

Aus der Klinik für Neurochirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von EphB4 auf die Vermittlung vaskulärer Resistenz  
im Rahmen einer antiangiogenen Therapie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Moritz Markel

aus Hildesheim

Datum der Promotion: 09.09.2016

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
<b>I. Abstract in deutscher Sprache.....</b>	<b>5</b>
<b>II Abstract in englischer Sprache.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Vaskulogenese und Angiogenese.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Ephrine und Eph-Rezeptoren.....</b>	<b>9</b>
1.2.1 Eph/Ephrin-Familie in Angiogenese und Tumorangiogenese.....	9
1.2.2 Eph/Ephrin-Familie und Tumorigenese.....	10
<b>1.3 Antiangiogene Therapie und Resistenzmechanismen.....</b>	<b>11</b>
1.3.1 „Adaptive“ Resistenzmechanismen.....	12
1.3.2 „Intrinsische“ Resistenzmechanismen.....	13
<b>1.4 Perizyten: Wichtige Regulatoren des Gefäßsystems.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Fragestellung.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Zellen und Zellkultur.....</b>	<b>17</b>
2.1.1 Glioblastoma multiforme (SF 126).....	17
2.1.2 Phoenix-E-Zelltypen.....	17
2.1.3 Koimplantation.....	18
<b>2.2 Versuchstiere.....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Narkose.....	19
2.2.2 Antiangiogene Therapie.....	20
<b>2.3 Rückenhautkammermodell.....</b>	<b>20</b>
2.3.1 Präparation der Rückenhautkammer.....	20
<b>2.4 Intravital-Fluoreszenz-Video-Mikroskopie (IVM).....</b>	<b>21</b>
2.4.1 Messparameter.....	22
2.4.1.1 Gefäßdurchmesser (D).....	22
2.4.1.2 Totale Gefäßdichte (TVD).....	23
2.4.1.3 Funktionelle Gefäßdichte (FVD).....	23
2.4.1.4 Perfusionsindex (PI).....	23
2.4.1.5 Volumetrischer Blutfluss ( $Q_v$ ).....	24
2.4.1.6 Permeabilitätsindex (P).....	24
<b>2.5 Konfokale Lasermikroskopie.....</b>	<b>25</b>
<b>2.6 Subkutane Zellimplantation.....</b>	<b>25</b>
<b>2.7 Immunfluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>25</b>

2.7.1 Perizyten-Endothel-Interaktion.....	25
2.7.2 Proliferation.....	26
2.7.3 Endotheliale Proliferation.....	26
2.7.4 Apoptose.....	26
<b>2.8 Studiendesign.....</b>	<b>27</b>
<b>2.9 Statistische Methoden.....</b>	<b>27</b>
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Ergebnisse der Intravital-Fluoreszenz-Video-Mikroskopie.....</b>	<b>28</b>
3.1.1 Gefäßdurchmesser (D).....	28
3.1.2 Totale Gefäßdichte (TVD).....	29
3.1.3 Funktionelle Gefäßdichte (FVD).....	30
3.1.4 Permeabilitätsindex (PI).....	32
3.1.5 Perfusionsindex (P).....	33
3.1.6 Volumetrischer Blutfluss ( $Q_v$ ).....	33
<b>3.2 Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>36</b>
3.2.1 Perizyten-Endothel-Interaktion.....	36
3.2.2 Proliferation.....	38
3.2.3 Endotheliale Proliferation.....	40
3.2.4 Apoptose.....	42
<b>3.3 Ergebnisse der Konfokalen Lasermikroskopie.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4 Ergebnisse der Subkutanen Zellimplantationen.....</b>	<b>45</b>
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Diskussion der Methodik.....</b>	<b>46</b>
4.1.1 Das Glioblastom-Modell.....	46
4.1.2 Das ecotrope Transfektions-Modell.....	49
4.1.3 Die Gefäßanalyse mittels Intravital-Fluoreszenz-Video-Mikroskopie.....	50
<b>4.2 Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
4.2.1 Tumorangio-genese und antiangiogene Therapie.....	51
4.2.2 Eph B4 vermittelt vaskuläre Resistenz gegenüber antiangiogener Therapie.....	52
4.2.3 EphB4 stabilisiert Tumorwachstum und vermindert Apoptose.....	57
4.2.4 Sind Effekte von EphB4 über Aktivierung von Ephrin B2 vermittelt?.....	59
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>61</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>63</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>74</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	74
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	77
<b>8. Erklärung zur Dissertation.....</b>	<b>78</b>

<b>9. Lebenslauf.....</b>	<b>79</b>
<b>10. Danksagungen.....</b>	<b>79</b>

## **I. Abstract in deutscher Sprache**

### **Einleitung:**

Der antiangiogene Therapieansatz von Tumoren wird durch vaskuläre Resistenzmechanismen begrenzt. Die dem zu Grunde liegenden Signalwege sind derzeit nicht bekannt. Das Ziel dieser Studie war die Analyse des EphB4-Signalweges bezüglich einer Vermittlung von Resistenzmechanismen.

### **Material und Methoden:**

Es wurde eine ecotroper retroviraler Vektor (pLXSN), welcher die gesamte Gensequenz von EphB4 (EphB4 wt) beinhaltet, generiert und befindlich in Phoenix E Zellen zusammen mit SF 126 Gliomzellen in eine Rückenhautkammer und zudem als subkutane Xenografts (N=5) implantiert. Das Gefäßsystem wurde unter Einsatz von Intravitalfluoreszenzmikroskopie mit Konzentration auf die Gefäßdicke (TVD), den Gefäßdurchmesser (D), die Permeabilitätsindex (PI) und weitere Parameter analysiert. Das Wachstum der subkutanen Tumore wurde ab einer Größe von 50 mm<sup>3</sup> für 7 Tage dokumentiert. Die Behandlung mit Sunitinib (40 mg/kg KG) wurde für 6 Tage durchgeführt. Die Immunhistochemie beinhaltete Pecam-Desmin-, KI67- und Caspase 3-Färbungen.

### **Ergebnisse:**

Sunitinib führte zu einer verminderten Gefäßdicke in den Tumoren der Kontrollgruppe. In den Tumoren der Überexpression von EphB4 kam es zu keiner Reduktion der Gefäßdicke. Korrespondierend zeigten sich die Tumore der EphB4wt Gruppe in den subkutanen Xenografts resistent gegenüber der Therapie mit Sunitinib. Tumore der EphB4 Gruppe zeigten eine verminderte Permeabilität und erhöhte Assoziation von Perizyten und Endothel.

### **Zusammenfassung:**

EphB4 vermittelt die Ausbildung einer vaskulären Resistenz gegenüber antiangiogener Therapie durch Stabilisierung der Gefäßdicke und Veränderung der Perizyten-Endothel-Interaktion.

## **II. Abstract in englischer Sprache**

### **Introduction:**

Antitumor effects of antiangiogenic treatment are limited by vascular resistance mechanisms. The underlying molecular pathways are currently unknown. It was the aim to analyze the role of the EphB4 pathway in mediating vascular resistance to antiangiogenic treatment.

### **Material and Methods:**

An ecotropic retroviral vector (pLXSN) encoding full length EphB4 (EphB4 wt) was established and Phoenix E virus producing cells were coimplanted with SF126 glioma cells in dorsal skinfold chambers (N=5) and subcutaneous xenografts (N=5). Intravital microscopy was performed focusing on vessel density (TVD), vessel diameter (D), permeability-index (PI) and additional parameters. Subcutaneous tumor growth was assessed (for 7 days) when tumors reached 50mm<sup>3</sup>. Sunitinib treatment (40mg/kg BW) was applied for 6 days. Immunohistochemistry included Pecam-Desmin, KI67 and Caspase 3 stainings.

### **Results:**

Sunitinib led to reduced TVD in control tumors. In EphB4 wt tumors, TVD was not reduced by Sunitinib therapy. Correspondingly, EphB4 wt tumors were resistant to Sunitinib therapy in subcutaneous xenografts. Tumor vessels in EphB4 wt tumors were characterized by reduced permeability and increased pericyte-endothelial cell interactions.

### **Conclusion:**

EphB4 mediates resistance to antiangiogenic treatment by stabilizing vessel density and by altering pericyte-endothelial cell interactions.

## 1. Einleitung

### 1.1 Vaskulogenese und Angiogenese

Die Erhaltung von Organen, Geweben, somit gesamter Organismen ist angewiesen auf die Versorgung über ein geeignetes Medium. Dieses wiederum benötigt Wege um zu den entsprechenden Zielbereichen zu gelangen und transportierte Nährstoffe in hoher Konzentration „abliefern“ zu können. Im menschlichen Organismus ist dieses Medium vornehmlich das Blut (neben anderen hier zu vernachlässigen Medien wie Lymphe, Liquor etc.) und die Wege stellen die Blutgefäße dar. Die Entwicklung des Blutgefäßsystems kann in drei wesentliche Mechanismen untergliedert werden. Im Rahmen des als „Angiogenese“ umschriebenen Prozesses kommt es zur Bildung neuer Abzweigungen, vermittelt über sogenannte „tip-cells“. Der zweite Prozess, die „Vaskulogenese, beschreibt die Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen, die sich zu Endothel differenzieren (EPC: endothelial progenitor cells). Eine weitere Möglichkeit stellt die sogenannte „Intussusception“ dar bei der es zu einer Aufteilung eines bestehenden Gefäßes zu zwei unterschiedlichen kommt. Das Zusammenspiel dieser drei Mechanismen führt zur Ausreifung des Gefäßsystems (4, 32, 86, 127).

Ausgehend von einem angiogenen Signal (z.B. Hypoxie über Sauerstoffrezeptoren) kommt es zu einer Ausschüttung von proangiogenen Faktoren (VEGF, VEGF-C, FGF, ANG-2, weitere Chemokine), was neben parallelen Veränderungen im Endothel des Gefäßes letztlich zur Selektion einer „tip-cell“ (vermittelt durch VEGFR-2, Dll4, JAGGED1, NRP1, Integrine, HIF-1 $\alpha$ , MTP1-MMP, PGC-1 $\alpha$ ) führt. Diese stellt im übertragenen Sinn die „Speerspitze“ des sich neu entwickelnden Gefäßes dar. Weitere notwendige Vorgänge wie die Formation eines Lumens (über VE-cadherin, CD34 etc.), die Stabilisierung des Gefäßes über Rekrutierung von Perizyten (über PDGF-beta, ANG-1, NOTCH, ephrinB2, FGF), die „Führung der Speerspitze“ (über Semaphorine, Ephrine, Integrine etc.) und die Verbindung mit sogenannten „stalk-cells“ auf einem nahe gelegenen Gefäß folgen, sodass es zu Bildung eines „Brückengefäßes“ zwischen zwei benachbarten Gefäßen kommt. Es sei zu erwähnen, dass es sich hierbei um einen Entwurf der Vorgänge handelt und der genaue, sehr komplexe Vorgang noch nicht im Detail verstanden ist (127).

Es wird deutlich, dass der Vorgang der Angiogenese sehr komplex und die involvierten molekularen Faktoren zahlreich sind. Im Folgenden soll nun insbesondere auf die an der Ausbildung einer vaskulären Resistenz beteiligten Faktoren eingegangen werden, die für diese Studie von entscheidender Bedeutung sind: die Eph-Rezeptoren und Ephrine.

## **1.2 Ephrine und Eph-Rezeptoren**

Die Familie der Eph-Rezeptoren und Ephrine wurde Ende der achtziger Jahre erstmalig erwähnt und stellt eine Gruppierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und deren Liganden dar (128). Sie übernehmen wichtige Funktionen im Bereich der embryologischen Entwicklung und der Angio- und Lymphogenese. In neueren Studien sind sie auch im Bereich der Tumorigenese und Tumorangiogenese stärker zum Untersuchungsgegenstand geworden (129,130). Die Namengebung geht auf das griechische Wort „ephoros“ zurück, welches frei übersetzt Kontrolleur bedeutet. Zudem wurde die Nomenklatur die Ephrin/Eph-Familie betreffend, durch das „Eph Nomenclature Comittee“ 1997 festgelegt (132, 133).

Eph-Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären und einer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne hat eine immunglobulin-ähnliche Bindungsstelle und eine Cystein-reiche Region, die von 2 Fibronectinen vom Typ 3 gefolgt wird. Die intrazelluläre Domäne besteht aus einer juxtamembranen Domäne, einer SAM-Domäne („sterile alpha motif“) und einem PDZ-Anteil („Postsynaptic density 95-Discs large-Zonula occludentes-1“). Es gibt Eph-Rezeptoren vom Typ A und B, deren Aufbau grundsätzlich ähnlich ist (42, 128).

Die Ephrin-Liganden unterteilen sich ebenfalls in Typen A und B. Typ A stellt ein extrazelluläres Protein dar, welches über einen GPI-Anker (GPI: glycosylphosphatidylinositol) mit der Zellmembran verbunden ist. Typ B ist ein extrazelluläres Protein, welches über eine transmembranäre Domäne mit einem intrazellulären PDZ-Anteil verbunden ist. Es sind bisher insgesamt 15 Eph-Rezeptoren (EphA1-9 und EphB 1-6) und 9 Ephrine (EphrinA 1-6 und EphrinB 1-3) beschrieben

worden, die generell innerhalb der A und B Unterteilung miteinander interagieren, von der es nur wenige Ausnahmen gibt (132, 134, 135).

Die Signaltransduktion der Ephrine bringt Besonderheiten mit sich. So kommt es nicht nur über eine Dimerisation zu einer Aktivierung, sondern auch über eine Multimerisation, die dann auch ein stärkeres biologisches Signal zur Folge haben scheint (136). Außerdem unterteilt sich wie schon 1996 von Holland et al. beschrieben das Signaling in eine „forward“-Signal und ein „reverse“-Signal. Das „forward“-Signal wird nach Verbindung von Ephrin-Ligand und Eph-Rezeptor über Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne des Eph-Rezeptors vermittelt und führt nachfolgend zu einer Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden (z.B. Cas, Crk, Rho, Src, Fyn, MAPK, Akt). Hierüber werden über Kanal-Proteine, Adhäsions-Proteine, Poren, die Extrazellulär-Matrix und Gen-Regulation die zahlreichen Funktionen der Ephrin/Eph-Familie in Zell-Zell-Interaktion, Zellbewegung, Veränderung der Zellmorphologie und weitere biologische Funktionen vermittelt (39, 137-139).

### **1.2.1 Eph/Ephrin-Familie in Angiogenese und Tumorangiogenese**

In Bezug auf die Angiogenese/Tumorangiogenese haben sich vor allem EphB4 und EphrinB2 als entscheidende Faktoren herausgestellt. Entsprechend ihrem Verteilungsmuster scheinen sich die Grenzen zwischen venösem und arteriellem System herauszubilden, wobei EphrinB2 bevorzugt auf arteriellen und EphB4 eher auf den venösen Gefäßen auffindbar zu sein scheint (42, 43, 44, 146).

Für die regelrechte Entwicklung des Gefäßsystems ist das ausgewogene Vorhandensein von EphB4 und EphrinB2 essentiell, wie durch verschiedene Untersuchungen belegt wurde. Fehlen oder Überexpression eines Faktors kann in der Entwicklung des Gefäßsystems zu entscheidenden Fehlern führen (44). Auch das Gleichgewicht des „forward“ und „reverse“ Signaling scheint hier von entscheidender Bedeutung zu sein (39, 143, 144).

Eine besondere Rolle scheint die Eph/Ephrin-Familie auch in der Tumorangiogenese zu haben (39). Die Blut-Perfusion des Tumors ist essentiell für sein Wachstum und

Überleben. Derzeit ist die vorherrschende Meinung, dass die Regulation der Perfusion dem sogenannten Prinzip des „angiogenic switch“ unterliegt. Hierbei wurden als proangiogene Faktoren bFGF, aFGF (FGF-1 und 2) und VEGF beschrieben. Als inhibierende Faktoren werden  $\alpha$ -Interferon, Plättchen-Faktor 4 und Thrombospondin und andere untergeordnete Fragmente von Plasminogen Plättchen-Faktor 4, einem Propeptid von Kollagen und einem Peptid-Fragment des endothelialen Wachstumsfaktors gehandelt. Je nach Überwiegen der proangiogenen oder inhibierenden Faktoren kommt zur Ausbildung neuer Gefäßabzweigungen oder zum Niedergang dieser (1, 2, 3, 22). Ein wichtiger Induktor der Tumorangiogenese scheint auch die Hypoxie innerhalb des Tumors zu sein. So kommt es unter den sauerstoffarmen Bedingungen innerhalb des Tumors zur Hochregulation von HIF-1 $\alpha$  und VEGF, die wie oben erwähnt natürlich als proangiogene Faktoren gelten. Interessanterweise wird hierbei auch ein Anstieg der Expression von EphB4, EphrinB2 und weiteren Ephs und Ephrinen auf mRNA und Protein-Ebene beobachtet (145). Nicht nur diese Ergebnisse geben Hinweis auf eine entscheidende Bedeutung der Eph/Ephrin-Familie insbesondere von EphB4 und Ephrin B2 im Zusammenhang mit Tumorangiogenese. So werden EphB4 und EphrinB2 neben anderen Mitgliedern der Familie vor allem in Endothelzellen des hochgradigen Glioms verstärkt exprimiert (13). Derzeit gibt es schon verschiedenste Ansätze, die die Hemmung und Aktivierung von EphrinB2 und EphB4 als therapeutische Option ergründen, welche im Rahmen der Ergebnisdiskussion genauer erläutert werden sollen (39, 65). Bei allen Untersuchungen ist die Besonderheit des „forward“ und „reverse“-Signaling und des anderweitigen Signaling der Eph/Ephrin-Familie auf Grund der hohen Komplexität immer noch Gegenstand der Diskussion (142).

### **1.2.2 Ephrine/Eph- Rezeptoren in Tumorigenese**

Auch wenn die Fokussierung dieser Studie natürlich auf den angiogenen Veränderungen durch Einfluss von EphB4 liegt, so soll trotzdem auch kurz erörtert werden wie EphB4 oder im allgemeinen die Eph/Ephrin-Familie in die Tumorigenese, also die Entwicklung der Tumorzellmasse involviert ist. Zunächst sei nochmals zu

erwähnen, dass diverse Ephrine und Eph-Rezeptoren in verschiedenen humanen Tumorentitäten überexprimiert sind. Des Weiteren haben unterschiedliche Mitglieder der Familie unterschiedlichen Einfluss auf sowohl verstärkte Tumorzellproliferation, sowie Apoptose, des Weiteren Invasion von Tumorzellen und Metastasierung gezeigt (39, 128, 130, 147). In Zusammenhang mit EphB4 wurden überwiegend Effekte beschrieben, die zu einer Progression des Tumorstadiums geführt haben, sei es durch Förderung der Proliferation oder Hemmung der Apoptose. Diese sollen in der Diskussion der Ergebnisse genauer erläutert werden (58, 64, 68, 69).

### **1.3 Antiangiogene Therapie und Resistenzmechanismen**

Die hohe Vaskularisierung von Tumoren und deren hohe Anforderungen an Nährstoffversorgung und Blutperfusion ließen den Ansatz der antiangiogenen Therapie entstehen. Judah Folkman formulierte als erster das Ziel die hohen Ansprüche des Tumors als geeignete Schwachstelle und Ziel therapeutischer Intervention zu begreifen (1, 2, 3, 4). Bis heute wurden unzählige Studien präklinischer sowie klinischer Natur durchgeführt. Hierbei erwiesen sich wenige Substanzen, zum größten Teil aus der Gruppe der Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI) als wirksam und das Nebenwirkungsprofil betreffend als tolerabel. Hierzu zählen Sorafinib, Pazopanib, Axitinib, und Sunitinib (36). Diese Inhibitoren haben alle VEGF-A als gemeinsames Ziel, wobei alle Substanzen noch weitere angiogen relevante TK's (Tyrosin-Kinasen) in ihrer Funktion hemmen. So blockt Sunitinib als Beispiel die Rezeptoren (Split-Kinase-Domänen) von VEGFR, PDGFR, c-KIT und FLT3 und hemmt somit nicht nur VEGF als primären proangiogenen Faktor, sondern auch PDGFR, der sich wie oben erwähnt relevant für die Stabilisierung der neuen Gefäßstraßen gezeigt hat und weitere angiogene Signalkaskaden (20). Sunitinib zeigte im metastasierten Nierenzell-Karzinom im Vergleich zu Interferon- $\alpha$  sowohl im progressionsfreien Intervall (11 Monate im Vergleich zu 5 Monaten) als auch im Gesamtüberleben (26.4 im Vergleich zu 21.8 Monate) als wirksamer (21). Als Ausnahme neben den TKI sei hier kurz Bevacizumab erwähnt, ein humaner monoklonaler Antikörper, der sich im kolorektalen Karzinom wirksam gezeigt hat (153).

Auch wenn sich das Konzept der antiangiogenen Therapie in oben genannten Präparaten als erfolgreich gezeigt hat, so wurde in den letzten Jahren immer deutlicher, dass es in der Entwicklung des Tumors zu einer Form von Resistenz gegenüber der antiangiogenen Therapie kommen kann. So kommt es nach einer vorübergehenden Hemmung des Tumorwachstums, nachfolgend zu einer Tumorprogression trotz Fortführung der antiangiogenen Therapie (22). Bisherige Studien lassen zwei unterschiedliche Formen von Resistenzmechanismen erkennen. Zum einen gibt es Resistenzmechanismen, die als Reaktion auf die antiangiogene Therapie zu molekularbiologischen Reaktionen des Tumors, beziehungsweise der Tumorzelle führen, um die antiangiogene Blockade zu umgehen. Zum anderen gibt es solche, die schon in der jeweiligen Tumorentität angelegt zu sein scheinen. (22). Die folgende Unterteilung in „adaptiv“ und „intrinsisch“ wird zum besseren Verständnis gewählt.

### **1.3.1 „Adaptive“ Resistenzmechanismen**

Entgegen der klassischen Vorstellung einer Adaptation des Tumors an die Inhibition eines Signalweges über modifizierte Gen-Expression des Zielmoleküls, scheinen heute Mechanismen entscheidend zu sein, die zur Aktivierung von z.B. alternativen Signalwegen führen, während die Blockade des jeweiligen „targets“ persistiert (148, 149).

Es sind vier Arten von „adaptiven“ Resistenzmechanismen beschrieben. So kommt es unter antiangiogener Therapie und Inhibition des VEGF-Signalweges zur Aktivierung alternativer Signalwege. Casanovas et al. beschrieben in einem Maus-Modell (Neuroendokrines Pankreaskarzinom), dass es nach Blockade des VEGF-Signalweges über einen spezifischen monoklonalen Antikörper gegen VEGFR2, nach initialer Tumorregression zu erneutem Tumorwachstum und erhöhten Expressionslevels von mRNA der proangiogenen Faktoren Fgf1, Fgf2, Efna1, Efna2 und Angiopoetin 1 kam (150).

Einen weiteren Mechanismus stellt die Rekrutierung von aus dem Knochenmark stammenden proangiogenen Zellen (proangiogene „bone-marrow-derived cells“) unter hypoxischen Bedingungen dar, welche sich dann zu Zellen differenzieren, die neue

Blutgefäße bilden und so zu einer Verbesserung der Perfusion des Tumors führen (22). Hier zeigten Du et al., dass es über eine Ausschüttung von HIF1- $\alpha$  und hieraus resultierenden Erhöhung von SDF1- $\alpha$  zur einer Rekrutierung von Knochenmarkszellen und anderen proangiogenen Zellvorläufern kommt, die die Neovaskularisierung im Glioblastom fördern. Die dritte Möglichkeit des Tumors um sich der antiangiogenen Therapie zu entziehen, stellt ein Anstieg der Invasivität dar. So kam es in gerade erwähnter Studie von Du et al., in der auf genetischer Ebene eine Blockade von proangiogenen Signalwegen (VEGF, HIF1- $\alpha$ ) vollzogen wurde, zu einer erhöhten Invasivität des Tumors und es wurden Hinweise gefunden, die auf eine Nachahmung der Tumorzellen und Bildung gefäßähnlicher Strukturen hindeuten, durch welche die Perfusion des Tumors auch ohne Neovaskularisierung gewährleistet wurde (151). Zuletzt sei noch die veränderte Interaktion von Perizyten und Endothel erwähnt, welche auch von wesentlicher Bedeutung für Resistenzmechanismen von Tumoren unter angiogener Therapie scheint und auf Grund der Verbindung zu unserer Studie unter 1.4 ausführlich behandelt wird (22).

### **1.3.2 „Intrinsische“ Resistenzmechanismen**

Die zweite Gruppe von Resistenzmechanismen stellt eine von vornherein bestehende Resistenz gegenüber antiangiogener Therapie dar. Hier kommt es weder zu einer vorübergehenden Phase von Tumorregression oder einer Veränderung der Gefäßmorphologie, noch zu wesentlichen Veränderungen auf molekularer Ebene. Die Erforschung dieser stellt sich als schwierig heraus. Diskutierte Mechanismen hier sind eine bei z.B. im Mamma-Ca eines späteren Stadiums bestehende, Bevorzugung angiogener Signalwege, die weniger abhängig von den grundsätzlichen Signalwegen wie z.B. in Zusammenhang mit VEGF sind und somit auch zu einem schlechten Effekt der antiangiogenen Medikamente führen (22). Ein weiteres Kriterium könnten die schon von vornherein bestehenden Unterschiede bezüglich der Abhängigkeit einer Tumorentität von seiner Vaskularisierung darstellen. So stellen sich z.B. Adenokarzinoma des Pankreasganges als zum großen Teil hypovaskularisiert dar. Dies lässt ein vermindertes Ansprechen auf antiangiogene Therapie logisch erscheinen (152).

## 1.4 Perizyten: Wichtige Regulatoren des Gefäßsystems

Es wird berichtet, dass die Entdeckung der Perizyten auf Charles–Marie–Benjamin Rouget zurückgeht. Dieser beschrieb sie erstmalig 1873 als adventitielle Zelle (101, 103, 104). Bensley und Vimtrup berichten aber, dass Eberth schon 1871 von diesem Zelltyp als „kapilläre adventitielle Zelle“ berichtet hat (102, 105). Trotzdem wurde besagter Zelltyp zunächst als „Rouget-Zelle“ bezeichnet und erst Zimmermann führte nach der bis dato detailliertesten lichtmikroskopischen Darstellung den Namen „Perizyt“ ein (107).

Perizyten sind sternförmige Zellen mesenchymalen Ursprungs mit langen, kontraktile Ausläufern, einem deutlich erkennbaren Nucleus und wenig umgebenden Zytoplasma (22, 117, 118). Sie kommen vor allem an mikrovaskulären, kapillären Gefäßen vor, aber per se sind sie an allen Gefäßen des Körpers zu finden (108, 109, 110, 115).

Sie stehen im direkten Kontakt zu Endothel-Zellen und sind gemeinsam mit diesen an der Bildung der Basalmembran beteiligt, innerhalb derer sie zu Anteilen verortet sind (110, 112, 115). Sie haben eine entscheidende Rolle in der Angiogenese und Vermittlung von vaskulärer Stabilität. Sie sind involviert in parakrinem Signaling und Phagozytose (111, 115, 120,121). Über Gap junctions können sie Ionen und kleinere Moleküle aussenden und empfangen und stehen somit in engem Kontakt mit den Endothelzellen. Über diese Junctions, sowie Verbindungen über N-cadherin, Zell-Adhäsions-Moleküle, auf  $\beta$ -Catenin basierende Verbindungsmoleküle und die Extrazelluläre Matrix (Z.b. Fibronectin) werden zudem mechanisch-kontraktile Kräfte bzw. Funktionen der Perizytenausläufer vermittelt (22, 109,122).

Perizyten haben verschiedenste Eigenschaften mit Zellen der glatten Muskulatur und anderen muralen Zellen gemeinsam, weshalb sie auch schon als vaskuläre glatte Muskelzellen bezeichnet wurden („vSMC = vascular smooth muscle cells“ (115)). Die „Verwandtschaft“, welche bis heute nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, wird auf Grund des Vorhandenseins von kontraktile Fasern, sich teilweise überschneidenden Verteilungsmustern und ähnlichen molekularen Markern vermutet. (22, 109) Perizyten sind im Gefäßsystem vor allem auf kleineren Blutgefäßen und

bevorzugt auf venösen Gefäßen zu finden, während glatte Muskelzellen in größeren Gefäßen, auch in venösen, aber häufiger mit arteriellen Gefäßen assoziiert sind. Vor allem die großen zentralen arteriellen Gefäße sind eng umhüllt von glatten Muskelzellen. Ein Unterschied besteht auch darin, dass Perizyten im Vergleich zu glatten Muskelzellen sehr viel enger mit dem Gefäßsystem assoziiert sind und wie schon erwähnt sogar in der Basalmembran liegen können (22, 109, 123).

Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen ist vor allem der Einfluss der Perizyten auf die Tumorangiogenese unter anti-angiogener Therapie von Bedeutung. Verschiedene Autoren beschreiben eine veränderte Assoziation der Perizyten mit den Tumorgefäßen. Neben einer weniger engen Anlagerung der Perizyten wurde auch eine sehr enge Assoziation an Blutgefäße beschrieben (14, 50, 52). In der Gesamtheit wird eher von einem protektiven Effekt der Perizyten auf das Gefäßsystem ausgegangen, sei es zum einen über die Sekretion von VEGF oder durch Sekretion anderer Faktoren (22, 52, 62, 124, 125).

Für unsere Studie ist vor allem die von Erber et al. 2004 veröffentlichten Studie essentiell, die die Perizyten-Endothel-Assoziation als Untersuchungsgegenstand hat. In der Studie wurde neben einem reinen Inhibitor des VEGF-Rezeptors auch ein Tyrosin-Kinase-Inhibitor in Mäusen mit wachsendem C6-Gliom verwendet, der sowohl den VEGFR-2 als auch den PDGF-beta Rezeptor inhibiert (SU 6888) (14). Die Studie zeigte, dass es durch Inhibition beider Signalwege zu einer in der Raster-Elektronen-Mikroskopie nachweisbaren Lösung der Interaktion von Perizyten und Endothel kam, bei ausbleibendem Effekt auf die Perizyten-Endothel-Interaktion in der Immunhistochemie. Die Autoren sahen hierin den Grund für die, ebenfalls in der Studie dargelegte, stärkere Reduktion des Tumorwachstums (14). In früheren Untersuchungen wurden im Rahmen einer diskutierten Resistenzbildung gegenüber antiangiogenen Medikamenten, unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Assoziation dieser Perizyten-Endothel-Interaktion beschrieben (22, 55, 56, 126). Auch unsere Studie hat die Untersuchung der Perizyten-Endothelfunktion als Gegenstand.

## 1.5 Fragestellung

In vorhergehenden Studien kam es unter der Anwendung von antiangiogener Therapie auf ein sich entwickelndes Gefäßsystem im Glioblastom zu bestimmten gefäßmorphologischen Veränderungen. Diese wurden auch unter Überexpression von Eph B4 beziehungsweise Ephrin B2 gesehen. So zeigten Erber et al., dass es in einem Modell der Überexpression von EphB4 zu gefäßmorphologischen Veränderungen kommt, die auch in anderen Studien unter Einsatz von antiangiogener Therapie beobachtet wurden (13). Auch die Gefäßassoziation mit Perizyten zeigte ähnliche Veränderungen (13,14, 52, 154).

Wir hypothesieren, dass EphB4 maßgeblichen Einfluss auf die gefäßmorphologischen und resistenzbildenden Mechanismen innerhalb eines heranwachsenden Glioblastoms unter antiangiogener Therapie hat.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellen und Zellkultur**

Beide Zelltypen (humane SF 126 Gliom-Zellen; Pheonix Eco Zelltypen) konnten nach dem Auftauen aus -81°C Stickstoffbehältern in Zellkulturen mit 4,5 g/l High Glucose DMEM–Zellkulturmedium, dem Penicillin und Streptomycin, sowie 10 % FBS (Fetal bovine Serum, PAA Linz GmbH, Österreich) und Pyruvat hinzugefügt wurde, in Kultur genommen werden. Das Splitting erfolgte spätestens bei 80% Konfluenz unter Einsatz von Trypsin (0,25%)/EDTA (2mM). Das Medium wurde spätestens nach 48 Stunden gewechselt. Die Anzucht erfolgte in Inkubatoren mit einem Milieu von 37°C, 5% CO<sub>2</sub> bei erhöhter Luftfeuchtigkeit. Das Einfriermedium bestand aus dem Zellkulturmedium dem 5%ig DMSO zugefügt wurde.

#### **2.1.1 SF126 Gliomzellen**

Die Kultivierung der SF 126 „Glioblastoma multiforme“ – Zellen wurde durch zeitgemäßes Splitting bei ca. 80% Konfluenz der am Boden der Zellkulturflasche adhärenen Zellen vorgenommen, bis zu einer maximalen Passage von 11. Für die nachfolgend erklärten Implantationsvorgänge wurden Zellen aus den Passagen 10 und 11 verwendet.

#### **2.1.2 Pheonix-E-Zelltypen**

Die Zellen vom Pheonix Eco Zelltyp sind Zellen humanen fibroblastischen Ursprungs (HEK 293T/17, Niere) welche durch vorherige Transfektion mit einem genetisch verändertem Retroviralen System auf Basis eines pLXSN-Vektors ausgestattet wurden. Die Zellen enthalten jeweils einen spezifischen viralen Plasmidvektor, welcher entweder die genetische Information des EphB4 Rezeptormoleküls („EphB4 wt“, 2992

Basenpaare) trägt oder „leer“ („pLXSN“) ist (13). Diese genetische Information wird in geeignetem Milieu durch das Virus „überexprimiert“ und in die DNA entsprechender mauseigener Epithelzellen integriert. Der pLXSN Vektor enthält Elemente des mausspezifischen Moloney Leukämie-Virus (MoMuLV) und des mausspezifischen Moloney Sarkoma-Virus und ist für retroviralen Gentransfer designed. Er kann in z.B. oben genannte „Transporter-Zelltypen“ transfiziert werden und exprimiert nach Implantation die integrierte Geninformation in mauseigenen Zellen. Dem Plasmid fehlt die Information zur Replikation. Somit wird eine replikationsinkompetenter Virus produziert, der die gewünschte Transfektion im Zielgewebe bewirkt (Information, Clontech, GenBank Accession No.: M28248). Je nach genetischer Information führt dies entweder zu einem verstärkten Effekt im Sinne der Funktion des EphB4 Tyrosinkinase-Rezeptors („forward-signaling“), oder bei leerem Plasmid-Vektor (pLXSN) zu keinem zusätzlichen Effekt. Es sei nochmal zu erwähnen, dass die Transfektion nur in einem sich durch Angiogenese neu entwickelnden Gefäßsystem bemerkbar macht, sei es im Sinne von Tumorangiogenese oder embryogenetischen Vorgängen (13).

Die Herstellung des retroviralen Systems wurde zuvor durch Millauer et al. ausführlich beschrieben (28).

Die Funktionalität der durch uns verwendeten Zellen wurde bei Erber (Erber et al. 2006) durch PCR und Western-Blot nachgewiesen, die methodische Anwendung somit vorhergehend etabliert und validiert. Eine Selektion der jeweilig den richtigen Vektor tragenden Zellen war durch Neomycin G418 oder Pan G420 möglich. Die Lagerung erfolgte in 5% DMSO-haltigem Medium. Ursprünglich stammen die Zellen aus Martinsried, Deutschland (A.Ullrich/U.Eichelsbacher, Zellbanknummer: 2082) (13).

### **2.1.3 Koimplantation**

Zur geeigneten gleichmäßigen Überexpression der jeweiligen genetischen Information war eine spezielle Vorbereitung der Zellen zur Implantation in die Rückenhautkammer notwendig. Hierzu wurden beide Zelltypen (SF 126 Zellen und einer der Phoenix E Zelltypen) in entsprechendem Maße kultiviert und in gleichen Anteilen (innerhalb eines gemischten Zellpellets) in das Fenster (jeweils 4µl, somit 8µl) der Rückenhautkammer

beziehungsweise als subkutanes Xenograft (jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen, somit  $4 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS gelöst) implantiert.

## **2.2 Versuchstiere**

Zur Untersuchung der angiogenen Vorgänge wurde das etablierte Rückenhautkammer-Mausmodell mit CD1 NuNu- Nacktmäusen (weiblich 21-27g, Charles River) verwendet. Die Tiere hatten ein Alter von ca. 6-8 Wochen und wurden im Tierstall der experimentellen Neurochirurgie an der Charité-Universitätsmedizin-Berlin bei  $22,5 \pm 5$  °C untergebracht. Sie unterlagen einem Hell-Dunkel-Intervall von 12 Stunden und die durchsichtigen Kunststoffkäfige mit Streuenauslegung verfügten über Material zum Nestbau. Die Tiere erhielten Trockenfutter und Aqua ad libitum bis zum Operationsbeginn, beziehungsweise Mikroskopie-Beginn.

Der CD1 Nunu Maus-Stamm erwies sich auf Grund des Fehlens aller des CD1 folgenden Lymphozytenarten als besonders geeignet. Die Athymie der Mäuse ermöglichte ein, der Notwendigkeit der Untersuchung entsprechendes Wachstum der SF 126 Zellen humanen Ursprungs. Sowohl bei den subkutanen Implantationen als auch den intravitalmikroskopischen Experimenten wurden Tiere mit auffälligem Verhalten, sowie Tiere, die  $> 30$  % des Körpergewichts während der Experimente verloren hatten aus dem Versuch genommen und wie alle anderen Tiere nach Abschluss der Experimente durch Dekapitation in Narkose getötet.

### **2.2.1 Narkose**

Die Narkose für die Präparation der Rückenhautkammer und für die jeweiligen intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin-Hydrochlorid (100mg/kg Körpergewicht) und Xylazine (10 mg/kg Körpergewicht) durchgeführt (11, 12, 154).

## **2.2.2 Antiangiogene Therapie**

Sunitinib ist eine Tyrosinkinase-Rezeptor-Inhibitor und inhibiert die Rezeptoren (Split-Kinase-Domänen) von VEGFR, PDGFR, c-KIT und FLT3 (20, 21) Die Therapie mit Sunitinib (Sutent© 40mg/kg/Tag) gelöst in 0,9% NaCl-Lösung wurde von Tag 12 bis 17 bei allen Tieren der Therapiegruppe durch intraperitoneale Injektion durchgeführt. Die Tiere der Kontrollgruppen erhielten entsprechende Injektionen mit 0,9% NaCl-Lösung. Bei den subkutanen Tumoren wurde mit der Sunitinib-Therapie begonnen wenn die Tumore ein Volumen von 500 mm<sup>3</sup> erreicht hatten und für 7 Tage durchgeführt (154).

## **2.3 Rückenhautkammermodell**

Die Präparation der Rückenhautkammer erfolgte nach nachfolgend beschriebenem Protokoll in bekannter Weise an CD1 nu/nu Nacktmäusen (weiblich, 21-27g, N=5). Um eventuelle Inflammationsreaktionen auszuschließen wurde die Präparation 2 Tage vor Implantation des Zell-Pellets vorgenommen (5).

### **2.3.1 Präparation der Rückenhautkammer**

Es wurde, nach entsprechender Analgosedierung des Versuchstiers mit Ketanest® und Rompun® (100 mg/kg KG Ketamin und 10 mg/kg KG Xylazin), entsprechender Hautdesinfektion, und diaphanoskopischer Durchleuchtung zur Gefäßschonung, die Präparation der Rückhautkammer vorgenommen. Dazu wurde die Rückenhaut des Versuchstiers aufgespannt und zunächst der erste Anteil des Rückenhautkammertitangerüsts durch Punktnähte mit 5-0 Vicryl-Nahtmaterial an 4 Stellen fixiert. Nach dieser Fixierung wurden die, die Haut schon vorwölbenden Brückenschrauben durch Inzision durch die Hautschichten geführt und nach dem Hindurchtreten mit Klemmen fixiert. Nun folgte die diaphanoskopische Durchleuchtung und Markierung des zu inzidierenden Areals für das Fenster der Rückhautkammer. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf der gleichzeitigen Markierung eventuell

verletzungsgefährdeter subkutaner Blutgefäße, um eine Einblutung ins Gewebe zu verhindern. Die Haut (Epidermis und Subkutis) wurde daraufhin einseitig durch Skalpell oder kleine Schere entfernt ohne Blutgefäße zu verletzen, sodass die Sicht auf subkutane Gefäße und die Unterseite der gegenüberliegenden Hautschicht frei wurde. Nun erfolgte die Abtragung einer dünnen subkutanen Bindegewebsschicht unter dem Mikroskop mit mikrochirurgischen Instrumenten unter Schonung der Blutgefäßsysteme der Gegenseite.

Nachfolgend wurde das titane Gegenstück des Rückenhautkammergestells aufgesteckt und festgeschraubt. Das Hautfenster wurde einmalig mit 0,04 % Polyhexanid-Lösung gespült und darauffolgend ein Glasplättchen eingelegt, welches mit einem Titanring fixiert wurde.



Abbildung 1: CD1 nu/nu Nacktmaus mit präparierter Rückenhautkammer

## 2.4 Intravital-Fluoreszenz-Video-Mikroskopie (IFVM)

Die Intravitale Videomikroskopie wurde mit einem modifiziertem AxioTech Vario Mikroskop mit 10x „long-distance“ und 20x „water-immersion“ Objektiven (Attoarc; Zeiss) an den Tagen 7, 11, 14 und 18 nach Zellimplantation durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mittels einer „charged-coupled-device“ (CCD) Videokamera, welche auf eine S-VHS Videosystem (Panasonic) übertragen wurde, aufgezeichnet (→ „offline“-Analyse). Zudem verfügte das System über einen „optional-image-intensifier“, um schwache Fluoreszenzintensitäten ( $\kappa$ ) zu verstärken.

Die Analyse der Aufnahmen erfolgte Computer-assistiert unter Verwendung von CapImage (Zeintl Software Engineering, Heidelberg, Germany) auf einem dafür eingerichteten PC.

Als Fluoreszenzmittel wurde Fluoriso-5-thiocyanat-konjugiertes Dextran (FITC-Dextran, Sigma-Aldrich) zwei-prozentig gelöst in Aqua bidestilliert mit einem Molekulargewicht von 150 kD verwendet. Es wurden 0,1 ml intravenös appliziert und unter Epilumination mit Licht blauer Wellenlänge (450-480 nm) angeregt.



Abbildung 2: Arbeitsplatz Intravitalfluoreszenz-Mikroskopie.

## **2.4.1 Messparameter**

### **2.4.1.1 Gefäßdurchmesser (D)**

Der Gefäßdurchmesser (D) in  $\mu\text{m}$  von mindestens 6 Gefäßen pro Areal bestimmt. Dabei wurde bei jeder Messung eine Linie von exakt einer Innenseite des Gefäß (Grenze Endothel zu Blutstrom) zur anderen quer zur Gefäß-Längsachse gezogen. Das Auswertungsprogramm gab die Länge dieser Strecke entsprechend des Maßstabs in  $\mu\text{m}$  an. Dieser so ermittelte Wert wurde dann für jedes Gefäß dokumentiert. Aus den ermittelten Einzelwerten wurden Mittelwerte ermittelt (5, 154).

#### **2.4.1.2 Totale Gefäßdichte (TVD)**

Die untersuchten Parameter umfassten die Totale Gefäßdichte (Total Vessel Density TVD), die Länge aller neugebildeten Blutgefäße. Die Bestimmung erfolgte durch Markierung aller Gefäße, die im untersuchten Bildausschnitt zu sehen waren. Durch die Auswertungssoftware wurde die Strecke aller markierten Gefäße dann auf die maßstäblich umgerechnete Fläche bezogen und somit in cm/cm<sup>2</sup> dokumentiert (5, 154).

#### **2.4.1.3 Funktionelle Gefäßdichte (FVD)**

Die Funktionelle Gefäßdichte (Functional Vessel Density = FVD), die Länge aller neugebildeten und vaskularisierten (Fluoreszenzmittel-aufnehmenden) Gefäße.

Im Gegensatz zur TVD wurden bei der Ermittlung der FVD nur Gefäße in dem auch für die TVD verwendeten, Bildausschnitt markiert, die eine deutliche Anreicherung von Fluoreszenzmittel oder einen aktiven Blutstrom erkennen ließen. Auch diese wurde in cm/cm<sup>2</sup> dokumentiert (5, 154).

#### **2.4.1.4 Perfusionsindex (PI)**

Die Ermittlung des Perfusionsindexes erfolgte unter zu Hilfenahme der TVD und FVD. Aus diesen wurde der Perfusionsindex, als Ratio der perfundierten zu den nicht perfundierten Blutgefäßen ermittelt, unter Verwendung folgender Formel (5, 154):

$$\text{PI} = \text{FVD}/\text{TVD} \times 100$$

#### **2.4.1.5 Volumetrischer Blutfluss ( $Q_v$ )**

Der Blutfluss ( $Q_v$  [nl/s]) im Areal wurde über die Flussgeschwindigkeit der Erythrozyten (Red blood cell velocity, RBCV [mm/s]) und den Durchmesser D der Gefäße mit folgender Formel ermittelt (5, 154):

$$Q_v = \pi \times (D/2)^2 \times RBCV / K$$

(K = Baker-Wyland-Faktor (1,3), der das parabole Flussprofil in Kapillargefäßen berücksichtigt).

#### **2.4.1.6 Permeabilitätsindex (P)**

Anhand der Fluoreszenzintensität intravasal und extravasal wurde der Permeabilitätsindex ( $P = \text{Intravasale Fluoreszenzintensität} / \text{Extravasale Fluoreszenzintensität}$ ) ermittelt. Dieser ist ein indirektes Maß für den Fluoreszenzmittelaustritt ins paravasale Gewebe und somit für die Permeabilität. Ein hoher Wert bedeutet einen geringeren relativen Austritt von Fluoreszenzmittel (geringere Permeabilität), ein niedriger Wert einen höheren relativen Austritt von Fluoreszenzmittel (höhere Permeabilität). Es wurde wie oben beschrieben FITC-Dextran von 150 kD molekularem Gewicht verwendet (5, 154).

Zur Bestimmung wurden planimetrisch am Auswertungscomputer intravasale und extravasale Areale markiert, in denen ein gemittelter Fluoreszenzwert digital bestimmt werden konnte. Die beiden Areale, die zur Errechnung der Ratio verwendet wurden lagen einander, nur durch die Gefäßwand getrennt, direkt an. Zudem wurden Areale entsprechender Größe markiert. Es wurden mindestens 3 Areale pro Bildausschnitt bestimmt und zur Errechnung eines Mittelwertes verwendet.

## **2.5 Konfokale Lasermikroskopie**

Zur ergänzenden Visualisierung der Unterschiede innerhalb der Therapiegruppen wurden 20 µm „stacks“ mit einem Konfokalen Lasermikroskop angefertigt (Zeiss).

## **2.6 Subkutane Zellimplantation**

Die subkutanen Zellimplantationen zur Erfassung der Entwicklung des Tumolvolumens wurden ebenfalls an CD1 Nu/nu Nacktmäusen (weiblich, 21-27 g, N=5) durchgeführt. Hierzu wurden die gemischten Zellpellets in das subkutane Gewebe der Flankenregion des Tieres implantiert. Aus der Vermessung der Länge Breite und Höhe des Tumors in Millimeter wurde anhand folgender Formel das Tumolvolumen ermittelt:  $(\text{Höhe} \times \text{Länge} \times \text{Breite})/2$ . Die Therapie mit Sunitinib (40mg/kg/Tag) wurde ab einem Tumolvolumen von 500 mm<sup>3</sup> durch intraperitoneale Injektion für durchgeführt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten eine Injektion von 0,9% NaCl-Lösung entsprechender Dosierung durch ebenfalls intraperitoneale Injektion. Das Tumolvolumen wurde täglich bestimmt. Nach sieben Tagen Therapie wurden die Tumore entfernt und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

## **2.7 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Die Aufnahmen der einzelnen „regions of interest“ (ROI) erfolgte unter 20x Vergrößerung. Die genaueren Modalitäten der einzelnen Färbungen werden in den folgenden Unterpunkten erläutert. Alle Tumore wurden an Tag 18 kryokonserviert.

### **2.7.1 Perizyten-Endothel-Interaktion**

Der wichtige Aspekt der Perizyten-Endothel-Interaktion insbesondere in Hinblick auf Permeabilität und Biodistribution wurde durch eine Doppelfärbung mit CD 31-Antikörper (Sigma-Aldrich) und Desmin-Antikörper (Sigma-Aldrich) erfasst. Hierzu wurde eine

Ratio aus Desmin-positiven zu CD 31-positiven erstellt. Es wurden 5 „regions of interest“ (ROI) von mit Methanol-fixierten Kryoschnitten (6 µm Dicke) aus 5 Tumoren nach etabliertem Protokoll gefärbt und aufgenommen.

### **2.7.2 Proliferation der Tumorzellen**

Um eine Aussage über die Proliferation der Tumorzellen treffen zu können wurde eine Färbung mit Ki67 Antikörpern (Thermo-Scientific) durchgeführt. Als proliferierende Zellen wurden positive Zellen gezählt. Es wurden 5 „regions of interest“ (ROI) von 2 Methanol-fixierten Kryoschnitten (6 µm Dicke) aus 4 Tumoren nach etabliertem Protokoll gefärbt und aufgenommen.

### **2.7.3 Endotheliale Zellproliferation**

Um eine Aussage über die Proliferation der Endothelzellen zu treffen wurden Doppelfärbungen mit Ki67 und CD31 durchgeführt. Als proliferierend wurden doppelpositive Zellen gewertet und ausgezählt. Es wurden 5 „regions of interest“ (ROI) von 2 Methanol-fixierten Kryoschnitten (6 µm Dicke) aus 4 Tumoren nach etabliertem Protokoll gefärbt und aufgenommen.

### **2.7.4 Apoptose**

Eventueller Einfluss der Therapie und der Transfektion auf apoptotische Vorgänge wurden durch Färbung mit Caspase 3 Antikörpern (Sigma-Aldrich) untersucht. Als apoptotisch wurden positive Zellen gewertet. Hier wurden 5 „regions of interest“ (ROI) von mit 4% PFA-fixierten Kryoschnitten (6 µm Dicke) aus 5 Tumoren nach etabliertem Protokoll gefärbt und aufgenommen.

## **2.8 Studiendesign**

Es wurden 6 CD1 nu/nu Mäuse pro Gruppe randomisiert in die jeweiligen Studiengruppen aufgenommen. Die Rückenhautkammer wurde bei allen Tieren in oben beschriebener Methode präpariert. Nach der Rückenhautkammerpräparation erhielten alle Versuchstiere gewichtsadaptiert Paracetamol verdünnt in Aqua ad libitum. Die Zellimplantation wurde 2 Tage nach der Präparation der Rückenhautkammer vorgenommen, um etwaige Entzündungsvorgänge auszuschließen. Der Tag der Implantation ist definiert als Tag 0. Nachfolgend wurden intravitalmikroskopische Aufnahmen an den Tagen 7, 11, 14 und 18 für ca. 5 min je Tier durchgeführt. Die Mikroskopie wurde in oben beschriebener Analgosedierung, direkt nach Injektion des FITC-Dextran intravenös über die Schwanzvene, durchgeführt. Die Therapie mit Sunitinib wurde am Tag 12 nach Zellimplantation bis zum Tag 17 gewichtsadaptiert durchgeführt. Nach Abschluss des Experiments wurden die Tumoren eingebettet in „Tissue-Tec“ in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

## **2.9 Statistische Methoden**

Die statistische Auswertung erfolgte durch Verwendung von GraphPad Prism 5 und Durchführung von One-Way-ANOVA mit Bonferroni Post-Korrektur.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Ergebnisse in der Intravital-Fluoreszenz-Video-Mikroskopie**

##### **3.1.1 Gefäßdurchmesser (D)**

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt. Während zum Tag 7 des Untersuchungszeitraums noch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet wurde, zeigte sich im Verlauf ab Tag 11 ein signifikant, bis zu dreifach höherer Durchmesser unter Eph B4 – Überexpression im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die EphB4 wt – Gruppe ohne Therapie zeigte keinen Unterschied zu der EphB4 wt Gruppe unter Therapie. Zwischen den beiden Kontrollgruppen entwickelte sich an Tag 14 ein Unterschied, der sich zum Tag 18 wieder vermindert zeigte und zu keinem Zeitpunkt signifikant war.

(pLXSN: 15,11 µm am Tag 7, 23,19 µm am Tag 11, 32,19 µm am Tag 14, 28,98 µm am Tag 18; pLXSN + SU: 12,91 µm am Tag 7, 26,46 µm am Tag 11, 45,99 µm am Tag 14, 36,09 µm am Tag 18; EphB4 wt: 16,99 µm am Tag 7, 41,63 µm am Tag 11, 59,42 µm am Tag 14, 62,57 µm am Tag 18; EphB4 wt + SU: 17,18 µm am Tag 7, 36,30 µm am Tag 11, 54,82 µm am Tag 14, 64,37 µm am Tag 18).

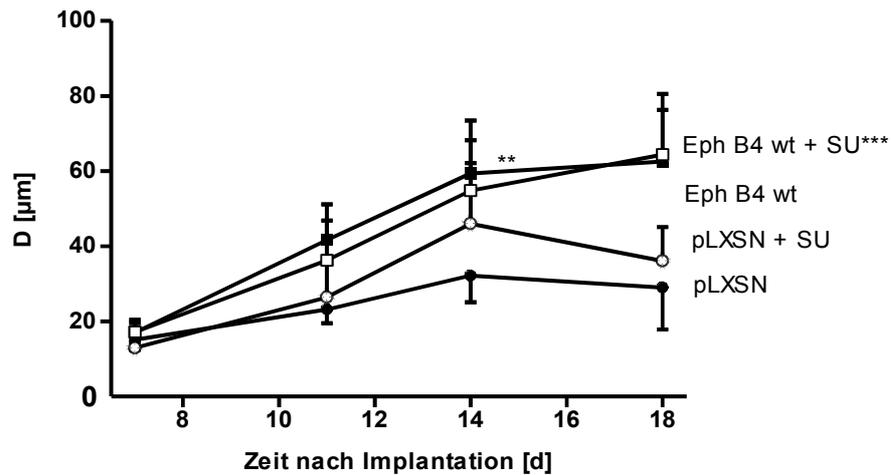


Abbildung 3: Die Veränderung des Gefäßdurchmessers über die Zeit. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

\*\* :  $p < 0,001$  EphB4 wt + SU vs. pLXSN + SU an Tag 14

\*\*\* :  $p < 0,001$  EphB4 wt + SU vs. pLXSN + SU an Tag 18

### 3.1.2 Totale Gefäßdichte (TVD)

Die Veränderungen sind in Abbildung 4 dargestellt. Es ergeben sich schon an Tag 7 signifikante Unterschiede zwischen den EphB4 wt und den Kontrollgruppen unabhängig von der Therapie. Die Kontrollgruppe zeigen an Tag 7 eine höhere Gefäßdichte gegenüber den EphB4 wt – Gruppen. Im Verlauf kommt es in allen Gruppen zu einem Abfall der Gefäßdichte. Während dieser Abfall bei den pLXSN -Tumoren unter Therapie auf in etwa ein Drittel des Ausgangswertes beobachtet werden kann, kommt es in allen anderen Gruppen nur zu einem Abfall um ca. ein Fünftel des Ausgangswertes.

(pLXSN: 150,3 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 7, 129,6 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 11, 114,5 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 14, 103,2 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 18; pLXSN + SU: 163,7 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 7, 140,5 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 11, 83,1 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 14, 40,0 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 18; EphB4 wt: 102,9 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 7, 126,2 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 11, 79,3 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 14, 76,4 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 18; EphB4 wt + SU: 122,6 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 7, 121,0 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 11, 96,3 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 14, 88,3 cm/cm<sup>2</sup> am Tag 18).

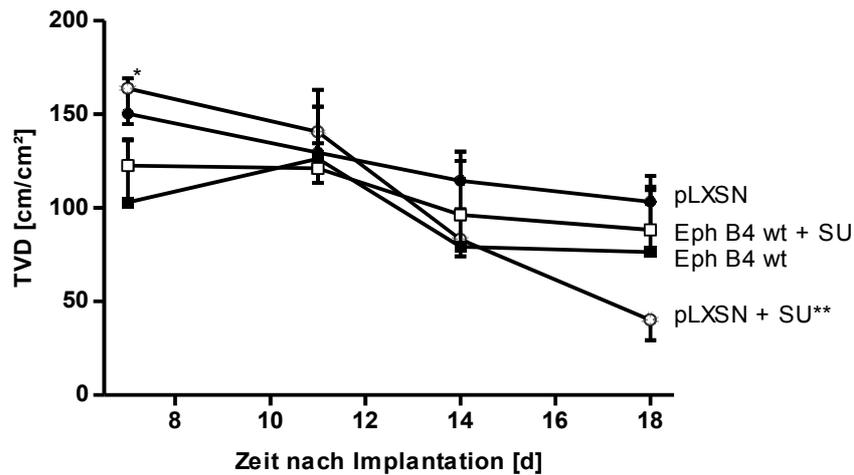


Abbildung 4: Die Veränderung der totalen Gefäßdichte TVD in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  über die Zeit. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

\*\*:  
 $p < 0.01$  EphB4 wt + SU vs. pLXSN + SU

### 3.1.3 Funktionelle Gefäßdichte (FVD)

Die Veränderungen sind in Abbildung 5 dargestellt und entsprechen bis auf wenige Details den Veränderungen der Totalen Gefäßdichte, die schon oben dargestellt wurden. Insgesamt bewegen sich die Werte der FVD auf niedrigerem Niveau.

(pLXSN:  $122,6 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 7,  $97,15 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 11,  $79,79 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 14,  $77,46 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 18; pLXSN + SU:  $128,2 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 7,  $89,34 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 11,  $56,13 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 14,  $28,57 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 18; EphB4 wt:  $82,5 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 7,  $89,7 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 11,  $65,7 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 14,  $52,9 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 18; EphB4 wt + SU:  $87,4 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 7,  $74,7 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 11,  $68,6 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 14,  $72,87 \text{ cm}/\text{cm}^2$  am Tag 18).

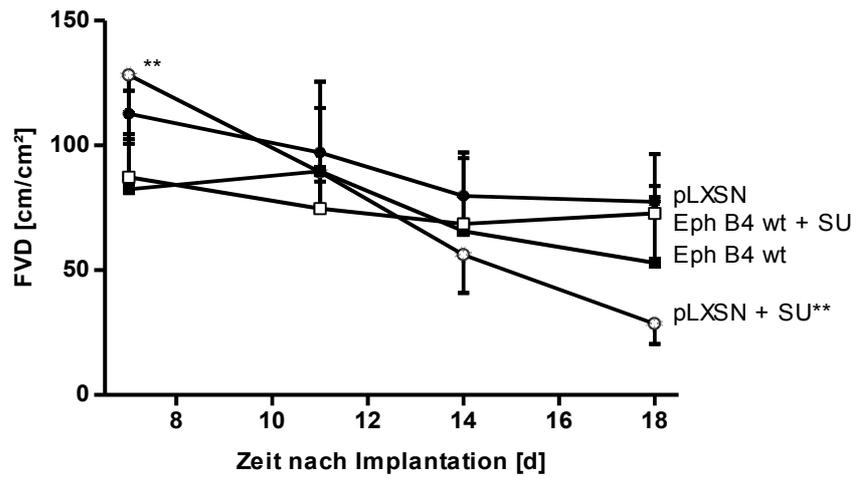


Abbildung 5: Die Veränderung der funktionellen Gefäßdichte FVD in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  über die Zeit. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

\*\*:  
 $p < 0.01$  EphB4 wt + SU vs. pLXSN + SU

### 3.1.4 Permeabilitätsindex (P)

Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. An Tag 7 der Untersuchung zeigt sich zwischen den Gruppen kein Unterschied bezüglich der Fluoreszenzintensität. Ab Tag 11 kommt es zu einem Anstieg des Permeabilitätsindex in den Gruppen pLXSN + SU, EphB4 wt und EphB4 wt + SU (somit zu einer verminderten Permeabilität). Zum Tag 18 zeigt sich im EphB4 wt unter Therapie eine Steigerung des Permeabilitätsindex um ca. 0,4, bezüglich EphB4 wt ohne Therapie und pLXSN unter Therapie um ca. 0,2, während die Permeabilität in der Kontrollgruppe unverändert verbleibt.

(pLXSN: 1,014 am Tag 7, 1,042 am Tag 11, 1,079 am Tag 14, 1,024 am Tag 18;  
pLXSN + SU: 1,041 am Tag 7, 1,079 am Tag 11, 1,173 am Tag 14, 1,157 am Tag 18;  
EphB4 wt: 1,029 am Tag 7, 1,168 am Tag 11, 1,199 am Tag 14, 1,150 am Tag 18;  
EphB4 wt + SU: 1,078 am Tag 7, 1,152 am Tag 11, 1,229 am Tag 14, 1,329 am Tag 18).

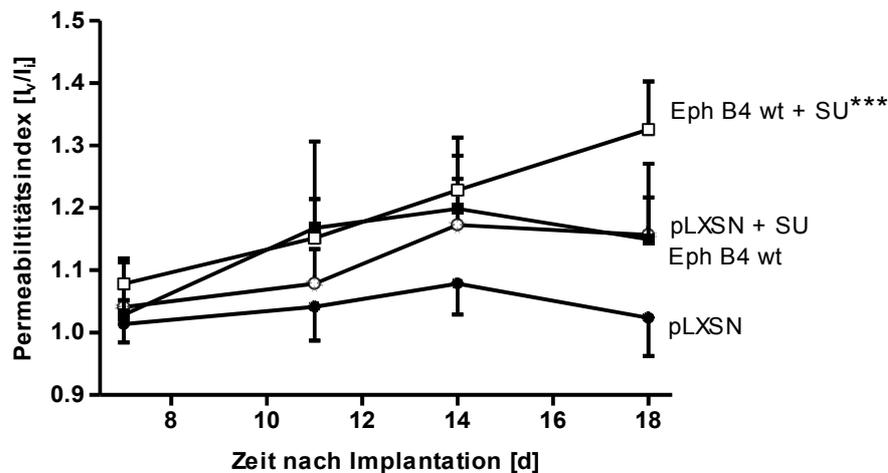


Abbildung 6: Die Veränderung der Permeabilitätsindices als Ratio von vaskulärer Fluoreszenzintensität ( $I_v$ ) zu interstitieller Fluoreszenzintensität ( $I_i$ ). Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

\*\*\*:  $p < 0.001$  EphB4 wt + SU vs. pLXSN

### 3.1.5 Perfusionsindex (P)

Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt. Bezüglich des Perfusionsindex konnte im Zeitverlauf kein signifikanter Unterschied verzeichnet werden. In den Gruppen zeigten sich Perfusionsindices von ca. 65 – 77 %.

(pLXSN: 75,32 % am Tag 7, 74,31 % am Tag 11, 68,96 % am Tag 14, 75,75 % am Tag 18; pLXSN + SU: 77,41 % am Tag 7, 64,49 % am Tag 11, 67,23 % am Tag 14, 73,71 % am Tag 18; EphB4 wt: 76,62 % am Tag 7, 76,07 % am Tag 11, 76,43 % am Tag 14, 68,52 % am Tag 18; EphB4 wt + SU: 70,11 % am Tag 7, 64,49 % am Tag 11, 67,23 % am Tag 14, 73,71 % am Tag 18).

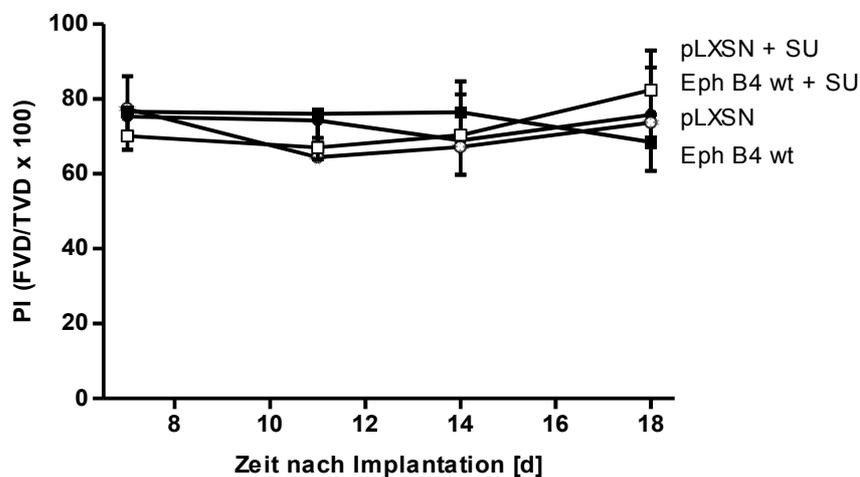


Abbildung 7: Die Veränderung der Perfusionsindices als Ratio von FVD und TVD x 100 in Prozent. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

### 3.1.6 Volumetrischer Blutfluss ( $Q_v$ )

Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. In allen Gruppen zeigt sich im Zeitverlauf ein Anstieg der Perfusion. Die Perfusion in der pLXSN Gruppe unter Therapie und in der Eph B4 wt – Gruppe stieg im Vergleich zur pLXSN – Gruppe auf

das doppelte beziehungsweise 2,5 – fache bis zum Tag 18 an. Die EphB4 wt - Gruppe unter Therapie stieg im Vergleich zur pLXSN -Kontrolle auf das 6 – fache.

(pLXSN: 24,31 nl/s am Tag 7, 46,96 nl/s am Tag 11, 167,0 nl/s am Tag 14, 105,1 nl/s am Tag 18; pLXSN + SU: 15,69 nl/s am Tag 7, 46,71 nl/s am Tag 11, 197,8 nl/s am Tag 14, 223,1 nl/s am Tag 18; EphB4 wt: 35,37 nl/s am Tag 7, 203,8 nl/s am Tag 11, 346,6 nl/s am Tag 14, 300,4 nl/s am Tag 18; EphB4 wt + SU: 35,36 nl/s am Tag 7, 145,0 nl/s am Tag 11, 371,5 nl/s am Tag 14, 665,0 nl/s am Tag 18).

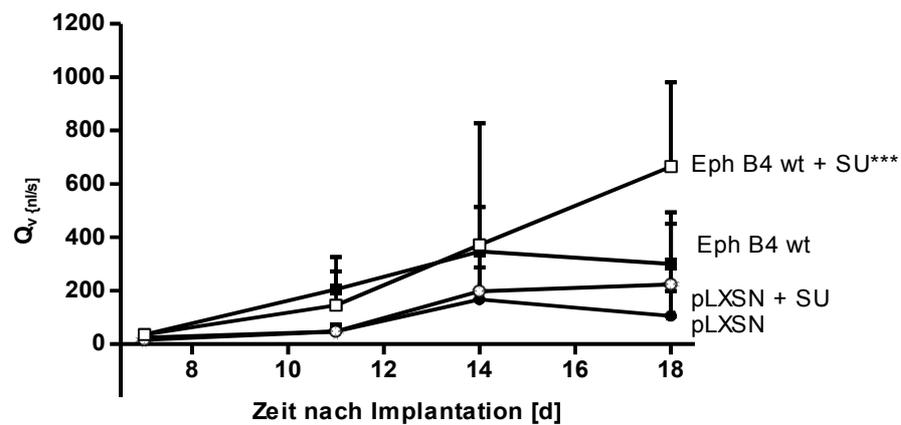
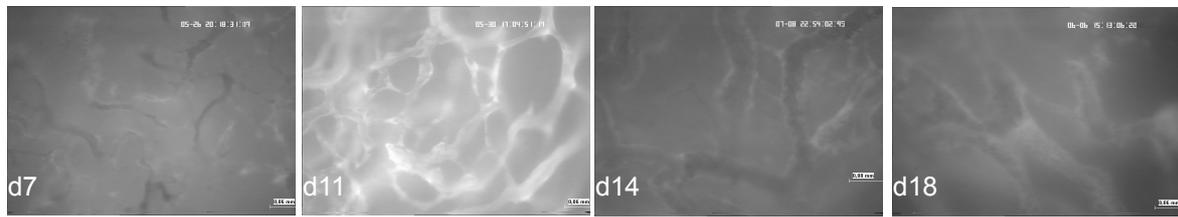
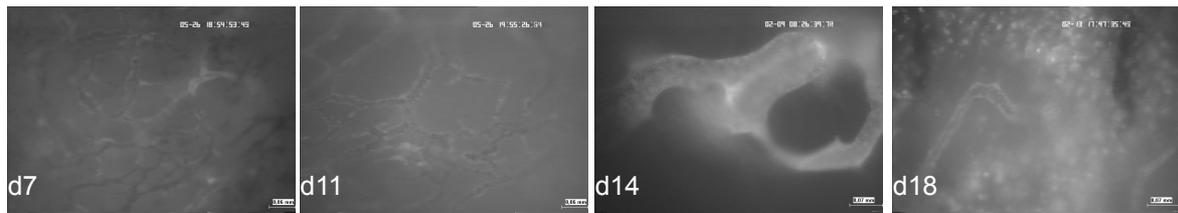


Abbildung 8: Die Veränderung des volumetrischen Blutflusses  $Q_v$  in nl/s .  
Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

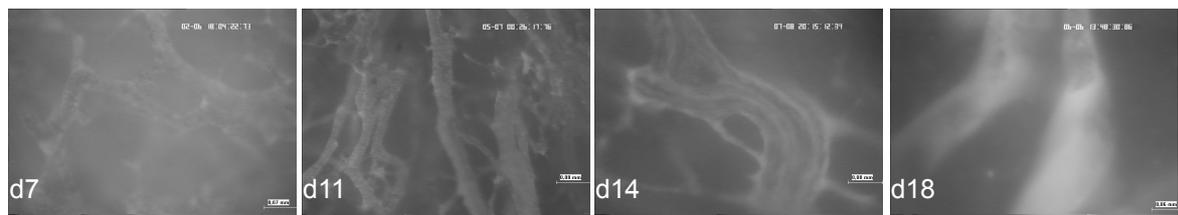
\*\*\*:  $p < 0.001$  EphB4 wt + SU vs. pLXSN + SU.



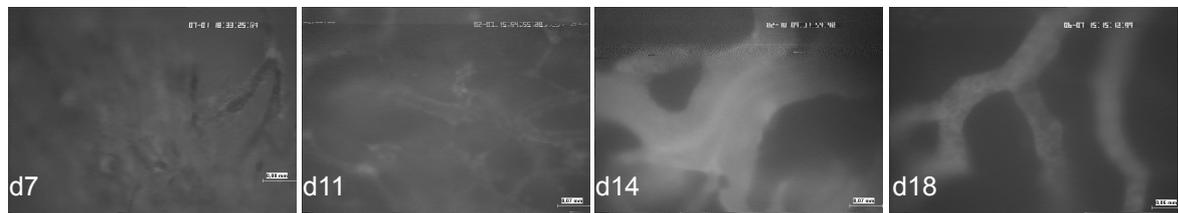
pLXSN



pLXSN unter Therapie mit SU 11248



Eph B4 wt



Eph B4 wt unter Therapie mit SU 11248

Abbildung 9: Intravitalfluoreszenz-Mikroskopie, Alle Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung nach intravenöser Injektion von 0,1 ml 2% FITC-Dextran 150 kD.

## 3.2 Ergebnisse der Immunhistochemie

### 3.2.1 Ergebnisse der CD31/Desmin-Färbung (Perizyten-Endothel-Assoziation)

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 10 und 11 wiedergegeben. Es konnte eine deutliche Reduktion der Pecam-Desmin-Ratio in der pLXSN -Gruppe unter Therapie auf circa 0,5 beobachtet werden während in den restlichen Gruppen besagte Ratio im Bereich von etwa 0,8 bis 0,85 lag. Alle Tumore wurden am Tag 18 kryofixiert und dem Protokoll folgend aufbereitet.

(pLXSN: 0,80; pLXSN + SU: 0,47; EphB4 wt: 0,88; EphB4 wt + SU: 0,74).

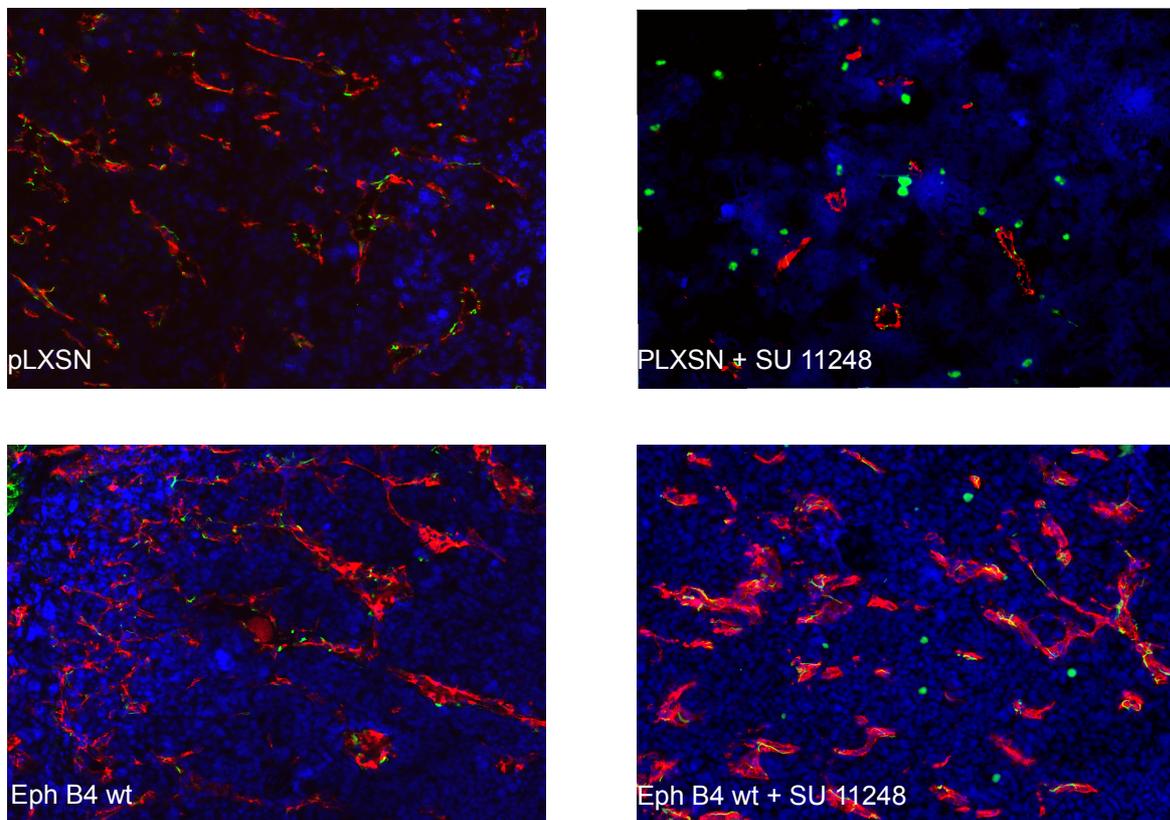


Abbildung 10: Immunfluoreszenz CD31/Desmin – Färbung. Alle Aufnahmen in 20 – facher Vergrößerung. CD31 (rot), Desmin (grün), DAPI (blau).

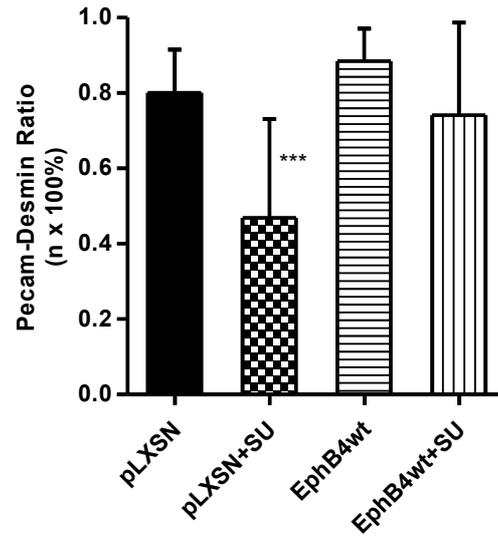


Abbildung 11: Immunfluoreszenz CD31/Desmin-Ratio. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

\*\*\*:  $p < 0.001$  EphB4 wt + SU vs. pLXSN + SU.

### 3.2.2 Ergebnisse der Ki67 – Färbung (Proliferation Tumorzellen)

Die Ergebnisse der Tumorpheriferation sind in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Ki67 positiven Zellkerne in den Therapiegruppen auf bis zu 50 % im Vergleich zu den nicht therapierten Tumoren. Zwischen EphB4 wt und pLXSN Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

(pLXSN: 398,7 n/ROI; pLXSN + SU: 199,8 n/ROI; EphB4 wt: 415,3 n/ROI; EphB4 wt + SU: 225,8 n/ROI).

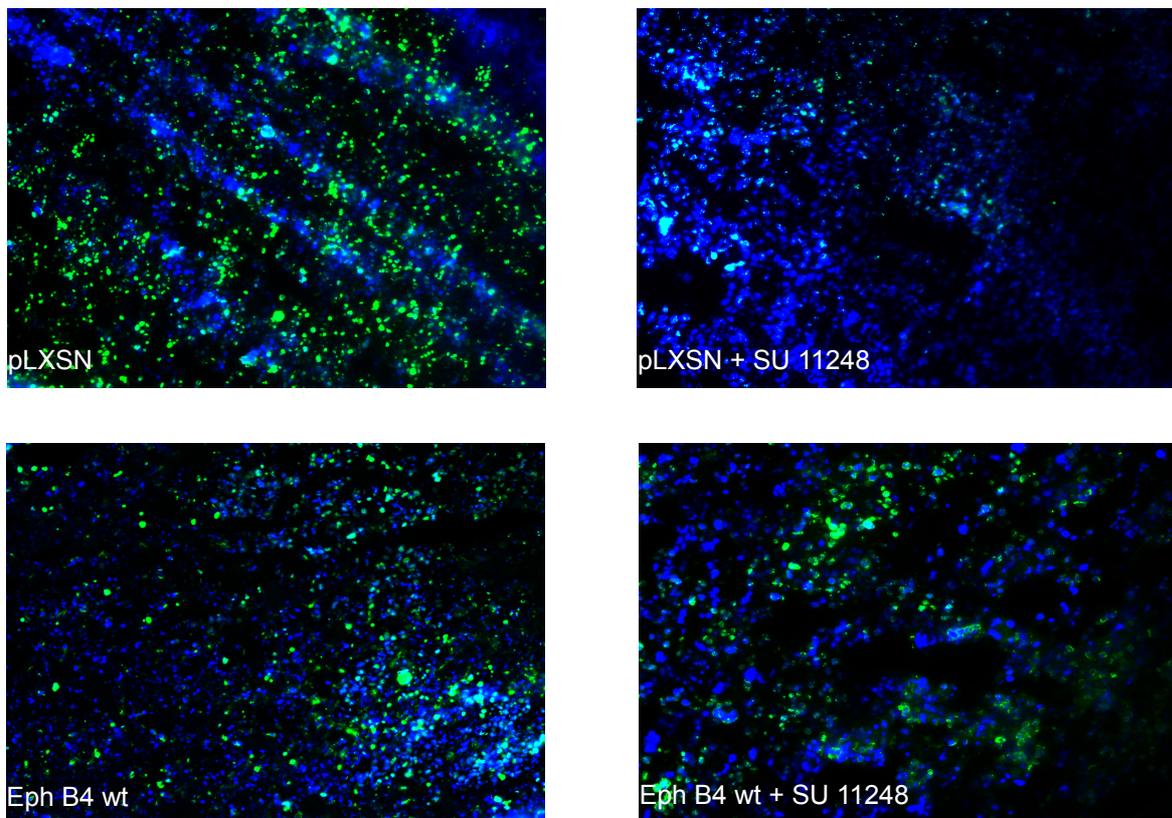


Abbildung 12: Immunfluoreszenz Ki67/DAPI – Färbung. Alle Aufnahmen in 20 – facher Vergrößerung. Ki67 (grün), DAPI (blau).

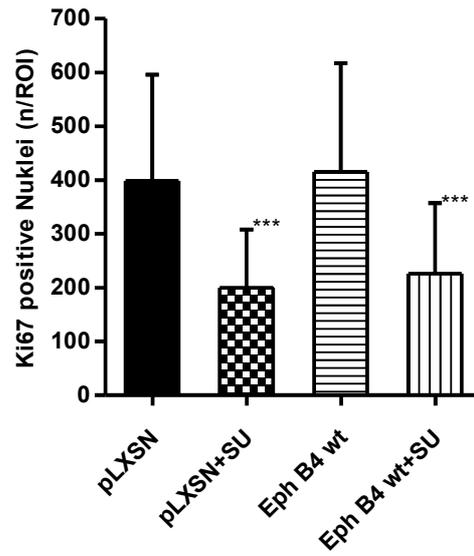


Abbildung 13: Immunfluoreszenz Ki67. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

\*\*\*:  $p < 0.001$  Therapiegruppen gegen Gruppe ohne Therapie.

### 3.2.3 Ergebnisse der Ki67 und CD31 Doppelfärbung (Endotheliale Proliferation)

Die Ergebnisse der endothelialen Proliferation sind in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Ki67/CD31- doppelpositiven Zellkerne in den Therapiegruppen auf bis zu 30 % im Vergleich zu den nicht therapierten Tumoren. Zwischen EphB4 wt und pLXSN Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Alle Tumore wurden am Tag 18 kryofixiert und dem Protokoll folgend aufbereitet. (pLXSN: 26,3 n/ROI; pLXSN + SU: 8 n/ROI; EphB4 wt: 22,7 n/ROI; EphB4 wt + SU: 7,3 n/ROI)

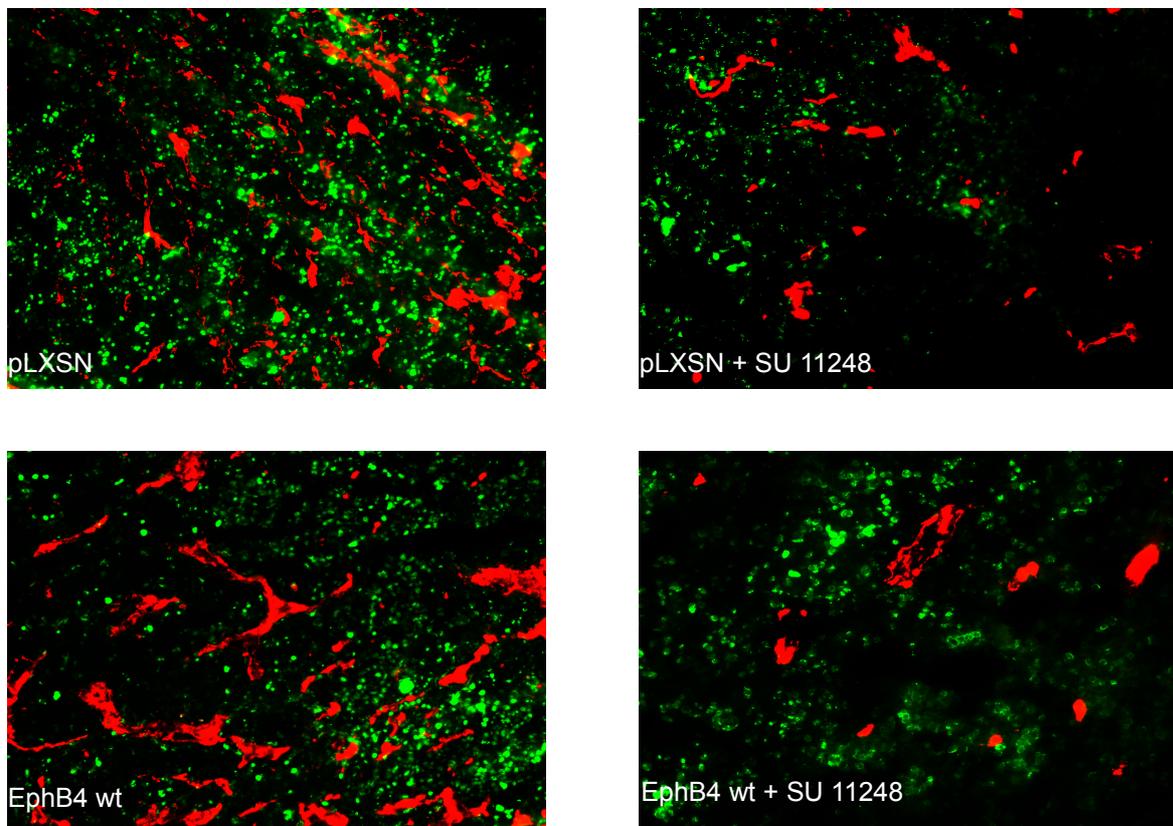


Abbildung 14: Immunfluoreszenz Ki67/CD31 - Färbung. Alle Aufnahmen in 20 - facher Vergrößerung. CD31 (rot), Ki67 (grün).

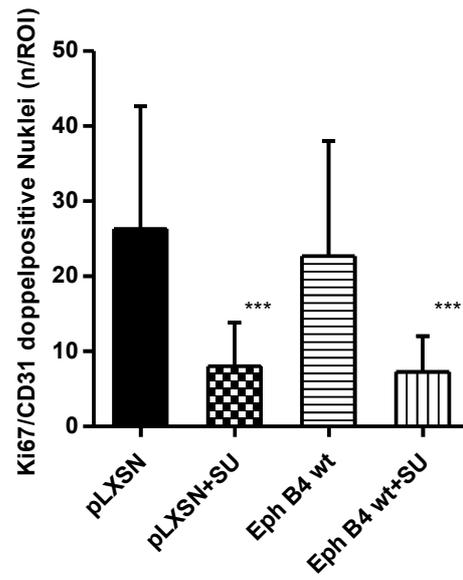


Abbildung 15: Immunfluoreszenz Ki67/CD31 doppelpositive Zellkerne. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

\*\*\*:  $p < 0,001$  Therapiegruppen versus Gruppen ohne Therapie.

### 3.2.4 Ergebnisse der Caspase 3 – Färbung (Apoptose)

Die Ergebnisse der Caspase 3-Färbung sind in Abbildung 16 und 17 dargestellt. Die Caspase-positiven Zellkerne liegen in den Gruppen pLXSN, EphB4 wt und EphB4 wt unter Therapie ca. bei 50 pro „region of interest“. In der pLXSN -Gruppe unter Therapie zeigt sich im Vergleich eine durchschnittlich doppelt so hohe Anzahl der positiven Zellkerne mit Werten um 90 pro „region of interest“.

(pLXSN: 44,9 n/ROI; pLXSN + SU: 92,54 n/ROI; EphB4 wt: 53,1 n/ROI; EphB4 wt + SU: 52,6 n/ROI)

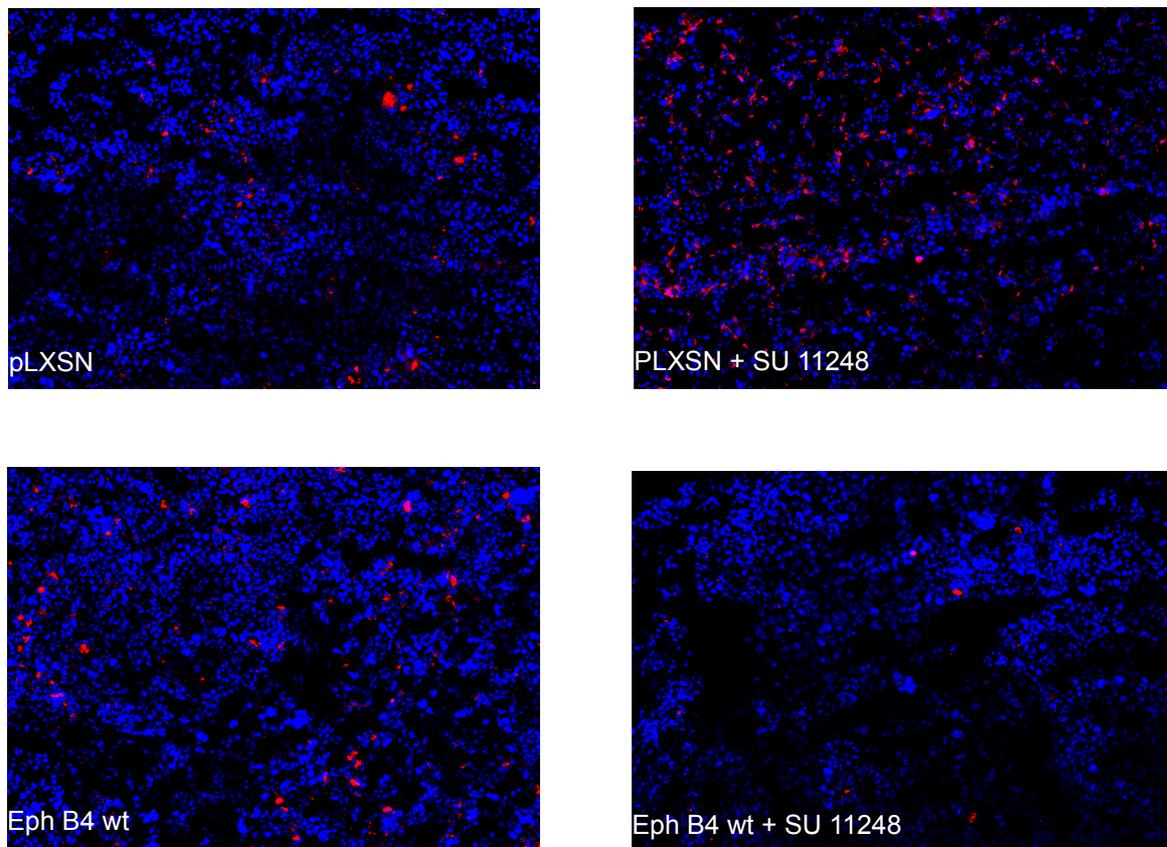


Abbildung 16: Immunfluoreszenz Caspase 3 – positive Zellen. Alle Aufnahmen in 20 – facher Vergrößerung. Caspase 3 (rot), DAPI (blau)

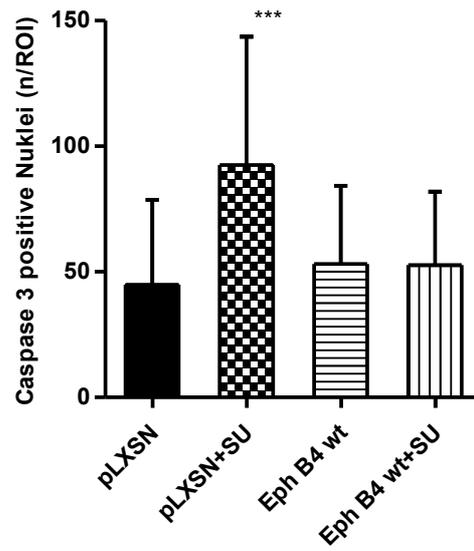


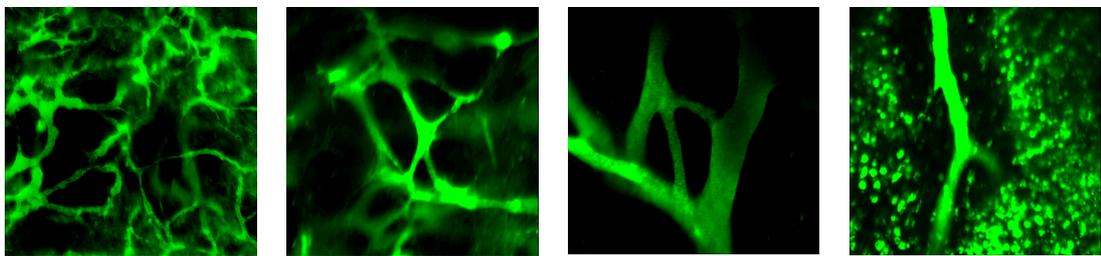
Abbildung 17: Immunfluoreszenz Caspase 3 positive Zellen. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

\*\*\*:  $p < 0,001$  pLXSN + SU versus alle andere Gruppen.

### 3.3 Ergebnisse in der konfokalen Lasermikroskopie

Die konfokale Lasermikroskopie wurde zusätzlich zu der Fluoreszenzmikroskopie intravital eingesetzt, um eine zusätzliche Visualisierung des Gefäßsystems unter Therapie zu erreichen. Neben einer Bestätigung der phänotypischen Beobachtungen, die wir über das Gefäßsystem machen konnten, zeigte die konfokale Lasermikroskopie zudem deutliche Anzeichen für sich extravasal bildende FITC-Dextran-Kristalle, vorwiegend in der pLXSN-Gruppe unter Therapie.

#### pLXSN + SU 11248



#### Eph B4 wt + SU 11248

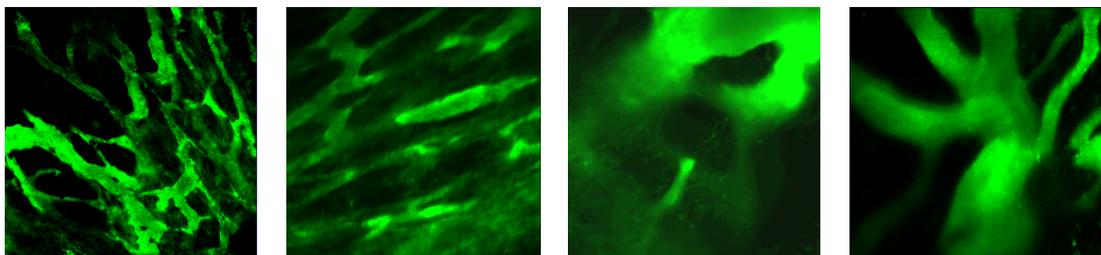


Abbildung 18: Intravitale-Konfokale-Laser-Mikroskopie der Therapiegruppen

### 3.4 Ergebnisse der Experimente mit subkutanen Xenografts

Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt. Während die Tumore der Gruppen pLXSN, EphB4 wt und EphB4 wt + SU ein über den gesamten Zeitraum von 7 Tagen vergleichbares Wachstum zeigten, fiel bei den Tumoren der pLXSN - Gruppe unter Therapie vor allem ab Tag 6 ein deutlich vermindertes Wachstum auf. Am Tag 7 des Studienzeitraums hatten die Tumore dieser Gruppe ein ca. 50% geringeres Volumen als die Tumoren der anderen Gruppe.

(pLXSN: 58,05 mm<sup>3</sup> an Tag 1, 94,38 mm<sup>3</sup> an Tag 2, 131,3 mm<sup>3</sup> an Tag 3, 183,8 mm<sup>3</sup> an Tag 4, 257,5 mm<sup>3</sup> an Tag 5, 359,1 mm<sup>3</sup> an Tag 6, 371,9 mm<sup>3</sup> an Tag 7; pLXSN + SU: 48,77 mm<sup>3</sup> an Tag 1, 57,58 mm<sup>3</sup> an Tag 2, 63,63 mm<sup>3</sup> an Tag 3, 81,74 mm<sup>3</sup> an Tag 4, 175,4 mm<sup>3</sup> an Tag 5, 154,4 mm<sup>3</sup> an Tag 6, 200,5 mm<sup>3</sup> an Tag 7; EphB4 wt: 37,31 mm<sup>3</sup> an Tag 1, 55,17 mm<sup>3</sup> an Tag 2, 105,9 mm<sup>3</sup> an Tag 3, 152,8 mm<sup>3</sup> an Tag 4, 198,3 mm<sup>3</sup> an Tag 5, 335,7 mm<sup>3</sup> an Tag 6, 354,4 mm<sup>3</sup> an Tag 7, EphB4 wt + SU: 55,43 mm<sup>3</sup> an Tag 1, 76,06 mm<sup>3</sup> an Tag 2, 94,98 mm<sup>3</sup> an Tag 3, 136,8 mm<sup>3</sup> an Tag 4, 219,3 mm<sup>3</sup> an Tag 5, 281,6 mm<sup>3</sup> an Tag 6, 392 mm<sup>3</sup> an Tag 7).

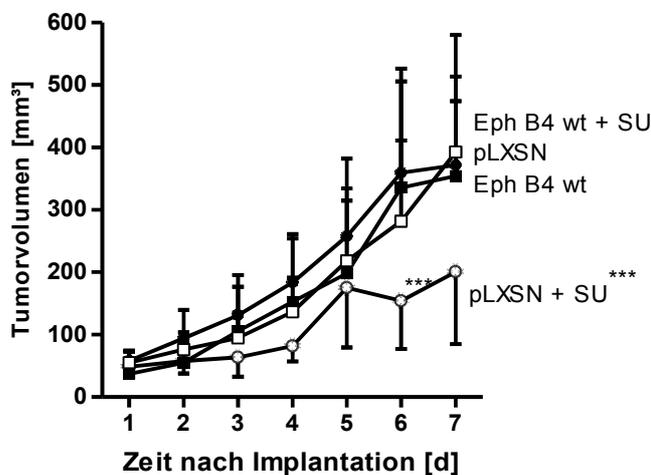


Abbildung 19: Volumen der Subkutanen Xenografts. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

\*\*\*:  $p < 0,001$  EphB4 wt + SU vs. PLXSN + SU

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Methodik**

Der zentrale Bestandteil dieser Studie ist die intravitalmikroskopische Beurteilung des sich „in vivo“ entwickelnden Gefäßsystems. Die heutige medizinische Forschung ist auch trotz der Bemühungen sich vom Tierexperiment zu entfernen, mehr denn je auf die Forschung mit „in vivo“-Modellen angewiesen, um möglichen Therapieoptionen eine adäquate Grundlagenforschung vorausgehen zu lassen, oder um bezüglich besagter Grundlagen, auf den menschlichen Organismus möglichst präzise übertragbare Ergebnisse zu erhalten (17). Mögen experimentelle Ansätze „in vitro“ nicht minderer Bedeutung sein, so betrachtet man bei diesen Zusammenhänge doch unter sehr artifiziellen Bedingungen und werden nach wie vor kein Ersatz für „in vivo“-Experimente darstellen (15). Die steigende Bedeutung von „in vivo“-Forschung lässt natürlich auch den Bedarf der ethischen Auseinandersetzung mit diesem Thema und das Bewusstsein über die Grenzen tierexperimenteller Forschung immer wichtiger werden (17, 18).

Unsere tierexperimentelle Studie wurde in Durchführung und Protokollierung vom Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin (Bearbeitungsnummer G0003/08) genehmigt. Es wurden während der Studie alle Anforderungen und Bedingungen nach §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes eingehalten.

#### **4.1.1 Das Glioblastom-Modell**

Das Glioblastom verfügt über eine ausgeprägte Vaskularisierung (25) und stellt somit neben anderen möglichen Tumorentitäten, auf Grund des schnellen Wachstums, bei dem sich die ersten makroskopisch erkennbaren Tumormanifestationen zwischen Tag 2-4 zeigten, eine sehr gut geeignete Tumorentität zur Untersuchung von tumorangiogenen Vorgängen dar (5).

Die SF 126 Zellen sind Zellen humanen Ursprungs. Dies ist entscheidend für den Erfolg der Transfektion durch das ecotrope retrovirale System, das zum Einsatz kam. Die

Transfektion dieses Systems geschieht nur in mauseigenen Zellen fibroblastischen Ursprungs und beeinflusst nicht das Wachstum der SF 126 Zellen. Die SF 126 Zellen stellen auf Grund ihrer geringen Ansprüche in der Zellkultur einen idealen, gut verfügbaren und leicht zu kultivierenden Zelltypus dar und eignen sich somit für unsere Studie (13,14). Da es sich bei den Zellen um humane transplantierte Zelllinien handelt und diese zudem nicht orthotop implantiert werden, muss die Frage gestellt werden, ob die Ergebnisse wirklich repräsentativ für die Gefäßentwicklung eines Glioms im menschlichen Gehirn sein kann. Es gibt Studien, die zeigen, dass es bei Transplantation eines gleichen Tumorzelltyps in unterschiedlichen Geweben auch zu unterschiedlichen Ergebnissen z.B. bezüglich der Permeabilität kommt (27).

Coomber et al. kamen zu dem Ergebnis, dass, unabhängig vom Gastgewebe, Tumorentitäten immer den gleichen Phänotyp ausbilden würden (26). Trotz zahlreicher Studien bleibt die Frage der verlässlichen Übertragbarkeit der Tiermodell-Ergebnisse auf den sich im menschlichen Organismus entwickelnden Tumor bestehen.

Wir verwendeten weibliche CD1 Nunu Nacktmäuse (Charles River). Diese Mäuse wurden 1979 durch Kreuzung von Crl:NU-Foxn1<sup>nu</sup> und einer CD1 entwickelt und besitzen keinen Thymus. Infolgedessen bilden sie keine T-Zellformen aus und sind immundefizient. Dies ist unumgängliche Voraussetzung für die Implantation und erfolgreiche Wachstum oben erwähnter SF 126 Gliom-Zellen humanen Ursprungs. Zudem verfügen diese Mäuse über sehr elastische und annähernd unbehaarte Haut, was wiederum einen Vorteil für die Präparation und die Haltbarkeit der Rückenhautkammer darstellt. Die Anfälligkeit der Tiere für Infekte stellt bei hygienebewusster Arbeit in keimarmer Umgebung keine Schwierigkeit dar. Die gute Verfügbarkeit und die unkomplizierte Haltung ermöglichen die Durchführung der Experimente durch eine Person. Die Tiere tolerierten die Experimente gut. Es wurden keine Auffälligkeiten in Ess-, Trink-, Schlaf- oder Sozialverhalten beobachtet. Ein Gewichtsverlust von mehr als 30% hätte zum Ausschluss aus dem Experiment geführt, wurde aber bei keinem Tier beobachtet.

Die Durchführung der Narkose mit Ketamin und Xylazin konnte problemlos durchgeführt werden. Mit besonderer Rücksicht auf die kardialen Nebenwirkungen der Kombination aus Ketamin und Xylazin wurde die Anästhesie entsprechend bedacht durchgeführt (23).

Zur antiangiogenen Therapie der Tumore wurde Sunitinib (Sutent®, SU 11248) durch intraperitoneale Injektion (40 mg/kg KG/d) verwendet. Durch seine umfangreiche Inhibition angiogen relevanter Signalwege (s.o.) erwies es sich für die Untersuchung als besonders geeignet. Obwohl sich Sunitinib zunächst als hoffnungsvolle medikamentöse Ergänzung zu bestehenden antiangiogenen Medikamenten wie Imatinib darstellte (34), zeigte sich in zuletzt durchgeführten Studien ein eher nachteiliges Bild bezüglich der Wirksamkeit. Sowohl im PFS („progression free survival“), als auch OS („overall survival“) zeigte Sunitinib (bei positivem Effekt gegenüber Placebo-Gabe) schlechtere Ergebnisse als andere Medikamente. Hierfür werden Resistenzmechanismen verantwortlich gemacht, deren Ergründung auch Ziel dieser Studie ist. Somit stellt es sich auch in unserem experimentellen Setting als geeignet dar (22).

Die Therapie wurde in etablierter Art und Weise durchgeführt, um ausreichend Effekt auf die Gefäßarchitektur des Tumors zu erhalten (154).

Das Rückenhautkammermodell „dorsal skinfold chamber“ stellt eine gut etablierte Methode zur Untersuchung von Angiogenese und Tumorangiogenese (5), Interaktion von Fremdgewebe auf umgebendes Eigengewebe (19) oder auch anderen physiologischen bzw. biochemischen Vorgängen dar. Das Modell ermöglicht die nicht-invasive, wiederholte Untersuchung der Veränderung des Gefäßsystems. Zudem kann bei entsprechendem Erfordernis eine Untersuchung der Neo-Vaskularisierung, also der Bildung von neuen tumoreigenen Blutgefäßen erfolgen. Des Weiteren ermöglicht die offene Rückwand der Kammer eine räumliche Expansion des Tumors und somit auch eine dreidimensionale Analyse der Gefäßarchitektur (5).

Das Modell birgt natürlich auch einige wenige Nachteile. Einen dieser stellt die, durch den begrenzten Raum bedingte, starke Auswirkung der Ödembildung auf die Bildqualität dar. Da sowohl das wachsende Gliom auf Grund seiner hyperpermeablen Gefäßarchitektur, als auch das Sunitinib eine ausgeprägte Ödembildung begünstigen, war die sorgfältige Präparation der Kammer von entscheidender Bedeutung (5, 24, 154). Ein weiteren Nachteil stellt wahrscheinlich auch die Koimplantation von zwei Zelltypen dar, da es hierdurch neben dem Wachstum der SF126 Zellen auch zum Untergang und infolgedessen Ansammlung von zerstörten Bestandteilen untergegangener Phoenix-Zellen oder anderer Zellen kommen kann. Vermutlich hat

dies im Vergleich zu einer Mikroskopie nach reiner Gliomzellen-Implantation Einfluss auf die Bildqualität.

Die Präparation der Kammer wurde nach den üblichen Standards vorgenommen. Bei der Präparation verursachtem Trauma und damit verbundener Entzündungsreaktion im Gewebe und Verfälschungen der intravitalmikroskopischen Analyse, wird durch ein Intervall von 2 Tagen postoperativ vor Implantation der Tumorzellen vorgebeugt (5, 8, 19).

#### **4.1.2 Das ecotrope Transfektionsmodell**

Die retrovirale Transfektion über sogenannte „packaging cell lines“ ist eine sehr etablierte Methode des Gentransfers oder der Transfektion von Genen in Zielgewebe oder Zielzellen. Auf dem „murine leukaemia virus“ basierende retrovirale Systeme, so wie auch das in unserer Studie verwendete, stellen die heutzutage am häufigsten verwendete Form zur Gentransfektion dar. Sie bieten den Vorteil, dass dem Virus die Eigenschaft zur Produktion viraler Strukturbestandteile fehlt, somit nur die Expression des gewünschten genetischen Inhalts stattfindet und zudem Gensequenzen in den Vektor eingefügt werden können, die zu einer Transfektion eines bestimmten Zelltypus führen (13, 29)

Ein wichtiger Aspekt dieses Transfektionsmodells ist, dass es nur zur Transfektion der Zielzelle führen kann, wenn dieses sich in der Zell-Mitose befindet (30, 31). Das bedeutet bezüglich der Transfektion des Tumorgefäßsystems, dass nur neugebildete Tumorgefäße durch die Transfektion mit EphB4 erreicht werden (13). Nachteil des Modells ist demnach, dass keinerlei Aussage auf einen eventuellen Effekt von EphB4 auf nicht proliferierende Epithelzellen getroffen werden kann. Ob ein eventueller Effekt von EphB4 auf nicht-proliferierendes Gewebe zu einer Veränderung der Ergebnisse unserer Studie führen würde, bleibt somit ungeklärt.

Zudem bleibt die Frage der Überlebensdauer der packaging cells und somit die Dauer der funktionierenden Transfektion nicht eindeutig geklärt, trotz der, durch Erber

nachgewiesenen, Überexpression des EphB4-Rezeptors im Western-Blot der subkutanen Xenografts (13).

Die Herstellung eines gemischten Pellets aus Gliomzellen und Phoenix E Zellen soll zu einer optimalen Transfektion des Gefäßsystems innerhalb des wachsenden Tumors führen (13).

#### **4.1.3 Die Gefäßanalyse mittels Intravital-Fluoreszenz-Video-Mikroskopie**

Die Intravital-Fluoreszenzmikroskopie stellt eine besonders geeignete Methode dar, um die Fragestellung dieser Studie zu bearbeiten. Die Untersuchung des sich „in vivo“ entwickelnden Tumorgefäßsystems ist unumgänglich, um tumorgefäßmorphologische Veränderungen zu erfassen und zu verstehen. Insbesondere Zusammenhänge, welche nicht durch klassische Methodik wie z.B. Immunhistochemie etc., erschlossen werden können, wie z.B. Permeabilität, des Weiteren Biodistribution, oder Leukozyten-Endothel-Interaktion, lassen sich durch die intravitalmikroskopische Ansätze erfassen (5, 6, 11, 12, 154). Hierbei erlaubt im speziellen die Intravitalfluoreszenz-Mikroskopie durch Epilumineszenz im Vergleich zu anderen, seltener verfügbaren, Techniken (2-Photon, Multiphotonenmikroskopie), neben einer guten Auflösung von Geweben und Gefäßausdehnung auch eine sehr gut etablierte Beurteilung der Mikroperfusion, bei eingeschränkter Beurteilung in der Tiefe des Gewebes (max. 100µm) (5). Neuere Techniken wie das „optical-frequency-domain-imaging“ OFDI oder schon oben erwähnte Multi-Photonen-Mikroskopie erweitern das Feld der Möglichkeiten und lassen den intravitalmikroskopischen Ansatz zu einer zukünftig entscheidenden Technik in der Forschung und der klinischen Medizin werden (10).

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Tumorangiogenese und antiangiogene Therapie**

Zu Beginn der siebziger Jahre beschrieb Judah Folkman die therapeutischen Chancen die sich aus der Beobachtung des sich entwickelnden Tumorgefäßsystems ergeben. Er leitete aus seinen Beobachtungen ab, dass ein sich entwickelnder Tumor neue Blutgefäße ausbilden muss, um über das Stadium einer kleinen Ansammlung von Zellen, die sich durch Diffusion ernähren kann, hinauszukommen (1). Dieser Zusammenhang war, wie einleitend beschrieben, Grundlage der Idee durch Hemmung besagter Angiogenese, das Wachstum und somit auch Expansion und Wachstum eines sich entwickelnden Tumors zu unterbrechen und damit eine neue Therapieoption, neben zytostatischen oder anderen Medikamenten, zu erschließen (2).

Bis heute wurden, ausgehend von den initialen Untersuchungen Folkmans, unzählige Studien durchgeführt, um das Potential des therapeutischen Ansatzes zu ergründen. Dies führte zu einem tieferen Verständnis angiogener Vorgänge und pathophysiologischer Zusammenhänge. In die Angiogenese sind verschiedene Zelltypen wie z.B. Perizyten involviert und sie wird durch unterschiedlichste körpereigene Faktoren, Rezeptoren oder intrazelluläre Signalwege beeinflusst, vornehmlich solche, die im Zusammenhang mit der VEGF-Familie stehen. Zudem kann sie durch Tumorzellen selbst beeinflusst oder nachgeahmt werden (33, 35, 37). Unsere Studie rückt die Ephrin-Familie, respektive den EphB4-Rezeptor, und seinen Einfluss auf angiogene Vorgänge unter antiangiogener Therapie in den Mittelpunkt. Wie schon einleitend erwähnt kommt dem Ephrin-Eph-System eine entscheidende Rolle in Vorgängen der Tumorangiogenese zu. (38, 39, 41).

#### **4.2.2 EphB4 vermittelt Ausbildung vaskulärer Resistenzen gegenüber antiangiogener Therapie**

In unserer Studie wurden vor allem die „adaptiven Resistenzmechanismen“ beleuchtet wie nachfolgend dargestellt werden soll. Die Gefäßdichte, sowohl die totale (TVD), als auch die funktionelle (FVD), verblieben in fast allen Gruppen annähernd konstant. In der Studie, die durch Erber et al. durchgeführt wurde, konnten unter Überexpression von Eph-B4 ohne Therapie mit Sunitinib ebenfalls keine eindeutigen Veränderungen der Gefäßdichten gesehen werden (13).

Nur die Tumore der pLXSN Gruppe (Kontrollgruppe) unter Therapie zeigten einen signifikanten Abfall der Gefäßdichten, wie es in allen vergleichbaren Untersuchungen auch mit anderen antiangiogenen Medikamenten gesehen wurde (5, 11-14). Die Therapiegruppe der Gruppe der EphB4-Überexpression zeigte diesen Abfall nicht, was auf einen das Gefäßsystem stabilisierenden Effekt von Eph-B4 hindeuten könnte.

In frühen Untersuchungen von Martiny-Baron et al. an mit löslichem sEphB4 transfizierten Melanom-Xenografts in NMRI-nu/-nu Mäusen konnte ein durch sEphB4 vermutete Reduktion der Gefäßdichte um 19% im Tumorgefäßsystem gefunden werden. Ähnliche Beobachtungen wurden von Djokovic et al. 2010 berichtet. Diese verwendeten ein Pankreaskarzinom-Modell in Dll4 knock-out Mäusen, um es mit löslichem sEphB4-Alb zu behandeln, also den über EphB4 vermittelten Effekt zu reduzieren, was einer „down“-Regulation von EphB4 gleichkommt. Die Therapie resultierte in einer Reduktion der Gefäßdichte, welche auf den Einsatz des EphB4-Antikörpers zurückgeführt wurde. Auch Studien im Bereich der Therapie des Karposi-Sarkoms, die eine Hemmung des Ephrin B2/EphB4-Signalweges als Gegenstand hatten, ließen eine Reduktion der Gefäßdichte erkennen. Diese Studien stützen im Umkehrschluss unsere Ergebnisse, welche, wie im Folgenden ausgeführt, einen gefäßstabilisierenden Effekt von EphB4 gezeigt haben (57-59).

Unsere Studie ist aber die Erste, die eine Stabilisierung des Gefäßsystems durch Überexpression von EphB4 unter antiangiogener Therapie zeigen kann. Somit ist zu vermuten, dass der Mechanismus der Resistenzbildung über ein (von VEGF, PDGF und allen weiteren durch Sunitinib inhibierten Signalwege) unabhängiges „Signaling“ vermittelt werden muss.

Des Weiteren zeigt das Tumorgefäßsystem unter Therapie mit antiangiogenen Medikamenten eine Erhöhung des Gefäßdurchmessers, was auch durch andere Studien zuvor gezeigt werden konnte (11, 12, 50, 51, 154). Diese Veränderung lässt sich auch in der Gruppe der EphB4-Überexpression sehen. Interessanterweise ist die Erhöhung des Durchmessers durch die Eph-B4-Überexpression, sowohl bei den nicht-therapierten als auch therapierten Tieren, doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe unter Therapie mit Sunitinib. Somit kommt es durch die Erhöhung der Expression des Eph-B4-Rezeptors auf den Endothelzellen der Maus zu einer Verbesserung der Perfusion des Tumors, wie sich an den Ergebnissen der Blutflussraten bestätigen lassen. Unsere Ergebnisse knüpfen damit direkt an Ergebnisse in immunhistochemischen Untersuchungen von z.B. Noren et al. an, die 2004 zeigen konnten, dass es durch Expression von EphB4 (welchem die intrazelluläre Tyrosinkinase-Aktivität fehlte; somit wurde der Effekt vermutlich über Ephrin B2 vermittelt) in MDA-MB-435-Tumoren zu einer Erhöhung des Gefäßdurchmesser und der Perfusion der Tumoren kommt (53). Auch Erber et al. stellten ähnliche Veränderungen des Gefäßsystem fest. Neben erweiterten Gefäßen konnte auch von Ihnen eine erhöhte Perfusion der EphB4 Tumore gesehen werden (13).

Während die Erhöhung der Gefäßdurchmesser unter antiangiogener Therapie (ohne Beeinflussung der Eph-B4 Expression) durch frühere Studien von Vajkoczy et al. im C6 Gliom (Ratte) nicht beobachtet wurden, konnte damals aber ebenfalls eine Erhöhung der Perfusionsrate verzeichnet werden (5, 6, 7). Dabei sei zu erwähnen, dass damals Semaxanib (SU 5416), ein Inhibitor von Flk-1/KDR und somit VEGFR2, verwendet wurde und somit die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar erscheinen. Die Ergebnisse von Erber et al. aus 2004 ließen ebenfalls keine Veränderung des Gefäßdurchmessers beobachten. Auch hier wurde SU 5416 verwendet (14). Auch Bampi et al. zeigten im Plattenepithelkarzinom eher eine Reduktion des Gefäßdurchmessers oder morphologische Veränderungen im Sinne einer Normalisierung des Tumorgefäßsystems unter antiangiogener Therapie, wie sie zuvor auch schon von anderer Seite postuliert wurden (54-56).

Wie einleitend dargestellt stehen nicht nur die direkt zum Gefäßsystem gehörenden Zellen im Interesse der Erforschung des vaskulären Systems oder im Speziellen der

Tumorangiogenese. Auch die umgebenden mesenchymalen Zellen, und insbesondere die Perizyten, scheinen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und späteren Beeinflussung mikrovaskulärer Vorgänge zu spielen (13, 61, 62).

Unsere Studie versuchte die Veränderungen der Permeabilität unter Überexpression von EphB4 und antiangiogener Therapie anhand von intravitalmikroskopischer Bestimmung des Permeabilitätsindex und Immunhistochemischer Färbung von Perizyten durch Einsatz von Pecam/Desmin zu erfassen. Wie zuvor erwähnt ist die Verwendung dieser Antikörper mit Einschränkungen in der genaueren Aussage zur Perizyten-Endothel-Assoziation verbunden, da Desmin nicht nur auf Perizyten zu finden ist. Trotzdem deuten unsere Ergebnisse daraufhin, dass es, vermittelt durch EphB4 respektive Ephrin B2, zu einer erhöhten Assoziation der Endothelzellen mit umliegenden Zellen mesenchymalen Ursprungs kommt. Während Erber et al. unter Verwendung von SU 6668 (Blockade von VEGFR-2 und PDGFR- $\beta$ ) keine verminderte Perizyten-Endothel-Interaktion sehen konnten, führte die Therapie unserer Tumore mit SU 11248 zu einer Verminderung der Perizyten-Endothel-Interaktion, welche unter EphB4-Überexpression wieder tendenziell normalisiert erschien (14). Diese Ergebnisse korrespondieren mit Erkenntnissen, die von Kimura et al. gewonnen wurden. Dort wurde durch Verwendung eines löslichen EphrinB2-Fc Antikörpers eine Aktivierung des EphB4-Rezeptors erzielt, welche eine höhere Assoziation von  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen und CD31-positiven Zellen zur Folge hatte. Eine Verwendung eines EphB4Fc-Antikörpers zur Aktivierung von EphrinB2 führte nicht zu diesen Ergebnissen (64). In einer Studie von Schemet et al. wurde beschrieben, dass Injektion von löslichem sEphB4 (somit eine Blockade sowohl von „forward“- als auch „backward“-signaling) zu einem weniger reifen Gefäßsystem führt (59, 65). EphB4 scheint somit einen stabilisierenden Effekt auf das Tumorgefäßsystem zu haben, welcher unabhängig von VEGF oder PDGF vermittelt wird. Eventuell wird die Stabilisierung des Tumorgefäßsystems auch über eine verstärkte Rekrutierung oder Differenzierung von perivaskulären, stabilisierenden Zellen aus Tumorstammzellen vermittelt (63).

Der erhöhte Permeabilitätsindex in der pLXSN-Gruppe unter Therapie, der EphB4wt-Gruppe und der EphB4wt-Gruppe unter Therapie im Vergleich zur pLXSN-Gruppe ohne Therapie, deuten auf eine verminderte Permeabilität des Gefäßsystems unter diesen Bedingungen hin. Somit scheint zum einen die Therapie mit Sunitinib zu einer

verminderten mikrovaskulären Permeabilität zu führen, was auch in anderen Studien gesehen wurde (12). Zum anderen führt auch die Überexpression von EphB4 zu einer Verminderung der Permeabilität. Unter Therapie und gleichzeitiger Überexpression kommt es sogar zu einer nochmals stärkeren Verminderung der Permeabilität. Des Weiteren konnten in der pLXSN Gruppe unter Therapie, neben der erhöhten extravasalen Intensität der Fluoreszenz, eine deutlich stärkere Bildung von FITC-Dextran-Kristallen gefunden werden (siehe Abbildung 20, Seite 56).

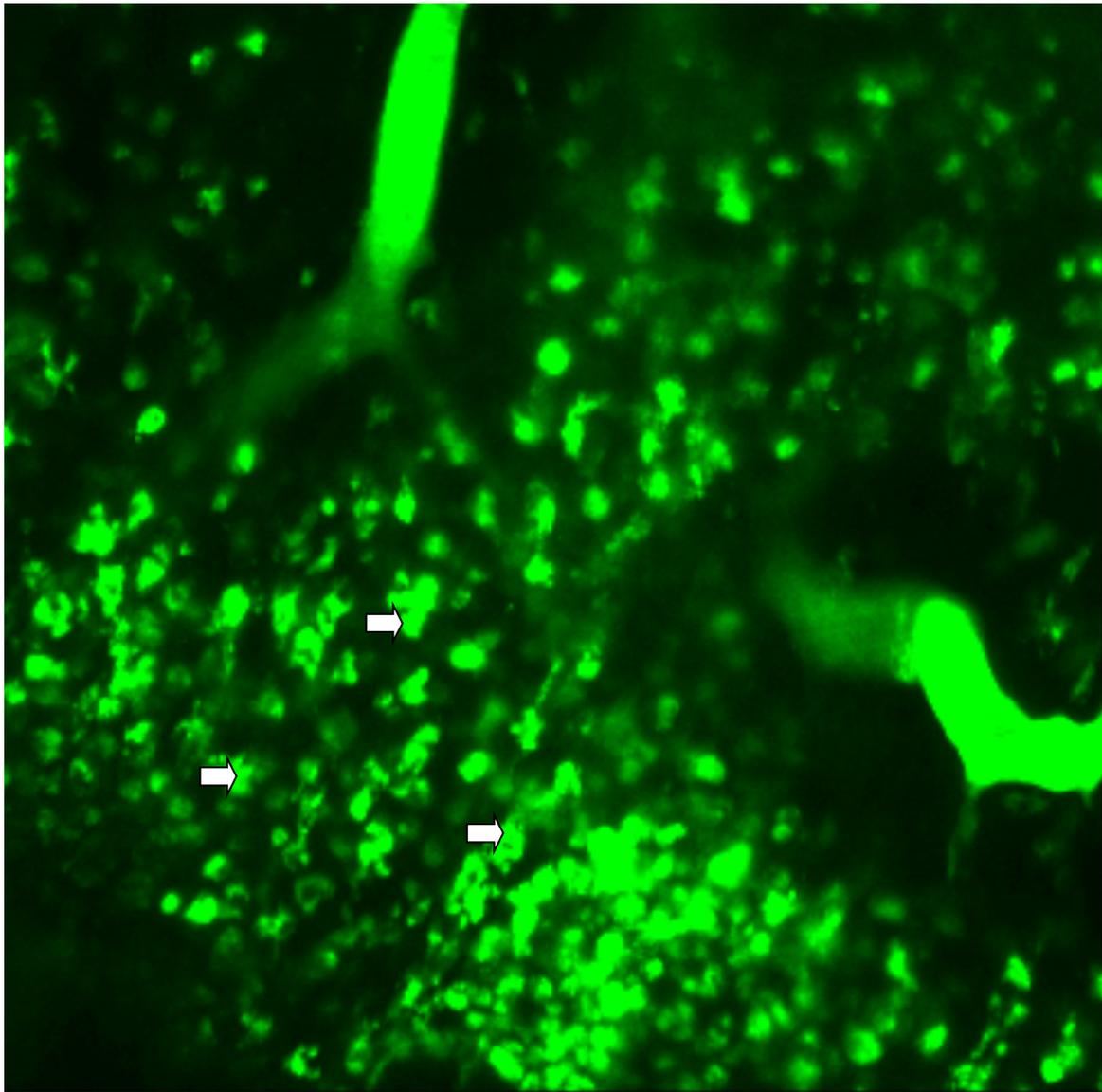


Abbildung 20: Intravital-Konfokale-Laser-Mikroskopie.

Pfeile deuten auf FITC-Dextran Kristalle die sich nach Extravasation von FITC-Dextran gebildet haben. Dies kann als indirektes Zeichen für eine hohe Gefäßpermeabilität gewertet werden.

Diese Ergebnisse stehen in einer Linie mit der Erhöhung der Blutflussrate  $Q$  und der erhöhten Pecam-Desmin-Ratio in der Immunhistochemischen Färbung. Auch durch Erber et al. konnte eine Reduktion der Permeabilität des Tumorgefäßsystems des Glioms beobachtet werden, während z.B. Dimova et al. keinerlei Einfluss von EphB4 auf die Permeabilität in der area vasculosa des Huhn-Embryos sehen konnten (14).

### 4.2.3 EphB4 stabilisiert Tumorwachstum und vermindert Apoptose

Unsere Studie zeigt, dass es unter Überexpression von EphB4 und Therapie mit Sunitinib zu einem konstant bleibenden Tumorwachstum kommt. Die Gruppe der pLXSN-Tumore unter Therapie zeigt im Vergleich dazu ein deutlich vermindertes Größenwachstum. Dabei sind die pLXSN-Tumore unter Therapie mit Sunitinib am Ende des Beobachtungszeitraumes ca. 50% kleiner als die Tumore der anderen Gruppen. Zudem zeigen die immunhistochemischen Untersuchungen, dass es durch EphB4 zu einer verminderten Apoptoserate in den Tumoren kommt. Ein Effekt auf die Proliferation der Tumorzellen können wir nicht nachweisen.

Dass EphB4 zu einer Progression anderer Tumorentitäten führt, wurde schon indirekt von anderen Autoren beschrieben (68, 69). Mehrere Studien in denen lösliche Formen von EphB4-Antikörpern eingesetzt wurden zeigen eine deutliche Verminderung des Tumorwachstums bei Inhibition des EphB4-Signalweges (58, 64) Diese Studien unterstützen unsere Ergebnisse und zeigen einen positiven Effekt von Aktivierung des EphB4-Rezeptors auf das Wachstum der jeweiligen Tumorentität.

Andere Studien zu diesem Thema postulieren Gegenteiliges. Noren et al. z.B. beschrieben 2004, dass Aktivierung des EphB4-Rezeptors über einen löslichen EphrinB2-Liganden zu einer Inhibition des Tumorwachstum führt und im Umkehrschluss Aktivierung von EphrinB2 über einen EphB4-Liganden zu einem verstärkten Tumorwachstum führt (53). Ähnliche Ergebnisse konnten in anderen Untersuchungen und in anderen Tumorentitäten gemacht werden (66, 70).

Es ist zu vermuten, dass der Effekt der Aktivierung von EphB4 immer im Kontext der umgebenden Zellen und der Expression von EphrinB2 gesehen werden muss. So beschreiben Rutkowski et al., dass alleinige Überexpression von EphB4 in Prostata-CA-Zellen (22Rv1) und Brustdrüsenepithel (MCF-10A) ohne bindenden Liganden zu einem verstärkten Wachstum in beiden Zelltypen führt, während es in Gegenwart des löslichen Liganden EphrinB2-Fc trotz Überexpression von EphB4 zu einer Suppression des Wachstums kommt (67)

Der in unserer Studie gesehene antiapoptotische Effekt von EphB4, wird auch durch Ergebnisse anderer Studien gestützt. Kumar et al. zeigten im Modell eines kolorektalen

Karzinoms, dass nach Überexpression von EphB4 eine Reduktion der Apoptoserate zu beobachten ist (68)

Liu et al. konnten eine erhöhte Apoptoserate in Mesotheliomen nach Einsatz von EphB4-Antikörpern sehen (72). Und auch Spannuth et al. sahen durch therapeutischen Einsatz von EphB4-inhibierenden Antikörpern stark erhöhte Apoptose-Raten, sodass im Umkehrschluss eine Überexpression von EphB4 mit einer verminderten Apoptose-Rate einhergehen müsste (73).

Zur Klärung der wachstumsfördernden oder -hemmenden, proliferationsfördernden oder -hemmenden und proapoptischen oder antiapoptischen Effekte von EphB4 werden weitere Untersuchungen nötig sein, um eindeutigere Aussagen treffen zu können. Unsere Studie zeigt, dass es durch EphB4-Überexpression zu einem verstärkten, stabileren Wachstum von Tumorgewebe unter antiangiogener Therapie kommt, wie es auch durch viele andere Studien direkt oder indirekt belegt wurde (58, 64, 68, 73, 88).

In unserer Studie wurde folgender Einfluss auf die „adaptiven Resistenzmechanismen“ unter Therapie mit Sunitinib gesehen: EphB4 führt unter Therapie mit Sunitinib (I.) zu morphologischen Veränderungen des Tumorgefäßsystems, welche durch eine stabilisierte funktionelle und totale Gefäßdichte, einen erhöhten vaskulären Durchmesser, eine verminderte Permeabilität und eine erhöhte Perfusion der Tumorgefäße charakterisiert sind.

Des Weiteren kommt es durch EphB4 (II.) zu einer erhöhten Assoziation mit perivaskulären Zellen, wobei durch nachfolgende Studien zu klären sein wird ob es sich dabei um Perizyten (73), zu Perizyten differenzierte Tumorstammzellen (63), oder andere stabilisierende Zelltypen, beziehungsweise Mechanismen handelt (32).

Außerdem vermittelt EphB4 (III.) die Stabilisierung des Tumorwachstums und eine Verminderung der Apoptoserate (68, 73, 87).

Diese Erkenntnisse zusammengefasst deuten auf einen durch EphB4 vermittelten proangiogenen antiapoptischen Effekt hin, wodurch zum einen Hinweise darauf gegeben sein könnten, dass EphB4 für die, während antiangiogener Therapie gesehenen, Resistenzmechanismen von Bedeutung sein könnte (22). Die Betrachtung

der in der Tumorentität angelegten „intrinsischen Resistenzmechanismen“ ist durch unsere Untersuchungen nicht möglich.

#### **4.2.4 Sind Effekte von EphB4 über Aktivierung von EphrinB2 vermittelt?**

Auf Grund der Tatsache, dass sich diese Arbeit auf die Untersuchung des EphB4-Rezeptors konzentriert, muss und soll an dieser Stelle auch die Rolle von EphrinB2 kurz diskutiert werden. Bekanntermaßen steht die Wirkung von EphB4 immer in engem Zusammenhang mit seinem „Liganden“ EphrinB2 und die Zuordnung der durch EphB4 (bei Aktivierung der assoziierten intrazellulären TKI durch Bindung von EphrinB2 als „forward-signaling“ definiert (13)) beziehungsweise EphrinB2 (bei Aktivierung über binden von EphB4 als „backward-signaling“ (22)) vermittelten Effekte auf Vaskulogenese und Angiogenese ist schwierig (39).

Es deutet vieles darauf hin, dass die in unserer Studie gesehenen Effekte auf Tumorwachstum und Tumovaskulogenese nicht direkt durch die Aktivierung von EphB4, sondern über das „backward-signaling“ und EphrinB2 vermittelt werden. So sind die unseren Ergebnissen entsprechenden Ergebnisse von Erber et al. sowohl unter Überexpression des vollständigen EphB4-Rezeptors, als auch unter Überexpression eines EphB4 Rezeptors ohne TKI-Aktivität, also intrazelluläres „forward-signaling“, gefunden worden (13). Wohlgermerkt wurde die Transfektion nur in mauseigenen Endothelzellen und nicht in den verwendeten humanen Gliomzellen vorgenommen (13). In Untersuchungen von Noren et al. wurden Brustkrebszellen transfiziert welche dann EphB4 Rezeptoren exprimierten, die intrazellulär anstatt mit der TKI-Domäne mit einem EGFP-Molekül verbunden waren. Infolgedessen kam es zu einer verminderten Expression von EphB4 in den Tumorzellen, sodass der fördernde Effekt auf das Tumorwachstum auch dem aktivierten „backward-signaling“ in HUVEC Zellen via EphrinB2 zugesprochen werden muss (HUVEC, humane Endothelzellen) (53).

Andere Studien an MCF-7 Zellen (Mamma-CA) und ebenfalls HUVEC zeigten, dass durch Einsatz von sEphB4 sowohl die Phosphorylierung von EphrinB2 als auch die Phosphorylierung von EphB4 verhindert wird und der antiproliferative Effekt auf einer Inhibition sowohl des „backward-“, als auch „forward-signalings“ beruhen muss (65).

Es werden weitere Studien durchgeführt werden müssen, um die genauen Zusammenhänge des komplizierten Ephrin/Eph-„Signalings“ zu ergründen. Der Einsatz und die Effektivität der gegen EphB4 gerichteten Antikörpern und anderen Therapeutika lässt EphB4 als interessantes Ziel therapeutischer Ansätze bestehen, unabhängig von der Frage ob diese direkt über das „forward-signaling“ des Eph-Rezeptors oder das „backward-signaling“ des EphrinB2-Moleküls vermittelt werden.

## 5. Zusammenfassung

Eph-Rezeptoren und Ephrin-Moleküle bilden die größte Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren und haben große Bedeutung in der Embryogenese, Angiogenese und Tumorigenese. Insbesondere der EphB4-Rezeptor und der EphrinB2-Ligand werden in verschiedenen Tumorentitäten verstärkt exprimiert und scheinen von essentieller Bedeutung für die Entwicklung des Tumorgefäßsystems und das Tumorwachstum zu sein. Der vielversprechende Ansatz der antiangiogenen Therapie hat sich in der Behandlung einiger Tumorentitäten zum Teil als wirksam erwiesen, sei es im Nierenzell-Karzinom oder dem Kolorektalen Karzinom. Die Behandlung anderer Krebserkrankungen gestaltete sich als problematisch und die Ergründung dieser ineffektiven Therapie zu Grunde liegenden Zusammenhänge und eventueller Resistenzmechanismen ist derzeit Ziel vieler experimenteller Studien. Vorhergehende Studien von z.B. Noren et al. oder Erber et al. rücken EphB4 und EphrinB2 in den Mittelpunkt. Auch unsere Studie versucht den Einfluss von EphB4 auf die Tumorangio-genese unter antiangiogener Therapie mit Sunitinib im Gliom-Modell zu untersuchen.

Unsere intravitalmikroskopische Studie zeigt, dass es durch Überexpression von EphB4 in den Endothelzellen von CD1-Nunu-Mäusen zu morphologischen Veränderungen des Tumorgefäßsystems in SF126 kommt und dass diese Veränderung auch oder gerade unter dem Einsatz des Tyrosin-Kinase-Inhibitors Sunitinib zu beobachten sind. So führt die Überexpression von EphB4 zu einem erhöhten mikrovaskulären Durchmesser, einer konstanten funktionellen und totalen Gefäßdichte, einer verminderten Permeabilität der Blutgefäße und einer erhöhten Perfusion des Tumorgewebes. Unsere immunohistochemischen Untersuchungen zeigen eine durch EphB4 vermittelte erhöhte Assoziation des Endothels mit perivaskulären mesenchymalen Zellen, sowie eine verminderte Apoptoserate unter Therapie mit Sunitinib. Des Weiteren führt Überexpression von EphB4 zu einem stabilisierten Tumorwachstum unter Therapie. Einen Effekt auf die Proliferationsraten konnten wir nicht feststellen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass EphB4 einen proangiogenen, antiapoptotischen Einfluss auf das sich entwickelnde mikrovaskuläre System im Gliom hat und beteiligt sein könnte an der Entwicklung von Resistenzmechanismen gegenüber antiangiogenen Therapeutika.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Folkman J (1971). **Tumorangiogenesis: Therapeutic implications.** N Engl J Med 1971 Nov 18; 285(21): 1182-1186.
2. Folkman J (1985). **Angiogenesis and its inhibitors.** Important Adv Oncol. 1985: 42-62.
3. Folkman J (1995). **Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.** Nat.Med. 1995 Jan;1(1):27-31.
4. Folkman J. **Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?** Nat Rev Drug Disc. 2007 Apr;6(4):273-86.
5. Vajkoczy P, Ullrich A, Menger MD (2000). **Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation.** Neoplasia 2000 Jan-Apr;(1-2):53-61.
6. Vajkoczy P, Schilling L, Ullrich A, Schmiedek P, Menger MD 1998. **Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifluorescence microscopic approach in the athymic nude mouse.** J Cereb Blood Flow Metab. 1998 May;18(5):510-20.
7. Vajkoczy P et al. (1999). **Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy.** Neoplasia 1999 Apr;1(1):31-41.
8. Vajkoczy P, Menger MD, Simpson E, Messmer K (1995). **Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts.** Transplantation. 1995 Jul 27;60(2):123-7.
9. Lunt SJ, Gray C, Reyes-Aldaroso CC, Matcher SJ, Tozer GM. **Application of intravital microscopy in studies of tumor microcirculation.** J Biomed Opt. 2010 Jan-Feb;15(1):011113.
10. Fukumura D, Duda DG, Munn LL, Jain RK (2010). **Tumor Microvasculature and Microenvironment: Novel insights through Intravital Imaging in Pre-Clinical Models.** Microcirculation 2010 Apr;17(3):206-25.
11. Czabanka M, Parmaksiz GM, Bayerl SH, Nieminen M, Trachsel E, Menssen HD, Erber R, Neri D, Vajkoczy P (2011). **Microvascular biodistribution of L19-SIP in angiogenesis targeting strategies.** Eur J Cancer. 2011 May; 47(8):1276-84. Epub 2011 Mar 9.
12. Czabanka M, Bruenner J, Parmaksiz G, Broggin T, Topalovic M, Bayerl SH, Auf G, Kremenetskaia I, Nieminen M, Jabouille A, Mueller S, Harms U, Harms C, Koch A, Heppner FL, Vajkoczy P (2013). **Combined temozolomide and sunitinib treatment leads to better tumor control but increased vascular resistance in O6-**

- methylguanine methyltransferase-methylated gliomas.** Eur J Cancer. 2013 Mar 14. Epub ahead of print.
13. Erber R, Eichelsbacher U, Powajbo V, Korn T, Djonov V, Lin J, Hammes HP, Grobholz R, Ullrich A, Vajkoczy P (2006). **EphB4 controls blood vascular morphogenesis during postnatal angiogenesis.** EMBO J. 2006 Feb 8;25(3):628-41. Epub 2006 Jan 19.
  14. Erber R, Turnher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes HP, Menger MD, Ullrich A, Vajkoczy P (2004). **Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms.** FASEB J. 2004 Feb;18(2):338-40. Epub 2003 Dec 4.
  15. Pearson RM (1986). **In-vitro techniques: can they replace animal testing?** Hum Reprod. 1986 Dec;1(8):559-60
  16. Connors T (1996). **Anticancer drug development: The way forward.** Oncologist. 1996;1(3):180-81
  17. Kehinde EO (2013). **They see a rat, we seek a cure for diseases: The current status of animal experimentation in medical practice.** Med Princ Pract. 2013 Nov 8:52-61.
  18. Giles J (2006). **Animal experiments under fire for poor design.** Nature 2006; 444:981
  19. Laschke MW, Vollmar B, Menger MD (2011). **The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue.** Eur Cell Mater. 2011 Sep 20;22:147-64
  20. O'Farrel AM, Abrams TJ, Yuen HA, Ngai TJ, Louie SG, Yee KW, Wong LM, Hong W, Lee LB, Town A, Smolich BD, Manning WC, Murray LJ, Heinrich MC, Cherrington JM (2003). **SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo.** Blood. 2003 May 1;101(9):3597-605.
  21. Motzer RJ, Hutson TE, tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA (2007). **Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma.** N Engl J Med. 2007 Jan 11;356(2):115-24.
  22. Bergers G, Hanahan D (2008). **Modes of resistance to anti-angiogenic therapy.** Nat Rev Cancer. 2008 Aug;8(8):592-603.
  23. Feng Y, Chai J, Chu W, Ma L, Zhang P, Duan H (2013). **Combination of ketamine and xylazine exacerbates cardiac dysfunction in severely scalded rats during the shock stage.** Exp Ther Med. 2013 Sep;6(3):641-648.
  24. Wen PY, Marks PW (2002). **Medical management of patients with brain tumors.** Curr Opin Oncol. 2002 May;14(3):299-307.
  25. Plate KH, Risau W (1995). **Angiogenesis in malignant gliomas.** Glia. 1995 Nov;15(3):339-47

26. Coomber BL, Stewart PA, Hayakawa EM, Farrell CL, Del Maestro RF (1988). **A quantitative assessment of microvessel ultrastructure in C6 astrocytoma spheroids transplanted to brain and to muscle.** J Neuropathol Exp Neurol 47: 29-40.
27. Kato T, Tsuchida T, Kawamoto K (2005). **Blood tumor permeability of experimental brain tumor: an electron microscopic study using lanthanum.** Neuropathology. 2005 Mar;25(1):21-6.
28. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A (1994). **Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant.** Nature. 1994 Feb 10;367(6463):576-9.
29. Palù G, Parolin C, Takeuchi Y, Pizzato M (2000). **Progress with retroviral gene vectors.** Rev Med Virol. 2000 My-Jun;10(3):185-202.
30. Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO (1993). **Integration of murine leukaemia virus DNA depends on mitosis.** Embo J 1993; 12: 2099-2108.
31. Seamon JA, Jones KS, Miller C, Roth MJ (2002). **Inserting a nuclear targeting signal into a replication-competent Moloney murine leukaemia virus affects viral export and is not sufficient for cell cycle-independent infection.** J Virol. 2002 Aug; 76(16):8475-84.
32. Cameliè P, Jain RK (2011). **Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis.** Nature. 2011 May 19;473(7347):298-307.
33. Schaper W (2009). **Collateral circulation: past and present.** Basic Res Cardiol. 2009 Jan;104(1): 5-21.
34. Demetri GD, van Oosterom AT, Gerrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, MacArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA, Desai J, Fletcher CD, George S, Bello CL, Huang X, Baum CM, Casali PG (2006). **Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumor after failure of imatinib: a randomised controlled trial.** Lancet. 2006 Oct 14; 368(9544):1329-38.
35. Swift MR, Weinstein BM (2009). **Arterial-venous specification during development.** Circ. Res. 2009, 104, 576-588
36. Vasudev NS, Reynolds AR (2014). **Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions.** Angiogenesis, Jan 2014
37. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V (2010). **Glioblastoma stem-like cells give rise to tumor endothelium.** Nature. 2010 Dec; 468(7325): 829-33.
38. Herbert SP et al., (2009). **Arterial-venous segregation by selective cell sprouting: an alternative mode of blood vessel formation.** Science 326, 294-298 (2009)
39. Mosch B, Reissenweber B, Neuber C, Pietzsch J (2010). **Eph receptors and ephrin ligands: important players in angiogenesis and tumor angiogenesis.** J Oncol. Mar 10, 2010: 135285

40. Pasquale EB. **Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease.** Cell 133, 38–52 (2008)
41. Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, Wilkinson GA, Pitulescu ME, Acker T, Acker-Palmer A (2010). **Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumor angiogenesis.** Nature. 27 May 2010; 465(7297):487-491.
42. Brantley-Sieders DM, Chen J (2004). **Eph receptor tyrosine kinases in angiogenesis: from development to disease.** Angiogenesis. 2004; 7(1): 17-28.
43. Kim YH, Hu H, Guevara-Gallardo S, Lam MT, Fong SY, Wang RA (2008). **Artery and vein size is balanced by Notch and ephrin B2/EphB4 during angiogenesis.** Development. 2008 Nov; 135(22):3755-64.
44. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ (1998). **Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4.** Cell. 1998 May 29;93(5):741-53.
45. Crown JP et al. (2013). **Phase III trial of Sunitinib in combination with capecitabine versus capecitabine monotherapy for the treatment of patients with pretreated metastatic breast cancer.** J Clin Oncol. 2013 Aug 10;31(23): 2870-8.
46. Bergh J et al. (2012). **First-line treatment of advanced breast cancer with sunitinib in combination with docetaxel versus docetaxel alone: results of a prospective, randomized phase III study.** J Clin Oncol. 2012 Mar 20;30(9):921-9.
47. Piao Y et al. (2012). **Glioblastoma resistance to anti-VEGF therapy is associated with myeloid cell infiltration, stem cell accumulation, and a mesenchymal phenotype.** Neuro Oncol. 2012 Nov;14(11):1379-92.
48. Neyns B et al. (2011). **Phase II study of sunitinib malate in patients with recurrent high-grade glioma.** J Neurooncol. 2011; 103:491-501
49. Parmaksiz G et al. (2014). **Antiangiogenic Therapy Inhibits the Recruitment of Vascular Accessory Cells to the Perivascular Niche in Glioma Angiogenesis.** J Vasc Res.2014 Feb 19;51 (2):102-109.
50. Weisshardt P et al. (2012). **Tumor vessel stabilization and remodeling by anti-angiogenic therapy with bevacizumab.** Histochem Cell Biol. 2012 Mar; 137(3):391-401.
51. Helfrich I et al. (2010). **Resistance to antiangiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation in malignant melanoma.** J Exp Med. Mar 15, 2010; 207(3): 491-503.
52. Bergers G et al. (1999). **Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice.** Science. 1999 Apr 30;284(5415):808-12.
53. Noren NK, Lu M, Freeman AL, Koolpe M, Pasquale EB (2004). **Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr 13;101(15): 55583-8.

54. Bampi VF et al. (2014). **The effect of the anti-angiogenic drug sunitinib malate on the vascular architecture of oral squamous cell carcinoma.** *Microsc Res Tech.* 2014 Apr;77(4):250-6.
55. Jain RK (2001). **Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy.** *Nat Med* 2001 Sep; 7(9):987-9.
56. Jain RK (2005). **Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy.** *Science* 2005 Jan 7;307(5706):58-62.
57. Martiny-Baron G et al. (2004). **Inhibition of tumor growth and angiogenesis by soluble EphB4.** *Neoplasia.* 2004 My-Jun;6(3):248-57.
58. Djokovic D et al. (2010). **Combination of Dll4/Notch and EphrinB2/EpB4 targeted therapy is highly effective in disrupting tumor angiogenesis.** *BMC Cancer.* 2010 Nov 23;10:641.
59. Scehnet JS et al. (2009). **The role of Ephs, Ephrins, and growth factors in Kaposi sarcoma and implications of EphrinB2 blockade.** *Blood.* 2009 Jan 1;113(1):254-63.
60. Baum O et al. (2010). **VEGF-A promotes intussusceptive angiogenesis in the developing chicken chorioallantoic membrane.** *Microcirculation* 2010 Aug;17(6):447-57.
61. Wesseling P, Schlingemann RO, Rietveld FJ, Link M, Burger PC, Ruiter DJ. (1995) **Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immunolight and immuno-electron microscopic study.** *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54, 304–310.
62. Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C (2001) **Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis.** *J. Cell Biol.* 153, 543–553.
63. Cheng et al. (2013). **Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth.** *Cell* 2013 Mar 28;153(1):139-52.
64. Kimura et al. (2009). **Soluble form of ephrinB2 inhibits xenograft growth of squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Int J Ocol.* 2009 Feb;34(2):321-7.
65. Kertesz N, Krasnoperov V, Reddy R, et al. (2006). **The soluble extracellular domain of EphB4 (sEphB4) antagonizes EphB4-EphrinB2 interaction, modulates angiogenesis, and inhibits tumor growth.** *Blood.* 2006;107:2330–2338.
66. Barneh F et al. (2013). **EphB4 tyrosine kinase stimulation inhibits growth of MDA-MB-231 breast cancer cells in a dose and time dependent manner.** *Dis Markers* 2013;35(6):933-8.
67. Rutkowski et al. (2012). **Evidence for a dual function of EphB4 as tumor promoter and suppressor regulated by the absence or presence of the ephrin-B2 ligand.** *Int J Cancer.* 2012 Sep 1;131(5):E614-24.
68. Kumar SR, Singh J, Xia G, et al. (2006) **Receptor tyrosine kinase EphB4 is a survival factor in breast cancer.** *American Journal of Pathology.* 2006;169(1):279–293.

69. Masood R, Ram Kumar S, Sinha UK, et al. **EphB4 provides survival advantage to squamous cell carcinoma of the head and neck.** International Journal of Cancer. 2006;119(6):1236–1248.
70. Dopeso et al.. **The receptor tyrosine kinase EPHB4 has tumor suppressor activities in intestinal tumorigenesis.** Cancer Res. 2009 Sep 15;69(18):7430-8.
71. Xia G, Kumar SR, Masood R, et al. **EphB4 Expression and Biological Significance in Prostate Cancer.** Cancer Res. 2005;65:4623-4632.
72. Liu R, Ferguson BD et al.. **EphB4 as a therapeutic target in mesothelioma.** BMC Cancer 2013 May 30;13:269.
73. Spannuth Wa et al.. **Converging evidence for efficacy from parallel EphB4-targeted approaches in ovarian carcinoma.** 2010 Mol Cancer Ther. Aug;9(8):2377-88.
74. Bergers G et al. **Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors.** J Clin Invest. 2003 May;111(9):1287-95.
75. Kumar SR et al.. **Preferential induction of EphB4 over EphB2 and its implication in colorectal cancer progression.** Cancer Res. 2009 May 1;69(9):3736-45.
76. Nisancioglu, MH, Betsholtz C, Genove, G. **The absence of pericytes does not increase the sensitivity of tumor vasculature to vascular endothelial growth factor-A blockade.** Cancer Res.70,109–5115 (2010)
77. Falcon BL et al.. **Contrasting actions of selective inhibitors of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 on the normalization of tumor blood vessels.** Am. J. Pathol. 175, 2159–2170 (2009).
78. Koh, YJ et al.. **Double antiangiogenic protein, DAAP, targeting VEGF-A and angiopoietins in tumor angiogenesis, metastasis, and vascular leakage.** Cancer Cell 18, 171–184 (2010).
79. Jain, R. K., Duda, D. G., Clark, J. W. & Loeffler, J. S. **Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer.** Nature Clin. Pract. Oncol. 3, 24–40 (2006).
80. Ferrara, N. **VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth.** Eur. Cytokine Netw. 20, 158–163 (2009).
81. Pardali, E., Goumans, M. J. & ten Dijke, P. **Signaling by members of the TGF- $\beta$  family in vascular morphogenesis and disease.** Trends Cell Biol. 20, 556–567 (2010).
82. Beenken, A. & Mohammadi, M. **The FGF family: biology, pathophysiology and therapy.** Nature Rev. Drug Discov. 8, 235–253 (2009).
83. Augustin, H. G., Koh, G. Y., Thurston, G. & Alitalo, K. **Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system.** Nature Rev. Mol. Cell Biol. 10, 165–177 (2009).
84. De Palma, M.et al. **Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors.** Cancer Cell 8, 211–226 (2005).

85. Jain, R. K. et al. **Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy.** *Nature Rev. Clin. Oncol.* 6, 327–338 (2009).
86. Carmeliet, P. **Angiogenesis in life, disease and medicine.** *Nature* 438, 932–936 (2005).
87. Liu JL et al.. **DLL4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo.** *Cancer Res.* 2011 Sep 15;71(18):6073-83.
88. Ferguson BD et al. **The EphB4 receptor tyrosine kinase promotes lung cancer growth: a potential novel therapeutic target.** *PLoS One.* 2013 Jul 2;8(7):e67668.
89. Chen T et al. **EphB4 is overexpressed in gliomas and promotes the growth of glioma cells.** *Tumour Biol.* 2013 Feb;34(1):379-85.
90. Hasina R et al. **Critical role for the receptor tyrosine kinase EPHB4 in esophageal cancers.** *Cancer Res.* 2013 Jan 1;73(1):184-94.
91. Li M. Zhao Z. **Clinical implications of EphB4 receptor expression in pancreatic cancer.** *Mol Biol Rep.* 2013 Feb;40(2):1735-41.
92. You J et al.. **Effective photothermal chemotherapy using doxorubicin-loaded gold nanospheres that target EphB4 receptors in tumors.** *Cancer Res.* 2012 Sep 15;72(18):4777-86.
93. Tu Y et al.. **Expression of EphrinB2 and EphB4 in glioma tissues correlated to the progression of glioma and the prognosis of glioblastoma patients.** *Clin Transl Oncol.* 2012 Mar;14(3):214-20.
94. Kertesz N, Krasnoperov V, Reddy R, et al. **The soluble extracellular domain of EphB4 (sEphB4) antagonizes EphB4-EphrinB2 interaction, modulates angiogenesis, and inhibits tumor growth.** *Blood.* 2006;107(6):2330–2338.
95. Koolpe et al.. **EphB receptor-binding peptides identified by phage display enable design of an antagonist with ephrin-like affinity.** *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):17301-11.
96. Bardelle C, Cross D, Davenport S, et al. **Inhibitors of the tyrosine kinase EphB4. Part 1: structure-based design and optimization of a series of 2,4-bis-anilinopyrimidines.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.* 2008;18(9):2776–2780.
97. Bardelle C, Coleman T, Cross D, et al. **Inhibitors of the tyrosine kinase EphB4. Part 2: structure-based discovery and optimisation of 3,5-bis substituted anilinopyrimidines.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.* 2008;18(21):5717–5721.
98. Noren NK, Pasquale EB. **Paradoxes of the EphB4 receptor in cancer.** *Cancer Res.* 2007;67:3994-7.
99. Noren NK, Foos G, Hauser CA, Pasquale EB. **The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway.** *Nat Cell Biol.* 2006 Aug;8(8):815-25.

100. Kelly-Goss MR1, Sweat RS, Stapor PC, Peirce SM, Murfee WL. **Targeting Pericytes for Angiogenic Therapies.** *Microcirculation.* 2013 Nov 23.
101. Edelman DA, Jiang Y, Tyburski J, Wilson RF, Steffes C. **Pericytes and their role in microvasculature homeostasis.** *J Surg Res.* 2006. 135(2): 305-311.
102. Eberth CJ. **Handbuch der Lehre von den Gewebwn des Menschen und der Tiere** (ed. S. Stricker), 1871, Bd.1, Leipzig.
103. Rouget C. **Mémoire sur le développement, la structure et les propriétés physiologiques des capillaires sanguins et lymphatiques.** *Arch. Physiol. Normale Pathol.* 1873. 5. 603-661.
104. Rouget C. **Sur la contractilité capillaires sanguins.** *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris,* 1879, 88: 916-918. English translation in: David Keilin (1887-1963): *The history of cell respiration and cytochrome*, edited by Loan Keilin. Cambridge, Cambridge University Press, 1966.
105. Bensley RR, Vimtrup BJ. **On the nature of Rouget cells of capillaries.** *Anat. Rec.* 1928, 39, 37-55.
106. Sims DE. **The pericyte—a review.** *Tissue Cell.* 1986;18(2):153-74.
107. Zimmermann K. **Die feinere Bau der Blutcapillaren.** *Z. Anat. Entwickl.* 1923, 68, 29-109.
108. Andreeva ER, Pugach IM, Gordon D, Orekhov AN. **Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed.** *Tissue Cell* 30(1): 127- 135, 1998.
109. Gerhardt H, Betsholtz C. **Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis.** *Cell Tissue Res* 314(1):15-23, 2003.
110. Mandarino LJ, Sundarraj N, Finlayson J, Hassell JR. **Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro.** *Exp Eye Res* 1993;57:609-21.
111. Leveen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C. **Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities.** *Genes Dev.* 1994. 8(16): 1875-1887.
112. Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE. **Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation.** *Blood* 114(24): 5091-5101, 2009.
113. Allt G, Lawrenson JG. **Pericytes: Cell biology and pathology.** *Cells Tissues Organs* 2001;169:1.
114. Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C. **Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis.** *J Cell Biol* 153(3): 543-553, 2001.
115. Hirschi KK, D'Amore PA. **Pericytes in the microvasculature.** *Cardiovasc Res* 32(4): 687-698, 1996.

116. Hirschi KK, Rohovsky SA, Beck LH, Smith SR, D'Amore PA. **Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact.** *Circ Res.* 1999, 84(3): 298-305.
117. Clark,ER, Clark EL. **Microscopic observations on the extra-endothelial cells of living mammalian blood vessels.** *Am J Anat.* 1940, 66, 39-49.
118. Stensaas LJ. **Pericytes and perivascular microglial cells in the basal forebrain of the neonatal rabbit.** *Cell Tiss Res.* 1975. 158, 517-541.
119. Bergers G, Song S. **The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance.** *Neuro Oncol* 7(4): 452-464, 2005.
120. Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. **Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes.** *Nature* 443(7112): 700-704, 2006.
121. Franco M, Roswall P, Cortez E, Hanahan D, Pietras K. **Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression.** *Blood.* 2011. 118(10): 2906-2917.
122. Rucker HK, Howard J Wynder, Thomas EW. **Cellular mechanisms of CNS pericytes.** *Brain Res Bull.* 2000;51:363-369.
123. Cleaver O, Melton DA. **Endothelial signaling during development.** *Nat Med.* 2003;9:661-668.
124. Song S et al. **PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumors regulate pericyte differentiation and vascular survival.** *Nat Cell Biol.* Sep;7(9):870-9. Epub.2005.
125. Darland DC, Massingham LJ, Smith SR, Piek E, Saint-Geniez M, D'Amore PA. **Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival.** *Dev Biol.* Dec 1;264(1):275-88. 2003.
126. Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Sennino B, Nakahara T, Yao VJ, Inai T, Brooks P, Freimark B, Shalinsky DR, Hu-Lowe DD, McDonald DM. **Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition.** *J Clin Invest.* 2006 Oct;116(10):2610-21.
127. Butler JM, Kobayashi H, Rafii S. **Instructive role of the vascular niche in promoting tumor growth and tissue repair by angiocrine factors.** *Nat Rev Cancer.* 2010 Feb;10(2):138-46.
128. Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F. **A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene.** *Science.* 1987 Dec 18;238(4834):1717-20.
129. Holder N, Klein R. **Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. Development.** 1999 May;126(10):2033-44.
130. Surawska H, Ma PC, Salgia R. **The role of ephrins and Eph receptors in cancer.** *Cytoline Growth Factor Rev.* 2004 Dec; 15(6):419-33.
131. Brantley-Sieders D, Schmidt S, Parker M, Chen J. **Eph receptor tyrosine kinases in tumor and tumor microenvironment.** *Curr Pharm Des.* 2004;10(27):3431-42.

132. Zhou R. **The Eph family receptors and ligands.** Pharmacol Ther. 1998 Mar;77(3):151-81
133. Eph Nomenclature Committee. **Unified nomenclature for Eph receptors and their ligands, the ephrins.** Cell, **90 (1997), pp. 403-404.**
134. Himanen et al.. **Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling.** Nat Neurosci. 2004 May;7(5):501-9.
135. Pasquale EB. **Eph-ephrin promiscuity is now crystal clear.** Nat Neurosci. 2004 May;7(5):417-8.
136. Stein E, Lane AA, Cerretti DP, Schoecklmann HO, Schroff AD, Van Etten RL, Daniel TO. **Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses.** Genes Dev. 1998 Mar 1;12(5):667-78.
137. Holland SJ et al.. **Bidirectional signaling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands.** Nature. 1996 Oct 24;383(6602):722-5.
138. Arvanitis D, Davy A. **Eph/ephrin signaling: networks.** Genes Dev. 2008 Feb 15;22(4):416-29.
139. Binns KL, Taylor PP, Sicheri F, Pawson T, Holland SJ. **Phosphorylation of tyrosine residues in the kinase domain and juxtamembrane region regulates the biological and catalytic activities of Eph receptors.** Mol Cell Biol. 2000 Jul;20(13):4791-805.
140. Oike et al.. **Regulation of vasculogenesis and angiogenesis by EphB/ephrin-B2 signaling between endothelial cells and surrounding mesenchymal cells.** Blood. 2002 Aug 15;100(4):1326-33.
141. Kim YH et al.. **Artery and vein size is balanced by Notch and ephrin-B2/EphB4 during angiogenesis.** Development. Nov 2008; 135(22): 3755-3764.
142. Chen J, Zhuang G, Frieden L, Debski W. **Eph receptors and Ephrins in cancer: common themes and controversies.** Cancer Res. 2008 Dec 15;68(24): 10031-3.
143. Foo SS et al.. **Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly.** Cell. 2006 Jan 13; 124(1): 161-73.
144. Salvucci O. et al.. **EphrinB reverse signaling contributes to endothelial and mural cell assembly into vascular structures.** Blood. 2009. Aug 20; 114(8): 1707-1716.
145. Vihanto MM et al.. **Hypoxia up-regulates expression of Eph receptors and ephrins in mouse skin.** FASEB J. 2005 Oct;19(12):1689-91.
146. Adams RH et al.. **Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis.** Genes Dev. 1999 Feb 1;13(3):295-306.
147. Dodelet VC, Pasquale EB. **Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis.** Oncogene. 2000 Nov 20;19(49):5614-9.
148. Kerbel RS. **Therapeutic implications of intrinsic or induced angiogenic growth factor redundancy in tumors revealed.** Cancer Cell. 2005 Oct;8(4):269-71

149. Kadenhe-Chiweshe A, et al. **Sustained VEGF blockade results in microenvironmental sequestration of VEGF by tumors and persistent VEGF receptor-2 activation.** Mol. Cancer Res. 2008;6:1–9.
150. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. **Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors.** Cancer Cell. 2005;8:299–309.
151. Du D et al. **HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion.** Cancer Cell. 2008 Mar;13(3):206-20.
152. Yu JL. **Heterogenous vascular dependence of tumor cell populations.** Am J Pathol. 2001 Apr;158(4):1325-34.
153. Hurwitz HI. **Efficacy and safety of bevacizumab in metastatic colorectal cancer: pooled analysis from seven randomized controlled trials.** Oncologist. 2013;18(9):1004-12.
154. Czabanka et al. **Effects of sunitinib on tumor hemodynamics and delivery of chemotherapy.** Int J Cancer. 2009 Mar 15;124(6):1293-300.

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

22Rv1 -Zellen	Zelllinie des Humanen Prostata-Zell-Karzinoms
$\alpha$ -SMA	alpha-smooth-muscel-actin
ANG-1	Angiopoetin-1
ANG-2	Angiopoetin-2
CA	Karzinom
CCD	Charged-coupled Device
CD1	Cluster of differentiation 1
CD31	Cluster of differentiation 31
CD34	Cluster of differentiation 34
c-kit (SCFR)	Stem cell growth factor receptor
Crk (p38)	Protoonkogen
D	Gefäßdurchmesser
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribunucleic acid
Dll4	Delta like ligand 4
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Efna1	Ephrin A1 Gen
Efna2	Ephrin A2 Gen
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EPC	Endothelial Progenitor Cells
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration, USA
FLT3 (CD135)	Fms-like tyrosine kinase 3
FGF1	Fibroblast Growth Factor 1
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
FITC-Dextran	Fluorescein-5-isothiocyanate-Dextran
Flk-1 (KDR, CD309)	Fetal Liver Kinase 1
FVD	Functional Vessel Density
Fyn	Tyrosinkinase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-Inducible-Factor-1-alpha

HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IFVM	Intravital-Fluorescent-Video-Microscopy
JAGGED1	Ligand for NOTCH-1-Rezeptor
K	Baker-Wyland-Faktor
KDR (Flk-1, CD309)	Kinase insert Domain Receptor
KG	Körpergewicht
Ki67	Antigen Kiel-67
kD	kilo Dalton
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 Zelllinie
MCF-10A	Michigan Cancer Foundation-10A Zelllinie
MoMuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MTP1-MMP	Type-I transmembrane Metalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid
NMRI-nu/-nu	Mausstamm
NRP1	Neuropilin-1 Gen
OFDI	Optical Frequency Domain Imaging
OS	Overall Survival
P	Permeabilitätsindex
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF-beta	Platelet-Derived Growth Factor-beta
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PDZ-Domäne	PSD95/SAP90, Disc large, Zonular occludentes-1-Domäne
PFA	Perfluoralkoxylalkan
PFS	Progression Free Survival
PGC-1 $\alpha$	Peroxisome receptor Gamma Coactivator 1-alpha
PI	Perfusionindex
Q <sub>v</sub>	Blutfluss
Ras	Rat Sarcoma Protoonkogen
RBCV	Red Blood Cell Velocity
ROI	Region Of Interest
SDF1- $\alpha$ (CXCL12)	Stromal cell-Derived-Factor 1-alpha
c-Src	„cellular-Sarcoma“ Tyrosinkinase
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor-beta
Tie2	Tyrosine-Kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2
TK	Tyrosine-Kinase
TKI	Tyrosin-Kinase-Inhibitor

TVD	Total Vessel Density
VEGF-A,B,C	Vascular Endothelial Growth Factor-A,B,C
VE-cadherin	Vascular Endothelial-cadherin
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
vSMC	vascular Smooth Muscle Cell

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	CD1 nu/nu Nacktmaus mit präparierter Rückenhautkammer
Abbildung 2:	Arbeitsplatz Intravitalfluoreszenz-Mikroskopie
Abbildung 3:	Intravitalfluoreszenz-Mikroskopie, ausgewählte Bilder
Abbildung 4:	Die Veränderung des Gefäßdurchmessers über die Zeit
Abbildung 5:	Die Veränderung der TVD über die Zeit
Abbildung 6:	Die Veränderung der FVD über die Zeit
Abbildung 7:	Die Veränderung der Permeabilitätsindices über die Zeit
Abbildung 8:	Die Veränderung der Perfusionsindices über die Zeit
Abbildung 9:	Die Veränderung des volumetrischen Blutflusses $Q_v$ über die Zeit
Abbildung 10:	Immunhistochemie, CD31/Desmin, ausgewählte Bilder
Abbildung 11:	Immunhistochemie, CD31/Desmin, Diagramm
Abbildung 12:	Immunhistochemie, Ki67/DAPI, ausgewählte Bilder
Abbildung 13:	Immunhistochemie, Ki67/DAPI, Diagramm
Abbildung 14:	Immunhistochemie, CD31/Ki67, ausgewählte Bilder
Abbildung 15:	Immunhistochemie, CD31/Ki67, Diagramm
Abbildung 16:	Immunhistochemie, Caspase 3, ausgewählte Bilder
Abbildung 17:	Immunhistochemie, Caspase 3, Diagramm
Abbildung 18:	Intravitale-Konfokal-Laser-Mikroskopie Therapiegruppen, Beispielbilder
Abbildung 19:	Volumen der subkutanen Xenografts über die Zeit
Abbildung 20:	Intravitale-Konfokale-Laser-Mikroskopie, FITC-Kristalle

## 8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Moritz Markel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Der „Einfluss von Eph B4 auf die Vermittlung vaskulärer Resistenz im Rahmen einer antiangiogenen Therapie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **9. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **10. Danksagungen**

Zuallererst möchte ich mich bei PD Dr. med. Marcus Czabanka für seine unglaublich lehrreiche und herzliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. med. Peter Vajkoczy, dass ich diese Dissertation in seiner angesehenen Abteilung anfertigen durfte.

Gerne erinnere ich mich an die freundliche Unterstützung von Seiten aller Beschäftigten im „Aschheim-Zondek“-Haus („Aschheim-Zonken“) zurück, die einem die Durchführung der Versuche so angenehm begleitet haben. Ich habe in der Zeit dort auch sehr viel für meinen weiteren Arbeitsweg gelernt und möchte hiermit nochmals „Danke“ sagen.

Außerdem danke ich all meinen Berliner Freunden (Arthur, Jorien, Grete, Seb, Fabian, Robert, Malte, Olli, Sören, Laura, Ronja, Marie, Valentin, Karo und Galli, Christoph und denen, die ich jetzt evtl. vergessen haben mag.) die mich alle in dieser Zeit begleitet haben.

Und natürlich danke ich nicht zuletzt meinen Eltern und meinen Brüdern für die immer währende Unterstützung.

