

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

DISSERTATION

Intravitalmikroskopische Analyse verschiedener vaskulärer
Targetingstrategien in der Behandlung des Glioblastoma
multiforme

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Güliz Acker

aus Üsküdar

Datum der Promotion: 26.02.2016

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1 - 22

Abstrakt/Abstract	2
1 Einleitung	4
1.1 Maligne Hirntumore.....	4
1.2 Tumorangiogenese.....	4
1.3 Antiangiogene Therapie.....	4
1.4 Vaskuläres Targeting.....	5
2 Material und Methoden	7
2.1 Tumorzelllinien.....	7
2.2 Vascular accessory cells.....	7
2.3 Sunitinib- und Temozolomidtherapie.....	7
2.4 Antikörper L19-Smallimmunoprotein.....	8
2.5 Immunhistochemie.....	8
2.6 Tiermodell.....	8
2.7 Intravitalfluoreszenzmikroskopie.....	9
2.8 Statistische Analyse.....	9
2.9 Versuchsabläufe.....	9
2.9.1 Effekte der antiangiogenen Therapie auf die Rekrutierung von VACs.....	9
2.9.2 Mikrovaskuläre Analyse der Kombinationstherapie.....	10
2.9.3 Biodistribution des L19 Antikörpers während der Angiogenese und antiangiogener Therapie.....	10
3 Ergebnisse	10
3.1 Effekte der antiangiogenen Therapie auf die Rekrutierung von VACs.....	10
3.1.1 Antiangiogene Therapie.....	10
3.1.2 Mikrovaskuläre Rekrutierung von VACs.....	11
3.2 Mikrovaskuläre Analyse der Kombinationstherapie.....	11
3.3 Biodistribution des L19 Antikörpers.....	12
3.3.1 Biodistribution des L19 Antikörpers während der Tumorangiogenese.....	12
3.3.2 Allgemeine mikrohämodynamische Änderungen nach der Sunitinibtherapie.....	12
3.3.3 Effekte der antiangiogenen Therapie auf das Bindungsverhalten des L19 Antikörpers.....	13
4 Diskussion	13
4.1 Rekrutierung von VACs.....	14
4.2 Kombinierte Therapiemaßnahmen.....	14
4.3 Vaskuläres Targeting.....	15
5 Literaturverzeichnis	18
6 Abkürzungsverzeichnis	22
Eidesstattliche Versicherung	23
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	24
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	25
(i) Antiangiogenic therapy inhibits the recruitment of vascular accessory cells to the perivascular niche in glioma angiogenesis.....	25
(ii) Combined temozolomide and sunitinib treatment leads to better tumour control but increased vascular resistance in O6-methylguanine methyltransferase-methylated gliomas.....	34
(iii) Microvascular biodistribution of L19-SIP in angiogenesis targeting strategies.....	45
Lebenslauf	55
Komplette Publikationsliste	56
Danksagung	58

Abstrakt

Einleitung: Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste und bösartigste astrogliale Hirntumor, dessen Prognose trotz Fortschritten in der Forschung weiterhin sehr schlecht ist. Die Angiogenese dieser Tumore spielt in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle und stellt somit ein vielversprechendes Therapieziel dar. Der Erfolg der antiangiogenen Therapie ist durch verschiedene Resistenzmechanismen limitiert. Einer dieser Resistenzmechanismen ist die myeloidzell-induzierte Vaskulogenese. Als neue Therapieversuche gelten zum einen antikörpervermittelte vaskuläre Targetingstrategien sowie zum anderen die Kombination antiangiogener Therapien mit Chemotherapeutika. Der Antikörper L19 ist einer der am besten charakterisierten Antikörper spezifisch für den neoangiogenen Marker Fibronectin B. Unser Ziel war, die mikrovaskuläre Biodistribution der „vascular accessory cells“ (VACs) und des Antikörpers L19 sowie die mikrohämodynamischen Effekte einer kombinierten Temozolomid- und Sunitinibtherapie (TMZ/SU) in vivo zu untersuchen. **Methodik:** Als Methode setzten wir ein Gliommodell in der chronischen Rückenmarkskammer in vivo ein und führten Mikrohämodynamik- und Biodistributionsanalysen mittels Intravitalmikroskopie durch. **Ergebnisse:** Unsere Ergebnisse zeigten, dass die antiangiogene Therapie mit Sunitinib zu einer verbesserten Mikrohämodynamik der therapieresistenten Tumorgefäße und zu einer Reduktion der perivaskulären Akkumulation der VACs führte. Eine kombinierte Therapie mit TMZ/SU resultierte in einer Reduktion der Gefäßpermeabilität von therapieresistenten Gefäßen, was auf eine zusätzliche Resistenzentwicklung hinweisen könnte. Unsere Studie demonstrierte, dass die spezifische Bindung des L19 Antikörpers an die Tumorgefäße zeitabhängig ist und zusätzlich eine subsequente Extravasation in das Tumorinterstitium stattfindet. Darüber hinaus zeigten wir, dass die Sunitinibtherapie zu einer verstärkten Bindung des Antikörpers führte. **Schlussfolgerung:** Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass VACs keine Rolle in der Resistenzentwicklung der antiangiogenen Therapie mit Sunitinib spielen sondern ein zusätzliches Ziel dieser Therapie darstellen könnten. Auf der anderen Seite führte eine kombinierte Therapie mit TMZ/SU zusätzlich zu einem additiven Therapieeffekt sowie vermutlich zu einer Resistenzentwicklung durch die Perizyten-Endothelzell-Interaktionen an therapieresistenten Tumorgefäßen, was eine Therapielimitierung mit sich bringen könnte. Das vaskuläre Targeting stellt eine vielversprechende Therapiemodalität auch in Kombination mit antiangiogener Therapie dar und benötigt in der Zukunft eine genauere Validierung.

Abstract

Introduction: GBM is the most common and most malignant astroglial brain tumor. Despite recent progress in the research the prognosis of this disease remains very poor. High angiogenesis of these tumors is one of the causes of their malignancy, thus angiogenesis represents one of the promising therapy targets. However, the therapeutic effect of the antiangiogenic treatments is limited by diverse resistance mechanisms. Myeloid cell induced vasculogenesis is one the discussed mechanisms. On the other hand, vascular targeting strategies and combination of antiangiogenic therapies with chemotherapeutics represent new promising therapy modalities to overcome therapy resistance. L19 antibody is one of the best characterized antibodies specific to a neoangiogenesis marker fibronectin B. Our aim was to analyze microvascular biodistribution of VACs, L19 antibody and microhemodynamic effects of the combination therapy with TMZ/SU in vivo. **Methods:** We used a glioma-model in dorsal skinfold chamber in vivo and analyzed biodistribution and microhemodynamics by intravitalmicroscopy. **Results:** Our results showed that antiangiogenic treatment with sunitinib led to better microhemodynamics of therapy resistant tumor blood vessels and to reduced accumulation of VACs in perivascular niche. The combination therapy with TMZ/SU resulted in diminished permeability of therapy resistant tumor vessels, which may represent an additional resistance development. Our study demonstrated that specific binding of L19 antibody to tumor vessels was time dependent and there was also a subsequential extravasation of the antibody in tumor tissue. Additionally, L19 antibody's binding increased after antiangiogenic treatment. **Conclusion:** In conclusion, we postulate that VACs do not play a role in resistance of antiangiogenic treatment but might even represent an additional target of this therapy. On the other hand, the combination therapy with TMZ/SU led not only to additive therapeutic benefits but also probably to resistance development by pericyte/endothelial cell interaction of resistant blood vessels limiting therapeutic effects. Vascular targeting strategies represent a promising era alone or in combination with antiangiogenic treatments and should be more investigated in the future.

1 Einleitung

1.1 Maligne Hirntumore

Supratentorielle astrogliale Neoplasien repräsentieren über 70% der primären Tumore im zentralen Nervensystem Erwachsener¹. Basierend auf histopathologischen Kriterien werden sie in vier Malignitätsgrade laut WHO eingeteilt, das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste und maligneste aller astroglialen Tumore². Die Standardtherapie des primären GBM umfasst die chirurgische Resektion mit konkominanter Radiochemotherapie³. Die Prognose des GBM ist trotz vielfältiger diagnostischer und therapeutischer Bemühungen in den letzten Jahren mit einer medianen Überlebenszeit von 14,6 Monaten weiterhin als sehr schlecht einzustufen³.

Die ausgeprägte Tumorgefäßneubildung (Tumorangiogenese) des GBM wird als maßgeblich verantwortlich für die Aggressivität dieses Tumors angesehen⁴⁻⁶. Die These welche besagt, dass sowohl das solide als auch das infiltrative Wachstum maligner Hirntumore abhängig von der Angiogenese sind, wird mit experimentellen Studien untermauert^{7,8}. Somit stellt die Angiogenese ein vielversprechendes Therapieziel für die Behandlung des GBM dar.

1.2 Tumorangiogenese

Es gibt verschiedene Entstehungsmechanismen der Gefäßneubildung. Die spätere Ausbildung neuer Blutgefäße aus einem bereits bestehenden primitiven Gefäßstamm wird als Angiogenese bezeichnet⁹. Diese spielt eine maßgebliche Rolle für das Krebswachstum und ist ein entscheidender Faktor für die Entwicklung von primär kleinen Tumoren zu einer klinisch relevanten Tumorentität, sowie für die hämatogene Metastasierung in andere Organe¹⁰. Eine ausgeprägte Neovaskularisation stellt ein charakteristisches Merkmal vieler aggressiver Tumorerkrankungen dar¹¹. Bei einigen Tumoren wurde bereits im Jahr 1995 von Folkman et al. eine direkte Korrelation zwischen der Gefäßdichte und der Tumorinvasion festgestellt¹⁰. Vor diesem Hintergrund steht die Tumorangiogenese im Mittelpunkt von neuen therapeutischen und diagnostischen Strategien. Durch die intensive Angiogeneseforschung in den letzten Jahrzehnten wurden die beteiligten Schlüsselmoleküle, wie etwa der Endothelwachstumsfaktor „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), der Fibroblastenwachstumsfaktor „fibroblast growth factor“ (FGF) und der Wachstumsfaktor „platelet-derived growth factor“ (PDGF) identifiziert¹².

1.3 Antiangiogene Therapie

Eine der vielversprechendsten Angiogeneseinhibitoren ist der Multikinaseninhibitor Sunitinib (SU)¹³. Der klinische Therapieerfolg von Sunitinib zeigte sich allerdings in der Gliombehandlung limitiert¹⁴, was wie andere antiangiogene Therapiemaßnahmen durch

verschiedene Resistenzmechanismen bedingt sein kann^{15,16}. Die myeloidzell-vermittelte Vaskulogenese ist eine der postulierten Resistenzmechanismen gegen antiangiogene Therapien¹⁶⁻¹⁸. Der Begriff „vascular accessory cells“ (VACs) wurde von Grunewald et al. eingeführt, um die in der Literatur heterogene Myeloidzellpopulation einheitlich zu beschreiben¹⁹. VACs spielen bei der Vaskulogenese eine entscheidende Rolle und stellen einen potentiellen Resistenzmechanismus gegen eine antiangiogene Therapie dar. Es ist allerdings unbekannt, wie VACs mit Tumorendothel unter antiangiogener Therapie interagieren. **Somit war es das Ziel unserer Studie, die Interaktion von VACs und Tumorendothel unter Sunitinibtherapie zu untersuchen.**

Als Ausweg für die Resistenzentwicklung gegen eine antiangiogene Therapie wird eine Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika postuliert⁹. In einer Studie von Zhou et al. konnte eine dosis- und zeitabhängige Erhöhung des Temozolomidtransports unter Sunitinibtherapie gezeigt werden²⁰. Als Erklärung postulierten die Autoren einen verbesserten „vaskulären Normalisationsindex“ bei therapieresistenten Gefäßen. Eine 2009 publizierte Studie aus unserer Arbeitsgruppe untersuchte den Effekt der Sunitinibtherapie auf die Mikrohämodynamik der Gliomangiogenese intravitalmikroskopisch²¹. In dieser Studie wurde ein erhöhter mikrovaskulärer „Deliveryindex“ der Chemotherapeutika durch die verbesserte Hämodynamik in den therapieresistenten Gefäßen, trotz signifikant reduzierter funktioneller Gefäßdichte, demonstriert.

Vor diesem Hintergrund führten wir eine Studie am experimentellen Gliom in vivo mit einer Kombinationstherapie, bestehend aus Temozolomid (TMZ), dem effektivsten Zytostatikum in der GBM-Therapie und Sunitinib mit folgenden Fragestellungen durch:

- (i) Analyse mikrohämodynamischer Effekte der kombinierten TMZ/SU-Therapie**
- (ii) Charakterisierung potenzieller vaskulärer Resistenzmechanismen**

1.4 Vaskuläres Targeting

Als zusätzliche Therapieentwicklung in der Behandlung maligner Tumore konnten zahlreiche Moleküle identifiziert werden, welche spezifisch für die Neoangiogenese sind^{22,23}. Diese spezifischen neoangiogenen Moleküle bilden die Basis für das Prinzip des „vaskulären Targetings“²⁴. Das Konzept des vaskulären Targetings beruht auf der Identifikation vaskulärer, tumor-spezifischer Epitope, welche z.B. mittels Antikörpern dazu verwendet werden können um diagnostische und/oder therapeutische Substanzen spezifisch zum Tumor zu transportieren²⁵. Somit kann die Präzision der Diagnostik und Therapie unter Schonung des gesunden Gewebes erhöht werden. Im Rahmen vaskulärer Targetingstrategien sind zwei Hauptgruppen der Moleküle von großem Interesse im Hinblick auf die Angiogenese: endotheliale

Membranproteine (z.B. Integrine, VEGF usw.) sowie extrazelluläre Matrixproteine²⁴. Endotheliale Membranproteine sind durch ihre luminale Lage einfacher zu erreichen, dafür aber nicht immer ausreichend exprimiert²⁴. Obwohl die extrazellulären Matrixproteine aufgrund abluminaler Lokalisation schwerer zu erreichen sind, bieten sie meistens den Vorteil ausgeprägter und stabiler Expression zu sein²⁴. Zu den am meist erforschten neoangiogenen Markern zählt die erstmalig 1987 beschriebene Extradomäne B (ED-B) des Basalmembranmoleküls Fibronectin, welches als extrazelluläres Matrixprotein zwischen Perizyten und Endothelzellen essentiell für die vaskuläre Morphogenese ist²⁶. Aufgrund der Rückbildung dieses Moleküls während des vaskulären Maturierungsprozesses ist die ED-B im gesunden Gewebe ausschließlich während der Proliferationsphase im Endometrium nachweisbar²⁷. Verschiedene monoklonale Antikörper wurden im letzten Jahrzehnt spezifisch für die vielversprechenden neoangiogenen Marker mittels „Phage Display“ Technik mit rekombinanten Antikörperfragmentbibliotheken synthetisiert²⁸⁻³⁰. Einer der etablierten humanen Antikörper ist der sogenannte L19 Antikörper. Dieser humane Antikörper L19 bindet spezifisch an die ED-B von Fibronectin und stellt somit ein geeignetes molekulares Werkzeug für antikörperbasierte Therapie- und Diagnostikstrategien dar³¹. Der L19 Antikörper, gekoppelt mit verschiedenen Immunzytokinen oder Radionuklid, wurde in den letzten Jahren in zahlreichen Therapien und zur Diagnostik eingesetzt^{24,25}. Die bisherigen klinischen Studien bezüglich der Applikationssicherheit und der Durchführbarkeit L19-gekoppelter Therapie- und Diagnostikstrategien zeigen überzeugende Ergebnisse³²⁻³⁴.

Die gezielte Verwendung antikörper-basierter Therapiestrategien setzt spezifische Kenntnisse bezüglich des mikrovaskulären Bindungsverhaltens, der Biodistribution und der Mikrohämodynamik des verwendeten Antikörpers in vivo voraus. Diese sind trotz zunehmender präklinischer und klinischer Studien für den Antikörper L19 noch nicht ausreichend geklärt. Darüber hinaus erlauben diese Antikörper einerseits die direkte Visualisierung der Tumorangiogenese und könnten somit neue diagnostische Implikationen für hochangiogene Tumore wie z.B. das Glioblastoma multiforme mit sich bringen. Andererseits können im Rahmen des vaskulären Targetings neue Therapieansätze für die Behandlung des GBM entwickelt werden.

Somit war es das Ziel in unserer Studie zu untersuchen,

- (i) wie spezifisch das Bindungsverhalten des L19 Antikörpers an Tumorgefäßen in vivo ist.**
- (ii) wie das Bindungsverhalten und die Dynamik dieses Prozesses zu charakterisieren sind.**

- (iii) **welchen Einfluss die Mikrohämodynamik auf das Bindungsverhalten besitzt.**
- (iv) **wie sich die Biodistribution und das Bindungsverhalten unter der antiangiogenen Therapie ändern.**

2 Material und Methoden

Für alle Experimente wurden die Grundsätze der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und die einschlägigen Tierschutzbestimmungen zur Kenntnis genommen und berücksichtigt.

2.1 Tumorzelllinien

SF126 Gliomzellen (JCRB Cell Bank, Osaka, Japan) wurden in DMEM mit 4,5g/L Glucose ergänzend mit 10%-igem fetalem Rinderserum bei 37°C in mit 5% CO₂ befeuchteten Inkubatoren nach Standardprotokollen kultiviert. C6 Ratte-Gliomzellen (ATCC, Wesel, Deutschland) wurden nach dem Auftauen in HAM's F-10 Kulturmedium bei 37°C in mit 5% CO₂ befeuchteten Inkubatoren nach Standardprotokollen kultiviert. Die Zellzählung erfolgte nach Standardlaborprotokollen mittels Neubauerkammer. Für die Rückenhautkammerexperimente (s.u.) wurden 5x10⁵ C6 Ratte-Gliomzellen oder 3x10⁵ SF126 Gliomzellen implantiert.

2.2 Vascular accessory cells

In unserer Studie verwendeten wir Tie-2⁺, c-Kit⁺, Sca-1⁻ und Flk-1^{-niedrig} VACs, deren Isolation und Aufarbeitung bereits beschrieben wurde³⁵. Diese Zellen wurden uns von unserem Kooperationspartner Antonis K. Hatzopoulos (Vanderbilt Universität, Tennessee, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. 6x10⁶ DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) markierte VACs wurden pro Tier intraarteriell injiziert.

2.3 Sunitinib- und Temozolomidtherapie

Als antiangiogene Therapie wurde der Multikinaseninhibitor Sunitinib (SU11248, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland) verwendet, dessen Effekte auf die Mikrohämodynamik von unserer Arbeitsgruppe bereits detailliert beschrieben wurden²¹. Wir applizierten 40mg/kg Körpergewicht (KG) Sunitinib pro Tag pro Tier intraperitoneal fünf bis sechs Tage lang, fünf beziehungsweise sieben Tage nach der Zellimplantation.

Als Zytostatikum wurde Temozolomid (Firma Tocris, Wiesbaden, Deutschland) eingesetzt. Für die Kombinationstherapiestudie wurden die Mäuse zufällig in vier Therapiegruppen eingeteilt und fünf Tage nach der Tumorzellimplantation (Rückenhautkammermodell) für sechs Tage mit intraperitonealen Injektionen wie folgt therapiert: Gruppe 1= Kontrolle (Therapie mit 0,5ml 0,9%-iger Natriumchlorid-Lösung (NaCl)), Gruppe 2= SU (40mg/kg KG), Gruppe 3= TMZ (200mg/kg KG), Gruppe 4= SU (40mg/kg KG) und TMZ (200mg/kg KG).

2.4 Antikörper L19-Smallimmunoprotein

Der Antikörper L19-Smallimmunoprotein (SIP) wurde uns bereits mit einem Cyanin (Cy) 3-Fluoreszenzmarker markiert von unserem Kooperationspartner Dario Neri (Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Schweiz), Entwickler dieser Antikörper, freundlicherweise übermittelt. Für die Details zur Entwicklung dieses Antikörpers verweisen wir auf die Literatur^{29,31}. 100µg L19-SIP wurden jeweils in die Vena jugularis interna injiziert.

2.5 Immunhistochemie

Wir führten die bereits etablierte immunhistochemische „cluster of differentiation,, (CD31) Färbung (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) mit einem grünen Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (Diavona, Hamburg, Deutschland) zur Endothelzelldarstellung durch. Da der L19 Antikörper und VACs bereits ex vivo mit Fluoreszenzmarkern (rot) gekoppelt verabreicht wurden, war eine spezielle Färbung zur Darstellung der Antikörper oder VACs nicht notwendig. Das „antifading mounting“ Medium DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol; Dianova, Hamburg, Deutschland) wurde zur Färbung der Tumorzellen durch DNA-Färbung verwendet. DAPI erzeugt blaue Fluoreszenz. Photomikrographische Analysen wurden mittels „Axiovision software“ (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt.

2.6 Tiermodell

Die Versuche wurden an erwachsenen Nacktmäusen (NMRI nu/nu, 28-35g, männlich oder weiblich, Firma Charles River, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Das Rückenhautkammermodell ist ein für die Angiogeneseforschung bereits etabliertes in vivo Tiermodell, welches sich insbesondere für Langzeitbeobachtungen der Tumorangiogenese mittels Intravitalmikroskopie (IVM) eignet^{36,37}. Das Rückenhautkammermodell für die Mäuse wurde bereits 1943 von Algire et al. beschrieben, welches 1993 erstmalig in immuninkompetenten Nacktmäusen etabliert wurde^{36,38}.

2.7 Intravitalfluoreszenzmikroskopie

Die Intravital-Fluoreszenzvideomikroskopie wurde mittels Epi-Illumination mit einem modifizierten Axiotech Vario Mikroskop (Attoarch, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) unter Verwendung von 10×Langstrecken- und 20×Wasserimmersionsobjektiven durchgeführt (Zeiss, Jena, Deutschland). Die Offline Auswertung wurde mit Hilfe eines computerunterstützten Auswertungssystems (CAPIMAGE, Zeintl Software Engineering, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die intravitalmikroskopische Darstellung der Tumorgefäße wurde durch Kontrastverstärkung mit 2%-igem fluoreszierendem Isothiocyanat (FITC) konjugiertem Dextran (0,1 ml intravenös, Molekulargewicht 150.000 Dalton, Sigma) unter Verwendung von Blaulicht-Epi-Illumination erreicht. Zeitgleiche in vivo Applikation des Cy3-markierten L19-SIP Antikörpers oder markierter VACs unter Einsatz der Grünlicht-Epi-Illumination ermöglichten die sequenzielle Analyse der mikrovaskulären Biodistribution. Die mikrohäodynamischen Parameter „totale Gefäßdichte (TVD)“, „funktionelle Gefäßdichte (FVD)“, „Perfusionsindex (PI)“, „Gefäßdurchmesser (D)“, „Blutfluss (Q)“, die „Permeabilität (P)“, „Wandscherrate (WSR)“ und „Wandschubspannung (WSS)“ wurden, wie in der Literatur beschrieben, berechnet³⁹.

2.8 Statistische Analyse

Die quantitativen Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Für die statistische Analyse der Daten wurden folgende Tests verwendet: Student t-Test sowie einfaktorielle ANOVA gefolgt von der Bonferroni Korrektur. Statistische Ergebnisse mit $p < 0.05$ wurden als signifikant definiert.

2.9 Versuchsabläufe

2.9.1 Effekte der antiangiogenen Therapie auf die Rekrutierung von VACs

In dieser Studie wurden C6 Gliomzellen in die Rückenhautkammer (n=6 pro Gruppe) implantiert. Die Tiere in der Therapiegruppe (n=6) erhielten fünf Tage nach der Tumorzellimplantation fünf Tage lang Sunitinib intraperitoneal, während die Kontrolltiere (n=6) 0,9%-ige NaCl-Lösung als Placebothherapie erhielten. Am Ende der Therapie erfolgte eine IVM Diagnostik sowie 48 Stunden nach intraarterieller Injektion der VACs. Die Tumore wurden am Ende explantiert und einer immunhistochemischen Analyse zur Verifizierung der intravitalmikroskopischen Daten unterzogen.

2.9.2 Mikrovaskuläre Analyse der Kombinationstherapie

In dieser Studie wurden SF126 Gliomzellen in die Rückenhautkammer (n=5 pro Gruppe) implantiert. Die im Abschnitt 2.3 geschilderten Therapien wurden fünf Tage nach der Tumorzellimplantation sechs Tage lang durchgeführt. IVM erfolgte an den Tagen 5, 7, 9 und 11 nach der Tumorzellimplantation. Die Tumore wurden am Ende explantiert und einer immunhistochemischen Analyse unterzogen.

2.9.3 Biodistribution des L19 Antikörpers während der Angiogenese und antiangiogener Therapie

In dieser Studie wurden SF126 Gliomzellen in die Rückenhautkammer (n=4) implantiert und nach sechs Tagen Wachstumszeit mittels IVM analysiert. Die IVM erfolgte zum Zeitpunkt der Antikörperinjektion (t=0) sowie zu den Zeitpunkten t=4h und t=24h nach Antikörperinjektion. Als Kontrollen dienten Versuchstiere mit Rückenhautkammern (n=4), die das gleiche Versuchsprotokoll jedoch ohne Tumorzellimplantation durchliefen. In den Therapieexperimenten wurde die Sunitinibtherapie sieben Tage nach der Tumorzellimplantation für sechs Tage durchgeführt (n=4). Die IVM wurde am zweiten Tag sowie am Ende der Sunitinibtherapie durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten Versuchstiere mit Tumorzellimplantation ohne antiangiogene Therapie (n=4). Die Tumore wurden nach Abschluss der Experimente explantiert und einer immunhistochemischen Analyse zur Verifizierung der intravitalmikroskopischen Daten unterzogen.

3 Ergebnisse

Alle Ergebnisse wurden in Form von Originalartikeln veröffentlicht³⁹⁻⁴¹. Aus rechtlichen Gründen wurde auf die Übernahme der Abbildungen verzichtet.

3.1 Effekte der antiangiogenen Therapie auf die Rekrutierung von VACs³⁹

3.1.1 Antiangiogene Therapie

Wir beobachteten nach der antiangiogenen Therapie eine signifikante Verminderung der totalen sowie funktionellen Gefäßdichte im Vergleich zur Kontrollgruppe (jeweils um 50% und um 35%), wobei der Perfusionsindex mit einem 29%-igen Anstieg in der Therapiegruppe signifikant erhöht war. Die therapieresistenten Gefäße waren durch einen 3-fach höheren Blutfluss charakterisiert. Der Durchmesser der therapieresistenten Tumorgefäße war 39% größer im

Vergleich zu der Kontrollgruppe, während die Permeabilität, die Wandscherrate (WSR) und die Wandschubspannung (WSS) nach antiangiogener Therapie unverändert blieben.

3.1.2 Mikrovaskuläre Rekrutierung von VACs

Wir analysierten die mikrovaskuläre Rekrutierung von VACs während der intraarteriellen Injektion, nach einer Stunde sowie 48 Stunden danach. Während der Injektionsphase blieb die initiale Adhäsion in beiden Gruppen gleich und veränderte sich auch nicht nach Ablauf einer Stunde. Ebenso beobachteten wir keinen signifikanten Unterschied in der „festen“ Adhäsion. 48 Stunden nach der Injektion von VACs kam eine 45% reduzierte Akkumulierung der VACs in der perivaskulären Region der therapierten Tumore im Vergleich zu der Kontrollgruppe zur Darstellung ($53,7\pm 8\%$ vs. $24,0\pm 17\%$; $p < 0,05$, $n=6$ pro Gruppe, t-Test). Die reduzierte Akkumulierung der VAC Clusters in der perivaskulären Region der therapierten Tumore konnten wir auch immunhistochemisch verifizieren.

3.2 Mikrovaskuläre Analyse der Kombinationstherapie⁴⁰

In den intravitalmikroskopischen Analysen der Kombinationstherapie zeigten sich die niedrigsten Werte für die TVD in der Sunitinib- und Kombinationstherapiegruppe mit Temozolomid und Sunitinib im Vergleich zur TMZ- und Kontrollgruppe. Zwischen der Sunitinibtherapie und der Kombinationstherapie zeigte sich bezüglich der TVD-Reduktion keine signifikante Differenz (Tabelle 1). Während alle Therapiegruppen eine signifikante Abnahme der FVD im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten, erwies die Kombination von TMZ/SU eine weitere signifikante Reduktion von funktionellen Gefäßen verglichen mit TMZ-Monotherapie (Tabelle 1). Die Analyse des Perfusionsindex ergab ähnlich zu den TVD Ergebnissen einen signifikant höheren Perfusionsindex in allen Therapiegruppen verglichen mit der Kontrollgruppe, während die Therapiemodalitäten mit Sunitinib (Mono- und Kombinationstherapie) signifikant höhere Werte als eine ausschließliche TMZ-Therapie zeigten. Die Blutflussrate hingegen war nur in der Sunitinib-Monotherapie und Kombinationstherapie signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe, während die TMZ-Monotherapie keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte. Die Permeabilität der therapieresistenten Gefäße zeigte sich in der Kombinationstherapiegruppe signifikant vermindert im Vergleich zu den beiden Monotherapien und zur Kontrollgruppe (Tabelle 1). Die Gefäßpermeabilität änderte sich in den SU- und TMZ-therapierten Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant.

Tabelle 1: Zusammenfassung der mikrohäodynamischen Effekte der Kombinationstherapie (TMZ/SU) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Placebo) und zu den beiden Monotherapien (TMZ, SU). (↑: signifikant erhöht, ↓: signifikant erniedrigt, ≈: keine signifikante Veränderung; $p < 0.05$, $n = 6$ pro Gruppe, einfaktorielle ANOVA gefolgt von der Bonferroni Korrektur)

	Im Vgl. zum Placebo	Im Vgl. zu TMZ	Im Vgl. zu SU
TVD	↓	↓	≈
FVD	↓	↓	≈
PI	↑	↑	≈
Q	↑	↑	≈
P	↓	↓	↓

3.3 Biodistribution des L19 Antikörpers ⁴¹

3.3.1 Biodistribution des L19 Antikörpers während der Tumorangiogenese

Um die Dynamik des mikrovaskulären Biodistributionsprozesses des L19-SIP Antikörpers zu charakterisieren wurde eine repetitive intravitalmikroskopische Analyse zu den Zeitpunkten $t=0h$ (während L19-SIP Injektion), $t=4h$ und $t=24h$ durchgeführt. Vier Stunden nach Antikörperapplikation zeigte sich in der IVM eine deutliche mikrovaskuläre Anreicherung des Antikörpers im vaskulären Kompartiment der Tumorgefäße, wobei keine Antikörperakkumulation an den Wirtsgefäßen zu sehen war. Zudem beobachteten wir ebenso bereits vier Stunden nach der Antikörperinjektion einen signifikanten, jedoch im Vergleich zur vaskulären Akkumulation nachrangigen Fluoreszenzanstieg im interstitiellen Kompartiment durch die Extravasation des L19-SIP Antikörpers. Nach 24 Stunden kam es dann zu einer leichten Abschwächung des Kontrastverhaltens zwischen dem vaskulären und interstitiellen Kompartiment in der Cy3-L19-SIP Visualisierung. Somit entstand der beste Akkumulationskontrast zwischen dem vaskulären und dem interstitiellen Kompartiment 4 Stunden nach Injektion. Der Verlauf der interstitiellen Fluoreszenzintensität zeigte sich im Gegensatz zu dem vaskulären Kompartiment nach 4 Stunden weitgehend konstant.

3.3.2 Allgemeine mikrohäodynamische Änderungen nach der Sunitinibtherapie

Wie bereits im Abschnitt 3.1.1 beschrieben führte die antiangiogene Therapie zur signifikanten Verminderung der totalen sowie der funktionellen Gefäßdichte, wobei der Perfusionsindex in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war. Des Weiteren lagen der

Blutfluss und der Durchmesser der therapieresistenten Tumorgefäße signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.3.3 Effekte der antiangiogenen Therapie auf das Bindungsverhalten des L19 Antikörpers

Unsere intravitalmikroskopischen Beobachtungen demonstrierten eine deutlich verstärkte Fluoreszenzintensität an therapieresistenten Tumorgefäßen vier Stunden nach der Antikörperinjektion, welche bis zum Ende des Beobachtungszeitraums anhielt. Der Akkumulationskontrast zwischen der vaskulären und der interstitiellen Bindung des Antikörpers blieb 24 Stunden nach Antikörperinjektion weiterhin stabil. Unsere Quantifizierungen zeigten nach 24 Stunden eine Zunahme der Akkumulation des L19-SIP Antikörpers an therapieresistenten Gefäßen im Vergleich zur Kontrollgruppe um 29%. Ebenso war die sekundäre Extravasation unter antiangiogener Therapie um 22% nach 24 Stunden erhöht. Unsere histologischen Analysen bestätigten die Persistenz des Epitopes ED-B im vaskulären und interstitiellen Kompartiment nach einer antiangiogenen Therapie.

4 Diskussion

Das Ziel unserer Studien war es, die mikrovaskuläre Biodistribution der VACs und des Antikörpers L19 sowie die mikrohämodynamischen Effekte einer kombinierten TMZ/SU-Therapie in vivo mit Hilfe des chronischen Rückenhautkammermodells und nachfolgender IVM zu untersuchen.

Das Rückenhautkammermodell ist ein bestens etabliertes chronisches in vivo Modell, welches sich für langfristige intravitalmikroskopische Analysen eignet³⁶. Der größte Nachteil des Rückenhautkammermodells ist die nicht orthotope Implantation der Tumorzellen mit konsekutiven Mikroumgebungsunterschieden im Tumorwachstum. Das sogenannte Schädelfenstermodell gilt als alternatives Tiermodell mit dem Vorteil orthotoper Tumorzellimplantation im Gegensatz zum Rückenhautkammermodell⁴². Zu kritisieren ist, dass beim Schädelfenstermodell die Tumorzellimplantation auf den Kortex (extraaxial) und nicht intraparenchymatös erfolgt⁴³. Zum anderen wurde eine vom Wirtsgewebe unabhängige Morphologie der Gliomangiogenese gezeigt⁴⁴. Das liegt daran, dass die Tumorzellen und nicht das Wirtsgewebe die mikrovaskulären Charakteristika bestimmen⁴⁵. In Zusammenschau dieser Studien sowie in Anbetracht der Komplexität des Schädelfenstermodells im Vergleich zum Rückenhautkammermodell hielten wir das Rückenhautkammermodell als ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Tumorangio-genese für unsere Fragestellungen.

Als antiangiogene Therapie verwendeten wir den Multityrosinkinaseinhibitor Sunitinib mit potenter antiangiogener und antiproliferativer Aktivität⁴⁶, dessen Effekte auf die Mikrohämodynamik von unserer Arbeitsgruppe bereits charakterisiert wurden²¹. TMZ ist die effektivste Therapiemodalität, insbesondere in den O⁶-methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) Promotor methylierten Gliomen⁴⁷. Aus diesem Grund verwendeten wir in der kombinierten Therapiestudie eine MGMT⁺ Zelllinie.

4.1 Rekrutierung von VACs

Wie bereits in der Literatur beschrieben beobachteten auch wir in unserer Studie eine signifikant verbesserte mikrovaskuläre Perfusion in den therapieresistenten Tumorgefäßen nach Sunitinibtherapie. Dies beeinflusste allerdings nicht signifikant die initialen oder späteren Adhäsionsprozesse der VACs³⁹. Als eine potentielle Erklärung blieben zum einen die „WSR“ und „WSS“ trotz der veränderten Mikrohämodynamik unverändert³⁹, zum anderen sind die bekannten Schlüsselmoleküle der Adhäsion der VACs wie E-/P-/L- Selektine oder Integrin β 2 keine nachgewiesenen Zielmoleküle von Sunitinib¹³. Die Rezeptortyrosinkinase „c-KIT“, welche bekannterweise die Myeloidzelladhäsion beeinflusst, wird zwar von Sunitinib blockiert, scheint aber als nur ein Glied in der molekularen Kette nicht entscheidend zu sein⁴⁸. Ein signifikanter Unterschied nach antiangiogener Therapie war die reduzierte Akkumulation der VACs in der perivaskulären Nische³⁹, wo die VACs bekannterweise auch durch parakrine Sekretion der Angiogenese beitragen¹⁹. Da die Permeabilität nach der Sunitinibtherapie unverändert blieb, kann eine Alteration in der Permeabilität nicht für ursächlich gehalten werden³⁹. Die Inhibition des VEGF Signalweges durch Sunitinib kann diese Beobachtung erklären, da VEGF Rezeptor-2, VEGF und „placental growth factor“ (PlGF) bekannte Promotoren der Vaskulogenese sind⁴⁹. Zum anderen wurde gezeigt, dass die c-KIT Inhibition auch die Rekrutierung der VACs zu neugeformten Gefäßen hemmt⁴⁸. Da Sunitinib auch mitunter c-KIT inhibiert, kann dies eine mögliche Erklärung der reduzierten VACs in der perivaskulären Nische sein¹³. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass VACs keine Rolle in der Resistenzentwicklung gegenüber der Sunitinibtherapie spielen. Die reduzierte Rekrutierung der VACs somit die verringerte VACs getriggerte Vaskulogenese kann eine zusätzliche antiangiogene Wirkung der Sunitinibtherapie darstellen.

4.2 Kombinierte Therapiemaßnahmen

In unserer Studie zeigten wir intravitalmikroskopisch, dass die TMZ/SU Kombinationstherapie zu stärkeren vaskulären Resistenzmechanismen mit niedriger Permeabilität und verbesserter Perfusion führt⁴⁰. Zhou et al. demonstrierten in präklinischen Studien, dass eine

Sunitinibtherapie die Tumordistribution von TMZ erhöht^{20,50}. Die große Frage der zeitlichen Sequenzierung einer solchen Kombinationstherapie blieb hierbei offen. Das sogenannte „Normalisationsfenster“ wurde als die richtige Zeit für eine zusätzliche Chemotherapiegabe postuliert⁵¹. In unserem experimentellen Ansatz beobachteten wir keinen zusätzlichen antitumorösen Effekt der sequentiellen Applikation beider Substanzen⁴⁰. Wir zeigten einen synergistischen antitumorösen Effekt der Kombinationstherapien jedoch nur unter der Bedingung, dass die beiden Therapien gleichzeitig durchgeführt worden waren⁴⁰. Die zugrunde liegenden molekularen Wege bleiben zwar derzeit noch unerklärt, aber ein Teil des Synergismus kann durch die bekannte proapoptotische und antiangiogene Wirkung beider Therapien als Monotherapie erklärt werden^{21,40,52-54}. Allerdings führte die kombinierte Therapie zu einer erhöhten Toxizität, welche die klinische Durchführung einer solchen Kombination limitiert⁴⁰. In der Intravitalmikroskopie detektierten wir ca. 20% therapieresistente Tumorgefäße unter der Kombinationstherapie⁴⁰. In den resistenten Tumorgefäßen war der Perfusionsindex signifikant höher im Vergleich zur TMZ-Monotherapie bzw. zur Kontrollgruppe⁴⁰. Die therapieresistenten Tumorgefäße in der Kombinationstherapiegruppe zeigten eine höhere Blutflussrate als die TMZ- und Kontrollgruppe⁴⁰. Diese Beobachtungen sind bereits als mikrohämodynamische Effekte der Sunitinibtherapie bekannt²¹. Ein wesentlicher Unterschied der Kombinationstherapie zu allen anderen Therapiegruppen inklusive der Sunitinib-Monotherapie war die signifikant reduzierte Permeabilität der therapieresistenten Tumorgefäße⁴⁰. Die Analysen unserer Arbeitsgruppe ergaben eine signifikant höhere Wiederherstellung der Perizyten-Endothelzellen Interaktionen in der Kombinationstherapie im Vergleich zur Sunitinib-Monotherapie^{21,40}. Die bessere Wiederherstellung der Perizyten-Endothelzellen Interaktionen können die beobachteten vaskulären Resistenzmechanismen unter anderem erklären. Die vaskulären Resistenzmechanismen müssen in der Planung kombinierter Therapiemaßnahmen berücksichtigt und angegangen werden, um einen suffizienten Therapieerfolg auf Dauer erzielen zu können.

4.3 Vaskuläres Targeting

Das spezifische Targeting von Tumorgefäßen mit Hilfe neoangiogener Marker ist eine vielversprechende Methode um neuartige onkologische Therapie- und Diagnostikstrategien zu entwickeln. In unserer Studie wurde demonstriert, dass die spezifische Bindung des L19-SIP Antikörpers an Tumorgefäße zeitabhängig ist und dass zusätzlich eine subsequente Extravasation in das Tumorinterstitium stattfindet⁴¹. Darüber hinaus demonstrierten wir die Abhängigkeit des mikrovaskulären Bindungsprozesses von mikrohämodynamischen Eigenschaften und zeigten spezifische Bindungsstellen auf⁴¹. Somit konnten wir wertvolle Erkenntnisse in Bezug auf die

Biodistribution des L19-SIP Antikörpers liefern, welche für zukünftige klinische Applikationen im Hinblick auf therapeutische und diagnostische Interventionen von Bedeutung sein könnten.

Wir postulierten, dass das maximale Bindungspotential ca. vier Stunden nach intravenöser Applikation des Antikörpers erreicht wird⁴¹. Unsere Ergebnisse stimmen mit anderen Tumormodellen in der Literatur überein, welche eine maximale intratumorale Akkumulation von L19-SIP 4 bis sechs Stunden nach intravenöser Applikation zeigten^{31,55}. Allerdings stellten wir zusätzlich einen dynamischen Extravasationsprozess parallel zum mikrovaskulären Targetingpotential des L19-SIP Antikörpers dar⁴¹. Dies kann unter anderem durch die Permeabilität der Tumorgefäße erklärt werden⁵⁶. Dennoch müssen wir darauf hinweisen, dass die Fluoreszenzintensität im perivaskulären Kompartiment konstant höher als die Fluoreszenzintensität im Interstitium war. Das kann vor allem durch die bekannte prominente perivaskuläre und abluminale Bindung des Antikörpers an den Tumorgefäßen begründet werden^{55,57}. Da es mehrere tumorspezifische Faktoren, wie beispielsweise die heterogene Blutversorgung und den erhöhten interstitiellen Druck gibt, welche den mikrovaskulären Transport von Makromolekülen ins Tumorinterstitium beeinflussen können, repräsentiert der gezielte Transport von L19-SIP zu Fibronectin in der subendothelialen extrazellulären Matrix ein brauchbares Hilfsmittel, um diese tumor-assoziierten Nachteile zu überwinden⁵⁶. Die beste Kontrastierung zwischen den perivaskulären und interstitiellen Kompartimenten wurde 4 Stunden nach der Antikörperinjektion erreicht⁴¹. Unsere Ergebnisse unterstützen die Ergebnisse von Borsi et al. mit nur einer mäßigen Erniedrigung der Tumorakkumulation des Antikörpers nach 24 Stunden³¹. Dies weist auf eine hohe in vivo Stabilität des Antikörpers hin.

Nach der antiangiogenen Sunitinibtherapie zeigte sich eine erhöhte Bindung des Antikörpers an die therapieresistenten Tumorgefäße. Ein verbesserter Transport durch bessere Mikrohämodynamik nach antiangiogener Therapie könnte verantwortlich für diese Beobachtung sein^{21,40}. Eine mögliche molekulare Expressionsänderung durch die antiangiogene Therapie bleibt offen als zusätzliche potentielle Erklärung. In dieser Hinsicht ist es allerdings wichtig zu betonen, dass der L19 Antikörper sich auch nach einer antiangiogenen Therapie für diagnostische und therapeutische Maßnahmen als geeignet zeigt.

Fazit

Unsere Arbeiten zeigen, dass VACs nicht an der Vermittlung vaskulärer Resistenzmechanismen beteiligt sind, sondern durch Sunitinib reduziert werden und somit ein therapeutisches Ziel darstellen. Die Kombination einer antiangiogenen Therapie mit TMZ führt zu leicht additiven antitumoralen Effekten. Allerdings wird eine ausgeprägte vaskuläre Resistenz durch die

Kombination induziert. Nicht zuletzt stellt der L19 Antikörper ein vielversprechendes Werkzeug dar, um gezielt das vaskuläre System von GBM anzusteuern. Insbesondere für resistente Tumorgefäße wird eine erhöhte Biodistribution des L19 Antikörpers beschrieben, so dass hier eine potentielle „Rescue-Strategie“ zur Behandlung des therapieresistenten GBM bestehen könnte.

5 Literaturverzeichnis

1. Ohgaki H. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol* 2009;472:323-42.
2. Feiden S, Feiden W. [WHO classification of tumours of the CNS: revised edition of 2007 with critical comments on the typing und grading of common-type diffuse gliomas]. *Pathologie* 2008;29:411-21.
3. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987-96.
4. Brem S, Cotran R, Folkman J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst* 1972;48:347-56.
5. Giese A, Westphal M. Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* 1996;39:235-50; discussion 50-52.
6. Plate KH, Risau W. Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia* 1995;15:339-47.
7. Vajkoczy P, Menger MD, Goldbrunner R, Ge S, Fong TA, Vollmar B, Schilling L, Ullrich A, Hirth KP, Tonn JC, Schmiedek P, Rempel SA. Targeting angiogenesis inhibits tumor infiltration and expression of the pro-invasive protein SPARC. *Int J Cancer* 2000;87:261-8.
8. Vajkoczy P, Menger MD, Vollmar B, Schilling L, Schmiedek P, Hirth KP, Ullrich A, Fong TA. Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy. *Neoplasia* 1999;1:31-41.
9. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298-307.
10. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
11. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine* 1971;285:1182-6.
12. Claesson-Welsh L. Blood vessels as targets in tumor therapy. *Ups J Med Sci* 2012;117:178-86.
13. Faivre S, Demetri G, Sargent W, Raymond E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nature reviews Drug discovery* 2007;6:734-45.
14. Neyns B, Sadones J, Chaskis C, Dujardin M, Everaert H, Lv S, Duerinck J, Tynninen O, Nupponen N, Michotte A, De Greve J. Phase II study of sunitinib malate in patients with recurrent high-grade glioma. *J Neurooncol* 2011;103:491-501.
15. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:592-603.
16. Piao Y, Liang J, Holmes L, Zurita AJ, Henry V, Heymach JV, de Groot JF. Glioblastoma resistance to anti-VEGF therapy is associated with myeloid cell infiltration, stem cell accumulation, and a mesenchymal phenotype. *Neuro Oncol* 2012;14:1379-92.
17. Loges S, Schmidt T, Carmeliet P. Mechanisms of resistance to anti-angiogenic therapy and development of third-generation anti-angiogenic drug candidates. *Genes & cancer* 2010;1:12-25.
18. Shojaei F, Wu X, Malik AK, Zhong C, Baldwin ME, Schanz S, Fuh G, Gerber HP, Ferrara N. Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nature biotechnology* 2007;25:911-20.
19. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124:175-89.

20. Zhou Q, Guo P, Gallo JM. Impact of angiogenesis inhibition by sunitinib on tumor distribution of temozolomide. *Clin Cancer Res* 2008;14:1540-9.
21. Czabanka M, Vinci M, Heppner F, Ullrich A, Vajkoczy P. Effects of sunitinib on tumor hemodynamics and delivery of chemotherapy. *Int J Cancer* 2009;124:1293-300.
22. Alessi P, Ebbinghaus C, Neri D. Molecular targeting of angiogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 2004;1654:39-49.
23. Halin C, Zardi L, Neri D. Antibody-based targeting of angiogenesis. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 2001;16:191-4.
24. Schliemann C, Neri D. Antibody-based vascular tumor targeting. *Recent Results Cancer Res* 2010;180:201-16.
25. Rybak J-N, Trachsel E, Scheuermann J, Neri D. Ligand-based vascular targeting of disease. *ChemMedChem* 2007;2:22-40.
26. Zardi L, Carnemolla B, Siri A, Petersen TE, Paolella G, Sebastio G, Baralle FE. Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon. *EMBO J* 1987;6:2337-42.
27. Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L. The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *Int J Cancer* 1994;59:612-8.
28. Pini A, Viti F, Santucci A, Carnemolla B, Zardi L, Neri P, Neri D. Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem* 1998;273:21769-76.
29. Viti F, Tarli L, Giovannoni L, Zardi L, Neri D. Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis. *Cancer Res* 1999;59:347-52.
30. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 1994;12:433-55.
31. Borsi L, Balza E, Bestagno M, Castellani P, Carnemolla B, Biro A, Leprini A, Sepulveda J, Burrone O, Neri D, Zardi L. Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin. *Int J Cancer* 2002;102:75-85.
32. Birchler MT, Thuerl C, Schmid D, Neri D, Waibel R, Schubiger A, Stoeckli SJ, Schmid S, Goerres GW. Immunoscintigraphy of patients with head and neck carcinomas, with an anti-angiogenetic antibody fragment. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;136:543-8.
33. Danielli R, Patuzzo R, Ruffini PA, Maurichi A, Giovannoni L, Elia G, Neri D, Santinami M. Armed antibodies for cancer treatment: a promising tool in a changing era. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2015;64:113-21.
34. Sauer S, Erba PA, Petrini M, Menrad A, Giovannoni L, Grana C, Hirsch B, Zardi L, Paganelli G, Mariani G, Neri D, Dürkop H, Menssen HD. Expression of the oncofetal ED-B-containing fibronectin isoform in hematologic tumors enables ED-B-targeted ¹³¹I-L19SIP radioimmunotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *Blood* 2009;113:2265-74.
35. Hatzopoulos AK, Folkman J, Vasile E, Eiselen GK, Rosenberg RD. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* 1998;125:1457-68.
36. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 1993;143:1055-62.
37. Vajkoczy P, Schilling L, Ullrich A, Schmiedek P, Menger MD. Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multicolor fluorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:510-20.

38. Algire G. An adaptation of the transparent-chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 1943;4:1-11.
39. Parmaksiz G, Czabanka M, Vinci M, Vajkoczy P. Antiangiogenic therapy inhibits the recruitment of vascular accessory cells to the perivascular niche in glioma angiogenesis. *J Vasc Res* 2014;51:102-9.
40. Czabanka M, Bruenner J, Parmaksiz G, Broggini T, Topalovic M, Bayerl SH, Auf G, Kremenetskaia I, Nieminen M, Jabouille A, Mueller S, Harms U, Harms C, Koch A, Heppner FL, Vajkoczy P. Combined temozolomide and sunitinib treatment leads to better tumour control but increased vascular resistance in O6-methylguanine methyltransferase-methylated gliomas. *Eur J Cancer* 2013;49:2243-52.
41. Czabanka M, Parmaksiz G, Bayerl SH, Nieminen M, Trachsel E, Menssen HD, Erber R, Neri D, Vajkoczy P. Microvascular biodistribution of L19-SIP in angiogenesis targeting strategies. *Eur J Cancer* 2011;47:1276-84.
42. Yuan F, Salehi HA, Boucher Y, Vasthare US, Tuma RF, Jain RK. Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows. *Cancer Res* 1994;54:4564-8.
43. Vajkoczy P, Ullrich A, Menger MD. Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia* 2000;2:53-61.
44. Coomber BL, Stewart PA, Hayakawa EM, Farrell CL, Del Maestro RF. A quantitative assessment of microvessel ultrastructure in C6 astrocytoma spheroids transplanted to brain and to muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 1988;47:29-40.
45. Konerding MA, Malkusch W, Klapthor B, van Ackern C, Fait E, Hill SA, Parkins C, Chaplin DJ, Presta M, Denekamp J. Evidence for characteristic vascular patterns in solid tumours: quantitative studies using corrosion casts. *Br J Cancer* 1999;80:724-32.
46. Roskoski R. Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;356:323-8.
47. Becker KP, Yu J. Status quo--standard-of-care medical and radiation therapy for glioblastoma. *Cancer journal* 2012;18:12-9.
48. Dentelli P, Rosso A, Balsamo A, Colmenares Benedetto S, Zeoli A, Pegoraro M, Camussi G, Pegoraro L, Brizzi MF. C-KIT, by interacting with the membrane-bound ligand, recruits endothelial progenitor cells to inflamed endothelium. *Blood* 2007;109:4264-71.
49. Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J* 2006;20:1495-7.
50. Zhou Q, Gallo JM. Differential effect of sunitinib on the distribution of temozolomide in an orthotopic glioma model. *Neuro-oncology* 2009;11:301-10.
51. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005;307:58-62.
52. Roos WP, Batista LF, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CF, Kaina B. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene* 2007;26:186-97.
53. Sur P, Sribnick EA, Patel SJ, Ray SK, Banik NL. Dexamethasone decreases temozolomide-induced apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Glia* 2005;50:160-7.
54. Yang F, Jove V, Xin H, Hedvat M, Van Meter TE, Yu H. Sunitinib induces apoptosis and growth arrest of medulloblastoma tumor cells by inhibiting STAT3 and AKT signaling pathways. *Molecular cancer research : MCR* 2010;8:35-45.
55. El-Emir E, Dearling JL, Huhlov A, Robson MP, Boxer G, Neri D, van Dongen GA, Trachsel E, Begent RH, Pedley RB. Characterisation and radioimmunotherapy of L19-SIP, an anti-angiogenic antibody against the extra domain B of fibronectin, in colorectal tumour models. *Br J Cancer* 2007;96:1862-70.

56. Jain RK. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res* 1990;50:814s-9s.
57. Fabbrini M, Trachsel E, Soldani P, Bindi S, Alessi P, Bracci L, Kosmehl H, Zardi L, Neri D, Neri P. Selective occlusion of tumor blood vessels by targeted delivery of an antibody-photosensitizer conjugate. *Int J Cancer* 2006;118:1805-13.

6 Abkürzungsverzeichnis

CD31	cluster of differentiation 31
c-KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor
Cy	Cyanin
D	Durchmesser
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DiI	1,1'-diocetadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ED-B	Extradomäne B
FGF	fibroblast growth factor
FITC	fluoreszierendes Isothiocyanat
Flk-1	fetal liver kinase-1
FVD	funktionelle Gefäßdichte
GBM	Glioblastoma multiforme
IVM	Intravitalmikroskopie
KG	Körpergewicht
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
NaCl	Natriumchlorid
P	Permeabilität
PDGF	platelet-derived growth factor
PI	Perfusionsindex
PIGF	placental growth factor
Q	Blutfluss
Sca-1	stem cells antigen-1
SIP	small immunoprotein
SU	Sunitinib
Tie-2	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2
TMZ	Temozolomid
TVD	totale Gefäßdichte
VAC	vascular accessory cells
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
WSR	Wandscherrate
WSS	Wandschubspannung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Güliz Acker, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Intravitalmikroskopische Analyse verschiedener vaskulärer Targetingstrategien in der Behandlung des Glioblastoma multiforme“** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Güliz Acker hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Parmaksiz G, Czabanka M, Vinci M, Vajkoczy P. Antiangiogenic therapy inhibits the recruitment of vascular accessory cells to the perivascular niche in glioma angiogenesis, *Journal of Vascular Research*, 2014 (Impact Faktor: 2,443)

Beitrag im Einzelnen: *Erarbeitung der Hypothese, Durchführung der immunohistochemischen Färbungen und deren Auswertung, Interpretation der Daten, Erstellung des Manuskripts inklusive der Abbildungen, Zusammenführen und Einarbeitung der Beiträge der Koautoren in das Manuskript, Einreichen des Manuskripts (online) mit entsprechender Überarbeitung nach Begutachtung im peer review System, in diesem Zusammenhang kritische Auseinandersetzung mit den Kommentaren der Gutachter und Koautoren.*

Publikation 2: Czabanka M, Bruenner J, **Parmaksiz G**, Broggin T, Topalovic M, Bayerl SH, Auf G, Kremenetskaia I, Nieminen M, Jabouille A, Mueller S, Harms U, Harms C, Koch A, Heppner FL, Vajkoczy P, Combined temozolomide and sunitinib treatment leads to better tumour control but increased vascular resistance in O6-methylguanine methyltransferase-methylated gliomas, *European Journal of Cancer*, 2013 (Impact Faktor: 4,819)

Beitrag im Einzelnen: *Durchführung der in vivo Experimente mit der Rückenhautkammer (inklusive der Zellaufbereitung, Operation und Intravitalmikroskopie), Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen, Interpretation der intravitalmikroskopischen Daten, Einreichen des Manuskripts (online), Teilhabe an der Überarbeitung des Manuskripts nach Begutachtung im peer review System.*

Publikation 3: Czabanka M, **Parmaksiz G**, Bayerl SH, Nieminen M, Trachsel E, Menssen HD, Erber R, Neri D, Vajkoczy P. Microvascular biodistribution of L19-SIP in angiogenesis targeting strategies, *European Journal of Cancer*, 2011 (Impact Faktor: 4,819)

Beitrag im Einzelnen: *Erarbeitung der Fragestellung, Durchführung der in vivo Experimente, Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen, Durchführung der immunohistochemischen Färbungen und deren Auswertung, Interpretation der Daten, Erstellung des Manuskripts insbesondere der Diagramme und Bilder, Teilhabe an der Überarbeitung des Manuskripts nach Begutachtung im peer review System.*

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Publikation 1

Parmaksiz G, Czabanka M, Vinci M, Vajkoczy P. Antiangiogenic therapy inhibits the recruitment of vascular accessory cells to the perivascular niche in glioma angiogenesis. *J Vasc Res* 2014;51:102-9.

**Seiten
26-33**

DOI: 10.1159/000357620

URL: <http://dx.doi.org/10.1159/000357620>

<https://www.karger.com/Article/Pdf/357620>

Publikation 2

Czabanka M, Bruenner J, Parmaksiz G, Broggin T, Topalovic M, Bayerl SH, Auf G, Kremenetskaia I, Nieminen M, Jabouille A, Mueller S, Harms U, Harms C, Koch A, Heppner FL, Vajkoczy P. Combined temozolomide and sunitinib treatment leads to better tumour control but increased vascular resistance in O6-methylguanine methyltransferase-methylated gliomas. Eur J Cancer 2013;49:2243-52.

Seiten
35-44

DOI: 10.1016/j.ejca.2013.02.019

URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2013.02.019>

[http://www.ejcancer.com/article/S0959-8049\(13\)00149-4/pdf](http://www.ejcancer.com/article/S0959-8049(13)00149-4/pdf)

Publikation 3

Czabanka M, Parmaksiz G, Bayerl SH, Nieminen M, Trachsel E, Menssen HD, Erber R, Neri D, Vajkoczy P. Microvascular biodistribution of L19-SIP in angiogenesis targeting strategies. Eur J Cancer 2011;47:1276-84.

**Seiten
46-54**

DOI: 10.1016/j.ejca.2011.02.001

URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2011.02.001>

[http://www.ejcancer.com/article/S0959-8049\(11\)00084-0/pdf](http://www.ejcancer.com/article/S0959-8049(11)00084-0/pdf)

Lebenslauf

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

Komplette Publikationsliste

Originalarbeiten

Van Kampen A, Parmaksiz G, van de Vijver R, Höhle B. Metrical and Statistical Cues for Word Segmentation: The Use of Vowel Harmony and Word Stress as Cues to Word Boundaries by 6- and 9-Month-old Turkish Learners. *Language Acquisition and Development: "Proceedings of GALA 2007"* 2008; 313-324

Czabanka M, Parmaksiz G, Bayerl SH, Nieminen M, Trachsel E, Menssen HD, Erber R, Neri D, Vajkoczy P. Microvascular biodistribution of L19-SIP in angiogenesis targeting strategies. *Eur J Cancer* 2011; 47:1276–1284

Czabanka M, Bruenner J, Parmaksiz G, Broggin T, Topalovic M, Bayerl SH, Auf G, Kremenetskaia I, Nieminen M, Jabouille A, Mueller S, Harms U, Harms C, Koch A, Heppner FL, Vajkoczy P. Combined temozolomide and sunitinib treatment leads to better tumour control but increased vascular resistance in O6-methylguanine methyltransferase-methylated gliomas. *Eur J Cancer* 2013; 49:2243–2252

Parmaksiz G., Czabanka M., Vinci M. and Vajkoczy, P. Antiangiogenic therapy inhibits the recruitment of vascular accessory cells to the perivascular niche in glioma angiogenesis. *J Vasc Res* 2014; 51:102–109

Czabanka M, Acker G, Jussen D, Finger T, Pena-Tapia P, Schubert GA, Scharf J, Martus P, Schmiedek P, Vajkoczy P. Collateralization and ischemia in hemodynamic cerebrovascular insufficiency. *Acta Neurochir* 2014; 156:2051-8

Acker G, Goerdes S, Schneider UC, Schmiedek P, Czabanka M, Vajkoczy P. Distinct clinical and radiographic characteristics of moyamoya disease amongst European Caucasians. *Eur J Neurol* 2015; 22:1012-7

Wissenschaftliche Vorträge/Postervorstellungen

Parmaksiz G, Czabanka M, Neri D, Vajkoczy P. In vivo biodistribution and microvascular binding of a high-affinity monoclonal antibody fragment F8-SIP against the extra-domain A of fibronectin. Posterbeitrag: *Brain Tumor 2008*, Berlin

Parmaksiz G, Czabanka M, Neri D, Vajkoczy P. In vivo biodistribution and microvascular binding of a high-affinity monoclonal antibody fragment F8-SIP against the extra-domain A of fibronectin. Poster und Vortrag: *4th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology- 2nd Targeted Tumor Therapies*, 2009, Berlin

Parmaksiz G, Czabanka M, Neri D, Vajkoczy P. In vivo biodistribution and microvascular binding of a high-affinity monoclonal antibody fragment F8-SIP against the extra-domain A of fibronectin. Poster: *60th Jahrestagung der DGNC*, 2009, Münster

Parmaksiz G, Czabanka M, Palumbo A, Neri D, Vajkoczy P. In vivo characterization of vascular targeting strategies using F8-SIP antibody against the extradomain A of fibronectin. Poster: *7th International Symposium on the Biology of Endothelial Cells*, 2009, Wien

Parmaksiz G, Czabanka M, Palumbo A, Neri D, Vajkoczy P. In vivo characterization of vascular targeting strategies using F8-SIP antibody against the ED A of fibronectin. Vortrag: 20th International European Students' Conference, 2010, Berlin

Parmaksiz G, Czabanka M, Menssen D, Neri D, Vajkoczy P. Microvascular biodistribution of L19-SIP in angiogenesis targeting strategies. Vortrag: Jahrestagung, Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V., 2010, Berlin

Parmaksiz G, Steffen IG, Apostolova R, Michel R, Schulze O, Rosner C, Hofheinz F, Prasad V, Brenner W, Vajkoczy P, Buchert R. Zerebrovaskulären Reservekapazität O-15 H₂O-PET versus Tc-99m-ECD SPECT. Vortrag: Jahrestagung der Sektion „Intrakranieller Druck, Hirndurchblutung und Hydrocephalus“ der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, 2013, Berlin

Parmaksiz G, Woitzik J, Schneider U, Grozdanovic Z, Vajkoczy P. Cervical disc herniation as a trigger for cervical cord ischemia. Poster: Jahrestagung der Sektion Wirbelsäule der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, 2013, Frankfurt

Parmaksiz G, Goerdes S, Schneider UC, Schmiedek P, Czabanka M, Vajkoczy P. Distinct clinical and radiographic characteristics of moyamoya disease amongst European Caucasians. New insights to Moyamoya Angiopathy in Europe –A series of 216 Caucasians in Europe. Vortrag: 65th Jahrestagung der DGNC, 2014, Dresden

Parmaksiz G, Steffen IG, Apostolova R, Michel R, Schulze O, Rosner C, Hofheinz F, Prasad V, Brenner W, Vajkoczy P, Buchert R. Cerebrovascularreservecapacity in Moyamoya Disease and atherosclerotic cerebrovascular disease: O-15-water PET versus SPECT. Vortrag: 65th Jahrestagung der DGNC, 2014, Dresden

Danksagung

Nach Abschluss meiner Doktorarbeit gilt mein besonderer Dank:

Herrn Prof. Dr. med. Peter Vajkoczy, Direktor der Neurochirurgischen Klinik der Charité Universitätsmedizin Berlin, für die Möglichkeit in seiner Klinik meine Dissertation erstellen zu dürfen sowie für die sorgfältige wissenschaftliche Aufsicht. Nicht zuletzt für die Möglichkeit meine wissenschaftliche Karriere in seiner Klinik fortsetzen zu dürfen.

Meinem Doktorvater, PD Dr.med. Marcus Czabanka, der mich fachkompetent und geduldig geleitet hat und mir durch gedankliche Anstöße und konstruktive Kritik bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente zur Seite stand.

Den Mitdoktoranden sowie den Mitarbeitern der Experimentellen Neurochirurgischen Forschung, insbesondere Frau Irina Kremenetskaia, Frau Melina Nieminen-Kelhä und Frau Sabine Seidlitz für ihre kontinuierliche fachliche und freundschaftliche Unterstützung und das stets angenehme Arbeitsklima.

Meiner großartigen Mutter und Großmutter, für die Möglichkeit im Ausland studieren und meine Träume verwirklichen zu können sowie für deren unendlicher Geduld und Rückhalt während dieser Arbeit.

Meinem Mann Valentin Acker, der mich während der gesamten Zeit dieser Arbeit immer hilfreich begleitet hat, sowie meinen Schwiegereltern, welche mich beim Verfassen dieser Arbeit ermutigt und unterstützt haben.