunahme der Expression von LYVE-1 auf aus dem Knochenmark isolierten Makrophagen

beobachtet werden. Auch in anderen Tumoren und im entzündlichen Gewebe wurde eine Beteiligung von Makrophagen/Monozyten an der Angio- sowie Lymphangiogenese beschrieben (Schmeisser et al., 2001, Maruyama et al., 2005).

Um den Ursprung der LYVE-1 positiven Zellen im Glioblastom näher beschreiben zu können und um eine Differenzierung von LYVE-1-positiven Endothelzellen und LYVE-1-positiven Makrophagen vornehmen zu können, könnten in weiteren Arbeiten die makrophagenspezifischen Marker im Glioblastoms untersuchen werden.

Der zu den lymphspezifischen Markern zählende Transkriptionsfaktor Prox-1 konnte in dieser Arbeit ebenfalls im Glioblastomgewebeschnitt, wenn auch mit einem schwachen Signal, nachwiesen werden. Prox-1 ist während der Entwicklung für die Differenzierung der aussprossenden Zellen aus der kardialen Vene verantwortlich (Hong and Detmar, 2003). Des Weiteren wird Prox-1 ein Einfluss in der Tumorgenese einiger maligner Tumore zugeschrieben; so konnten Petrova et al. zeigen, dass es im kolorektalen Karzinom zu einer erhöhten Konzentration von Prox-1 kommt (Petrova et al., 2008). Elsir und Kollegen zeigten eine negative Korrelation der Prox-1-Expression mit dem Überleben von Patienten mit malignen Gliomen WHO° II (Elsir et al., 2011). Im hepatozellulären Karzinom konnte hingegen eine Verringerung von Prox-1 nachgewiesen werden (Shimoda et al., 2006). Insgesamt scheint Prox-1 durch die Einflussnahme auf verschiedene Regulierungswege der Zellproliferation sowohl einen tumorsuppressiven als auch onkogenen Effekt zu haben (Elsir et al., 2010). Der im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Nachweis des Transkriptionsfaktors Prox-1 im Glioblastomgewebeschnitt deutet möglicherweise auf eine Beteiligung an der Tumorgenese bzw. an der Angiogenese hin.

Der Hauptfaktor der Angiogenese innerhalb des Glioblastoms ist der Wachstumsfaktor VEGF-A, der eine hohe Affinität zu den Rezeptoren VEGFR-1 und -2 aufweist. VEGFR-1 und -2 sind auf Blutgefäßendothelzellen exprimiert (Plate et al., 1992). Der monoklonale Antikörper Bevacizumab ist gegen VEGF-A gerichtet und wird in der antiangiogenen Therapie des Glioblastoms eingesetzt. Es konnte nach Bevacizumab-Therapie eine so genannte „second wave of angiogenesis“ beobachtet werden und es zeigte sich, dass Rezidive nach einer Bevacizumab-Therapie eine stärkere Invasivität aufweisen als der Primärtumor (Braghiroli et al., 2012, Fischer et al., 2008). Dieses „escape phenomenon“ der Angiogenese gegenüber antiangiogenen Therapieverfahren ist Gegenstand vieler Studien (Rivera et al., 2011, Huang and Li, 2010, Behling et al., 2016).

Die Beschreibung von VEGFR-3 an Gefäßen des Glioblastoms könnte einen möglichen alternativen Weg der Angiogenese nach Blockierung von VEGF-A darstellen. VEGFR-3 wird im adulten Gewebe vornehmlich auf Lymphgefäßen exprimiert. In der embryonalen Entwicklung ist VEGFR-3 ein wichtiger Faktor der Entwicklung des Herzkreislaufsystems (Dumont et al., 1998). Die Liganden des Rezeptors sind die Wachstumsfaktoren VEGF-C und -D, welche neben der Induktion der Lymphangiogenese auch Angiogenese fördernde Effekte aufweisen; letzteres vermitteln sie vornehmlich durch die Bindung an VEGFR-2 (Achen et al., 1998). Durch die Blockierung von VEGF-A konnten Moffat und Kollegen eine vermehrte Expression von VEGF-D im Glioblastom nachweisen. Dies könnte zu einem alternativen Weg der Angiogenese über die Rezeptoren VEGFR-2 und -3 beitragen (Moffat et al., 2006, Maehana et al., 2016). Unter diesem Gesichtspunkt wäre es auch interessant zu untersuchen, ob es durch die Therapie mit Bevacizumab zu einer Induktion von VEGFR-3 im Glioblastom kommt. Der Einfluss von VEGFR-3 auf die Angiogenese konnte durch Valtola et al. im duktalem Mammakarzinom gezeigt werden (Valtola et al., 1999, Autenshlyus et al., 2016). Auch Witmer und Kollegen konnten zeigen, dass während der Neovaskularisation der sonst avaskulären Kornea durch VEGF-A-Stimulation, VEGFR-3 in den neugebildeten Gefäßen exprimiert wurde (Witmer et al., 2001). Kubo und Kollegen untersuchten den Einfluss von VEGFR-3 in der Angiogenese im nicht glialen Tumormodel durch Blockierung von VEGFR-3 mit einem spezifischen Antikörper. Sie konnten zeigen, dass es durch die Blockierung von VEGFR-3 zur Reduktion des Tumors und der Angiogenese kam (Kubo et al., 2000).

Diese Beobachtungen und die in dieser Arbeit nachgewiesene Expression von VEGFR-3 an Gefäßen des Glioblastoms, machen diesen Rezeptor interessant für mögliche neue Therapieansätze zur Umgehung der „second wave of angiogenesis“ e nach Anti-VEGF-A Therapie.

In dieser Arbeit konnte in immunhistologischen Färbungen eine positive Expression von Podoplanin vor allem in Randbereichen um Nekroseareale herum nachwiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beschreibung von Mishima und Kollegen überein, die ebenfalls eine positive Expression von Podoplanin im Glioblastom nachweisen konnten und ferner durch den Vergleich mit der Expression von Podoplanin in „low-grade“ Gliomen eine Assoziation von hohen Podoplanin-Expressionen und „high-grade“ Gliomen und aggressivem Wachstumsverhalten zeigen konnten (Mishima et al., 2006). Eine erhöhte Expression von Podoplanin konnte auch in anderen Tumoren wie dem

Plattenepithelkarzinom (Martin-Villar et al., 2005), im Lungenkarzinom (Kato et al., 2005) sowie im malignen Melanom (Ordóñez, 2005) nachgewiesen werden. Martin-Villar und Kollegen beschrieben, dass Podoplanin im oralen Plattenepithelkarzinom eine Rolle in der Migration und Invasivität der Tumorzellen in das umliegende Gewebe zu haben scheint (Martin-Villar et al., 2005). Nach antiangiogener Therapie wurde eine erhöhte Invasivität des Glioblastoms in das umliegende Hirngewebe beobachtet (Keunen et al., 2011, Cortes-Santiago et al., 2016). Wie zuvor erwähnt scheint auch die Expression von Podoplanin mit der Entdifferenzierung und dem aggressiven Wachstum assoziiert zu sein. Die in dieser Arbeit gezeigte Podoplanin-Expression im Glioblastomgewebeschnitt unterstützt diese Beobachtungen.

Neben den lymphspezifischen Markern wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression der Endothel- und Stammzellmarker CD105 und CD90 im Glioblastom untersucht. Es konnte eine positive Expression von CD105 und CD90 in den Gefäßen des Glioblastoms nachgewiesen werden. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Expressionsprofilen anderer Tumore. In einer Reihe von soliden Tumoren wie dem Plattenepithelkarzinom, dem Prostatakarzinom und dem Kolonkarzinom wurde ebenfalls eine positive Expression von CD105 auf Tumorgefäßen beschrieben (Fonsatti et al., 2001, Yu et al., 2003). Die Arbeitsgruppe um Smith untersuchte die Expression von CD105 im Glioblastom des Kindes und konnte eine Korrelation von positiver CD105-Expression und schlechter Prognose zeigen (Smith et al., 2012). Auch im Zervix Karzinom konnten Zijlmans und Kollegen zeigen, dass eine hohe Expression von CD105 in Tumorgefäßen mit einer schlechteren Prognose und einem erhöhten Metastasierungsrisiko einhergeht (Zijlmans et al., 2009). CD105 gehört zu den Markern, die in der Beschreibung von Stammzellen mit herangezogen werden. CD105 wird aber auch auf Endothelzellen von Blutgefäßen exprimiert und scheint einen Einfluss auf die Angiogenese zu haben. CD105 Knockout-Mäuse sterben *in utero* durch die fehlende Ausbildung eines funktionierenden Gefäßsystems (Li et al., 2000). CD105 ist ein Rezeptor des „Transforming Growth-Faktors β “ (TGF β) und vermittelt seine Wirkung durch Interaktion mit den Rezeptoren TGF β -I und -II (Dallas et al., 2008). Es wird vermutet, dass CD105 die inhibitorische Wirkung von TGF β modelliert und so die Proliferation, Migration und Gefäßformation beeinflusst und zur Angiogenese beiträgt (Li et al., 2000). Wie gezeigt werden konnte, wird CD105 vor allem während der Tumorangiogenese auf den neugebildeten Gefäßen exprimiert und

korreliert mit einer schlechten Prognose (Zijlmans et al., 2009, Fonsatti et al., 2003, Ilhan et al., 2016).

Die Angiogenese im Glioblastom ist ein wichtiger Malignitätsfaktor. Hypoxie scheint dabei ein wesentlicher Trigger für die Angiogenese zu sein. Sanches-Elsner und Kollegen konnten nachweisen, dass CD105 unter Hypoxie vermehrt exprimiert wird (Sanchez-Elsner et al., 2002). Durch den Nachweis von CD105 im Glioblastom und dessen Assoziation mit der Angiogenese könnte dies einen weiteren möglichen „Escape-Mechanismus“ der Angiogenese und einen möglichen Therapieansatz darstellen. Aktuelle Studien am Tumor-Mausmodell vom Adenokarzinom der Mamma konnten durch Blockierung von CD105 (Engolin) eine Reduktion des Tumorwachstum und der Tumorangiogenese zeigen (Dolinsek et al., 2015).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in den immunhistologischen Färbungen verschiedene lymphspezifische Marker an den Gefäßen des Glioblastoms nachgewiesen werden. Die Färbungen der U87-Glioblastomtumorzellen zeigen, dass es nicht nur in den Gefäßendothelzellen zur Expression von VEGFR-3 und Prox-1 kommt sondern, dass auch einige Tumorzellen selbst VEGFR-3 und Prox-1 exprimieren. Die Expression von VEGFR-3 wurde bereits in anderen nicht glialen Tumorzellreihen nachgewiesen (Spinella et al., 2012). Khromova und Kollegen konnten in Versuchen an VEGFR-3-positiven Lungen- und Kolonkarziomzellen zeigen, dass es durch Verringerung des Liganden des Rezeptors, dem Wachstumsfaktor VEGF-C, zu einer Verminderung der Proliferation und der Invasivität der Zellen kommt (Khromova et al., 2012). Die positive Expression von Prox-1 in Glioblastomzellen könnte sich zum einen mit seiner Funktion als Transkriptionsfaktor für VEGFR-3 erklären lassen, zum anderen wird Prox-1 auch ein Einfluss auf die Tumorangiogenese zugeschrieben. VEGF-C ist ein Wachstumsfaktor, der zum einen ein wichtiger Faktor der Lymphangiogenese ist, zum anderen aber auch Einfluss auf die Metastasierung und Zellproliferation hat. Marchio und Kollegen zeigten, dass es nach Aktivierung von VEGFR-3 durch VEGF-C zu einer Induktion der Zellproliferation im Kaposi-Sarkom kam (Marchio et al., 1999). Expression von VEGFR-3 auf Tumorzellen scheint ein weiteres Malignitätskriterium zu sein. So konnten Kodama und Kollegen eine Assoziation von VEGF-C und VEGFR-3 Expression und maligner Transformation im Magenkarzinom zeigen (Kodama et al., 2008). Im malignen Melanom zeigten Spinella und Kollegen, dass VEGF-C zur Induktion von VEGFR-3 führt und dies die Proliferation anregt und dass eine Zunahme des „vascular mimicry“ beobachtet werden konnte (Spinella et al.,

2012). Auch in einer Reihe von anderen Tumoren wie dem Prostatakarzinom (Sharma et al., 2002), dem Mammakarzinom (Shirakawa et al., 2002) und dem Rhabdomyosarkom (Sun et al., 2004) wurde ein „vascular mimicry“ beschrieben. Es beschreibt die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen innerhalb des Tumors durch die Tumorzellen. Auch im Glioblastom wurde ein „vascular mimicry“ beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass dies eine Assoziation zum „high-grade“ Gliom und schlechter Prognose hat (Liu et al., 2011). Insofern ist der Nachweis von VEGFR-3 auf Tumorzellen bedeutsam und könnte auch im Glioblastom auf diesem Weg an der Vaskularisation des Tumors beteiligt sein. Die Blockade von VEGFR-3 könnte ein potentieller Angriffspunkt für eine Tumorthherapie sein.

Im Hinblick auf die Hypothese, dass mesenchymale Stammzellen eine mögliche Quelle für die im Glioblastom exprimierten Lymphangiogenesemarker sein könnten, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von U87-Glioblastomzellen auf die Expression von VEGFR-3, Podoplanin, Prox-1, LYVE-1, CD90 und CD105 in mesenchymalen Stammzellen (MSC) untersucht. MSC sind eine heterogene Population von multipotenten Zellen, die die Fähigkeit besitzen, in verschiedene Gewebe zu differenzieren und zu Migrieren. Lee und Kollegen isolierten CD11b+ positive Stammzellen aus dem Knochenmark und untersuchten deren Potenzial, sich unter bestimmten Bedingungen in Lymphendothelzellen zu differenzieren. Die Zellen exprimierten unter dem Einfluss von VEGF-A und VEGF-C die Lymphmarker Podoplanin, VEGFR-3, LYVE-1 und Prox-1 (Lee et al., 2010). Eine andere Arbeitsgruppe um Conrad konnte zeigen, dass es unter Kultivierung mit Überstand von Lymphendothelzellen und VEGF-C zu einer Änderung der Morphologie der MSC sowie zu einer Expression der Lymphendothelzellmarker kam. Nach Injektion von MSC in ein artifizielles Lymphödem konnte eine Reduktion des Ödems im Gegensatz zur Kontrolle beobachtet werden (Conrad et al., 2009). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass MSC in der Lage sind, sich unter bestimmten Bedingungen in Lymphendothelzellen (LEC) zu differenzieren und einen Einfluss auf die Lymphangiogenese haben (Van't Hull et al., 2014).

In den Versuchen dieser Arbeit wurden die MSC mit Überstand von U87-Glioblastomzellen kultiviert und nach 2, 4 und 5 Tagen die Expression der Lymphmarker durch immunzytologische Färbungen untersucht. Nach 4 Tagen Inkubation konnten alle Marker immunzytologisch nachgewiesen werden. Dies lässt sich mit den Versuchen von Lee et al. vergleichen. Lee beschrieb, dass die Expression der Marker nach 4 Tagen ihren

Peak erreicht hatte (Lee et al., 2010). Unklar ist, welche Faktoren im Überstand der U87-Glioblastomzellen zur Differenzierung der MSC führen. Die Versuche wurden mit TKM auf Grund der Annahme durchgeführt, dass das Glioblastom ein Tumor ist, der in hohem Maße VEGF-A und VEGF-C sezerniert, welche wichtige Faktoren der Angio- aber auch Lymphangiogenese sind. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Faktoren im Überstand der Zellen vorhanden sind. Den Einfluss des TKM auf MSC konnten Schichor et al. bereits zeigen. Sie untersuchten den Einfluss von TKM auf das Migrationsverhalten von MSC in Glioblastomgewebe und konnten nachweisen, dass TKM sowie VEGF-A die MSC zur Migration ins Glioblastom anregt (Schichor et al., 2006). Birnbaum et al. konnten zeigen, dass TKM einen stärkeren Einfluss auf die Migration von MSC ins Glioblastom hat als VEGF-A und dass an der Lokomotion durch TKM noch weitere Stoffe neben VEGF-A eine Rolle spielen (Birnbaum et al., 2007). Knochenmarkstammzellen sind an der Angiogenese sowie der Vaskulogenese beteiligt, wie Lyden und Kollegen zeigen konnten. Durch die Blockierung von VEGF wurde die Migration von VEGFR-1 und VEGFR-2 positiven Zellen aus dem Knochenmark vermindert. Dadurch konnte eine Reduktion im Wachstum und der Angiogenese im nicht glialen Tumor-Mausmodell nachgewiesen werden (Lyden et al., 2001).

In den Färbungen der MSC ohne Inkubation mit TKM konnte in dieser Arbeit eine schwache Expression von Prox-1, VEGFR-3 und Podoplanin an einigen der Zellen nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass auch ohne Einwirkung von Lymphangiogenese fördernden Faktoren, eine Subpopulation von Zellen im Knochenmark diese Marker exprimiert. Salven und Kollegen beschrieben eine Subpopulation von Stamm- und Progenitorzellen, die VEGFR-3 neben anderen Markern exprimierten und denen eine Rolle in der Lymphangiogenese sowie Angiogenese zugeschrieben wird (Salven et al., 2003). Podoplanin wird wie von Lee beschrieben auf einer Subpopulation von aus dem Knochenmark isolierten Stammzellen exprimiert. Diese Zellen scheinen mögliche Lymphendothel-Progenitorzellen zu sein (Lee et al., 2010). Prox-1 wiederum ist ein Transkriptionsfaktor und spielt eine Rolle in der Expression der genannten Marker Podoplanin und VEGFR-3 (Hong et al., 2002).

Gröger und Kollegen haben beschrieben, dass es nach Inhibition von IL-3 zu einer Reduktion der Expression von Prox-1 und Podoplanin auf Lymphendothelzellen kommt. Ferner konnte gezeigt werden, dass es durch Induktion von Prox-1 auf Blutendothelzellen

zur Expression von Lymphendothelzell-Markern wie VEGFR-3 und Podoplanin kommt (Groger et al., 2004). IL-3 hat einen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen (Khapli et al., 2003) und scheint ferner einen Einfluss auf die Expression von lymphspezifischen Markern, vor allem Prox-1, auf Lymphendothelzellen zu haben. Davon ausgehend, dass IL-3 einen Einfluss auf die Expression von Prox-1 und dadurch auch auf die Expression von Podoplanin und VEGFR-3 hat, wurden in dieser Arbeit die MSC mit IL-3 inkubiert. Die gesteigerte Expression der Marker wurde nach 2 Tagen immunhistologisch untersucht. Es konnte eine positive Expression von Prox-1, Podoplanin und VEGFR-3 nachgewiesen werden.

In Zusammenschau der Ergebnisse und ihrer Bedeutung im wissenschaftlichen Kontext trägt diese Arbeit zum Verständnis der Glioblastombiologie bei und beschreibt Faktoren die einen Einfluss auf die Angiogene und Lymphangiogene zu haben scheinen und mögliche Angriffspunkte für zukünftige Therapieansätze darstellen könnten.

6 Zusammenfassung

Die Lymphangiogenese spielt in der Ausbreitung und Malignität einiger Tumoren eine wichtige Rolle. Das ZNS ist frei von Lymphgefäßen, dennoch konnten lymphgefäßspezifische Marker im Glioblastom nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Expression der lymphangiogenese-spezifischen Marker VEGFR-3, Podoplanin, LYVE-1 und Prox-1 an Gewebeschnitten des Glioblastoms untersucht, zum anderen der Einfluss sezernierter Faktoren von Tumor-konditioniertem Mediums auf die Expression von Lymph-Angiogenese-spezifischen Markern in mesenchymalen Stammzellen. Es konnte gezeigt werden, dass es erst nach einigen Tagen zu einer Zunahme der lymphspezifischen Marker VEGFR-3, Podoplanin, LYVE-1 und Prox-1 in MSC durch die Inkubation mit TKM kommt. In Glioblastomgewebeschnitten konnte die Expression der beschriebenen Lymphmarker VEGFR-3, Podoplanin, LYVE-1 und Prox-1 im Bereich der Gefäße nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass mesenchymale Stammzellen, nach einer eventuellen Rekrutierung durch den Tumor, induziert durch sezernierte Faktoren, zum lymphangiogenen Phänotyp des Glioblastoms beitragen.

Literaturverzeichnis

- ACHEN, M. G., JELTSCH, M., KUKK, E., MAKINEN, T., VITALI, A., WILKS, A. F., ALITALO, K. & STACKER, S. A. 1998. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 548-53.
- AL-RAWI, M. A., MANSEL, R. E. & JIANG, W. G. 2005. Lymphangiogenesis and its role in cancer. *Histol Histopathol*, 20, 283-98.
- ALITALO, K., TAMMELA, T. & PETROVA, T. V. 2005. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*, 438, 946-53.
- ASELLIUS, G. 1627. *De lactibus sive lacteis venis*, J.B. Bidellium, Mediolani, Milan.
- AUTENSHLYUS, A. I., ARKHIPOV, S. A., KUNTS, T. A., MARINKIN, I. O., MIKHAILOVA, E. S., KARPUKHINA, X. V. & VARAKSIN, N. A. 2016. Cytokine profiles of tumor supernatants in invasive ductal cancer and fibroadenoma of the breast and its relationship with VEGF-A expression in the tumors. *Int J Immunopathol Pharmacol*.
- BANERJI, S., NI, J., WANG, S. X., CLASPER, S., SU, J., TAMMI, R., JONES, M. & JACKSON, D. G. 1999. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol*, 144, 789-801.
- BEHLING, K., MAGUIRE, W. F., DI GIALLEONARDO, V., HEEB, L. E., HASSAN, I. F., VEACH, D. R., KESHARI, K. R., GUTIN, P. H., SCHEINBERG, D. A. & MCDEVITT, M. R. 2016. Remodeling the Vascular Microenvironment of Glioblastoma with alpha-Particles. *J Nucl Med*, 57, 1771-1777.
- BETSCHINGER, J., MECHTLER, K. & KNOBLICH, J. A. 2006. Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in Drosophila neural stem cells. *Cell*, 124, 1241-53.
- BIRNBAUM, T., ROIDER, J., SCHANKIN, C. J., PADOVAN, C. S., SCHICHOR, C., GOLDBRUNNER, R. & STRAUBE, A. 2007. Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *J Neurooncol*, 83, 241-7.
- BONO, P., WASENIUS, V. M., HEIKKILA, P., LUNDIN, J., JACKSON, D. G. & JOENSUU, H. 2004. High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 7144-9.
- BRAGHIROLI, M. I., SABBAGA, J. & HOFF, P. M. 2012. Bevacizumab: overview of the literature. *Expert Rev Anticancer Ther*, 12, 567-80.
- BREITENEDER-GELEFF, S., MATSUI, K., SOLEIMAN, A., MERANER, P., POCZEWSKI, H., KALT, R., SCHAFFNER, G. & KERJASCHKI, D. 1997. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol*, 151, 1141-52.
- BREITENEDER-GELEFF, S., SOLEIMAN, A., KOWALSKI, H., HORVAT, R., AMANN, G., KRIEHLER, E., DIEM, K., WENINGER, W., TSCHACHLER, E., ALITALO, K. & KERJASCHKI, D. 1999. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol*, 154, 385-94.
- CAMPAGNOLI, C., ROBERTS, I. A., KUMAR, S., BENNETT, P. R., BELLANTUONO, I. & FISK, N. M. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98, 2396-402.

- CHEN, J., LI, Y., WANG, L., LU, M., ZHANG, X. & CHOPP, M. 2001. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci*, 189, 49-57.
- COHEN, A. L., HOLMEN, S. L. & COLMAN, H. 2013. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 13, 345.
- CONRAD, C., NIESS, H., HUSS, R., HUBER, S., VON LUETTICHAU, I., NELSON, P. J., OTT, H. C., JAUCH, K. W. & BRUNS, C. J. 2009. Multipotent mesenchymal stem cells acquire a lymphendothelial phenotype and enhance lymphatic regeneration in vivo. *Circulation*, 119, 281-9.
- CORTES-SANTIAGO, N., HOSSAIN, M. B., GABRUSIEWICZ, K., FAN, X., GUMIN, J., MARINI, F. C., ALONSO, M. M., LANG, F., YUNG, W. K., FUEYO, J. & GOMEZ-MANZANO, C. 2016. Soluble Tie2 overrides the heightened invasion induced by anti-angiogenesis therapies in gliomas. *Oncotarget*, 7, 16146-57.
- DALLAS, N. A., SAMUEL, S., XIA, L., FAN, F., GRAY, M. J., LIM, S. J. & ELLIS, L. M. 2008. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res*, 14, 1931-7.
- DOLINSEK, T., MARKELC, B., BOSNJAK, M., BLAGUS, T., PROSEN, L., KRANJC, S., STIMAC, M., LAMPREHT, U., SERSA, G. & CEMAZAR, M. 2015. Endoglin silencing has significant antitumor effect on murine mammary adenocarcinoma mediated by vascular targeted effect. *Curr Gene Ther*, 15, 228-44.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D. & HORWITZ, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-7.
- DROPCHO, E. J. & SOONG, S. J. 1996. The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. *Neurology*, 47, 684-90.
- DUMONT, D. J., JUSSILA, L., TAIPALE, J., LYMBOUSSAKI, A., MUSTONEN, T., PAJUSOLA, K., BREITMAN, M. & ALITALO, K. 1998. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*, 282, 946-9.
- ELSIR, T., ERIKSSON, A., ORREGO, A., LINDSTROM, M. S. & NISTER, M. 2010. Expression of PROX1 Is a common feature of high-grade malignant astrocytic gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69, 129-38.
- ELSIR, T., QU, M., BERNTSSON, S. G., ORREGO, A., OLOFSSON, T., LINDSTROM, M. S., NISTER, M., VON DEIMLING, A., HARTMANN, C., RIBOM, D. & SMITS, A. 2011. PROX1 is a predictor of survival for gliomas WHO grade II. *Br J Cancer*, 104, 1747-54.
- FISCHER, I., CUNLIFFE, C. H., BOLLO, R. J., RAZA, S., MONOKY, D., CHIRIBOGA, L., PARKER, E. C., GOLFINOS, J. G., KELLY, P. J., KNOPP, E. A., GRUBER, M. L., ZAGZAG, D. & NARAYANA, A. 2008. High-grade glioma before and after treatment with radiation and Avastin: initial observations. *Neuro Oncol*, 10, 700-8.
- FONSATTI, E., ALTOMONTE, M., NICOTRA, M. R., NATALI, P. G. & MAIO, M. 2003. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. *Oncogene*, 22, 6557-63.
- FONSATTI, E., DEL VECCHIO, L., ALTOMONTE, M., SIGALOTTI, L., NICOTRA, M. R., CORAL, S., NATALI, P. G. & MAIO, M. 2001. Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol*, 188, 1-7.
- FRIEDENSTEIN, A. J., PIATETZKY, S., II & PETRAKOVA, K. V. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 16, 381-90.

- GALE, N. W., PREVO, R., ESPINOSA, J., FERGUSON, D. J., DOMINGUEZ, M. G., YANCOPOULOS, G. D., THURSTON, G. & JACKSON, D. G. 2006. Normal Lymphatic Development and Function in Mice Deficient for the Lymphatic Hyaluronan Receptor LYVE-1. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 595-604.
- GRAU, S. J., TRILLSCH, F., HERMS, J., THON, N., NELSON, P. J., TONN, J. C. & GOLDBRUNNER, R. 2007. Expression of VEGFR3 in glioma endothelium correlates with tumor grade. *J Neurooncol*, 82, 141-50.
- GRAU, S. J., TRILLSCH, F., VON LUTTICHAU, I., NELSON, P. J., HERMS, J., TONN, J. C. & GOLDBRUNNER, R. H. 2008. Lymphatic phenotype of tumour vessels in malignant gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 34, 675-9.
- GROGER, M., LOEWE, R., HOLNTHONER, W., EMBACHER, R., PILLINGER, M., HERRON, G. S., WOLFF, K. & PETZELBAUER, P. 2004. IL-3 induces expression of lymphatic markers Prox-1 and podoplanin in human endothelial cells. *J Immunol*, 173, 7161-9.
- HE, Y., KOZAKI, K., KARPANEN, T., KOSHIKAWA, K., YLA-HERTTUALA, S., TAKAHASHI, T. & ALITALO, K. 2002. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst*, 94, 819-25.
- HE, Y., RAJANTIE, I., PAJUSOLA, K., JELTSCH, M., HOLOPAINEN, T., YLA-HERTTUALA, S., HARDING, T., JOOSS, K., TAKAHASHI, T. & ALITALO, K. 2005. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res*, 65, 4739-46.
- HJELMELAND, A. B., LATHIA, J. D., SATHORNSUMETEE, S. & RICH, J. N. 2011. Twisted tango: brain tumor neurovascular interactions. *Nat Neurosci*, 14, 1375-81.
- HONG, Y. K. & DETMAR, M. 2003. Prox1, master regulator of the lymphatic vasculature phenotype. *Cell Tissue Res*, 314, 85-92.
- HONG, Y. K., HARVEY, N., NOH, Y. H., SCHACHT, V., HIRAKAWA, S., DETMAR, M. & OLIVER, G. 2002. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn*, 225, 351-7.
- HORWITZ, E. M., LE BLANC, K., DOMINICI, M., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F. C., DEANS, R. J., KRAUSE, D. S. & KEATING, A. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7, 393-5.
- HUANG, Y. & LI, S. 2010. Detection of characteristic sub pathway network for angiogenesis based on the comprehensive pathway network. *BMC Bioinformatics*, 11 Suppl 1, S32.
- HUNTINGTON, G. S. 1914. The development of the Mammalian jugular lymphsac, of the tributary primitive ulnar lymphatic and of the thoracic ducts from the view point of recent investigation of vertebrate lymphatic ontogeny, together with a consideration of the genetic relation of lymphatic and haemal vascular channels in the embryos of Amniotes. *The American journal of anatomy*, 16, 259-316.
- ILHAN, N., GUNGOR, H., GUL, H. F. & EROKSUZ, H. 2016. Expression of Endoglin and Vascular Endothelial Growth Factor as Prognostic Markers in Experimental Colorectal Cancer. *Anticancer Res*, 36, 3953-9.
- JACKSON, K. A., MAJKA, S. M., WANG, H., POCIUS, J., HARTLEY, C. J., MAJESKY, M. W., ENTMAN, M. L., MICHAEL, L. H., HIRSCHI, K. K. & GOODELL, M. A. 2001. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 107, 1395-402.

- JENNY, B., HARRISON, J. A., BAETENS, D., TILLE, J. C., BURKHARDT, K., MOTTAZ, H., KISS, J. Z., DIETRICH, P. Y., DE TRIBOLET, N., PIZZOLATO, G. P. & PEPPER, M. S. 2006. Expression and localization of VEGF-C and VEGFR-3 in glioblastomas and haemangioblastomas. *J Pathol*, 209, 34-43.
- JUBB, A. M., HURWITZ, H. I., BAI, W., HOLMGREN, E. B., TOBIN, P., GUERRERO, A. S., KABBINAVAR, F., HOLDEN, S. N., NOVOTNY, W. F., FRANTZ, G. D., HILLAN, K. J. & KOEPPEN, H. 2006. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 24, 217-27.
- KAIPAINEN, A., KORHONEN, J., MUSTONEN, T., VAN HINSBERGH, V. W., FANG, G. H., DUMONT, D., BREITMAN, M. & ALITALO, K. 1995. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 3566-70.
- KARGIOTIS, O., RAO, J. S. & KYRITSIS, A. P. 2006. Mechanisms of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol*, 78, 281-93.
- KARKKAINEN, M. J., HAIKO, P., SAINIO, K., PARTANEN, J., TAIPALE, J., PETROVA, T. V., JELTSCH, M., JACKSON, D. G., TALIKKA, M., RAUVALA, H., BETSHOLTZ, C. & ALITALO, K. 2004. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*, 5, 74-80.
- KARPANEN, T. & ALITALO, K. 2008. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol*, 3, 367-97.
- KARPANEN, T., EGBLAD, M., KARKKAINEN, M. J., KUBO, H., YLA-HERTTUALA, S., JAATTELA, M. & ALITALO, K. 2001. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res*, 61, 1786-90.
- KATO, Y., KANEKO, M., SATA, M., FUJITA, N., TSURUO, T. & OSAWA, M. 2005. Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*, 26, 195-200.
- KEUNEN, O., JOHANSSON, M., OUDIN, A., SANZEY, M., RAHIM, S. A., FACK, F., THORSEN, F., TAXT, T., BARTOS, M., JIRIK, R., MILETIC, H., WANG, J., STIEBER, D., STUHR, L., MOEN, I., RYGH, C. B., BJERKVIG, R. & NICLOU, S. P. 2011. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 3749-54.
- KHAPLI, S. M., MANGASHETTI, L. S., YOGESHA, S. D. & WANI, M. R. 2003. IL-3 acts directly on osteoclast precursors and irreversibly inhibits receptor activator of NF-kappa B ligand-induced osteoclast differentiation by diverting the cells to macrophage lineage. *J Immunol*, 171, 142-51.
- KHROMOVA, N., KOPNIN, P., RYBKO, V. & KOPNIN, B. P. 2012. Downregulation of VEGF-C expression in lung and colon cancer cells decelerates tumor growth and inhibits metastasis via multiple mechanisms. *Oncogene*, 31, 1389-97.
- KODAMA, M., KITADAI, Y., TANAKA, M., KUWAI, T., TANAKA, S., OUE, N., YASUI, W. & CHAYAMA, K. 2008. Vascular endothelial growth factor C stimulates progression of human gastric cancer via both autocrine and paracrine mechanisms. *Clin Cancer Res*, 14, 7205-14.
- KUBO, H., FUJIWARA, T., JUSSILA, L., HASHI, H., OGAWA, M., SHIMIZU, K., AWANE, M., SAKAI, Y., TAKABAYASHI, A., ALITALO, K., YAMAOKA, Y. & NISHIKAWA, S. I. 2000. Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood*, 96, 546-53.
- KUKK, E., LYMBOUSSAKI, A., TAIRA, S., KAIPAINEN, A., JELTSCH, M., JOUKOV, V. & ALITALO, K. 1996. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with

- VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*, 122, 3829-37.
- LEE, J. Y., PARK, C., CHO, Y. P., LEE, E., KIM, H., KIM, P., YUN, S. H. & YOON, Y. S. 2010. Podoplanin-expressing cells derived from bone marrow play a crucial role in postnatal lymphatic neovascularization. *Circulation*, 122, 1413-25.
- LI, C., HAMPSON, I. N., HAMPSON, L., KUMAR, P., BERNABEU, C. & KUMAR, S. 2000. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J*, 14, 55-64.
- LIU, X. M., ZHANG, Q. P., MU, Y. G., ZHANG, X. H., SAI, K., PANG, J. C., NG, H. K. & CHEN, Z. P. 2011. Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas. *J Neurooncol*, 105, 173-9.
- LOUIS, D. N., PERRY, A., REIFENBERGER, G., VON DEIMLING, A., FIGARELLA-BRANGER, D., CAVENEE, W. K., OHGAKI, H., WIESTLER, O. D., KLEIHUES, P. & ELLISON, D. W. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 131, 803-20.
- LYDEN, D., HATTORI, K., DIAS, S., COSTA, C., BLAIKIE, P., BUTROS, L., CHADBURN, A., HEISSIG, B., MARKS, W., WITTE, L., WU, Y., HICKLIN, D., ZHU, Z., HACKETT, N. R., CRYSTAL, R. G., MOORE, M. A., HAJJAR, K. A., MANOVA, K., BENEZRA, R. & RAFII, S. 2001. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*, 7, 1194-201.
- MAEHANA, S., NAKAMURA, M., OGAWA, F., IMAI, R., MURAKAMI, R., KOJIMA, F., MAJIMA, M. & KITASATO, H. 2016. Suppression of lymphangiogenesis by soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 in a mouse lung cancer model. *Biomed Pharmacother*, 84, 660-665.
- MARCHIO, S., PRIMO, L., PAGANO, M., PALESTRO, G., ALBINI, A., VEIKKOLA, T., CASCONI, I., ALITALO, K. & BUSSOLINO, F. 1999. Vascular endothelial growth factor-C stimulates the migration and proliferation of Kaposi's sarcoma cells. *J Biol Chem*, 274, 27617-22.
- MARTIN-VILLAR, E., SCHOLL, F. G., GAMALLO, C., YURRITA, M. M., MUNOZ-GUERRA, M., CRUCES, J. & QUINTANILLA, M. 2005. Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*, 113, 899-910.
- MARUYAMA, K., II, M., CURSIEFEN, C., JACKSON, D. G., KEINO, H., TOMITA, M., VAN ROOIJEN, N., TAKENAKA, H., D'AMORE, P. A., STEIN-STREILEIN, J., LOSORDO, D. W. & STREILEIN, J. W. 2005. Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *J Clin Invest*, 115, 2363-72.
- MISHIMA, K., KATO, Y., KANEKO, M. K., NISHIKAWA, R., HIROSE, T. & MATSUTANI, M. 2006. Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathol*, 111, 483-8.
- MOFFAT, B. A., CHEN, M., KARIAAPPER, M. S., HAMSTRA, D. A., HALL, D. E., STOJANOVSKA, J., JOHNSON, T. D., BLAIVAS, M., KUMAR, M., CHENEVERT, T. L., REHEMTULLA, A. & ROSS, B. D. 2006. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A causes a paradoxical increase in tumor blood flow and up-regulation of VEGF-D. *Clin Cancer Res*, 12, 1525-32.
- MOON, K. S., JUNG, S., LEE, M. C., KIM, I. Y., KIM, H. W., LEE, J. K. & KIM, T. S. 2004. Metastatic glioblastoma in cervical lymph node after repeated craniotomies: report of a case with diagnosis by fine needle aspiration. *J Korean Med Sci*, 19, 911-4.
- NAGPAL, S., HARSH, G. & RECHT, L. 2011. Bevacizumab improves quality of life in patients with recurrent glioblastoma. *Chemother Res Pract*, 2011, 602812.

- NAKAHARA, H., DENNIS, J. E., BRUDER, S. P., HAYNESWORTH, S. E., LENNON, D. P. & CAPLAN, A. I. 1991. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res*, 195, 492-503.
- OLIVER, G. & DETMAR, M. 2002. The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev*, 16, 773-83.
- OLIVER, G., SOSA-PINEDA, B., GEISENDORF, S., SPANA, E. P., DOE, C. Q. & GRUSS, P. 1993. Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mech Dev*, 44, 3-16.
- ORDONEZ, N. G. 2005. D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma. *Hum Pathol*, 36, 372-80.
- PARK, C., LEE, J. Y. & YOON, Y. S. 2011. Role of bone marrow-derived lymphatic endothelial progenitor cells for lymphatic neovascularization. *Trends Cardiovasc Med*, 21, 135-40.
- PETROVA, T. V., NYKANEN, A., NORRMEN, C., IVANOV, K. I., ANDERSSON, L. C., HAGLUND, C., PUOLAKKAINEN, P., WEMPE, F., VON MELCHNER, H., GRADWOHL, G., VANHARANTA, S., AALTONEN, L. A., SAHARINEN, J., GENTILE, M., CLARKE, A., TAIPALE, J., OLIVER, G. & ALITALO, K. 2008. Transcription factor PROX1 induces colon cancer progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype. *Cancer Cell*, 13, 407-19.
- PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S. & MARSHAK, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7.
- PLATE, K. H., BREIER, G., WEICH, H. A. & RISAU, W. 1992. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*, 359, 845-8.
- PREVO, R., BANERJI, S., FERGUSON, D. J., CLASPER, S. & JACKSON, D. G. 2001. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem*, 276, 19420-30.
- PROCKOP, D. J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276, 71-4.
- RAMIREZ, M. I., MILLIEN, G., HINDS, A., CAO, Y., SELDIN, D. C. & WILLIAMS, M. C. 2003. T1alpha, a lung type I cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth. *Dev Biol*, 256, 61-72.
- RIVERA, C. G., MELLBERG, S., CLAESSION-WELSH, L., BADER, J. S. & POPEL, A. S. 2011. Analysis of VEGF--a regulated gene expression in endothelial cells to identify genes linked to angiogenesis. *PLoS One*, 6, e24887.
- SABIN, F. R. 1902. On the origin of the lymphatic system from the veins, and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *The American journal of anatomy*, 1, 367-389.
- SABIN, F. R. 1904. On the development of the superficial lymphatics in the skin of the pig. *The American journal of anatomy*, 3, 183-195.
- SACCHI, G., WEBER, E., AGLIANO, M., RAFFAELLI, N. & COMPARINI, L. 1997. The structure of superficial lymphatics in the human thigh: precollectors. *Anat Rec*, 247, 53-62.
- SALVEN, P., MUSTJOKI, S., ALITALO, R., ALITALO, K. & RAFII, S. 2003. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood*, 101, 168-72.

- SANCHEZ-ELSNER, T., BOTELLA, L. M., VELASCO, B., LANGA, C. & BERNABEU, C. 2002. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem*, 277, 43799-808.
- SATHORNSUMETEE, S., RICH, J. N. & REARDON, D. A. 2007. Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma. *Neurol Clin*, 25, 1111-39, x.
- SCALLAN, J. P., ZAWIEJA, S. D., CASTORENA-GONZALEZ, J. A. & DAVIS, M. J. 2016. Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction. *J Physiol*, 594, 5749-5768.
- SCHACHT, V., RAMIREZ, M. I., HONG, Y. K., HIRAKAWA, S., FENG, D., HARVEY, N., WILLIAMS, M., DVORAK, A. M., DVORAK, H. F., OLIVER, G. & DETMAR, M. 2003. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J*, 22, 3546-56.
- SCHICHOR, C., BIRNBAUM, T., ETMINAN, N., SCHNELL, O., GRAU, S., MIEBACH, S., ABOODY, K., PADOVAN, C., STRAUBE, A., TONN, J. C. & GOLDBRUNNER, R. 2006. Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Exp Neurol*, 199, 301-10.
- SCHLEDZEWSKI, K., FALKOWSKI, M., MOLDENHAUER, G., METHAROM, P., KZHYSHKOWSKA, J., GANSS, R., DEMORY, A., FALKOWSKA-HANSEN, B., KURZEN, H., UGUREL, S., GEGINAT, G., ARNOLD, B. & GOERDT, S. 2006. Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis. *J Pathol*, 209, 67-77.
- SCHMEISSER, A., GARLICH, C. D., ZHANG, H., ESKAFI, S., GRAFFY, C., LUDWIG, J., STRASSER, R. H. & DANIEL, W. G. 2001. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res*, 49, 671-80.
- SCHNEIDER, M., OTHMAN-HASSAN, K., CHRIST, B. & WILTING, J. 1999. Lymphangioblasts in the avian wing bud. *Dev Dyn*, 216, 311-9.
- SHARMA, N., SEFTOR, R. E., SEFTOR, E. A., GRUMAN, L. M., HEIDGER, P. M., JR., COHEN, M. B., LUBAROFF, D. M. & HENDRIX, M. J. 2002. Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: role in vasculogenic mimicry. *Prostate*, 50, 189-201.
- SHIMODA, M., TAKAHASHI, M., YOSHIMOTO, T., KONO, T., IKAI, I. & KUBO, H. 2006. A homeobox protein, prox1, is involved in the differentiation, proliferation, and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 12, 6005-11.
- SHIRAKAWA, K., KOBAYASHI, H., HEIKE, Y., KAWAMOTO, S., BRECHBIEL, M. W., KASUMI, F., IWANAGA, T., KONISHI, F., TERADA, M. & WAKASUGI, H. 2002. Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res*, 62, 560-6.
- SMITH, S. J., TILLY, H., WARD, J. H., MACARTHUR, D. C., LOWE, J., COYLE, B. & GRUNDY, R. G. 2012. CD105 (Endoglin) exerts prognostic effects via its role in the microvascular niche of paediatric high grade glioma. *Acta Neuropathol*, 124, 99-110.
- SPINELLA, F., CAPRARA, V., DI CASTRO, V., ROSANO, L., CIANFROCCA, R., NATALI, P. G. & BAGNATO, A. 2012. Endothelin-1 induces the transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *J Mol Med (Berl)*.

- SUN, B., ZHANG, S., ZHAO, X., ZHANG, W. & HAO, X. 2004. Vasculogenic mimicry is associated with poor survival in patients with mesothelial sarcomas and alveolar rhabdomyosarcomas. *Int J Oncol*, 25, 1609-14.
- VALTOLA, R., SALVEN, P., HEIKKILA, P., TAIPALE, J., JOENSUU, H., REHN, M., PIHLAJANIEMI, T., WEICH, H., DEWAAL, R. & ALITALO, K. 1999. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol*, 154, 1381-90.
- VAN'T HULL, E. F., BRON, S., HENRY, L., IFTICENE-TREBOUX, A., TURRINI, R., COUKOS, G., DELALOYE, J. F. & DOUCEY, M. A. 2014. Bone marrow-derived cells are implicated as a source of lymphatic endothelial progenitors in human breast cancer. *Oncoimmunology*, 3, e29080.
- WAKITANI, S., SAITO, T. & CAPLAN, A. I. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 18, 1417-26.
- WATANABE, K., TACHIBANA, O., SATA, K., YONEKAWA, Y., KLEIHUES, P. & OHGAKI, H. 1996. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol*, 6, 217-23; discussion 23-4.
- WICKI, A. & CHRISTOFORI, G. 2007. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer*, 96, 1-5.
- WIGLE, J. T., HARVEY, N., DETMAR, M., LAGUTINA, I., GROSVELD, G., GUNN, M. D., JACKSON, D. G. & OLIVER, G. 2002. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J*, 21, 1505-13.
- WIGLE, J. T. & OLIVER, G. 1999. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*, 98, 769-78.
- WILTING, J., AREF, Y., HUANG, R., TOMAREV, S. I., SCHWEIGERER, L., CHRIST, B., VALASEK, P. & PAPOUTSI, M. 2006. Dual origin of avian lymphatics. *Dev Biol*, 292, 165-73.
- WITMER, A. N., VAN BLIJSWIJK, B. C., DAI, J., HOFMAN, P., PARTANEN, T. A., VRENSSEN, G. F. & SCHLINGEMANN, R. O. 2001. VEGFR-3 in adult angiogenesis. *J Pathol*, 195, 490-7.
- WOODBURY, D., SCHWARZ, E. J., PROCKOP, D. J. & BLACK, I. B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 61, 364-70.
- YU, J. X., ZHANG, X. T., LIAO, Y. Q., ZHANG, Q. Y., CHEN, H., LIN, M. & KUMAR, S. 2003. Relationship between expression of CD105 and growth factors in malignant tumors of gastrointestinal tract and its significance. *World J Gastroenterol*, 9, 2866-9.
- ZAGZAG, D., ZHONG, H., SCALZITTI, J. M., LAUGHNER, E., SIMONS, J. W. & SEMENZA, G. L. 2000. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer*, 88, 2606-18.
- ZIJLMANS, H. J., FLEUREN, G. J., HAZELBAG, S., SIER, C. F., DREEF, E. J., KENTER, G. G. & GORTER, A. 2009. Expression of endoglin (CD105) in cervical cancer. *Br J Cancer*, 100, 1617-26.
- ZUK, P. A., ZHU, M., ASHJIAN, P., DE UGARTE, D. A., HUANG, J. I., MIZUNO, H., ALFONSO, Z. C., FRASER, J. K., BENHAIM, P. & HEDRICK, M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13, 4279-95.

Danksagung

Bedanke möchte ich mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Tonn und bei Herrn Prof. Dr. Schichor für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Anleitung und für die Möglichkeit in ihrem Labor zu arbeiten.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Valerie Albrecht und dem Team des tumorbiologischen Labors für die Betreuung der Arbeit und für die unermüdliche Unterstützung bei den Versuchen von A wie Anfärben bis Z wie Zellpflege.

Mein herzlicher Dank gilt schließlich meinen Eltern, meinen Brüdern, meinem Mann und meinen vielen Freunden, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, mich motiviert haben und mir zuletzt den Mut gaben nicht aufzugeben.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Vieth, Sophia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Expression von mesenchymalen und lymphangiogenen Markern 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.

Hamburg, 17.02.2020

Ort, Datum

Sophia Vieth

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand