

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von Apelin-Signalwegen in der Angiogenese von
Gliomen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Frisch, geb. Jarczewski,

aus Oranienburg

Datum der Promotion: 17.09.2021

Für meine Großväter

„Alles sollte so einfach wie möglich gemacht werden,
aber nicht einfacher.“

Albert Einstein (1879 – 1955)

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in: Frisch, A., Kälin, S., Monk, R., Radke, J., Heppner, F.L. & Kälin, R.E. Apelin Controls Angiogenesis-Dependent Glioblastoma Growth. *International journal of molecular sciences* **21**, 4179 (2020).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Formelverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	6
Kurzfassung	8
Abstract	10
1 Überblick	11
1.1 Angiogenese und Antiangiogenese	12
1.1.1 Morphologischer Aufbau von Blutkapillaren.....	13
1.1.2 Gefäßneubildung und -reifung.....	14
1.1.3 Molekulare Regulation der Angiogenese	16
1.1.3.1 Proangiogene Faktoren	16
1.1.3.2 Antiangiogene Faktoren.....	17
1.1.3.3 Der angiogene Switch.....	18
1.2 Angiogenese bei malignen Tumorerkrankungen	18
1.2.1 Hypoxie-induzierte Angiogenese in Tumorgewebe.....	19
1.2.2 Die Morphologie und Funktion von Tumorgefäßen.....	20
1.2.3 Antiangiogene Therapieansätze bei malignen Tumorerkrankungen	21
1.3 APLNR und sein Ligand Apelin.....	23
1.3.1 (Patho)physiologische Funktionen des apelinergen Systems	24
1.3.2 Apelin als potenter Aktivator der Tumoriangiogenese.....	25
1.4 Gliome und Glioblastome	26
1.4.1 Phänotypische Charakteristika maligner Gliome	27
1.4.2 Tumoriangiogenese in Glioblastoma multiforme.....	28
1.4.3 Therapeutische Strategien zur Behandlung maligner Gliome	29
1.5 In dieser Arbeit verwendete Maus- und Xenograftmodelle.....	31
1.5.1 Immundefiziente Mausmodelle	31
1.5.2 Murine Knock-out-Modelle von Apelin und APLNR.....	32
1.5.3 Das U-87-Xenograftmodell des malignen Glioms	33
2 Ziele	35

3	Material und Methoden.....	37
3.1	Versuchsaufbau und Studienprotokoll	37
3.2	Versuchstierhaltung und -demografie	41
3.3	Perfusion, Fixierung und Sektion der Mäusehirne	41
3.4	Anfertigung von zerebralen Gefrierschnitten	42
3.5	Histologische Färbemethoden.....	44
3.5.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	44
3.5.2	Eisenfärbung.....	45
3.6	Immunhistochemische Färbemethoden	45
3.6.1	Gefäßfärbungen (IB4, CD31)	46
3.6.2	Färbung der Perizyten (Desmin).....	47
3.7	Kernspintomographische Aufnahmen der murinen Hirne	48
3.8	Stereologische Analyse	48
3.8.1	Die Cavalieri-Methode	49
3.8.2	Die Space-Ball-Methode	50
3.9	Bildanalytische Auswertung der Gefäße und Perizyten	53
3.10	Semiquantitative Analyse zur Blutungs- und Nekroseneigung	55
3.10.1	Analyse der Blutungsneigung.....	55
3.10.2	Analyse der Nekroseneigung.....	57
3.11	Statistische Analyse	58
3.12	Fotographien und digitale Grafikprogramme	59
4	Ergebnisse.....	60
4.1	Der durch Apelinvorkommen in Tumor und Wirt bedingte Effekt auf die Vaskularisierung in U-87-Xenografts.....	60
4.2	Die spezifische Wirkung des Apelin-13 auf die Gefäßdichte im neu gebildeten Tumorgefäßnetz von U-87-Xenografts.....	65
4.3	Hemmung des von der Angiogenese abhängige Tumorstwachstums in U-87-Xenografts bei Verlust der Apelinexpression.....	66
4.3.1	Analyse der Tumorstwachstums mittels Cavalieri-Methode.....	67
4.3.2	Kernspintomographische Bildgebung und Analyse der Tumorstwachstums von U-87-Xenografts.....	68
4.4	Das Apelinlevel hat keinen Einfluss auf die Morphologie von Gefäßen und Perizyten in U-87-Xenografts	71
4.5	Vorkommen von Hämorrhagien und Nekrosen in U-87-Xenografts	78
4.6	Fehlender Einfluss von Transduktion und Immunstatus auf Vaskularisation und Tumorstwachstum von U-87-Xenografts	81
5	Diskussion	84
5.1	Apelinabhängige Unterschiede in der Vaskularisierung von U-87-Xenografts	84

5.1.1	Evaluation der Methodik zu Gefäßfärbungen & zur Bestimmung der Vaskularisierung	86
5.2	Apelinabhängige Unterschiede im Tumolvolumen von U-87-Xenografts.....	90
5.2.1	Evaluation der Methodik zur Tumorimplantation und Bestimmung der Tumorumina	92
5.3	Apelinabhängige Unterschiede in der Invasionstendenz von U-87-Xenografts.....	94
5.4	Perizytäre Bedeckung und Gefäßdurchlässigkeit von U-87-Xenograft-Gefäßen.....	96
5.5	Diskussion zur Methodik	99
5.5.1	Allgemeine Anmerkungen zur Methodik	99
5.5.2	Legitime Zusammenfassung des Wildtyps.....	99
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	103
7	Literaturverzeichnis	107
8	Eidesstattliche Versicherung.....	130
9	Lebenslauf.....	132
10	Publikationsliste	133
10.1	Veröffentlichungen	133
10.2	Gutachten	133
10.3	Kongressbeiträge.....	133
11	Danksagung	134

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Darstellung einer Kapillare mit Heraushebung perizytärer Funktionen	14
Abbildung 2 – Mechanismen der vaskulären Entwicklung.	15
Abbildung 3 – Expression von Apelin und APLNR in GBM.....	29
Abbildung 4 – Koordinaten zur stereotaktischen Inokulation von U-87-Zellen.....	39
Abbildung 5 – Experimenteller Ablauf.....	40
Abbildung 6 – Anfertigung von Gefrierschnitten	43
Abbildung 7 – Darstellung der Cavalieri-Methode.....	49
Abbildung 8 – Darstellung der Space-Ball-Methode.....	51
Abbildung 9 – Bildanalytische Auswertung von Perizyten und Gefäßen mittels CellSens	54
Abbildung 10 – Schweregradeinteilung von Hämorrhagien in U-87-Xenografts	56
Abbildung 11 – Beispielbild zur Eisenfärbung eines U-87-Xenografts	57
Abbildung 12 – Beispielbilder von nekrotischen Arealen in U-87-Xenografts.....	58
Abbildung 13 – Die apelinabhängige Vaskularisation von U-87-Xenografts	61
Abbildung 14 – Sowohl die Apelinausschüttung des Tumors als auch die des Wirts beeinflussen die durch Kapillarsprossung vorangetriebene Tumorangiogenese	64
Abbildung 15 – Eine exogene Apelingabe rettet den vaskulär defizitären Phänotyp von <i>U87AKD / AKO</i>	66
Abbildung 16 – Mittels HE-Färbung aufbereitete Xenografts.....	67
Abbildung 17 – Tumolvolumina in HE-gefärbten Schnitten ermittelt nach Cavalieri-Methode	68
Abbildung 18 – Kernspintomographische Aufnahmen von U-87-Xenografts	69
Abbildung 19 – Verlust des vaskulären Apelins führt zu kleineren Tumolvolumina	71
Abbildung 20 – Apelinverlust führt zu einer verminderten Gefäßanzahl.....	73
Abbildung 21 – Die perizytäre Bedecktheit wird nicht vom Apelinvorkommen beeinflusst.....	75
Abbildung 22 – U-87-Xenografts zeigen neoplasietytische Veränderungen der Perizyten im Vergleich zum Normalhirn der Gegenseite	77
Abbildung 23 – Hämorrhagien und Nekrosen in Korrelation mit der Tumorgröße	80
Abbildung 24 – Die lentivirale Transduktion hat keinen Einfluss.....	82
Abbildung 25 – Der Mausgenotyp hat keinen Einfluss	83

Formelverzeichnis

Formel 1 – Formeln der Cavalieri-Methode zur Berechnung des Tumolvolumens	50
Formel 2 – Formeln zur Bestimmung der Gefäßlänge (L) und der Gefäßlängendichte (VLD) ..	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Versuchsgruppen unter Angabe von U-87-Zellart und Versuchstiergenotyp	38
Tabelle 2 – Versuchsgruppen in der Interventionskohorte.....	39

Tabelle 3 – Verwendete Endothelzellen- und Perizytenmarker	46
Tabelle 4 – Verwendete Konjugate zur Endothelzellen- oder Perizytenfärbung	46
Tabelle 5 – Ergebnisse von VLD, Netzwerkkomplexität und Gesamtgefäßlänge	62
Tabelle 6 – Tumorumfängen nach Versuchsgruppe.....	70
Tabelle 7 – Vorkommen von Hämorrhagien und Nekrosen.....	79
Tabelle 8 – Vorkommen von Blutungen und Nekrosen in Abhängigkeit vom Tumorumfang ..	81

Abkürzungsverzeichnis

α SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
aCSF	<i>artificial cerebral spinal fluid</i>
AKO	Rag2-Apelin-Knock-out-Mäuse
Ang-1 oder -2	Angiopoetin-1 oder -2
Ap13	Apelin-13-Peptid
APELA	<i>Apelin early ligand A</i>
ApF13A	Apelin-F13A
APLN	Apelin
APLNR	Apelinrezeptor
AT1R	Angiotensin-II-Rezeptor Typ I
bFGF	<i>(basic) fibroblast growth factor</i>
EGF/EGFR	<i>epidermal growth factor / epidermal growth factor receptor</i>
FEM	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin
GBM	Glioblastoma multiforme
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR	<i>G protein-coupled receptors</i>
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor-1 α</i>
HRE(s)	<i>hypoxia response elements</i>
i. c.	intrazerebral
IB4	biotinyliertes Isolectin B4
IL	Interleukin(e)
INF- α oder - β	Interferon- α oder - β
M	Mittelwert
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MRT	Magnetresonanztomographie
n. s.	nicht signifikant
NA	numerische Aperatur
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBS	phosphatgepufferter Salzlösung
PBS-T	Triton [®] -X-100 in PBS
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd

POD	<i>postoperative day</i>
Rag	<i>recombinase activating gen-Knock-out</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
TGF α oder β	<i>transforming growth factor α oder β</i>
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
U87AKD	Apelin-Knock-down-U-87-Zellen
U87NSC	Non-silencing-Control-U-87-Zellen
U87WT	Wildtyp der U-87 MG-Zellen
VEC	vaskulär-endotheliales Cadherin
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vN	Komplexität des vaskulären Netzwerks
vs.	versus
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	immundefiziente Mäuse mit physiologischer Apelinexpression

Kurzfassung

Hintergrund: Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der am häufigsten auftretende und letalste primäre Hirntumor des Erwachsenen. Trotz multimodaler Behandlungsansätze bleibt die mittlere Lebenserwartung nach Diagnosestellung anhaltend gering. Eine ausgeprägte Tumorangiogenese ist eines der pathologischen Kennzeichen des Glioblastoms, sodass antiangiogene Therapieansätze einen relevanten Stellenwert im Therapieregime haben. Der in den 90er Jahren entdeckte Apelin-APLNR-Signalweg spielt neben diversen physiologischen Prozessen im menschlichen Körper vor allem in der embryonalen Angiogenese eine Rolle. Vorangegangene Studien zeigten eine Hochregulierung von Apelin und seines Rezeptors (APLNR) im Gewebe menschlicher Glioblastome und dort insbesondere in Arealen mikrovaskulärer Proliferationen.

Methoden: Um den Einfluss Apelins auf die Vaskularisierung und die Größenentwicklung des Glioblastoma multiforme zu analysieren, wurde für diese Arbeit ein orthotopes Xenograftmodell humaner Glioblastomzellen (U-87 MG) für die Maus genutzt und eine von U-87 MG ausgehende Glioblastomzelllinie mit herabgesetzter Apelinexpression mittels lentiviraler shRNA-Transduktion geschaffen. Als Versuchstiere dienten einerseits immundefiziente Mausstämme mit natürlicher Apelinkompetenz sowie institutsintern gekreuzte immundefiziente Mäuse mit reduzierter Apelinproduktion. Weiterhin wurde in der Versuchsgruppe mit eingeschränkter muriner und tumoraler Apelinexpression Apelin-13-Peptid oder ein Apelinantagonist nach intrazerebral in das Tumorgebiet gebracht. Detaillierte stereologische, histologische Schnittbild- und MRT-analytische Auswertungsmethoden wurden genutzt, um Parameter der Tumervaskularisation (*Vessel Length Density* (Gefäßlängendichte), Gesamtgefäßlänge, Komplexität des vaskulären Netzwerks, Gefäß-/Perizytenanzahl, Gefäß-/Perizytenfläche, Gefäß-/Perizytenradius, Gefäß-/Perizytenbedecktheitsgrad sowie Vorkommen von Nekrosen und Hämorrhagien) und Tumorumfänge zu vergleichen.

Ergebnisse: Eine Reduktion der Apelinexpression in den Tumorzellen bewirkte eine Herabsetzung der Tumervaskularisation. Darüberhinaus führte die Inokulation von Apelin-Knock-down-Tumorzellen in Knock-out-Tieren zu kombinatorischen Effekten in der Reduktion der Neoangiogenese und resultierte in einer derart reduzierten Tumervaskularisation, die sie mit der im physiologischen Hirngewebe des Striatum vergleichbar werden ließ. Die direkte Infusion von Apelin in dieses Setting der kombinatorischen Apelindeletion stellte die typische Tumervaskularisation wieder her und steigerte die Tumorangiogenese. Der Verlust der Apelinexpression resultierte des Weiteren in dem verringerten angiogeneseabhängigen Tumorstadium. Die verwendeten Methoden erbrachten keine signifikanten Unterschiede

zwischen den Versuchsgruppen bzgl. des perizytären Bedecktheitsgrads sowie im Vorkommen von Nekrosen und Hämorrhagien.

Schlussfolgerung: Diese Arbeit bestätigt die Annahme, dass Apelin-APLNR-Signalwege einen Einfluss auf die Ausbildung des tumoralen vaskulären Gefäßbetts und Tumorgröße des verwendeten orthotopen Xenograftmodells hat. Des Weiteren liefert sie einen Einblick über die Funktion eines weiteren, bisher wenig beachteten, angiogenetischen Faktors in der Pathogenese des Glioblastoma multiforme und bietet eine Grundlage zu alternativen Therapieansätzen in der Behandlung dieser aggressiven Tumorentität.

Schlagwörter: Glioblastoma multiforme, Apelin, Vessel Length Density, Tumorangiogenese

Abstract

Signaling pathway of Apelin in glioma angiogenesis

Background: Glioblastoma multiforme (GBM) are the most frequent malignant primary tumors of the brain. They are highly invasive, infiltrate normal brain tissue and total surgical resection is difficult. GBM survival and growth is determined by its characteristic intense tumor angiogenesis. As a result, anti-angiogenic therapies play a significant role in current multimodal treatment strategies and ongoing scientific studies. The peptide hormone apelin, which was first described in 1998 and signals through its G-protein coupled receptor APLNR, is closely associated with embryonic angiogenesis. In addition to that, findings in previous studies show an apelin and APLNR upregulation in regions of microvascular proliferations in GBM specimens, implying a role in tumor angiogenesis.

Methods: To investigate apelin-APLNR signaling in tumor growth and pathological vessel formation in glioblastoma multiforme an orthotopic model of tumor formation in the mouse was established. Next to the glioma cell line U87MG, expressing high levels of apelin *in vitro*, an apelin-lacking U87MG cell line was created by lentiviral shRNA transduction. Both mice with the ability to express apelin and mice lacking apelin were used to test for a potential complementary role of apelin originating from the glioma microenvironment. Furthermore, apelin lacking xenografts in APLN-knockout-mice were directly infused either with apelin-13 or an antagonist. Detailed analyses of vascularization, glioma growth as well as vascular and pericytal morphology and degree of pericytal coverage by stereomorphology, MR imaging and immunohistochemistry were conducted in the mentioned test animal groups.

Results: A knockdown of the tumour cell-derived apelin reduced the tumour angiogenesis of U87-xenografts. An additional depletion of apelin expression in APLN-knockout mice led to an aggravated decrease in vascularization, which was comparable to healthy striatal vasculature. Direct infusion of the bioactive peptide apelin-13 directed the angiogenesis to normalization. Furthermore, loss of apelin caused a reduction of angiogenesis-dependent tumour growth. The pericytal coverage as well as the incidence of necrosis and hemorrhages did not significantly differ in relation to the existing apelin level.

Conclusion: Overall, the results suggest that apelin signaling is required for the formation of glioma vascular beds and, consequently, glioma growth. We are anticipating that apelin-APLNR signaling may serve as novel target for anti-angiogenic tumor therapy.

Keywords: Glioblastoma multiforme, apelin, vessel length density, tumor angiogenesis

1 Überblick

Das Glioblastoma multiforme (GBM) weist die höchste Letalität der von Gliazellen ausgehenden Hirntumoren auf^{1,2}. Es ist charakterisiert durch ein äußerst invasives und destruierendes Wachstum, sodass trotz aufwendiger Therapieverfahren mit Kombinationen aus chirurgischer Intervention, Bestrahlung und Chemotherapie die mittlere Lebenserwartung von Patient*innen mit GBM ab Diagnosestellung zwischen 8,5 – 16 Monaten liegt^{1,3-7}. Um dieses Ergebnis zukünftig zu verbessern, ist eine Entwicklung alternativer Therapiestrategien von Interesse.

Werden die biologischen und molekularen Mechanismen betrachtet, die die Entstehung und das Wachstum dieses aggressiven soliden Tumors vorantreiben, lassen sich viele Gemeinsamkeiten mit über 200 anderen soliden Tumorentitäten finden⁸. So wird die Ausbildung eines Gefäßnetzes, welches die Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt, als Schlüsselereignis in der Entstehung solider Tumore, wie auch dem GBM, betrachtet⁹. Diesem Ansatz folgend schlug Judah Folkman erstmals den therapeutischen Angriff auf die Tumorgefäße solider Tumoren als mögliche Strategie zur Beeinflussung des Tumorwachstums vor¹⁰.

Ein bedeutender Faktor im Prozess der Gefäßneubildung stellt das Peptid *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dar, welcher in hohem Maße in malignen Hirntumoren exprimiert wird. Aus diesem Grund ist VEGF seit einiger Zeit zu einem beliebten Angriffsziel für antiangiogene Therapieverfahren geworden und Inhalt vieler therapeutischer Studien im Kampf gegen maligne Hirntumore. Der anfängliche Enthusiasmus für diesen antiangiogenen Therapieansatz wurde jedoch durch Berichte geschmälert, die tumorale Resistenzen gegen anti-VEGF-Therapien aufzeigen und auf eine Adaptation der Neoplasien durch die Aktivierung anderer Aktivator der Angiogenese hinweisen¹¹. Auf der Suche nach alternativen Therapieansätzen für die Behandlung des GBM ist demnach erneut die Ausweitung der Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Tumorangiogenese von hoher Dringlichkeit.

Seit den 1990er Jahren gewann der bis dahin noch weitgehend unbekannt Signalweg von Apelin (APLN) und seinem Rezeptor (APLNR) an Bedeutung in der angiogenetischen Forschung. So konnte seit seiner Erstbeschreibung neben einer zentralen Rolle bei der Regulation der embryonalen Angiogenese auch ein Einfluss auf die Tumorangiogenese postuliert werden¹². Die Arbeitsgruppe um Sorli zeigte, dass eine ektopische Überexpression von Apelin im subkutanen Tumor eines Mausmodells mammärer Karzinomzellen das Tumorwachstum und die Bildung von großen intratumoralen Gefäßen fördern kann¹³.

Vorbereitend auf diese Arbeit wurde gezeigt, dass Apelin in Geweben des GBM exprimiert wird¹⁴. Um die Rolle von Apelin in der Tumorentstehung genauer zu betrachten, wurde anschließend eine Gliomzelllinie generiert, in welcher Apelin spezifisch mittels antisense-RNA herunterreguliert wurde. Sowohl die Wildtyp- als auch die generierte apelindefiziente Zelllinie wurden als orthotope Xenografts in Mäusehirne implantiert.

Unter Anwendung eines komplexen *in-vivo*-Systems in der Maus soll die Rolle des Apelin/APLNR-Signalweges in der Pathogenese von Hirntumoren genauer charakterisiert werden. Das Verhalten von Tumorzellen in dem vielschichtigen Mikromilieu des murinen Hirns lässt sich mit *in-vitro*-Methoden nur eingeschränkt modellieren. Im Fokus liegen die hirneigenen Gefäße der Maus, deren spezifische Antwort auf die eingeführten Tumorzellen aus induziertem Wachstum und Reorganisation (Angiogenese und Vaskulogenese) besteht und die in ihrer Komplexität im dreidimensionalen Raum des Hirngewebes nicht zu übertreffen sind. Die Anwendung eines komplexen *in-vivo*-Systems in der Maus zur Klärung der hier aufgeworfenen Fragen ist somit unerlässlich. Ein besseres Verständnis über einen weiteren, bisher in diesem Feld wenig beachteten angiogenetischen Faktor in der Pathogenese des GBM, bietet möglicherweise eine Grundlage zu alternativen Therapieansätzen in der Behandlung dieser aggressiven Tumorentität.

1.1 Angiogenese und Antiangiogenese

Das kardiovaskuläre System ist das erste funktionierende Organsystem im sich entwickelnden Embryo¹⁵. Während einzellige Lebensformen direkt im Austausch mit ihrer Umgebung stehen, sind mehrzellige, höher entwickelte Organismen auf die Transportmechanismen eines Blutgefäßsystems angewiesen. Überlebensnotwendige Nährstoffe und Sauerstoff können so auf dem Weg der nur wenige Millimeter reichenden Diffusion in jede Zelle des Organismus gelangen und den zellulären Stoffwechsel sicherstellen. Bei der Entstehung neuer Blutgefäße, zusammenfassend Angiogenese genannt, werden drei voneinander getrennte Arten unterschieden: die Vaskulogenese, die Arteriogenese und die Angiogenese im engeren Sinne¹⁶. Obwohl auch physiologisch antiangiogen ablaufende Prozesse existieren, werden heute unter Antiangiogenese in erster Linie Therapiekonzepte zusammengefasst, die der Gefäßneubildung in erkrankten Geweben entgegenwirken sollen^{17,18}.

1.1.1 Morphologischer Aufbau von Blutkapillaren

Anhand von Morphologie und Funktion werden Blutgefäße in Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen eingeteilt. Die Wände der Arterien, Arteriolen, Venen und Venolen bestehen aus drei Schichten – der Tunica interna (Endothelzellen), der Tunica media (glatte Muskelzellen) und der Tunica externa (u. a. Fibroblasten und Extrazellulärmatrix). Kapillaren hingegen setzen sich von innen nach außen aus einer Schicht Endothelzellen, welche das Kapillarlumen formen, einer ihnen anliegenden Basalmembran und umgebenden Perizyten zusammen¹⁹.

Unter physiologischen Bedingungen kleiden **Endothelzellen** das Blutgefäßsystem mit einer Gesamtoberfläche von ca. 7.000 m² ($\approx 6 \times 10^{13}$ Zellen) vollständig aus²⁰. Als Beispiele ihrer vielfältigen Funktionen bilden sie die Barriere zwischen Blut und Gewebe, regulieren den kapillären Stoffaustausch zwischen diesen Kompartimenten und machen den Informationsaustausch immunologischer Vorgänge zwischen verschiedenen Organen möglich. Das Endothel wird – mit steigender Durchlässigkeit – in drei Typen eingeteilt: kontinuierlich, fenestriert und diskontinuierlich²⁰⁻²³.

Basolateral den Endothelzellen aufsitzend befindet sich die **Basalmembran**, welche als spezialisierte Form der extrazellulären Matrix angesehen wird. Sie besteht aus Kollagen Typ IV, Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen, welche von Endothelzellen, Perizyten und Fibroblasten gebildet werden. Im ständigen Kontakt zu den Endothelzellen der Gefäße dienen sie der strukturellen Formgebung und tragen bei der Kapillarelastizität zur Bewältigung des hydrostatischen Druckes bei. Außerdem erwiesen sich einige Bestandteile der Basalmembran, wie Laminin und Kollagen Typ IV, als Schlüsselemente in der Regulation der Angiogenese²⁴.

Der Basalmembran von außen aufliegend durchdringen **Perizyten** diese mit feinen Fortsätzen. Sie dienen als flache Stützzellen und nehmen diverse mechanische, metabolische und signalgebende Aufgaben wahr (folglich **Abbildung 1**)²⁵. Perizyten und Endothelzellen beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Mitoserate, der Reifung und in ihrem Überleben²⁶. Das Maß der Perizyten-dichte an der Gefäßaußenfläche bestimmt den Grad der Gefäßpermeabilität²⁷.

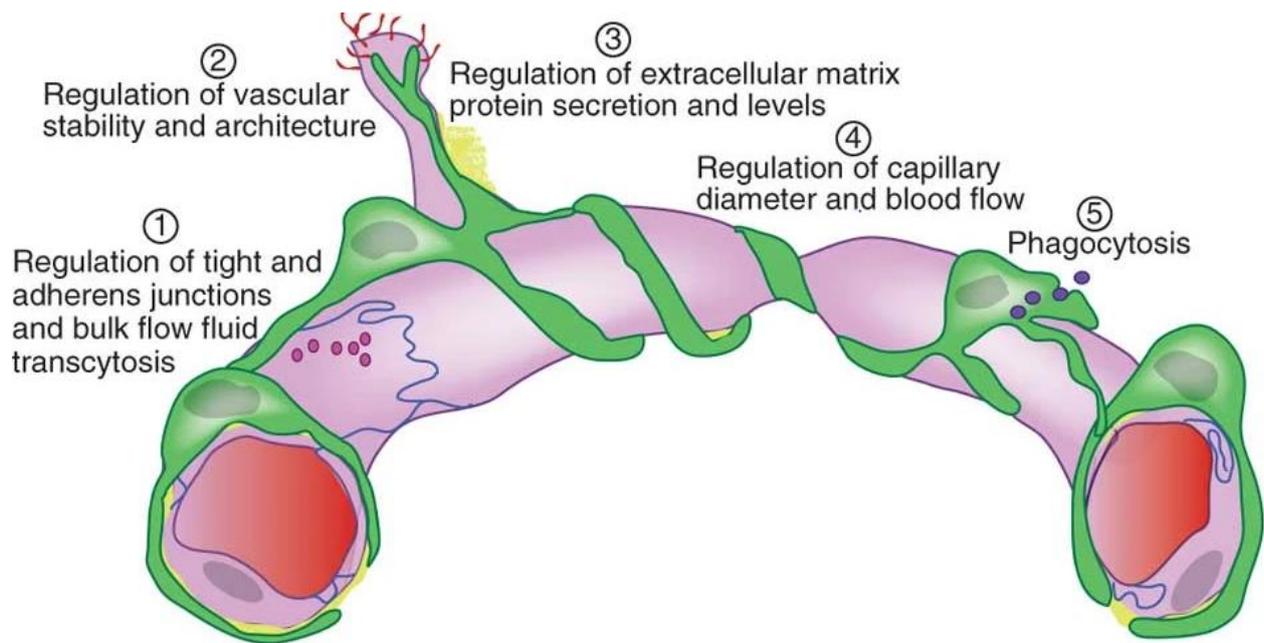


Abbildung 1 – Darstellung einer Kapillare mit Heraushebung perizytärer Funktionen. Neben den dargestellten Aufgaben der (1) Beeinflussung von Zellverbindungen der *Tight* und *Adherens Junctions*, (2) Regulierung der vaskulären Stabilität und Architektur, (3) Proteinsekretion zum Aufbau der Extrazellulärmatrix, (4) Regulierung des Kapillardurchmessers und des intravaskulären Blutflusses sowie der (5) Phagozytose werden perizytär auch die Synthese und Sekretion von vasoaktiven Agonsisten zur Autoregulation der Blutgefäße und die Synthese und Ausschüttung von Bestandteilen der Basalmembran kontrolliert und umgesetzt (Abbildung von Winkler et al., 2011, ReUseLicenseNumber 4901781491283)^{25,28}.

1.1.2 Gefäßneubildung und -reifung

In der dritten Gestationswoche findet die Ausbildung und Spezifizierung der Blutgefäß- und Lymphgefäßsysteme im vertebralen Organismus statt. Die Entwicklung des Blutgefäßsystems nutzt die Prozesse der Vaskulogenese und Angiogenese^{29,30}.

So werden in der **Vaskulogenese** neue Blutgefäße aus zirkulierenden, endothelialen Vorläuferzellen (Angioblasten) gebildet. Angioblasten entwickeln sich ursprünglich aus vom Mesoderm entstammenden Hämangioblasten, welche als bipotente Stammzellen auch Vorläufer hämatopoietischer Zellen sind. Während der embryonalen Entwicklung ordnen sich Angioblasten lose strangartig aneinander und reifen im weiteren Verlauf in einen primären Blutgefäßplexus aus. Dieser beschreibt ein sehr einfaches homogenes Netzwerk aus Endothelzellen^{15,31,32} (**Abbildung 2**). Im adulten Organismus ist die Vaskulogenese nur in Ausnahmen zu finden, wie beispielsweise bei kardio- oder zerebrovaskulären Erkrankungen und soliden Tumoren³³.

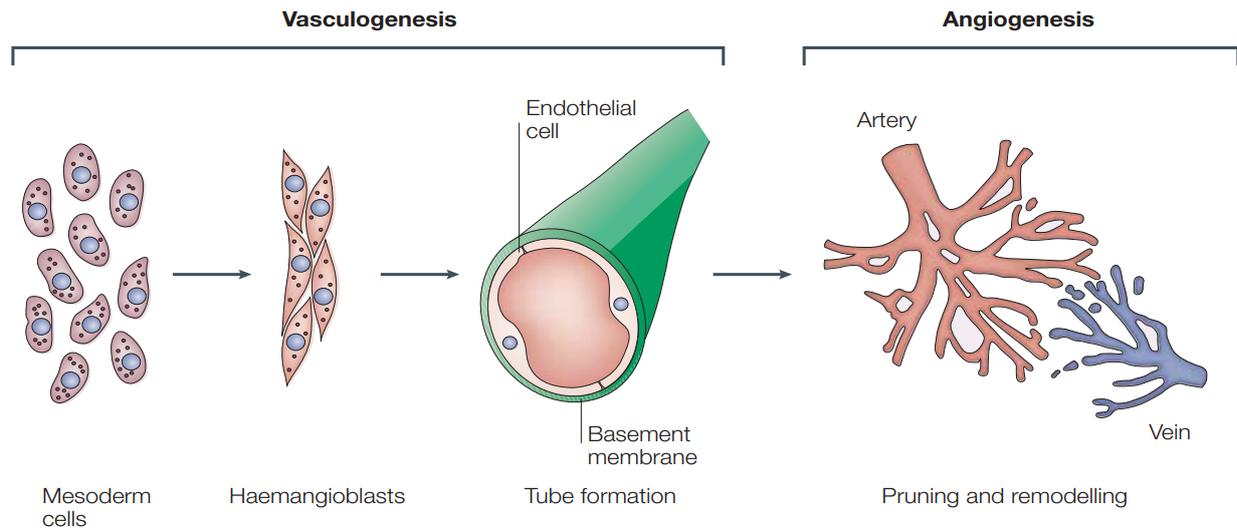


Abbildung 2 – Mechanismen der vaskulären Entwicklung. Aus dem Mesoderm entsprungene Hämangioblasten entwickeln sich zu Vorläufern vaskulärer Endothelzellen und formen so primäre kapilläre Gefäßwände (Vaskulogenese). Der Umbau des primären kapillaren Gefäßnetzwerkes und die Entwicklung neuer Gefäße durch Proliferation und Migration von Endothelzellen schon bestehender Gefäße (Angiogenese) sorgt für den Umbau in reife Arterien und Venen (Abbildung von Oliver et al., 2004, ReUseLicenseNumber 4901790086537)³⁴.

Während der **Angiogenese** erwachsen neue Blutgefäße aus schon existierenden Blutgefäßen – dem vaskulären Plexus in der Embryonalphase oder reifen Gefäßen im adulten Organismus³⁵. Es werden entweder weitlumige Blutgefäße durch den Vorgang der Intussuszeption (Einstülpung) geteilt³⁵ oder – und häufiger auftretend – es entstehen neue Blutgefäße durch Kapillarsprossung. Dabei binden proangiogene Faktoren, wie beispielsweise VEGF, *platelet-derived growth factor* (PDGF), *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α), Angiopoetin-2 (Ang-2) und andere (folglich Abschnitt 1.1.3), an spezifische Rezeptoren von Endothelzellen schon existierender Blutgefäße. Durch die Aktivierung endothelialer Signalkaskaden werden Enzyme produziert und freigesetzt, welche die nahe gelegene Basalmembran und die basolaterale Extrazellulärmatrix lokal auflösen. Die freigesetzten Enzyme beinhalten Matrixmetalloproteinasen (MMP), die entsprechend ihrer Substrate in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und membranassoziierte MMP eingeteilt werden³⁶. Die aktivierten Endothelzellen verändern ihre Interaktionen mit perivaskulären Zellen (v. a. Perizyten) und proliferieren und migrieren aus ihrem Zellverband durch die entstehenden Löcher in der Basalmembran³⁷. Die Migrationsrichtung wird chemotaktisch durch den Diffusionsgradienten freigesetzter Wachstumsfaktoren, wie VEGF, Angiopoetin-1 (Ang-1) und *basic fibroblast growth factor* (bFGF), vorgegeben. Das Vorwärtssprossen der neuen Kapillaren wird des

Weiteren durch als Entershaken fungierende Adhäsionsmoleküle (Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$) unterstützt^{38,39}. Ausgeschüttete MMP lösen das Gewebe vor der Spitze der sprossenden Kapillaren. Die Endothelzellen werden in der Form flacher und bilden nach und nach das Lumen der neu wachsenden Blutgefäße aus. Einzelne Kapillarröhrchen aus unterschiedlichen Richtungen verbinden sich anschließend und formen ein neues Blutgefäßnetz. Proteinaseinhibitoren, wie *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), verhindern den Abbau provisorischer Extrazellulärmatrix in der Umgebung der neugebildeten Gefäße. PDGF, welches von aktivierten Endothelzellen ausgeschüttet wird, rekrutiert zuletzt Perizyten und glatte Muskelzellen, die sich zur Stabilisierung der neuen Gefäße von basolateral anlagern^{19,37,40-43}.

Von den Prozessen der Vaskulo- und Angiogenese abzugrenzen ist die **Arteriogenese**, bei der es sich um die Entstehung von Ersatzblutgefäßen handelt. Im Falle eines auftretenden Blutgefäßverschlusses bilden sich aus bereits bestehenden Arteriolen Kollateralgefäße, die die Versorgung des betroffenen Gewebes wieder bereitstellen. Der Vorgang der Arteriogenese spielt vor allem bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine Rolle⁴⁴.

Die Reifung neu entstandener Gefäße wird zu einem Großteil von Basalmembran und Perizyten unterstützt. Die Basalmembran dient als Quelle für diverse Wachstumsfaktoren für Endothelzellen und Perizyten^{19,45}. Perizyten fördern Überleben und Reifung der Endothelzellen durch direkte Zell-zu-Zell-Interaktion und über parakrine Mechanismen (folglich Abschnitt 1.1.1)^{26,46}.

1.1.3 Molekulare Regulation der Angiogenese

Neuentstehung, Wachstum, Reifung und Überleben von Blutgefäßen werden auf den Ebenen der Genexpression, sowie Sekretion und Aktivierung von pro- und antiangiogenen Stimuli strikt reguliert. Die vaskuläre Homöostase ist von der Balance dieser Gegenspieler abhängig^{19,43}. Wird dieses ausgewogene System gestört, kann eine exzessive Bildung von Blutgefäßen oder eine unzureichende Entwicklung des (lokalen) Gefäßsystems die Folge sein und den Grundstein für ernsthafte Erkrankungen legen⁴³.

1.1.3.1 Proangiogene Faktoren

Im Jahr 1996 wurden die Merkmale eines proangiogenen Faktors folgendermaßen definiert⁴⁷:

1. Ein proangiogener Faktor ist an Orten der Angiogenese und nicht im normalen adulten Gewebe zu finden. Es sei denn, ein geeigneter Hemmstoff ist zeitgleich vertreten.

2. Er ist in der Lage, durch Diffusion an spezifischen Rezeptoren von Endothelzellen zu binden und diese zu aktivieren. Hohe Konzentrationen führen zu einer vermehrten Bildung neuer Blutgefäße.
3. Eine Neutralisation des angiogenen Faktors durch natürliche oder synthetische Hemmstoffe verhindert den Vorgang der Angiogenese.

Zum heutigen Tag ist eine Vielzahl proangiogener Faktoren bekannt. Zu den bedeutendsten proangiogenen Faktoren gehören neben VEGF und *fibroblast growth factor* (FGF) unter anderem *transforming growth factors* α und β (TGF α oder β), Angiopoetine, HIF-1 α , Interleukine (IL), wie bspw. IL-6, Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), PDGF und Apelin^{13,14,35,48}.

VEGF stellt dabei nach heutigen Kenntnissen ein Schlüsselprotein im Ablauf der Angiogenese dar. Die durch VEGF ausgelöste Signalkaskade wird als kritisches Ereignis der Blutgefäßneubildung angesehen^{9,45,49}. Schon bei der Erstbeschreibung 1983 teilten Senger et al. dem damals als *endothelial cell specific growth factor* benannten Protein eine stimulierende Rolle in der Angiogenese und vaskulären Durchlässigkeit zu. Die VEGF-Familie beschreibt sieben strukturell ähnliche, dimere Glykoproteine, wobei sich die Bezeichnung *VEGF* im Allgemeinen auf den Faktor VEGF-A dieser Familie bezieht⁴⁹. Die von VEGF-A aktivierten intrazellulären Signalkaskaden unterstützen die Endothelzellmigration und -proliferation, sowie das Überleben der Endothelzellen durch die Ausschüttung antiapoptischer Proteine^{9,43,49,50}. Die Bedeutung von VEGF-A als Schlüsselprotein und die Wichtigkeit der strengen Regulation angiogener Prozesse werden in diversen murinen Experimenten deutlich, in denen sowohl eine verminderte als auch erhöhte Expression von VEGF-A zu schweren vaskulären Abnormalitäten führten und welche schon embryonal letal endeten⁵¹⁻⁵³.

1.1.3.2 Antiangiogene Faktoren

Im Vergleich zu den proangiogenen Faktoren hemmen antiangiogene Faktoren entweder direkt angiogene Reaktionen von Endothelzellen oder veranlassen indirekt die Blockade bestimmter angiogener Substanzen. Im ausgewogenen System zur Regulation angiogener Prozesse sind sie essentielle Gegenspieler der proangiogenen Faktoren⁵⁴. Bekannte antiangiogene Faktoren umfassen unter anderem Angiostatin, Antithrombin III, *cartilage-derived inhibitor* (CDI), Endostatin, Fibronectin, Interferon- α und - β (INF- α oder - β) sowie Metalloproteinaseinhibitoren, Prolactin, Vasostatin, Thrombospondin-1 und -2 (TSP-1 oder -2)^{8,35,55}.

1.1.3.3 Der angiogene Switch

Im gesunden adulten Organismus wird nur selten eine Neubildung von Blutgefäßen benötigt. In der Entwicklung gebildete, funktionstüchtige Blutgefäße mit intakter Blutzirkulation existieren im Normalfall, ohne dass ein weiteres Blutgefäßwachstum zu verzeichnen ist. Daher befinden sich Endothelzellen solange in einem ruhenden Stadium bis ihre Proliferation aktiviert wird. Pro- und antiangiogene Faktoren halten sich in einem Gleichgewicht, um im Bedarfsfall eine streng regulierte Blutgefäßneubildung einzuleiten und wieder zu unterdrücken. Kommt es nun unter bestimmten Voraussetzungen zu einem *Umschalten* des Ruhezustands in einen Zustand aktiver vaskulärer Neubildung, wird diese Veränderung als *angiogenic switch* (*angiogenes Umschalten*) bezeichnet^{37,56}.

1.2 Angiogenese bei malignen Tumorerkrankungen

Die Entwicklung von malignen soliden Tumoren ist ein multifaktorielles Geschehen. Ausschlaggebend in der Entstehung entartenden Gewebes ist eine Anhäufung spontaner genetischer und epigenetischer Veränderungen in Zellen, die dadurch Vorteile im Wachstums- und Invasionsverhalten akquirieren^{10,17}. Hanahan und Weinberg definierten als kritisches Merkmal von entartenden Geweben neben bspw. der Fähigkeit der Selbstversorgung, der Ausschüttung von Wachstumssignalen, der Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen und der Fähigkeit zur Gewebeinfiltration und Metastasierung auch eine andauernde Angiogenese^{57,58}.

Schon im 19. Jahrhundert hat die Arbeitsgruppe um Goldman eine Korrelation zwischen dem vaskulären System und der Entstehung maligner Erkrankungen hergestellt⁵⁹. Im Unterschied zur Gefäßentwicklung in gesundem Gewebe werden die Mechanismen der Angiogenese unter pathologischen Bedingungen auf andere Weise reaktiviert⁶⁰. Hauptsächlich Inflammation, metabolischer Stress und anhaltende Hypoxie veranlassen das Gefäßwachstum im unterversorgtem Gebiet⁴³ und stören das Gleichgewicht pro- und antiangiogener Faktoren. Die Gefäßneubildung ist dabei sowohl auf qualitativer, als auch auf quantitativer Ebene fehlgesteuert^{35,43}. Heute werden mehr als 70 Funktionsstörungen auf eine fehlerhafte Angiogenese zurückgeführt, wobei sie auf zwei gegensätzliche Arten – als exzessive oder insuffiziente Angiogenese – zur Entstehung bzw. Progression dieser Erkrankungen beiträgt^{35,60,61}.

Bei der insuffizienten Angiogenese sind neue Blutgefäße in der Anzahl nicht genügend oder schlecht ausdifferenziert und somit nicht funktionstüchtig. Endothelzellen können Fehlfunktionen

aufweisen. Die direkte Konsequenz ist die Unterversorgung der nachgeschalteten Organe und Gewebe. Folgen umfassen einerseits Wundheilungsstörungen, wie beim weit verbreiteten Diabetes mellitus, oder andererseits Erkrankungen, dessen Pathogenese teils auf einer insuffizienten Blutgefäßbildung fußen, wie Alzheimer, diabetische Neuropathie, amyotrophe Lateralsklerose, Atherosklerose, Restenosen, Nephropathien und Osteoporose³⁵.

Eine pathologisch überschießende Blutgefäßbildung tritt im Rahmen einer exzessiven Angiogenese auf. Ursache ist zumeist eine Überproduktion proangiogener Faktoren in diesem Gebiet, welche den Einfluss inhibierender Faktoren aufhebt. Diese Situation ist beispielsweise bei Erkrankungen entzündlicher Genese, Obesitas, Asthma bronchiale, Multiple Sklerose, Endometriose, Autoimmunerkrankungen, diabetischer Makulopathie, altersbedingter Makuladegeneration, rheumatoider Arthritis, Psoriasis oder Tumorerkrankungen zu verzeichnen. Neu wachsende Blutgefäße entstehen um erkranktes Gewebe zu versorgen. Gesundes Gewebe wird zerstört und bei malignen Neoplasien zusätzlich die Abschwemmung von Tumorzellen in entfernte Körperregionen gefördert³⁵.

1.2.1 Hypoxie-induzierte Angiogenese in Tumorgeweben

Neu entstehende Neoplasien werden anfangs durch Nähr- und Sauerstoffdiffusion aus angrenzenden Blutgefäßen versorgt. Frühe Studien haben gezeigt, dass Tumormassen eine Größe von 1 mm³ nicht ohne die Aktivierung von Angiogenese und die Entwicklung einer eigenen Blutversorgung überschreiten können^{10,17}. Erreicht eine Tumormasse also die kritische Größe von wenigen Millimetern, sind die im Zentrum liegenden Tumorzellen mangelhaft versorgt und es kommt zunächst zu einem Wachstumsstillstand. Folkman bezeichnete Tumore in diesem Monate bis Jahre anhaltenden Zustand als „ruhend“ (*tumor dormancy*)¹⁰. Wird diese kritische Größe dennoch überschritten, entstehen im Zentrum hypoxische Bereiche. Durch Hypoxie ausgelöste Signalwege vermitteln die Expression proangiogener Faktoren, insbesondere VEGF, und die Neubildung von Blutgefäßen in Richtung minderversorgter Tumorzellen wird angeregt^{48,62,63}. Langanhaltende und schwerwiegende hypoxische Zustände haben sowohl für Normalgewebe als auch für Tumorzellen den Zelltod zur Folge. Oftmals besitzen jedoch Letztere die Fähigkeit sich mit zahlreichen Abwehrmechanismen gegenüber Stressoren, wie Hypoxie, anzupassen. Tumore, die trotz Stressoren die Fähigkeit besitzen weiter zu wachsen, entwickeln hohe Resistenzen gegen angewandte chemo- oder strahlentherapeutische Maßnahmen und können mit einer schlechten Prognose korreliert werden^{48,62-65}. Neben der Hypoxie-induzierten Tumorangiogenese umfassen andere Auslöser für ein

voranschreitendes Tumorwachstum die Aktivierung von Onkogenen, die Hemmung von Tumorsuppressorgenen und weitere durch Umgebungsbedingungen verursachte Stressoren, wie reaktive Sauerstoffspezies, Glukosedepriavation oder der von umliegenden proliferierenden Zellen herbeigeführte Druck^{43,48,62,63,66}.

In dem Moment, in dem sich das Verhältnis zwischen pro- und antiangiogenen zugunsten der proangiogenen Faktoren ändert, dass heißt der angiogene Switch erfolgt, verwandelt sich ein nicht durchbluteter mitotisch wenig aktiver Zellverband in einen wuchernden malignen Tumor mit aktiv proliferierenden und migrierenden Endothelzellen^{10,55}. Tumorzellen in hypoxischen Arealen nutzen den HIF-1/VEGF-A-Signalweg um mit Hilfe von so aktivierten Endothelzellen und der folgenden Hypoxie-induzierten Angiogenese eine Unterversorgung des Gewebes zu minimieren⁶⁷.

Der erste Schritt bei der Entwicklung neuer Tumorgefäße aus schon existierenden Gefäßstrukturen besteht in der Auflösung der Zellverbände nativer Blutgefäße. Tumorzellen akkumulieren um existierende Gefäße und zerstören die Zellkontakte zwischen Endothelzellen und der Basalmembran. Aktivierte Endothelzellen sezernieren VEGF-A und Ang-2, welche die Proliferation, Migration und das Überleben von Endothelzellen regulieren, native Blutgefäßwände destabilisieren und die Abdeckung durch Perizyten senken (vgl. auch Abschnitt 1.1.3.1)^{37,43,68-71}. Im Folgenden wird die Basalmembran und die umgebende Extrazellulärmatrix durch MMP, bspw. in Glioblastomen insbesondere durch die synergistisch wirkenden MMP-2 und MMP-9⁷², aufgelöst und die Gefäßneubildung mit Hilfe migrierender Endothelzellen setzt ein (vgl. auch Abschnitt 1.1.2)⁷³.

1.2.2 Die Morphologie und Funktion von Tumorgefäßen

Benötigen Endothelzellen in gesunden ausdifferenzierten Geweben Jahre zur Erneuerung³⁷, reifen Blutgefäße bei temporär notwendiger Angiogenese, wie z.B. in Verletzungen, schon wesentlich schneller und sind innerhalb kürzester Zeit stabil⁷⁴. Während im Normalfall die durch eine kurzfristig vermehrte Produktion von proangiogenen Faktoren geführte Angiogenese in Arealen von Verletzungen selbstreguliert wieder deaktiviert wird, können solide Tumoren, wie Dvorak es bezeichnete, als „nie heilende Wunden“ betrachtet werden⁷⁵. Das ausgewogene System von Stimulatoren und Inhibitoren ist dort zugunsten der angiogenen Stimulation, insbesondere durch eine Überexpression von VEGF, anhaltend gestört^{42,76}. Neu ausgebildete Tumorgefäße befinden sich im Vergleich zu Gefäßen des gesunden Gewebes in ständigem Wachstum und Umbau, sind unreif und in vielen Gesichtspunkten verschieden. Unreife Blutgefäßnetzwerke von Tumoren präsentieren sich als unorganisiert und ohne hierarchische Ordnung. Die Gefäße sind innerhalb des Tum-

orgewebes ungleichmäßig verteilt, blind im Gewebe endend, irregulär geformt, dilatiert und gewunden. Eingeschränkte Zell-Zell-Zusammenhalte, das Fehlen einer normalen Ummantelung mit glatten Muskelfasern, abnorme Basalmembranen und erhöhte Durchlässigkeit führen dazu, dass die neu ausgebildeten Mikrogefäße lecken und den intravaskulären Druckgradienten nicht aufrechterhalten können. Interstitielle Hypertension, Ödeme des Parenchyms, Hämorrhagien, sowie die Prädisposition zur Metastasenentwicklung sind die Folge^{42,76-78}.

Das Überleben von Endothelzellen der Tumorgefäße ist im Gegensatz zu Endothelzellen der Gefäße des Normalgewebes stark von Wachstumsfaktoren, wie VEGF, abhängig⁷⁹. Des Weiteren wird die Reifung der Endothelzellen durch die Beeinträchtigung der Perizyten in malignen Geweben geschmälert. Perizyten fehlen oder gehen nur insuffiziente Zusammenhalte mit den Endothelzellen ein, was die Unreife der Gefäße maßgeblich beeinflusst⁴⁶. Strukturell und im Aufbau abnorme Basalmembranen begünstigen in malignen Geweben die Metastasierung maligner epithelialer Zellen und die Proliferation von Endothelzellen (vgl. auch Abschnitt 1.1.2)²⁴.

Morphologische Abnormitäten führen in der Gesamtheit zu funktionsuntüchtigen Tumorblutgefäßen, in denen Blut unregelmäßig, langsam oder gar hin- und herpendelnd fließt. Trotz aktiver Angiogenese ist die Versorgung des wachsenden Tumorgewebes meist nicht ausreichend möglich, so dass anhaltende Hypoxie und die dadurch begünstigte, fortwährende Freisetzung proangiogener Faktoren zu einer Überproduktion des kapillaren Netzwerkes, besonders in der Tumorperipherie, führt. Dementsprechend zeigen molekulare Analysen der tumoralen Endothelzellen eine Hochregulation diverser Moleküle, die eine erhöhte Permeabilität, Proliferation, Migration und Antiapoptose unterstützen, wie bspw. VEGFR oder CD105⁸⁰. Der geringere Sauerstoffpartialdruck und die erhöhte interstitielle Hypertension schafft ein schädigendes Mikromilieu im umgebenden Tumorgewebe. Im Sinne eines *Circulus vitiosus* begünstigt dies selektiv das Entstehen eines malignen Phänotyps, der wiederum zu erhöhter Mortalitäts- und Morbidität der erkrankten Patient*innen führt⁴⁵.

1.2.3 Antiangiogene Therapieansätze bei malignen Tumorerkrankungen

Konventionelle Therapieansätze zur Behandlung maligner Neoplasien basieren derzeit auf den Säulen der chirurgischen, strahlentherapeutischen und chemotherapeutischen Intervention. Eine Kombination der Behandlungsansätze wird häufig verfolgt, um die Wahrscheinlichkeit des Therapieerfolgs zu erhöhen. Das Behandlungsregime wird je nach Art der Neoplasie, Stadium sowie allgemeiner Verfassung der Patient*innen individuell gewählt⁸¹.

Wie oben beschrieben zeigen Tumorgefäße eine unausgewogene und lokale Überexpression von proangiogenen Faktoren (wie VEGF), welche in hohem Maße die Durchlässigkeit und die Neubildung der Tumorgefäße beeinflusst. Verschiedene Arbeitsgruppen wiesen mit steigender Malignität von Bronchial-⁸², Nieren-⁸³ und Mammakarzinomen⁸⁴, Adenokarzinomen der Bauchspeicheldrüse⁸⁵, Tumoren des Magen-Darm-Traktes⁸⁶ und Ovarialtumoren⁸⁷ eine erhöhte VEGF-Expression nach, welche auch mit der Überlebenszeit der beobachteten Patient*innen korreliert werden konnte. Demzufolge sind VEGF und seine endothelialen Rezeptoren bedeutende Zielstrukturen für antiangiogene Therapieansätze in der Tumorbehandlung^{17,18}. Die Zulassung Bevacizumabs (Avastin[®]) im Jahr 2005 führte antiangiogene Therapeutika als eine vierte Säule in der Behandlung maligner Neoplasien ein⁸⁸. Grundlage dafür war eine klinische Studie der Phase III zur Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms, in der in Kombination mit den Chemotherapeutika Irinotecan, 5-Fluorouracil und Leukovorin ein signifikanter Überlebensvorteil festgestellt wurde⁸⁹.

Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen die 4 Isoformen des humanen VEGF-A. Er geht mit VEGF-A eine kovalente Bindung ein und verhindert dessen Bindung an auf Endothelzellen exprimierte Rezeptoren. In der Folge bleiben die Aktivierung der Rezeptoren und die Signaltransduktion ins Innere der Endothelzellen aus. Diese verbleiben in der Ruhephase und es erfolgt weder deren Migration, noch Proliferation, welche zur Rekrutierung neuer Blutgefäße notwendig wären⁹⁰ (vgl. Abschnitte 1.1.3.1 und 1.2.1). Die Wirksamkeit von Bevacizumab konnte bei der Behandlung von weiteren Neoplasien, wie Brustkrebs in Kombination mit Paclitaxel und Lungenkrebs in Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel, nachgewiesen werden⁹¹⁻⁹⁴, sodass 2007 die Zulassung für die Behandlung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms und des metastasierenden Mammakarzinoms erfolgte.

Heute sind neben Bevacizumab weitere antiangiogene Therapeutika zum einen schon als First-Line-Therapie zugelassen und zum anderen im Fokus der experimentellen und klinischen Forschung. Entsprechend ihres Blockierungspotentials sprechen sie die Proteine der Angiogeneskaskade in unterschiedlichem Maße an und können nach Folkmans Einteilung einen wesentlichen, zwei bis drei solcher oder aber ein breites Spektrum verschiedener Angiogeneseregulatoren blockieren⁹⁵.

1.3 APLNR und sein Ligand Apelin

Die proangiogene Wirkung Apelins und die in der Literatur zunehmend diskutierte Relevanz antiangiogener Therapieansätze bildeten die Grundlage für diese Arbeit. Die Erstbeschreibung des Apelinrezeptors (APLNR, auch bekannt als APJ) erfolgte 1993 nachdem verwendete Primer der Arbeitsgruppe um O'Dowd den Apelinrezeptor statt dem angestrebten Vasopressin-Rezeptor ansprachen⁹⁶. Er gehört zur größten Familie der Zelloberflächenrezeptoren, den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G protein-coupled receptors*, GPCR). 1998 extrahierte die Arbeitsgruppe um Tatemoto et al. erstmals das 36-aa-Peptid *Apelin* aus bovinem Magenextrakt als passenden Liganden für den bis dahin verwaisten GPCR APLNR (*orphan GPCR*)⁹⁷. 2013 und 2014 wurden mit *ELABELA* bzw. *Toddler* (oder auch *Apelin early ligand A*, APELA, genannt; Gen: *Apela*) ein weiterer Ligand entdeckt^{98,99}. Obwohl strukturell signifikante Homologien zum Angiotensin-II-Rezeptor Typ I (AT₁R) existieren, ist es für Angiotensin II nicht möglich am APLNR zu binden^{96,97,100}.

Die ursprüngliche Form des Apelins als 77-aa-Präpropeptid wird durch ein Gen des langen Arms des humanen X-Chromosoms (Xq25-26.1) kodiert. In einem posttranslationalen Signalweg werden über eine proteolytische Reifung des C-terminalen Endes verschiedene Apelinpolypeptide und damit unterschiedlich biologisch aktive Isoformen generiert, welche von Apelin-55 (Proapelin) bis Apelin-12 reichen^{101,102}. Apelin-36 (Aminosäuren 42-77), Apelin-17 (Aminosäuren 61-77), Apelin-13 (Aminosäuren 65-77) und (Pyr¹)apelin-13 (der N-terminale Glutaminrest des Apelin-13 ist zu Pyroglutamat zyklisiert) stellen dabei die prädominierenden und aktivsten Isoformen dar^{97,103}. Sowohl APLNR, als auch Präproapelinvorläufer von Mensch, Maus und Ratte zeigen hohe Homologien der Aminosäuresequenz, was auf eine starke evolutionäre Konservierung der Gene hinweist¹⁰⁴.

Apelin ruft über den APLNR-Signalweg diverse intrazelluläre Signalkaskaden hervor, welche letztendlich die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zum Ziel haben. Die Verbindung des APLNR mit einem inhibitorisch wirkenden G-Protein erklärt durch Apelin hervorgerufene, bedeutende intrazelluläre Effekte, wie die Hemmung der Adenylylcyclase, die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und die Aktivierung von ERK (*extracellular-signal regulated kinases*), welche eine Relevanz in Prozessen der Zellteilung haben und oftmals im Rahmen der Onkogenese fehlreguliert sind, wie bspw. bei der Entwicklung eines GBM^{104,105}.

Die ersten Studien zu Signalwegen von Apelin und APLNR beinhalteten die Modifikation des C-terminalen Endes von (Pyr¹)apelin-13, bei der Phenylalanin mit Alanin ersetzt wurde und das

Peptid Apelin-F13A mit antagonistischer Wirkung *in vivo* entstand. Im Vergleich zu (Pyr1)apelin-13 wurde gezeigt, dass die durch Apelin üblicherweise gehemmte Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) bei einer Verbindung von Apelin-F13A und dem APLNR ausbleibt und eine durch Apelin-13 hervorgerufene Absenkung des Blutdrucks antagonisiert werden kann¹⁰⁶. Andererseits wurde dem Peptid auch nach beobachteter Hemmung der Adenylatzyklase und APLNR-Internalisierung in funktionalen Assays eine agonistische Wirkung zugeschrieben^{107,108}.

1.3.1 (Patho)physiologische Funktionen des apelinergen Systems

Seit der Entdeckung des Apelinrezeptors und dessen natürlichen Liganden Apelin wird eine ubiquitäre Verbreitung im menschlichen Organismus und die Bedeutung zahlreicher physiologischer Abläufe immer ersichtlicher^{109,110}. Expressionsstudien humaner und muriner Gewebe zeigten eine weitreichende Kolo-kalisation von APLNR und Apelin sowohl im zentralen Nervensystem, als auch in peripheren Organen, wie Lunge, Herz, Nieren, Leber, Milz, Brustdrüse, Hoden, Ovarien und Fettgewebe^{103,111}. Entsprechend des ubiquitären Vorkommens von Apelin und APLNR wird ihnen eine regulierende Rolle in physiologischen Prozessen, wie bspw. dem Immunsystem, der Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme, dem Energiestoffwechsel, dem Insulin- und Glukosestoffwechsel, den neuroendokrinen Mechanismen bei Stressreaktionen, kardiovaskulären Funktionen und der Angiogenese zugesprochen^{104,105}. Die Verwendung polyklonaler Antikörper gegen Apelin deckte immunreaktives Apelin in Endothelzellen kleiner Arterien von Mesenterium, Omentum, Herz, Lunge, Gastrointestinaltrakt, Milz, Pankreas und Leber auf¹¹². Insbesondere die ausgeprägte Expression von Apelin und APLNR auf embryonalen Gefäßstrukturen impliziert eine bedeutende regulierende Rolle in der embryonalen Entwicklung des vaskulären Systems¹¹³. Entsprechend der zugesprochenen proangiogenen Wirkung sind insbesondere das Wachstum intersomitischer Gefäße und die parakrine Aktivierung der embryonalen Angiogenese von Apelin abhängig^{12,14}. Während Apelin *in vitro* mitogen auf choroid-retinalen Endothelzellen des Rhesusaffens wirkt¹¹⁴, wiesen Studien humaner Endothelzellen nach Stimulation mit Apelin jedoch keine signifikante Proliferation auf, sondern zeigten eher eine erhöhte endotheliale Migrationstendenz^{12,14}. Zudem wurde die Wirkung als potenter chemotaktischer Faktor ebenfalls in APLNR-exprimierenden Zellen an der Spitze retinaler Gefäße¹¹⁵ und in vaskulären glatten Muskelzellen^{116,117} nachgewiesen. Auch außerhalb des Gefäßsystems konnte Apelins Rolle als chemotaktischer Faktor in den Signalwegen der Zellanziehung beispielsweise in lymphatischen Endothelialzellen dargelegt werden¹¹⁸.

Die Relevanz des apelinergen Systems in pathophysiologischen angiogenetischen Prozessen wurde beispielsweise in der portosystemischen Kollateralisierung und viszeralen Neovaskularisierung bei Leberzirrhose und bei portaler Hypertension beobachtet^{104,119,120}. In regenerativ-angiogenetischen Vorgängen postischämischer Zustände, wie beispielsweise nach myokardialer Infarktion zeigte sich, dass Apelin als Lockstoff von zirkulierenden Endothelzellvorläufern dient¹⁰⁵. Dementsprechend legten Kidoya et al. in einem murinen Ischämie-Modell der Hinterläufe dar, dass eine Apelingabe zur funktionellen Besserung führte. Die entstehenden Blutgefäße waren vergrößert und nicht durchlässig¹²¹. Pathologische Zustände, welche mit einem erhöhten Level an Apelin einhergehen, umfassen zum Beispiel die koronare Herzerkrankung, Atherosklerose, Diabetes mellitus und die Tumor(angio)genese^{104,105}.

1.3.2 Apelin als potenter Aktivator der Tumorangiogenese

Ähnlich dem physiologischen Vorkommen Apelins in der Entwicklung des vaskulären Systems wiesen diverse Arbeitsgruppen auch auf eine Bedeutung Apelins im Rahmen der pathologischen Tumorangiogenese hin. So wurde die Hochregulierung des Apelin-kodierenden Gens in einem Drittel humaner maligner Neoplasien beobachtet¹²². Ein Vergleich der Genexpression in Endothelien von gesunden und neoplastischen Geweben identifizierte Apelin als spezifisches Gen für Tumorendothelien¹²³. Masiero et al. arbeitete über eine Analyse von mehr als 1000 primären Malignomen des Menschen – darunter 121 Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs, 959 Mammakarzinome und 170 klarzellige Nierenzellkarzinome – heraus, welche Kerngene für die Tumorangiogenese in diesen Neoplasien verantwortlich sind und interessanterweise ist Apelin eines dieser Kerngene¹²⁴. Dementsprechend hat sich gezeigt, dass die Höhe der Expressionslevel von APLNR und/oder Apelin in Tumorgewebe sowie das Serumlevel von Apelin für Prognose und auch Therapieansprechen bei einigen Tumorentitäten wegweisend sind¹²⁵⁻¹²⁹.

In der Entstehung solider Tumore scheint Apelin eine vergleichbare Funktion wie VEGF-A in den Prozessen der Gefäßneuentwicklung einzunehmen¹²². Die Arbeitsgruppe um Berta et al. beobachtete, dass eine Überexpression Apelins im humanen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom die Durchmesser und Anzahl kleiner Gefäße pro Fläche steigert¹³⁰. *In-vivo*-Experimente von Tumorzelllinien zeigten bei Apelin-überexprimierenden Tumoren ein gesteigertes Tumorstadium, was auf ein früheres Einsetzen der Tumorentwicklung bei besserer vaskulärer Versorgung zurückgeführt wurde^{13,130}. Im Kontrast dazu postulieren Kidoya et al., dass Apelin und sein Rezeptor vorrangig für die Gefäßreifung, statt für eine Gefäßsprossung in der Tumorangiogenese verantwortlich sind. Subkutane Tumorentitäten des murinen Kolon- und Lungenkarzinoms, welche Apelin

überexprimierten, zeigten in ihren Experimenten größere Gefäße und keine gesteigerte Gefäßdichte, auch war das Tumorwachstum eher gehemmt. Ihre Hypothese ist, dass die apelininduzierte Normalisierung der Tumorgefäße genutzt werden kann, um die Effektivität konventioneller onkologischer Therapieverfahren zu erhöhen¹³¹.

Die detaillierten molekularen Vorgänge der Apelinexpression in malignen Neoplasien sind nicht abschließend geklärt. Einige Hypothesen schließen die Abhängigkeit von veränderten Umgebungsbedingungen ein, wie bspw. lokale Zustände der Hypoxie. Hinweisend auf eine durch Hypoxie ausgelöste Apelinaktivität sind bspw. die Anwesenheit von sogenannten HREs (*hypoxia response elements*) in der Promoterregion des Apelin-kodierenden Gens^{114,132}, die die Gentranskription für Prozesse zur Bewältigung der Hypoxie anregen, und die zeitweilige erhöhte APLNR-Expression in retinalen Gefäßen während postnataler Entwicklungsphasen, bei denen es kurzzeitig zu Hypoxien kommen kann¹¹⁵. Dem HIF-1/VEGF-A-Signalweg als Reaktion auf hypoxische Zustände (vgl. Abschnitt 1.2.1) entsprechend wurde nachgewiesen, dass HIF-1 α die Apelinexpression in Kardiomyozyten, Adipozyten, Endothel- und vaskulären glatten Muskelzellen reguliert¹³²⁻¹³⁴. In zerebralen Neoplasien, GBM im Speziellen, konnte eine hohe Expression von Apelin und seinem Rezeptor sowie von VEGF-A in Zellen angrenzend des zentralen Nekroseareals, das heißt in unmittelbarer Nähe zu hypoxischem Gewebe, nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 1.4.2). Es ist also naheliegend, dass parakrine Signalwege zwischen Tumorzellen und Endothelzellen in der GBM-Angiogenese von der kooperierenden Wirkung Apelins und VEGF-As profitieren¹⁴.

1.4 Gliome und Glioblastome

Gliome sind Tumore, die dem neuroepithelialen Gewebe entspringen. Sie werden in Abhängigkeit von ihren prognosebestimmenden histopathologischen und molekulargenetischen Merkmalen durch die *World Health Organization* (WHO) in Grad I-IV klassifiziert¹. Tumore ersten Grades (pilozytische Astrozytome) sind selten und zumeist benigne. Tumore zweiten Grades zeichnen sich durch nukleäre Atypien aus. Die betroffenen Patient*innen haben eine mittlere Überlebenszeit von ca. 10 Jahren. Patient*innen, die mit einem Tumor des Grades III (anaplastische Astrozytome) diagnostiziert werden, haben hingegen eine mittlere Überlebenszeit von ca. 2 Jahren. Tumore vierten Grades (Glioblastoma multiforme (GBM)) nehmen ca. 51 % aller Gliome ein und haben die schlechteste Prognose mit einer mittleren Überlebenszeit von 8,5 – 16 Monaten ab Zeitpunkt der Diagnose^{1,4,6,7}. GBM beschreibt unter den astrozytären Gliomen somit den Tumor höchster Malignität, und es ist gleichzeitig der am häufigsten auftretende primäre Hirntumor des Erwachsenen^{4,135}. Die jährliche Inzidenz beträgt 3-5 neu diagnostizierte Fälle pro 100.000 Einwohner mit

bis zu zweifach erhöhter Inzidenz bei Menschen europäischer Abstammung im Vergleich zur afro-amerikanischen oder asiatischen^{136,137}. Der Großteil der Patient*innen mit GBM (> 90 %, primäre GBM) stellen sich mit einem rasch verlaufenden klinischen Bild und dem ersten Auftreten eines Beschwerdebildes Tage oder Wochen vor der Erstdiagnose vor. Wenige GBM (10 %) entwickeln sich allmählich aus Gliomen geringeren Grades (WHO Grad II oder III) und werden als sekundäre GBM bezeichnet¹³⁵. Das klinische Bild kann ausgesprochen unterschiedlich ausfallen und hängt stark von Lokalisation und Größe des Tumors ab. Häufig auftretende Symptome schließen fokale neurologische Defizite (Aphasie, Parästhesie, Hemiparese, visuelle Ausfälle), Persönlichkeitsveränderungen, Krampfanfälle oder Symptome des erhöhten intrakraniellen Drucks, wie Kopfschmerzen, Erbrechen oder Übelkeit, ein¹³⁵.

1.4.1 Phänotypische Charakteristika maligner Gliome

Die Untersuchungsmethode der ersten Wahl in der Diagnostik des GBM ist heute die Schnittbildgebung, allen voran die Magnetresonanztomographie (MRT). Meist zeigt dieser raumfordernde Tumor eine zentrale Nekrosezone und entsprechend der vaskularisierten vitalen Peripherie der Neoplasie eine ringförmig umgebende Kontrastmittelanreicherung. In T2-gewichteten Sequenzen der MRT werden des Weiteren das ausgeprägte perifokale Ödem und die angrenzende diffuse Tumordinfiltration ersichtlich¹³⁵.

Maligne Gliome (WHO Grad III und IV) sind vorrangig subkortikal im Bereich der zerebralen Hemisphären gelegene Tumore der weißen Hirnsubstanz. Obwohl infiltratives Wachstum Merkmal aller diffusen astrozytären Tumore ist, fällt das GBM durch sein rapides infiltrierendes Wachstum in angrenzendes Gewebe auf¹³⁸. Die Tumordinfiltration erstreckt sich oftmals in den angrenzenden Kortex und als supratentoriale bilaterale Ausweitung entlang der myelinisierten Strukturen, wie dem Corpus callosum oder den Fornices, in die kontralaterale Hemisphäre oder in die Temporallappen. Eine andere Art der Tumorextension wird entlang oder innerhalb perivaskulärer Räume beobachtet^{36,139}.

Zu den histopathologischen Kennzeichen gehören in erster Linie ausgeprägte Tendenzen zur Proliferation, Neovaskularisation und Invasion. Die Proliferation von malignen Gliomen ist deutlich an ubiquitären Mitosefiguren erkennbar. Das rapide Wachstum des Tumorgewebes hat zumeist die Entwicklung eines Nekroseareals im Zentrum zur Folge. Tumorzellen umgeben pseudopalisadenartig diese Nekroseareale und gelten in dieser Konfiguration als besonderes Merkmal eines GBM³⁶. Weitere Kennzeichen eines GBM sind die Tendenz zur beträchtlichen

Ödembildung und das Risiko spontaner Einblutungen^{1,135,140}. Die primären und sekundären Subtypen des GBM (vgl. Abschnitt 1.4) lassen sich histologisch nicht unterscheiden¹³⁵.

GBM gehören zu den am stärksten vaskularisierten Tumoren des Menschen. Entsprechend der typischen Charakteristika von Blutgefäßen solider Tumoren finden sich demnach auch hier Blutgefäße mit vergrößertem Durchmesser, einer diskontinuierlichen Schicht von Perizyten, einer verdickten Basalmembran und hyperplastischen Endothelzellen, die über die Maße proliferieren^{141,142}. Die charakteristische Ödembildung ist vasogen durch dysfunktionale, durchlässige Tumorgefäße bedingt¹³⁵. Exzessive vaskuläre Neubildungen sind insbesondere am Rand des Nekroseareals und in der peripheren Infiltrationszone des Tumors zu verzeichnen¹⁴³. Histopathologisch präsentieren sich diese mikrovaskulären Proliferationen durch glomerulär ausgebildete Kapillarschlaufen in girlandenförmiger Anordnung^{144,145}. Glioblastome zeigen im Vergleich zu Tumoren niedrigerer WHO-Grade eine erhöhte Dichte des Gefäßnetzes. Diverse Studien zeigten, dass das Maß der Angiogenese ein Faktor zur Bestimmung der Tumorstadiumsrate und eines potenziellen Rückfalls im Verlauf der Behandlung darstellt. In der Betrachtung von Gliomen zeigt sich demnach eine inverse Korrelation zwischen vaskulärer Dichte und Überlebenszeit, wobei eine Zunahme der Vaskularisation die Prognose zum Schlechteren beeinflusst^{141,146-148}.

1.4.2 Tumorangiogenese in Glioblastoma multiforme

Tumorangiogenese ist eines der pathologischen Kennzeichen maligner Gliome¹⁴³. Für ihr Wachstum stimulieren die Tumorzellen des GBM die Ausbildung von neuen Blutgefäßen. Die wuchernden Gefäße sind in ihrer Struktur und Funktion abnormal und tragen zu einer „feindlichen“ Mikroumgebung bei, welche durch einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck und einen hohen interstitiellen Flüssigkeitsdruck gekennzeichnet sind. Diese unwirtliche Umgebung des wachsenden Tumors unterstützt den entscheidenden Selektionsdruck für den malignen Phänotyp sowie die daraus resultierende erhöhte Morbidität und Mortalität bei GBM⁴⁵.

VEGF-A wird nicht nur als wichtigster proangiogener Faktor in der pathologischen Angiogenese betrachtet⁴⁹, sondern wird zudem in den meisten GBM stark überexprimiert. Seine Rezeptoren können unter anderem auf den Tumorgefäßen detektiert werden¹⁴⁹. Rong et al. wiesen darauf hin, dass die für das GBM kennzeichnende Pseudopalisadenzellen auftreten, wenn das Tumorgewebe in hypoxische Zustände gerät. Sie überexprimieren HIF-1 und produzieren proangiogene Faktoren, wie bspw. VEGF und IL-8. Demnach können Zustände der Hypoxie, das Auftreten von pseudopalisadenartigen Zellen und mikrovaskuläre Hyperplasien, welche die Grundlage für neu ausgebildete Tumorgefäße und die periphere Tumorexpansion ausmachen, in Verbindung

gebracht werden¹⁵⁰. Dementsprechend stellten Kälin et al. dar, dass Pseudopalisadenzellen neben VEGF auch Apelin und APLNR exprimieren. Diese Beobachtung und zusätzliche Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Cox et al. lassen auf eine Hypoxie-induzierte Aktivierung Apelins schließen^{12,14}. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass vorher mit Hilfe des endothelialen Markers CD31 identifizierte intratumorale mikrovaskuläre Proliferationen Apelin und APLNR in hohem Maße exprimieren (vgl. **Abbildung 3**). Die hohe Expression wurde vor allem in Gegenden der Gefäßverzweigung und -aussprossung detektiert¹⁴. Das gleichzeitige Vorkommen von Ligand und Rezeptor in diesen Regionen deutet auf eine autokrine Signalübermittlung hin. Weitere Hinweise für die Beteiligung Apelins an der Gliomentstehung erbrachte die Entdeckung des Tumorsuppressorgens hHSS1 (*Human Hematopoietic Signal peptide-containing Secreted 1*). In Microarray-Expressionsanalysen von U-87-Gliomzellen, welche gezielt hHSS1 überexprimierten, zeigte insbesondere das Apelin-betreffende Gen eine bedeutende Runterregulierung¹⁵¹.

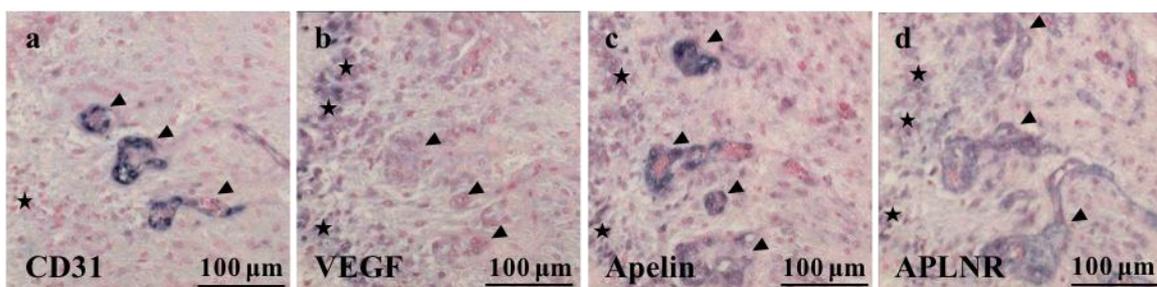


Abbildung 3 – Expression von Apelin und APLNR in GBM. Darstellung der RNA-Expression von (a) CD31, (b) VEGF, (c) Apelin und (d) APLNR mittels In-situ-Hybridisierung in aufeinanderfolgenden Schnitten von Proben humaner GBM. Während Pseudopalisadenzellen (*) in Regionen der Nekrose VEGF exprimieren, markiert die Färbung mit CD31 die Tumorgefäße (Pfeilköpfe). Sowohl Apelin, als auch APLNR kann in mikrovaskulären Proliferationen (Pfeilköpfe) und Pseudopalisaden (*) angrenzend der nekrotischen Areale detektiert werden (adaptiert nach Kälin et al., 2007, ReUseLicenseNumber 4901790244431)¹⁴.

1.4.3 Therapeutische Strategien zur Behandlung maligner Gliome

Als häufigster maligner Hirntumor des Erwachsenen mit aggressivem und diffusem infiltrativem Wachstum sowie dementsprechend oftmals rapidem klinischen Verlauf stellt das GBM die Patient*innen und Behandelnden vor medizinische und psychosoziale Hürden^{135,142}. Trotz multimodaler Behandlungskonzepte, welche heutzutage typischerweise chirurgische, strahlentherapeutische und chemotherapeutische Verfahren beinhalten, berichten klinische Studien weiterhin von

mittleren Überlebensraten zwischen 8,5 – 16 Monaten und einer 2-Jahres-Überlebensrate von 26 - 33 %^{4,6,7}.

Obwohl trotz des Einsatzes von fluoreszenzgestützten Verfahren zur intraoperativen Sichtbarmachung der Tumorzellen mittels 5-Aminolevulinsäure und makroskopisch vollständiger Entfernung der Tumoranteile häufig jedoch vereinzelte Tumorzellen *in situ* verbleiben, bildet die chirurgische Tumorentnahme die Basis derzeitiger Therapiestandards in der Behandlung des GBM. Patient*innen mit neu diagnostizierten GBM erfahren mit Hilfe einer chirurgischen Intervention eine rasche Linderung ihrer Symptomatik und Studien wiesen auf die Verbesserung der Gesamtprognose nach initialer maximal möglicher Resektion hin^{6,152}. Bei einer initialen Tumorlokalisation in problematischen Arealen, wie dem primären Motorkortex und Corpus callosum, stellt eine partielle Entfernung der Neoplasie die einzige Option dar. In 20 - 30 % der Fälle ist die operative Intervention schon initial nicht durchführbar und lediglich eine diagnostische Probenentnahme wird durchgeführt^{135,153}. In Kombination mit der chirurgischen Intervention besteht die Option biologisch abbaubare Implantate, welche über ca. 3 Wochen das Chemotherapeutikum Carmustin lokal abgeben, im Resektionsareal zu hinterlassen (sogenannte *Carmustin-Wafer*). Klinische Studien in der Anwendung bei malignen Gliomen zeigten zwar insgesamt einen moderaten Überlebenszugewinn, jedoch in der Gruppe der Glioblastome keinen Zusatznutzen. Außerdem wurden im Behandlungsverlauf Wundheilungsstörungen, erhöhte Ödemneigung, intrakranielle Infektionen und Tendenzen zu Krampfanfällen beschrieben^{154,155}.

Die Kombination chemotherapeutischer und strahlentherapeutischer Ansätze als Therapiestandard fußt vor allem auf den Ergebnissen von Stupp et al., welche zeigten, dass eine Kombination von Temozolomid, ein alkylierendes Zytostatikum, und der regional angewandten Strahlentherapie die mittlere Überlebenszeit von 12,1 auf 14,6 Monate im Vergleich zur alleinig angewandten Radiatio erhöht¹⁴². Heutige chemotherapeutische Schemata der Wahl beinhalten in der Mehrzahl Temozolomid. Patient*innen, welche mit diesem Zytostatikum behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu mit anderen Präparaten behandelten Patient*innen die höchsten mittleren Überlebenszeiten^{5,156}.

Studien orthotoper Tiermodelle wiesen darauf hin, dass das Wachstum von GBM und die Vaskularisation stark VEGF-A-abhängig ist (vgl. Abschnitt 1.4.2) und analog die Inhibierung von VEGF-A-Signalkaskaden das Tumorwachstum signifikant reduziert, indem Neovaskularisation und Proliferation unterdrückt wird^{157,158}. Demnach wurde in Forschung und Entwicklung viel Hoffnung in eine zielgerichtete Therapie gegen VEGF oder den VEGF-Rezeptor gelegt. Die ersten Studien bewiesen zunächst die Effektivität von VEGF-Inhibitoren¹⁵⁹, wie Bevacizumab (vgl. Abschnitt 1.2.3), welches 2009 die Zulassung für die Therapie des GBM-Rezidivs erhielt¹⁶⁰. Im

Verlauf zeigte sich in klinischen Studien jedoch kein Vorteil im Langzeitüberleben der beobachteten Patient*innen mit GBM und Bevacizumab-Therapie^{161,162}. Untersuchungen im präklinischen Kontext führen das Therapieversagen auf eine Resistenzentwicklung gegen die anti-VEGF-Therapie zurück, welche durch die Hochregulation zusätzlicher angiogener Faktoren entsteht^{163,164}. Auch eine Induktion von Tumorzellinvasion oder die Akquise bestehender Hirngefäße für die Tumorversorgung stehen in der Diskussion^{68,165-169}. Die Beobachtung, dass GBM teils unterschiedlich auf die antiangiogene Therapie reagieren, wird zunehmend auf interindividuelle Heterogenitäten dieser Tumorentität zurückgeführt. Genetische Stratifikationen wiesen auf verschiedene Subtypen von GBM (proneural, mesenchymal und klassisch) mit Unterschieden in Prognose und Therapieverhalten hin¹⁷⁰. Insbesondere proneurale und klassische GBM zeigen sich empfänglich für die antiangiogenen Therapiestrategien¹⁷¹.

Neben den antiangiogenen Therapieansätzen ist zusätzlich die Immuntherapie in den Fokus der Therapieentwicklung gerückt, im Rahmen dessen Vakzine, T-Zell-gezielte-Therapien und Checkpointinhibitoren untersucht werden¹⁷²⁻¹⁷⁶. Letzteres umfasst Antikörper gegen Oberflächenstrukturen, wie bspw. die regulierenden Immuncheckpoints *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA4) and *programmed cell death protein 1* (PD-1), mit hemmender Wirkung auf die Immunantwort von tumorinfiltrierenden T-Zellen. Sie sollen eine dysfunktionale Immunantwort gegen das Tumorgewebe korrigieren. Obwohl die Immuntherapie einen Einfluss auf das Überleben bei Patient*innen mit anderen Tumorentitäten, wie bspw. Neoplasien der Haut, Lunge oder des Kopf-Hals-Bereichs, haben, erbrachten Phase-III-Studien beim GBM bislang keinen Anstieg des Gesamtüberlebens^{172,173}.

1.5 In dieser Arbeit verwendete Maus- und Xenograftmodelle

1.5.1 Immundefiziente Mausmodelle

In den Vorarbeiten für das in dieser Arbeit verwendete orthotope Tumormodell wurde initial der immunkompetente Inzuchtstamm C57BL/6 den etablierten, immundefizienten Mausstämmen Rag1, Rag2 und γ Rag (oder auch Rag1^(-/-), Rag2^(-/-) und Rag2^(-/-)/ γ c⁽⁻⁾, *recombinase activating gene*-Knock-out) gegenübergestellt¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Da bei Immunkompetenz des Wirtes die eingebrachten humanen U-87-Zellen zeitnah abgeräumt wurden und die Menge der Einflussfaktoren auf das zu beobachtende Wachstum höher wäre, richtete sich im weiteren Verlauf der Experimente die Auf-

merksamkeit auf immundefiziente Inzuchtstämme. Diese wurden mit einem Apelin-Knock-out-Modell (siehe auch Abschnitt 1.5.1) gekreuzt und so ein Vergleich zwischen natürlich existierendem versus fehlendem Apelinvorkommen im murinen Wirt möglich.

Die Mausstämme Rag1, Rag2 und γ Rag sind heute etablierte Modelle für wissenschaftliche immunologische und onkologische Fragestellungen. Humane und murine Organismen, welche nicht in der Lage sind Rag1 und Rag2 zu exprimieren oder eine Mutation der Gene aufweisen, zeigen vorrangig Defizite des adaptiven Immunsystems. Das Ausreifen immunkompetenter Lymphozyten sowie die Entwicklung variabler Immunglobuline und T-Zell-Rezeptoren bleiben aus, da der Prozess der somatischen Rekombination nicht stattfinden kann. Immunkompetente B- und T-Zellen fehlen^{180,181}. Lediglich natürliche Killerzellen (NK-Zellen) können noch heranreifen. Ihre Anzahl ist in Rag1- und Rag2-defizienten Mäusen sogar erhöht^{181,182}. Das Rag2^(-/-)/ γ c⁽⁻⁾-Mausmodell hat den Vorteil weder NK-, B-, noch T-Zellen ausbilden zu können¹⁷⁸. Aufgrund des fehlenden adaptiven Immunsystems sind diese Mausstämme bei fehlender Abstoßungsreaktion insbesondere zur allo- oder xenogenen Transplantation von Gewebszellen jeglicher Art (Tumorzellen, hämatopoetischen Stammzellen etc.) geeignet¹⁷⁸.

1.5.2 Murine Knock-out-Modelle von Apelin und APLNR

Nullmutationen des APLNR- bzw. des Apelin-Gens wirken sich im murinen Phänotyp unterschiedlich aus¹⁸³. Mäuse mit einer Nullmutation des APLNR-Gens (APLNR-Knock-out-Mäuse) pflanzen sich nicht nach Mendelschen Regeln fort. Die Anzahl der Neugeborenen pro Wurf ist gering und der Hauptteil der Jungtiere verstirbt aufgrund mangelhafter mütterlicher Versorgung. Ein Großteil der Mäuse zeigt eine Wachstumsretardierung und kardiovaskuläre Entwicklungsstörungen¹⁸³. Homozygote Mutanten zeigen eine verstärkte Reaktion auf Angiotensin II im Vergleich zu Wildtypmäusen. Doppelmutanten, denen sowohl der AT₁R als auch APLNR fehlen, verzeichnen einen höheren mittleren Blutdruck als Mäuse, denen ausschließlich der AT₁R fehlt, was auf die gegenregulierende Wirkung Apelins zu Angiotensin II in der Blutdruckregulation hinweist¹⁸⁴. Die kardiale Kontraktilität ist bei APLNR-Knock-out-Mäusen in Ruhe nur minimal verringert, unter Belastung jedoch immens eingeschränkt¹⁸³. Des Weiteren zeigen diese Mäuse eine abnorme Regulation der Flüssigkeitshomöostase bei osmotischem Stress, das heißt Salzüberhang oder Wasserentzug¹⁸⁵.

Mäuse, denen Apelin fehlt (APLN-Knock-out), sind lebensfähig, fertil, erscheinen gesund und zeigen eine normale Entwicklung, einschließlich einer normalen Herzentwicklung^{183,186}. APLN-Knock-out-Mäuse pflanzen sich in Bezug auf die Nullmutation nach Mendelschen Regeln

fort. Ähnlich wie APLNR-Knock-out-Mäuse zeigen APLN-Knock-out-Mäuse wenig eingeschränkte kardiale Funktionen in Ruhebedingungen und eine relevante Einschränkung der Belastungsfähigkeit unter Stress¹⁸³. Das vaskuläre System betreffend fiel in APLN-Knock-out-Mäusen eine verringerte retinale Vaskularisation mit einhergehender eingeschränkter okulärer Entwicklung auf. Apelin scheint dementsprechend eine Voraussetzung für die Hypoxie-induzierte Angiogenese in der retinalen Gefäßentwicklung zu sein¹⁸⁷. Embryonal zeigen APLNR-Knock-out-Mäuse dünnere intersomatische Blutgefäße und postnatal dünnere Blutgefäße in der Trachea und der Haut¹⁸⁸. Ersteres wurde mit kongruenten Ergebnissen in der Kaulquappe bestätigt^{12,14}. Die physiologische Aktivierung der Diameterzunahme von Blutgefäßen über den Ang-1-getriggerten Mechanismus erscheint in APLN-Knock-out-Mäusen nicht funktionstüchtig¹⁸⁹.

1.5.3 Das U-87-Xenograftmodell des malignen Glioms

Für ein geeignetes Modell zur Untersuchung des Apelin/APLNR-Signalweges in malignen Gliomen wurden in Vorbereitung auf diese Arbeit verschiedene Tumorzelllinien auf die Expression von Apelin hin untersucht. Während die im Mausmodell häufig verwendete murine Gliomzelllinie GL261^{190,191} keinerlei Apelinexpression und andere humane Zelllinien, wie bspw. U-373 MG (ATCC®: HTB-17™), lediglich eine geringe Apelinexpression zeigte, bestätigte sie sich zu einem hohen Maß in der humanen Gliomzelllinie U-87 MG¹⁹². Um die Rolle des aus den Tumorzellen stammenden Apelins ebenfalls und verlässlich beurteilen zu können, fiel die Wahl auf U-87 MG. Die Zelllinie U-87 MG wurde 1966 von J. Ponten und Kollegin als eine von mehreren humanen Zelllinien maligner Astrozytome extrahiert und der Wissenschaft zugänglich gemacht. Ursprünglich entstammten die Zellen dem GBM eines 44-jährigen europäischen Patienten¹⁹³⁻¹⁹⁵.

Um die Rolle von Apelin in der Tumorentstehung genauer bewerten zu können, wurde in Vorarbeit dieser Versuchsreihe zudem die Gliomzelllinie U-87shApelin (im Folgenden U-87-Apelin-Knock-down, U87AKD) generiert, in welcher Apelin spezifisch über eine antisense-RNA vermittelte Abschaltung herunterreguliert wurde. Eine Modulation von Apelin in humanen GBM-Zellen ist ebenfalls im Mausmodell pathophysiologisch bedeutsam, da die Aminosäuresequenz des bioaktiven Apelin-13 humanem und murinem Ursprungs identisch ist (vgl. auch Abschnitt 1.3)¹⁴. Um die Modulation zu erreichen wurde die humane Zelllinie U-87 MG mit zielspezifischen lentiviralen Partikeln transduziert. Lentiviren dienen im Allgemeinen als virale Vektoren und machen einen Gentransfer in Zielzellen möglich. Mit einer Infektion der gewünschten Zelle werden gezielt fremde Gene eingeschleust und die Produktion des genetischen

Materials der Vektoren veranlasst. Bei lentiviralen Vektoren handelt es sich um replikationsinkompetente Viruspartikel, in denen an Stelle von Regionen, die virale Strukturproteine kodieren, Expressionskassetten mit dem zu übertragendem Fremdgen in das Genom eingesetzt wurden. Zur Transduktion der U-87-Zellen wurden small hairpin RNA (shRNA) für Apelin verwendet, die durch den Mechanismus der RNA-Interferenz die für die Apelinproduktion codierenden Gene stilllegt und eine stabile U-87-Zelllinie mit 90 % verminderter RNA-Expression für Apelin (U-87shApelin bzw. U87AKD) hervorbringt. Die Zellproliferation und -form der U87AKD-Zelllinie sind *in vitro* mit der Mutterzelllinie U-87 MG vergleichbar¹⁹².

Als Negativkontrollen der Gentransduktion dienten mit lentiviralen Kontrollvektoren (*Non-silencing-shRNA*, *pGIPZ non-silencing shRNAmir lentiviral control vector*) transduzierte Zellen (Non-silencing-Control-U-87-Zellen, im Folgenden U87NSC). Die eingebrachte shRNA wird zwar im endogenen Ablauf der RNA-Interferenz eingeschlossen, sie besitzt jedoch keine Homologien zu Genen von Säugetieren, so dass trotz erfolgreicher Transduktion keine mRNA des Säugetiergenoms beeinflusst werden kann. Die Transduktion hat somit keine Auswirkung auf die Proliferation, Überlebensfähigkeit, Morphologie oder das Verhalten der Zielzellen und Effekte im experimentellen Vergleich der beiden Zelllinien sind nicht auf die lentivirale Veränderung zurückzuführen.

Positivkontrollen wurden mit EG5-shRNA-Vektoren (Kinesin-5; EG5-GIPZ lentiviral shRNAmir positive control) generiert¹⁹². EG5 ist ubiquitär vorkommend und die shRNA-Transduktion zeigt in jeder Zelllinie Expressionsminderungen auf mRNA- und Proteinlevel. EG5 wird durch das KIF11(*kinesin family member 11*)-Gen kodiert und ist ein Protein der Kinesinfamilie, welches in der Mitose die Spindelentstehung und Chromosomenmigration unterstützt¹⁹⁶. Eine Inaktivierung der EG5-Aktivität, ob chemisch oder durch die Stilllegung des EG5-Gens mittels lentiviraler EG5-shRNA-Vektoren, resultiert in einer fehlerhaften Ausbildung der mitotischen Spindel, der Hemmung des Zellzyklus in der Prometaphase und in der Konsequenz in einer verminderten Zellproliferation^{197,198}.

Die eingebrachte shRNA der beschriebenen Zelllinien ist mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) markiert, so dass alle erfolgreich lentiviral transduzierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennbar sind.

2 Ziele

Der primäre Hirntumor Glioblastoma multiforme gehört zu den aggressivsten Neoplasien im menschlichen Körper¹⁹⁹. Trotz multimodaler Behandlungsansätze bleibt eine mittlere Überlebenszeit zwischen 8,5 - 16 Monaten nach Diagnosestellung bestehen^{1,4,6,7}. Eine ausgeprägte Tumorangiogenese mit der Ausbildung unreifer und in ihrer Struktur und Funktion abnormaler Tumorgefäße ist eines der pathologischen Kennzeichen maligner Gliome^{143,45}, sodass die Kontrolle der Blutversorgung ein vielversprechendes Ziel in der Behandlung des Glioblastoma multiforme darstellt. Studien antiangiogener Therapieansätze (bspw. anti-VEGF) deuten auf eine Resistenz der Tumore durch die Hochregulation anderer angiogener Faktoren hin¹¹, sodass die Betrachtung weiterer angiogener Mechanismen in der Tumor(angio)genese hochmaligner Hirntumoren und die Exploration zusätzlicher antiangiogener Therapieansätze erforderlich ist. Der in den 90er Jahren entdeckte Apelin-APLNR-Signalweg spielt neben diversen physiologischen Prozessen im menschlichen Körper vor allem in der embryonalen Angiogenese eine Rolle^{109,110,113}. Vorangegangene Studien zeigen eine Hochregulierung von Apelin und APLNR im Gewebe menschlicher Glioblastome und dort insbesondere in Arealen mikrovaskulärer Proliferationen¹⁴. Dementsprechend stellt sich die Frage, welchen Einfluss Apelin auf die Vaskularisierung und das Wachstum des GBM hat und ob der Apelin-APLNR-Signalweg ggf. sogar eine Voraussetzung für die Tumorangiogenese und das Tumorwachstum ist. Auch ist bedeutsam, ob Apelin eine Relevanz für den reduzierten Reifegrad, die abnorme Morphologie und die erhöhte Durchlässigkeit von Tumorgefäßen hat, da insbesondere dies die erhöhte Morbidität und Mortalität von GBM bedingt. Studien zu Apelin-überexprimierenden, extrakraniellen Neoplasien postulieren, dass Apelin und sein Rezeptor vorrangig für die Gefäßreifung, statt für eine Gefäßsprossung in der Tumorangiogenese verantwortlich sind und dass die apelininduzierte Normalisierung der Tumorgefäße genutzt werden kann, um die Effektivität konventioneller onkologischer Therapieverfahren zu erhöhen¹³¹.

Um den Einfluss der Apelinexpression auf Gefäßausbildung, -reifung und/ oder -durchlässigkeit im GBM zu untersuchen sowie deren Bedeutung für das Tumorwachstum zu beleuchten, verwendete ich etablierte orthotope Xenograftmodelle humaner Glioblastomzellen (U-87 MG). Die intrazerebrale Implantation von Glioblastomzellen mit regelrechter und herabgesetzter Apelinexpression im Vergleich soll zeigen, dass eine adäquate Apelinexpression als Voraussetzung für die Neovaskularisation in GBM dient. Der zentralen Arbeitshypothese nach verzeichnen U-87-Xenografts mit herabgesetzter Apelinexpression 4 Wochen nach Implantation weniger dichte Gefäßnetze im Vergleich zu Xenografts mit regelrechter Apelinexpression. Die Beantwortung dieser Hauptfragestellung erfolgt anhand der Vessel Length Density

(Gefäßlängendichte) in immunhistochemisch gefärbten Schnitten von U-87-Xenografts mit unterschiedlichem Apelinexpressionslevel in Tumor und Versuchstier. Um die Rolle von Apelin zu bekräftigen besteht die Annahme, dass extern appliziertes Apelin in der Lage ist den gering vaskularisierten Phänotyp in U-87-Xenografts mit herabgesetzter Apelinexpression zu korrigieren. Des Weiteren erwarte ich, dass ein niedriges Apelinexpressionslevel das angiogen getriebene Tumorstadium reduziert und dass demzufolge die Tumorstadien bei U-87-Xenografts mit herabgesetzter Apelinexpression 4 Wochen nach Implantation in der akquirierten MRT-Bildgebung kleiner ausfallen. Gemäß der Annahme, dass ein Defizit Apelins zu unreiferen und permeableren Gefäßen führt, sollten im Rahmen einer Nebenfragestellung Analysen zur Morphologie und Anzahl der vaskulären und perizytären Strukturen eine Vergrößerung der Durchmesser, eine Reduktion der eingenommenen Fläche und der Anzahl sowie eine herabgesetzte Anzahl von durch Perizyten bedeckten Gefäßen einnehmen. Ebenfalls gehe ich davon aus, dass Xenografts mit reduziertem Apelinvorkommen bei herabgesetzter Gefäßreife eher zu Nekrosen und Blutungen neigen. Diese Nebenfragestellungen kann die Grundlage für weiterführende Studien zur vaskulären Reifung und Funktionstüchtigkeit in der Tumorstadiumbildung bilden. Eine Bestätigung der Hauptfragestellungen eröffnet die Hoffnung, den Apelin-APLNR-Signalweg als neue therapeutische Zielstruktur zu nutzen, um über eine Blockade der Tumorstadiumbildung eine Reduktion des Wachstums von GBM zu erreichen.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau und Studienprotokoll

Für das orthotope Gliommodell dieser Arbeit wurden unter anderem unbehandelte U-87 MG-Zellen (American Type Culture Collection (ATCC®), Zugangsnummer: HTB-14™, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland, im Weiteren *Wildtyp*, U87WT) in murine Hirne inokuliert und deren Wachstum beobachtet. Neben Zellen, die als Kontrolle des lentiviralen Gentransfers mit einer non-silencing-shRNA (Open Biosystems, GE Healthcare Dharmacon, St. Leon-Rot, Deutschland) transduziert wurden¹⁹² (vgl. auch Abschnitt 1.5.3, U87NSC), wurden U-87-Zellen mit herabgesetzter Apelinexpression (U87AKD) verwendet. Die institutsintern durchgeführte Transduktion der Zellen konnte anhand der Markierung der verwendeten shRNA mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) überprüft werden und erleichterte das Auffinden der Tumorzellen in Gewebeschnitten. Als Mausmodelle wurden einerseits etablierte immundefiziente Mausstämme Rag1, Rag2 und γ Rag verwendet, welche natürlicherweise physiologische Apelinexpressionslevel zeigen (im Weiteren als eine Gruppe zusammengefasst und als *Wildtyp* bezeichnet [bezogen auf das im Versuchstier vorkommende Apelin], WT). Der immundefiziente Mausstamm Rag2 (B6.129S6-Rag2^{tm1Fwa})¹⁸¹ wurde institutsintern mit einem Apelin-Knock-out-Modell^{186,192} (vgl. auch Abschnitt 1.5.1) gekreuzt und so der Vergleich mit Mäusen mit herabgesetztem Immunsystem und deletierter Apelinexpression möglich gemacht (Rag2/APLN-Knock-out; im Weiteren *Apelin-Knock-out*, AKO; vgl. **Tabelle 1**). Um homozygote Tiere und damit eine sichere Merkmalsausprägung generieren zu können, wurden zur Identifizierung der verschiedenen Mausgenotypen – Status der Apelin-, Rag1-, Rag2-, γ - und Wildtyp-Allele – institutsintern die Apelin-, Rag1-, Rag2-Knock-out-Region sowie die γ -Mutation mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt und per Gelelektrophorese analysiert^{181,186}.

Tabelle 1 – Versuchsgruppen unter Angabe von U-87-Zellart und Versuchstiergenotyp (* die Xenotransplantation von *U87WT* in *Rag2/APLN-Knock-out-Mäuse* erfolgte nicht, da lediglich die Gruppe *U87WT / WT* für den Vergleich zur Kontrollgruppe *U87NSC / WT* von Nöten war, um einen Einfluss der Transduktion auszuschließen)

Genotyp	<i>Rag1, Rag2, cγRag</i>	<i>Rag2/APLN-Knock-out</i>
U-87-Zellen		
<i>U87WT</i>	U87WT / WT	-*
<i>U87NSC</i>	U87NSC / WT	U87NSC / AKO
<i>U87AKD</i>	U87AKD / WT	U87AKD / AKO

Die orthotope stereotaktische Implantation der U-87-Zellen wurde nach vorbeschriebener Methode durchgeführt¹⁹². Die stereotaktische Implantation von U-87-Zellen erfolgte 1 mm anterior und 1,5 mm rechts lateral des Bregmas (vgl. **Abbildung 4**) und in 4 mm Tiefe im Bereich des Nucleus caudatus des Putamens. Rekonstruierbare Implantationslokalisationen wurden mittels einer stereotaktischen Haltevorrichtung mit integrierter Messeinheit zur Bestimmung des vertikalen Bewegungsumfanges und einem reproduzierbarem Injektionsprotokoll gewährleistet. In einer 1 µl Microliter™-Spritze wurden 1 µl mit 1×10^5 wachstumsfähige U-87-Zellen in Medium ohne Ergänzungsmittel (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) über eine 22 G-Kanüle (Hamilton, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) langsam manuell über 2 min injiziert und nach der Injektion wurde die Spritze für 1 min in Position gehalten, bevor die vorsichtige Entfernung schrittweise 1 mm/min erfolgte.

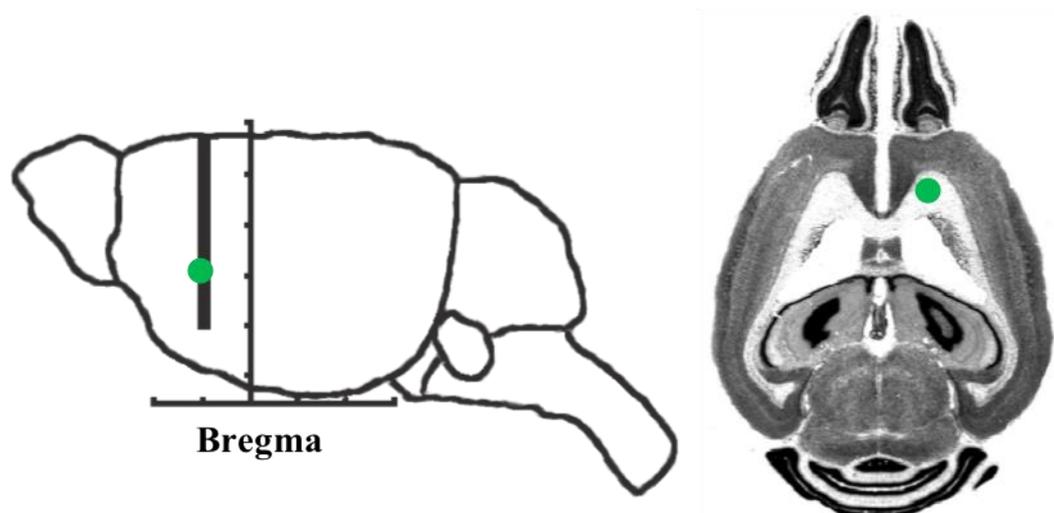


Abbildung 4 – Koordinaten zur stereotaktischen Inokulation von U-87-Zellen. U-87-Zellen wurden 1 mm anterior und 1,5 mm lateral des Bregmas in einer Tiefe von 4 mm im Bereich des Putamens plaziert (Punktmarkierung; adaptiert nach Glass, 2005, Copyright 2005 Society for Neuroscience)²⁰⁰.

Bei einem Teil der Versuchstiere wurde am Tag 10 nach Inokulation der U-87-Zellen miniosmotische Pumpen²⁰¹ (ALZET, Model 1002, Brain Infusion Kit 3, Charles River, Wilmington, Massachusetts, USA) nach vorbeschriebener Methode implantiert¹⁹² und so die kontinuierliche Gabe von artifiziellem Liquor (*artificial cerebral spinal fluid*, aCSF, Herstellung wie von ALZET beschrieben: http://www.alzet.com/products/guide_to_use/cfs_preparation.html), Apelin-13-Peptid (30 µg in aCSF; (Pyr¹)apelin-13, Ap13; Bachem AG, Bubendorf, Schweiz) oder Apelin-F13A (30 µg in aCSF; ApF13A¹⁰⁶; Bachem AG, Bubendorf, Schweiz) intrazerebral (i. c.) in das Tumorgebiet gesichert (siehe **Tabelle 2**).

Tabelle 2 – Versuchsgruppen in der Interventionskohorte

i. c.-Gabe	aCSF	Apelin-13	Apelin-F13A
Versuchsgruppe			
U87AKD / AKO	U87AKD / AKO / aCSF	U87AKD / AKO / Ap13	U87AKD / AKO / ApF13A

An bis zu vier Zeitpunkten – in den Wochen 1, 2, 3 und 4 – nach Inokulation der U-87-Zellen wurden kernspintomographische Aufnahmen des Neurokraniums durchgeführt und die Mäuse je nach Kohorte im Anschluss euthanasiert. Nach Perfusion, Fixierung und Sektion der Mäusehirne wurden Gefrierschnitte dieser angefertigt sowie histologische und immunhistochemische Färbungen erzeugt. Zur Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellungen wurden im weiteren Verlauf MRT-analytische, stereologische, bildanalytische und semiquantitative Auswertemethoden

angewendet. Von besonderem Interesse waren die Volumenbestimmung, der Wachstumsverlauf und die Phänotypen der Xenografts im Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen. In Bezug auf die Phänotypen wurden sowohl die Tendenz zur Ausbildung von Nekrosen und Blutungsneigungen als auch die Gefäßdichte, die von vaskulären Strukturen eingenommene Fläche, der Gefäßdurchmesser und die Gefäßreife (Grad der Bedecktheit durch Perizyten) beurteilt. Der Vergleich mit gesundem Hirngewebe der kontralateralen Hemisphäre wurde in Einzelfällen ebenfalls durchgeführt. Der experimentelle Ablauf ist in **Abbildung 5** dargestellt.

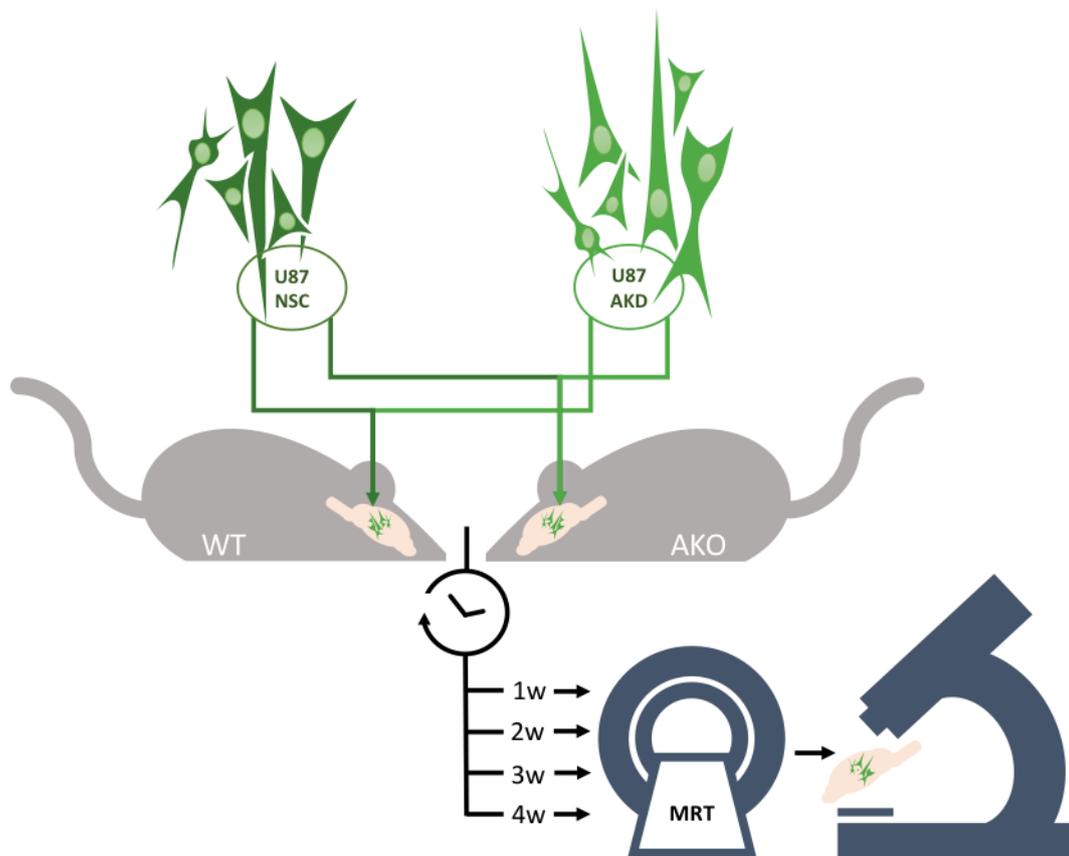


Abbildung 5 – Experimenteller Ablauf (ohne Interventionskohorte). Für das orthotope Gliommodell wurden mittels lentiviralem Gentransfer transduzierte U-87 MG-Gliomzellen in murine Hirne inokuliert. Die Versuchsgruppen ergaben sich aus der Kombination von Xenografts mit regelhafter (U87NSC) oder mit herabgesetzter Apelinexpression (U87AKD) und Versuchstieren mit physiologischem Apelinexpressionslevel (WT) oder deletiertem Apelinvorkommen (AKO). An bis zu vier Zeitpunkten – in den Wochen 1, 2, 3 und 4 – nach Inokulation der U-87-Zellen wurden kernspintomographische Aufnahmen des Neurokraniums durchgeführt und die Mäuse im Anschluss euthanasiert. Gefrierschnitte der Mäusehirne wurden angefertigt und histologische, sowie immunhistochemische Färbungen erzeugt. Zur Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellungen wurden im weiteren Verlauf MRT-analytische, stereologische, bildanalytische und semiquantitative Auswertemethoden angewendet.

3.2 Versuchstierhaltung und -demografie

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit weiblichen und männlichen, adulten Mäusen mit einem altersabhängigen Körpergewicht von > 20 g durchgeführt. Die verwendeten Mausstämme wurden über die Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) bezogen. Der genetische Hintergrund aller Stämme war stets der Inzuchtstamm C57BL/6. Während der gesamten Zeit der Zucht und Versuchsdurchführung wurden die Mäuse in der FEM versorgt. Die Tierhaltung erfolgte in spezifiziert pathogenfreier Umgebung bei einem zwölfstündigen Licht-Dunkel-Rhythmus. Die Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur (RT) wurde bei $59 \% \pm 2 \%$ und $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ gehalten. Die Verabreichung von Futtermittel und Trinkwasser erfolgte *ad libitum*. Die Versuchstiere wurden in Gruppen von 2 - 6 Mäusen auf Standardeinstreu in Kunststoffkäfigen mit Metallabdeckungen gehalten.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsdurchführungen sind durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, genehmigt und nach den Richtlinien des *United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia)* durchgeführt²⁰².

Insgesamt wurden 227 Versuchstiere beobachtet, wobei 13 Tiere (5,7 %) entweder vorzeitig verstorben sind ($n = 9$; 4,0 %) oder bei Erreichen des humanen Endpunkts ($n = 4$; 1,8 %) getötet wurden. Über die Gesamtheit betrachtet waren die Versuchstiere zu 54,6 % weiblich ($n = 124$) und zu 45,4 % männlich ($n = 103$). Im Mittel betrug das Alter der Tiere bei Implantation der Xenografts 128 Tage mit einem Minimum bei 31 Tagen und einem Maximum bei 496 Tagen (25. Perzentile = 79 Tage, 50. Perzentile = 118 Tage, 75. Perzentile = 140 Tage). Die Implantation von miniosmotischen Pumpen erfolgte bei 45 Tieren (19,8 %).

3.3 Perfusion, Fixierung und Sektion der Mäusehirne

Die Versuchstiere wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten in Woche 1, 2, 3 und 4 nach intrazerebraler Implantation der U-87-Zellen mit Pentobarbital (Narcoren®, Merial, Halbergmoos, Deutschland) in eine tiefe Narkose gelegt. Bei ausgesetzter Atmung und fehlender Tiefensensibilität wurde die Bauch- und Brusthöhle am in Rückenlage fixiertem Tier eröffnet und die linke Herzkammer an der Herzspitze punktiert. Es erfolgte die transkardiale Perfusion mit 10 ml isotonischer Kochsalzlösung (0,9 %; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) und anschließend die Perfusion mit wenigstens 10 ml Fixanslösung aus 4 % Paraformaldehyd (PFA; Merck, Darmstadt, Deutschland) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; BiochromAG, Berlin,

Deutschland). Anschließend erfolgte die Dekapitation zur Entnahme des murinen Hirns. Mit einer kleinen chirurgischen Schere wurde die Kopfhaut beginnend am Foramen magnum entfernt und die Kalotte temporal beidseits von okzipital nach rostral sowie das Os nasale in der Frontalebene durchtrennt. Die Hirne wurden sorgfältig im Ganzen unter Durchtrennung von zuführenden und abgehenden Gefäßen und Nerven aus den Kranien entnommen und zur weiteren Fixierung in 4 % PFA/PBS bei 4 °C für einige Stunden gelagert, um homogenere Markierungen in der Immunhistochemie zu erreichen. Im Anschluss wurden die Hirne zur Kryoprotektion bei der Anfertigung von Gefrierschnitten in einer 30 %igen phosphatgepufferten Zuckerlösung (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) transferiert und bis zu ihrem Absinken im 15 ml Falkontube bei 4 °C aufbewahrt. Die Fixierung mittels Sucrose basiert darauf, dass Zuckerlösungen über 10 % hyperton sind und dem Gewebe Wasser entziehen. Sobald eine Isotonie entsteht, sinkt das eingebrachte Gewebe ab. In der Weiterverarbeitung kann so die Rate an Kryoartefakte reduziert werden, welche entstehen, weil im Gewebe verbliebenes Wasser beim Gefrieren expandiert und Zellmembrane und Gewebe zerstört²⁰³.

3.4 Anfertigung von zerebralen Gefrierschnitten

Zur immunhistochemischen und histologischen Analyse des Hirngewebes wurden 30 µm dicke Frontalschnitte mit Hilfe eines rotierenden Gefriermikrotoms (Microm Cryostat HM 560, Microm GmbH, Walldorf, Deutschland) angefertigt. Hierzu wurden die ganzen Hirne nach Abtrennung des Cerebellums unter Verwendung von Tissue-Tek (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) aufrecht auf einem Korkplättchen fixiert und für 1 h bei -20 °C im Innenraum des Gefriermikrotoms abgekühlt. Nach dem Einspannen in den Objekthalter wurden erste Schnitte der Bulbi verworfen und mit Beginn der Hemisphären kontinuierlich alle Gefrierschnitte schematisch auf Objektträger bzw. als *free-floating*-Schnitte gesammelt (vgl. **Abbildung 6**). Das Sammeln der Schnitte wurde beendet sobald makroskopisch kein Tumorgewebe sichtbar war oder das Ende der Hemisphären okzipital erreicht wurde. Die Temperatur des Objekthalters wurde bei -21 ± 1 °C, die des Messers bei -23 ± 1 °C gehalten.

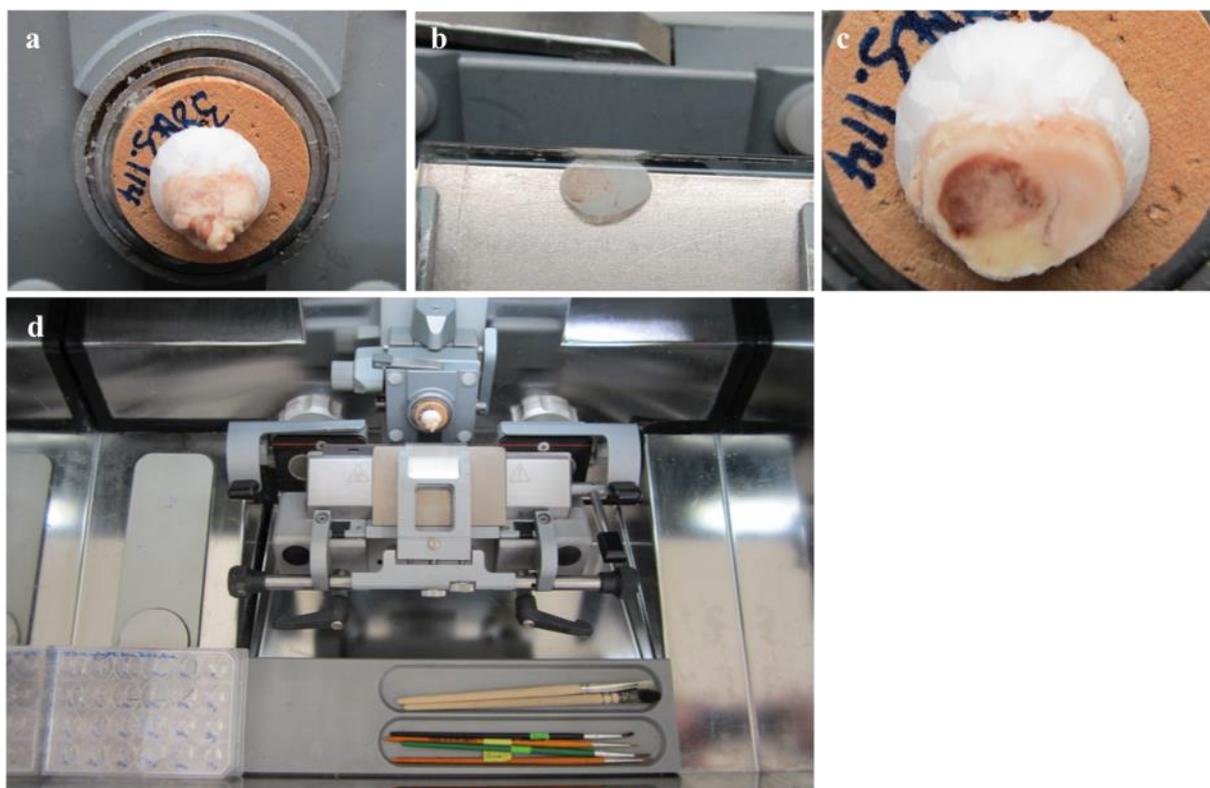


Abbildung 6 – Anfertigung von Gefrierschnitten. (a) Darstellung eines vorbereiteten murinen Hirns vor Beginn des Schneidens, (b) Gefrierschnitt, (c) Querschnitt eines murinen Hirns nach Sammlung einiger Schnitte mit Blick auf ein eingeblutetes Xenograft und (d) Sicht auf das Innere eines Gefriermikrotoms mit Überblick über verwendete Materialien.

Die angefertigten Schnitte wurden in Mikrotiterplatten (Multiwell™, 24 Well, BD Falcon®, BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) und auf Objektträgern (R. Langenbrinck, SuperFrost®, Plus Objektträger, Emmendingen, Deutschland) so gesammelt, dass jeder entstandene Schnitt in Abfolge in einer Vertiefung bzw. auf einem Objektträger weiter (in horizontaler Richtung) aufgefangen wurde. Eine Sammlungsreihe bestand aus 9 Schnitten: Schnitte I-III in den ersten drei Vertiefungen der Microtiterplatte, Schnitte IV-VI auf drei Objektträgern und Schnitte VII-IX in den nächsten (und letzten drei) Vertiefungen der Microtiterplatten. Das heißt jeder der ersten 9 Schnitte hatte einen eigenen Sammlungsort. Die nächsten und übernächsten 9 Schnitte wurden entsprechend in Abfolge zur ersten Schnittreihe gegeben, sodass Vertiefung I-III und VII-IX bzw. Objektträger IV-VI jeweils drei Schnitte enthielten. Danach wurde eine neue Reihe begonnen. Dementsprechend entstanden 9 Serien (I-IX), wobei in jeder Serie die systematische Sammlung jedes 9. Schnitts gewährleistet wurde. Die auf den Objektträgern gesammelten Schnitte (Serien IV-VI, jeweils 3 Schnitte pro Objektträger) wurden über Nacht bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag

gefärbt oder bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingelagert. Die in Mikrotiterplatten aufgefangenen Schnitte (Serien I -III und VII-IX, jeweils 3 Schnitte pro Vertiefung) wurden zur Kryoprotektion in phosphatgepufferte Glycerollösung (300 µl/Vertiefung; 150 ml Ethylenglycol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 125 ml Glycerol (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 250 ml 0,1 M PO₄-Puffer, pH = 7,4) bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Um für die verwendeten Auswertemethoden einen Überblick über den gesamten Tumor zu gewährleisten, wurden komplette Serien einzelnen Färbemethoden zugeordnet und jeweils für jede Färbemethode die gesamte Serie gefärbt.

3.5 Histologische Färbemethoden

Für die histologischen Färbemethoden wurden lediglich die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte verwendet (Serien IV-VI, jeweils 3 Schnitte pro Objektträger). Vorbereitend auf die Histologie wurden Objektträger aus der Lagerung in 4 °C für 10 min in kaltes Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland) gebracht und anschließend 10 min bei RT getrocknet. Objektträger aus der Lagerung in -80 °C wurden 20 min bei RT aufgetaut, 10 min in kaltes Aceton inkubiert, 7 min in Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und 10 min bei RT getrocknet.

3.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine Routinefärbemethode in der Histologie, welche mit zwei Einzelfärbungen die Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen möglich macht. Hämalan, die aufbereitete Form von Hämatoxylin, färbt basophile Strukturen, wie Zellkerne oder das raue endoplasmatische Retikulum, blau an. Eosin färbt alle eosinophilen Strukturen, wie Zellplasmaproteine und Teile der Extrazellulärmatrix, rot an²⁰⁴.

Nach dreiminütiger Inkubation in gereiftem Hämalan nach Mayer (Merck, Darmstadt, Germany) wurden die zu färbenden Schnitte unter laufendem Leitungswasser für 3 min gebläut. Anschließend folgte die Gegenfärbung mit Eosin (Eosin-G-Lösung; Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 20 sec und je ein kurzes Waschen in Leitungswasser und destilliertem Wasser. Das Entwässern der Schnitte erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe. Dazu wurden sie je 30 sec in 70 % und 80 % sowie je 1 min in 96 % und 100 % Ethanol (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) gegeben. Danach wurden die Schnitte zweimal 1 min mit Xylol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) behandelt und abschließend mit dem Eindeckmedium Roti[®] Histokitt II (Roth, Karlsruhe, Deutschland) unter Verwendung von Deckgläschen (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) eingedeckt.

3.5.2 Eisenfärbung

Mit der Eisenfärbung, auch *Berliner-Blau-Reaktion* genannt, lässt sich Hämosiderin nachweisen. Dieses besteht aus Bruchstücken von Ferritin und Proteinen, welche zusammen einen wasserunlöslichen Komplex bilden. Als unphysiologische Form des Speichereisens ist es nur intrazellulär als phagozytäres Abbauprodukt (z. B. in Makrophagen) zu finden und kommt besonders im Bereich von Hämorrhagien vor. Das nativ goldgelbe Hämosiderin färbt sich in der Berliner-Blau-Reaktion blau an.

Initial wurden die Schnitte mit Aqua dest. gespült. In einem Gemisch aus gleichen Anteilen von 2,5 % Ferrocyankalium (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 2 % Salzsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Schnitte anschließend für 15 min inkubiert und dann kurz erneut in Aqua dest. gespült. Nachfolgend wurden sie für 1 min in Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung (Waldeck, Münster, Deutschland) gegeben. Nach erneuter Spülung in Aqua dest. folgte das Entwässern der Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe. Dazu wurden sie je 30 sec in 70 % und 80 % sowie je 1 min in 96 % und 100 % Ethanol gegeben. Im Anschluss wurden die Schnitte zweimal 1 min mit Xylol behandelt und abschließend mit dem Eindeckmedium Roti® Histokitt II unter Verwendung von Deckgläschen eingedeckt.

3.6 Immunhistochemische Färbemethoden

Für die Immunhistochemie wurden die in Mikrotiterplatten gesammelten Hirnschnitte verwendet. Zur Vorbereitung wurden die zu färbenden Schnitte unter Einhaltung des Sammelschemas in eine neue 24-Well-Mikrotiterplatte transferiert und zweimal 5 min in PBS gewaschen um die Schnitte von der Glycerollösung zu reinigen.

Die verwendeten Marker zur Färbung von Endothelzellen und Perizyten sind unter Angabe der Verdünnung in **Tabelle 3** und **Tabelle 4** gelistet. Zur Bestätigung der Reaktion wurden Schnitte desselben Versuchstieres als Negativkontrollen parallel in einem separaten Well auf der Mikrotiterplatte mitgefärbt. Anstelle der jeweiligen Marker wurden jedoch PBS bei sonst identischem Färbeprotokoll verwendet.

Tabelle 3 – Verwendete Endothelzellen- und Perizytenmarker

Marker	Spezifität	Verdünnung	Hersteller / Händler
CD31	Ratte anti-Maus	1:50	BD Pharmingen™, Heidelberg, DE
IB4	-	1:100	Vector Laboratories: Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE
Desmin	Kaninchen anti Maus/Ratte/Mensch	1:200	Abcam, Cambridge, UK

Tabelle 4 – Verwendete Konjugate zur Endothelzellen- oder Perizytenfärbung (*Sekundärantikörper bzw. **Enzymkonjugat)

Marker	Konjugate	Wirt	Reaktivität	Verdünnung	Händler
CD31	Cy3 AffiniPure Donkey anti-Rat IgG (H+L)*	Esel	Ratte	1:100	Dianova, Hamburg, DE
IB4	ExtrAvidin®-Cy3™ **	-	-	1:50	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Desmin	Alexa Fluor® 647-Affini-Pure Goat anti-Rat IgG (H+L) (Cy5)*	Ziege	Ratte	1:200	Dianova, Hamburg, DE

3.6.1 Gefäßfärbungen (IB4, CD31)

Zur Gefäßfärbung wurden Antikörper gegen CD31 (codierendes Gen: PECAM-1) und das biotinylierte Isolectin B4 (IB4) (im Falle der Interventionskohorte) verwendet. Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule*, PECAM-1), welches auch CD31 genannt wird, ist ein transmembranes Glykoprotein, welches zu hohem Maß im Endothelium unreifer und reifer Gefäße exprimiert wird²⁰⁵. IB4 ist ein Glykoprotein, welches auf Erythrozyten der Blutgruppe B, Microglia, unmyelinisierten primär afferenten Neuronen und perivaskulären Zellen des Hirns zu finden ist. Neben der Blutgruppentypisierung wird es vielfach als ein Marker für Endothelzellen von Maus, Ratte, Kaninchen und Ziege verwendet^{206,207}.

Für die immunhistochemische Färbung unter Verwendung von Antikörpern gegen **CD31** wurden die Schnitte nach initialer Vorbehandlung für 1 h mit einer Lösung aus PBS-T und 10 % speziesspezifischem Normalserum des Esels (Vector Laboratories: Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland) behandelt, um unspezifische Epitope auf den Zelloberflächen zu blockieren. Danach folgte über Nacht die Inkubation mit Antikörpern gegen CD31 in PBS-T und 5 % speziesspezifischem Normalserum des Esels bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal 10 min in PBS gewaschen und mit Cy3-Sekundärantikörpern (vgl. **Tabelle 4**) in PBS-T und 5 % speziesspezifischem Normalserum des Esels behandelt. Lichtgeschützt wirkten die Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur ein. Nach mehrmaligem Waschen in PBS (3 x 10 min) wurden die Schnitte in einem Wasserbad aus destilliertem Wasser mit Hilfe eines Pinsels und weiterhin

unter Einhaltung des Sammlungsschemas auf Objektträger gezogen. An einem lichtgeschützten Ort wurden die Schnitte für 30 min getrocknet und anschließend mit einem wässrigen Eindeckmittel (Aquatex[®], Merck, Darmstadt, Deutschland) und einem Deckglas eingedeckt. Am Folgetag wurden die Ränder der Deckgläser mit einer Schicht aus Nagellack versiegelt um ein Austrocknen des wässrigen Eindeckmittels und das Eintreten von Luftblasen unter das Deckglas zu vermeiden.

Im Fall der Färbung mit **IB4** wurden die Schnitte nach oben beschriebener Vorbehandlung mit dem IB4-Reagenz und 0,3 % Triton[®]-X-100 in PBS (PBS-T; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie dreimal für 10 min in PBS gewaschen und mit Cy3 markiertem ExtrAvidin[®] in PBS-T in Aluminiumfolie zum Schutz vor Licht eingeschlagen und für 30 min bei RT auf dem Wippschüttler behandelt. Nach zweimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 min wurden die Schnitte wie oben beschrieben auf Objektträger aufgezogen und nach 30-minütigem Trocknen in wässrigem Eindeckmittel und Deckgläsern eingedeckt. Am Folgetag erfolgte die Applikation von Nagellack.

Die Anti-CD31-Cy3- und Anti-IB4-Cy3-Färbung wurde für einige Schnitte als Doppelfärbung in Kombination mit Antikörpern gegen Desmin durchgeführt. Die Ausführung ist im Abschnitt 3.6.2 beschrieben.

3.6.2 Färbung der Perizyten (Desmin)

Die Färbung der Perizyten erfolgte unter Verwendung von Antikörpern gegen Desmin (codierendes Gen: DES). **Desmin** ist ein Intermediärfilament und kommt im Allgemeinen in der Skelettmuskulatur, wie auch in der glatten Muskulatur, vor und dient als klassischer Marker vaskulärer glatter Muskelzellen. Jedoch hat sich gezeigt, dass auch Zellen mit kontraktile Eigenschaften, wie Perizyten, diesen Oberflächenmarker exprimieren²⁰⁸. Für Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen CD31 und Desmin bzw. IB4 und Desmin wurde lediglich der Inhalt eines Wells (3 Schnitte) einer Serie mit einer Doppelfärbung versehen. Bei der Herstellung der Verdünnungen der Primär- bzw. Sekundärantikörper wurden stets beide Primärantikörper bzw. beide dazugehörigen Sekundärantikörper in die Verdünnung gebracht (vgl. Abschnitt 3.6.1). Es wurde Normalserum der Ziege (Vector Laboratories: Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland) verwendet. Die Einwirkzeit der Sekundärantikörper ExtrAvidin[®] und Alexa Fluor[®]-Cy5 verlängerte sich gegenüber der Einzelfärbung von einer 30-minütigen Inkubation auf 1 h.

3.7 Kernspintomographische Aufnahmen der murinen Hirne

Die kernspintomographischen Aufnahmen wurden mit entsprechend der in Frisch et al. beschriebenen Methode in einem Kleintier-MRT (FOV 2,60 cm, SI 0,50/0,50 mm) in den Wochen 1, 2, 3 und 4 nach Implantation der U-87-Zellen von Dr. sc. nat. R. Kälin durchgeführt¹⁹². Die Versuchstiere wurden mittels Inhalationsnarkose mit Isofluran immobilisiert (induziert mit 3 % und aufrechterhalten mit 1,5 - 2 %, 0,5 l/min bei 100 % O₂; Forene, Abbot, Wiesbaden, Deutschland). Während der Aufnahmen wurde die Atemfrequenz (physiologisch 50 - 90 /min, ideal 70 /min) dauerhaft überwacht (*Small Animal Monitoring & Gating System*, SA Instruments, Stony Brook, New York, USA). Zur Bilderstellung des murinen Neurokranium wurden T1- und T2-gewichtete 2D Turbo Spin-Echo Sequenzen benutzt (Parameter für T1: TR / TE = 800 / 10,6 ms, RARE Faktor 2; für T2: TR / TE = 4200 / 36 ms, RARE Faktor 8) und 20 axiale Schichten mit einer Schichtdicke von 0.5 mm, einem Field of View von 2,60 x 2,60 cm und einer Matrix von 256 x 256 Pixeln akquiriert. Die T2-gewichteten MRT-Aufnahmen wurden mit ImageJ 1.46 (Wayne Rasband, NIH, USA) in das Analyseformat umgewandelt (.img) und mit Analyze 5.0 (AnalyzeDirect, KS, USA) ausgewertet. Dabei wurden Tumorregionen in jedem Schnittbild unter Verwendung der automatischen Markierungsfunktion (*Autotrace*) oder manuell (*Polygon*) markiert und anschließend mit Hilfe der Software aus markierten Flächen und der Schichtdicke von 0,5 mm das Tumolvolumen pro Versuchstier automatisch errechnet (*Sample Options > Summing: ON > Sample: alle Slices > Log Stats: ON > Sample Images*). Kernspintomographische Aufnahmen wurden von der weiteren Analyse der Tumorumfänge ausgeschlossen, wenn die Bildgebung ohne Tumornachweis blieb, sich eine Fehlimplantation, bspw. in das Ventrikelsystem, zeigte oder im Verlauf der Bildgebung ein Wachstum nach intraventrikulär oder extrakranial nachgewiesen werden konnte.

3.8 Stereologische Analyse

Um eine über das gesamte Xenograft aussagekräftige Analyse des Gefäßstatus (und der Tumorumfänge) zu gewährleisten und den Selektionsbias zu minimieren (vgl. Abschnitt 5.1.1), wurde für jedes Versuchstier eine komplette Serie der systematischen Sammlung eingeschlossen. Auf diesem Weg konnte über Stichproben im Abstand von 270 µm zueinander (9 Schnitte) der gesamte Tumor im Überblick dargestellt werden. Zur stereologischen Analyse wurde die Software *StereoInvestigator*® 10.21.1 (MicroBrightField Bioscience, Williston, VT, USA) in Kombination mit einem Olympus-BX53-Mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) und einem motorisierten Objektisch (MicroBrightField Bioscience, Williston, VT, USA) verwendet. Die Auswertung des Gefäßstatus erfolgte stets mittels Space-Ball-Methode, im Rahmen dessen für die Berechnung der VLD die

Erhebung des Tumorzvolumens als ersten Schritt im Workflow der Methode notwendig war²⁰⁹⁻²¹². Zu Beginn des Versuchsvorhabens wurde unabhängig davon bei einer kleinen Stichprobe, die Cavalieri-Methode zur Analyse der Tumorzvolumina als bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe etablierte Methode angewendet²¹³. Die Cavalieri-Methode wurde im Verlauf dieser Arbeit von der Analyse der MR-Bildgebung zur Begutachtung des Xenograftwachstums abgelöst.

3.8.1 Die Cavalieri-Methode

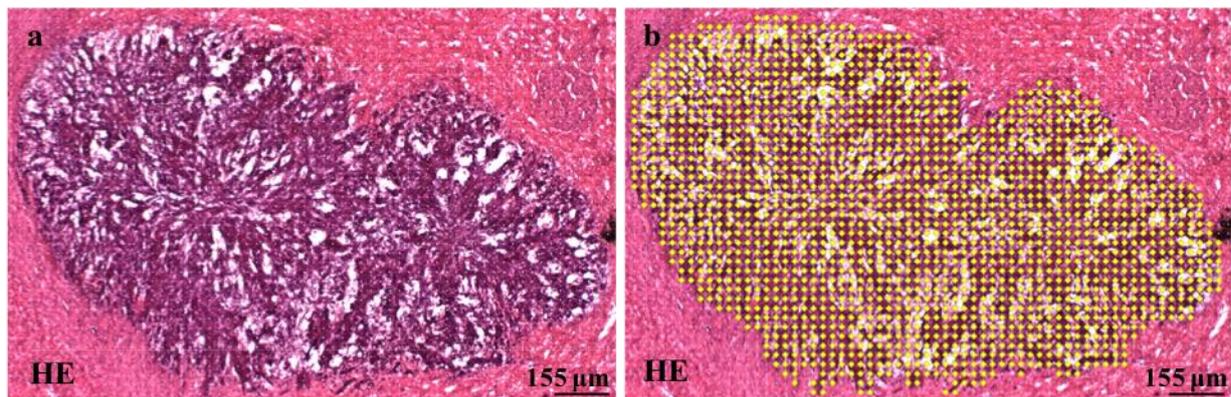


Abbildung 7 – Darstellung der Cavalieri-Methode zur Bestimmung des Tumorzvolumens mittels Punktzählung. (a) HE-gefärbtes Präparat mit eingeblendetem Raster. (b) Entlang des Rasters gesetzte gelbe Markierungen im Bereich des Tumorzvolumens.

Das Tumorzvolumen einiger Xenografts wurde mit Hilfe der HE-gefärbten Hirnschnitte und unter Verwendung der in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Cavalieri-Methode in Verbindung mit einer Punktzählung (vgl. **Abbildung 7**) berechnet²¹⁴. Zur mikroskopischen Einstellung wurden ein Plan-Apo-N-Objektiv mit 1,25- (numerische Apertur (NA): 0,04), UPlan-FL-N-Objektiv mit 4- (NA: 0,13) oder 10-facher (NA: 0,3) Vergrößerung (Olympus, Tokyo, Japan) verwendet. Initial wurde nach Aufsuchen des Schnittes der *Cavalieri Estimator* in der StereoInvestigator[®]-Software aufgerufen und ein nicht rotiertes Raster mit einem Rasterabstand von 40 µm x 40 µm über dem Schnitt generiert. Die Schnittdicke wurde bei 30 µm und das Schnittintervall bei 9 festgelegt. Im *Serial Section Manager* wurde die *Mounted Thickness* von 12 µm gewählt. Mit Hilfe von punktförmigen Markierungen (*Marquee Mode, Snap to Grid Mode*) wurde anschließend das Areal des Tumors für jeden Schnitt einzeln gekennzeichnet. Die Markierungen aller verwendeten Schnitte eines Versuchstieres wurden durch die Software in ein Gesamtvolumen umgerechnet. Die Berechnung erfolgte unter Berücksichtigung folgender Parameter: Intervall der analysierten Stichproben,

Schnittdicke, Vergrößerung und Rastergröße (vgl. **Formel 1**). Tumore, die ausschließlich Wachstum außerhalb des Kortex zeigten, wurden ausgeschlossen.

$$\text{a) } \hat{V} = A_p m \bar{t} \left(\sum_{i=1}^n P_i \right), A_p = g^2$$

$$\text{b) } [v] = t \left(k \sum_{j=1}^g a'_j - \max(a') \right)$$

\hat{V}	berechnetes Volumen
A_p	mit einer Markierung assoziierte Fläche
m	Intervall der analysierten Schnitte
\bar{t}, t	(durchschnittliche) Schnittdicke
P_i	gezählte Markierungen
g	Rastergröße
k	Korrekturfaktor
a'	projizierte Fläche
$[v]$	korrigiertes Volumen

Formel 1 – Formeln der Cavalieri-Methode zur Berechnung des Tumolvolumens. (a) Errechnetes Volumen, (b) korrigiertes Volumen der analysierten Stichprobe unter Einbeziehung von Überprojektion.

3.8.2 Die Space-Ball-Methode

Unter Benutzung der geleiteten Auswertemethode *Space-Ball-Workflow* der Software StereoInvestigator® 10.21.1 (MicroBrightField, Williston, VT, USA) in Kombination mit einem Olympus-BX53-Mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) und einem motorisierten Objektisch (MicroBrightField, Williston, VT, USA), wurde der Gefäßstatus der U-87-Xenografts analysiert. Die am Ende resultierende Komplexität des vaskulären Netzwerks (Anzahl der Markierungen / Anzahl analysierter Quadrate des Rasters, gleichzusetzen mit der durchschnittlichen Anzahl von Gefäßverzweigungen, vN) und Gefäßlängendichte (*Vessel length density*, VLD , in mm/mm^3) ermöglichen objektive Aussagen über das Ausmaß der voranschreitenden Tumorneoangiogenese durch Kapillarsprossung (vN) und die vorliegende Vaskularisation des analysierten Gewebes unabhängig von der Tumorgöße (VLD)²⁰⁹⁻²¹².

Die Space-Ball-Methode basiert auf dem Ansatz, dass anhand der Anzahl der Schnittstellen von tubulären Strukturen und einer zweidimensionalen Fläche die Länge der beobachteten tubulären Strukturen errechnet werden kann. Dabei sind die Strukturen umso länger, je höher die Anzahl der Schnittstellen sind. Die Bedingung für diesen Ansatz ist die Isotropie – die Unabhängigkeit der Ausrichtung im Raum – von der zur Analyse genutzten Fläche, der zu analysierenden tubulären Strukturen oder beiden. Im Rahmen der Space-Ball-Methode wird unter Verwendung einer isotropen Kugel (oder Halbkugel für Gewebe geringer Schnittdicke) die Gefäßlänge eines Systems aus sich dreidimensional verzweigenden Gefäßen anhand der Schnittstellen mit der konvexen Kugeloberfläche berechnet (vgl. **Abbildung 8**)²⁰⁹. In der Analyse des Gefäßstatus mittels Space-Ball-Methode kam jeweils eine komplette Serie der immunhistochemisch mit Antikörpern gegen CD31

oder gegen IB4 gefärbten Schnitte zum Einsatz. Die GFP-markierten Tumorzellen erschienen unter Verwendung des FITC-Filters grün fluoreszierend und konnten so sicher vom Normalgewebe abgegrenzt werden.

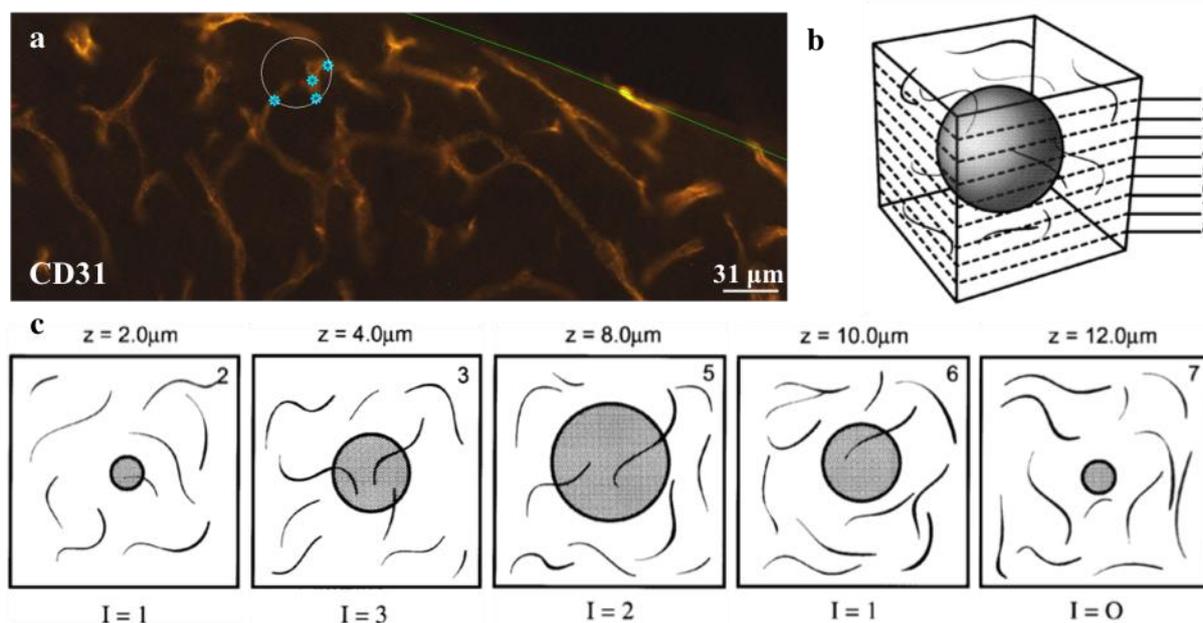


Abbildung 8 – Darstellung der Space-Ball-Methode. (a) Anwendung der Space-Ball-Methode im U-87-Xenograft mit Markierung der Schnittstellen in blau (CD31/Cy3-Färbung). (b) Dreidimensionale schematische Darstellung des verwendeten kugelförmigen Messkörpers im Gewebe, welcher (c) in zwei-dimensionalen Ebenen ($n = 8$; nur teilweise abgebildet) mit Abständen von je $2 \mu\text{m}$ auf der Z-Achse ringförmig abgebildet wird. Die Anzahl der Schnittstellen (I) von Messkörper und tubulären Strukturen ist proportional zur Länge der tubulären Strukturen im untersuchten Gewebe (adaptiert nach Mouton, 2002, ReUseLicenseNumber 4901790481316)²⁰⁹.

In der Durchführung des *Space-Ball-Workflows* wurden initial jeweils die Anzahl der zu analysierenden Schnitte, die Schnittdicke der unbehandelten Proben ($30 \mu\text{m}$, *Section Cut Thickness*) und das Intervall der auszuwertenden Schnitte ($n = 9$) angegeben. In geringer Vergrößerung (in Abhängigkeit der Tumorgroße ein Plan-Apo-N-Objektiv mit 1,25- [NA: 0,04] oder UPlan-FL-N-Objektiv mit 4-fach [NA: 0,13]) wurde das gesamte Tumorareal eines Schnittes abgebildet und als *Region of Interest* (ROI) umrandet. Die durchschnittliche Schnittdicke der behandelten und auf die Objektträger aufgetragenen Proben (*Mounted Thickness*) wurde nach Austestung der durchschnittlichen Schnittdicke an einigen Schnitten als $25,2 \mu\text{m}$ für die Gesamtheit der analysierten Schnitte festgelegt. Bei vorliegender geringer Schnittdicke der Stichproben wurde die Space-Ball-

Methode nach Mouton angepasst und eine Halbkugel verwendet. Der Radius der durch die Software generierten Halbkugeln wurde als 20 μm definiert. Im Anschluss wurde ein Raster mit einem Rasterabstand von entsprechend 250 μm x 250 μm , 880 μm x 1000 μm bzw. 1200 μm x 1200 μm über dem Tumorareal generiert. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde die Rastergröße demzufolge im Verlauf ausgetestet und verändert. In höchster Vergrößerung (40-fach [NA: 0,75]) wurden in jedem Quadrat des Rasters alle Ebenen über die Schnittdicke scharf gestellt, so dass sich die theoretisch dreidimensionale Halbkugel als zweidimensionaler, im Durchmesser sich verändernder Ring präsentierte. Alle Gefäße, die diesen Ring schnitten, sowie Gefäßverzweigungen innerhalb des Rings wurden einzeln markiert (vgl. **Abbildung 8**).

Erfasste Parameter beinhalteten die Anzahl generierter und analysierter Quadrate des Rasters über dem Tumorareal (*Number of Sampling Sites*), die durch die Space Balls errechneten Gefäßlängen (in μm), Anzahl der gesetzten Markierungen, Tumolvolumen (in μm^3) und Tumorfläche (in μm^2). So konnten die Komplexität des vaskulären Netzwerks (vN; Anzahl der Markierungen/Anzahl analysierter Quadrate des Rasters, der durchschnittlichen Anzahl von Gefäßverzweigungen entsprechend) und die Gefäßlängendichte (VLD, in mm/mm^3) bezogen auf das Tumolvolumen, welches im Rahmen der Space-Ball-Methode erhoben wurde, für jedes Xenograft ermittelt werden (vgl. **Formel 2**).

$$\text{a) } L = 2 \times \left(\sum_{i=1}^n Q_i \right) \times \frac{v}{a} \times \frac{1}{ssf}, v = xyt$$

$$\text{b) } VLD = \frac{L}{V}$$

n	Anzahl der ausgewerteten Schnitte
Q_i	gezählte Überschneidungen
v	analysiertes Volumen
a	Oberfläche der Halbkugel
ssf	Anteil der ausgewerteten Schnitte an der Gesamtheit der Schnitte
x	Rastergröße in x-Ausrichtung
y	Rastergröße in y-Ausrichtung
t	Schnittdicke
V	Tumolvolumen

Formel 2 – Formeln zur Bestimmung der Gefäßlänge (L) und der Gefäßlängendichte (VLD) errechnet anhand der Anzahl von Schnittstellen zwischen Gefäßen und der generierten Halbkugel^{209,215}.

3.9 Bildanalytische Auswertung der Gefäße und Perizyten

Neben der Untersuchung der Vaskularisation und der Tumorgroße waren morphologische Charakteristika der Gefäße und Perizyten im Gruppenvergleich von besonderem Interesse, um indirekte Rückschlüsse auf mögliche funktionelle Unterschiede der Gefäße zwischen den Versuchsgruppen schließen zu können. So wurde durch eine zusätzliche Methode die Anzahl der Gefäße und Perizyten, die von den Gefäßen bzw. Perizyten eingenommene Fläche pro Untersuchungsareal, der Gefäßdurchmesser sowie die Form von Gefäßen und Perizyten untersucht. Neben einer Analyse des Tumoreals wurde auch das Normalhirn der Gegenseite bei einigen Versuchstieren einbezogen. Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte mit Doppelfärbung anti-Desmin/Cy5 und anti-CD31/Cy3 (vgl. auch Abschnitt 3.6.2) wurden zu diesem Zweck fotografiert (AxioVision 4.8.2.0, Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland) und mit CellSens Dimension Desktop 1.6 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) analysiert. Von jedem Schnitt wurden jeweils 4 repräsentative Aufnahmen des Tumoreals (und ggf. des Normalhirns der Gegenseite) in 20-facher Vergrößerung angefertigt. Da der Inhalt eines Wells (3 Schnitte) pro Serie mit dieser Färbung versehen wurde, wurden jeweils 12 Aufnahmen (3 Schnitte á 4 Aufnahmen) für Tumoreal (und Normalhirn) in die Analyse einbezogen. Vorbereitend wurde das Bild in CellSens kalibriert (0,4957 µm/Pixel x 0,4957 µm/Pixel) und der Kontrast aller Bilder eingestellt (*Image Processing, Auto Contrast: L 0,1 %, R 0,1 %*). Die Analyse der Gefäße oder der Perizyten erfolgte unter Verwendung von Graubildern der jeweiligen Kanäle (anti-CD31/Cy3 für Gefäß- und anti-Desmin für Perizytenanalysen). Für den Grad der Bedecktheit wurde auf das Mischbild in Farbe zurückgegriffen. Um eine automatisierte Bildanalyse zu aktivieren, wurde die durch die Software schrittweise geleitete Analysefunktion *Count and Measure* genutzt. Die Mindestgröße der zu erfassenden Gefäß- oder Perizytenobjekte (*Detection Options > Minimum Object Size*) wurde auf 25 Pixel festgelegt. In Abhängigkeit der Signalintensität wurden durch die Software nach Einstellung eines Schwellenwerts für zu wertende Intensitäten Gefäß- oder Perizytenobjekte definiert. Die Gefäßanalyse erfolgte mit einem adaptierten Schwellenwert (*Adaptive Threshold, Intensity Adaption: 112, Intensity Value: adaptiert bis 256*) und die Analyse der Perizyten bzw. der Bedecktheit mit einem manuell eingestellten Schwellenwert (*Manual Threshold*). Der Schwellenwert wurde so gewählt, dass die größtmögliche Objektanzahl durch die Software erkannt wurde ohne falsch positive Objekte im umliegenden Gewebe auszuwählen. Im Anschluss wurden die morphologischen Charakteristika der definierten Gefäß- und Perizytenobjekte teils manuell, teils automatisiert mit Hilfe der Software analysiert.

Durch manuelle Markierung wurde ermittelt, wie viele Gefäße mit Perizyten bedeckt sind und wie hoch der Anteil von nicht bedeckten Gefäßen oder einzeln vorkommenden Perizyten im Vergleich zur Gesamtanzahl der Gefäße bzw. Perizyten im Untersuchungsareal ist (siehe **Abbildung 9**). Dazu erfolgte jeweils die Bildung eines Verhältnisses: Gefäß-Ratio = Anzahl der Gefäße ohne Perizyten / \sum (Anzahl der Gefäße ohne Perizyten + Anzahl der Gefäße bedeckt durch Perizyten) und Perizyten-Ratio = Anzahl der Perizyten ohne Gefäße / \sum (Anzahl der Perizyten ohne Gefäße + Anzahl der Perizyten, welche Gefäße bedecken).

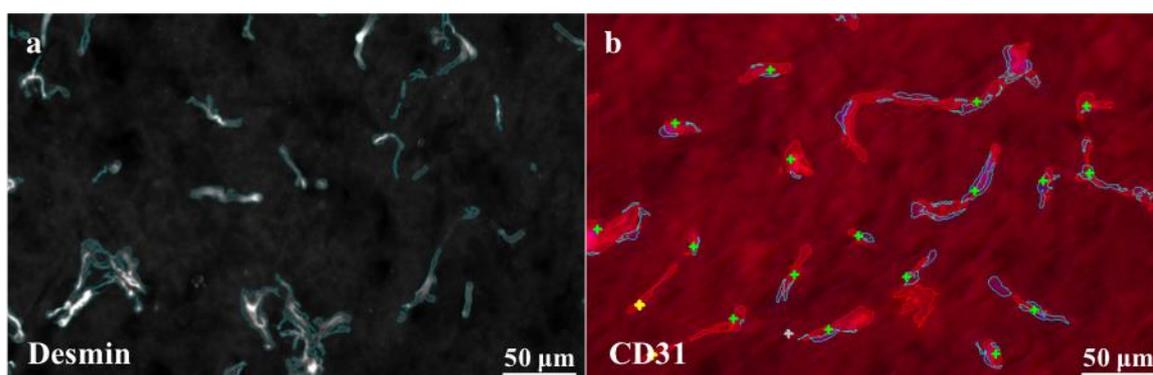


Abbildung 9 – Bildanalytische Auswertung von Perizyten und Gefäßen mittels CellSens in immunhistochemisch gefärbten Schnitten mit Doppelfärbung anti-Desmin/Cy5 (Perizyten) und anti-CD31/Cy3 (Gefäße). (a) Definierte Objekte der Perizyten im Graubild (in petrol), (b) definierte Objekte der Gefäße (in rot) und Perizyten (in blau) im Mischbild in Farbe mit Markierung von Gefäßen ohne perizytärer (gelbes Kreuz) und mit perizytärer Bedeckung (grünes Kreuz).

Die automatische Bildanalyse erfolgt anhand der Funktion *Count and Measure*, welche die vorher festgelegten über den Schwellenwert definierten Objekte registriert und auswertet. Die zu erhebenden Analyseparameter können in der Dialogbox *Class Measurement* spezifiziert werden. Zum besseren Einblick in die morphologischen Charakteristika der Gefäße von U-87-Xenografts wurden die folgenden Parameter genauer betrachtet:

- Durchschnittliche Objektanzahl (gleichzusetzen mit Anzahl der Gefäße oder Perizyten) pro analysiertem Auswertungsareal (*Site*)
- Durchschnittlicher Anteil der eingenommenen Objektflächen pro Auswertungsareal oder über alle Auswertungsareale, welcher den Anteil der Fläche aller erhobenen Objekte in einem Auswertungsareal (in %) zusammengefasst oder über alle Untersuchungsareale gemittelt (in %) angibt

- Automatisch erhobener, gemittelter, interner Objektdurchmesser (in μm), welcher durch die kürzeste Verbindung zwischen dem Objektmittelpunkt und der äußeren Begrenzung zu beiden gegenüberliegenden Seiten definiert ist. Der interne Objektdurchmesser verläuft zu keiner Zeit außerhalb des Objekts
- Durchschnittliche minimale Distanz zum Nachbarobjekt (in μm)

3.10 Semiquantitative Analyse zur Blutungs- und Nekroseneigung

Vor dem Hintergrund der in 1.4.1 beschriebenen histologischen Charakteristika wurden das Auftreten von Hämorrhagien und Nekrosen in einer Stichprobe von Xenografts mit herabgesetzter und erhaltener Apelinexpression verglichen. Die eingeschlossenen Xenografts waren nicht Teil der Interventionsgruppe, die Xenografts waren mindestens 25 Tage in situ und es lag zum Messzeitpunkt 2 Wochen nach Tumorinokulation kein im MRT detektierter Ventrikeleinbruch vor.

3.10.1 Analyse der Blutungsneigung

Zur Analyse der Blutungstendenz wurden die histopathologisch gefärbten Schnitte unter Verwendung eines Lichtmikroskops (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland) mit A-Plan-Objektiven (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland) in 5- (NA: 0,12), 10- (NA: 0,25), 20- (NA: 0,45) und 40-facher (NA: 0,65) Vergrößerung bewertet. Komplette Serien in HE-Färbung wurden in einem ersten Analyseschritt ausgewertet. Hämorrhagien wurden registriert, wenn Erythrozyten frei im Gewebe außerhalb der Gefäße (d.h. extravasal) abzugrenzen waren. Zur Quantifizierung der vorherrschenden Blutung wurde eine dreistufige Skala entwickelt (vgl. **Abbildung 10**). Für jeden Schnitt wurde anhand der Skala eine Bewertung notiert und über alle Schnitte ein Mittelwert errechnet, wobei die Graduierung mittels „-“ = 1, „+“ = 2 und „++“ = 3 erfolgte. In einem zweiten Schritt wurden als objektiver Kontrollmechanismus Eisenfärbungen von ausgewählten Schnitten durchgeführt, um die Einschätzung zum Vorliegen einer Hämorrhagie zu validieren (vgl. **Abbildung 11**).

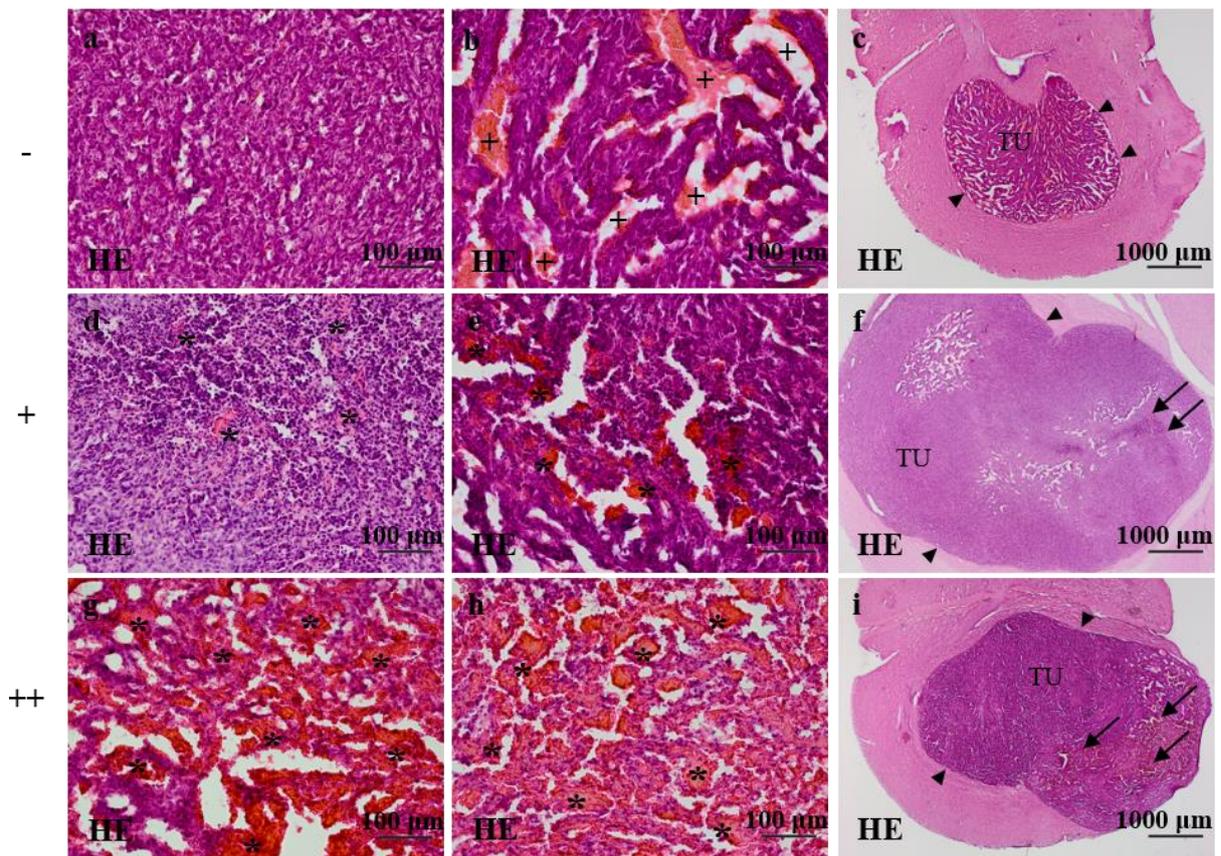


Abbildung 10 – Schweregradeinteilung von Hämorrhagien in U-87-Xenografts in (a-c) „-“ = keine Blutungszeichen, (d-f) „+“ = wenige Blutungszeichen und (g-i) „++“ = deutliche Blutungszeichen in HE-gefärbten Präparaten. Die Bildauswahl wurde unabhängig der Versuchsgruppen zur Verbildlichung der Skala getätigt. Pluszeichen (+) markieren prominente Blutgefäße mit intraluminalen Erythrozyten. (a-b), (d-e) und (g-h) stellen jeweils zwei Bildbeispiele für die unterschiedlichen Stufen der Blutungsskala in 20-facher Vergrößerung dar, wobei Sternchen (*) extraluminale Erythrozyten als Äquivalent einer Hämorrhagie markieren; (c), (f) und (i) umfassen Beispiele in 2-facher Vergrößerung. Pfeilköpfe zeigen den Tumorrand der Xenografts (TU) und Pfeile markieren Areale mit Hämorrhagien.

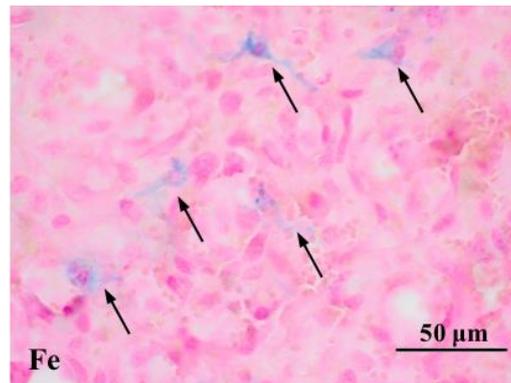


Abbildung 11 – Beispielbild zur Eisenfärbung eines U-87-Xenografts mit Markierung der Blutungsareale (Pfeile), 60-fache Vergrößerung. Die *Berliner-Blau-Reaktion* macht von Makrophagen aufgenommenes Hämosiderin (sogenannte Hämosiderophagen) in Arealen stattgehabter Blutungen in blau sichtbar. Beispielfähig ist entsprechend ein mittels dieser Eisenfärbung behandeltes Tumorareal eines Versuchstiers der Gruppe AKD / WT dargestellt in einem Blutungsareal der Graduierung „++“ (deutliche Blutungszeichen).

3.10.2 Analyse der Nekroseneigung

Die Neigung zu Nekrosen wurde in ganzen Serien der HE-gefärbten Schnitte mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland) mit A-Plan-Objektiven (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland, vgl. auch Abschnitt 3.10.1) analysiert und entsprechend auf Nekrosezeichen, wie mangelnde Kernfärbbarkeit, Karyopyknose (Schrumpfung des Zellkerns), Karyolyse, Eosinophilie, homogene Färbbarkeit des Zytoplasmas, evtl. dystrophische Verkalkung, Verlust der Zellgrenzen bei Zerstörung der Zellmembran, Demarkation im Randbereich (Phagozytose, Entzündung) und Pseudopalisadenstellung der umgebenden Zellen² (vgl. **Abbildung 12**), untersucht. Das Vorhandensein einer beliebigen Ausprägung nekrotischer Areale wurde notiert (vorhanden/nicht vorhanden).

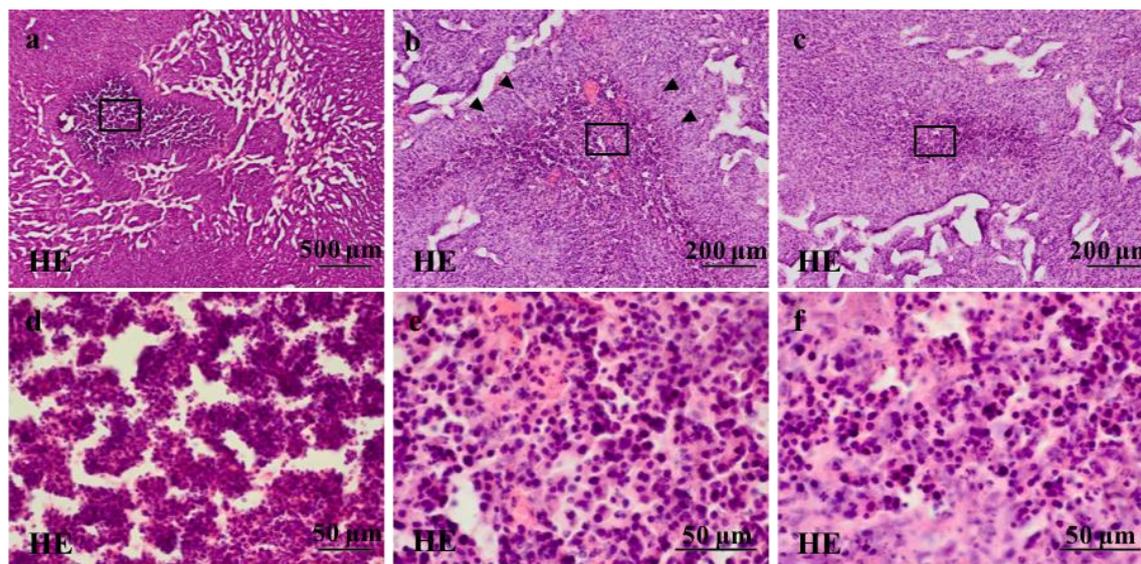


Abbildung 12 – Beispielbilder von nekrotischen Arealen in U-87-Xenografts in HE-gefärbten Präparaten (Bildauswahl unabhängig der Versuchsgruppen). Pfeilköpfe markieren Regionen von Pseudopalisaden und die Bilder (d-f) zeigen Karyopykosen, Apoptosen und Zelltrümmer (Karyolysen und Verlust der Zellgrenzen) als Zeichen zahlreicher in Untergang befindlicher oder auch bereits untergangener Zellen. Rechteckige Rahmen in (a-c) umranden die Auswahl der Vergrößerung von (a) in 4-facher zugehörig (d) in 40-facher, von (b) in 10-facher zugehörig (e) in 60-facher und von (c) in 10-facher zugehörig (f) in 60-facher Vergrößerung.

3.11 Statistische Analyse

Die statistische Analyse und die Grafikerstellung wurden mit SPSS 23 (SPSS Statistics, IBM, Ehningen, Deutschland) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden für intervallskalierte Daten numerisch als Mittelwerte (M) \pm Standardabweichung (*Standard Deviation*; SD) sowie grafisch in Boxplots unter Angabe von Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil und Maximum dargestellt. Eine Überprüfung auf Normalverteilung der Daten erfolgte mittels grafischer Überprüfung (Histogramm, QQ-Plot) und dem Test nach Shapiro-Wilk^{216,217}. Die Varianzhomogenität der Daten wurde mittels des Levene-Tests überprüft²¹⁸. Im statistischen Vergleich kam bei zwei unverbundenen Versuchsgruppen in Abhängigkeit von Normalverteilung und Varianzhomogenität entweder ein t-Test für unabhängige Stichproben nach Gosset²¹⁹ (normalverteilte Daten mit vorliegender Varianzhomogenität) ein Welch-Test^{220,221} (normalverteilten Daten mit fehlender Varianzhomogenität) oder ein Mann-Whitney-U-Test²²² (nicht normalverteilten Daten) zum Einsatz. Bei zwei verbundenen Versuchsgruppen wurde ein t-Test für abhängige Stichproben (normalverteilte Daten)²²³ oder ein Wilcoxon-Test (nicht normalverteilte Daten)²²⁴ angewandt. Bei mehr als zwei unverbundenen Versuchsgruppen wurde jeweils in Verbindung mit dem Post-Hoc-Test nach Dunn-

Bonferroni entweder die einfaktorielle Varianzanalyse²²⁵ (*Analysis of Variance*, ANOVA; normalverteilte Daten mit vorliegender Varianzhomogenität), der nichtparametrische Test nach Kruskal-Wallis²²⁶ ([nicht] normalverteilten Daten mit fehlender Varianzhomogenität) oder die mehrfaktorielle Varianzanalyse²²⁷ (> 1 Gruppierungsvariable) angewendet. Die Größe des Effektes wird mittels Korrelationskoeffizient r als Maß des Zusammenhangs (Interpretation: $r = 0,1$ kleiner Effekt, $r = 0,3 - 0,5$ mittlerer Effekt, $r > 0,5$ starker Effekt) verdeutlicht. Zur Analyse der dichotomen Variablen der Blutungs- und Nekroseneigung wurde der Binomialtest verwendet²²⁸. Multiples Testen wurde mit Bonferroni-Korrektur berücksichtigt und die Signifikanzwerte (p-Werte) werden wie folgt angegeben: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$ ²²⁹.

3.12 Fotografieren und digitale Grafikprogramme

Zum einen wurden die immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitte mit einem Mikroskop vom Typ Zeiss Observer.Z1 begutachtet und über die angeschlossene Axio-Cam-MRC-Kamera mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware AxioVision 4.8.2.0 (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland) fotografiert. Zum anderen wurde eine Olympus-XM10-Kamera in Kombination mit einem Olympus-BX53-Mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) benutzt. Für die histologisch gefärbten Schnitte wurde ein Olympus-BX50-Lichtmikroskop, die angeschlossene Olympus-DP25-Kamera (Olympus, Tokyo, Japan) und die Bildverarbeitungssoftware cell^D (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland) verwendet. Die Bildbearbeitung und -beschriftung erfolgte mit den Programmen GIMP (GNU Image Manipulation Program, Version 2.8.10), Adobe® Photoshop® CS3 (Adobe®, San Jose, CA, USA) und Microsoft PowerPoint (Microsoft Office, Redmond, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Der durch Apelinvorkommen in Tumor und Wirt bedingte Effekt auf die Vaskularisierung in U-87-Xenografts

Für die Versuchsdurchführung stand im zentralen Interesse, ob und welche der parakrinen und autokrinen Signalmechanismen Apelins die Tumorangiogenese des GBM beeinflussen, vgl. **Abbildung 13**. Zum einen wurde der Anteil der tumorzellbedingten Apelinexpression an der Tumorangiogenese im Sinne des parakrinen Expressionsmechanismus durch den Vergleich von U-87-Zellen mit vorhandener (*U87NSC*) und mit eingeschränkter Apelinexpression (*U87AKD*) adressiert. Zum anderen konzentrierten sich die Versuche auf den Einfluss von Apelin, welches in der Tumorumgebung ausgeschüttet wird. Im Prozess der Tumorangiogenese wachsen Gefäße des Wirts in das Tumoreal ein und endotheliale Zellen dieser sprossenden Kapillarspitzen exprimieren Apelin in autokriner Form^{14,230-232}. Welche Rolle dieses von vaskulären Strukturen des Wirts ausgeschüttete Apelin übernimmt, wurde durch den Vergleich von Versuchstieren, deren Apelinexpression physiologisch (*WT*) oder fehlend (*AKO*) ist, realisiert.

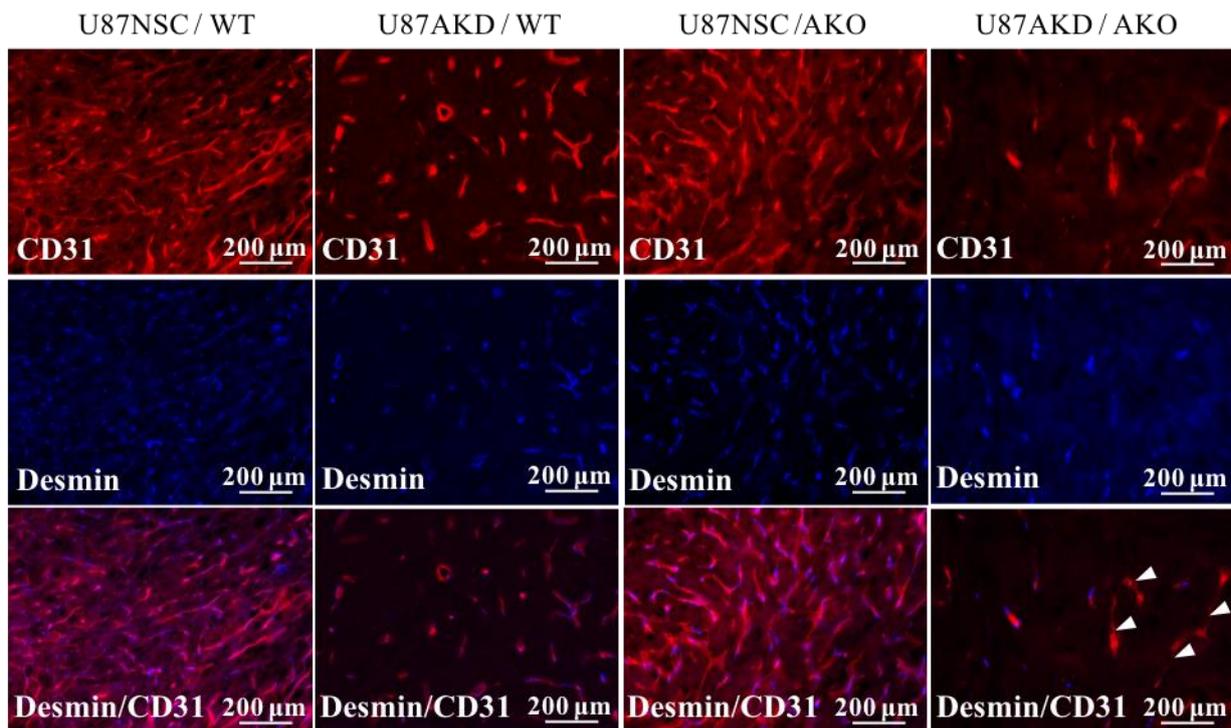


Abbildung 13 – Die apelinabhängige Vaskularisation von U-87-Xenografts. Transfizierte U-87-Zellen mit vorhandener (*U87NSC*) oder mit fehlender Apelinexpression (*U87AKD*) wurden immundefizienten Mäusen mit physiologischer (*WT*) oder eingeschränkter (*AKO*) Apelinausschüttung implantiert und wuchsen innerhalb von 4 Wochen zu orthotopen Xenografts heran. Immunhistochemische Färbungen von Xenografts 4 Wochen nach Inokulation mit Antikörpern gegen CD31 (vaskuläre Strukturen) und Desmin (Perizyten) sind nach Versuchsgruppen geordnet und jeweils als Einzelfärbung – CD31 (in rot) und Perizyten (in blau) – und als Doppelfärbung dargestellt (20fache Vergrößerung). Weiße Pfeilspitzen markieren Gefäße ohne nachweisbare perizytäre Bedeckung in der Doppelfärbung der Versuchsgruppe *U87AKD / AKO*.

Die Gefäßanalyse mittels Space-Ball-Methode der so entstehenden vier Versuchsgruppen weist auf eine Korrelation zwischen dem vorhandenen Level an Apelin und dem Ausmaß der Tumorangio-genese hin, gemessen an VLD ($n = 39$, $p < 0,001$, nichtparametrischer Test nach Kruskal-Wallis), der Gesamtgefäßlänge ($n = 39$, $p < 0,001$, nichtparametrischer Test nach Kruskal-Wallis) und der Komplexität des vaskulären Netzwerks ($n = 39$, $p < 0,001$, nichtparametrischer Test nach Kruskal-Wallis). Herabgesetzte Mengen des zur Verfügung stehenden Apelins im Xenograft führte zu einer signifikanten Reduktion der Tumolvaskularisation vier Wochen nach Implantation der Tumorzellen. Liegt neben einer Reduktion der Apelinexpression in den U-87-Tumorzellen auch eine Deletion der Apelinausschüttung im murinen Wirt vor, wird diese Wirkung verstärkt und die Neoangiogenese weiter reduziert. So präsentieren die Xenografts der Gruppe *U87NSC / WT* vier Wochen nach Implantation eine sehr dichte Vaskularisierung im Tumorareal

(VLD = 3979 mm/mm³), während Xenografts der Zelllinie U87AKD in Tieren des Apelinwildtyps (*U87AKD / WT*) im Vergleich dazu eine um ca. 60 % reduzierte VLD von 1574 mm/mm³ aufzeigten (vgl. **Abbildung 14a** und **Tabelle 5**; $p = 0,003$, Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni; $r = 0,77$). Die Injektion von U87NSC in AKO-Mäuse resultierte in einer mäßiggradigen, nicht-signifikanten Reduktion der VLD auf 2574 mm/mm³ (im Vergleich zu *U87NSC / WT* um 35 %, $p = 0,329$, Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni), was darauf hinweist, dass vor allem das durch Tumorzellen ausgeschüttete Apelin proangiogene Wirkungen zeigte. Die kombinierte Ablation der Apelinexpression in U-87-Zellen und im Wirt der Versuchsgruppe *U87AKD / AKO* blockiert die Tumorangio-genese im höchsten Maße (VLD = 756 mm/mm³). Sie führte zu einer 81 % geringeren Gefäßlängendichte im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$, Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni; $r = 1,15$) und lag damit unter den bisher berichteten Werten zwischen 1142 mm/mm³ und 1359 mm/mm³ für den tumorfreien Hippocampus adulter Mäuse^{192,233}.

Tabelle 5 – Ergebnisse von VLD, Netzwerkkomplexität und Gesamtgefäßlänge vier Wochen nach Implantation unter Angabe der Versuchstieranzahl pro Gruppe. Die stärkste Reduktion von VLD, vN und Gesamtgefäßlänge ist in der Versuchsgruppe *U87AKD / AKO* zu verzeichnen.

		<i>VLD</i>	<i>Netzwerkkomplexität</i>	<i>Gesamtgefäßlänge</i>	<i>Gesamtanzahl</i>
		<i>M (SD) in mm/mm³</i>	<i>M (SD)</i>	<i>M (SD) in mm</i>	<i>(n)</i>
<i>Versuchsgruppe</i>	U87NSC / WT	3979 (395)	6,90 (2,70)	195962 (82751)	8
	U87AKD / WT	1574 (714)	2,35 (1,07)	45853 (36085)	12
	U87NSC / AKO	2574 (1146)	4,28 (1,44)	39016 (37574)	9
	U87AKD / AKO	756 (294)	1,18 (0,48)	21706 (21131)	10
<i>Gesamtanzahl (n)</i>		-	-	-	39

Entsprechend der VLD korreliert die Komplexität des vaskulären Netzwerks mit dem Level der vorhandenen Apelinexpression in den implantierten U-87-Zellen und im murinen Wirt (vgl. **Abbildung 14b** sowie **Tabelle 5**). Wiesen die Xenografts der Kontrollgruppe (*U87NSC / WT*) mit 6,90 eine hohe Komplexität des vaskulären Netzwerks auf, reduzierte die sowohl in Tumor, als auch Wirt eingeschränkte Apelinausschüttung der Versuchsgruppe (*U87AKD / AKO*) die durch den Mechanismus der Kapillarsprossung vorangetriebene Tumorneoangiogenese in höchstem Maße ($p < 0,001$, Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni; $r = 1,17$). Eine durchschnittliche Anzahl von Gefäßverzweigungen von 1,18 in dieser Versuchsgruppe deutet auf eine niedrige (nahezu lineare) Komplexität des vaskulären Netzwerks und einen geringen Stellenwert der angiogenen Kapillarsprossung im Tumorwachstum hin. Dieses Ergebnis entspricht erneut geringeren Werten

als im tumorfreien Striatum ($vN = 2,6$)¹⁹². Im Gegensatz zur VLD und vN als Maß der durch Kapillarsprossung vorangetriebenen Tumorangiogenese zeigt sich die Gesamtgefäßlänge (VLD multipliziert mit dem individuellen Tumolvolumen) im Gruppenvergleich bei allen Versuchsgruppen mit eingeschränkter Apelinexpression, unabhängig vom tumoralen oder murinen Vermögen Apelin auszuschütten, reduziert (vgl. **Abbildung 14c** sowie **Tabelle 5**).

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Versuche, dass sowohl die parakrin (vom Tumor) als auch die autokrin (über die vaskulären Strukturen des Wirts) gesteuerte Apelinausschüttung maßgebliche Auswirkungen auf die Tumorangiogenese des GBM hat und das Ausmaß dieser bestimmt.

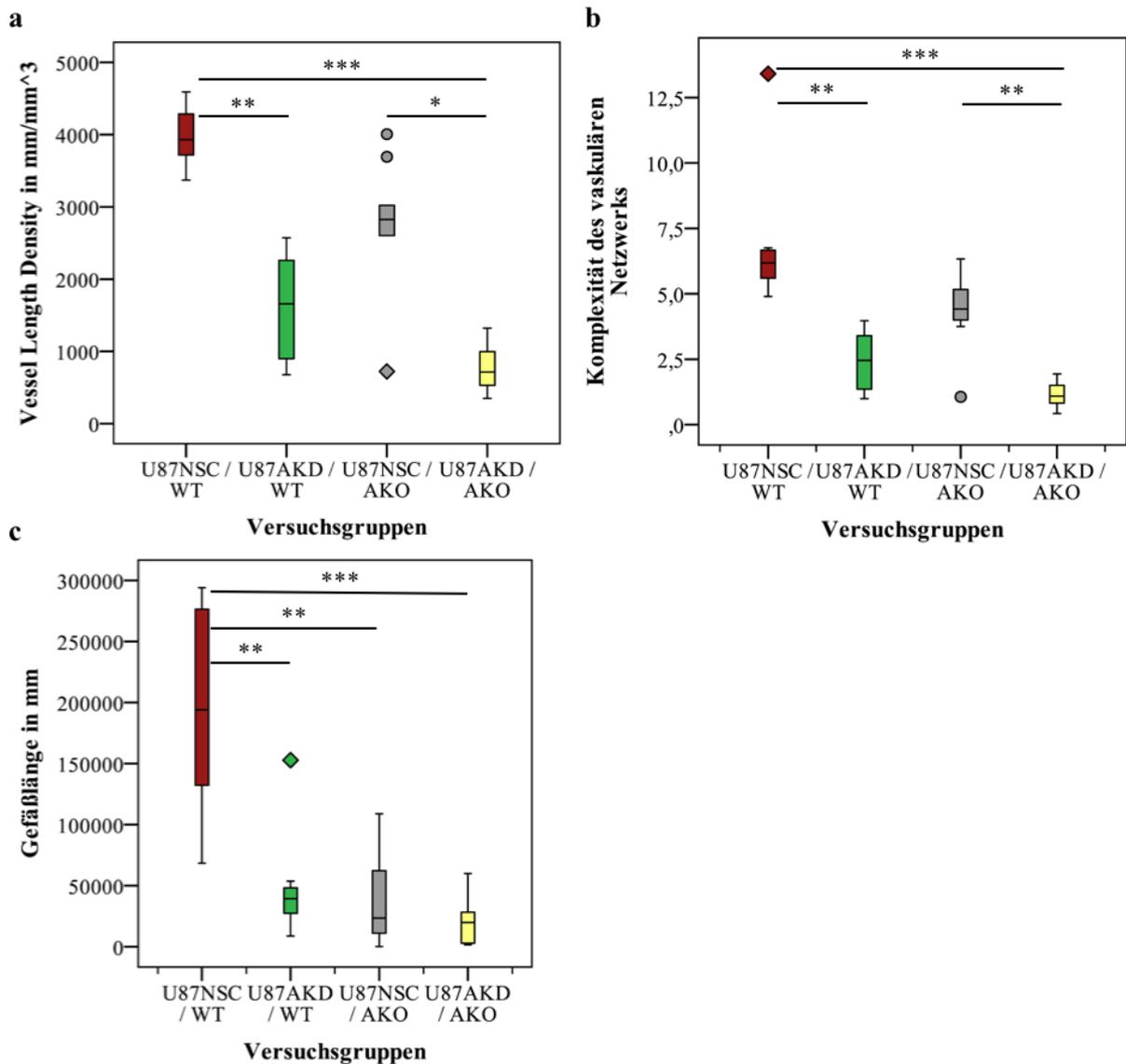


Abbildung 14 – Sowohl die Apelinausschüttung des Tumors als auch die des Wirts beeinflussen die durch Kapillarsprossung vorangetriebene Tumorangiogenese von U-87-Xenografts. Das mittels der stereomorphologischen Space-Ball-Methode analysierte Gefäßnetz zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe (*U87NSC / WT*, $n = 8$) eine Reduktion von (a) VLD, (b) vN und (c) Gesamtgefäßlänge in der Gruppe mit eingeschränkter Apelinexpression der Tumorzellen (*U87AKD / WT*, $n = 12$). Ein zusätzlicher Verlust der murinen Apelinausschüttung in der Versuchsgruppe *U87AKD / AKO* ($n = 10$) führte im Vergleich der Mittelwerte zur stärksten Unterdrückung der Tumolvaskularisation mit Reduktion der VLD um 81 %, der vN um 83 % und der Gesamtgefäßlänge um 89 %. Während die Ergebnisse zur Komplexität des vaskulären Netzwerks die Resultate der VLD spiegeln, war die Gesamtgefäßlänge in allen Versuchsgruppen mit verminderter Apelinexpression (unabhängig von tumoraler oder muriner Herkunft) stark herabgesetzt. Darstellung der statistischen Signifikanz mittels $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ nach nichtparametrischem Test nach Kruskal-Wallis und Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni; *U87NSC / AKO*, $n = 9$.

4.2 Die spezifische Wirkung des Apelin-13 auf die Gefäßdichte im neu gebildeten Tumorgefäßnetz von U-87-Xenografts

Weiterführende Versuchsreihen adressierten die Frage, ob die Apelindefizienz unseres Mausmodells *AKO* zu Alterationen in Signaltransduktionskaskaden angiogener Prozesse führt oder ob die Apelinantwort mittels des Apelinrezeptors potenziell weiterhin besteht. Dazu erfolgte die kontinuierliche Gabe von bioaktivem Apelin-13-Peptid in das *U87AKD / AKO* Xenograft von 8 Versuchstieren ab Tag 10 bis vier Wochen nach Tumorimplantation (*U87AKD / AKO / Ap13*, vgl. Abschnitt 3.1). Im Vergleich zur Kontrollgruppe dieses Settings, welche lediglich die Infusion von artifiziellem Liquor erhielt, ergab sich eine partielle Rekonvaleszenz der Tumorneovaskularisation, erkennbar an der höheren Gefäßlängendichte von 2734 mm/mm^3 (*U87AKD / AKO / Ap13*) versus 1269 mm/mm^3 (*U87AKD / AKO / aCSF*, $n = 8$, $p = 0,005$, Mann-Whitney-*U*-Test, $r = 0,68$) und der höheren Komplexität des vaskulären Netzwerks von $4,17$ versus $2,13$ ($p = 0,005$, Mann-Whitney-*U*-Test, $r = 0,68$); vgl. **Abbildung 15**. Im Gegensatz dazu konnte bei einer Gabe des am C-terminalen Ende mutierten Peptids Apelin-F13A, welches in der Vergangenheit bereits als Antagonist des APLNR verwendet wurde^{106,192} (vgl. Abschnitt 1.3), keine signifikante Veränderung der Tumorangiogenese in der Interventionsgruppe *U87AKD / AKO / ApF13A* ($n = 7$, $VLD = 1419 \text{ mm/mm}^3$, $vN = 2,13$) im Vergleich mit der Kontrollgruppe *U87AKD / AKO / aCSF* festgestellt werden ($p_{VLD} = 0,397$ und $p_{vN} = 0,694$, Mann-Whitney-*U*-Test, vgl. **Abbildung 15**).

Die Ergebnisse unterstützen die These, dass obwohl es dem Mausmodell *AKO* an endogenem Apelin mangelt, es jedoch in der Lage ist auf exogenes oder auf aus dem Tumor stammendem Apelin zu reagieren. Dieser Umstand fügt sich in die bisher ausgeführten Ergebnisse einer graduell gehemmten Vaskularisation der Versuchsgruppen in Abhängigkeit von tumoral oder murin vorhandenem Apelinvorkommen ein (vgl. Abschnitt 4.1). Fehlendes Apelin in den Tumorzellen oder im Wirt führt zu Xenografts mit reduzierter Vaskularisation im Vergleich zu unangetastetem Apelinvorkommen. Eine Reduktion in sowohl Tumorzellen und murinem Wirt resultierte hingegen in einem synergistischen antiangiogenen Effekt. Die partielle Rekonvaleszenz des vaskulären Phänotyps durch die Hinzugabe des Peptids Apelin-13 zu Xenografts mit deletierter Apelinproduktion zeigt im Umkehrschluss, dass die vaskulären Parameter VLD und vN spezifisch durch Aktivierung von Apelinsignalkaskaden beeinflusst werden.

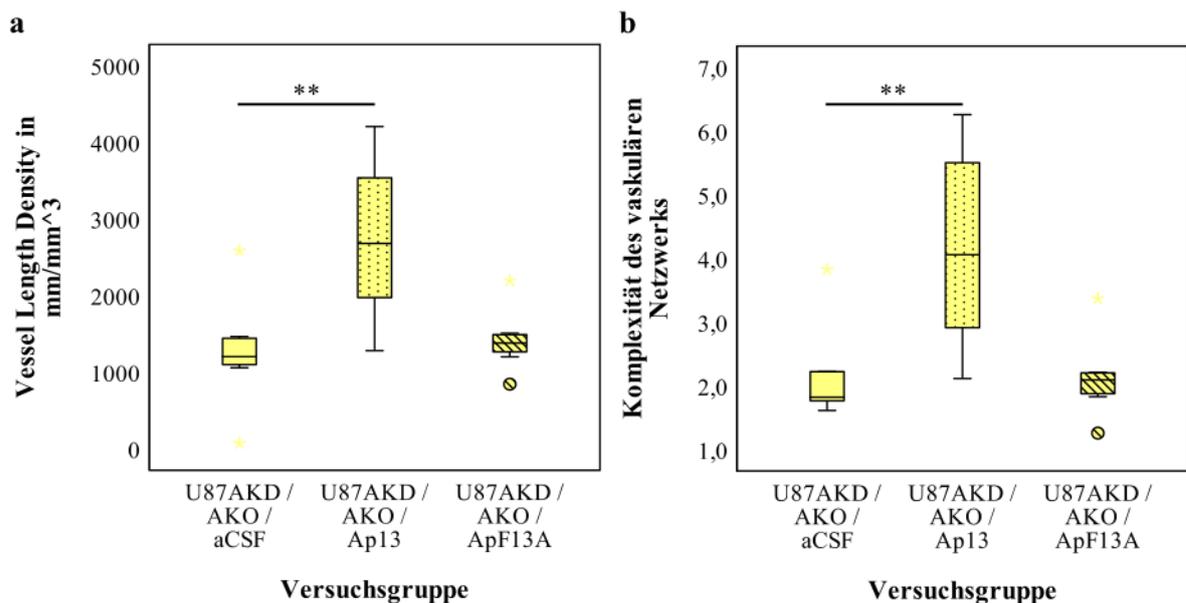


Abbildung 15 – Eine exogene Apelingabe rettet den vaskulär defizitären Phänotyp von *U87AKD/AKO*. Als Interventionsstudie erfolgte in der Versuchsgruppe mit herabgesetzter Apelinproduktion in Tumor und Wirt (*U87AKD/AKO*) die intratumorale Infusion von bioaktivem Apelin-13-Peptid (Ap13, n = 8), artifiziellem Liquor (aCSF, n = 8) oder am C-terminalen Ende mutiertem Peptid Apelin-F13A (ApF13A, n = 7) mittels miniosmotischer Pumpe ab Tag 10 bis zur Euthanasie 4 Wochen nach Inokulation. Die Gabe von 30 µg Apelin-13-Peptid in das Tumoreal erhöhte die Xenograftangiogenese in *U87AKD/AKO*-Mäusen, gemessen an (a) VLD und (b) vN, im Vergleich zur alleinigen Gabe von artifiziellem Liquor (aCSF) und bewirkte so eine partielle Rekonvaleszenz der Tumorneovaskularisation in der sowohl tumoral als auch murin apelineletierten Versuchsgruppe. Weder die (a) VLD noch die (b) vN wurden durch einen Antagonisten von Apelin (ApF13A) signifikant beeinflusst. Darstellung der statistischen Signifikanz mittels $**p < 0,01$ nach Mann-Whitney-*U*-Test.

4.3 Hemmung des von der Angiogenese abhängige Tumorstums in U-87-Xenografts bei Verlust der Apelinexpression

Um den Effekt von Apelin auf das Tumorstum beurteilen zu können, wurden die Tumorstumina der orthotopen U-87-Xenografts sowohl histologisch nach Euthanasie der Versuchstiere als auch *in vivo* über die Zeit mittels longitudinaler kernspintomografischer Bildgebung (MRT) analysiert. Die inokulierten U-87-Tumorstumzellen wuchsen innerhalb von 4 Wochen insbesondere in der Kontrollgruppe *U87NSC/WT* zu kompakten und sehr großen Xenotransplantaten heran bevor die Tiere euthanasiert wurden. Im Vergleich dazu wurde bei Tumorstum in einer Umgebung mit fehlender Apelinexpression (*U87NSC/AKO*, *U87AKD/AKO*) kleinere Tumorstumvolumina detektiert, vgl. **Abbildung 18** und **Abbildung 19**.

4.3.1 Analyse der Tumorumina mittels Cavalieri-Methode

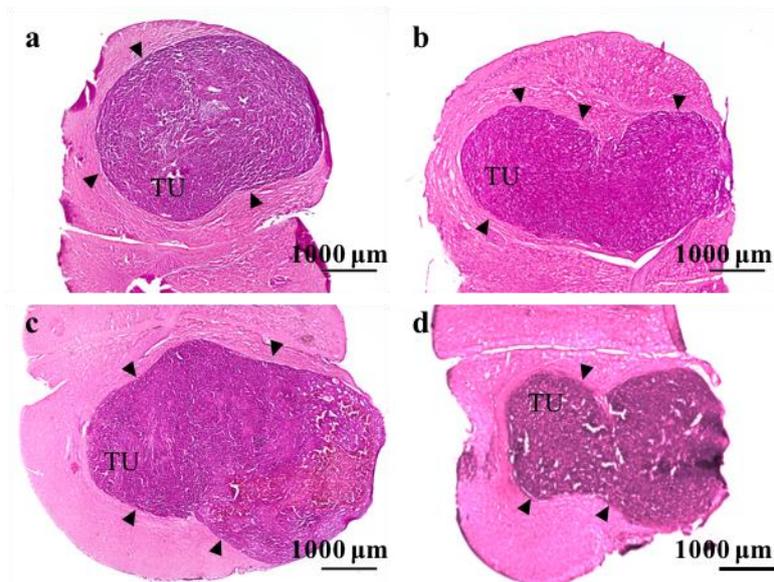


Abbildung 16 – Mittels HE-Färbung aufbereitete Xenografts der Versuchsgruppen (a) *U87NSC/WT*, (b) *U87NSC/AKO*, (c) *U87AKD/WT* und (d) *U87AKD/AKO* vier Wochen nach Implantation in 2-facher Vergrößerung zeigen kleinere Tumorumina in den Versuchsgruppen mit reduziertem vaskulären Apelinvorkommen (*U87NSC/AKO* und *U87AKD/AKO*). Pfeilköpfe markieren den Tumorrand der Xenografts (TU).

Die Analyse der Tumorumina mittels Cavalieri-Methode wurde zu Beginn des Versuchsvorhabens neben der MRT-Analyse als erste Sichtung des Wachstumsverhaltens bei einer kleinen Stichprobe durchgeführt. Die Versuchsgruppe *U87NSC/AKO* wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt im Versuchsvorhaben ergänzt und ist somit in dieser Ergebnisdarstellung nicht erwähnt. Die mit Hilfe der Cavalieri-Methode ermittelten Tumorumina vier Wochen nach Implantation zeigten bei geringer Gruppengröße keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen *U87NSC/WT* ($n = 4$; $M = 51,88 \text{ mm}^3$, $SD = 25,29 \text{ mm}^3$), *U87AKD/WT* ($n = 5$; $M = 44,05 \text{ mm}^3$, $SD = 19,81 \text{ mm}^3$) und *U87AKD/AKO* ($n = 2$; $M = 31,09 \text{ mm}^3$, $SD = 7,08 \text{ mm}^3$), $p = 0,518$, nicht-parametrischer Test nach Kruskal-Wallis; vgl. **Abbildung 17**), jedoch ließen sie eine geringere Tumorumgröße in der Gruppe mit murin und tumoral herabgesetzter Apelinexpression *U87AKD/AKO* entsprechend der kernspintomographischen Ergebnisse erkennen.

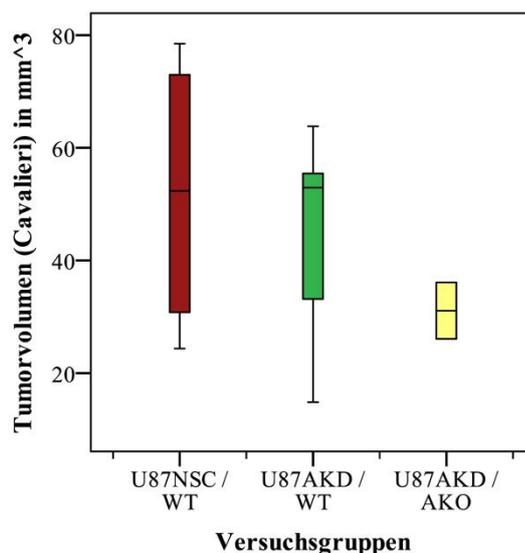


Abbildung 17 – Tumolvolumina in HE-gefärbten Schnitten ermittelt nach Cavalieri-Methode bei einem Tumoralter von vier Wochen nach Inokulation ergeben keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Versuchsgruppen (n. s., $p = 0,518$, nichtparametrischer Test nach Kruskal-Wallis, $n = 4, 5, 2$), wobei eine um 40 % geringere Tumorgröße in der Gruppe mit murin und tumoral herabgesetzter Apelinexpression *U87AKD / AKO* auffiel.

4.3.2 Kernspintomographische Bildgebung und Analyse der Tumolvolumina von U-87-Xenografts

Longitudinale MRT derselben Versuchstiere ließen die Beobachtung des Tumorwachstums *in vivo* im Verlauf zu (vgl. **Abbildung 18**). Die Bildgebung der analysierten MRT (ohne Interventionskohorte) wurde an bis zu vier Zeitpunkten (1 - 4 Wochen) nach Implantation des Xenografts durchgeführt, wobei dies im Median am 8. Tag nach Implantation (*postoperative day*, *POD*, *MRT I*; $n = 39$; $POD_{\min} = 6$ d; $POD_{\max} = 9$ d), 14. *POD* (*MRT II*; $n = 113$; $POD_{\min} = 13$ d; $POD_{\max} = 15$ d), 21. *POD* (*MRT III*; $n = 67$; $POD_{\min} = 18$ d; $POD_{\max} = 22$ d) und 27. *POD* (*MRT IV*; $n = 82$; $POD_{\min} = 25$ d; $POD_{\max} = 29$ d) stattfand. Die Xenotransplantate aller Versuchsgruppen nahmen exponentiell an Größe zu, jedoch steigerten sich die Tumolvolumina der Versuchsgruppen mit verminderter Apelinausschüttung im Wirt (*U87NSC / AKO* und *U87AKD / AKO*) im Vergleich zu den Gruppen mit regulärem Apelinvorkommen in der Tumorumgebung (*U87NSC / WT* und *U87AKD / WT*) zu einem geringeren Grad (vgl. **Abbildung 18**).

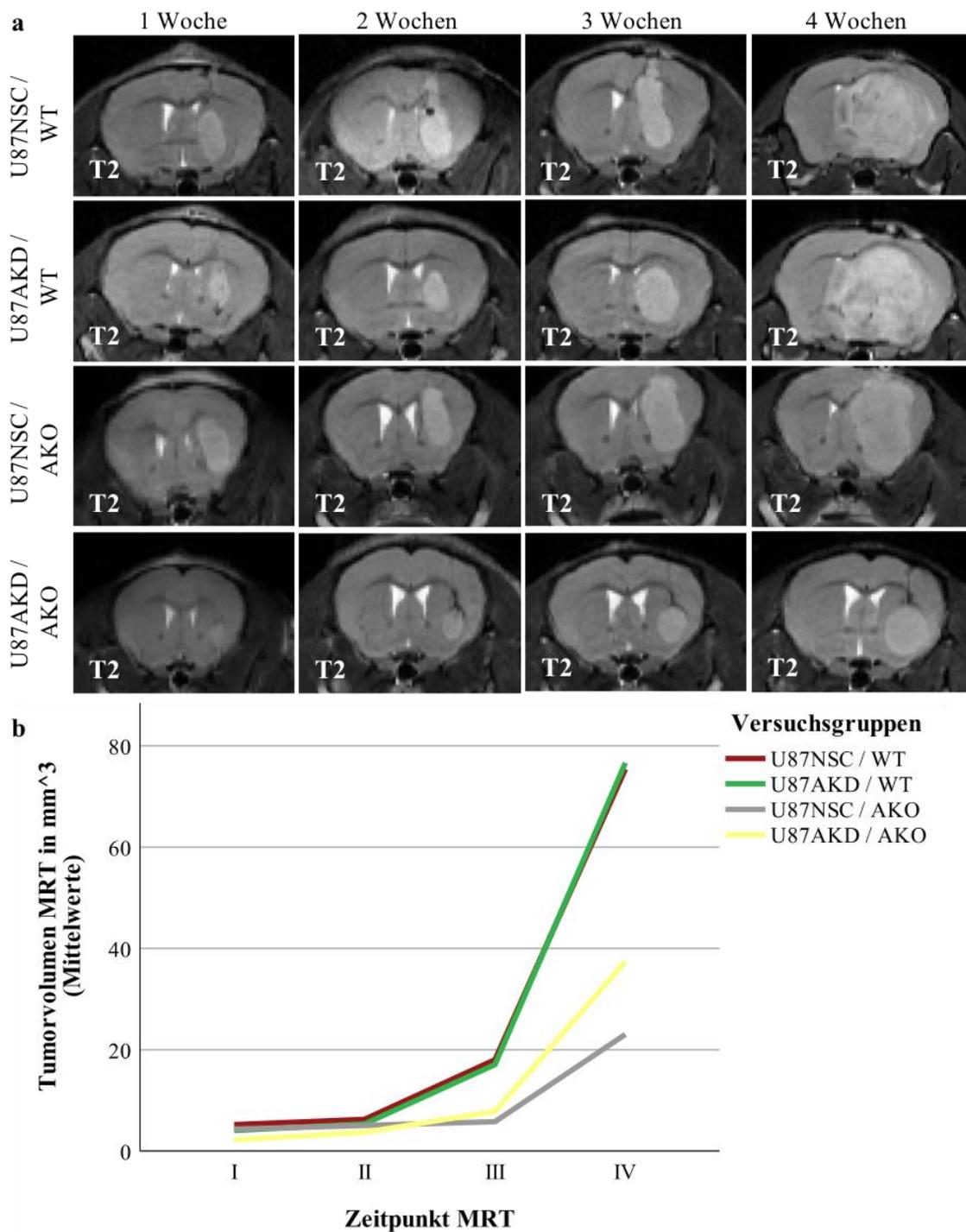


Abbildung 18 – Kernspintomographische Aufnahmen von U-87-Xenografts zeigen im Verlauf ein apelin-abhängiges Tumorwachstum. Sowohl die (a) Bildauswahl der MRT von U-87-Xenografts in murinen Hirnen *in situ*, geordnet nach Untersuchungszeitpunkten und Versuchsgruppen (T2-gewichtete Sequenzen; ohne Interventionsgruppen), als auch die (b) Quantifizierung der Tumorzvolumina im MRT über die verschiedenen Messzeitpunkte (1-4 Wochen nach Xenograftimplantation) zeigen einen stetigen Anstieg der Tumorzvolumina über die Zeit. Die Tumorzvolumina der Versuchsgruppen mit verminderter Apelinausschüttung im Wirt (*U87NSC / AKO* und *U87AKD / AKO*) verzeichneten jedoch im Vergleich zu den Gruppen mit apelin-kompetenten Tieren (*U87NSC / WT* und *U87AKD / WT*) einen geringeren Zuwachs.

Vor allem Xenografts in einem Milieu mit nahezu fehlender Apelinausschüttung (*U87AKD / AKO*) neigten schon zum Zeitpunkt MRT I und MRT II zu signifikant kleineren Tumervolumina im Vergleich zu den Versuchsgruppen *U87NSC / WT* (MRT I und II $p < 0,001$, $r_I = 0,87$ und $r_{II} = 0,52$) und *U87AKD / WT* (MRT I $p = 0,017$, $r_I = 0,58$; nichtparametrischer Test nach Kruskal-Wallis und Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni). Zu den Untersuchungszeitpunkten *MRT III* und *IV* präsentierten die Versuchstiere mit deletierter Apelinexpression (sowohl *U87NSC / AKO* als auch *U87AKD / AKO*) die kleinsten Xenografts (MRT III: $p < 0,001$, $n = 67$ und MRT IV: $p < 0,001$, $n = 83$; nichtparametrischer Test nach Kruskal-Wallis). Im Gegensatz dazu zeigten U-87-Tumore mit herabgesetzter Apelinproduktion in murinen Wirten mit intaktem Apelinvorkommen (*U87AKD / WT*) zu allen Zeitpunkten *MRT I-IV* keinen signifikanten Größenunterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe mit lentiviraler Kontrolltransfektion *U87NSC / WT* (vgl. **Tabelle 6** und **Abbildung 19**).

Tabelle 6 – Tumervolumina nach Versuchsgruppe zu den Zeitpunkten *MRT I-IV*

		<i>Tumervolumen</i>							
		<i>MRT I</i>		<i>MRT II</i>		<i>MRT III</i>		<i>MRT IV</i>	
		<i>M (SD) in mm³</i>	<i>n</i>						
<i>Versuchsgruppe</i>	<i>U87NSC / WT</i>	5,21 (1,53)	9	6,26 (2,00)	39	18,02 (18,78)	25	75,37 (58,77)	27
	<i>U87AKD / WT</i>	4,08 (1,44)	11	5,33 (2,52)	34	17,10 (9,86)	14	76,62 (59,20)	26
	<i>U87NSC / AKO</i>	4,33 (0,83)	4	5,04 (3,56)	19	5,83 (2,85)	11	23,03 (30,86)	13
	<i>U87AKD / AKO</i>	2,20 (0,79)	15	3,71 (2,35)	21	7,83 (6,67)	17	37,44 (45,24)	17

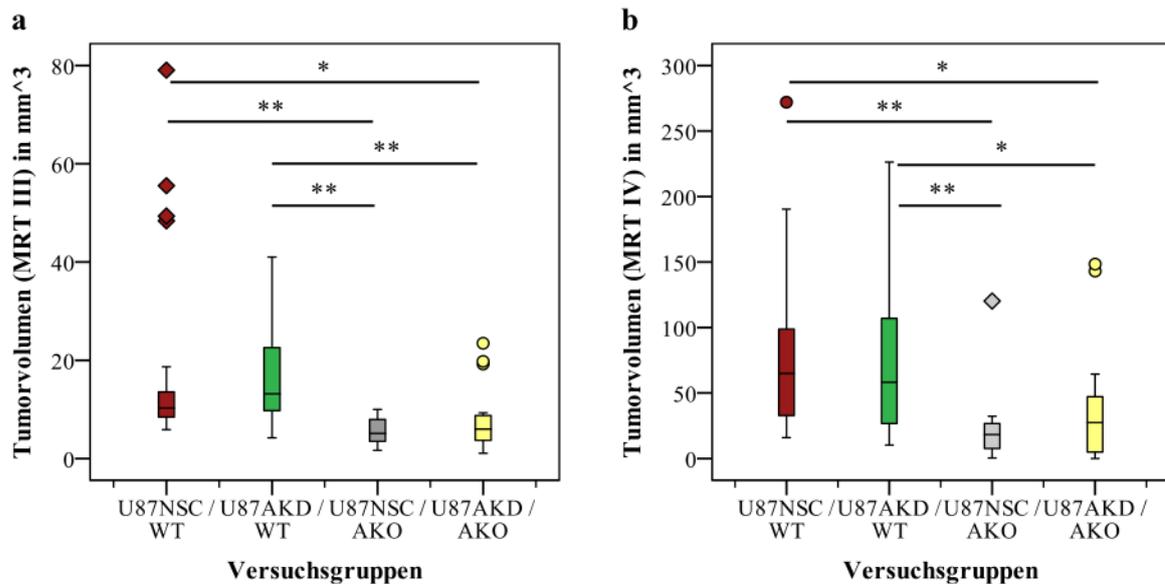


Abbildung 19 – Verlust des vaskulären Apelins führt zu kleineren Tumolvolumina von U-87-Xenografts in longitudinal erhobenen MRT (a) drei oder (b) vier Wochen nach orthotoper Implantation von U-87-Zellen. Versuchsgruppen mit reduziertem Vorkommen des vaskulären Apelins (*U87NSC / AKO*, und *U87AKD / AKO*) wiesen bis zu 69 % bzw. 44 % kleinere Tumolvolumina als die Kontrollgruppe mit erhaltener Apelinproduktion im Wirt (*U87NSC / WT*) vier Wochen nach Implantation auf; $n_{\text{MRTIII}} = 25, 14, 11, 17$ und $n_{\text{MRTIV}} = 27, 26, 13, 17$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ nach durchgeführter Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni.

4.4 Das Apelinlevel hat keinen Einfluss auf die Morphologie von Gefäßen und Perizyten in U-87-Xenografts

Entsprechend der Hypothese, dass Tumorgefäße unreifer und permeabler als Gefäße des Normalgewebes sind, war der Status der Perizyten und insbesondere der Bedecktheitsgrad der Tumorgefäße durch die Perizyten in U-87-Xenografts – auch im Vergleich zum Normalgewebe des Gehirns der Gegenseite – von besonderem Interesse. Das Maß der Perizyten-dichte an der Gefäßaußenfläche kann als Indikator für den Reifegrad der Gefäße und deren Funktion, wie die Gefäßpermeabilität²⁷, dienen (vgl. auch Abschnitte 1.1.1 und 1.2.2 sowie **Abbildung 1**). Bekanntermaßen präsentieren sich neu ausgebildete Tumorgefäße im Tumorgewebe ungleichmäßig verteilt, teils blind endend, irregulär geformt und dilatiert (vgl. auch Abschnitt 1.2.2 zur Morphologie von Tumorgefäßen)^{42,76-78}. Nachdem die ersten Versuche bestätigten, dass Apelin die durch Kapillarsprossung verursachte Tumorneoangiogenese und auch das Ausmaß der Vaskularisierung im Tumorgewebe von U-87-Xenografts beeinflusst, sollte mittels der bildanalytischen Begutachtung von immunhis-

tochemisch gefärbten Schnitten die für maligne Gewebe typische Morphologie der Gefäße bestätigt, ein möglicher Einfluss Apelins auf diese Morphologie aufgedeckt und durch die kombinierte Betrachtung von Gefäßen und Perizyten indirekte Rückschlüsse auf funktionelle Unterschiede der Gefäße zwischen den Versuchsgruppen gezogen werden. So wurde zunächst durch eine zusätzliche Methode jeweils für Gefäße und Perizyten die Anzahl, die eingenommene Fläche pro Untersuchungsareal, der Abstand zueinander und der Durchmesser im Gruppenvergleich untersucht (vgl. auch Abschnitt 3.9 zur Methodik).

Die Ergebnisse der bildanalytischen Auswertung der Gefäße korrelieren stark mit denen der in Abschnitt 4.1 beschriebenen stereomorphologischen Analyse mittels Space-Ball-Methode. Bei sowohl in Xenograft als auch im murinen Wirt eingeschränkter Apelinexpression ist im Vergleich zur Kontrollgruppe mit erhaltenem Apelinvorkommen insbesondere die Anzahl der detektierten Gefäße signifikant herabgesetzt (*U87AKD / AKO*: $M = 75$, $SD = 9$; $n = 7$ vs. *U87NSC / WT*: $M = 132$, $SD = 52$; $p = 0,045$, Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni, $r = 0,71$, vgl. **Abbildung 20a**). Die sonstigen Parameter (durch Gefäße eingenommene Fläche, Distanz der Gefäße zueinander und Gefäßdurchmesser) zeigten keine signifikanten Unterschiede, wenn auch die vaskulär eingenommene Fläche bei herabgesetzter tumoraler Apelinexpression in den Versuchsgruppen *U87AKD / AKO* ($M = 5,85 \%$, $SD = 2,09 \%$) und *U87AKD / WT* ($M = 5,84 \%$, $SD = 1,98 \%$) im Vergleich zur Gruppe *U87NSC / WT* ($M = 8,45 \%$, $SD = 2,09 \%$) 31 % geringer ausfiel ($p = 0,097$, einfaktorielle Varianzanalyse, vgl. **Abbildung 20b**) und der Gefäßabstand sich bei in Xenograft und Tumorumgebung herabgesetzter Apelinexpression im Vergleich zum erhaltenen Apelinvorkommen tendenziell vergrößert zeigte (*U87AKD / AKO*: $M = 34,64 \mu\text{m}$, $SD = 2,95 \mu\text{m}$ vs. *U87NSC / WT*: $M = 29,78 \mu\text{m}$, $SD = 5,45 \mu\text{m}$; $p = 0,170$, einfaktorielle Varianzanalyse, vgl. **Abbildung 20c**). Die Gefäße der *U87AKD*-Xenografts im *AKO*-Wirt wiesen (nicht signifikant) größere Diameter im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (*U87AKD / AKO*: $M = 11,09 \mu\text{m}$, $SD = 2,28 \mu\text{m}$ vs. *U87NSC / WT*: $M = 9,98 \mu\text{m}$, $SD = 1,85 \mu\text{m}$; $p = 0,669$, nichtparametrischer Test nach Kruskal-Wallis, vgl. **Abbildung 20d**).

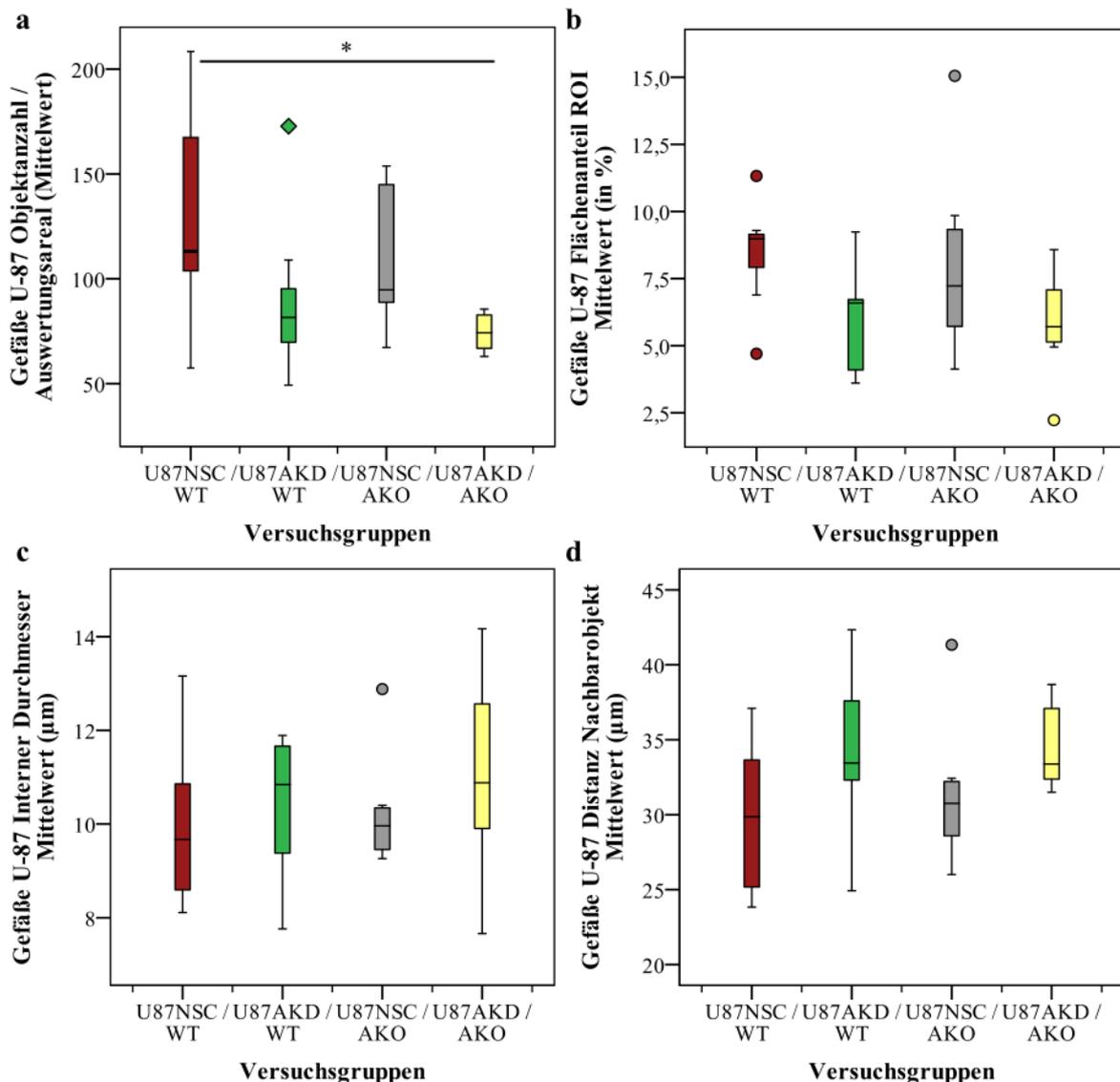


Abbildung 20 – Apelinverlust führt zu einer verminderten Gefäßanzahl. (a) Mäuse mit U-87-Xenografts wurden vier Wochen nach Implantation euthanisiert und die anti-CD31/Cy3 immunhistochemisch gefärbten Schnitte der Tumore mittels Cellsens analysiert. Morphologische Charakteristika der Gefäße standen im Fokus und lediglich die durchschnittliche Gefäßanzahl pro Auswertungsareal in der Versuchsgruppe mit herabgesetzter Apelinexpression in Xenograft und Tumorumgebung (*U87AKD / AKO*) zeigte sich signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe; * $p < 0,05$; Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni. (b-d) Die sonstigen Parameter zeigten sich statistisch nicht signifikant verschieden, wobei die Versuchsgruppen mit reduziertem Apelinvorkommen im Tumor tendenziell (b) eine geringere von den Gefäßen eingenommene Fläche (bezogen auf das Auswertungsareal, in %, $p = 0,097$; einfaktorische Varianzanalyse), (c) größere vaskuläre Diameter ($p = 0,669$; nichtparametrischer Test nach Kruskal-Wallis) und (d) einen größeren Abstand der Gefäße zueinander ($p = 0,170$ im statistischen Vergleich aller vier Versuchsgruppen in der einfaktorischen Varianzanalyse) verzeichneten; *U87NSC / WT*: $n = 7$, *U87AKD / WT*: $n = 9$, *U87NSC / AKO*: $n = 7$ und *U87AKD / AKO*: $n = 7$.

Der perizytäre Bedecktheitsgrad oder das Maß der Perizytdichte der U-87-Xenograftgefäße wurde erhoben, um als indirekten Rückschluss auf mögliche unterschiedliche Reifegrade und funktionelle Unterschiede der Xenograftgefäße in den Versuchsgruppen zu dienen. Er wurde durch das Verhältnis von perizytär nicht bedeckten Gefäßen zur Gesamtheit der Gefäße (Summe aus perizytär nicht bedeckten Gefäßen und durch Perizyten bedeckte Gefäße) definiert. In mittels immunhistochemisch gegen CD31 (Gefäße) und Desmin (Perizyten) gefärbten Schnitten (vgl. **Abbildung 13**) wurde der Eindruck geweckt, dass der perizytäre Bedecktheitsgrad insbesondere in der Versuchsgruppe mit reduziertem Apelinvorkommen in Tumor und Wirt reduziert sei. Die bildanalytische Untersuchung zeigte jedoch, dass das Maß der Perizytdichte nicht signifikant zwischen den Gruppen differierte und vor allem die Versuchsgruppe mit reduzierter, vaskulärer Apelinexpression *U87NSC/AKO* ($M = 0,18$, $SD = 0,11$) den geringsten Bedecktheitsgrad vorwies (*U87NSC/WT* ($M = 0,24$, $SD = 0,13$), *U87AKD/WT* ($M = 0,20$, $SD = 0,06$), und *U87AKD/AKO* ($M = 0,21$, $SD = 0,10$), $p = 0,901$, nichtparametrischer Test nach Kruskal-Wallis, vgl. **Abbildung 21a**). Wurde die alleinige Zahl der perizytär nicht bedeckten Gefäße bezogen auf das Tumorareal betrachtet, ergab sich ein analoges Bild zur Auswertung der Tumolvaskularisierung (vgl. Abschnitt 4.1), was als Begleiterscheinung der apelinabhängigen Reduktion der Gefäßdichte interpretiert werden muss. Die herabgesetzte Verfügbarkeit von Apelin führte demnach zu einer geringeren Anzahl von perizytär bedeckten Tumorgefäßen (*U87NSC/WT* ($M = 315$, $SD = 104$), *U87AKD/WT* ($M = 249$, $SD = 93$), *U87NSC/AKO* ($M = 316$, $SD = 122$) und *U87AKD/AKO* ($M = 180$, $SD = 37$), $p = 0,032$, nichtparametrischer Test nach Kruskal-Wallis). So konnten bei alleiniger Reduktion der Apelinproduktion in den Tumorzellen in der Gruppe *U87AKD/WT* noch keine signifikante Veränderung, jedoch immerhin 21 % weniger mit Perizyten bedeckte Gefäße ($p = 0,233$, Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni) und bei zusätzlich vorhandener Deletion der Apelinausschüttung im murinen Wirt in der Gruppe *U87AKD/AKO* eine Verstärkung des Effekts mit einer signifikanten Reduktion um 43 % im Vergleich zur Kontrollgruppe *U87NSC/WT* beobachtet werden ($p = 0,045$, Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni, $r = 0,741$, vgl. **Abbildung 21b**).

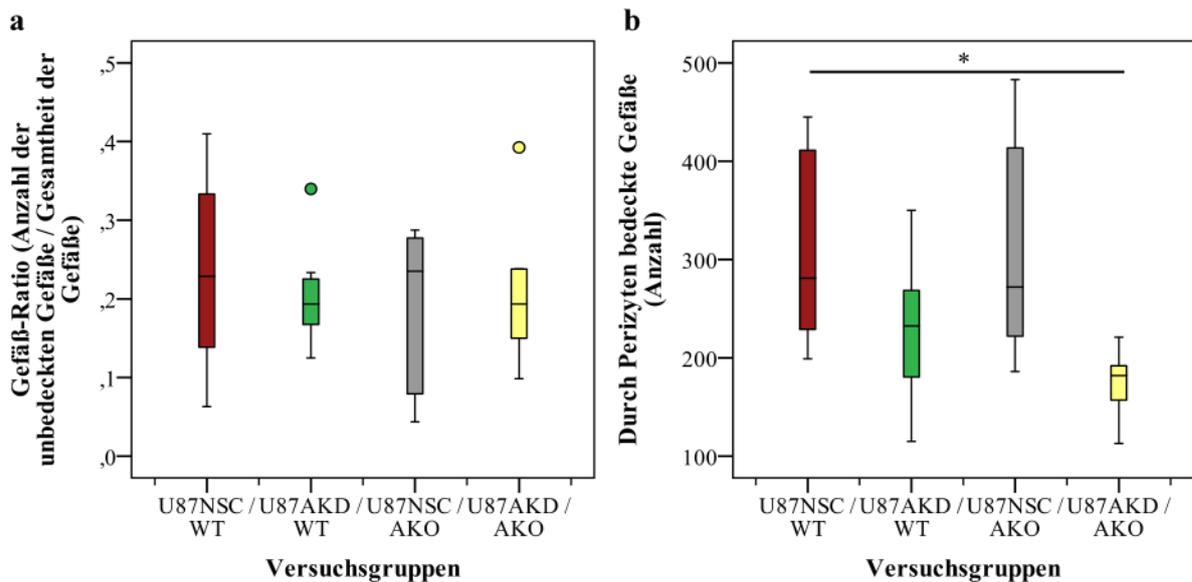


Abbildung 21 – Die perizytäre Bedecktheit wird nicht vom Apelinvorkommen beeinflusst. Immunhistochemisch gegen CD31 (Gefäße) und Desmin (Perizyten) gefärbte Schnitte von U-87-Xenografts vier Wochen nach Implantation wurden mittels Cellsens analysiert. (a) Der perizytäre Bedecktheitsgrad von U-87-Xenograftgefäßen wurde durch das Verhältnis von nicht bedeckten Gefäßen zur Gesamtheit der Gefäße (Summe aus nicht bedeckten Gefäßen und durch Perizyten bedeckte Gefäße) definiert und dient als indirekter Rückschluss auf den Reifegrad und die Durchlässigkeit der Tumorgefäße. Es besteht bei fehlendem Unterschied zwischen den Versuchsgruppen kein sicherer Hinweis auf eine apelinabhängige Wirkung, $p = 0,901$, n. s. im nichtparametrischen Test nach Kruskal-Wallis. (b) Gemäß der reduzierten Vaskularisierung in der Versuchsgruppe mit Apelinverlust in Tumor und Wirt unterschied sich die Anzahl der durch perizyten bedeckten Gefäße bezogen auf das untersuchte Tumorareal signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe, $* p < 0,05$ nach durchgeführter Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni; $U87NSC / WT: n = 7$, $U87AKD / WT: n = 8$, $U87NSC / AKO: n = 7$ und $U87AKD / AKO: n = 6$.

Entsprechend der reduzierten Gefäßdichte konnte auch die niedrigste Perizytenanzahl (Objektanzahl in der perizyten-spezifischen Färbung; vgl. Abschnitt 3.9) in Xenografts der Versuchsgruppe mit herabgesetzter Apelinexpression in Tumor und Wirt festgestellt werden ($U87AKD / AKO$, $M = 99$, $SD = 5$; im Vergleich zu $U87NSC / AKO$ ($M = 161$, $SD = 49$), $p = 0,014$, Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni, $r = 0,81$, vgl. **Abbildung 22**). Die Perizytenanzahl in den anderen Versuchsgruppen wich in diesem Analyseverfahren nicht signifikant von der Kontrollgruppe ab. Und auch die sonstigen erhobenen Parameter für Perizyten im Tumorareal (durchschnittliche perizytäre Objektgröße, Anteil der eingenommenen Fläche der Perizytenobjekte bezogen auf das Auswer-

tungsareal und interner perizytärer Durchmesser) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und damit keine relevante Abhängigkeit vom Apelinvorkommen, vgl. **Abbildung 22**.

Werden die gleichen Parameter für Perizyten des Normalhirns der Gegenseite betrachtet und die Ergebnisse mit denen in den U-87-Xenografts verglichen, zeigte sich im Tumorgewebe – mit einer Ausnahme in der Gruppe *U87AKD/AKO* – eine höhere Anzahl von Perizyten sowie in allen Gruppen gesteigerte Perizytengrößen im Tumorgewebe und damit einhergehende erhöhte perizytäre Diameter und durch die Perizyten eingenommene Flächen, vgl. **Abbildung 22**. Diese Ergebnisse sind kongruent zu den allgemeinen Erfahrungen bisheriger Studien zur Tumorgefäßmorphologie. Die erhöhte Gefäßdichte in Tumoren und die dilatierten Gefäßlumen^{42,76-78} resultieren im Gegenzug in einer erhöhten Anzahl von Perizyten im Xenograftgewebe. Erneut am ehesten einer Begleiterscheinung der reduzierten Tumovaskularisation entsprechend unterschied sich die Perizytenanzahl in den Xenografts der Gruppe *U87AKD/AKO* im Vergleich zum Normalhirn nicht ($M_{U-87} = 99$, $SD_{U-87} = 5$ vs. $M_{Normalhirn} = 95$, $SD_{Normalhirn} = 22$; $p = 0,624$, t-Test für abhängige Stichproben, vgl. **Abbildung 22**). Die Perizyten des Normalhirns waren jeweils in Größe, Diameter und Anzahl in allen Versuchsgruppen nahezu identisch, was beweist, dass der Verlust der Apelinexpression im Apelin-Knock-out-Modell keinen Einfluss auf die Perizytenmorphologie und -anzahl im Normalgewebe per se hat.

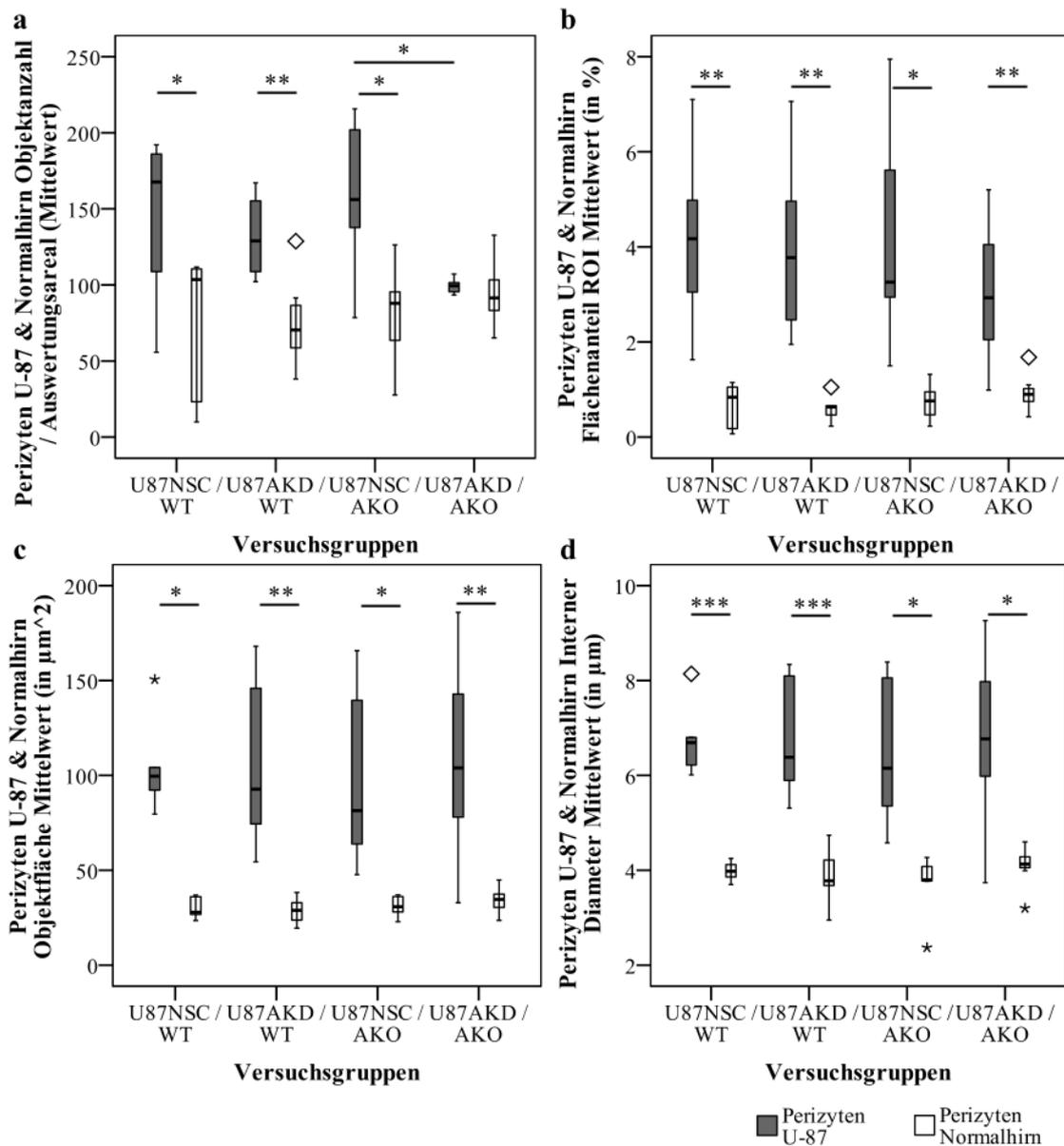


Abbildung 22 – U-87-Xenografts zeigen neoplasietypische Veränderungen der Perizyten im Vergleich zum Normalhirn der Gegenseite. (a) Eine Analyse von immunhistochemisch, mittels perizytenspezifischer Färbung (Desmin) behandelte Schnitte von U-87-Xenografts vier Wochen nach Implantation offenbarte eine höhere Anzahl von Perizyten im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Eine Ausnahme bildete die Gruppe *U87AKD/AKO*, welche im Tumor entsprechend der verringerten Gefäßdichte eine ähnliche Perizytenanzahl wie im Normalgewebe vorwies. (b) Auch die durch Perizyten eingenommene Fläche pro Auswertungsareal, (c) die Perizytengröße und (d) der perizytäre Diameter stellten sich im Tumorareal signifikant größer dar als im Normalgewebe. Analyse der Perizyten in U-87-Xenografts der vier Versuchsgruppen: * $p < 0,05$, nach durchgeführter Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni. Vergleich der Perizyten von U-87-Xenografts und des Normalhirns der Gegenseite (innerhalb der Versuchsgruppen): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ nach durchgeführtem t-Test für abhängige Stichproben oder Wilcoxon-Test; *U87NSC/WT*: $n = 5$, *U87AKD/WT*: $n = 8$, *U87NSC/AKO*: $n = 7$ und *U87AKD/AKO*: $n = 7$.

4.5 Vorkommen von Hämorrhagien und Nekrosen in U-87-Xenografts

Bedingt durch anhaltende Wachstums- und Umbauprozesse in der Tumorneoangiogenese sind Tumorgefäße oftmals unreif und morphologisch abnorm. Dadurch entstehen funktionsuntüchtige Gefäßnetze, welche wachsendes Tumorgewebe trotz aktiver Angiogenese nicht ausreichend versorgen. Konsekutiv treten hypoxische Areale auf und eine erhöhte vaskuläre Durchlässigkeit resultiert in Gefäßleckagen und eine verminderte Aufrechterhaltung des intravaskulären Druckgradienten^{42,76-78}. Die markantesten Kennzeichen des GBM sind dementsprechend durch rapides Wachstum auftretende Nekroseareale im Zentrum der Neoplasie³⁶, die Tendenz zur beträchtlichen Ödembildung und das Risiko spontaner Einblutungen^{1,135,140}. Die in der Literatur postulierte Annahme, dass Apelin und sein Rezeptor vorrangig für die Gefäßreifung in extrakraniellen Neoplasien zuständig sei, und die bisher fehlende Betrachtung funktioneller Untersuchungen des Gefäßnetzes von U-87-Xenografts, begründeten die Analyse der Blutungs- und Nekroseneigung in Abhängigkeit vom Level der Apelinexpression. Insgesamt wurden die HE-gefärbten Schnitte von 52 Xenografts vier Wochen nach Implantation analysiert, eine Graduierung von Hämorrhagien („keine“, „wenige“ und „deutliche Blutungszeichen“) erhoben und das Vorhandensein von Nekrosen notiert (vgl. **Tabelle 7**). Die in der Literatur beschriebene Häufigkeit von 53 % zum Auftreten von Hämorrhagien (inkl. Mikroblutungen) in GBM²³⁴ wurde in der Kontrollgruppe mit 62,5 % Inzidenz erfüllt, jedoch nicht signifikant überschritten ($p = 0,307$, Binomialtest). Bei fehlender Apelinexpression in Xenograft und/oder Wirt traten im Gegensatz dazu signifikant seltener intratumorale Blutungen auf als für GBM im Allgemeinen angenommen ($p_{U87AKD/WT} = 0,006$, $p_{U87NSC/AKO} = 0,012$, $p_{U87AKD/AKO} = 0,021$, Binomialtest). Das Auftreten von Nekrosen zeigte sich für alle Versuchsgruppen signifikant geringer als die in Studien vorbeschriebenen 76 - 88 %²³⁵⁻²³⁷ ($p_{Kontroll} = 0,008$, $p_{U87AKD/WT} < 0,001$, $p_{U87NSC/AKO} = 0,001$ bzw. $p_{U87AKD/AKO} < 0,001$, Binomialtest). Obwohl die Xenografts der Kontrollgruppen ($U87WT/WT$ und $U87NSC/WT$ zur Erhöhung der Gruppengröße zusammengefasst) gemäß der angewendeten Bewertung in „keine“, „wenige“ und „deutliche Blutungszeichen“ (vgl. Abschnitt 3.10) 44 % häufiger zu Hämorrhagien und 38 % häufiger zu Nekrosen als die Tumore der Gruppe $U87AKD/AKO$ (vgl. **Tabelle 7**) neigten, waren in der Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen signifikant.

Tabelle 7 – Vorkommen von Hämorrhagien und Nekrosen in U-87-Xenografts. Die Graduierung der Hämorrhagien erfolgte mittels Einteilung nach „keine“, „wenige“ und „deutliche Blutungszeichen“, wobei „wenige“ und „deutliche Blutungszeichen“ als Bestätigung einer existierenden Blutung mit „ja“ in der Tabelle zusammengefasst wurden.

		Vorkommen von Hämorrhagien			Nekroseneigung	
		ja (n, %)	nein (n, %)	Mittelwert (Min; Max)	ja (n, %)	nein (n, %)
Versuchsgruppe	Kontrollgruppe	10 (62,5 %)	6 (37,5 %)	1,37 (1,00; 2,75)	9 (56,3 %)	7 (43,8 %)
	U87AKD / WT	3 (18,8 %)	13 (81,3 %)	1,20 (1,00; 2,74)	0 (0 %)	16 (100 %)
	U87NSC / AKO	1 (11,1 %)	8 (88,9 %)	1,01 (1,00; 1,07)	3 (33,3 %)	6 (66,7 %)
	U87AKD / AKO	2 (18,2 %)	9 (81,8 %)	1,04 (1,00; 1,25)	2 (18,2 %)	9 (81,8 %)

Eine Überlegung war, dass insbesondere gesteigerte Tumorgrößen das Auftreten von Hämorrhagien und Nekrosen fördert. Dementsprechend wurden sowohl Hämorrhagien als auch Nekrosen in der Kontrollgruppe vor allem in Xenografts signifikant höheren Volumens in der MRT vier Wochen nach Implantation nachgewiesen (vgl. **Abbildung 23** und **Tabelle 8**, $p_{\text{Hämorrhagie}} = 0,012$ bzw. $p_{\text{Nekrose}} = 0,019$, Welch-Test). In allen anderen Versuchsgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Tumorgröße zwischen Fällen mit oder ohne Blutungen bzw. Nekrosen (*U87AKD / WT*: $p_{\text{Hämorrhagie}} = 0,923$; *U87NSC / AKO*: $p_{\text{Hämorrhagie}} = 0,667$ bzw. $p_{\text{Nekrose}} = 0,548$, *U87AKD / AKO*: $p_{\text{Hämorrhagie}} = 0,218$ bzw. $p_{\text{Nekrose}} = 0,218$, Mann-Whitney-U-Test). In den Gruppen *U87NSC / AKO* und *U87AKD / AKO* wurden im Gegenteil dazu auch Blutungszeichen und Nekrosen in weniger großen Tumoren verzeichnet und die Xenografts der Gruppe *U87AKD / WT* ($n = 16$) präsentierten in der Gesamtheit unabhängig vom Tumorumfang keine Nekrosen. Die Tumorumfänge der Xenografts mit sichtbaren Blutungszeichen unterschied sich zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant, $p = 0,329$ im nichtparametrischen Test nach Kruskal-Wallis. Im Gegensatz dazu war in der Versuchsgruppe *U87NSC / AKO* das Tumorumfang der Xenografts mit aufgetretener Nekrose signifikant kleiner als die Tumorumfänge der Kontrollgruppe, $p = 0,039$, Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni.

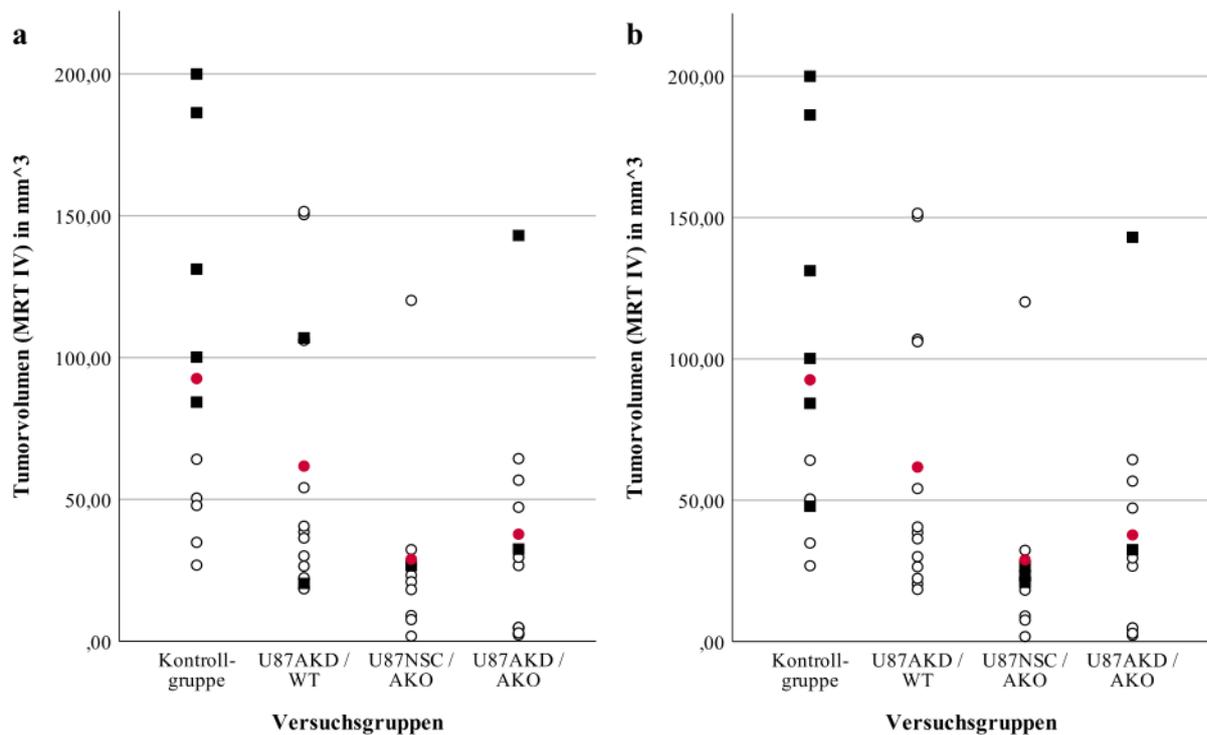


Abbildung 23 – Hämorrhagien und Nekrosen in Korrelation mit der Tumorgröße. In HE-Schnitten analysierte (a) Blutungs- und (b) Nekrosezeichen wurden mit dem Tumorzellen korreliert, welches in vier Wochen nach Implantation angefertigten kernspintomographischen Aufnahmen erhoben wurde. (a) Die Tumorzellen der Xenografts mit Blutungszeichen in der Kontrollgruppe zeigten sich signifikant größer, $p = 0,012$, Welch-Test. Obwohl auch in kleineren Tumoren der anderen Versuchsgruppen Blutungszeichen aufgetreten waren, bestand kein signifikanter Unterschied der Tumorzellen von Xenografts mit Zeichen einer Hämorrhagie über alle Versuchsgruppen, $p = 0,329$, n. s. im nichtparametrischen Test nach Kruskal-Wallis. (b) Auch die Tumorzellen der Xenografts in der Kontrollgruppe mit Zeichen einer Nekrose waren signifikant größer als Xenografts ohne Nekrosezeichen, $p = 0,019$, Welch-Test. In der Versuchsgruppe U87NSC / AKO war das Tumorzellen der Xenografts mit aufgetretener Nekrose signifikant kleiner als die Tumorzellen der Kontrollgruppe, $p = 0,039$, nach durchgeführter Post-Hoc-Analyse nach Dunn-Bonferroni. Graues Quadrat – Zeichen von Hämorrhagien bzw. Nekrosen, weißer Kreis – keine Zeichen von Hämorrhagien bzw. Nekrosen, roter Kreis – Mittelwert; U87NSC / WT: $n = 10$, U87AKD / WT: $n = 13$, U87NSC / AKO: $n = 9$ und U87AKD / AKO: $n = 11$.

Tabelle 8 – Vorkommen von Blutungen und Nekrosen in Abhängigkeit vom Tumolvolumen (M (SD) in mm^3) der U-87-Xenografts. Die Graduierung der Hämorrhagien erfolgte mittels Einteilung nach „keine“, „wenige“ und „deutliche Blutungszeichen“, wobei „wenige“ und „deutliche Blutungszeichen“ als Bestätigung einer existierenden Blutung mit „ja“ in der Tabelle zusammengefasst wurden.

		Tumolvolumen (M (SD) in mm^3)							
		Hämorrhagien				Nekrosen			
		ja	n	nein	n	ja	n	nein	n
Versuchsgruppe	Kontrollgruppe	140,39 (51,27)	5	44,83 (14,47)	5	124,97 (59,41)	6	44,08 (16,60)	4
	U87AKD / WT	63,67 (61,19)	2	61,37 (50,24)	11	-	0	61,72 (49,15)	13
	U87NSC / AKO	27,79 (0)	1	29,18 (38,04)	8	23,64 (2,86)	3	31,53 (44,71)	6
	U87AKD / AKO	87,76 (78,18)	2	26,60 (24,70)	9	87,76 (78,18)	2	26,60 (24,70)	9

4.6 Fehlender Einfluss von Transduktion und Immunstatus auf Vaskularisation und Tumolvolumen von U-87-Xenografts

Um einen relevanten Einfluss der lentiviralen Transduktion selbst auf das Tumorstadium oder die Ausprägung des Gefäßsystems *in vivo* auszuschließen, wurden die Tumorstadien und Vaskularisierung von unbehandelten U-87-MG-Xenografts (U87WT) und der Kontrollkohorte (U87NSC) in Apelinwildtypmäusen (WT, Wildtyp bezogen auf die physiologische Fähigkeit Apelin auszuschütten) verglichen. Vier Wochen nach Implantation ergab sich in Betracht des Tumorstadiums weder in der MRT ($p = 0,052$, Mann-Whitney- U -Test, vgl. **Abbildung 24a**), noch in nach Cavalieri-Methode ausgewerteten histologischen Schnitten ($p = 0,527$, Mann-Whitney- U -Test, vgl. **Abbildung 24b**) ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Auch die VLD ($p = 0,606$; Mann-Whitney- U -Test, vgl. **Abbildung 24c**) und die Komplexität des vaskulären Netzwerks ($p = 0,074$; $M_{U87WT/WT} = 5,30$, $SD = 0,85$, $n = 9$; $M_{U87NSC/WT} = 6,90$, $SD = 2,70$, $n = 8$; Mann-Whitney- U -Test) differierten nicht.

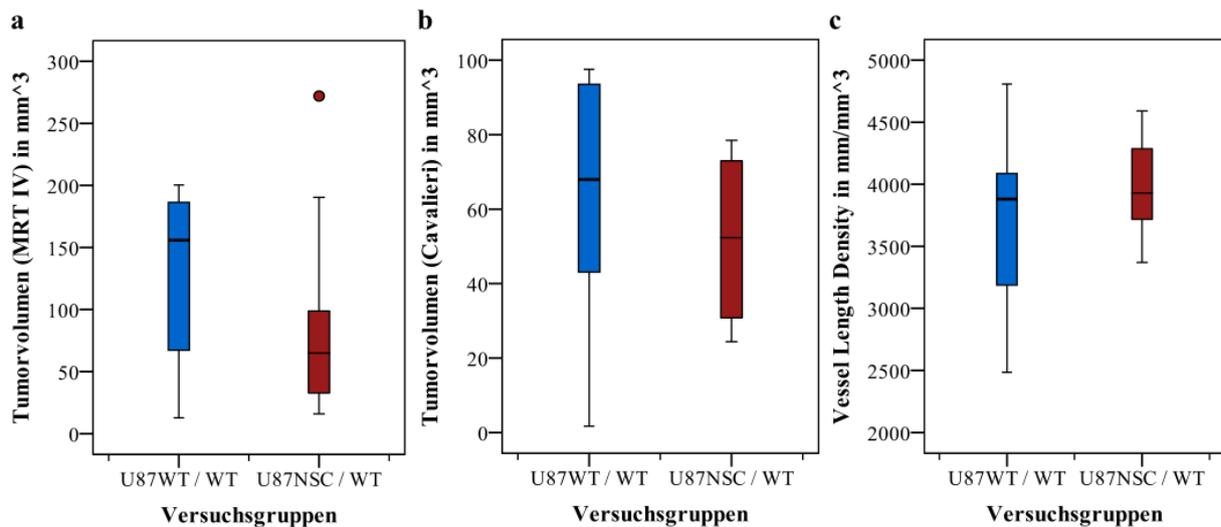


Abbildung 24 – Die lentivirale Transduktion hat keinen Einfluss auf Tumorstadium (gemessen (a) in kernspintomografischen Aufnahmen und (b) in histologischen Schnitten nach Cavalieri-Methode) und (c) die Vaskularisierung (gemäß VLD) von U-87-Xenografts im Vergleich der Kontrollgruppen *U87WT/WT* und *U87NSC/WT* vier Wochen nach Implantation (n.s., exakter Mann-Whitney-U-Test). Es wurden repräsentative Xenografts in einer Gruppenstärke von $n_{MRT} = 9$ und 27, $n_{Cavalieri} = 7$ und 4, $n_{VLD} = 9$ und 8 analysiert. Die absoluten Zahlen der Tumorstadien unterscheidet sich bei Betrachtung von (a) MRT und (b) Cavalieri-Methode methodenbedingt, da erstere die Tumorstadium von vitalem Gewebe *in vivo* und letztere bearbeitetes und im Rahmen des Wasserentzugs größenreduziertes Gewebe umfasst.

Des Weiteren sollte ausgeschlossen werden, dass der differierende Immunstatus der Versuchstiere einen Einfluss auf die erzielten Ergebnisse hat. In den verwendeten Mausmodellen fehlen immunkompetente B- und T-Zellen^{180,181} (vgl. auch Abschnitt 1.5.1). Lediglich NK-Zellen können in Rag1- und Rag2-defizienten Mäusen noch heranreifen und sind in ihrer Anzahl sogar erhöht^{181,182}. Das Rag2^(-/-)/γc^(-/-)-Mausmodell hat den Vorteil weder NK-, B-, noch T-Zellen ausbilden zu können¹⁷⁸. Die immundefizienten Mausstämme Rag1/2 und cγRag wurden für die Datenanalyse in Hinblick auf ihre Apelincompetenz als Wildtyp (WT) mit der Annahme zusammengefasst (vgl. Abschnitt 3.1), dass die unterschiedliche Ausprägung der fehlenden Immunkompetenz keine signifikante Wirkung auf das Tumorstadium und die Gefäßausbildung im durchgeführten Versuchsvorhaben hat. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass sich weder bei der Betrachtung des Tumorstadiums in der MRT ($p = 0,136$; Mann-Whitney-U-Test, vgl. **Abbildung 25a**), noch der Vaskularisierung – gemessen an VLD ($p = 0,256$; Mann-Whitney-U-Test, vgl. **Abbildung 25b**) und Komplexität des vaskulären Netzwerks ($p = 0,591$; Mann-Whitney-U-Test, vgl. **Abbildung 25c**) – ein signifikanter Unterschied im Vergleich von Rag1- und cγRag2-Mäusen ergibt.

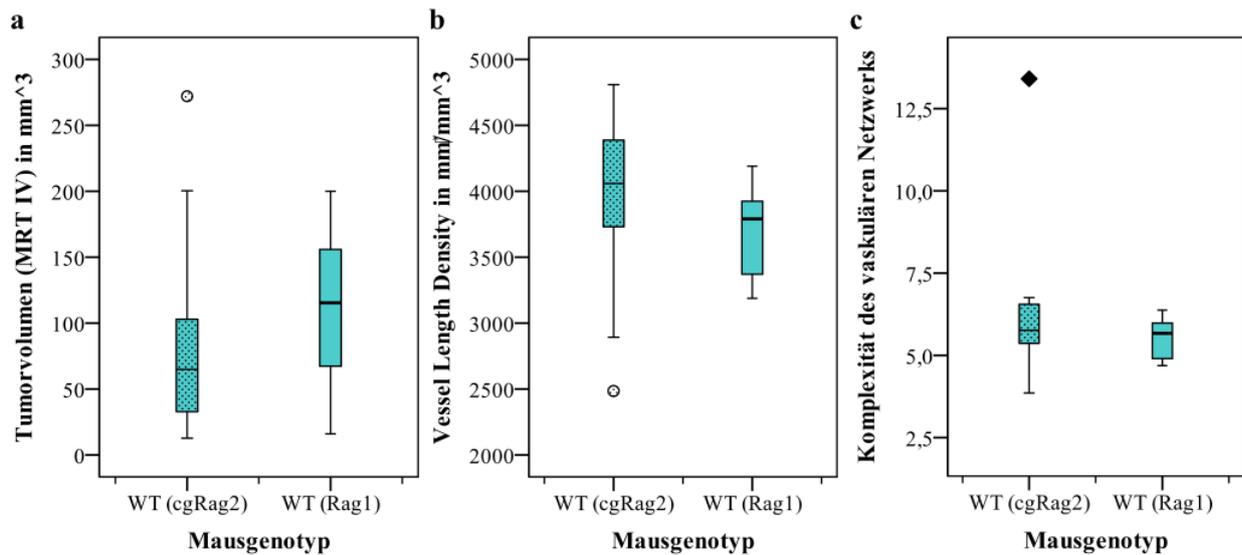


Abbildung 25 – Der Mausgenotyp hat keinen Einfluss auf das Tumorwachstum und die Vaskularisation von U-87-Xenografts. Es wurden die Mausgenotypen *cgRag2* und *Rag1* miteinander verglichen in Bezug auf (a) Tumolvolumen, (b) VLD und (c) vN vier Wochen nach Implantation. Die Versuchsgruppen *U87WT/WT* und *U87NSC/WT* wurden für diesen Vergleich zusammengefasst, um die Gruppenstärke zu erhöhen und die Testung durchführbar zu machen; n. s., exakter Mann-Whitney-U-Test; $n_{\text{MRT}} = 27$ und 9; $n_{\text{VLD/vN}} = 11$ und 6.

5 Diskussion

5.1 Apelinabhängige Unterschiede in der Vaskularisierung von U-87-Xenografts

In dieser Arbeit wird das Verhältnis von Apelin und seinem Rezeptor in der Angiogenese von GBM beschrieben. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Maß der Apelinexpression in GBM-Xenografts der Zelllinie U-87 und das Level der Tumorangiogenese korrelieren und dass sowohl die Apelinausschüttung durch die Tumorzellen als auch das Apelinvorkommen im umgebenden Wirt die Tumurvaskularisation beeinflusst. Es wurde hier ersichtlich, dass eine Reduktion der Apelinexpression in U-87-Tumorzellen mit einer herabgesetzten Tumorangiogenese einhergeht und dass die Infusion von Apelin-13-Peptid in das Tumoreal den GBM-Phänotyp wiederherstellt. Des Weiteren führt eine Unfähigkeit des tumorumgebenden Maushirns Apelin auszuschütten zu weiter herabgesetzten Gefäßdichtelängen der untersuchten Xenografts, welche unterhalb der vorbeschriebenen Werte in gesunden, murinen, striatalen Geweben liegen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen Analogien zu bisher existierenden Ergebnissen von in-vivo-Studien, in denen andere Zelllinien untersucht wurden²³⁸, sowie zu Arbeiten, in denen eine Apelinüberexpression zu einer erhöhten ektopen Angiogenese und einem gesteigerten Tumorwachstum subkutan führte^{13,118,130}. Nach jetzigem Kenntnisstand ist dies die erste Arbeit, in der die Modulation der Apelinproduktion in U-87-Tumorzellen und Wirt separat adressiert und auch die Auswirkung von Apelinverlust in U-87-Tumorzellen und Mikroumgebung in Kombination analysiert wird.

Obwohl der Einfluss auf die Tumurvaskularisation bei Verlust der Apelinproduktion von Tumorzellen oder Wirt nachweisbar ist, hatte in den kernspintomographischen Analysen vorrangig das Apelinvorkommen im murinen Wirt die ausschlaggebende Wirkung auf die Größenunterschiede in den Versuchsgruppen (vgl. Abschnitt 4.3.2). So hatte die Gruppe *U87NSC / AKO* das kleinste Tumolvolumen, jedoch eine signifikant höhere Gefäßlängendichte als die der Gruppe *U87AKD / AKO*, und anders herum hatte die Gruppe *U87AKD / WT* nicht signifikant kleinere Tumolvolumina als die Kontrollgruppe *U87NSC / WT*, jedoch zeigte sie eine signifikante Reduktion in der Gefäßlängendichte. Demnach führt die Apelinproduktion der Tumorzellen zu vaskularisierteren Xenografts, aber eine apelinarme Umgebung im Wirt zu kleineren Phänotypen. Eine Erklärung ist darin zu sehen, dass *U87AKD*-Xenografts in apelinkompetenten Wirten zu Arealen des Normalhirns streben, von denen Apelin ausgeschüttet wird, da der APLNR-Besatz der Zellen eine

Migration zu Arealen mit höherem Apelinvorkommen veranlasst (vgl. weiterführende Diskussion 5.3).

Gefäßanalysen in Apelin-Knock-out-Versuchsmäusen zeigten dünnere Blutgefäße in Trachea und Haut sowie eine verringerte retinale Vaskularisation¹⁸⁸. Die daraus resultierende Annahme, dass Apelin-Knock-out-Versuchsmäuse generell zu einer geringeren Anzahl von Gefäßen neigen, wurde in dem hier vorgestellten Versuchsmodell im Vergleich von Versuchstieren mit physiologischer versus herabgesetzter Apelinausschüttung jedoch nicht bestätigt (vgl. Abschnitte 4.1 und 4.4).

Eine Beobachtung, dass Xenografts mit reduzierter Apelinexpression im Vergleich zum Wildtyp ein dichteres Gefäßnetz in der Peripherie und eine Gefäßrarefizierung im Zentrum darboten und dass das Gefäßnetz des angrenzenden Hirngewebes dichter als im Normalhirn der gesunden Hemisphäre imponierte, wurde quantitativ nicht analysiert und wäre in weiterführenden Arbeiten zu bedenken. Möglicherweise sorgt die Gefäßrarefizierung im Tumorzentrum zu stärkeren hypoxischen Zuständen, die die Tumorzellen mittels Ausschüttung proangiogener Faktoren (anderer als Apelin) und die damit einhergehende Anlockung von Gefäßen aus dem angrenzenden Normalhirn auszugleichen versucht (vgl. Abschnitt 1.2.1)^{10,43}. Analog haben Sorli et al. in Bezug auf Apelin gezeigt, dass dieser proangiogene Faktor durch parakrine Signale auf die Gefäße des Wirts eine potente Aktivierung der tumoralen Neoangiogenese im Versuchsmodell zum Mammakarzinom bewirkt¹³. Trotz aktiver Angiogenese ist die Versorgung des wachsenden Tumorgewebes meist nicht ausreichend möglich, so dass anhaltende Hypoxie und die dadurch begünstigte, fortwährende Freisetzung proangiogener Faktoren zu einer Überproduktion des kapillaren Netzwerkes in der Tumorperipherie führt. Eine Analyse der vorherrschenden proangiogenen Faktoren in Tumorzentrum, Tumorperipherie und im angrenzenden Normalgewebe wären hier gewinnbringend. Andererseits ist fraglich, ob dieser bildmorphologische Eindruck objektiviert werden kann und ob es lediglich durch die Gefäßrarefizierung im Zentrum den Anschein erweckt, dass eine dichtere Vaskularisierung in der Peripherie und im angrenzenden Normalgewebe in diesen Versuchsgruppen vorherrscht. So haben schon Plate et al. 1995 beschrieben, dass GBM charakteristischerweise drei morphologische Kompartimente zeigen: In der Tumorperipherie und angrenzendem Normalgewebe mache sich eine höhere Dichte von infiltrierenden Tumorzellen und eine Vermehrung kleiner Blutgefäße im Vergleich zum Normalhirn bemerkbar. Nach Innen angrenzend finde sich ein aktiver Tumoranteil mit proliferierenden Tumorzellen und einer Vielzahl von Gefäßen. Die Mitte des Tumors bestehe aus nekrotischen Arealen mit einem zwar höheren Anteil an Gefäßlumina als in den anderen Kompartimenten, jedoch seien diese okkludiert und nicht funktionsfähig¹⁴⁹.

Bekanntermaßen ist die Vaskularisation von Tumoren im Allgemeinen geprägt durch unorganisiert verteilte Gefäße, welche teils blind im Gewebe enden, irregulär geformt, dilatiert und gewunden sind⁴² (vgl. Abschnitt 1.2.2). Studien zu apelinüberexprimierenden Tumorzellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms und des Mammakarzinoms resultierten in vergrößerten Gefäßdurchmesser^{13,130}. Die Analyse der Gefäßmorphologie von U-87-Xenografts dieser Arbeit (vgl. Abschnitt 4.4) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, jedoch zeigte sich eine Tendenz zu größeren Gefäßdiametern, größeren Gefäßabständen und kleineren, durch vaskuläre Strukturen eingenommene Flächen in Xenografts mit herabgesetzter Apelinexpression. Lediglich die Gefäßanzahl zeigte signifikant geringere Werte in der Gruppe *U87AKD/ AKO* im Vergleich zur Kontrollgruppe mit regelrechtem Apelinvorkommen in Tumor und Maus. Dies und die erkennbaren Tendenzen in den untersuchten vaskulären Flächenanteilen und der Distanzen zwischen den Gefäßobjekten bestätigen die Ergebnisse mittels Space-Ball-Methode zur reduzierten Vaskularisation in den U-87-Xenografts der Versuchsgruppe *U87AKD/ AKO*. Eine größere Gruppengröße und Anpassungen in der Methodik, bspw. mittels automatisierter Auswertverfahren und größerer, analysierter Tumorfläche, wären hier gewinnbringend um womöglich Signifikanzen zu erreichen.

Für weiterführende Arbeiten beinhaltet die Blockade von APLNR in der Versuchsgruppe mit regelhaftem murinen und tumoralen Apelinvorkommen (*U87NSC/ WT*) durch die intrazerebrale Gabe des Apelinantagonisten (ApF13A) (analog zu Abschnitt 4.2) eine sinnvolle Ergänzung zu Untersuchungen der Wirkmechanismen des Apelin-APLNR-Signalwegs und dessen Auswirkungen auf Xenograftangiogenese und Tumorwachstum.

5.1.1 Evaluation der Methodik zu Gefäßfärbungen & zur Bestimmung der Vaskularisierung

Zur Färbung der Zielstrukturen – Gefäße und Perizyten – wurde eine Färbemethode benötigt, welche sowohl adäquat zu dem verfügbaren Material als auch zu den danach applizierten Auswertmethoden passte. So konnte keine Färbemethode mit grüner Markierung der Zielstrukturen vorgenommen werden, da die U-87-Xenograftzellen GFP-markiert waren. Zum Zweiten mussten die Sekundäntikörper für Gefäß- und Perizytenfärbung differieren, da eine Doppelfärbung geplant war. Zum Dritten sollte die Bildakquisition aus technischen Gründen mit einer Belichtungszeit von ca. 100 ms möglich sein. Bei längeren Belichtungszeiten ist die Durchführung der Space-Ball-Methode nicht durchführbar, da die Software die automatisierte Analyse nicht umsetzen kann.

Zunächst wurde überprüft, ob zwei bislang in der Arbeitsgruppe etablierte Gefäßfärbungen anderer Projekte auf das U-87-Xenograftmodell übertragen werden könnten. Es handelte sich zum einen um eine anti-CD31/POD-Färbung zur Markierung von Gefäßen intrathekal inokulierter Tumore des klarzelligem Nierenzellkarzinoms und zum anderen um eine anti-IB4/ExtrAvidin-Cy3-Färbung, welche für ein murines Gliommodell entwickelt worden war. Letztendlich wurde eine Fluoreszenzfärbung gewählt, da diese in Kombination mit der GFP-Markierung der U-87-Zellen sinnvoller erschien.

Die Reifung der Gefäße und der Endothelzellen im Speziellen ist in Tumorgewebe beeinträchtigt⁴⁶ (vgl. Abschnitt 1.2.2), sodass eine immunhistochemische Färbung benötigt wurde, welche sowohl reife als auch unreife Endothelien markieren kann. CD31 als transmembranes Glykoprotein von Endothelien unreifer und reifer Gefäße mit hoher Sensitivität in den Färbungen erfüllt diese Voraussetzung^{205,239}. Andere von uns bedachte immunhistochemische Marker umfassten *alpha smooth muscle actin* (α SMA), welches als Teil des Zytoskeletts in die Zellmotilität, -struktur und -integrität involviert ist^{208,240}, CD34, welches als transmembranes Phosphoglykoprotein unter anderem in Endothelzellen kleiner Blutgefäße zu finden ist²⁴¹, und das Adhäsionsmolekül vaskulär-endotheliales Cadherin (VEC oder VE-Cadherin), welches auf Endothelzellen eine wichtige Rolle in der Ausbildung, Reifung und im Remodelling der Gefäßwand übernimmt²⁴². Färbungen mit dem Anti-CD34-Antikörper werden in der Literatur für ihre endotheliale Sensitivität, Spezifität und Reproduktivität geschätzt^{205,243} und haben im Vergleich von Färbungen mit Anti-CD31-Antikörpern zu höheren Werten der Gefäßdichte und besserer Relation zum klinischen Outcome in Studien zum invasiven Mammakarzinom geführt, da auch kleinste Mikrogefäße angefärbt werden konnten²⁰⁵. Andererseits wurde ebenfalls das unspezifische Anfärben von Leukozyten und anderen Immunzellen in der Literatur berichtet²⁴⁴. Im Vergleich zwischen CD31 und den getesteten aufgeführten Markern zeigten die mit CD34 und VEC gefärbten Schnitte viel Hintergrundsignal und insbesondere bei Färbungen mittels α SMA imponierten kleine Gefäße nicht ausreichend gefärbt, sodass die endgültige Wahl auf CD31 als Primäranantikörper fiel. Die fehlende Anfärbung undifferenzierter Gefäße durch α SMA gilt als bekannt in der Literatur²⁴⁵, wurde aber von Kurz et al. auf ein Übersehen bei geringer kapillärer Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den kräftigen Signalen größerer vaskulärer Strukturen in geringerer Resolution zurückgeführt²⁰⁸. Außerdem findet α SMA ebenfalls in perizytären Färbungen Anwendung²⁴⁴, was bei der geplanten Doppelfärbung von Endothelzellen und Perizyten hinderlich gewesen wäre.

In der Interventionskohorte machte sich jedoch ebenfalls ein starkes Hintergrundsignal in der Gefäßfärbung mit Anti-CD31-Antikörpern bemerkbar, welches am ehesten als unspezifische Bindung der Antikörper an IgG zu interpretieren war. So beschrieben Martin et al. ebenfalls ein Hintergrundrauschen in Färbungen mit CD31, welche sie auf die Anfärbung von inflammatorischen Zellen zurückführten²⁰⁵. In den Fällen der Interventionskohorte dieser Arbeit wurde die ebenfalls gut verwendbare Färbemethode mit IB4 genutzt. Als Sekundärantikörper eigneten sich Cy3 und Cy5. Unter Verwendung von Cy5 waren Einstellungen in der Belichtungszeit zwischen 1900-3100 ms in den Testfärbungen der Gefäße von Nöten, sodass Cy5 für die Färbung der Perizyten gewählt wurde.

Weitere Möglichkeiten zur Gefäßdarstellung wären die Nutzung von Antikörper gegen den von-Willebrand-Faktor (vWF), PDGFR- β (PDGF-Rezeptor- β) oder Endoglin unter vielen anderen. Der von-Willebrand-Faktor ist ein spezifischer Oberflächenmarker von Endothelzellen und kann in allen Arten von Blutgefäßen (Arterien, Venen, Kapillare) sowie in reifen und unreifen Gefäßen nachgewiesen werden²⁴⁶. Neben CD31 und CD34 ist er der am häufigsten verwendete Endothelzellenmarker in der onkologischen Forschung²⁴⁷. Einige Autoren beschreiben eine geringe Sensitivität und Spezifität in Bezug auf Endothelzellen – im Vergleich zu CD34 bspw. – sowie eine Variabilität in der Färbequalität und eingeschränkte Reproduzierbarkeiten²⁴⁸⁻²⁵⁰. PDGFR- β ermöglicht die Anfärbung ganzer Zellen statt Fragmenten, so dass ein genauerer Flächenvergleich durchgeführt werden kann. Er ist der Rezeptor eines proangiogenen Faktors (PDGF-B, vgl. Abschnitt 1.1.3.1), welcher in Tumorgefäßen des GBM zu finden ist und in Gefäßen des Normalhirns fehlt²⁵¹. Endoglin reguliert als angiogener Faktor vornehmlich die Proliferation, Differenzierung und Zellmigration von Endothelzellen in Regionen aktiver Prozesse der Angiogenese^{252,253}. Daher wurde es in soliden Tumoren, wie Brust- und Prostatakrebs, vermehrt auf kleinen und vorrangig unreifen Tumorgefäßen nachgewiesen und als zuverlässigen Marker der intratumoralen Gefäßdichte definiert^{246,254} ²⁵³. In geringerem Grad fiel auch eine Endoglinexpression im Zytoplasma neoplastischer Zellen in Meningeomen, Sarkomen sowie Brust- und Ovarialkarzinom auf²⁵³. Ferner sind alternativ Darstellungen mittels intravaskulär injizierter Gefäßfärbungen denkbar ²⁵⁵, wie Resorcin-Kristallviolett oder fluoreszierendem Carbocyanin (3,3-Diheptoxycarbocyaniniodid, DiOC7), welche durch eine Färbung gefäßangrenzender Zellen eine optimale Visualisierung von Tumorgefäßen und teils auch die Überprüfung der Funktionalität ermöglichen²⁵⁶.

Die Gefäßdichte wird als vielversprechender prognostischer Marker in einer Vielzahl von Malignomen angesehen²⁴⁶. Demnach wird einer ausgeprägteren Irregularität im tumoralen Gefäßnetz ein aggressiveres Verhalten des Tumors zugesprochen^{148,243}. Zur Quantifizierung von Blutgefäßen

solider Tumore ist die „Hot Spot-Methode“ nach Weidner²⁵⁷ verbreitet. Danach werden für den Tumor repräsentative histologische Schnitte einer endothelspezifischen Färbung unterzogen sowie die so sichtbar gemachten Blutgefäße in Regionen der stärksten Vaskularisation („hot spots“) im Lichtmikroskop gezählt und die maximale Dichte der Blutgefäße pro Schnittbereich bestimmt²⁴⁷. Methodisch bleibt jedoch die Funktionstüchtigkeit der analysierten Kapillare außer Acht, sodass zunehmend zusätzlich für die Reifung der Tumorgefäße zuständige Komponenten des vaskulären Mikromilieus, wie bspw. Perizyten, quantifiziert werden²⁴⁷. Ein weiterer Nachteil in der Analyse ausgewählter Areale in ebenfalls ausgewählten histologischen Schnitten liegt in der stichprobenartigen Messung der Tumolvaskularisierung, die von Areal zu Areal und Schnitt zu Schnitt gegebenenfalls erheblich variieren kann. Da die Beurteilung der Vaskularisierung in histologischen Schnitten zweidimensional erfolgt und durch Wickelung, Gefäßschlängelung und Kompression der Gefäße beeinflusst wird, ist die Auswahl von Lokalisationen maximaler Vaskularisierung in dieser verbreiteten „Hot Spot-Methode“ anfällig für eine Verzerrung durch den Auswertenden^{205,258}. Bei der Wahl der analysierten Areale und Schnitte sollte demnach die höchste Repräsentativität für den Gesamttumor angestrebt werden. Um die angesprochenen Hürden in der Gefäßanalyse anzugehen, wurde in dieser Arbeit dickschichtiges Gewebe gewählt, welches mittels der von der „Hot Spot-Methode“ abweichenden Space-Ball-Methode und ergänzenden Analysen zur Gefäßfunktionalität untersucht wurde. Die Verwendung der von uns verwendeten dicken Schichten erlaubt eine genauere stereologische Quantifizierung von histomorphologischen, dreidimensionalen Objekten. Auch kann so die Analyse multizellulärer Strukturen in ihrer Gänze, wie im Fall von tubulären Gefäßen, erleichtert werden. Andererseits führt die verwendete Schichtdicke zu erschwerenden Bedingungen in der Weiterverarbeitung. So sind bspw. die in den immunhistochemischen Färbungen verwendeten Antikörper, wie auch CD31, nur bedingt fähig in die Gewebe einzudringen. Herabgesetzte Farbintensitäten im Vergleich zu dünnschichtigen Präparaten sind das Resultat²⁵⁹. Die Funktionalität der U-87-Tumorgefäße haben wir indirekt in den morphologischen Studien sowie in den Untersuchungen zu Hämorrhagien und Nekrosen adressiert (vgl. Abschnitte 4.4 und 4.5 zu den Ergebnissen sowie Diskussion in 5.4). Die in dieser Arbeit verwendeten Schemata zur Gewebesammlung und -färbung (vgl. Abschnitte 3.4 und 3.6) sowie das Analyseverfahren der Space-Ball-Methode beruhten auf einer automatisierten Auswahl der Analyselokalisation und einer klaren Definition der zu zählenden Gefäßstrukturen in diesem Bereich, um eine möglichst repräsentative Darstellung des gesamten Tumors zu erreichen und eine mögliche Verzerrung durch die/den auswertende/n Wissenschaftler*in zu unterbinden²⁰⁹. Die Anisotropie des Gefäßnetzes – auch im Hinblick auf die in Abschnitt 5.1 diskutierte Beobachtung, dass Xenografts mit

verminderter Apelinexpression ein dichteres Gefäßnetz in der Peripherie und eine Gefäßrarefizierung im Zentrum zeigten sowie dass das Gefäßnetz des angrenzenden Hirngewebes dichter als im Normalhirn der gesunden Hemisphäre imponierte – wird im Rahmen der Space-Ball-Methode für das Tumorareal adressiert und durch eine flächendeckende repräsentative Auswahl der Lokalisationen ausgeglichen²⁰⁹. Auch der entsprechend fehlenden Orientierung des Gefäßsystems im Gewebe wird in der Space-Ball-Methode Beachtung geschenkt²⁰⁹. In der Analyse von Xenografts vier Wochen nach Implantation wurden für wenige Tiere abweichende Rastergrößen verwendet. Eine statistische Analyse inkl. grafischer Überprüfung wies keinen signifikanten Effekt der Rastergrößen auf die Parameter VLD und Komplexität des vaskulären Netzwerks auf. Dennoch muss das uneinheitliche Layout der Auswertung als Limitation benannt werden.

5.2 Apelinabhängige Unterschiede im Tumolvolumen von U-87-Xenografts

Schon in der kernspintomographischen Bildgebung (vgl. **Abbildung 18**) zeigt sich bildmorphologisch, dass Xenografts in Tieren mit reduziertem Apelinvorkommen (Gruppen U87NSC/AKO und U87AKD/AKO) kleinere Tumolvolumina aufweisen. In der statistischen Analyse bestätigt sich dies insbesondere mit zunehmendem Tumoralter. Unerheblich von der tumoralen Fähigkeit Apelin auszuschütten, erweist sich die Deletion der Apelinexpression im Wirt als essentiell. Insgesamt stellt sich die Frage, warum Xenografts in Versuchsgruppen mit reduziertem Apelinvorkommen ein kleineres Volumen aufweisen.

Wären nur Xenografts mit eingeschränkter Apelinexpression der Tumorzellen betroffen, wäre eine gehemmte Proliferation, eine höhere Apoptoserate der Tumorzellen oder ein Absterben durch Hypoxie-bedingter Nekrose zu diskutieren. Die Zellproliferation und -form der U87AKD-Zelllinie sind *in vitro* mit der Mutterzelllinie U-87 vergleichbar¹⁹². Auch Analysen anderer GBM-Zelllinien mit herabgesetzter Apelinexpression in Arbeiten der Gruppe um Mastrella et al. erwiesen keine Beeinträchtigung in Zellviabilität, Proliferationsrate und Ki-67-Status²³⁸. Untersuchungen zur Nekroseneigung in dieser Arbeit zeigen, dass gerade Tumore mit eingeschränkter Apelinproduktion in Mäusen mit regelrechtem Apelinvorkommen keine Nekrosen aufwiesen, vgl. auch Abschnitt 4.5..

Berta et al. verzeichneten bei *in-vivo*-Versuchen des humanen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, in denen Apelin mittels Gentransfer überexprimiert wurde, analog zu Ergebnissen dieser Arbeit größere Tumolvolumina und erhöhte Gefäßdichten. Die Überexpression

hatte keinen Einfluss auf die Proliferationstendenz der Tumorzellen *in vitro*¹³⁰. Auch Sorli et al. bestätigte den ausbleibenden Einfluss Apelins auf die Proliferationstendenz von manipulierten Mammakarzinomzellen *in vitro*¹³. Beide Arbeitsgruppen argumentieren, dass die größeren Tumorumfänge der apelinüberexprimierenden Versuchsgruppen durch einen stimulierenden Effekt Apelins auf die Tumorgefäße, einem früheren angiogenen Switch und der daraus resultierenden besseren Gefäßversorgung des Tumorgewebes begründet sind^{13,130}. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen führte die exogene Gabe von Apelin-13 in *in-vitro*-Versuchen sowohl zum oralen Plattenepithelkarzinom als auch zu humanen Zelllinien des Kolonkarzinoms zu einer verstärkten Proliferations- und Migrationstendenz der Tumorzellen^{260,261}. Heo et al. postulierte demnach die Hypothese, dass das Vorkommen des APLNR auf den Zielzellen die Wirkung des Apelins bestimmt und autokrine Wirkmechanismen ermöglicht. Während die Mammakarzinomzellen von Sorli et al. keine APLNR-Expression vorweisen, trägt das von Heo et al. verwendete orale Plattenepithelkarzinom den Rezeptor²⁶⁰. Auch führte sowohl eine Deletion des APLNR in hochgradig Apelin- und APLNR-exprimierenden Kolonkarzinomzellen, als auch eine exogene Zufuhr des (F13A)Apelin13-Antagonisten zu diesen Versuchszelllinien zu einer Hemmung der für die Zellproliferation verantwortlichen Signalwege in Versuchen von Picault et al.^{261,262}. Arbeiten zum antiapoptotischen Einfluss der Apelin-Signalwege zeigten unterschiedliche Ergebnisse²⁶³, wobei die Dokumentation der präventiven Wirkung auf die Zellapoptose für verschiedenste Zellarten überwiegt²⁶⁴⁻²⁶⁷. Basierend auf der beschränkten Literatur zu analogen Versuchsreihen wäre der Rückschluss, dass eine fehlende Apelinexpression zu einer gehemmten Proliferation und einer erhöhten Apoptoserate führe, allerdings spekulativ. Abgesehen von Mastrella et al. beschäftigte sich bislang keine Arbeitsgruppe intensiv mit den Auswirkungen einer herabgesetzten Apelinexpression von Malignomzellen auf das Tumorstadium *in vitro* und *in vivo*.

Da sich in meiner Arbeit auch die Xenografts mit regelrechter Apelinausschüttung in murinen Wirten mit deletierter Apelinexpression (U87NSC / AKO) signifikant kleiner darstellen, kann die geringere Tumormasse nicht allein auf ein unterschiedliches biologisches Verhalten der apelindefizienten U-87-Zellen *in vivo* zurückgeführt werden. Auch das Wachstumsverhalten der Versuchsgruppe U87AKD / WT passt nicht ins Bild, da sie signifikant größere Tumorumfänge aufweist als die Gruppen U87NSC / AKO und U87AKD / AKO. Hier ist die Relevanz des Apelinvorkommens im Wirt hervorzuheben. Die Hypothese von Berta et al. und Sorli et al., dass allein der stimulierende Effekt Apelins auf die Tumorgefäße die Tumormasse beeinflusst^{13,130}, kann mit unseren Ergebnissen zur Vaskularisation nicht bestätigt werden (vgl. Abschnitt 5.1). Vielmehr

lässt sich die Konstellation unserer Ergebnisse über die parakrine Wirkung Apelins erklären. Demnach haben die Gruppen *U87NSC / AKO* und *U87AKD / AKO* keinen Anreiz zum Wachstum oder einer Invasion während das Apelinvorkommen in der Gruppe *U87AKD / WT* auf parakrinem Weg die Tumorausdehnung begünstigt (vgl. auch Abschnitt 5.3). Ähnliche Ergebnisse liefern Mastrella et al. für andere murine Xenograftmodelle der Glioblastozelllinie GBM14 mit eingeschränkter Apelinausschüttung in Tumor und/oder Wirt. Sie konnten zeigen, dass mit sinkendem kompaktem Tumolvolumen bei reduziertem tumoralen und/oder murinen Apelinvorkommen das invasive Tumolvolumen steigt²³⁸.

Ein Anknüpfungspunkt für weiterführende Arbeiten zu der hier dargelegten Basis im gleichen Versuchssetting bot die Durchführung von Überlebensanalysen. Bekanntermaßen zeigt sich in der Betrachtung von Gliomen eine inverse Korrelation zwischen vaskulärer Dichte und Überlebenszeit, wobei eine Zunahme der Vaskularisation die Prognose zum Schlechteren beeinflusst^{141,146-148}. In den Ergebnissen dieser Arbeit bewies sich das herabgesetzte Apelinvorkommen im Wirt entsprechend als vorteilhaft. Demnach führt die Apelinproduktion der Tumorzellen zu vaskularisierteren Xenografts, aber eine apelinarme Umgebung im Wirt zu kleineren Phänotypen (vgl. Abschnitte 5.2 und 5.1). Durchgeführte Überlebensanalysen bestätigte die Beobachtung, dass das Fehlen von Apelin im Wirt das Überleben der Versuchstiere mit U-87-Xenografts signifikant verlängert¹⁹².

5.2.1 Evaluation der Methodik zur Tumorimplantation und Bestimmung der Tumorumina

Die Versuche zur Beobachtung der Tumorumina *in vivo* im zeitlichen Verlauf haben Limitationen, welche sich aus dem Versuchsmodell ergeben. Zum einen ist die Tumorausdehnung in einem geschlossenen Raum, wie dem murinen Kranium, räumlich begrenzt. Zum anderen ist das Tumorumin ab einem gewissen Ausmaß nicht mit dem Leben des Versuchstiers vereinbar. So würden sich bei unbegrenzter Beobachtungszeit die Tumorumina aller Gruppen im Verlauf angleichen oder Tiere mit schnellerem Wachstum den humanen Endpunkt zeitnaher erreichen bzw. früher versterben. Dennoch hat die Versuchsdurchführung *in vivo* unschätzbare Vorteile gegenüber *in-vitro*-Verfahren oder der subkutanen Tumorimplantation. *In-vitro*-Modelle sind zu vereinfacht um die reale Antwort des Organismus zu reproduzieren. Subkutane Xenograftmodelle sind ebenfalls einfach in der Durchführung, jedoch weisen auch sie immense analoge Limitationen

auf. Die intrazerebrale Mikroumgebung, inkl. der Verhaltens des tumoralen und lokalen Gefäßsystems sowie der Interaktionen zwischen Xenograft und hirnspezifischen Zellarten, ist auf diese Weise weder zu replizieren noch zu überprüfen^{268,269}.

Nach Durchführung der kernspintomographischen Bildgebung zeigte sich, dass einige Xenografts entlang des Inokulationskanals nach extrakraniell wuchsen oder in das Ventrikelsystem einbrachen. Eine Verzerrung der realen Tumorgroße ist hier denkbar, sodass in diesen Fällen ein Ausschluss erfolgte. Im Rahmen einer Fehleranalyse ist eine suboptimale Injektion bei diesen Tieren in Betracht zu ziehen. Insbesondere die Verwendung von kleinen Injektionsmengen (unter 3 µl), langsamen Injektionsraten (nicht geringer als 3 min) und automatisierten Injektionen mittels pumpengestützter Applikation führe in der Literatur zu einer bestmöglichen fokussierten Platzierung, minimalstem Reflux und geringster Variabilität in der Tumorgroße im Verlauf^{268,270,271}. Die in dieser Arbeit verwendete Injektionsmenge von 1 µl und die Injektionsrate von 2 min zzgl. 1 min Wartezeit vor begonnenem Rückzug entsprechen den Empfehlungen. Eine mögliche Verbesserung der Methodik kann in der Verwendung einer Injektionspumpe in folgenden Versuchsreihen angestrebt werden.

Eine Fehlerquelle in der Auswertung der Bildgebung umfasst möglicherweise das Verkennen von nicht-tumorösen Auffälligkeiten (bspw. Ödem oder Immunzellen) als Tumormasse. Zur Auswertung wurden T2-gewichtete Sequenzen verwendet, in denen ödematöse Areale hyperintens erscheinen und in der Regel gut abgrenzbar sind. Sollte eine Auswahl von ödematisiertem Gewebe in der automatisierten Markierungsfunktion erfolgt sein, so wurde dies manuell korrigiert.

Die Bestimmung der Tumolvolumina in histologischen Schnitten wurde nicht zuletzt aufgrund des erhöhten Aufwands lediglich in einer geringen Gruppengröße durchgeführt. Einrisse beim Schneiden der murinen Hirne sowie Veränderungen, wie Schrumpfung oder Risse des Gewebes durch die Bearbeitung der Präparate, wie Einfrieren, Färbemethoden etc., können die reale Tumorgroße verändern. In der Analyse mittels Cavalieri-Methode können zudem Blut- und Immunzellen als Tumoreal verkannt werden. Da diese Veränderungen in der Vorbereitung und das Verkennen von Tumorgrenzen in der Analyse weitestgehend alle Präparate betreffen, ist der Vergleich der Versuchsgruppen jedoch legitim und die Fehlerrate kann bei immer gleicher Anfertigung und Auswertung durch die identische Arbeitskraft minimiert werden²⁰⁹.

5.3 Apelinabhängige Unterschiede in der Invasionstendenz von U-87-Xenografts

Glioblastoma multiforme (GBM) zeichnen sich durch eine überschwängliche und abnormale Tumorneovaskularisation aus. Während es weithin bekannt ist, dass das Wachstum und die Ausdehnung solider Tumore an die Angiogenese tumorversorgender Gefäße gebunden ist, haben GBM die Fähigkeit therapeutische Maßnahmen zur Blockade dieser angiogenen Prozesse zu überwinden und durch infiltratives Wachstum ihre Ausdehnung voranzutreiben. In der Literatur werden demnach unterschiedliche Phänotypen beschrieben: Zum einen Malignome mit einer von der Angiogenese abhängigen Wachstumstendenz, bei der Tumorzellen in Clustern entlang neu entwickelter Blutgefäße im Normalgewebe existieren, zum anderen maligne Gliome mit von der Angiogenese unabhängigem Wachstum, welches durch die Infiltration einzelner Zellen in das Normalgewebe geprägt ist^{156,272}. Die Ausschüttung alternativer proangiogener Faktoren, die gesteigerte Fähigkeit zur Tumorzellinvasion und eine erhöhte Gefäßkooption werden als Ursachen der unterschiedlichen Phänotypen in Betracht gezogen^{48,165}. Obwohl VEGF-A eine zentrale Rolle in der pathologischen Neubildung von Tumorgefäßen spielt, ist unter anderem die Fähigkeit der Tumore zu einem infiltrativen Wachstumsmuster überzugehen verantwortlich für die Beobachtungen in klinischen Studien zum monoklonalen anti-VEGF-A-Antikörper Bevacizumab, in denen ein Versagen antiangiogener Therapieansätze in der GBM-Therapie festgestellt wurde^{167,168,273,274}. Eine Blockade von VEGF-A/VEGFR2 mittels Bevacizumab führt simultan zur Runterregulierung von Apelin sowohl in murinen GBM-Modellen* als auch in GBM-Proben von Patient*innen der Gruppe um Mastrella et al.. Außerdem kann in diesen murinen GBM-Modellen vom proneuralen Typ nach Gabe von Bevacizumab einerseits eine reduzierte Gefäßfläche und eine Verbesserung des Überlebens und andererseits ein gesteigertes Tumolvolumen im Vergleich zu Versuchstieren mit Placebo beobachtet werden^{238,275}. Folglich muss der gleiche indirekte Effekt von evasiver Resistenz gegenüber antiangiogener Therapie bei Apelindepletion in weiterführenden Analysen der Ergebnisse dieser Arbeit bedacht werden.

Die chemotaktischen Fähigkeiten Apelins wurden erstmals mit Hilfe von APLNR-transfizierten Zelllinien aufgezeigt^{103,276}. Im weiteren Verlauf erfolgte der Nachweis, dass Apelin die Proliferation und Migration von vaskulären Endothelzellen mit endogener APLNR-Expression induziert^{12,14,114}. Und auch außerhalb des Gefäßsystems konnte Apelins Rolle als chemotaktischer

* proneurale GBM-Modelle basierend auf dem RCAS/Tva-System bzw. p53-Knockout-Gliomstammzellen, welche PDFGB überexprimieren

Faktor in den Signalwegen der Zellattraktion, beispielsweise in lymphatischen Endothelialzellen¹¹⁸, gezeigt werden. Nun fiel in dieser Arbeit sowie entsprechend der Vorerfahrungen aus den klinischen Studien mit VEGF-Antikörpern und der Arbeit um Mastrella et al. auf, dass die apelinbeeinflusste Tumorangiogenese der U-87-Xenografts nicht ausschließlich Auswirkungen auf das Tumorstadium hat, sondern bei Verlust der autokrinen Apelinsekretion auch das Invasionsverhalten der Tumorzellen beeinflusst werden kann. Zeigen die Kontrollgruppe (*U87NSC/WT*) – und auch Tumore der Mutterzelllinie (*U87WT/WT*) – große Xenotransplantate mit kompakten Zellverbänden, wurden in den meist kleineren Tumoren mit herabgesetzter Apelinausschüttung teils bereits 14 Tage nach Implantation einzelne aus dem Tumorzellverbund herausgelöste Zellen im umliegenden Hirngewebe des Wirts beobachtet (Daten hier nicht gezeigt)¹⁹². Diese wichtige Nebenbeobachtung des Invasionsverhaltens von Tumorzellen mit herabgesetzter Apelinausschüttung wurde in der Arbeitsgruppe um Mastrella et al. für verschiedene GBM-Modelle (unter anderem auch U-87 MG *in vitro*) untersucht und bestätigt²³⁸. In den erstellten *in-vitro*-Assays beeinflusste Apelin direkt die Regulation der Tumorzellmigration und -invasion insbesondere von APLNR-exprimierenden Zellen. Der Verlust der autokrinen Apelinsignalwege resultierte vor allem bei Zellen mit hoher APLNR-Expression in einem aggressiveren Invasionsverhalten. Die Gabe des APLNR-Liganden Apelin-F13A zu GBM-Zellen mit erhaltener Apelinexpression reduzierte die Invasionstendenz nachweislich. Die klinische Relevanz konnte in stereotaktischen Biopsien nachvollzogen werden, in denen in invasiv wachsenden Zellverbänden des Tumorrandes höhere Expressionslevel des APLNR und interessanterweise eine fehlende Expression von Apelin nachgewiesen wurden. Im Tumorzentrum zeigten zell- und gefäßreiche Areale wiederum hohe Apelinlevel²³⁸. Auch *in-vivo*-Versuche in murinen Xenotransplantatmodellen anderer Zelllinien erbrachten analoge Verhältnisse zu den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen. Sie beobachteten kleinere Tumorstadien mit einem im Verhältnis höheren invasiven Tumorstadium in den Versuchsgruppen mit verringertem Apelinvorkommen (murin und tumoral)²³⁸. Auch andere Arbeitsgruppen beschrieben den Nutzen kompetitiver APLNR-Antagonisten in der Reduktion der Tumorstadienprogression von GBM und einem Modell des Mammakarzinoms^{277,278}. Pathophysiologisch kann dieses Verhalten bspw. auf den durch einen Apelinverlust verursachten Rückgang der Tumorstadienvaskularisation zurückgeführt werden, welche die Tumorzellen unter Druck setzt in physiologisch intakte (und gut vaskulär versorgte) Gebiete des Hirns zu wandern, da die Mikroumgebung des Tumors eine Formation großer solider Tumormassen nicht unterstützt (vgl. Abschnitt 1.2.1). Alternativ unterdrückt die Stimulation des APLNR der Tumorzellen evtl. direkt und aktiv die Tumorstadieninvasion und ein Apelinverlust löst wiederum über eine Aufhebung dieser Unterdrückung eine Invasionstendenz

aus. Das Apelin, welches von Endothelzellen am vordersten Gefäßsporn der Gefäßproliferate in hypoxischen GBM-Regionen ausgeschüttet wird, signalisiert den APLNR-exprimierenden Tumorzellen auf parakrinem Weg in gefäßreiche Tumorregionen zu wandern und gleichzeitig die Invasion in gesunde Hirnregionen mit fehlender Angiogenese und Apelinexpression zu verhindern^{14,238,279}. Ein gewisses Ausmaß existierender funktionierender autokriner APLN/APLNR-Signalwege in Tumorzellen scheint demnach vorteilhaft, da es der Invasionstendenz des GBM entgegenwirkt²³⁸. Weitere Erklärungsansätze wären die Wirkungsweise verschiedener Apelinisoformen, die unterschiedliche biologische Effekte bewirken^{97,105} oder aber die Wirkung eines weiteren APLNR-Liganden, wie *APELA*, welcher auch in GBM exprimiert wird und die Tumorgenese über das Wachstum von Gliomstammzellen voranzutreiben scheint. Die Expression von *APELA* korreliert mit reduzierten Überlebensraten und höheren Gliomgraden²⁸⁰. Weiterführende Studien zur Rolle von *APELA* in der Angiogenese von GBM oder auch zum Einschreiten eines nicht untersuchten proangiogenen Faktors, welcher ohne Vorkommen von Apelin vermehrt aktiv wird und wie Apelin migratorische Fähigkeiten hat, existieren bislang nicht. Es ist bekannt, dass Apelin die Migration von Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten, wie bspw. Kolonkarzinomen²⁶³, pulmonalen Adenokarzinomen²⁸¹, Magenkarzinomen²⁸² und oralen Plattenkarzinomen²⁶⁰, sowie die Invasivität von Kolon-²⁶³, Mamma-²⁸³ und Magenkarzinomzellen²⁸² durch eine hervorgerufene Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMP), welche die den Tumor umgebende extrazelluläre Matrix degradieren und reorganisieren, steigert.

5.4 Perizytäre Bedeckung und Gefäßdurchlässigkeit von U-87-Xenograft-Gefäßen

Apelin und sein Rezeptor bewirken die funktionelle und morphologische Reifung der Gefäße¹³¹, sodass eingangs die Annahme bestand, dass eine Reduktion des Apelinvorkommens Einflüsse auf die Reifung, Permeabilität und/oder auch den Grad der perizytären Bedecktheit hat. Die Unreife bzw. die Permeabilität der Tumorgefäße wurde indirekt durch den Bedecktheitsgrad der Endothelzellen mittels Perizyten und die Neigung zu Hämorrhagien in den Xenografts analysiert. Die Reifung beider Zellentitäten – Endothelzellen und Perizyten – bedingen einander. Die Differenzierung und Funktionstüchtigkeit von Perizyten und Endothelzellen bestimmen wiederum maßgeblich die vaskuläre Permeabilität^{28,143,149}. Die Versuche der Arbeitsgruppe um Hellström et al. zeigten, dass die Abwesenheit von Perizyten in PDGF-B- und PDGFR- β - (PDGF-Rezeptor- β -) defizienten

Mäusen keinen Einfluss auf die Gefäßdichte, Gefäßlänge und Anzahl der Verzweigungen des Gefäßnetzes in murinen Hirnen hatte, jedoch die Endothelzellen morphologisch abnorm waren. Sie fielen durch Hyperplasien und fehlerhafte Formen auf und bedingten erhöhte kapilläre Durchmesser und eine gesteigerte transendotheliale Permeabilität²⁸⁴. Bildmorphologische Auswertungen mittels Cellsens in dieser Arbeit wiesen darauf hin, dass das Apelinvorkommen in Tumorzellen und murinem Wirt keinen Einfluss auf die Perizyten-dichte auf der Gefäßaußenwand hat. Beobachtete Reduktionen der durch Perizyten bedeckten Gefäße und der absoluten Perizytenzahl in der Versuchsgruppe mit fehlendem Apelinvorkommen *U87AKD / AKO* im Vergleich zur Kontrollgruppe *U87NSC / WT* sind lediglich als Nebeneffekt des signifikant geringer ausgeprägten Gefäßnetzwerks zu interpretieren. Auch die initiale Annahme, dass Perizyten in apelindefizienten Xenografts unreifer sind und konsekutiv einen größeren Durchmesser besitzen (und von rundlicherer Form sind (Daten nicht gezeigt)), kann nicht bestätigt werden.

Gemäß der Annahme, dass in Tumorearen im Vergleich zum Normalhirn weitaus unorganisiertere und übermäßig ausgebildete Gefäßnetze vorherrschen (vgl. Abschnitt 1.2.2), konnte im Vergleich von Tumorgewebe und Normalhirn der anderen Hemisphäre bestärkt werden, dass Perizyten unabhängig von Versuchstiergruppe und Apelinvorkommen in den Xenografts in Perimeter, Fläche und Diameter größer sind und in absoluten Zahlen häufiger vorkommen. Eine einzelne Ausnahme bildet die Gruppe *U87AKD / AKO* unter Betrachtung der Perizytenanzahl, welche sich entsprechend der gering ausfallenden Gefäßanzahl in dieser Versuchsgruppe in Normalhirn und Tumorgewebe nicht signifikant unterscheiden.

Candolfi et al. beschreiben in der histopathologischen Analyse von experimentellen Gliommodellen, dass die Zelllinie U-87 MG hauptsächlich für ihre ausgeprägte Neovaskularisation auszuzeichnen ist und die aus dem humanen Setting bekannte Tendenz zur Nekrosenbildung in murinen Wirten[†] nicht reproduzierbar ist²⁸⁵. Dieser Umstand konnte hier bestätigt werden und dementsprechend zeigten alle Versuchsgruppen signifikant seltener Nekrosenzeichen als die in klinischen Studien vorbeschriebenen 76 - 88 % in humanen GBM²³⁵⁻²³⁷. Im Gegensatz dazu wurde in der Kontrollgruppe die in der Literatur beschriebene Häufigkeit von 53 % zum Auftreten von Hämorrhagien (inkl. Mikroblutungen) in GBM²³⁴ erfüllt. Eine fehlende Apelinexpression in Xenograft und/oder Wirt führte signifikant seltener zu intratumoralen Blutungen als für GBM im Allgemeinen angenommen. Und auch obwohl zwischen den Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede in den Post-Hoc-Analysen der Hämorrhagie- und Nekrosentendenz festgestellt werden

[†] Die Arbeitsgruppe um Candolfi et al. verwendete athyme Balb/c-Mäuse.

konnten, treten bildmorphologisch bei Tumoren der Kontrollgruppe mit erhaltener Apelinproduktion 44 % häufiger Hämorrhagien und 38% häufiger Nekrosen im Vergleich zur Versuchsgruppe mit eingeschränktem Apelinvorkommen in Tumor und Maus auf. In Zusammenschau mit der in der MRT erhobenen Tumorgröße können diese in der Kontrollgruppe vor allem in den Tumoren signifikant höheren Volumens festgestellt werden. Interessanterweise verzeichnen die Gruppen *U87NSC / AKO* und *U87AKD / AKO* auch Blutungen und Nekrosen in weniger großen Tumoren und obwohl Xenografts der Gruppe *U87AKD / WT* keine Anzeichen von Nekrosen zeigten, treten ebenso häufig wie in den anderen Versuchsgruppen mit eingeschränktem Apelinvorkommen Blutungen auf. Nekrosen sind das histologische Ergebnis von untergegangenen Tumorzellen – meist bedingt durch ein hypoxisches Mikromilieu in vaskulär in Anzahl oder Funktionalität unterversorgten Arealen¹⁴⁹. Pathophysiologisch wäre die für das überschießende Tumorwachstum inadäquate, unzureichende Anzahl von funktionalen Gefäßen in den großen, sehr kompakten Tumoren der Kontrollgruppe demnach für das häufigere Auftreten von Nekrosen verantwortlich zu machen. Auch das reduzierte Auftreten in der Gruppe *U87AKD / WT* wäre bei vorherrschendem avaskulären Wachstumsmuster (vgl. Abschnitt 5.3) erklärbar.

Die Annahme, dass die neugebildeten Tumorgefäße der Xenografts in Versuchsgruppen mit eingeschränktem Apelinvorkommen (tumoral und/oder murin) ebenfalls permeabler sind, kann als Gegenstand weiterführender Versuchsvorhaben bspw. mittels eines vaskulären Perfusionsassays mit blauer Tinte (Evans Blue) nach Miles²⁸⁶ und/ oder einer detaillierten Darstellung von interendothelialen Zellkontakten mittels Antikörperfärbung von Tight-Junction-Proteinen²⁸⁴, wie bspw. VEC, Occludin oder ZO-1 (Zonula occludens-1 oder auch Tight junction Protein-1), überprüft werden.

Letztendlich dienten diese bildmorphologischen Auswertungen als ergänzende Methoden zur Unterstützung der Hauptfragestellung und wurden zum Ende des Versuchsvorhabens durchgeführt. Die bildanalytischen Ergebnisse zu den perizytären Charakteristika zeigten die gleiche Tendenz wie die Analysen der Space-Ball-Methode. Jedoch wurden keine Signifikanzen erzielt, was am ehesten auf die Methodik zurückzuführen ist. Eine Erhöhung der Versuchstieranzahl wäre eine Möglichkeit die Streuung der Daten zu minimieren und die Aussagen zu untermauern. Zusätzlich ist die Art der Methodik als bildmorphologische Analyse fehleranfällig. Beispielsweise konnten lediglich Präparate mit einwandfreier Färbung der halbautomatischen Markierung mittels Threshold zugeführt werden, da sonst das Hintergrundrauschen falschpositive Ergebnisse provozierte. Außerdem ist eine indirekte Analyse, wie im Fall des Parameters *Anzahl der Objekte*, über

vier zentral gelegene Bildausschnitte eines zweidimensionalen, einzeln ausgewählten histologischen Schnittes in einem anisotropen Modell, wie dem Gefäßnetz, verbesserungswürdig^{205,209,258} (vgl. Diskussion zu den Möglichkeiten der repräsentativen Materialauswahl in Abschnitt 5.1.1). Bei der Begutachtung von Hämorrhagien und Nekrosen wurde durch die Erfahrung des Fachpersonals die Möglichkeit der fehlerhaften Interpretation, bspw. das Verkennen von Extravasationen, Gefäßen oder Entnahmeblutungen/-artefakten als reelle Hämorrhagien verringert.

5.5 Diskussion zur Methodik

5.5.1 Allgemeine Anmerkungen zur Methodik

In dieser Arbeit fanden unterschiedlichste Methoden zur Evaluation der Wirkung von Apelin auf die Angiogenese und Größenentwicklung des GBM Anwendung. Die Verwendung dieses komplexen Versuchsmodells *in vivo* und diverser Aus- und Einschlusskriterien für jede einzelne Methode resultierte in sehr unterschiedlichen Gruppengrößen. Ein Weglassen von Versuchstieren zur Anpassung der Gruppengrößen zugunsten der kleinsten Gruppe wurde nicht vorgenommen, da die Unterschiedlichkeit in der Versuchstieranzahl pro Gruppe einer qualitativ schlechteren Ausgangssituation für die statistische Analyse vorgezogen wurde.

5.5.2 Legitime Zusammenfassung des Wildtyps

GBM-Zellen haben eine geringe Mutationslast, d.h. das Tumorgewebe differiert im Erbgut bei geringer Mutationshäufigkeit wenig von gesunden Körperzellen. Dementsprechend weisen die Tumorzellen lediglich geringe Mengen an Neoantigenen auf und gelten als wenig immunogen. Diese niedrige Immunogenität in Kombination mit der abnormen Tumolvaskularisation und einer pathologischen Zusammensetzung des Tumormikromilieus erschwert Immunzellen das Erkennen des Tumorgewebes und die Initiierung immunologischer antitumoraler Prozesse²⁸⁷. Zusätzlich nutzt das GBM die relevante Eigenschaft, das Immunsystem in seinem Sinne zu modulieren. Obwohl das Immunsystem darauf ausgelegt ist – nach dem Konzept der immunologischen Überwachung (*immunological surveillance*) – Tumorzellen mit Hilfe von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen zu detektieren und zu eliminieren²⁸⁸, unterdrückt die Tumormikroumgebung eine effektive Immunantwort zum einen durch die Rekrutierung von modulierenden Immunzellen, wie regulierenden T-Zellen, Monozyten-abstammenden Suppressorzellen, Makrophagen und Mikroglia, und zum anderen mit Hilfe der Sekretion von Zytokinen, wie IL-6, IL-10, CSF-1, TGF- β und CCL2. Lange Zeit galt die Annahme, dass (maligne) Hirntumore der Immunüberwachung entgehen, da

das Gehirn als immunprivilegiertes Organ im physiologischen Zustand bei intakter Blut-Hirn-Schranke nur limitiert über antigen-präsentierende Immunzellen und eine lymphatische Drainierung verfügt²⁸⁹. Das Phänomen des Immunprivilegs ist dadurch gekennzeichnet, dass Zellen nicht durch das Immunsystem erkannt und zerstört werden können. In der Konsequenz haben Pathogene oder Tumore bessere Möglichkeiten zur Immunevasion^{290,291}.

In erkranktem Hirngewebe ist jedoch die Integrität der Blut-Hirn-Schranke kompromittiert und die Mobilität von Immunzellen über diese Barriere möglich²⁹². Studien zur Pathophysiologie von GBM weisen dementsprechend zunehmend darauf hin, dass Immunzellen und deren Infiltration ins Tumorgebiet zu großem Maße vorkommen^{292,293}. In der Tumorumgebung ist die Funktionalität der Immunzellen nicht nur auf die Defensive beschränkt, sondern kann auch im Gegenteil zum Tumorwachstum beitragen. Regelmäßige immunologische Mechanismen in Zuständen akuter Inflammation erkennen tumorspezifische Antigene und zerstören die antigentragenden Tumorzellen. Chronische inflammatorische Prozesse haben eine tumorunterstützende Wirkung, tragen der DNS-Schädigung bei, aktivieren die Tumorangiogenese, fördern die Umstrukturierung der Extrazellulärmatrix und deaktivieren die tumorbezogene adaptive Immunantwort²⁹⁴. Die Modulation der Immunantwort wird insbesondere durch die Tumorzellen selbst und das akquirierte Tumormikromilieu, bestehend aus vaskulären Zellen, glialen Zellen und Immunzellen, beeinflusst^{289,295-297}. Insbesondere die Produktion von immunsuppressiven Zytokinen, die Unterdrückung der T-Zell-Proliferation und die Aktivierung von regulierenden T-Zellen, welche auch supprimierend auf die Immunantwort wirken, helfen somit der Immunevasion von GBM^{289,291}. Microglia werden durch Zytokinaktivierung genutzt, ihrerseits ebenfalls immunsuppressive Liganden zu exprimieren. Die hypoxische Tumorumgebung führt dazu, dass sich Makrophagen des ZNS zu tumorassoziierten Makrophagen umwandeln, welche neben den Mikroglia ebenfalls über immunsuppressive und tumorunterstützende Mechanismen und insbesondere durch Ausschüttung von EGF, CSF-1, TGF- β 1, IL-6 und Matrixmetalloproteinasen die Tumorangiogenese, -invasion, -migration und -expansion fördern²⁸⁹. Die Inhibierung des VEGF-Signalwegs in tumorassoziierte Makrophagen und Mikroglia führte in der Literatur zu einem herabgesetzten Tumorwachstum und einer reduzierten Tumolvaskularisation²⁹⁸. Makrophagen und Mikroglia nehmen einen Großteil der tumorinfiltrierenden Zellen des Immunsystems ein²⁹⁹⁻³⁰¹, eine Unterscheidung von Mikroglia und Makrophagen fällt aufgrund eines fehlenden spezifischen histologischen Markers schwer^{302,303}. Neben Mikroglia und Makrophagen sind NK-Zellen, als große granuläre Lymphozyten, ebenfalls Teil der tumorinfiltrierenden Zellen³⁰⁴. Obwohl sie den kleinsten Teil der Immunzellpopulation in GBM einnehmen (ca. 2 %), sind sie aufgrund ihres bedeutenden Anteils in der antitumoralen Immunantwort

Gegenstand aktueller Studien zu immunologischen Therapiestrategien^{305,306}. NK-Zellen zerstören durch die Induktion von Apoptosesignalen direkt maligne Zellen und lenken über die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α und Interferon- γ , indirekt die tumorspezifische Antwort des adaptiven Immunsystems, bspw. über dendritische Zellen, die wiederum T-Zellen aktivieren³⁰⁷⁻³⁰⁹. Insbesondere undifferenzierte GBM-Zellen und GBM-Stammzellen sind anfälliger für die NK-Zell-vermittelte Zerstörung³¹⁰. Die Funktionalität von NK-Zellen wird in GBM unter anderem insbesondere durch die Ausschüttung von TGF- β eingeschränkt³¹¹. Die molekularbiologische Heterogenität von GBM und die vielfältigen Wege dieser Neoplasien lokal und systemisch immunsuppressiv zu wirken, stellt die Entwicklung von effektiven Immunotherapien vor große Hürden.

Unter Betrachtung der dargelegten Rolle des Immunsystems in GBM ist eine Limitation dieser Arbeit in der Zusammenführung der verschiedenen immundefizienten Mausgenotypen Rag1/2 und *cγ*Rag zu suchen. Sie basierte auf der Annahme, dass NK-Zellen physiologischerweise nicht die Blut-Hirn-Schranke überschreiten³¹². Tatsächlich zeigte die erhöhte Anzahl der NK-Zellen in Rag1- und Rag2-Mäusen nachgewiesenermaßen auch keine signifikante Wirkung auf das Tumorstadium und die Gefäßausbildung im durchgeführten Versuchsvorhaben (vgl. Abschnitt 4.6). Dennoch müsste in weiteren Studienvorhaben das Vorhandensein von Immunzellen in der Tumorumgebung und ihre eventuelle Wirkung auf das Tumorstadium näher beleuchtet werden.

Weitere Anknüpfungspunkte für anschließende Studien sind bspw. die Wirkung Apelins auf die Funktion von weiterhin in immundefizienten Mäusen vorhandenen Immunzellen, wie Makrophagen, Mikroglia und NK-Zellen. Makrophagen exprimieren den ALPDR und es hat sich gezeigt, dass Apelin einen Einfluss auf die Entwicklung, das Überleben und die Funktion von Makrophagen hat. Dabei wirkt Apelin zum einen positiv auf die Entwicklung von Makrophagen ein, beschützt sie vor Hypoxie-induzierter Apoptose und fördert die Zellmigration. Zum anderen wird über die Inhibierung aktivierter Makrophagen ein antiinflammatorischer Effekt erzielt, indem es die Phagozytose, chemotaktischen Eigenschaften und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine herabsetzt^{313,314}. Untersuchungen von aktivierten Makrophagen in apelindefizienten und Wildtypmäusen zeigten keinen Unterschied im Expressionsmuster der proinflammatorischen Zytokine und im Migrationsverhalten. Es wird daher angenommen, dass neben Apelin andere Peptide die Makrophagenfunktion beeinflussen^{313,315}. Außerdem steigern regulierende T-Zellen die Apelinexpression in Endothelzellen³¹⁶. Die induzierte Apelinexpression wiederum steigert die VCAM-1-Expression auf den Endothelzellen von normalisierten Gefäßen, welche eine Voraussetzung für den Einstrom und die Funktion von antitumoralen T-Zellen ist. In Studien, in denen die Induktion

von Apelin in Kombination mit einem Vakzin gegeben wurde, welches das Immunsystem antreibt und zur Produktion von NK-Zellen beiträgt, wurde eine starke Tumorantwort durch die über die normalisierten Gefäße wandernden NK-Zellen beobachtet¹³¹.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der bösartigste von Gliazellen ausgehende Hirntumor und der am häufigsten auftretende primäre Hirntumor des Erwachsenen^{4,135,317}. Aufgrund des äußerst invasiven und destruierenden Wachstums werden aufwendige Therapieverfahren mit Kombinationen aus chirurgischer Intervention, Bestrahlung und Chemotherapie dem alleinigen chirurgischen Therapieansatz vorgezogen⁷. Trotz einer interdisziplinären Herangehensweise liegt die mittlere Lebenserwartung von Patient*innen mit GBM ab Diagnosestellung je nach Patientenalter zwischen 8,5 - 16 Monaten^{3,7}, sodass eine Entwicklung alternativer Therapiestrategien zur Verbesserung dieses Outcomes von Interesse ist. Für das Überleben und die Expansion maligner Gliome sind die Tumorzellen in der Lage, einer für sie feindlichen Mikroumgebung zu entgehen, indem sie das Gefäßsystem gesunder Hirnareale stimulieren, neue Blutgefäße zu bilden (vgl. Abschnitt 1.2.1)^{10,17}. Dieser als Tumorangiogenese betitelte Prozess wird über Botenstoffe (pro- und antiangiogene Faktoren) reguliert, wobei das Verhältnis zugunsten der proangiogenen Faktoren ausfällt. Einer der wichtigsten und meist erforschtesten proangiogenen Faktoren in der pathologischen Angiogenese und im Vorkommen in soliden Tumoren – unter anderem auch mit starker Überexpression in den meisten GBM – ist VEGF⁴⁹. Demzufolge wurde in Forschung und Entwicklung viel Hoffnung in zielgerichtete Therapiestrategien gegen den VEGF-Rezeptor gelegt und 2009 Bevacizumab als VEGF-Inhibitor für die Therapie des GBM-Rezidivs zugelassen^{159,160}. In den Vorarbeiten für diese Arbeit wurden die regulatorische Funktion von Apelin und seines G-Protein-gekoppelten Rezeptors APLNR in der embryonalen Gefäßentwicklung sowie die durch VEGF-Signalwege induzierte endotheliale Expression von Apelin nachgewiesen. Eine Hochregulierung von Apelin und APLNR in mikrovaskulären Proliferationen des humanen Glioblastoma multiforma wurde ebenfalls aufgedeckt¹⁴. Darauf aufbauend wurde in dieser Arbeit der Einfluss Apelins auf die Vaskularisierung, das Wachstum sowie auf die Morphologie und die Funktion der Tumorgefäße des orthotopen Xenograftmodells humaner Glioblastomzellen (U-87 MG) analysiert. Zusammenfassend kann bestätigt werden, dass sich die Xenografts in Versuchsgruppen mit reduzierter Apelinproduktion im Vergleich zu den Gruppen mit vorhandener Apelinausschüttung in immunhistochemisch gefärbten Schnitten bzgl. ihrer *Vessel Length Density* (Gefäßlängendichte) und der Komplexität des vaskulären Netzwerks und in der akquirierten MRT-Bildgebung bzgl. ihrer Tumervolumina unterscheiden.

Die hier dargelegten Versuche weisen darauf hin, dass Apelin – sowohl exprimiert durch das Tumorgewebe als auch durch den murinen Wirt – einen relevanten Effekt auf das Ausmaß der Tumorangiogenese hat. Insgesamt zeigt sich, dass mit abnehmender Verfügbarkeit von Apelin die Anzahl der Gefäße, die Gefäßlängendichte und die Komplexität des vaskulären Netzwerks geringer ausfällt. Dabei führt eine Reduktion der Apelinexpression sowohl durch die lentivirale Modulation von Apelin in humanen GBM-Zellen als auch im Rahmen des Apelin-Knock-out-Modells des murinen Wirts zu einer herabgesetzten GBM-Vaskularisation. Die Kombination von GBM-Zellen mit supprimierten Apelinleveln in Mäusen mit fehlender Apelinexpression führte zusätzlich zu einer verstärkten Dezimierung der GBM-Neoangiogenese und resultierte in einer derart reduzierten Tumolvaskularisation, die der Vaskularisation von physiologischem Hirngewebe des Striatum entsprach. Weiterführend konnte die Gabe von Apelin in dieses Setting der kombinatorischen Apelindeletion die typische Tumolvaskularisation wiederherstellen und die Tumorangiogenese steigern. Die Anzahl der Perizyten zeigte sich analog der Gefäßrarefizierung in der Gruppe mit vollständiger Apelindeletion im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert. Ansonsten unterschied sich der perizytäre Bedecktheitsgrad, die Anzahl und auch die Größe der Perizyten mit unterschiedlichem Maß an Apelinlevel nicht. Im Vergleich zum Normalgewebe entsprach lediglich die Perizytenzahl in der Versuchsgruppe mit kombinatorisch in Tumor und Wirt reduzierter Apelinmenge der Anzahl im Normalhirn (entsprechend der Ergebnisse der Vaskularisation). Die Xenografts mit erhaltener Apelinausschüttung und die Tumore mit verminderter Apelinexpression in Wirten mit reduziertem Apelinvorkommen zeigten im Gegensatz dazu entsprechend der in der Literatur bekannten Annahme, dass Tumore vaskularisierter sind, in Anzahl gesteigerte Perizyten im Vergleich zum Normalgewebe. Die Perizyten aller Versuchsgruppen hatten einen größeren Durchmesser als die des Normalhirns. Bei der Betrachtung der Gefäßfunktionalität zeichneten sich die Tumore mit erhaltener Apelinausschüttung in Neoplasie und Wirt durch ähnliche Inzidenzen von intratumoralen Blutungen aus, wie in der Literatur beschrieben. Bei fehlender Apelinexpression in Xenograft und/oder Wirt traten im Gegensatz dazu signifikant seltener intratumorale Blutungen auf als für GBM im Allgemeinen angenommen. Nekrosen wurden für alle Versuchsgruppen signifikant seltener als in klinischen Studien verzeichnet. War der Nachweis von Blutungen und Nekrosen bei vollständig erhaltener Apelinausschüttung von der Größe der Tumore abhängig, so verzeichneten auch kleinere Xenografts der Versuchsgruppe mit fehlender Apelinexpression im Wirt Hämorrhagien und Nekrosen. Die Xenografts mit reduzierter Apelinexpression der Tumorzellen und erhaltener Apelinausschüttung des Wirts präsentierten keinerlei Nekrosen.

Da die Literatur bereits gezeigt hat, dass die Apelinwirkung je nach Vorhandensein des APLNR und auch in seinen autokrinen und parakrinen Wirkmechanismen stark variiert^{13,130,260} (vgl. Abschnitte 5.2 und 5.3), wäre dieser bisher in dieser Arbeit nicht adressierte Aspekt von großem Interesse. Auch scheinen sich die intrazellulären Signalwege Apelins für Migration und Antiapoptose von den Signalwegen für Proliferation zu unterscheiden¹¹⁰. In diesem Sinne stellt sich die Frage, ob die Blockade von APLNR oder der Verlust der Apelinexpression den gleichen therapeutischen Effekt zeigt und ob die Manipulation des Apelin-APLNR-Signalwegs ähnliche gegensätzliche (eher invasionsfördernde) Auswirkungen hat wie die von Bevacicumab (vgl. Abschnitte 5.2 und 5.3)^{168,167}. Da andere Liganden des APLNR (*ELABELA* und *Toddler*^{98,99}) zur Verfügung stehen, muss ebenfalls beurteilt und ausgeschlossen werden, dass bei Blockade von Apelin und/oder APLNR Signalwege oder Mechanismen über diese Liganden verstärkt ablaufen oder kompensiert werden. Auch der Einfluss Apelins auf die Immunzellen des Tumormikromilieus sollte ein Ansatzpunkt weiterführender Studien sein (vgl. 5.5.2).

Klinische Studien mit antiangiogenen Therapieansätzen, wie der anti-VEGF-Therapie, weisen auf eine Adaptation der Neoplasien durch die Aktivierung anderer Aktivatoren der Angiogenese hin¹¹. Demnach muss der gleiche Effekt von evasiver Resistenz gegenüber antiangiogener Therapie bei Apelindepletion in weiterführenden Arbeiten betrachtet werden. Andere zu untersuchende proangiogene Faktoren, welche ebenfalls eine Rolle in der Tumorgenese von GBM zu haben scheinen, wären bspw. der Stammzellfaktor (*stem cell factor (SCF)*), PDGF, bFGF oder der epidermale Wachstumsfaktor und sein Rezeptor (*epidermal growth factor (receptor)*, EGF/EGFR)^{11,143,251,318}. Diese Arbeit konzentriert sich auf einen der anscheinend synergistisch wirkenden Angiogenesefaktoren. Eine simultane Unterbrechung mehrerer Signalwege, bspw. die von VEGF, EGF/EGFR und Apelin, gäbe eventuell mehr Einsicht in die Möglichkeiten der Unterdrückung angiogener Prozesse. Auch das Vorhandensein von VEGF und VEGFR-2 in GBM-Zellen mit verminderter Apelinexpression wäre von Interesse. Die verminderte Expression von Apelin bei vorhandener Blockade des VEGFR-2 wurde von Mastrella et al. bewiesen²³⁸, ein analoger Nachweis ist ausstehend. Auch die kombinierte Blockade von VEGFR-2 und APLNR wurde von Mastrella et al. bereits für orthotop implantierte *p53^{KO}*PDGF-B GBM-Stammzellen umgesetzt und ein synergistischer Benefit für das Überleben festgestellt²³⁸. Eine Übertragung auf das U-87-Modell wäre denkbar.

Weitere Fragen, die auf Basis der hier vorgestellten Ergebnisse adressiert werden können, sind bspw., ob die Apelin/APLNR-stimulierte Angiogenese in den verschiedenen existierenden Tumorsubtypen der GBM (proneural, klassisch oder mesenchymal) unterschiedliche

Ausprägungen hat und ob als Konsequenz eine therapeutische Hemmung der Apelin/APLNR-induzierten Tumervaskularisation eher auf gewisse Subtypen angewendet werden sollte, wie von Mastrella et al. bereits angesprochen²³⁸.

Des Weiteren kann die Rolle von Apelin und APLNR als Biomarker in der Prognose des GBM weiter untersucht werden. Es hat sich gezeigt, dass die Höhe der Expressionslevel von APLNR und/oder Apelin in Tumorgeweben sowie das Serumlevel von Apelin für Prognose und auch Therapieansprechen unter Radiochemotherapie bei einigen Tumorentitäten prädiktiv bedeutend sind¹²⁵⁻¹²⁹.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die Modulation des Apelin/APLNR-Signalwegs bedeutende Unterschiede im vaskulären Phänotyp der GBM erzeugt und verspricht eine potenzielle Relevanz für die therapeutische Anwendung. Die vorliegende Arbeit bietet eine fundierte Basis und zahlreiche Anknüpfungspunkte zu weiterführenden Untersuchungen für die Entwicklung neuer Therapieansätze in der Behandlung der aggressiven Tumorentität des GBM.

7 Literaturverzeichnis

1. Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P. & Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica* **131**, 803-820 (2016).
2. Wen, P.Y. & Kesari, S. Malignant gliomas in adults. *The New England journal of medicine* **359**, 492-507 (2008).
3. Omuro, A.M. & Delattre, J.Y. Editorial: what is new in the treatment of gliomas? *Curr Opin Neurol* **20**, 704-707 (2007).
4. Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., European Organisation for, R., Treatment of Cancer Brain, T., Radiotherapy, G. & National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* **352**, 987-996 (2005).
5. Weller, M., van den Bent, M., Tonn, J.C., Stupp, R., Preusser, M., Cohen-Jonathan-Moyal, E., Henriksson, R., Rhun, E.L., Balana, C., Chinot, O., Bendszus, M., Reijneveld, J.C., Dhermain, F., French, P., Marosi, C., Watts, C., Oberg, I., Pilkington, G., Baumert, B.G., Taphoorn, M.J.B., Hegi, M., Westphal, M., Reifenberger, G., Soffietti, R., Wick, W. & European Association for Neuro-Oncology Task Force on, G. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol* **18**, e315-e329 (2017).
6. Weathers, S.P. & Gilbert, M.R. Advances in treating glioblastoma. *F1000Prime Rep* **6**, 46 (2014).
7. Delgado-Lopez, P.D. & Corrales-Garcia, E.M. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clin Transl Oncol* **18**, 1062-1071 (2016).
8. Folkman, J. Angiogenesis. *Annual review of medicine* **57**, 1-18 (2006).
9. Karamysheva, A.F. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry. Biokhimiia* **73**, 751-762 (2008).
10. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine* **285**, 1182-1186 (1971).
11. Sun, L., Hui, A.M., Su, Q., Vortmeyer, A., Kotliarov, Y., Pastorino, S., Passaniti, A., Menon, J., Walling, J., Bailey, R., Rosenblum, M., Mikkelsen, T. & Fine, H.A. Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell* **9**, 287-300 (2006).
12. Cox, C.M., D'Agostino, S.L., Miller, M.K., Heimark, R.L. & Krieg, P.A. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Developmental biology* **296**, 177-189 (2006).
13. Sorli, S.C., Le Gonidec, S., Knibiehler, B. & Audigier, Y. Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene* **26**, 7692-7699 (2007).

14. Kälén, R.E., Kretz, M.P., Meyer, A.M., Kispert, A., Heppner, F.L. & Brändli, A.W. Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Developmental biology* **305**, 599-614 (2007).
15. Risau, W. & Flamme, I. Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* **11**, 73-91 (1995).
16. Schirmer, S.H., van Royen, N., Laufs, U. & Böhm, M. [Mechanisms and potential of the therapeutic stimulation of arteriogenesis]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* **134**, 302-306 (2009).
17. Naumov, G.N., Akslen, L.A. & Folkman, J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell cycle* **5**, 1779-1787 (2006).
18. Folkman, J. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Experimental cell research* **312**, 594-607 (2006).
19. Jain, R.K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine* **9**, 685-693 (2003).
20. Simionescu, M. Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 266-274 (2007).
21. Augustin, H.G., Kozián, D.H. & Johnson, R.C. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **16**, 901-906 (1994).
22. Simionescu, M., Simionescu, N. & Palade, G.E. Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *The Journal of cell biology* **67**, 863-885 (1975).
23. Simionescu, M., Simionescu, N. & Palade, G.E. Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. Arteries and veins. *The Journal of cell biology* **68**, 705-723 (1976).
24. Kalluri, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* **3**, 422-433 (2003).
25. Winkler, E.A., Bell, R.D. & Zlokovic, B.V. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nature neuroscience* **14**, 1398-1405 (2011).
26. Fakhrejahani, E. & Toi, M. Tumor angiogenesis: pericytes and maturation are not to be ignored. *Journal of oncology* **2012**, 261750 (2012).
27. Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A.A. & Barres, B.A. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* **468**, 562-566 (2010).
28. Shepro, D. & Morel, N.M. Pericyte physiology. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **7**, 1031-1038 (1993).
29. Poole, T.J. & Coffin, J.D. Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *The Journal of experimental zoology* **251**, 224-231 (1989).
30. Ribatti, D. Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. *Angiogenesis* **11**, 3-10 (2008).
31. Roman, B.L. & Weinstein, B.M. Building the vertebrate vasculature: research is going swimmingly. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **22**, 882-893 (2000).

32. Xu, K., Chong, D.C., Rankin, S.A., Zorn, A.M. & Cleaver, O. Rasip1 is required for endothelial cell motility, angiogenesis and vessel formation. *Developmental biology* **329**, 269-279 (2009).
33. Jung, K.H. & Roh, J.K. Circulating endothelial progenitor cells in cerebrovascular disease. *Journal of clinical neurology* **4**, 139-147 (2008).
34. Oliver, G. Lymphatic vasculature development. *Nature reviews. Immunology* **4**, 35-45 (2004).
35. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine* **9**, 653-660 (2003).
36. Onishi, M., Ichikawa, T., Kurozumi, K. & Date, I. Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain tumor pathology* **28**, 13-24 (2011).
37. Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353-364 (1996).
38. Brooks, P.C., Clark, R.A. & Cheresh, D.A. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* **264**, 569-571 (1994).
39. Kim, S., Bell, K., Mousa, S.A. & Varner, J.A. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *The American journal of pathology* **156**, 1345-1362 (2000).
40. Lindahl, P., Johansson, B.R., Leveen, P. & Betsholtz, C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**, 242-245 (1997).
41. Ferrara, N. & Kerbel, R.S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **438**, 967-974 (2005).
42. Bergers, G. & Benjamin, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews. Cancer* **3**, 401-410 (2003).
43. Carmeliet, P. & Jain, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249-257 (2000).
44. Schirmer, S.H., van Nooijen, F.C., Piek, J.J. & van Royen, N. Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. *Heart* **95**, 191-197 (2009).
45. Jain, R.K., di Tomaso, E., Duda, D.G., Loeffler, J.S., Sorensen, A.G. & Batchelor, T.T. Angiogenesis in brain tumours. *Nature reviews. Neuroscience* **8**, 610-622 (2007).
46. Raza, A., Franklin, M.J. & Dudek, A.Z. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *American journal of hematology* **85**, 593-598 (2010).
47. Risau, W. What, if anything, is an angiogenic factor? *Cancer metastasis reviews* **15**, 149-151 (1996).
48. Carmeliet, P. & Jain, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298-307 (2011).
49. Ferrara, N., Gerber, H.P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* **9**, 669-676 (2003).
50. Gerber, H.P., Dixit, V. & Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **273**, 13313-13316 (1998).

51. Jakeman, L.B., Armanini, M., Phillips, H.S. & Ferrara, N. Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* **133**, 848-859 (1993).
52. Miquerol, L., Langille, B.L. & Nagy, A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* **127**, 3941-3946 (2000).
53. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. & Nagy, A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-439 (1996).
54. Folkman, J. & Ingber, D. Inhibition of angiogenesis. *Seminars in cancer biology* **3**, 89-96 (1992).
55. Baeriswyl, V. & Christofori, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in cancer biology* **19**, 329-337 (2009).
56. Folkman, J. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Scientific American* **275**, 150-154 (1996).
57. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
58. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
59. Goldmann, E. The Growth of Malignant Disease in Man and the Lower Animals, with special reference to the Vascular System. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **1**, 1-13 (1908).
60. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932-936 (2005).
61. Chung, A.S., Lee, J. & Ferrara, N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* **10**, 505-514 (2010).
62. Carmeliet, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* **69 Suppl 3**, 4-10 (2005).
63. Carmeliet, P. & Jain, R.K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature reviews. Drug discovery* **10**, 417-427 (2011).
64. Patiar, S. & Harris, A.L. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha as a cancer therapy target. *Endocrine-related cancer* **13 Suppl 1**, S61-75 (2006).
65. Arvelo, F. & Cotte, C. [Hypoxia in cancer malignity. Review]. *Investigacion clinica* **50**, 529-546 (2009).
66. North, S., Moenner, M. & Bikfalvi, A. Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer letters* **218**, 1-14 (2005).
67. Safran, M. & Kaelin, W.G., Jr. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *The Journal of clinical investigation* **111**, 779-783 (2003).
68. Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D. & Wiegand, S.J. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**, 1994-1998 (1999).

69. Zagzag, D., Hooper, A., Friedlander, D.R., Chan, W., Holash, J., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G.D. & Grumet, M. In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis. *Experimental neurology* **159**, 391-400 (1999).
70. Bergers, G. & Song, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-oncology* **7**, 452-464 (2005).
71. Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N. & Yancopoulos, G.D. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55-60 (1997).
72. Forsyth, P.A., Wong, H., Laing, T.D., Rewcastle, N.B., Morris, D.G., Muzik, H., Leco, K.J., Johnston, R.N., Brasher, P.M., Sutherland, G. & Edwards, D.R. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *British journal of cancer* **79**, 1828-1835 (1999).
73. Lakka, S.S., Gondi, C.S., Dinh, D.H., Olivero, W.C., Gujrati, M., Rao, V.H., Sioka, C. & Rao, J.S. Specific interference of urokinase-type plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 gene expression induced by double-stranded RNA results in decreased invasion, tumor growth, and angiogenesis in gliomas. *The Journal of biological chemistry* **280**, 21882-21892 (2005).
74. Dvorak, H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **20**, 4368-4380 (2002).
75. Dvorak, H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine* **315**, 1650-1659 (1986).
76. Nagy, J.A., Chang, S.H., Dvorak, A.M. & Dvorak, H.F. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *British journal of cancer* **100**, 865-869 (2009).
77. Marmé, D. & Fusenig, N. *Tumor Angiogenesis: Basic Mechanisms and Cancer Therapy*, (Springer, Berlin, Germany, 2008).
78. McDonald, D.M. & Baluk, P. Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer research* **62**, 5381-5385 (2002).
79. Zhang, Z., Neiva, K.G., Lingen, M.W., Ellis, L.M. & Nor, J.E. VEGF-dependent tumor angiogenesis requires inverse and reciprocal regulation of VEGFR1 and VEGFR2. *Cell death and differentiation* **17**, 499-512 (2010).
80. Furuya, M., Nishiyama, M., Kasuya, Y., Kimura, S. & Ishikura, H. Pathophysiology of tumor neovascularization. *Vascular health and risk management* **1**, 277-290 (2005).
81. Vincent T. DeVita Jr. MD, T.S.L.M.P., Steven A. Rosenberg MD PhD, Ronald A. DePinho MD, Robert A. Weinberg PhD. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology* (LWW; Ninth, North American Edition edition, 2011).

82. Volm, M., Koomagi, R. & Mattern, J. PD-ECGF, bFGF, and VEGF expression in non-small cell lung carcinomas and their association with lymph node metastasis. *Anticancer research* **19**, 651-655 (1999).
83. Yanagisawa, K., Hamada, K., Gotoh, M., Tokunaga T, Oshika, Y., Tomisawa, M., Lee, Y.H., Handa, A., Kijima, H., Yamazaki, H., Nakamura, M., Ueyama, Y., Tamaoki, N. & Fukuda, H. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the subacromial bursa is increased in patients with impingement syndrome. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **19**, 448-455 (2001).
84. Yoshiji, H., Noguchi, R., Kuriyama, S., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Yanase, K., Namisaki, T., Kitade, M., Yamazaki, M., Uemura, M. & Fukui, H. Different cascades in the signaling pathway of two vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors for the VEGF-mediated murine hepatocellular carcinoma development. *Oncology reports* **13**, 853-857 (2005).
85. Ellis, P.E., Wong Te Fong, L.F., Rolfe, K.J., Crow, J.C., Reid, W.M., Davidson, T., MacLean, A.B. & Perret, C.W. The role of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase (PD-ECGF/TP) in Paget's disease of the vulva and breast. *Anticancer research* **22**, 857-861 (2002).
86. Takahashi, M., Maeda, S., Ogura, K., Terano, A. & Omata, M. The possible role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in gastric ulcer healing: effect of sofalcone on VEGF release in vitro. *Journal of clinical gastroenterology* **27 Suppl 1**, S178-182 (1998).
87. Sowter, H.M., Corps, A.N., Evans, A.L., Clark, D.E., Charnock-Jones, D.S. & Smith, S.K. Expression and localization of the vascular endothelial growth factor family in ovarian epithelial tumors. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **77**, 607-614 (1997).
88. Agency, E.M. Avastin : European public assessment report (EPAR) - Summary for the public. Vol. 2017 (2016).
89. Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R. & Kabbinavar, F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* **350**, 2335-2342 (2004).
90. Presta, L.G., Chen, H., O'Connor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M. & Ferrara, N. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer research* **57**, 4593-4599 (1997).
91. Johnson, D.H., Fehrenbacher, L., Novotny, W.F., Herbst, R.S., Nemunaitis, J.J., Jablons, D.M., Langer, C.J., DeVore, R.F., 3rd, Gaudreault, J., Damico, L.A., Holmgren, E. & Kabbinavar, F. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **22**, 2184-2191 (2004).
92. Miller, K.D., Chap, L.I., Holmes, F.A., Cobleigh, M.A., Marcom, P.K., Fehrenbacher, L., Dickler, M., Overmoyer, B.A., Reimann, J.D., Sing, A.P., Langmuir, V. & Rugo, H.S. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine

- in patients with previously treated metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 792-799 (2005).
93. Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E.A., Shenkier, T., Cella, D. & Davidson, N.E. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* **357**, 2666-2676 (2007).
94. Sandler, A., Gray, R., Perry, M.C., Brahmer, J., Schiller, J.H., Dowlati, A., Lilenbaum, R. & Johnson, D.H. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* **355**, 2542-2550 (2006).
95. Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature reviews. Drug discovery* **6**, 273-286 (2007).
96. O'Dowd, B.F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H.H., Tsui, L.C., Kennedy, J.L., Shi, X., Petronis, A., George, S.R. & Nguyen, T. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* **136**, 355-360 (1993).
97. Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M.X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., Kurokawa, T., Onda, H. & Fujino, M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **251**, 471-476 (1998).
98. Pauli, A., Norris, M.L., Valen, E., Chew, G.L., Gagnon, J.A., Zimmerman, S., Mitchell, A., Ma, J., Dubrulle, J., Reyon, D., Tsai, S.Q., Joung, J.K., Saghatelian, A. & Schier, A.F. Toddler: an embryonic signal that promotes cell movement via Apelin receptors. *Science* **343**, 1248636 (2014).
99. Chng, S.C., Ho, L., Tian, J. & Reversade, B. ELABELA: a hormone essential for heart development signals via the apelin receptor. *Developmental cell* **27**, 672-680 (2013).
100. Devic, E., Paquereau, L., Vernier, P., Knibiehler, B. & Audigier, Y. Expression of a new G protein-coupled receptor X-msr is associated with an endothelial lineage in *Xenopus laevis*. *Mechanisms of development* **59**, 129-140 (1996).
101. Lee, D.K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A.P., Liu, Y., Osmond, D.H., George, S.R. & O'Dowd, B.F. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *Journal of neurochemistry* **74**, 34-41 (2000).
102. Kleinz, M.J. & Davenport, A.P. Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacology & therapeutics* **107**, 198-211 (2005).
103. Hosoya, M., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Fujii, R., Habata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Honda, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O. & Fujino, M. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *The Journal of biological chemistry* **275**, 21061-21067 (2000).
104. O'Carroll, A.M., Lolait, S.J., Harris, L.E. & Pope, G.R. The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. *The Journal of endocrinology* **219**, R13-35 (2013).
105. Kälin, S. & Kälin, R.E. Apelin and Cancer. in *Adipocytokines, Energy Balance, and Cancer* (eds. Reizes, O. & Berger, N.A.) 137-160 (Springer International Publishing, Cham, 2017).

106. Lee, D.K., Saldivia, V.R., Nguyen, T., Cheng, R., George, S.R. & O'Dowd, B.F. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* **146**, 231-236 (2005).
107. Fan, X., Zhou, N., Zhang, X., Mukhtar, M., Lu, Z., Fang, J., DuBois, G.C. & Pomerantz, R.J. Structural and functional study of the apelin-13 peptide, an endogenous ligand of the HIV-1 coreceptor, APJ. *Biochemistry* **42**, 10163-10168 (2003).
108. Medhurst, A.D., Jennings, C.A., Robbins, M.J., Davis, R.P., Ellis, C., Winborn, K.Y., Lawrie, K.W., Hervieu, G., Riley, G., Bolaky, J.E., Herrity, N.C., Murdock, P. & Darker, J.G. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *Journal of neurochemistry* **84**, 1162-1172 (2003).
109. Japp, A.G., Cruden, N.L., Amer, D.A., Li, V.K., Goudie, E.B., Johnston, N.R., Sharma, S., Neilson, I., Webb, D.J., Megson, I.L., Flapan, A.D. & Newby, D.E. Vascular effects of apelin in vivo in man. *Journal of the American College of Cardiology* **52**, 908-913 (2008).
110. Yang, Y., Lv, S.Y., Ye, W. & Zhang, L. Apelin/APJ system and cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **457**, 112-116 (2016).
111. Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Nishizawa, N., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O. & Fujino, M. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochimica et biophysica acta* **1538**, 162-171 (2001).
112. Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M.X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K. & Fujimiya, M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regulatory peptides* **99**, 87-92 (2001).
113. Devic, E., Rizzoti, K., Bodin, S., Knibiehler, B. & Audigier, Y. Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of Xenopus X-msr and human APJ. *Mechanisms of development* **84**, 199-203 (1999).
114. Kasai, A., Shintani, N., Oda, M., Kakuda, M., Hashimoto, H., Matsuda, T., Hinuma, S. & Baba, A. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* **325**, 395-400 (2004).
115. Saint-Geniez, M., Masri, B., Malecaze, F., Knibiehler, B. & Audigier, Y. Expression of the murine msr/apj receptor and its ligand apelin is upregulated during formation of the retinal vessels. *Mechanisms of development* **110**, 183-186 (2002).
116. Samura, M., Morikage, N., Suehiro, K., Tanaka, Y., Nakamura, T., Nishimoto, A., Ueno, K., Hosoyama, T. & Hamano, K. Combinatorial Treatment with Apelin-13 Enhances the Therapeutic Efficacy of a Preconditioned Cell-Based Therapy for Peripheral Ischemia. *Sci Rep* **6**, 19379 (2016).
117. Wang, C., Wen, J., Zhou, Y., Li, L., Cui, X., Wang, J., Pan, L., Ye, Z., Liu, P. & Wu, L. Apelin induces vascular smooth muscle cells migration via a PI3K/Akt/FoxO3a/MMP-2 pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology* **69**, 173-182 (2015).
118. Berta, J., Hoda, M.A., Laszlo, V., Rozsas, A., Garay, T., Torok, S., Grusch, M., Berger, W., Paku, S., Renyi-Vamos, F., Masri, B., Tovari, J., Groger, M., Klepetko, W., Hegedus, B. & Dome, B. Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncotarget* **5**, 4426-4437 (2014).
119. Tiani, C., Garcia-Pras, E., Mejias, M., de Gottardi, A., Berzigotti, A., Bosch, J. & Fernandez, M. Apelin signaling modulates splanchnic angiogenesis and portosystemic

- collateral vessel formation in rats with portal hypertension. *J Hepatol* **50**, 296-305 (2009).
120. Principe, A., Melgar-Lesmes, P., Fernandez-Varo, G., del Arbol, L.R., Ros, J., Morales-Ruiz, M., Bernardi, M., Arroyo, V. & Jimenez, W. The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease. *Hepatology* **48**, 1193-1201 (2008).
121. Kidoya, H., Naito, H. & Takakura, N. Apelin induces enlarged and nonleaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *Blood* **115**, 3166-3174 (2010).
122. Masri, B., van den Berghe, L., Sorli, C., Knibiehler, B. & Audigier, Y. [Apelin signalisation and vascular physiopathology]. *J Soc Biol* **203**, 171-179 (2009).
123. Seaman, S., Stevens, J., Yang, M.Y., Logsdon, D., Graff-Cherry, C. & St Croix, B. Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell* **11**, 539-554 (2007).
124. Masiero, M., Simoes, F.C., Han, H.D., Snell, C., Peterkin, T., Bridges, E., Mangala, L.S., Wu, S.Y., Pradeep, S., Li, D., Han, C., Dalton, H., Lopez-Berestein, G., Tuynman, J.B., Mortensen, N., Li, J.L., Patient, R., Sood, A.K., Banham, A.H., Harris, A.L. & Buffa, F.M. A core human primary tumor angiogenesis signature identifies the endothelial orphan receptor ELTD1 as a key regulator of angiogenesis. *Cancer Cell* **24**, 229-241 (2013).
125. Wysocka, M.B., Pietraszek-Gremplewicz, K. & Nowak, D. The Role of Apelin in Cardiovascular Diseases, Obesity and Cancer. *Frontiers in physiology* **9**, 557 (2018).
126. Diakowska, D., Markocka-Maczka, K., Szelachowski, P. & Grabowski, K. Serum levels of resistin, adiponectin, and apelin in gastroesophageal cancer patients. *Dis Markers* **2014**, 619649 (2014).
127. Hao, Y.Z., Li, M.L., Ning, F.L. & Wang, X.W. APJ Is Associated with Treatment Response in Gastric Cancer Patients Receiving Concurrent Chemoradiotherapy and Endostar Therapy. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* **32**, 133-138 (2017).
128. Zuurbier, L., Rahman, A., Cordes, M., Scheick, J., Wong, T.J., Rustenburg, F., Joseph, J.C., Dynoodt, P., Casey, R., Drillenburger, P., Gerhards, M., Barat, A., Klinger, R., Fender, B., O'Connor, D.P., Betge, J., Ebert, M.P., Gaiser, T., Prehn, J.H.M., Griffioen, A.W., van Grieken, N.C.T., Ylstra, B., Byrne, A.T., van der Flier, L.G., Gallagher, W.M. & Postel, R. Apelin: A putative novel predictive biomarker for bevacizumab response in colorectal cancer. *Oncotarget* **8**, 42949-42961 (2017).
129. Wick, W., Osswald, M., Wick, A. & Winkler, F. Treatment of glioblastoma in adults. *Ther Adv Neurol Disord* **11**, 1756286418790452 (2018).
130. Berta, J., Kenessey, I., Dobos, J., Tovari, J., Klepetko, W., Jan Ankersmit, H., Hegedus, B., Renyi-Vamos, F., Varga, J., Lorincz, Z., Paku, S., Ostoros, G., Rozsas, A., Timar, J. & Dome, B. Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **5**, 1120-1129 (2010).
131. Kidoya, H., Kunii, N., Naito, H., Muramatsu, F., Okamoto, Y., Nakayama, T. & Takakura, N. The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene* **31**, 3254-3264 (2012).
132. Eyries, M., Siegfried, G., Ciumas, M., Montagne, K., Agrapart, M., Lebrin, F. & Soubrier, F. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circulation research* **103**, 432-440 (2008).

133. Glassford, A.J., Yue, P., Sheikh, A.Y., Chun, H.J., Zarafshar, S., Chan, D.A., Reaven, G.M., Quertermous, T. & Tsao, P.S. HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **293**, E1590-1596 (2007).
134. Ronkainen, V.P., Ronkainen, J.J., Hanninen, S.L., Leskinen, H., Ruas, J.L., Pereira, T., Poellinger, L., Vuolteenaho, O. & Tavi, P. Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 1821-1830 (2007).
135. Preusser, M., de Ribaupierre, S., Wohrer, A., Erridge, S.C., Hegi, M., Weller, M. & Stupp, R. Current concepts and management of glioblastoma. *Annals of neurology* **70**, 9-21 (2011).
136. Wohrer, A., Waldhor, T., Heinzl, H., Hackl, M., Feichtinger, J., Gruber-Mosenbacher, U., Kiefer, A., Maier, H., Motz, R., Reiner-Concin, A., Richling, B., Idriceanu, C., Scarpatetti, M., Sedivy, R., Bankl, H.C., Stiglbauer, W., Preusser, M., Rossler, K. & Hainfellner, J.A. The Austrian Brain Tumour Registry: a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry. *Journal of neuro-oncology* **95**, 401-411 (2009).
137. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta neuropathologica* **109**, 93-108 (2005).
138. Cingolani, A., De Luca, A., Larocca, L.M., Ammassari, A., Scerrati, M., Antinori, A. & Ortona, L. Minimally invasive diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome-related primary central nervous system lymphoma. *Journal of the National Cancer Institute* **90**, 364-369 (1998).
139. Charles, N.A., Holland, E.C., Gilbertson, R., Glass, R. & Kettenmann, H. The brain tumor microenvironment. *Glia* **59**, 1169-1180 (2011).
140. White, J.B., Piepgras, D.G., Scheithauer, B.W. & Parisi, J.E. Rate of spontaneous hemorrhage in histologically proven cases of pilocytic astrocytoma. *Journal of neurosurgery* **108**, 223-226 (2008).
141. Lopes, M.B. Angiogenesis in brain tumors. *Microscopy research and technique* **60**, 225-230 (2003).
142. Urbanska, K., Sokolowska, J., Szmids, M. & Sysa, P. Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemp Oncol (Pozn)* **18**, 307-312 (2014).
143. Plate, K.H. & Risau, W. Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia* **15**, 339-347 (1995).
144. Reifenberger, G. & Collins, V.P. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *Journal of molecular medicine* **82**, 656-670 (2004).
145. Wong, M.L., Prawira, A., Kaye, A.H. & Hovens, C.M. Tumour angiogenesis: its mechanism and therapeutic implications in malignant gliomas. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* **16**, 1119-1130 (2009).
146. Lebelt, A., Dzieciol, J., Guzinska-Ustymowicz, K., Lemancewicz, D., Zimnoch, L. & Czykier, E. Angiogenesis in gliomas. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* **46**, 69-72 (2008).
147. Leon, S.P., Folkerth, R.D. & Black, P.M. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer* **77**, 362-372 (1996).

148. Assimakopoulou, M., Sotiropoulou-Bonikou, G., Maraziotis, T., Papadakis, N. & Varakis, I. Microvessel density in brain tumors. *Anticancer research* **17**, 4747-4753 (1997).
149. Plate, K.H. & Mennel, H.D. Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* **47**, 89-94 (1995).
150. Rong, Y., Durden, D.L., Van Meir, E.G. & Brat, D.J. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **65**, 529-539 (2006).
151. Junes-Gill, K.S., Gallaher, T.K., Gluzman-Poltorak, Z., Miller, J.D., Wheeler, C.J., Fan, X. & Basile, L.A. hHSS1: a novel secreted factor and suppressor of glioma growth located at chromosome 19q13.33. *Journal of neuro-oncology* **102**, 197-211 (2011).
152. Stummer, W., Reulen, H.J., Meinel, T., Pichlmeier, U., Schumacher, W., Tonn, J.C., Rohde, V., Opperl, F., Turowski, B., Woiciechowsky, C., Franz, K., Pietsch, T. & Group, A.L.-G.S. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery* **62**, 564-576; discussion 564-576 (2008).
153. Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F., Reulen, H.J. & Group, A.L.-G.S. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* **7**, 392-401 (2006).
154. Westphal, M., Hilt, D.C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P.C., Whittle, I.R., Jaaskelainen, J. & Ram, Z. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncology* **5**, 79-88 (2003).
155. Sabel, M. & Giese, A. Safety profile of carmustine wafers in malignant glioma: a review of controlled trials and a decade of clinical experience. *Curr Med Res Opin* **24**, 3239-3257 (2008).
156. Winkler, F., Osswald, M. & Wick, W. Anti-Angiogenics: Their Role in the Treatment of Glioblastoma. *Oncol Res Treat* **41**, 181-186 (2018).
157. Goldbrunner, R.H., Bendszus, M., Sasaki, M., Kraemer, T., Plate, K.H., Roosen, K. & Tonn, J.C. Vascular endothelial growth factor-driven glioma growth and vascularization in an orthotopic rat model monitored by magnetic resonance imaging. *Neurosurgery* **47**, 921-929; discussion 929-930 (2000).
158. Goldbrunner, R.H., Bendszus, M., Wood, J., Kiderlen, M., Sasaki, M. & Tonn, J.C. PTK787/ZK222584, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, decreases glioma growth and vascularization. *Neurosurgery* **55**, 426-432; discussion 432 (2004).
159. Kerbel, R.S. Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? *Science* **312**, 1171-1175 (2006).
160. Gerstner, E.R. & Batchelor, T.T. Antiangiogenic therapy for glioblastoma. *Cancer journal* **18**, 45-50 (2012).
161. Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., Brandes, A.A., Hilton, M.,

- Abrey, L. & Cloughesy, T. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine* **370**, 709-722 (2014).
162. Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., Jeraj, R., Brown, P.D., Jaeckle, K.A., Schiff, D., Stieber, V.W., Brachman, D.G., Werner-Wasik, M., Tremont-Lukats, I.W., Sulman, E.P., Aldape, K.D., Curran, W.J., Jr. & Mehta, M.P. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine* **370**, 699-708 (2014).
163. Mizukami, Y., Jo, W.S., Duerr, E.M., Gala, M., Li, J., Zhang, X., Zimmer, M.A., Iliopoulos, O., Zukerberg, L.R., Kohgo, Y., Lynch, M.P., Rueda, B.R. & Chung, D.C. Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. *Nature medicine* **11**, 992-997 (2005).
164. Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G. & Hanahan, D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* **8**, 299-309 (2005).
165. Plate, K.H., Scholz, A. & Dumont, D.J. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta neuropathologica* **124**, 763-775 (2012).
166. Winkler, F., Kienast, Y., Fuhrmann, M., Von Baumgarten, L., Burgold, S., Mitteregger, G., Kretschmar, H. & Herms, J. Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis. *Glia* **57**, 1306-1315 (2009).
167. Lu, K.V. & Bergers, G. Mechanisms of evasive resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma. *CNS Oncol* **2**, 49-65 (2013).
168. Keunen, O., Johansson, M., Oudin, A., Sanzey, M., Rahim, S.A., Fack, F., Thorsen, F., Taxt, T., Bartos, M., Jirik, R., Miletic, H., Wang, J., Stieber, D., Stuhr, L., Moen, I., Rygh, C.B., Bjerkvig, R. & Niclou, S.P. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 3749-3754 (2011).
169. Mahase, S., Rattenni, R.N., Wesseling, P., Leenders, W., Baldotto, C., Jain, R. & Zagzag, D. Hypoxia-Mediated Mechanisms Associated with Antiangiogenic Treatment Resistance in Glioblastomas. *The American journal of pathology* **187**, 940-953 (2017).
170. Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H.S., Hodgson, J.G., James, C.D., Sarkaria, J.N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P.T., Wilson, R.K., Speed, T.P., Gray, J.W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C.M., Hayes, D.N. & Cancer Genome Atlas Research, N. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**, 98-110 (2010).
171. Sandmann, T., Bourgon, R., Garcia, J., Li, C., Cloughesy, T., Chinot, O.L., Wick, W., Nishikawa, R., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Lai, A., Moore, N., Kharbanda, S., Peale, F., Hegde, P., Abrey, L.E., Phillips, H.S. & Bais, C. Patients With Proneural Glioblastoma May Derive Overall Survival Benefit From the Addition of Bevacizumab to First-Line Radiotherapy and Temozolomide: Retrospective Analysis of the AVAglio Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **33**, 2735-2744 (2015).

172. Cloughesy, T.F., Mochizuki, A.Y., Orpilla, J.R., Hugo, W., Lee, A.H., Davidson, T.B., Wang, A.C., Ellingson, B.M., Rytlewski, J.A., Sanders, C.M., Kawaguchi, E.S., Du, L., Li, G., Yong, W.H., Gaffey, S.C., Cohen, A.L., Mellinghoff, I.K., Lee, E.Q., Reardon, D.A., O'Brien, B.J., Butowski, N.A., Nghiemphu, P.L., Clarke, J.L., Arrillaga-Romany, I.C., Colman, H., Kaley, T.J., de Groot, J.F., Liau, L.M., Wen, P.Y. & Prins, R.M. Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nature medicine* **25**, 477-486 (2019).
173. Schalper, K.A., Rodriguez-Ruiz, M.E., Diez-Valle, R., Lopez-Janeiro, A., Porciuncula, A., Idoate, M.A., Inoges, S., de Andrea, C., Lopez-Diaz de Cerio, A., Tejada, S., Berraondo, P., Villarroel-Espindola, F., Choi, J., Gurrpide, A., Giraldez, M., Goicoechea, I., Gallego Perez-Larraya, J., Sanmamed, M.F., Perez-Gracia, J.L. & Melero, I. Neoadjuvant nivolumab modifies the tumor immune microenvironment in resectable glioblastoma. *Nature medicine* **25**, 470-476 (2019).
174. Zhao, J., Chen, A.X., Gartrell, R.D., Silverman, A.M., Aparicio, L., Chu, T., Bordbar, D., Shan, D., Samanamud, J., Mahajan, A., Filip, I., Orenbuch, R., Goetz, M., Yamaguchi, J.T., Cloney, M., Horbinski, C., Lukas, R.V., Raizer, J., Rae, A.I., Yuan, J., Canoll, P., Bruce, J.N., Saenger, Y.M., Sims, P., Iwamoto, F.M., Sonabend, A.M. & Rabadan, R. Immune and genomic correlates of response to anti-PD-1 immunotherapy in glioblastoma. *Nature medicine* **25**, 462-469 (2019).
175. Keskin, D.B., Anandappa, A.J., Sun, J., Tirosh, I., Mathewson, N.D., Li, S., Oliveira, G., Giobbie-Hurder, A., Felt, K., Gjini, E., Shukla, S.A., Hu, Z., Li, L., Le, P.M., Allesoe, R.L., Richman, A.R., Kowalczyk, M.S., Abdelrahman, S., Geduldig, J.E., Charbonneau, S., Pelton, K., Iorgulescu, J.B., Elagina, L., Zhang, W., Olive, O., McCluskey, C., Olsen, L.R., Stevens, J., Lane, W.J., Salazar, A.M., Daley, H., Wen, P.Y., Chiocca, E.A., Harden, M., Lennon, N.J., Gabriel, S., Getz, G., Lander, E.S., Regev, A., Ritz, J., Neuberg, D., Rodig, S.J., Ligon, K.L., Suva, M.L., Wucherpfennig, K.W., Hacohen, N., Fritsch, E.F., Livak, K.J., Ott, P.A., Wu, C.J. & Reardon, D.A. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. *Nature* **565**, 234-239 (2019).
176. O'Rourke, D.M., Nasrallah, M.P., Desai, A., Melenhorst, J.J., Mansfield, K., Morrissette, J.J.D., Martinez-Lage, M., Brem, S., Maloney, E., Shen, A., Isaacs, R., Mohan, S., Plesa, G., Lacey, S.F., Navenot, J.M., Zheng, Z., Levine, B.L., Okada, H., June, C.H., Brogdon, J.L. & Maus, M.V. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med* **9**(2017).
177. Belizario, J.E. Immunodeficient Mouse Models: An Overview. *The Open Immunology Journal* **2**, 79-85 (2009).
178. Mazurier, F., Fontanellas, A., Salesse, S., Taine, L., Landriau, S., Moreau-Gaudry, F., Reiffers, J., Peault, B., Di Santo, J.P. & de Verneuil, H. A novel immunodeficient mouse model--RAG2 x common cytokine receptor gamma chain double mutants--requiring exogenous cytokine administration for human hematopoietic stem cell engraftment. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 533-541 (1999).
179. Cao, X., Shores, E.W., Hu-Li, J., Anver, M.R., Kelsall, B.L., Russell, S.M., Drago, J., Noguchi, M., Grinberg, A., Bloom, E.T. & et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* **2**, 223-238 (1995).

180. Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S. & Papaioannou, V.E. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**, 869-877 (1992).
181. Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M. & et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855-867 (1992).
182. Grundy, M.A. & Sentman, C.L. Immunodeficient mice have elevated numbers of NK cells in non-lymphoid tissues. *Experimental cell research* **312**, 3920-3926 (2006).
183. Charo, D.N., Ho, M., Fajardo, G., Kawana, M., Kundu, R.K., Sheikh, A.Y., Finsterbach, T.P., Leeper, N.J., Ernst, K.V., Chen, M.M., Ho, Y.D., Chun, H.J., Bernstein, D., Ashley, E.A. & Quertermous, T. Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**, H1904-1913 (2009).
184. Ishida, J., Hashimoto, T., Hashimoto, Y., Nishiwaki, S., Iguchi, T., Harada, S., Sugaya, T., Matsuzaki, H., Yamamoto, R., Shiota, N., Okunishi, H., Kihara, M., Umemura, S., Sugiyama, F., Yagami, K., Kasuya, Y., Mochizuki, N. & Fukamizu, A. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *The Journal of biological chemistry* **279**, 26274-26279 (2004).
185. Roberts, E.M., Pope, G.R., Newson, M.J., Landgraf, R., Lolait, S.J. & O'Carroll, A.M. Stimulus-specific neuroendocrine responses to osmotic challenges in apelin receptor knockout mice. *Journal of neuroendocrinology* **22**, 301-308 (2010).
186. Kuba, K., Zhang, L., Imai, Y., Arab, S., Chen, M., Maekawa, Y., Leschnik, M., Leibbrandt, A., Markovic, M., Schwaighofer, J., Beetz, N., Musialek, R., Neely, G.G., Komnenovic, V., Kolm, U., Metzler, B., Ricci, R., Hara, H., Meixner, A., Nghiem, M., Chen, X., Dawood, F., Wong, K.M., Sarao, R., Cukerman, E., Kimura, A., Hein, L., Thalhammer, J., Liu, P.P. & Penninger, J.M. Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circulation research* **101**, e32-42 (2007).
187. Kasai, A., Shintani, N., Kato, H., Matsuda, S., Gomi, F., Haba, R., Hashimoto, H., Kakuda, M., Tano, Y. & Baba, A. Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**, 1717-1722 (2008).
188. Kidoya, H., Ueno, M., Yamada, Y., Mochizuki, N., Nakata, M., Yano, T., Fujii, R. & Takakura, N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *The EMBO journal* **27**, 522-534 (2008).
189. Suri, C., McClain, J., Thurston, G., McDonald, D.M., Zhou, H., Oldmixon, E.H., Sato, T.N. & Yancopoulos, G.D. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* **282**, 468-471 (1998).
190. Newcomb, E.W. The Murine GL261 Glioma Experimental Model to Assess Novel Brain Tumor Treatments. in *CNS Cancer - Models, Markers, Prognostic Factors, Targets, and Therapeutic Approaches* (ed. Meir, E.G.) 227-241 (Humana Press, 2009).
191. Szatmari, T., Lumniczky, K., Desaknai, S., Trajcevski, S., Hidvegi, E.J., Hamada, H. & Safrany, G. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer science* **97**, 546-553 (2006).
192. Frisch, A., Kälin, S., Monk, R., Radke, J., Heppner, F.L. & Kälin, R.E. Apelin Controls Angiogenesis-Dependent Glioblastoma Growth. *International journal of molecular sciences* **21**, 4179 (2020).

193. Clark, M.J., Homer, N., O'Connor, B.D., Chen, Z., Eskin, A., Lee, H., Merriman, B. & Nelson, S.F. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS genetics* **6**, e1000832 (2010).
194. Ponten, J. & Macintyre, E.H. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* **74**, 465-486 (1968).
195. ATCC. U-87 MG (ATCC® HTB-14™). Vol. 2016 (2014).
196. Sawin, K.E., LeGuellec, K., Philippe, M. & Mitchison, T.J. Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature* **359**, 540-543 (1992).
197. Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.L. & Mitchison, T.J. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* **286**, 971-974 (1999).
198. Weil, D., Garcon, L., Harper, M., Dumenil, D., Dautry, F. & Kress, M. Targeting the kinesin Eg5 to monitor siRNA transfection in mammalian cells. *BioTechniques* **33**, 1244-1248 (2002).
199. Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.K., Wen, P.Y. & Olson, J.J. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA: a cancer journal for clinicians* **60**, 166-193 (2010).
200. Glass, R., Synowitz, M., Kronenberg, G., Walzlein, J.H., Markovic, D.S., Wang, L.P., Gast, D., Kiwit, J., Kempermann, G. & Kettenmann, H. Glioblastoma-induced attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 2637-2646 (2005).
201. Theeuwes, F. & Yum, S.I. Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Annals of biomedical engineering* **4**, 343-353 (1976).
202. UKCCCR. United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition). *British journal of cancer* **77**, 1-10 (1998).
203. Rosene, D.L., Roy, N.J. & Davis, B.J. A cryoprotection method that facilitates cutting frozen sections of whole monkey brains for histological and histochemical processing without freezing artifact. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **34**, 1301-1315 (1986).
204. Avwioro, G. Histochemical Uses of Haematoxylin - A Review. *Journal of Pharmacy & Clinical Sciences* **1**, 24-34 (2011).
205. Martin, L., Green, B., Renshaw, C., Lowe, D., Rudland, P., Leinster, S.J. & Winstanley, J. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *British journal of cancer* **76**, 1046-1054 (1997).
206. Ernst, C. & Christie, B.R. Isolectin-IB 4 as a vascular stain for the study of adult neurogenesis. *Journal of neuroscience methods* **150**, 138-142 (2006).
207. Hayes, C.E. & Goldstein, I.J. An alpha-D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. Isolation by affinity chromatography and characterization. *The Journal of biological chemistry* **249**, 1904-1914 (1974).
208. Kurz, H., Fehr, J., Nitschke, R. & Burkhardt, H. Pericytes in the mature chorioallantoic membrane capillary plexus contain desmin and alpha-smooth muscle actin: relevance for non-sprouting angiogenesis. *Histochemistry and cell biology* **130**, 1027-1040 (2008).

209. Mouton, P.R., Gokhale, A.M., Ward, N.L. & West, M.J. Stereological length estimation using spherical probes. *Journal of microscopy* **206**, 54-64 (2002).
210. Calhoun, M.E. & Mouton, P.R. Length measurement: new developments in neurostereology and 3D imagery. *Journal of chemical neuroanatomy* **20**, 61-69 (2000).
211. Lokkegaard, A., Nyengaard, J.R. & West, M.J. Stereological estimates of number and length of capillaries in subdivisions of the human hippocampal region. *Hippocampus* **11**, 726-740 (2001).
212. Dockery, P. & Fraher, J. The quantification of vascular beds: a stereological approach. *Experimental and molecular pathology* **82**, 110-120 (2007).
213. Gundersen, H.J. & Jensen, E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of microscopy* **147**, 229-263 (1987).
214. Mayhew, T.M., Mwamengele, G.L. & Dantzer, V. Stereological and allometric studies on mammalian cerebral cortex with implications for medical brain imaging. *Journal of anatomy* **189** (Pt 1), 177-184 (1996).
215. Kreczmanski, P., Schmidt-Kastner, R., Heinsen, H., Steinbusch, H.W., Hof, P.R. & Schmitz, C. Stereological studies of capillary length density in the frontal cortex of schizophrenics. *Acta neuropathologica* **109**, 510-518 (2005).
216. Razali, N.M. & Wah, Y.B. Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling Tests. *J. Stat. Model. Analytics* **2**(2011).
217. Shapiro, S.S. & Wilk, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples)†. *Biometrika* **52**, 591-611 (1965).
218. Levene, H. Contributions to probability and statistics. *Essays in honor of Harold Hotelling*, 278-292 (1960).
219. Student. The Probable Error of a Mean. *Biometrika* **6**, 1-25 (1908).
220. Rasch, D., Kubinger, K.D. & Moder, K. The two-sample t test: pre-testing its assumptions does not pay off. *Statistical Papers* **52**, 219-231 (2011).
221. Ruxton, G.D. The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann–Whitney U test. *Behavioral Ecology* **17**, 688-690 (2006).
222. Mann, H.B. & Whitney, D.R. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann. Math. Statist.* **18**, 50-60 (1947).
223. Rasch, B.H., Wilhelm; Friese, Malte; Naumann, Ewald. Der t-Test. in *Quantitative Methoden: Einführung in die Statistik* 43-117 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2006).
224. Wilcoxon, F. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin* **1**, 80-83 (1945).
225. Glass, G.V., Peckham, P.D. & Sanders, J.R. Consequences of Failure to Meet Assumptions Underlying the Fixed Effects Analyses of Variance and Covariance. *Review of Educational Research* **42**, 237-288 (1972).
226. Kruskal, W.H. & Wallis, W.A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association* **47**, 583-621 (1952).

227. Janczyk, M. & Pfister, R. Mehrfaktorielle Varianzanalyse. in *Inferenzstatistik verstehen: Von A wie Signifikanztest bis Z wie Konfidenzintervall* 121-138 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015).
228. Gravetter, F.J. & Wallnau, L.B. *Statistics for the Behavioral Sciences*, (Wadsworth, 2009).
229. Abdi, H. Bonferroni and Šidák corrections for multiple comparisons. *Encyclopedia of measurement and statistics* **3**, 103-107 (2007).
230. del Toro, R., Prahst, C., Mathivet, T., Siegfried, G., Kaminker, J.S., Larrivee, B., Breant, C., Duarte, A., Takakura, N., Fukamizu, A., Penninger, J. & Eichmann, A. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* **116**, 4025-4033 (2010).
231. Strasser, G.A., Kaminker, J.S. & Tessier-Lavigne, M. Microarray analysis of retinal endothelial tip cells identifies CXCR4 as a mediator of tip cell morphology and branching. *Blood* **115**, 5102-5110 (2010).
232. Liu, Q., Hu, T., He, L., Huang, X., Tian, X., Zhang, H., He, L., Pu, W., Zhang, L., Sun, H., Fang, J., Yu, Y., Duan, S., Hu, C., Hui, L., Zhang, H., Quertermous, T., Xu, Q., Red-Horse, K., Wythe, J.D. & Zhou, B. Genetic targeting of sprouting angiogenesis using Apln-CreER. *Nature communications* **6**, 6020 (2015).
233. Franciosi, S., Gama Sosa, M.A., English, D.F., Oler, E., Oung, T., Janssen, W.G., De Gasperi, R., Schmeidler, J., Dickstein, D.L., Schmitz, C., Gandy, S., Hof, P.R., Buxbaum, J.D. & Elder, G.A. Novel cerebrovascular pathology in mice fed a high cholesterol diet. *Mol Neurodegener* **4**, 42 (2009).
234. Liwnicz, B.H., Wu, S.Z. & Tew, J.M., Jr. The relationship between the capillary structure and hemorrhage in gliomas. *Journal of neurosurgery* **66**, 536-541 (1987).
235. Pierallini, A., Bonamini, M., Pantano, P., Palmeggiani, F., Raguso, M., Osti, M.F., Anaveri, G. & Bozzao, L. Radiological assessment of necrosis in glioblastoma: variability and prognostic value. *Neuroradiology* **40**, 150-153 (1998).
236. Homma, T., Fukushima, T., Vaccarella, S., Yonekawa, Y., Di Patre, P.L., Franceschi, S. & Ohgaki, H. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **65**, 846-854 (2006).
237. Barker, F.G., 2nd, Davis, R.L., Chang, S.M. & Prados, M.D. Necrosis as a prognostic factor in glioblastoma multiforme. *Cancer* **77**, 1161-1166 (1996).
238. Mastrella, G., Hou, M., Li, M., Stoecklein, V.M., Zdouc, N., Volmar, M.N.M., Miletic, H., Reinhard, S., Herold-Mende, C.C., Kleber, S., Eisenhut, K., Gargiulo, G., Synowitz, M., Vescovi, A.L., Harter, P.N., Penninger, J.M., Wagner, E., Mittelbronn, M., Bjerkvig, R., Hambardzumyan, D., Schuller, U., Tonn, J.C., Radke, J., Glass, R. & Kalin, R.E. Targeting APLN/APLNR Improves Antiangiogenic Efficiency and Blunts Proinvasive Side Effects of VEGFA/VEGFR2 Blockade in Glioblastoma. *Cancer research* (2019).
239. Poblet, E., Gonzalez-Palacios, F. & Jimenez, F.J. Different immunoreactivity of endothelial markers in well and poorly differentiated areas of angiosarcomas. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **428**, 217-221 (1996).
240. Birnbaum, T., Hildebrandt, J., Nuebling, G., Sostak, P. & Straube, A. Glioblastoma-dependent differentiation and angiogenic potential of human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of neuro-oncology* **105**, 57-65 (2011).

241. Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, D., Bradley, N.J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D.R., Baker, M.A. & Greaves, M.F. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* **75**, 2417-2426 (1990).
242. Gavard, J. Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS letters* **583**, 1-6 (2009).
243. Luukkaa, H., Laitakari, J., Vahlberg, T., Klemi, P. & Grenman, R. Morphometric analysis using automated image analysis of CD34-positive vessels in salivary gland acinic cell carcinoma. *Acta oto-laryngologica* **127**, 869-873 (2007).
244. Yonenaga, Y., Mori, A., Onodera, H., Yasuda, S., Oe, H., Fujimoto, A., Tachibana, T. & Imamura, M. Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology* **69**, 159-166 (2005).
245. Abe, S., Suzuki, M., Cho, K.H., Murakami, G., Cho, B.H. & Ide, Y. CD34-positive developing vessels and other structures in human fetuses: an immunohistochemical study. *Surgical and radiologic anatomy : SRA* **33**, 919-927 (2011).
246. Wikstrom, P., Lissbrant, I.F., Stattin, P., Egevad, L. & Bergh, A. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *The Prostate* **51**, 268-275 (2002).
247. Kiessling, F., Razansky, D. & Alves, F. Anatomical and microstructural imaging of angiogenesis. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **37 Suppl 1**, S4-19 (2010).
248. Tanigawa, N., Amaya, H., Matsumura, M., Shimomatsuya, T., Horiuchi, T., Muraoka, R. & Iki, M. Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. *Cancer research* **56**, 2671-2676 (1996).
249. Graham, C.H., Rivers, J., Kerbel, R.S., Stankiewicz, K.S. & White, W.L. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (< 0.76 mm) malignant melanomas. *The American journal of pathology* **145**, 510-514 (1994).
250. Horak, E.R., Leek, R., Klenk, N., LeJeune, S., Smith, K., Stuart, N., Greenall, M., Stepniewska, K. & Harris, A.L. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* **340**, 1120-1124 (1992).
251. Plate, K.H., Breier, G., Farrell, C.L. & Risau, W. Platelet-derived growth factor receptor-beta is induced during tumor development and upregulated during tumor progression in endothelial cells in human gliomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **67**, 529-534 (1992).
252. Barbara, N.P., Wrana, J.L. & Letarte, M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *The Journal of biological chemistry* **274**, 584-594 (1999).
253. Fonsatti, E., Altomonte, M., Nicotra, M.R., Natali, P.G. & Maio, M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene* **22**, 6557-6563 (2003).
254. Wang, J.M., Kumar, S., Pye, D., Haboubi, N. & al-Nakib, L. Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *Journal of the National Cancer Institute* **86**, 386-388 (1994).

255. Trotter, M.J., Chaplin, D.J. & Olive, P.L. Use of a carbocyanine dye as a marker of functional vasculature in murine tumours. *British journal of cancer* **59**, 706-709 (1989).
256. Fenton, B.M., Paoni, S.F., Lee, J., Koch, C.J. & Lord, E.M. Quantification of tumour vasculature and hypoxia by immunohistochemical staining and HbO₂ saturation measurements. *British journal of cancer* **79**, 464-471 (1999).
257. Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R. & Folkman, J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *The New England journal of medicine* **324**, 1-8 (1991).
258. Barth, P.J., Weingartner, K., Kohler, H.H. & Bittinger, A. Assessment of the vascularization in prostatic carcinoma: a morphometric investigation. *Human pathology* **27**, 1306-1310 (1996).
259. Cruz-Orive, L.M. & Weibel, E.R. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *The American journal of physiology* **258**, L148-156 (1990).
260. Heo, K., Kim, Y.H., Sung, H.J., Li, H.Y., Yoo, C.W., Kim, J.Y., Park, J.Y., Lee, U.L., Nam, B.H., Kim, E.O., Kim, S.Y., Lee, S.H., Park, J.B. & Choi, S.W. Hypoxia-induced up-regulation of apelin is associated with a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* **48**, 500-506 (2012).
261. Picault, F.X., Chaves-Almagro, C., Progetti, F., Prats, H., Masri, B. & Audigier, Y. Tumour co-expression of apelin and its receptor is the basis of an autocrine loop involved in the growth of colon adenocarcinomas. *European journal of cancer* **50**, 663-674 (2014).
262. Chen, T., Liu, N., Xu, G.M., Liu, T.J., Liu, Y., Zhou, Y., Huo, S.B. & Zhang, K. Apelin13/APJ promotes proliferation of colon carcinoma by activating Notch3 signaling pathway. *Oncotarget* **8**, 101697-101706 (2017).
263. Podgorska, M., Pietraszek-Gremplewicz, K. & Nowak, D. Apelin Effects Migration and Invasion Abilities of Colon Cancer Cells. *Cells* **7**(2018).
264. Cui, R.R., Mao, D.A., Yi, L., Wang, C., Zhang, X.X., Xie, H., Wu, X.P., Liao, X.B., Zhou, H., Meng, J.C., Yuan, L.Q. & Liao, E.Y. Apelin suppresses apoptosis of human vascular smooth muscle cells via APJ/PI3-K/Akt signaling pathways. *Amino acids* **39**, 1193-1200 (2010).
265. Xie, H., Yuan, L.Q., Luo, X.H., Huang, J., Cui, R.R., Guo, L.J., Zhou, H.D., Wu, X.P. & Liao, E.Y. Apelin suppresses apoptosis of human osteoblasts. *Apoptosis* **12**, 247-254 (2007).
266. Zeng, X.X., Wilm, T.P., Sepich, D.S. & Solnica-Krezel, L. Apelin and its receptor control heart field formation during zebrafish gastrulation. *Developmental cell* **12**, 391-402 (2007).
267. Zhang, Z., Yu, B. & Tao, G.Z. Apelin protects against cardiomyocyte apoptosis induced by glucose deprivation. *Chinese medical journal* **122**, 2360-2365 (2009).
268. Pierce, A.M. & Keating, A.K. Creating anatomically accurate and reproducible intracranial xenografts of human brain tumors. *J Vis Exp*, 52017 (2014).
269. Shankavaram, U.T., Bredel, M., Burgan, W.E., Carter, D., Tofilon, P. & Camphausen, K. Molecular profiling indicates orthotopic xenograft of glioma cell lines simulate a subclass of human glioblastoma. *Journal of cellular and molecular medicine* **16**, 545-554 (2012).
270. Yamada, S., Khankaldyyan, V., Bu, X., Suzuki, A., Gonzalez-Gomez, I., Takahashi, K., McComb, J.G. & Laug, W.E. A method to accurately inject tumor cells into the

- caudate/putamen nuclei of the mouse brain. *The Tokai journal of experimental and clinical medicine* **29**, 167-173 (2004).
271. Brooks, A.I., Halterman, M.W., Chadwick, C.A., Davidson, B.L., Haak-Frendscho, M., Radel, C., Porter, C. & Federoff, H.J. Reproducible and efficient murine CNS gene delivery using a microprocessor-controlled injector. *Journal of neuroscience methods* **80**, 137-147 (1998).
272. Sakariassen, P.O., Prestegarden, L., Wang, J., Skaftnesmo, K.O., Mahesparan, R., Molthoff, C., Sminia, P., Sundlisaeter, E., Misra, A., Tysnes, B.B., Chekenya, M., Peters, H., Lende, G., Kalland, K.H., Oyan, A.M., Petersen, K., Jonassen, I., van der Kogel, A., Feuerstein, B.G., Terzis, A.J., Bjerkvig, R. & Enger, P.O. Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16466-16471 (2006).
273. Kunkel, P., Ulbricht, U., Bohlen, P., Brockmann, M.A., Fillbrandt, R., Stavrou, D., Westphal, M. & Lamszus, K. Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer research* **61**, 6624-6628 (2001).
274. Lamszus, K., Kunkel, P. & Westphal, M. Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy. *Acta neurochirurgica. Supplement* **88**, 169-177 (2003).
275. Pitter, K.L., Tamagno, I., Alikhanyan, K., Hosni-Ahmed, A., Pattwell, S.S., Donnola, S., Dai, C., Ozawa, T., Chang, M., Chan, T.A., Beal, K., Bishop, A.J., Barker, C.A., Jones, T.S., Hentschel, B., Gorlia, T., Schlegel, U., Stupp, R., Weller, M., Holland, E.C. & Hambarzumyan, D. Corticosteroids compromise survival in glioblastoma. *Brain : a journal of neurology* **139**, 1458-1471 (2016).
276. Hashimoto, Y., Ishida, J., Yamamoto, R., Fujiwara, K., Asada, S., Kasuya, Y., Mochizuki, N. & Fukamizu, A. G protein-coupled APJ receptor signaling induces focal adhesion formation and cell motility. *Int J Mol Med* **16**, 787-792 (2005).
277. Uribealago, I., Hoffmann, D., Zhang, Y., Kavirayani, A., Lazovic, J., Berta, J., Novatchkova, M., Pai, T.P., Wimmer, R.A., Laszlo, V., Schramek, D., Karim, R., Tortola, L., Deswal, S., Haas, L., Zuber, J., Szucs, M., Kuba, K., Dome, B., Cao, Y., Haubner, B.J. & Penninger, J.M. Apelin inhibition prevents resistance and metastasis associated with anti-angiogenic therapy. *EMBO Mol Med* **11**, e9266 (2019).
278. Harford-Wright, E., Andre-Gregoire, G., Jacobs, K.A., Treps, L., Le Gonidec, S., Leclair, H.M., Gonzalez-Diest, S., Roux, Q., Guillonneau, F., Loussouarn, D., Oliver, L., Vallette, F.M., Foufelle, F., Valet, P., Davenport, A.P., Glen, R.C., Bidere, N. & Gavard, J. Pharmacological targeting of apelin impairs glioblastoma growth. *Brain : a journal of neurology* **140**, 2939-2954 (2017).
279. Zhao, H., Tian, X., He, L., Li, Y., Pu, W., Liu, Q., Tang, J., Wu, J., Cheng, X., Liu, Y., Zhou, Q., Tan, Z., Bai, F., Xu, F., Smart, N. & Zhou, B. Apj(+) Vessels Drive Tumor Growth and Represent a Tractable Therapeutic Target. *Cell Rep* **25**, 1241-1254 e1245 (2018).
280. Ganguly, D., Cai, C., Sims, M.M., Yang, C.H., Thomas, M., Cheng, J., Saad, A.G. & Pfeffer, L.M. APELA Expression in Glioma, and Its Association with Patient Survival and Tumor Grade. *Pharmaceuticals (Basel)* **12**(2019).

281. Lv, D., Li, L., Lu, Q., Li, Y., Xie, F., Li, H., Cao, J., Liu, M., Wu, D., He, L. & Chen, L. PAK1-cofilin phosphorylation mediates human lung adenocarcinoma cells migration induced by apelin-13. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **43**, 569-579 (2016).
282. Feng, M., Yao, G., Yu, H., Qing, Y. & Wang, K. Tumor apelin, not serum apelin, is associated with the clinical features and prognosis of gastric cancer. *BMC cancer* **16**, 794 (2016).
283. Peng, X., Li, F., Wang, P., Jia, S., Sun, L. & Huo, H. Apelin-13 induces MCF-7 cell proliferation and invasion via phosphorylation of ERK1/2. *Int J Mol Med* **36**, 733-738 (2015).
284. 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. *The Journal of cell biology* **153**, 543-553 (2001).
285. Candolfi, M., Curtin, J.F., Nichols, W.S., Muhammad, A.G., King, G.D., Pluhar, G.E., McNiel, E.A., Ohlfest, J.R., Freese, A.B., Moore, P.F., Lerner, J., Lowenstein, P.R. & Castro, M.G. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *Journal of neuro-oncology* **85**, 133-148 (2007).
286. Xu, Q., Qaum, T. & Adamis, A.P. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Investigative ophthalmology & visual science* **42**, 789-794 (2001).
287. Amoozgar, Z., Jain, R.K. & Duda, D.G. Role of Apelin in Glioblastoma Vascularization and Invasion after Anti-VEGF Therapy: What Is the Impact on the Immune System? *Cancer research* **79**, 2104-2106 (2019).
288. Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D. & Smyth, M.J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology* **29**, 235-271 (2011).
289. Razavi, S.M., Lee, K.E., Jin, B.E., Aujla, P.S., Gholamin, S. & Li, G. Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Front Surg* **3**, 11 (2016).
290. Niederkorn, J.Y. See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nature immunology* **7**, 354-359 (2006).
291. Pyaram, K. & Yadav, V.N. Advances in NKT cell Immunotherapy for Glioblastoma. *J Cancer Sci Ther* **10**(2018).
292. Engelhardt, B. & Ransohoff, R.M. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol* **33**, 579-589 (2012).
293. Mohammad, M.G., Tsai, V.W., Ruitenber, M.J., Hassanpour, M., Li, H., Hart, P.H., Breit, S.N., Sawchenko, P.E. & Brown, D.A. Immune cell trafficking from the brain maintains CNS immune tolerance. *The Journal of clinical investigation* **124**, 1228-1241 (2014).
294. de Visser, K.E. & Coussens, L.M. The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. *Contrib Microbiol* **13**, 118-137 (2006).
295. Prins, R.M., Soto, H., Konkankit, V., Odesa, S.K., Eskin, A., Yong, W.H., Nelson, S.F. & Liau, L.M. Gene expression profile correlates with T-cell infiltration and relative survival in glioblastoma patients vaccinated with dendritic cell immunotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 1603-1615 (2011).

296. Zhang, C., Burger, M.C., Jennewein, L., Genssler, S., Schonfeld, K., Zeiner, P., Hattingen, E., Harter, P.N., Mittelbronn, M., Tonn, T., Steinbach, J.P. & Wels, W.S. ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma. *Journal of the National Cancer Institute* **108**(2016).
297. Chen, Z. & Hambardzumyan, D. Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Front Immunol* **9**, 1004 (2018).
298. Kerber, M., Reiss, Y., Wickersheim, A., Jugold, M., Kiessling, F., Heil, M., Tchaikovski, V., Waltenberger, J., Shibuya, M., Plate, K.H. & Machein, M.R. Flt-1 signaling in macrophages promotes glioma growth in vivo. *Cancer research* **68**, 7342-7351 (2008).
299. Charles, N.A., Holland, E.C., Gilbertson, R., Glass, R. & Kettenmann, H. The brain tumor microenvironment. *Glia* **60**, 502-514 (2012).
300. Bingle, L., Brown, N.J. & Lewis, C.E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of pathology* **196**, 254-265 (2002).
301. Morimura, T., Neuchrist, C., Kitz, K., Budka, H., Scheiner, O., Kraft, D. & Lassmann, H. Monocyte subpopulations in human gliomas: expression of Fc and complement receptors and correlation with tumor proliferation. *Acta neuropathologica* **80**, 287-294 (1990).
302. Ford, A.L., Goodsall, A.L., Hickey, W.F. & Sedgwick, J.D. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4⁺ T cells compared. *Journal of immunology* **154**, 4309-4321 (1995).
303. Badie, B. & Scharfner, J.M. Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. *Neurosurgery* **46**, 957-961; discussion 961-952 (2000).
304. Yang, I., Han, S.J., Sughrue, M.E., Tihan, T. & Parsa, A.T. Immune cell infiltrate differences in pilocytic astrocytoma and glioblastoma: evidence of distinct immunological microenvironments that reflect tumor biology. *Journal of neurosurgery* **115**, 505-511 (2011).
305. Golán, I., Rodríguez de la Fuente, L. & Costoya, J.A. NK Cell-Based Glioblastoma Immunotherapy. *Cancers* **10**, 522 (2018).
306. Kmiecik, J., Poli, A., Brons, N.H., Waha, A., Eide, G.E., Enger, P.O., Zimmer, J. & Chekenya, M. Elevated CD3⁺ and CD8⁺ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *Journal of neuroimmunology* **264**, 71-83 (2013).
307. Zhang, C., Oberoi, P., Oelsner, S., Waldmann, A., Lindner, A., Tonn, T. & Wels, W.S. Chimeric Antigen Receptor-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cellular Therapeutic for Targeted Elimination of Cancer Cells and Induction of Protective Antitumor Immunity. *Front Immunol* **8**, 533 (2017).
308. Fares, J., Fares, M.Y. & Fares, Y. Natural killer cells in the brain tumor microenvironment: Defining a new era in neuro-oncology. *Surgical neurology international* **10**, 43 (2019).
309. Caligiuri, M.A. Human natural killer cells. *Blood* **112**, 461-469 (2008).

310. Haspels, H.N., Rahman, M.A., Joseph, J.V., Gras Navarro, A. & Chekenya, M. Glioblastoma Stem-Like Cells Are More Susceptible Than Differentiated Cells to Natural Killer Cell Lysis Mediated Through Killer Immunoglobulin-Like Receptors-Human Leukocyte Antigen Ligand Mismatch and Activation Receptor-Ligand Interactions. *Front Immunol* **9**, 1345 (2018).
311. Han, J., Alvarez-Breckenridge, C.A., Wang, Q.E. & Yu, J. TGF-beta signaling and its targeting for glioma treatment. *Am J Cancer Res* **5**, 945-955 (2015).
312. Ransohoff, R.M., Schafer, D., Vincent, A., Blachere, N.E. & Bar-Or, A. Neuroinflammation: Ways in Which the Immune System Affects the Brain. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **12**, 896-909 (2015).
313. Arababadi, M.K., Asadikaram, P. & Asadikaram, G. APLN/APJ pathway: The key regulator of macrophage functions. *Life sciences* **232**, 116645 (2019).
314. Izgut-Uysal, V.N., Gemici, B., Birsen, I., Acar, N. & Ustunel, I. The effect of apelin on the functions of peritoneal macrophages. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **66**, 489-496 (2017).
315. Hara, C., Kasai, A., Gomi, F., Satooka, T., Sakimoto, S., Nakai, K., Yoshioka, Y., Yamamuro, A., Maeda, S. & Nishida, K. Laser-induced choroidal neovascularization in mice attenuated by deficiency in the apelin-APJ system. *Investigative ophthalmology & visual science* **54**, 4321-4329 (2013).
316. Leung, O.M., Li, J., Li, X., Chan, V.W., Yang, K.Y., Ku, M., Ji, L., Sun, H., Waldmann, H., Tian, X.Y., Huang, Y., Lau, J., Zhou, B. & Lui, K.O. Regulatory T Cells Promote Apelin-Mediated Sprouting Angiogenesis in Type 2 Diabetes. *Cell Rep* **24**, 1610-1626 (2018).
317. Kleihues, P. & Cavenee, W.K. *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System*, (IARC Press, 2000).
318. Talasila, K.M., Soentgerath, A., Euskirchen, P., Rosland, G.V., Wang, J., Huszthy, P.C., Prestegarden, L., Skaftnesmo, K.O., Sakariassen, P.O., Eskilsson, E., Stieber, D., Keunen, O., Brekka, N., Moen, I., Nigro, J.M., Vintermyr, O.K., Lund-Johansen, M., Niclou, S., Mork, S.J., Enger, P.O., Bjerkvig, R. & Miletic, H. EGFR wild-type amplification and activation promote invasion and development of glioblastoma independent of angiogenesis. *Acta neuropathologica* **125**, 683-698 (2013).

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anne Frisch, geb. Jarczewski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Die Rolle von APLN-Signalwegen in der Angiogenese von Gliomen“* 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 kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Ort, Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Frau Anne Frisch hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Frisch, A., Kälin, S., Monk, R., Radke, J., Heppner, F.L. & Kälin, R.E, Apelin Controls Angiogenesis-Dependent Glioblastoma Growth. International journal of molecular sciences, 2020

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

- a) Konzeption und Planung der Methodik: Die Konzeption und die Planung der Experimente erfolgte in Zusammenarbeit von R. E. K., F. L. H, S. K., J. R und A. F..
- b) Methodische Durchführung und deren Auswertung: Die Durchführung und Analysen der Magnetresonanztomographie (Abschnitt „Materials and Methods“ 4.6), H&E-Färbung (Abschnitt „Materials and Methods“ 4.7), In-situ-Hybridisierung (Abschnitt „Materials and Methods“ 4.10), des Perizytenstatus (Abschnitt „Supplementary Materials“ Fig. S1 A) sowie der Immunfluoreszenz und Gefäßdichtenquantifizierung (Abschnitt „Materials and Methods“ 4.11) wurden für die Zelllinie U-87 MG von A. F. größtenteils selbstständig geleistet und ausgewertet.
- c) Schreiben der Publikation: Die Erstellung des ersten Entwurfs des Manuskripts wurde vom Letztautor R. E. K. durchgeführt. An der Verbesserung des Entwurfs hatten alle Koautoren (u.a. auch A. F.) Anteil.

Ort, Datum

Stempel und Unterschrift des erstbetreuenden Hochschullehrers

Ort, Datum

Unterschrift der Doktorandin

9 Lebenslauf

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

10 Publikationsliste

10.1 Veröffentlichungen

1. Frisch, A., Kälin, S., Monk, R., Radke, J., Heppner, F.L. & Kälin, R.E. Apelin Controls Angiogenesis-Dependent Glioblastoma Growth. *International journal of molecular sciences* **21**, 4179 (2020).
2. Frisch A, Walter TC, Grieser C, Geisel D, Hamm B, Denecke T. *Performance survey on a new standardized formula for oral signal suppression in MRCP*. Eur J Radiol Open. 2017;5:1–5. Published 2017 Dec 23. doi:10.1016/j.ejro.2017.12.002
3. Frisch A, Walter TC, Hamm B, Denecke T. *Efficacy of oral contrast agents for upper gastrointestinal signal suppression in MRCP: A systematic review of the literature*. Acta Radiol Open. 2017;6(9):2058460117727315. Published 2017 Aug 30. doi:10.1177/2058460117727315
4. Blaum WE, Jarczewski A, Balzer F, Stötzner P, Ahlers O. *Auf dem Weg zum Web 3.0: Taxonomien und Ontologien für die medizinische Ausbildung - eine systematische Literaturrecherche*. GMS Z Med Ausbild. 2013;30(1):Doc13.
5. Blaum WE, Dannenberg KA, Friedrich T, Jarczewski A, Reinsch AK, Ahlers O. *Der praktische Nutzen des Konsensusstatements "praktische Fertigkeiten im Medizinstudium" – eine Validierungsstudie*. GMS Z Med Ausbild. 2012;29(4): Doc58.

10.2 Gutachten

1. Jarczewski A., Denecke T. *Gutachten zur klinischen Bewertung und medizinischen Notwendigkeit von LumiVision®* (im Auftrag von b.e. imaging GmbH für den Gemeinsamen Bundesausschuss, 2015)

10.3 Kongressbeiträge

1. Frisch A., Wyszynski J. V., Geisel D. *Voice of EPOS & Poster #7660 The dream of mixed reality in the daily routine – difficulties in generating 3D models of the liver*. ECR 2019
2. Frisch A., Geisel D., Hamm B., Denecke T. *Poster #9595 Oral gastrointestinal T2-Signal suppression in magnetic resonance cholangiopancreatography (MRCP): evaluation of a new biological product*. ECR 2019
3. Frisch A., Reimers I., Geisel D., Denecke T. *Scientific Paper #2664 - The influence of intravenous non-specific gadolinium-based contrast media application on image quality of T2-weighted MRC in preoperative evaluation of living liver donors*. ECR 2018
4. Jarczewski A., Grieser C., Geisel D., Hamm B., Denecke T. *EPOS Poster #6613 - Using LumiVision® as an orally administered agent for MRCP: a first evaluation*. ECR 2016

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen meinen tiefen Dank aussprechen, die mich auf dem Weg der Bearbeitung und Fertigstellung dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Zuallererst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Frank Heppner und meinem Promotionsbetreuer Dr. Roland Kälin für die Gelegenheit an diesem vielseitigen und fesselnden Thema mitzuwirken, für die wissenschaftliche Weiterbildung und für die konstruktiven Diskussionen zu Methodik und Ergebnissen. Ich danke von Herzen der AG Heppner im Ascheim-Zondek-Haus für die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und die ausführlichen Antworten auf die vielen Fragen. Insbesondere Dr. Stefanie Kälin, Dr. Josefine Radke und Ray Monk standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Herrn Prof. Dr. Bernd Hamm danke ich für die Möglichkeit in der Klinik für Radiologie arbeiten, forschen und lehren zu dürfen und dafür, dass ich in meinen beruflichen Interessen stets gefördert und bestärkt werde.

Mein besonderer Dank gilt auch den ehemaligen Kolleg*innen aus dem Lernzentrum und dort allen voran Prof. Dr. Wolf Hautz und Philip Stötzner, welche mich während der ersten Jahre der praktischen Versuchsdurchführungen zu dieser Promotionsarbeit nicht nur kurzfristig erfolgreich abgelenkt, sondern auch nachhaltig geprägt haben.

Für die akribische Durchsicht und Korrektur der Dissertationsschrift bin ich Lisa Frisch und Dr. Peter Radünzel unendlich dankbar. Dr. Giovanni Torsello schätze ich für den dringend benötigten Motivationsschub am Ende.

Zu guter Letzt und mit besonderem Nachdruck danke ich meinen Eltern, Verena und Bernd Jarczewski, die mir die Möglichkeiten und das Werkzeug gegeben haben, um soweit zu kommen. Außerdem danke ich meiner ganzen Familie und meinen Freunden – Luise, Juliane, Agata, Jana, Oliver, Moritz und Christopher – für die enorme Geduld, die wertvollen Ermutigungen und die verlässliche Unterstützung in der ganzen Zeit, die diese Arbeit in Anspruch nahm. Ich schätze eure aufbauenden Worte, das motivierende Zureden, die wohlthuenden Umarmungen und den unumstößlichen Glauben an mich.

Die Dankbarkeit gegenüber meinem Mann, Jan, und meinem Sohn, Carl, ist nicht in Worte zu fassen. Vielen Dank, dass ihr mir den Rücken freihaltet und dass ihr meinen Blick immer auf das Wesentliche zurücklenkt. Ohne eure Hilfe wäre es nicht möglich gewesen.