

Aus dem Institut für Experimentelle Neurochirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle des CXCR2/CXCL2 Signalwegs in der Resistenzentwicklung und Angiogenese im humanen Glioblastom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ruth Maria Urbantat
aus Herdecke

Datum der Promotion: 25. November 2022

Vorwort

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab in einem Fachjournal publiziert.

Publikation 1: R.M. Urbantat*, A. Blank*, I. Kremenetskaia, P. Vajkoczy, G.Acker† und S. Brandenburg†. **The CXCL2/IL8/CXCR2 pathway is relevant for brain tumor malignancy and endothelial cell function.** *International Journal of Molecular Sciences*, März 2021, doi: 10.3390/ijms22052634;

Publikation 2: R.M. Urbantat*, C. Jelgersma*, S. Brandenburg, M. Nieminen-Kelhä, I. Kremenetskaia, J. Zollfrank, S. Mueller, K. Rubarth, A. Koch, P. Vajkoczy und G. Acker. **Tumor-Associated Microglia/Macrophages as a Predictor for Survival in Glioblastoma and Temozolomide-Induced Changes in CXCR2 Signaling with New Resistance Overcoming Strategy by Combination Therapy.** *International Journal of Molecular Sciences*, Oktober 2021, doi: 10.3390/ijms222011180;

Publikation 3: R.M. Urbantat, C. Jelgersma, P. Vajkoczy, S. Brandenburg†, und G. Acker†. **Combining TMZ and SB225002 induces changes of CXCR2 and VEGFR signalling in primary human endothelial cells in vitro.** *Oncology Reports*, Juli 2022, doi: 10.3892/or.2022.8373;

* / † Diese Autoren haben gleichermaßen beigetragen;

Zudem wurden Teilergebnisse zur 70. Und 73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), 2019 in Würzburg und 2022 in Köln sowie auf dem 10. Brain Tumor Meeting 2019 in Berlin als Posterbeitrag vorgestellt.

Poster 1: R.M. Urbantat, G. Acker, S. Brandenburg, A. Koch, P. Vajkoczy. **The CXCR2/CXCL2 signaling pathway in the development of resistance in matched GBM patients.** 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), Mai 2019 in Würzburg. doi: 10.3205/19dgnc387

Poster 2: R.M. Urbantat, G. Acker, S. Brandenburg, A. Koch, P. Vajkoczy. **Impact of temozolomide on the CXCR2 signaling pathway in matched primary and recurrent GBM tumors.** 10th Brain Tumor Meeting, Mai 2019, Berlin

Poster 3: : R.M. Urbantat, C. Jelgersma, P. Vajkoczy, S. Brandenburg und G. Acker
Combining TMZ and SB225002 induces changes of CXCR2 and VEGFR signalling in primary human endothelial cells in vitro

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Abbildungsverzeichnis | 8 |
| 2. | Tabellenverzeichnis | 9 |
| 3. | Zusammenfassung/Abstract | 10 |
| 3.1. | Zusammenfassung..... | 10 |
| 3.2. | Abstract..... | 11 |
| 4. | Einleitung..... | 13 |
| 4.1. | Das Glioblastom..... | 13 |
| 4.1.1. | Klinik und Diagnostik | 14 |
| 4.1.2. | Therapie des Glioblastoms..... | 14 |
| 4.1.3. | Limitationen der Standardtherapie | 15 |
| 4.2. | Makrophagen und Mikroglia | 15 |
| 4.3. | Die Rolle von Tumor assoziierten Mikroglia und Makrophagen im GBM..... | 17 |
| 4.4. | Der CXCR2 Signalweg und dessen Relevanz im Glioblastom..... | 19 |
| 4.5. | Der CXCR2-Antagonist SB225002..... | 21 |
| 4.6. | Primäre Humane Endothelzellen | 21 |
| 4.7. | Zielsetzung und Fragestellung..... | 22 |
| 5. | Material und Methoden | 24 |
| 5.1. | Überblick der verwendeten Methoden | 24 |
| 5.2. | Material und verwendete Programme..... | 24 |
| 5.2.1. | Geräte/Hersteller | 24 |
| 5.2.2. | Chemikalien/Puffer/Lösungen | 26 |
| 5.2.3. | Zellkulturmedien/Zusätze | 27 |
| 5.2.4. | Programme | 27 |
| 5.3. | Patientenproben: Ethikantrag | 28 |
| 5.3.1. | Auswahl der Patientenproben | 28 |
| 5.3.2. | Analyse klinischer Parameter der Routinediagnostik | 29 |
| 5.4. | Proteinbiochemie..... | 29 |
| 5.4.1. | Histologische Aufarbeitung..... | 29 |
| 5.4.2. | Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung..... | 29 |

| | | |
|--------|---|----|
| 5.4.3. | Immunfluoreszenzfärbungen | 30 |
| 5.5. | Zellkultur | 32 |
| 5.5.1. | Auftauen | 32 |
| 5.5.2. | Kultivierung von HUVEC-Zellen | 33 |
| 5.5.3. | Kultivierung von HBMEC-Zellen | 34 |
| 5.5.4. | Proliferationsassay | 34 |
| 5.5.5. | Stimulationsassay | 35 |
| 5.5.6. | Transwell Migrationsassay | 37 |
| 5.5.7. | μ -Slide Chemotaxis | 38 |
| 5.5.8. | 3D Sphäroid-basierte Angiogenese..... | 42 |
| 5.6. | Molekularbiologische Methoden | 45 |
| 5.6.1. | RNA-Isolierung | 45 |
| 5.6.2. | RNA-Konzentrationsbestimmung | 45 |
| 5.6.3. | Reverse Transkription..... | 45 |
| 5.6.4. | Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) | 46 |
| 5.7. | Mikroskopiemethoden | 48 |
| 5.7.1. | Immunfluoreszenzmikroskopie | 48 |
| 5.7.2. | Konfokalmikroskopie..... | 49 |
| 5.7.3. | Live-Cell-Mikroskopie | 50 |
| 5.8. | Datenanalyse | 51 |
| 5.8.1. | Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie..... | 51 |
| 5.8.2. | Auswertung der 3D-Sphäroid-basierten Angiogenese | 51 |
| 5.8.3. | Auswertung der μ -Slide-Chemotaxis | 51 |
| 5.8.4. | Statistische Auswertung | 52 |
| 5.8.5. | Korrelationsanalysen und Lineare Regression..... | 52 |
| 5.8.6. | Cox-Regressionsanalyse..... | 52 |
| 6. | Ergebnisse | 54 |
| 6.1. | Der CXCR2-Signalweg <i>ex vivo</i> - Analyse von gematchten Primär- und Rezidivtumoren | 54 |
| 6.1.1. | Analyse klinischer Patientendaten sowie der diagnostischen Merkmale | 54 |
| 6.1.2. | Zeit bis zum Rezidiv und Gesamtüberleben der Patientenkohorte | 59 |
| 6.1.3. | Vergleich der Infiltration von TAMs in Primär – und Rezidivglioblastomen..... | 61 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 6.1.4. | Analyse proangiogener Moleküle in Primär – und Rezidivglioblastomen | 63 |
| 6.1.5. | Die Vaskularisierung in Primär – und Rezidivglioblastomen | 67 |
| 6.1.6. | Korrelationsanalyse des OS aller Patienten und Patientinnen hinsichtlich der Einteilung nach Therapieregime in Standard- und Nicht-Standard nach Pearson | 69 |
| 6.1.7. | Eine hohe Infiltration von TAMs korreliert negativ mit dem Gesamtüberleben | 71 |
| 6.2. | Der CXCR2-Signalweg an HUVEC und HBMEC <i>in vitro</i> | 73 |
| 6.2.1. | Der Einfluss des CXCR2-Signalwegs auf die Proliferation von primären humanen Endothelzellen | 73 |
| 6.2.2. | Stimulation von HUVEC und HBMEC und der Einfluss auf die Genexpression | 74 |
| 6.2.3. | Der Einfluss des CXCR2-Signalwegs auf die Migration von primären humanen Endothelzellen | 79 |
| 6.2.4. | μ -Slide Chemotaxis | 80 |
| 6.2.5. | 3D Sphäroid-basierte Angiogenese..... | 84 |
| 7. | Diskussion | 90 |
| 7.1. | Zusammenfassung der Hauptergebnisse dieser Arbeit | 90 |
| 7.2. | Vergleich der Patientenmerkmale mit der Literatur – kritische Betrachtung der untersuchten Kohorte | 90 |
| 7.3. | Die Relevanz der Mikroglia/Makrophagen-Infiltration im Primär- und Rezidivtumor | 94 |
| 7.4. | Die Vaskularisierung vor und nach TMZ-Therapie..... | 95 |
| 7.5. | Die Relevanz des CXCL2/CXCR2 Signalwegs und der Einfluss auf das Überleben der Patienten und Patientinnen | 96 |
| 7.6. | Kritische Betrachtung des gewählten <i>in vitro</i> Modells | 98 |
| 7.7. | Der Effekt der alternativen proangiogenen Moleküle auf die Proliferation, Chemotaxis, Angiogenese und Genexpression von humanen Endothelzellen..... | 99 |
| 7.8. | Der CXCR2-Antagonist SB225002 reduziert die Chemokinese, Angiogenese und verändert die Genexpression der Endothelzellen | 101 |
| 7.9. | Erste <i>in vitro</i> Versuche der Kombinationstherapie | 102 |
| 7.10. | Zukünftige Therapieansätze als „Targeted Therapies“ | 102 |
| 8. | Literaturverzeichnis..... | 104 |
| 9. | Abkürzungsverzeichnis..... | 118 |
| | Eidesstattliche Versicherung | 120 |
| | Anteilsklärung..... | 121 |

| | |
|------------------------|-----|
| Lebenslauf..... | 124 |
| Publikationsliste..... | 126 |
| Danksagung | 128 |

1. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Unterschiedliche Morphologie und Funktionen von Mikroglia..... | 17 |
| Abbildung 2: TAM Subpopulationen in Glioblastompatienten und -patientinnen..... | 18 |
| Abbildung 3: Die Rolle des CXCR2 Signalweges in der Tumormikroumgebung..... | 20 |
| Abbildung 4: Übersicht der verwendeten Methoden..... | 24 |
| Abbildung 5: Identifizierung und Einschluss der Patienten in die Studie..... | 29 |
| Abbildung 6: Ablauf des Stimulationsassays (HUVEC und HBMEC)..... | 36 |
| Abbildung 7: Ablauf der μ -Slide-Chemotaxis..... | 38 |
| Abbildung 8: μ -Slide Chemotaxis - Etablierung der Kontrolle mit 0.1% FCS..... | 42 |
| Abbildung 9: Schematische Darstellung des 3D-Sphäroid-basierten Angiogeneseassays..... | 43 |
| Abbildung 10: Prinzip der Konfokalen Mikroskopie..... | 49 |
| Abbildung 11: Eine MGMT-Promotorhypermethylierung korreliert mit einem längeren PFS und OS. . | 58 |
| Abbildung 12: Das progressionsfreie und Gesamtüberleben der Patientenkohorte nach Therapieregime und Expression verschiedener Merkmale..... | 61 |
| Abbildung 13: Höhere Infiltration von TAMs im primären Glioblastom..... | 62 |
| Abbildung 14: Kein Unterschied in der VEGF Expression im pGBM und rGBM. (a)..... | 64 |
| Abbildung 15: Die Expression von CXCL2 in Rezidivtumoren ist bei Patienten und Patientinnen, die weniger TMZ erhielten geringer und IL8 ist im Rezidivtumor hochreguliert..... | 65 |
| Abbildung 16: Die Vaskularisierung im pGBM und rGBM im Vergleich..... | 69 |
| Abbildung 17: Korrelationsanalysen in Bezug auf das Gesamtüberleben der Patienten..... | 70 |
| Abbildung 18: Proliferation von HUVEC und HBMEC unter Einfluss von proangiogenen Molekülen. . | 73 |
| Abbildung 19: Genexpression von HUVEC und HBMECs nach Stimulation mit proangiogenen Molekülen..... | 74 |
| Abbildung 20: Genexpression von HUVEC zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation mit proangiogenen Molekülen..... | 75 |
| Abbildung 21: Genexpression von HUVEC nach Behandlung mit TMZ und SB..... | 76 |
| Abbildung 22: Die Expression von CXCR2 und VEGFR2 von HUVEC nach Behandlung mit der Kombinationstherapie..... | 79 |
| Abbildung 23: Migrationsverhalten von HUVEC und HBMEC..... | 80 |
| Abbildung 24: VEGF, CXCL2 und IL8 haben keinen chemotaktischen Effekt auf HUVEC..... | 81 |
| Abbildung 25: SB225002 reduziert die Migrationsgeschwindigkeit und die zurückgelegte Distanz von HUVEC..... | 84 |
| Abbildung 26: Etablierung der HUVEC- und HBMEC-Sphäroide..... | 85 |
| Abbildung 27: 3D-Angiogenese von HUVEC und HBMEC unter Einfluss von CXCL2 und IL8..... | 86 |
| Abbildung 28: 3D-Angiogenese unter Behandlung mit dem CXCR2-Antagonisten..... | 88 |

2. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten Geräte | 24 |
| Tabelle 2: Zusammenfassung der verwendeten Puffer und Lösungen..... | 26 |
| Tabelle 3: Zellkulturmedien..... | 27 |
| Tabelle 4: Zusammenfassung verwendeter Programme..... | 27 |
| Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper für die Immunzytochemie..... | 31 |
| Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunzytochemie..... | 32 |
| Tabelle 7: Übersicht aller Konditionen der <i>in vitro</i> Stimulation mit Proteinen..... | 35 |
| Tabelle 8: Übersicht aller Konditionen der <i>in vitro</i> Stimulation mit TMZ/SB225002 | 36 |
| Tabelle 9: μ -Slide-Chemotaxis – Etablierung verschiedener Konditionen | 39 |
| Tabelle 10: μ -Slide Chemotaxis – Etablierung der Kontrolle..... | 40 |
| Tabelle 11: 3D-Sphäroid basierte Angiogenese – Konditionen Schritt 1 | 44 |
| Tabelle 12: 3D-Sphäroid basierte Angiogenese – Konditionen Schritt 2 | 44 |
| Tabelle 13: Schritt 1 - gDNA Eliminierung | 46 |
| Tabelle 14: Schritt 2 – Reverse Transkription..... | 46 |
| Tabelle 15: Zusammensetzung des bei der qPCR verwendeten Mastermixes | 47 |
| Tabelle 16: qPCR-Primersequenzen | 48 |
| Tabelle 17: Überblick der Patientencharakteristika | 55 |
| Tabelle 18: Individuelle klinische Patientencharakteristika | 56 |
| Tabelle 19: IL8 Expression in Primären- und Rezidivtumoren | 66 |
| Tabelle 20: Cox-Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens..... | 71 |
| Tabelle 21: Cox-Regressionsanalyse des PFS | 72 |
| Tabelle 22: Cox-Regressionsanalyse des Überlebens nach Rezidiv..... | 72 |

3. Zusammenfassung/Abstract

3.1. Zusammenfassung

Einleitung: Die Prognose für Patienten und Patientinnen mit Glioblastom (GBM), dem häufigsten malignen Hirntumor des Menschen, ist nach wie vor fatal und die Resistenzentwicklung gegen die Standardtherapie ist eine große Herausforderung. Auch neuere Therapieansätze, die in den VEGFR-Signalweg eingreifen, führen nicht zu einem verlängerten Gesamtüberleben. Die VEGF-alternativen proangiogenen Moleküle CXCL2 und IL8 sowie ihr Rezeptor CXCR2 sind im GBM überexprimiert. Die CXCL2 und IL8-Expression wird durch Temozolomid (TMZ) beeinflusst und trägt möglicherweise zur Resistenzentwicklung bei. Vor diesem Hintergrund bietet sich dieser Signalweg als mögliches neues Therapieziel an. Unser Ziel war in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des CXCR2 Signalwegs auf die Angiogenese und die Resistenzentwicklung im GBM näher zu untersuchen.

Methoden: Insgesamt 76 Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete (FFPE) Proben (38 Tumorpaare) von primären und rezidierten Glioblastomen wurden retrospektiv rekrutiert. Basierend auf dem Therapieregime erfolgte die Einteilung in zwei Gruppen: Standard (≥ 4 Zyklen TMZ) und Nicht-Standard (≤ 3 Zyklen TMZ). Die FFPE-Schnitte wurden hinsichtlich TAMs, Blutgefäßen und proangiogenen Molekülen immunhistochemisch untersucht. Der Einfluss der Parameter auf das Überleben wurde mittels Kaplan-Meier-Kurve mit Log-Rank-Test, Pearson-Korrelation und der Cox-Regressionsanalyse untersucht. Der Effekt von CXCL2 und IL8 auf die Proliferation, Migration, Chemotaxis, Angiogenese, Gen- und Proteinexpression wurde an primären humanen Endothelzellen aus der Peripherie (HUVEC) und dem Gehirn (HBMEC) analysiert. Ebenso wurde der Effekt des CXCR2 Antagonisten SB225002 allein und in Kombination mit TMZ auf diese Zellen *in vitro* untersucht.

Ergebnisse: Die Standard-Gruppe zeigte ein längeres progressionsfreies Überleben. Die Primärtumore zeichneten sich durch eine hohe Infiltration von TAMs aus, die mit einem früheren Rezidiv korrelierte. Weitere Analysen zeigten einen möglichen Zusammenhang zwischen der TAM-Infiltration mit einem reduziertem Gesamtüberleben. VEGF sowie vaskuläre Parameter waren in der Patientenkohorte innerhalb der Gruppen sowie im Primär- und Rezidivtumor unverändert. Alle Patienten und Patientinnen exprimierten CXCL2, wohingegen IL8 im Primärtumor von 43% und im Rezidivtumor von 67,6% exprimiert wurden. Demgegenüber war CXCL2 in den Rezidiven der Nicht-Standard-Gruppe reduziert. CXCL2 und IL8 steigerten die Chemokinese und Angiogenese von primären humanen Endothelzellen *in vitro*. Diese Effekte wurden durch die Behandlung mit SB225002 inhibiert. SB225002 allein und in Kombination mit TMZ führte zudem zu einer veränderten Genexpression von pro- und antiapoptischen Genen sowie CXCR2, CXCL2 und IL8.

Schlussfolgerung: Die Infiltration von TAMs korreliert mit einem früheren Rezidiv, was die Hypothese eines tumorfördernden Phänotyps dieser Zellen im GBM unterstützt. CXCL2 und IL8 fördern die Angiogenese und Chemokinese. Da Patienten und Patientinnen mit CXCL2/IL8-Überexpression von einer Anti-CXCR2-Therapie profitieren könnten, sollten kombinierte Ansätze mit SB225002 in präklinischen *in-vivo*-Studien weiterführend untersucht werden.

3.2. Abstract

Objective: Glioblastoma (GBM) prognosis is dismal, while GBM is the most common malignant brain tumour and development of resistance to the standard of care therapy remains a challenge. New therapeutic approaches targeting VEGFR signalling do not prolong overall survival. The VEGF-alternative proangiogenic molecules CXCL2 and IL8 and their receptor CXCR2 are upregulated in GBM. CXCL2 expression is altered by temozolomide (TMZ) and may contribute to the development of resistance. With that in mind, this signalling pathway could be a potential new therapeutic target. Therefore, the aim of this study was, to investigate the influence of CXCR2 signalling on angiogenesis and the development of resistance in GBM.

Methods: A total of 76 formalin-fixed paraffin-embedded samples (38 matched pairs) of primary and recurrent GBMs were obtained. Based on the therapeutic regime, they were divided into two groups: standard (≥ 4 cycles TMZ) and not-standard (≤ 3 cycles TMZ). FFPE sections were stained for TAMs, blood vessels and proangiogenic molecules. Their influence on patient survival was investigated using Kaplan-Meier survival curves with log-rank-test, Pearson correlation and Cox-regression analysis. The effect of CXCL2 and IL8 on the proliferation, migration, chemotaxis, angiogenesis, gene and protein expression, was analysed in primary human endothelial cells from the periphery (HUVEC) and the brain (HBMEC). Subsequently, the efficacy of SB225002, a CXCR2 antagonist, with and without TMZ was investigated *in vitro*.

Results: The standard group had a prolonged progression free survival. Primary tumours were highly infiltrated by TAMs, which correlated with early recurrence. Additional analyses revealed a connection between TAM infiltration and a reduced overall survival. VEGF and vascular parameters were unchanged in both groups and within primary and recurrent tumours. All patients expressed CXCL2, whereas IL8 was expressed by 43% in primary tumours and by 67.6% in recurrent tumours. In contrast, CXCL2 was reduced in recurrent tumours of the not-standard group. CXCL2 and IL8 increased chemokinesis and angiogenesis of endothelial cells *in vitro* which was successfully inhibited by treatment with SB225002. Furthermore, SB225002 alone and combined with TMZ led to an altered gene expression of pro- and antiapoptotic genes as well as CXCR2, CXCL2 and IL8.

Conclusion: TAM infiltration correlates with early recurrence, supporting findings on the tumor-promoting phenotype of myeloid cells in GBM. Additionally, CXCL2 and IL8 promote angiogenesis and chemokinesis and are partly affected by TMZ treatment. As patients with CXCL2/IL8 overexpression may benefit from anti-CXCR2 therapy, combined approaches with SB225002 should be further investigated in preclinical *in vivo* studies.

4. Einleitung

4.1. Das Glioblastom

Das Glioblastom ist ein maligner Tumor des zentralen Nervensystems (ZNS). Im Gegensatz zu anderen soliden Tumoren werden ZNS-Tumore nach der *WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System* (1) eingeteilt und nicht nach der *TNM-Klassifikation der Union for International Cancer Control (UICC)* (2). Die Einteilung der WHO erfolgt in die Grade I – IV hinsichtlich neuropathologischer Charakteristika, der Malignität und der Überlebensrate. Zudem wird zwischen primären und sekundären ZNS-Tumoren unterschieden. Die Gruppe der primären ZNS-Tumore besteht aus Tumoren, die aus hirneigenen Zellen entstehen und u.a. von den Meningen ausgehen (Meningeome) sowie Tumoren neuroektodermalen Ursprungs, den Gliomen. Zu diesen zählen Astrozytome, Oligodendrogliome und Ependymome. Im Kindesalter können zudem hochmaligne embryonale Tumore auftreten, sogenannte primitive neuroektodermale Tumore (PNET). Von den zuvor genannten primären ZNS-Tumoren werden die sekundären ZNS-Tumoren abgegrenzt. Zu dieser Gruppe gehören Metastasen anderer solider Tumore, ZNS-Lymphome sowie primär meningeale Melanome, Sarkome und Keimzelltumore. Neben dem Ursprungsgewebe wird auch hinsichtlich der Malignität unterschieden. Der Anteil der bösartigen Hirntumore liegt im Erwachsenenalter bei 30,2% (3). Das Glioblastom (GBM) gehört zu der Gruppe der malignen Gliome und ist nach der WHO, ein Grad IV Tumor (1). Es macht rund 50-70% der bösartigen zerebralen Raumforderungen aus und ist damit der häufigste maligne primäre ZNS-Tumor im Erwachsenenalter (3-5). Die Inzidenz des GBM liegt in den USA bei 3,22 pro 100.000 Einwohner (3). In Deutschland ist diese mehr als doppelt so hoch und lag laut des Deutschen Krebsregisters 2016 für Frauen bei 8,3 und für Männer bei 9,8 pro 100.000 Einwohner (5). Weltweit haben Studien gezeigt, dass Menschen mit einem kaukasischen Genpool deutlich häufiger an einem GBM erkranken als andere ethnische Gruppen (6). Das GBM zeichnet sich durch das aggressive Wachstum und eine hohe Malignität aus, die zu einem medianen Überleben von nur knapp 15 Monaten (4) und einer 5-Jahres-Überlebensrate von <7% führen (3). Glioblastome können sich *de novo* oder aus einem vorbestehenden Astrozytom Grad II oder III entwickeln. Erstere nennt man primäre, und letztere sekundäre Glioblastome (7). Diese Einteilung wurde erstmalig 1940 durch den Neuropathologen Hans Joachim Scherer verwendet (8). Erst vor rund einem Jahrzehnt wurde bei einer genomweiten Mutationsanalyse von Glioblastomen eine Mutation im Isozitat-Dehydrogenase-Gen (IDH-Gen) nachgewiesen (9). Eine weitere Studie zeigte, dass bei primären Glioblastomen die IDH in weniger als 5% mutiert ist, also ein IDH-Wildtyp vorliegt, während in sekundären Glioblastomen in mehr als 70% die IDH mutiert ist. Eine Mutation der IDH ist mit einem verlängerten Überleben und damit mit einer besseren Prognose assoziiert (1, 10). Aufgrund dieser Charakteristika wird das

Vorhandensein bzw. Fehlen einer Mutation im IDH-Gen nun zur Klassifikation von Glioblastomen herangezogen (1). In der aktuellen WHO Klassifikation von 2016 wird die Einteilung in das primäre und sekundäre Glioblastom maßgeblich durch das Vorhandensein einer Mutation in der IDH beschrieben (1).

Ein weiterer wichtiger Parameter in der Einteilung und Prognose der Glioblastome ist das O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase (MGMT)-Gen. Zahlreiche Studien zeigten, dass eine Hypermethylierung des MGMT-Promotors zu einem besseren Therapieansprechen führt und somit auch mit einem längeren Überleben assoziiert ist, was das MGMT-Gen zu einem wichtigen Prognosefaktor macht (4, 11-13).

4.1.1. Klinik und Diagnostik

Initial präsentiert sich das Glioblastom mit unspezifischen Symptomen wie Kopfschmerzen (50-60%), Krampfanfällen (20-50%) sowie fokale neurologische Ausfallserscheinungen (10-40%) wie Gedächtnisverlust, motorische Schwäche, visuelle Ausfallserscheinungen, Sprachdefizite, kognitive oder Persönlichkeitsveränderungen (14). Den Goldstandard der Diagnostik stellt die Magnetresonanztomografie (MRT) mit Kontrastmittel dar. In der T1-Wichtung stellt sich das Glioblastom als hypointense Läsion mit heterogener Kontrastmittelaufnahme und perifokalem Ödem dar. Charakteristisch ist ein Girlanden förmiges Kontrastmittel-Enhancement mit zentraler Nekrose (15). Die Diagnose wird durch eine stereotaktische Biopsie oder chirurgische Resektion mit nachfolgender neuropathologischer Begutachtung gesichert (16).

4.1.2. Therapie des Glioblastoms

Die derzeitige Standardtherapie des Glioblastoms baut im Wesentlichen auf drei Säulen auf, bestehend aus der chirurgischen Resektion, der Radiotherapie und der Chemotherapie (4). Einen signifikanten Einfluss auf die Überlebensdauer hat nach wie vor die chirurgische Resektion von >98% der Tumormasse, die auch als *Gross Total Resection* (GTR) bezeichnet wird (17-19). Trotz GTR liegt das mediane Überleben der Patienten und Patientinnen bei nur 15-18 Monaten (18, 19). Da das GBM ein hoch infiltrativer Tumor ist, ist eine Resektion von 100% der Tumormasse nicht möglich, da immer mikroskopische Tumoranteile im Hirnparenchym zurückbleiben. Aufgrund dieser Limitationen ist die anschließende Radiochemotherapie von enormer Bedeutung. Die Radiotherapie umfasst eine Dosis von 60 Gy, fraktioniert in 2 Gy pro Tag bei simultaner Gabe von Temozolomid (TMZ) über 6 Wochen, gefolgt von weiteren 6 Zyklen TMZ (4, 20, 21). Diese Kombination aus Radiochemotherapie gefolgt von einer zyklischen Temozolomidtherapie wird nach ihrem Erfinder als Stupp-Schema bezeichnet (4, 22). TMZ gehört zu den alkylierenden Substanzen. Seine antineoplastische

Wirkung basiert auf der Methylierung von Basen und einer dadurch gestörten DNA-Replikation.

Die Kombination der chirurgischen Resektion, der Radio- und Chemotherapie ist jeder einzelnen Therapiemodalität in Hinsicht auf das Überleben der Patienten und Patientinnen überlegen (23, 24). Ausgenommen davon sind lediglich ältere Patienten und Patientinnen (>70 Jahre), die im Gegensatz zu jüngeren Patienten und Patientinnen von einer hypofraktionierten Radiotherapie mit 34 Gy bei einer Tagesdosis von 3,4 Gy täglich über 2 Wochen profitierten (25). So konnte eine Studie von Malmström et al. zeigen, dass in dieser Altersgruppe die hypofraktionierte Radiotherapie der Standard-Radiotherapie überlegen war (25).

4.1.3. Limitationen der Standardtherapie

Trotz der aktuellen intensiven multimodalen Therapie entwickeln sich häufig innerhalb weniger Monate Rezidive (4, 26). Die Entstehung von Rezidivtumoren erfolgt durch ein Versagen der aggressiven Therapie bzw. durch eine Resistenzentwicklung gegen diese. An der Entwicklung neuer systemisch wirksamer Medikamente wird deshalb mit Hochdruck gearbeitet. Ein großes Problem in der Entwicklung neuer systemischer Glioblastomtherapien ist, dass diese bluthirnschrankengängig sein und außerdem bis zum Tumorlokalus gelangen müssen (27). Außerdem führt das aggressive Wachstum der Tumorzellen zu einer Volumenverdopplungszeit von weniger als 50 Tagen (27). Die abnormale Vaskularisierung mit ungeordneten, extrem permeablen Gefäßen bildet die Grundlage eines guten Nährstoff- und Sauerstoffangebots für die Tumorzellen (28). Deshalb ist die Erforschung der Angiogenese und Vaskularisierung als möglicher therapeutischer Angriffspunkt in den letzten Jahren zunehmend in den Vordergrund gerückt. Allerdings zeigten alternative systemische anti-angiogene Therapien z.B. solche, die in den VEGF-Signalweg eingreifen, bis dato gegenüber der etablierten Radiochemotherapie leider keinen signifikanten Vorteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens (aus dem Englischen: „overall survival“, OS) (29, 30). In einigen Studien zeigten sie jedoch ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben (aus dem Englischen: „progression free survival“, PFS) (29, 31). Abgesehen von VEGF, welches die Tumorangiogenese fördert, beeinflussen auch andere Moleküle und Zellen das Tumorstadium und sind Teil der Tumormikroumgebung, welche als Therapietarget angesehen werden können. Dazu gehören u.a. die tumorassoziierten Mikroglia und Makrophagen.

4.2. Makrophagen und Mikroglia

Neben neoplastischen Gliazellen besteht das Glioblastom aus zahlreichen nicht-neoplastischen Zellen. Dazu gehören Astrozyten, Endothelzellen, Perizyten sowie Zellen des Immunsystems wie die residenten Mikroglia, infiltrierende Monozyten/Makrophagen und

Leukozyten (28, 32, 33). Mikroglia und Makrophagen gehören zu dem mononukleär-phagozytärem System (34-36). Die Hauptaufgaben dieser Zellen des angeborenen Immunsystems ist die Abwehr von Erregern und die Phagozytose von Zelltrümmern und -resten (36). Somit sind sie direkt an der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase beteiligt (34, 35). Während der Embryonalentwicklung stammen die primitive Makrophagen aus dem Dottersack, im Verlauf ist die fötale Leber an der Blutbildung beteiligt bis dann im Erwachsenenalter das Knochenmark fast ausschließlich die Hämatopoese übernimmt (35). Von dort aus werden sie ins Blut abgegeben und dann Monozyten genannt (35). Monozyten differenzieren abhängig von der Lokalisation zu gewebespezifischen Makrophagen; in der Lunge beispielsweise zu alveolären Makrophagen, in der Haut zu dendritischen Zellen, in der Leber zu Kupffer-Sternzellen (35). Bei Inflammation oder anderen Pathologien wird die spezialisierte Makrophagenpopulation durch infiltrierende Monozyten unterstützt (36). Dies gilt nicht für das Gehirn, Mikroglia, die spezialisierten Immunzellen des ZNS werden in der Regel nicht durch zirkulierende Monozyten aufgefüllt (37, 38). Infiltrierende Makrophagen sind im ZNS nur dann zu finden, wenn die Bluthirnschranke beeinträchtigt ist wie z. B. im Rahmen von Hirntumoren sowie zahlreichen weiteren ZNS-Pathologien (36, 39).

Mikroglia sind die residenten Immunzellen des Gehirns und gewissermaßen die gewebespezifischen Makrophagen des ZNS. Sie wurden vor mehr als 100 Jahren von Pío del Río-Hortega entdeckt (39). Sie stammen aus dem Dottersack (38) und wandern während der Embryogenese und in der frühen postnatalen Phase ins ZNS ein, wo sie u.a. eine Rolle in der Ausreifung des Gehirns spielen (38, 40). Anders als bei Makrophagen erfolgt eine Vergrößerung der Mikrogliapopulation nicht durch Einwanderung von Progenitorzellen, sondern allein durch Proliferation der bestehenden Mikrogliazellen im ZNS (37). Es gibt neben den Mikroglia aber durchaus auch Makrophagen im ZNS. Dazu gehören perivaskuläre Makrophagen, meningeale Makrophagen und Makrophagen des Plexus choroideus (41, 42). Diese unterscheiden sich aber maßgeblich von peripheren Makrophagen (41) und somit auch von infiltrierende Makrophagen. Mikroglia haben zwei phänotypische Erscheinungsbilder „ramified“ und „amoeboid“. Ersteres wird sogenannten „resting“, ergo ruhenden, und letzteres „activated“, also aktivierten Mikroglia zugesprochen (**Abbildung 1**). Ruhende Mikroglia haben lange Ausläufer mit denen sie das gesunde Gewebe patrouillieren und das sie umgebende Gewebe schützen (43, 44). Weitere Funktionen sind die Regulation von Neurotransmittern und Hormonen (45) aber auch die Beteiligung an zahlreichen Pathologien (40). Durch pathologische Einflüsse auf das ZNS z.B. durch Infektionen, werden Mikroglia aktiviert und bilden den amöboiden Phänotyp aus (46, 47). Abhängig von der Pathologie können aktivierte Mikrogliazellen sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Eigenschaften haben (44, 47).

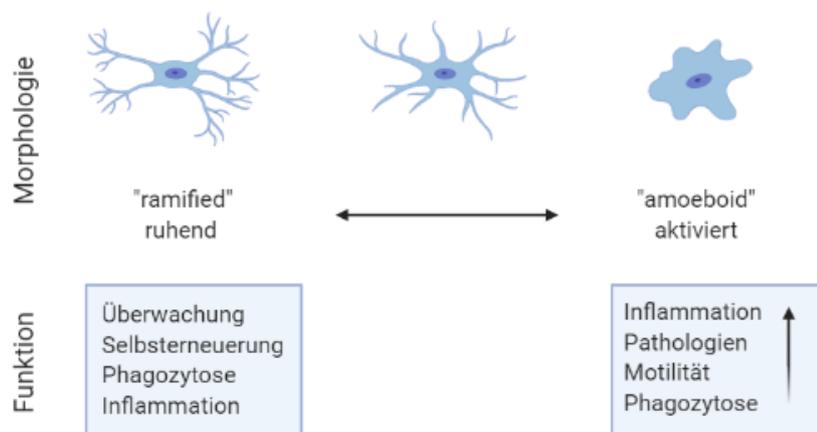


Abbildung 1: Unterschiedliche Morphologie und Funktionen von Mikroglia. Ruhende und aktivierte Mikroglia unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Funktion und Morphologie wie dargestellt. Es existieren auch Mischformen und nicht immer können Mikroglia im Tumormikromilieu einem bestimmten Phänotyp zugeordnet werden. Die Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.

4.3. Die Rolle von Tumor assoziierten Mikroglia und Makrophagen im GBM

Myeloide Zellen zu denen Mikroglia und Makrophagen gehören, machen 30-50% des zellulären Anteils des GBM aus (39, 48). Die Rolle der Mikroglia und infiltrierenden Makrophagen, auch tumorassoziierte Mikroglia/Makrophagen (TAMs) genannt, wird kontrovers diskutiert. Während einige Studien ihnen einen antitumoralen Phänotyp zuschreiben (49), zeigen andere Studien einen protumoralen Effekt dieser Zellen (50-52). Die Anzahl an infiltrierenden TAMs korreliert positiv mit dem Tumorgrad (53), also der Malignität und negativ mit dem progressionsfreien Überleben in Gliomen (54). Zudem konnte eine andere Studie zeigen, dass hohe Level an IL6 im Liquor, welches von TAMs sezerniert wird, zum einen mit der Infiltration von TAMs im GBM korreliert und zum anderen mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (55). Anders als bei lokalen Entzündungen setzen Mikroglia und Makrophagen im GBM immunsupprimierende Stoffe frei (56, 57). Diese protumoralen Eigenschaften lassen sich durch verschiedene Phänotypen von Mikroglia und Makrophagen erklären. Ein proinflammatorischer M1-Phänotyp wird durch die klassische Stimulation über den Toll-like-receptor 4 (TLR4) erreicht, während eine alternative Aktivierung durch multiple Interleukine zum M2-Phänotyp führt (58). Dieser alternative M2-Phänotyp wird weiter unterteilt in M2a (Th2-Antwort, Typ-2-Inflammation, Abtöten von Pathogenen, Allergie), M2b (Th-2-Aktivierung, Immunregulation) und M2c (Immunregulation, Extrazellulärmatrixablagerung, Gewebeerneuerung) (58, 59). In der Literatur wird oft davon ausgegangen, dass M1-

polarisierte, proinflammatorische Zellen antitumorale und M2-polarisierte, immunsuppressive Zellen protumorale Eigenschaften aufweisen (39, 60, 61). Dieses Konzept wird allerdings zunehmend kontrovers diskutiert und es wird angenommen, dass heterogene TAM Populationen im GBM vorhanden sind. Anhand von RNA-Microarray-Analysen konnten die Expressionsprofile von TAMs im Vergleich zu „normalen“ Mikroglia im Mausmodell untersucht werden. In dieser Studie konnten die Autoren zeigen, dass TAMs ca. 1000 Gene überexprimierten. Diese überschneiden sich mit allen bekannten Expressionsprofilen der M1-, M2a-, M2b- und die M2c-Polarisation (62). Somit lässt sich, anders als oft vermutet, den TAMs nicht eine eindeutige M2-Polarisation zuordnen (62) vielmehr ist davon auszugehen, dass die TAMs im GBM verschiedene Aktivierungszustände aufweisen, die sich je nach Mikroumgebung unterscheiden (61-63). In den vergangenen Jahren sind zahlreiche weitere Studien hinzugekommen, die für die Heterogenität von TAMs im GBM sprechen (63-65). Darmanis et al. konnten diese Diversität der Mikroglia/Makrophagen anhand von Single-Cell RNA-Sequenz-Analysen von Gliompatienten und Gliompatientinnen nachweisen und zeigten, dass TAMs im Tumorzentrum eher antiinflammatorische Gene exprimierten, während periphere TAMs eher proinflammatorische Gene exprimierten (**Abbildung 2.**) (65).

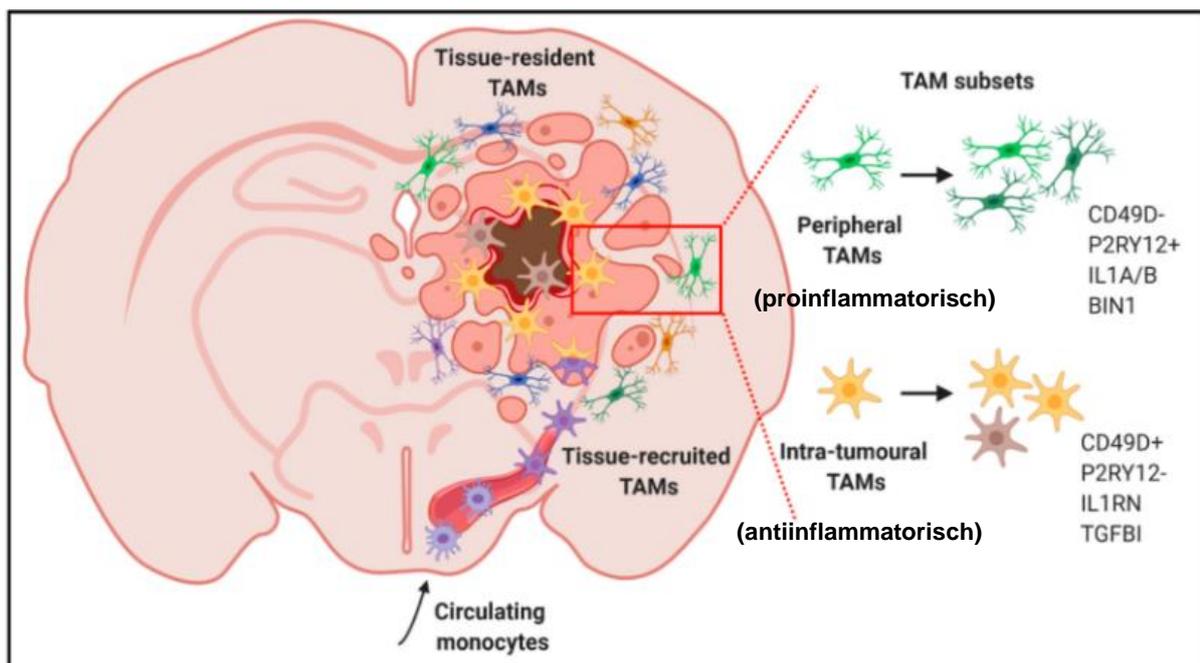


Abbildung 2: TAM Subpopulationen in Glioblastompatienten und -patientinnen. In Abhängigkeit der Ontogenese und ihrer räumlichen Lokalisierung, weisen TAMs in bestimmten Tumorgebieten unterschiedliche Merkmale auf. Abgeändert nach Pires Afonso et al. (64)

Auch wenn die phänotypische Vielfalt von TAMs noch nicht abschließend geklärt ist, fördern Mikroglia und Makrophagen das Tumorstadium und die Angiogenese durch die Sekretion von Chemokinen und Wachstumsfaktoren wie z.B. transforming growth factor beta (TGF- β) (39, 66) und vascular endothelial growth factor (VEGF) (28, 39, 65). Neben VEGF sezernieren

TAMs zudem auch CXCL2, ein bisher wenig untersuchtes proangiogenes Chemokin (28, 67), dessen Rolle in dieser Arbeit näher untersucht werden soll.

Zusammengefasst gesagt sind eine Vielzahl an Funktionen von TAMs im GBM bekannt. Sie modulieren den Immunstatus und die unmittelbare Tumormikroumgebung (56), setzen Chemokine frei und locken so weitere myeloide Zellen an und modulieren so die Angiogenese (68). Ob ihre pro- oder antitumorale Wirkung überwiegt, ist bis dato aber weitgehend ungeklärt.

4.4. Der CXCR2 Signalweg und dessen Relevanz im Glioblastom

Chemokine sind niedermolekulare Peptide. Der Name Chemokine zusammengesetzt aus "chemoattraktive" und „Zytokine" bezieht sich auf die ihnen initial zugeschriebene Funktion als Stimulatoren der Migration verschiedener Zelltypen (69). Chemokine werden von einer Vielzahl an Zellen, einschließlich Monozyten, Makrophagen inklusive TAMs (28, 70), T-Lymphozyten, Neutrophilen und Fibroblasten, sowie Nerven-, Endothel- (21, 71-74) und Epithelzellen sowie Tumorzellen (70, 75) synthetisiert (76, 77). Die Chemokine der CXCR2-Achse zu denen IL8 (auch CXCL8 genannt) und CXCL2 gehören, spielen eine wichtige Rolle in der Glia- und Gliomazellbiologie (75). Ihr gemeinsamer Rezeptor CXCR2 ist ein G-Protein gekoppelter Transmembranrezeptor mit einer Vielzahl an Effektormechanismen. Die Aktivierung von CXCR2 führt im Tumor primär zur Aktivierung der Phosphatityl-Inositol-3-Kinase oder der Phospholipase C, die wiederum zur Aktivierung von Akt-, PKC-, MAPK-Signalkaskaden und zur Calciummobilisierung führen. Diese Signalwege steigern dann die Translation von HIF-1, NF- κ B, AP-1, AR und modulieren die Aktivität der Transkriptionsfaktoren STAT3 und β -Catenin (77). Zu den Effektormechanismen gehören u.a. die Angiogenese (74, 78, 79 462, 80 461), die Chemotaxis (80 461, 81 474), das Zellüberleben (74), die Zellproliferation und Invasion (77). Waugh et al. erörterten 2008 mögliche Effekte von IL8 in der Tumormikroumgebung (77). Dazu gehörten neben der Angiogenese und Tumorzellproliferation auch, dass Tumorzellen selbst IL8 exprimieren und, dass IL8 zur Therapieresistenz führen kann (**Abbildung 3**)(77).

Einige dieser Aspekte wurden bereits im Glioblastom untersucht (74, 75, 82). So wurde nachgewiesen, dass CXCR2 im Gliom überexprimiert wird (82, 83). Außerdem konnte gezeigt werden, dass IL8 und CXCR2 nach antiangiogener Therapie mit VEGF-Signalweg-Inhibitoren *in vivo* sowie nach Behandlung mit Temozolomid *in vitro* hochreguliert waren, was die Relevanz dieses Signalwegs im Gliom und in der Tumorangio-genese unterstreicht (70, 75, 83). Weitere Studien konnten zudem einen Zusammenhang zwischen dem CXCR2-Signalweg und einem reduzierten PFS und OS von GBM Patienten und Patientinnen nachweisen (70, 83). Somit handelt es sich um einen bedeutenden Signalweg im Glioblastom. Alles in allem werden dem Signalweg verschiedene hoch relevante Effekte in der Gliomagenese, der

Progression, der vaskulären Mimikry, der Tumorangio-genese und der Resistenzentwicklung zugeschrieben (70, 73, 82-86). Aufgrund dieser wichtigen Rolle im Glioblastom und der bis heute mangelhaften Standardtherapie ist der CXCR2-Signalweg in den letzten Jahren zunehmend in den wissenschaftlichen Fokus gerückt. Für mögliche therapeutische Ansätze im Menschen ist die aktuelle Datenlage allerdings nicht ausreichend und bedarf weiterer Untersuchungen. Zudem lag der Fokus der Untersuchung der CXCR2-Liganden in den letzten Jahren auf IL8, wohingegen CXCL2 wenig Aufmerksamkeit zugutekam, weswegen das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf CXCL2 liegt. Durch die Vielzahl an Effektormechanismen, die das Tumorwachstum und die Tumorprogression vorantreiben (**Abbildung 3**) sowie die mögliche Beteiligung an der Resistenzentwicklung, wurde eine CXCR2-Blockade bereits in mehreren präklinischen Studien untersucht. Durch die Blockade von CXCR2 konnten bereits erste therapeutische Erfolge an Tumorzellen *in vitro* und im Mausmodell *in vivo* gezeigt werden (83, 85).

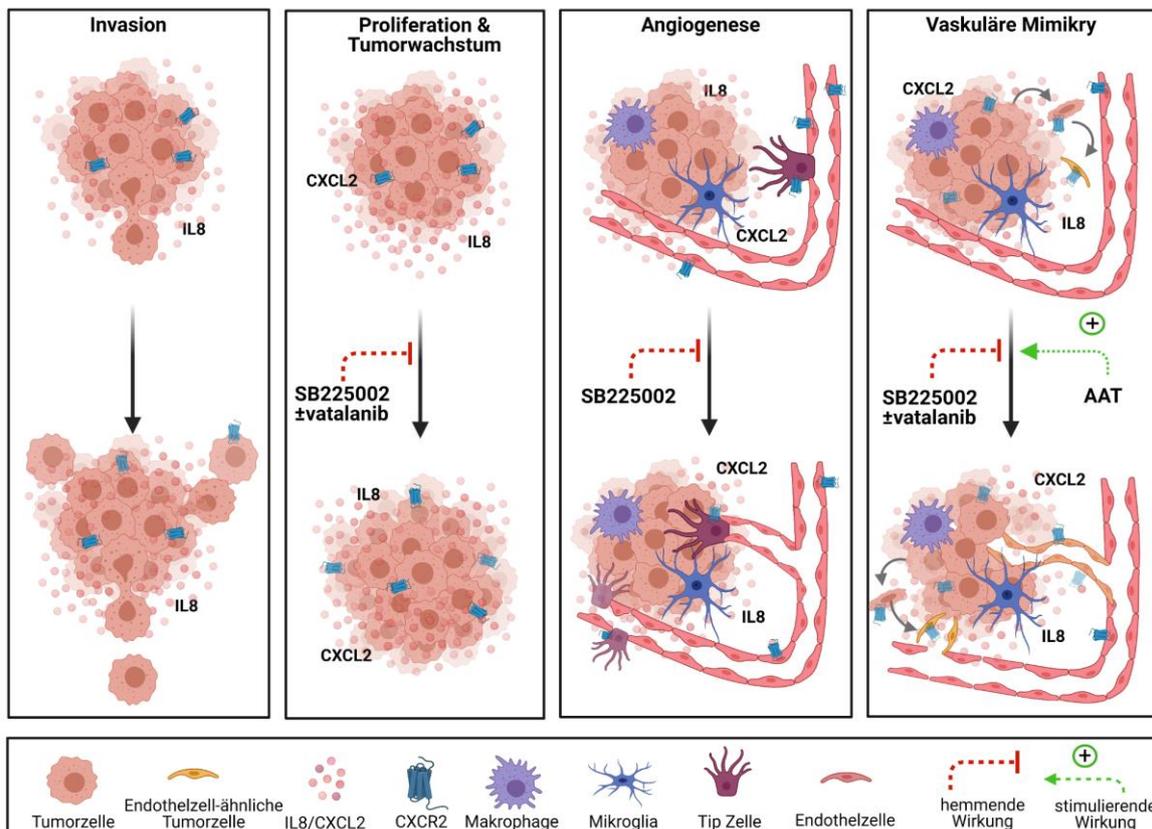


Abbildung 3: Die Rolle des CXCR2 Signalweges in der Tumormikroumgebung. Der CXCR2 Signalweg ist in zahlreiche Prozesse involviert, die die Tumorprogression fördern. Dazu gehören die Invasion, die Proliferation, das Tumorwachstum, die Tumor-Angiogenese und die Vaskuläre Mimikry. In einigen Studien *in vitro* und am Tiermodell konnte die Wirksamkeit des CXCR2 Antagonisten SB225002 allein und in Kombination mit Vatalanib, einem VEGFR-Kinase-Inhibitor, bereits nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass antiangiogene Therapien, die in den VEGFR-Signalweg eingreifen die Entstehung der Vaskulären Mimikry fördern. Erstellt in Biorender.com

4.5. Der CXCR2-Antagonist SB225002

Fehlende Langzeitbehandlungen und das kurze Gesamtüberleben von Patienten und Patientinnen mit Glioblastom (ca. 15 Monate) (4) erfordern neue therapeutische Ansätze. SB225002 ist ein potenter und selektiver Nicht-Peptid-CXCR2-Antagonist mit einer IC_{50} von 22nM (87). Er gehört zu den sogenannten „Small molecules“ und wurde 1998 von White et al. entdeckt und weist eine >150-fache Selektivität für CXCR2 gegenüber CXCR1 und 7 weiteren G-Protein-gekoppelten Transmembranrezeptoren auf (87). Zunächst wurde gezeigt, dass SB225002 die Migration von Neutrophilen Monozyten hemmt, (87). Im Laufe der letzten 20 Jahre konnte auch eine antitumorale (88) und antiangiogenetische (89) Wirkung nachgewiesen werden. Die antitumoralen Effekte des CXCR2-Antagonisten konnten in mehreren *in vitro* Studien solider Tumoren wie z.B. dem Ösophagus- (90), Pankreas- (91), Mamma- (92), Lungenkarzinom (93) sowie auch in der akuten lymphoblastischen Leukämie (94) nachgewiesen werden. Die Wirksamkeit im Glioma Mausmodell konnte zudem in ersten *in vivo* Versuchen bestätigt werden (83, 85). Acker et al. zeigte neben einem reduziertem Tumorwachstum auch eine verminderte Gefäßdichte sowie eine reduzierte Akkumulation von TAMs im Glioma Mausmodell (85). Somit bietet es sich an, SB225002 auch an humanen Zellen zu erproben, um einer möglichen Anwendung am Menschen ein Stück näher zu kommen.

4.6. Primäre Humane Endothelzellen

Fast alle Gewebe des menschlichen Körpers sind abhängig von der Blutversorgung. Diese ist wiederum abhängig von Endothelzellen. Endothelzellen sind mesodermalen Ursprungs und bilden die innere Schicht von Blutgefäßen bzw. kleiden diese komplett aus (95). Sie besitzen die bemerkenswerte Fähigkeit sich den lokalen Anforderungen durch ihre phänotypische Vielfalt anzupassen (95, 96). Sie sind unter anderem verantwortlich für die Neubildung von Gefäßen, für Wachstum und Wundheilung und die Homöostase (95, 96) und sind somit in viele physiologische, aber auch pathologische Prozesse eingebunden (97). Die Angiogenese, also die Neubildung von Gefäßen erfolgt durch die Proliferation, das „Aussproießen“ von Endothelzellen aus vorhandenen kleinen Gefäßen innerhalb von wenigen Tagen (98). Judah Folkman wird als Vater der Angiogenese angesehen (99). Er postulierte 1971 die Relevanz der Tumorangiogenese, die heute als eines der „Hallmarks of Cancer“ gilt (100) und inspirierte eine Vielzahl an hochkarätigen Wissenschaftlern sich mit der Angiogenese in Tumoren zu beschäftigen (99). Doch schon weit vor seiner Zeit, vor mehr als 300 Jahren vermuteten Forscher und Ärzte Besonderheiten in der Gefäßneubildung von Tumoren (99). Doch wie wissen die Endothelzellen, dass sie aussproießen sollen? Eine bedeutende Rolle in der Angiogenese spielen VEGF-A sowie dessen Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 (101). VEGF induziert die Zellproliferation, Migration und das „Sprouting“ *in vitro* (101). Schon vor gut 25

Jahren konnte gezeigt werden, dass ohne den VEGF/VEGFR2-Signalweg keine Gefäßneubildung in Embryonen möglich ist (102-104). Diese bahnbrechende Entdeckung führte zur Entwicklung antiangiogener Therapien auch für das stark vaskularisierte GBM, die jedoch aufgrund verschiedener Resistenzmechanismen, wie im Abschnitt 4.1.3 „Limitationen der Standardtherapie“ erläutert, leider keine Verlängerung des Gesamtüberlebens zeigten (83, 105-107). Daraufhin rückten andere proangiogene Signalwege wie der CXCR2-Signalweg in den Fokus der Wissenschaftler. Angara et al. zeigten, dass nach antiangiogener Therapie, die in den VEGF-Signalweg eingreift, CXCR2 und IL8 im Tumor hoch reguliert werden (83).

Die angiogene Kapazität von IL8 basiert auf der Expression von CXCR1 und CXCR2 auf Endothelzellen (74). Eine Vielzahl von Endothelzellen wie humanen Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC), mikrovaskuläre Endothelzellen und Hirnendothelzellen exprimieren diese Rezeptoren (74, 78, 79, 108). In Abhängigkeit von der Expression von CXCR2 wurden jedoch große Unterschiede hinsichtlich des Endothelzelltyps und der Rolle des CXCR2-Signalwegs gezeigt (74). Die meisten *in-vitro*-Studien zum CXCR2-Signalweg in menschlichen Endothelzellen wurden an HUVEC durchgeführt, bei denen es sich um periphere primäre Endothelzellen handelt (79, 80). Salcedo et al. zeigten, dass HUVEC im Vergleich zu humanen mikrovaskulären dermalen Endothelzellen niedrige CXCR1- und CXCR2-Spiegel exprimierten (109). Daher ist es von großer Bedeutung, diesen Signalweg in primären Hirnendothelzellen zu analysieren. Da spezialisierte mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns sich grundlegend von anderen Endothelien unterscheiden (110-112), sollten diese im Vergleich zu HUVEC untersucht werden. „Human Brain Microvessel Endothelial Cells“ (HBMEC) gelten als solides Modell der Blut-Hirn-Schranke *in vitro* (113). Bis dato steht ein direkter Vergleich von HUVEC und HBMEC jedoch noch aus.

4.7. Zielsetzung und Fragestellung

Trotz Fortschritte in der Therapie lässt sich das Glioblastom nicht heilen und die Prognose für die Patienten und Patientinnen ist nach wie vor fatal (3-5). Der CXCR2-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Gliomagenese, Angiogenese und Therapieresistenz (70, 74, 75, 78-80, 83, 114). Die Liganden IL8 und CXCL2 werden von Tumorzellen und TAMs synthetisiert (28, 75, 85). Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des CXCR2/CXCL2/IL8-Signalweges in der Angiogenese und der Resistenzentwicklung im humanen Primär- und Rezidiv-Glioblastom zu untersuchen. Dies lässt sich in zwei Unterpunkte gliedern:

1. Analyse des Patientenkollektivs

- a. Analyse klinischer Routineparameter sowie der Infiltration von TAMs im primären und rezidierten Glioblastom sowie die Vaskularisierung und die Expression von CXCR2, CXCL2, IL8 und VEGF innerhalb der Tumore *ex vivo*.

- b. Den Einfluss der oben genannten Moleküle auf das Gesamtüberleben, das progressionsfreie Überleben und das Intervall vom Rezidiv bis hin zum Tod *ex vivo* zu analysieren.

2. Analyse des CXCR2 Signalwegs *in vitro*

- a. Untersuchung der angiogenetischen und chemotaktischen Potenz von CXCL2 und IL8 im Vergleich zu VEGF auf primäre humane Endothelzellen aus der Peripherie (HUVEC) und aus dem Gehirn (HBMEC) *in vitro* sowie die Effektivität des CXCR2-Antagonisten SB225002, diese Prozesse zu hemmen.
- b. Außerdem sollte der Einfluss von SB225002 und TMZ unter einer simulierten Überexpression von CXCL2 und IL8 auf die Gen- und Proteinexpression des CXCR2/CXCL2/IL8 Signalweg sowie weiterer proangiogener Rezeptoren analysiert werden.

5. Material und Methoden

5.1. Überblick der verwendeten Methoden

Um den unterschiedlichen Fragen auf den Grund zu gehen, wurden verschiedene Methoden verwendet, die in **Abbildung 4** zusammengefasst dargestellt sind. In den nachfolgenden Kapiteln werden diese im Detail erläutert.

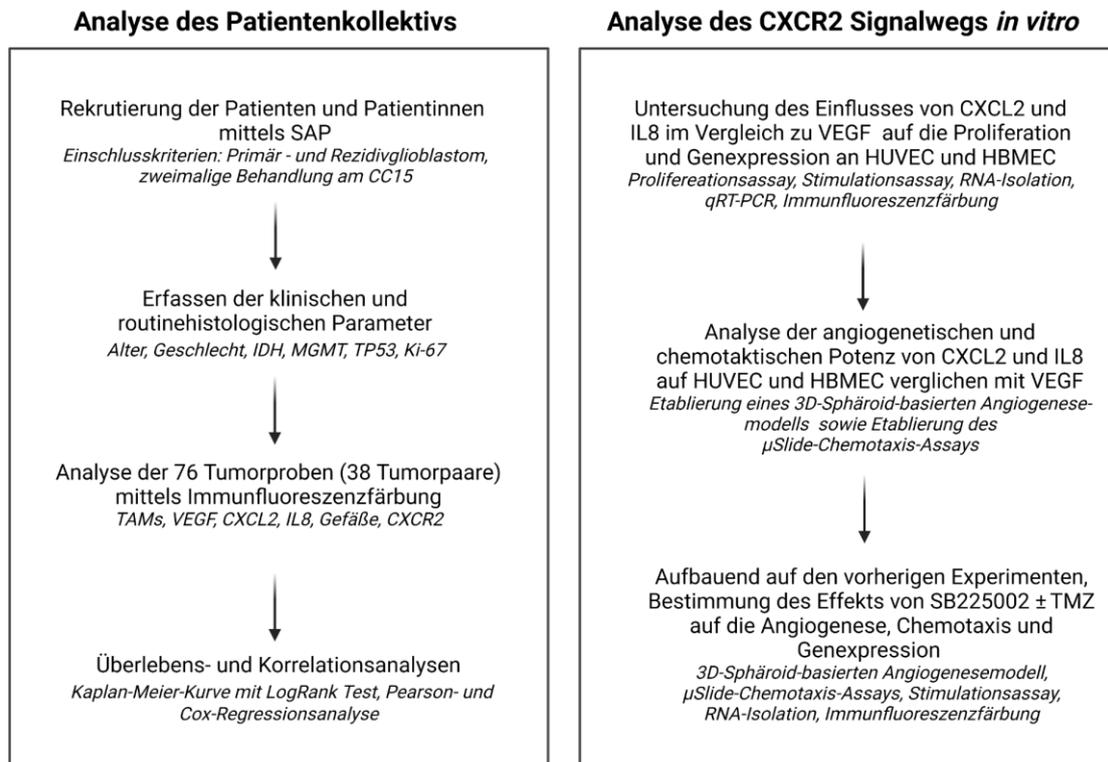


Abbildung 4: Übersicht der verwendeten Methoden. IDH = Isozitatdehydrogenase, MGMT = O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase, TP53 = Tumorsuppressorgen 53, Ki-67 = Proliferationsmarker, TAMs = Tumorassoziierte Mikroglia/Makrophagen, HUVEC = primäre humane Umbilikalvenenzellen, HBMEC = primäre humane Gehirnmikrogefäßendothelzellen, qRT-PCR = quantitative Realtime Polymerasekettenreaktion, SB225002 = CXCR2 Antagonist, TMZ = Temozolomid

5.2. Material und verwendete Programme

5.2.1. Geräte/Hersteller

Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten Geräte

| Gerät | Hersteller | Standort |
|---|-------------------------------------|----------------------------|
| Autoklav Laboklav | SHP Steriltechnik AG | AZH (Aschheim-Zondek-Haus) |
| Chamber Slides (x-well Tissue Culture Chambers) | Sarstedt | AZH |
| Cell Scraper | Corning Incorporated, costar | AZH |
| Cycler | GE4852T, Bio-Center | AZH |
| Fluoreszenzmikroskop | Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) | AZH |

| | | |
|--|--|---------------------------------|
| Inkubator BBD6220 | Thermo Scientific | AZH |
| Inserts | BD Fluoroblok™ individual inserts | AZH |
| Kochplatte | RETbasic, IKA Labortechnik | AZH |
| Konfokalmikroskop | Nikon A1Rsi+ | Charité Cross Over (CCO), AMBIO |
| Live Cell Microscope/ Lebendzell-Mikroskop | Nikon Widefield Ti2 | CCO, Ambio |
| Magnetrührer | MSH | AZH |
| Multikanalpipette 10-100µl | Eppendorf | AZH |
| MicroAmp® Fast 96-Well/384-Well Reaction Plate | applied biosystems by life technologies | AZH |
| Objektträger Superfrost® PLUS | Thermo Scientific | AZH |
| Petrischale (rund) | Greiner Bio-One | AZH |
| Petrischale (quadratisch) | Greiner Bio-One | AZH |
| Pipetten | Eppendorf | AZH |
| Pipettenspitzen (2,5, 5, 10, 200, 300 und 1000µl) | Biosphere Filter Tips, Sarstedt | AZH, CCO |
| Pipettenspitzen (filter tip FT 100) | Greiner Bio-One | AZH, CCO |
| Polypropylene Conical Tube 15/50ml | Falcon | AZH |
| QuantStudio 6 Flex | Thermo Scientific | AZH |
| Schnellkochtopf Sicomatic-L | Silit | AZH |
| Sterile Mullkompressen | Fink & Walter GmbH | AZH |
| Vortexer | Vortex Genie 2, Scientific Industries | AZH |
| Vortexer | Sunlab, SU1900 | AZH |
| Widefieldmikroskop | Nikon Ti2 | CCO, AMBIO |
| Wippe Shaker DRS-12 | NeoLab | AZH |
| Workstation | Asus | CCO, AMBIO |
| µ-Slide Chemotaxis | ibidi | AZH, CCO, AMBIO |
| Zellkulturplatte (6-Well) | Sarstedt | AZH |
| Zellkulturplatte (12-Well) | Sarstedt | AZH |
| Zellkulturplatte (24-Well) | Sarstedt | AZH |
| Zellkulturplatte (96-Well) | Greiner-Bio-One | AZH |
| Zellkulturplatte Rundboden (96-Well) | Greiner-Bio-One | AZH |
| Zellkulturflasche T25 | | AZH |
| Zellkulturflasche T25 | | AZH |
| Zellkulturplatte (96-Well-Cellstar) | greiner bio-one | AZH |
| Zellkulturplatte (TC 96-Well) | Sarstedt | AZH |
| Zellkulturplatte (TC 6-Well) | Sarstedt | AZH |
| Zentrifuge | Megafuge 1.OR, Thermo Scientific | AZH |
| Zentrifuge | Multifuge 3SR+, Thermo Scientific | AZH |

5.2.2. Chemikalien/Puffer/Lösungen

Tabelle 2: Zusammenfassung der verwendeten Puffer und Lösungen

| Reagenz | Beschreibung | Hersteller |
|--|---|--------------------|
| Autofluorescence Eliminator Reagent | 1 Tropfen pro Schnitt | Merck Millipore |
| BSA 0,5% | 5g Bovine Serum Albumin in 1l PBS | Sigma Aldrich |
| Casein 0,5/1% | 5g/10g Milchprotein in 1l PBS | Sigma Life Science |
| Collagen | Collagen Type I, rat tail 5mg/ml | ibidi |
| Collagen | Collagen Type I, rat tail 3.57mg/ml | Corning® |
| Cryo SFM | 1ml pro Kryo-Röhrchen | PromoCell |
| CyQuant-Assay | Reagenz für das Proliferationsassay | Invitrogen |
| DAPI | 4',6-diamidino-2- phenylindole | Sigma Aldrich |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | Merck-Millipore |
| Ethanol | Ethanol | Merck Millipore |
| Formaldehyd | 4%-ige Lösung | Sigma-Aldrich |
| Gelatine 1% | Aus Kaltwasserfisch-Haut | Sigma Life Science |
| Iso-Propanol | Iso-Propanol | Merck Millipore |
| IS mounting medium DAPI | | Dianova |
| PBS-Tabletten | Phosphat buffered saline aufgelöst in Millipore®-Wasser | Gibco |
| PBS | Phosphat buffered saline steril | Gibco |
| PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser | Zur Umschreibung von RNA zu cDNA | TaKaRa |
| Protein CXCL2 | Recombinant human CXCL2 (carrier-free) | BioLegend |
| Protein IL8 | Recombinant human CXCL8 (carrier-free) | BioLegend |
| Protein VEGF-165 | Recombinant human VEGF-165 (carrier-free) | BioLegend |
| Methyl Cellulose | Cellulose Puder mit zugesetzten Methoxygruppen | SIGMA |
| SB225002 | CXCR2-Antagonist für <i>in vitro</i> Experimente | TOCRIS |
| PureLink RNA Mini Kit | Zur RNA Isolation aus pflanzlichen, tierischen oder menschlichen Zellen | Ambion |
| RNAse-freies H2O | Durch Biofilter von RNAsen befreites Wasser | Sigma Aldrich |
| Roti®-Histokit | Zum Eindeckeln | Carl Roth |
| TB Green™ Premix Ex Taq™ | Kit für die qRT-PCR | TaKaRa |
| Temozolomid (Temodal®) | Chemotherapeutikum | MSD |
| Triton-X-100 | Octylphenoxypolyethoxyethanol | Sigma Aldrich |
| β-Mercaptoethanol | RNA-Isolierung | Sigma-Aldrich |

5.2.3. Zellkulturmedien/Zusätze

Tabelle 3: Zellkulturmedien

| Bezeichnung | Inhalt | Hersteller |
|---|---|-----------------------|
| ECGM2 | 500ml, basales Nährmedium | PromoCell |
| Supplemente | Wachstumsfaktoren, Hormone und essenzielle Proteine | PromoCell |
| Gentamicin (G) | Antibiotikum (10mg/ml) | Sigma Aldrich |
| Amphotericin B (A) | Antimykotikum (2,5mg/ml) | Sigma Aldrich |
| HEPES BSS | HEPES Puffer | PromoCell |
| Trypsin/EDTA | Trypsin/EDTA (0,04%/0,03%) | PromoCell |
| Trypsin | Trypsin/EDTA (0,5%) | GibcoTM |
| Endothelial Cell Medium | 500ml, basales Nährmedium | ScienCell |
| Fetal Bovine Serum (FBS) | Fötales Kälberserum | ScienCell |
| Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) | Wachstumsfaktoren, Hormone und essenzielle Proteine | ScienCell |
| Fibronectin | Human Plasma Fibronectin Purified Protein 1mg/ml | Merck Millipore |
| Penicillin-Streptomycin (P/S) | Antibiotika- (50µg/ml) Lösung | PAA Laboratories GmbH |

5.2.4. Programme

Tabelle 4: Zusammenfassung verwendeter Programme

| Programm | Verwendung | Hersteller |
|--|---|---|
| Axio Vision 4 | Immunfluoreszenz-Aufnahmen | Carl Zeiss |
| Excel 2016 | Auswertung | Microsoft |
| Graphpad Prism 5/9 | Statistiken, Graphen | STATCON LaJolla; Carlifornia; USA |
| ImageJ/Fiji | Bildbearbeitung, Immunfluoreszenz-, Confocal-, Live-Cell-Imaging-Auswertung | https://imagej.net/Fiji/Downloads |
| NIS-Elements | Bildverarbeitungssoftware | Nikon |
| OMERO 5.4.10 | Zwischenspeichern von Daten | https://www.openmicroscopy.org/omero/ |
| SPSS 26.0 | Auswertung und Analyse | IBM |
| Chemotaxis and Migration Tool | Auswertung und Analyse | Ibidi |
| QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.3 | RTQ-PCR Einstellungen und Auswertung | Thermo Scientific |

5.3. Patientenproben: Ethikantrag

Sämtliche Untersuchungen wurden gemäß des Ethikvotums der Charité – Universitätsmedizin Berlin (EA1/045/18) und nach den Richtlinien der guten wissenschaftlichen Praxis durchgeführt. Die Patientendaten wurden pseudonymisiert gesammelt und anonymisiert verblindet analysiert. Von allen Patienten und Patientinnen lag eine schriftliche Einverständniserklärung vor.

5.3.1. Auswahl der Patientenproben

Das Ziel dieser Arbeit war, das Primär- und Rezidivglioblastom desselben Patienten bzw. derselben Patientin zu vergleichen. Zu den Einschlusskriterien gehörten deshalb zum einen, die zweimalige Operation aufgrund einer Erkrankung am Glioblastom und zum anderen, die durch zwei unabhängige Neuropathologen bestätigte histologische Diagnose des Glioblastoms zu beiden Zeitpunkten. Außerdem wurde ein Mindestabstand von 2 Monaten zwischen der ersten und zweiten Operation festgelegt, um sicher zu gehen, dass es sich nicht um einen Resttumor handelte. Anhand von SAP-Daten und einer klinikinternen Datenbank konnten 65 Patienten und Patientinnen mit primärem und rezidierten Glioblastom identifiziert werden. Von allen 65 GBM Patienten und Patientinnen, welche im CC15 – Klinik für Neurochirurgie der Charité - Universitätsmedizin Berlin zwischen 2012 und 2017 zweimal operativ behandelt wurden, wurde das präservierte Restmaterial an der Klinik für Neuropathologie erfragt. Zunächst konnten 40 Patienten und Patientinnen eingeschlossen werden, von denen dann jedoch im Verlauf zwei weitere ausgeschlossen werden mussten, da nicht genügend Gewebe vorhanden war, sodass diese Studie insgesamt 38 Patienten und Patientinnen zur Analyse einschloss (**Abbildung 5**). Anhand der erfolgten Therapie nach der ersten Operation wurden die Patienten und Patientinnen in zwei Gruppen eingeteilt. Diejenigen, die neben der Radiochemotherapie ≥ 4 Zyklen Temozolomid, also eine Therapie nach dem Stupp-Schema (für Details vgl. 4.1.2) erhielten, wurden als „Standard“ tituiert (n = 18). Die Patienten und Patientinnen, die ≤ 3 Zyklen Temozolomid erhielten, wurden als „Nicht-Standard“ benannt (n = 20). Die Gründe, warum Patienten und Patientinnen nicht die empfohlene Therapie nach Stupp-Schema (4) erhielten, variierten von schwerwiegenden Nebenwirkungen bis hin zum ausdrücklichen Wunsch des Patienten bzw. der Patientin.

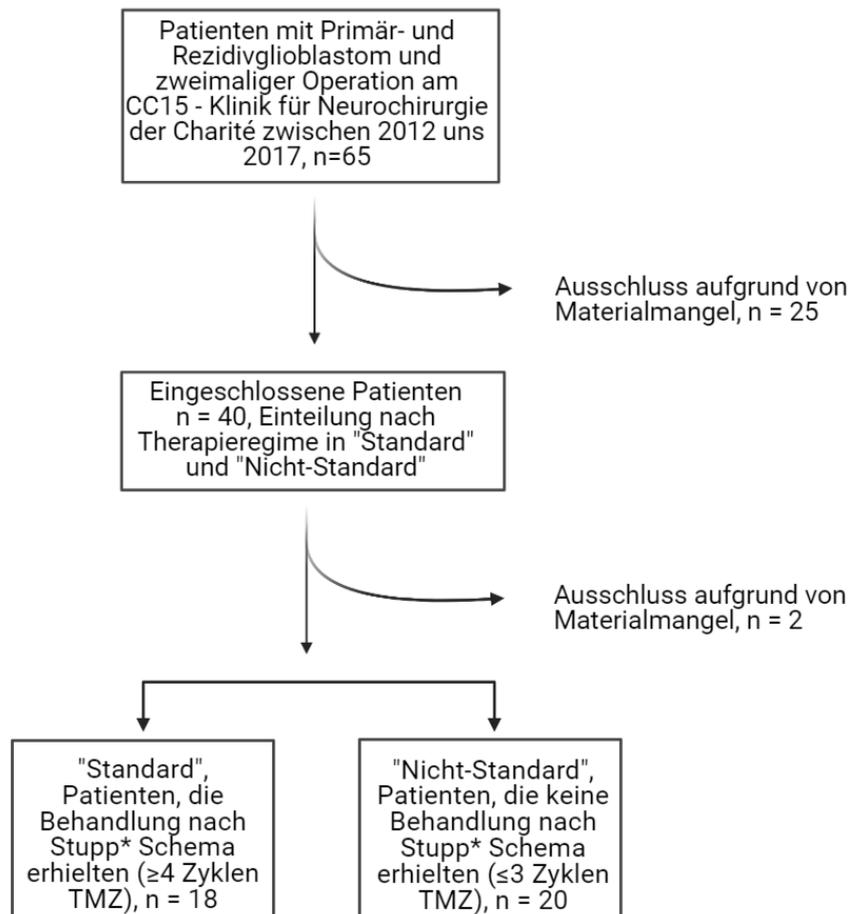


Abbildung 5: Identifizierung und Einschluss der Patienten in die Studie. * = Stupp Schema: an OP anschließende Radiochemotherapie gefolgt von 6 Zyklen adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid; TMZ = Temozolomid

5.3.2. Analyse klinischer Parameter der Routinediagnostik

Zunächst wurden klinische und histologische Routineparameter untersucht. Dazu gehörten neuropathologische Marker wie u.a. die MGMT-Methylierung, IDH-1/2- und TP53-Mutationen und Ki67-Expression (**Tabelle 17** und **Tabelle 18**) sowie klinische Daten wie u.a. das Alter, Geschlecht, Zeit bis zum Rezidiv, Gesamtüberleben. Das O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-(MGMT-) Gen codiert für das gleichnamige DNA-Reparaturprotein und hat ebenso wie der IDH1-Status eine Relevanz für die Prognoseeinschätzung der Patienten und Patientinnen.

5.4. Proteinbiochemie

5.4.1. Histologische Aufarbeitung

5.4.2. Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung

Die 4µm dicken FFPE-Schnitte (Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe aus dem Englischen: formalin-fixed paraffin-embedded tissue) der Patientenproben wurden mittels H.E.-Färbung analysiert, um einen Überblick über das Tumorgewebe zu erhalten und

nekrotische Areale zu identifizieren. Die H.E.-Färbung ist eine neuropathologische Standardfärbung und erfolgte nach etabliertem Protokoll.

Zunächst erfolgte die Deparaffinisierung der FFPE-Schnitte. Dafür wurden die Schnitte 2 x 5 Minuten in Xylol gegeben. Nach sorgfältigem Abtropfen erfolgte die Rehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe von 100%-, 96%-, 90%-, 80%-, 70%-igem Ethanol, in dem die Objektträger jeweils 10x geschwenkt wurden. Dann wurden sie in dH₂O gegeben. Nun konnte die H.E.-Färbung erfolgen. Dafür wurden die Objektträger für 5 min in Mayers-Haemalaun gegeben und anschließend mit dH₂O gewaschen. Für 2 sek wurden sie nun in 1%ige-HCl gegeben. Die Differenzierung erfolgte unter laufendem Leitungswasser für 5 min. Die nächste Färbung erfolgte mit Eosin für 25 sek. Nach dem Waschen wurden die Schnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70%, 80%-, 90%-, 96%- und 100%-igem Ethanol rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte nochmals für 2x5 min in Xylol gegeben und mit dem Roti®-Histokit-II eingebettet und abschließend mit einem Deckglas versiegelt.

5.4.3. Immunfluoreszenzfärbungen

5.4.3.1. Prinzip

In fixierten Zellen und Geweben können Proteine mithilfe der Immunfluoreszenz durch markierte Antikörper nachgewiesen und lokalisiert werden. Es gibt sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper. Letztere erkennen mehrere Epitope der Zielstruktur und sind deshalb unspezifischer als monoklonale Antikörper, die gegen nur eine Zielstruktur – ein Epitop – gerichtet sind. In dieser Arbeit wurden ausschließlich monoklonale Antikörper verwendet. Des Weiteren wird zwischen direkter und indirekter Immunmarkierung unterschieden. Ist an den Antikörper, der das gewünschte Epitop erkennt, ein Fluorochrom gekoppelt, spricht man von der direkten Immunmarkierung. Wenn der Primärantikörper selbst nicht fluoreszierend ist und erst durch einen fluoreszierenden Sekundärantikörper markiert werden muss, spricht man von der indirekten Immunmarkierung. Der Sekundärantikörper bindet dabei hochspezifisch an das Fc-Fragment des Primärantikörpers. In diesem Fall ist es wichtig, dass Primär- und Sekundärantikörper nicht aus der gleichen Tierart stammen und, dass der Sekundärantikörper immer passend zum Primärantikörper gewählt wird. Stammt der Primärantikörper beispielsweise vom Kaninchen, muss der Sekundärantikörper gegen Kaninchen sowie die gewählte Immunglobulin-Klasse gerichtet sein. Einige Gewebe können zudem stark autofluoreszieren, was zum Teil am Gewebe selbst, aber auch an der Fixierung liegen kann. Deshalb wurde zum einen ein Autofluoreszenz Eliminator verwendet und zum anderen stets auch eine Positiv- respektive Negativkontrolle mit angefertigt.

5.4.3.2. Vorgehen

Für die Immunfluoreszenzfärbungen mussten die Tumorschnitte wie auch zur H.E.-Färbung zunächst deparaffinisiert, und rehydriert werden. Anschließend wurden die Schnitte in einem 10mM Zitratpuffer (18ml 0,1M Zitronensäure und 82ml 0,1M Natriumcitrat und 900ml Aqua dest) für 15 min gekocht. Nachdem sie abgekühlt waren, wurden sie 5 min in Aqua dest und 5 min in PBS gewaschen. Nun wurde je nach Färbung (Iba-1; CXCL2, IL8) ein Autofluoreszenz Eliminator (Merck/Millipore, Autofluorescence Eliminator Reagent) nach Protokoll des Herstellers appliziert. Eine Fixierung erfolgte mittels Methanols für 10 min. Für die CD31/CXCR2-Färbung wurde der Autofluoreszenz Eliminator nicht eingesetzt, da er auch die Epitope an den Endothelzellen blockierte. Vor der eigentlichen Färbung sollten nun unspezifische Oberflächenproteine geblockt werden, damit die jeweiligen Antikörper spezifischer binden konnten. Dafür wurde das Gewebe 60 min in 1%ige Casein-PBS-Lösung (Iba-1, CXCL2, IL8) bzw. 30 min in 10%iges Ziegenserum (CD31/CXCR2) gegeben. Danach wurde der Primärantikörper auf das Gewebe gegeben (**Tabelle 5**). Nach 2 h Inkubationszeit mit den Primärantikörpern in einer Dunkelkammer bei Raumtemperatur, wurde die Antikörperlösung abgeschüttelt und die Schnitte 4x für 5 min in 0,5%iger Casein-PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Sekundärantikörper (**Tabelle 6**) auf das Gewebe pipettiert und die Schnitte für 1,5 h in einer Dunkelkammer inkubiert. Vor dem Eindecken mit DAPI Mounting Medium (Sigma Aldrich) wurden die Schnitte 2 x 5 min in PBS und Aqua bidest gewaschen.

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper für die Immunzytochemie

| Primärantikörper | Donor | Verdünnung | Hersteller |
|------------------------------|-----------|------------------|-----------------------------|
| Iba-1 | Ziege | 1:100 | Abcam (ab5076) |
| CXCR2 | Kaninchen | 1:100 bzw. 1/200 | Abcam (ab14935) |
| CXCL2 | Kaninchen | 1:100 | BIO-RAD (AHP773) |
| IL8 | Maus | 1:100 | R&D Systems (MAB208-100) |
| VEGF A | Kaninchen | 1:100 | Abcam (ab1316) |
| VEGFR2 | Kaninchen | 1:200 | Cell Signaling (2479S) |
| CD31 | Maus | 1:50 | DAKO (M0823) |
| CD31 | Maus | 1:25 | R&D Systems (BBA7) |
| AlexaFluor™488 phalloidin | | 1:200 | Thermo Fischer (A12379) |

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunzytochemie

| Sekundärantikörper | Epitop | Verdünnung | Hersteller |
|--------------------|----------------|------------|--|
| Alexa Fluor®647 | anti-Ziege | 1:200 | Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. |
| Cy™3 | anti-Kaninchen | 1.200 | Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. |
| Rhodamine Red | anti-Maus | 1:200 | Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. |
| Fluorescein | anti-Kaninchen | 1:200 | Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. |

Zu Beginn der Arbeit musste zunächst ein Protokoll für die Immunfluoreszenzfärbung an FFPE-Tumorschnitten etabliert werden. Nach intensiven Testfärbungen mit unterschiedlichen Primär- und Sekundärantikörpern ergaben sich wie oben beschrieben unterschiedliche Protokolle für die Einzel- und Kofärbungen. Die Etablierung der CD31/CXCR2-Kofärbung gestaltete sich als besonders schwierig, da insbesondere der CD31-Antikörper in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt werden musste und, da die CXCR2-Färbung mit dem benutzten Antikörper generell noch nicht etabliert war. Zudem konnte der Autofluoreszenzinhibitor nicht eingesetzt werden, was zu einem starken Hintergrundsignal führte. Ein weiteres Problem stellten die autofluoreszierenden Erythrozyten dar, die bei den humanen Proben anders als bei murinen Tumorschnitten nicht durch eine entsprechende Aufbereitung entfernt werden konnten.

5.5. Zellkultur

5.5.1. Auftauen

Für eine längerfristige Lagerung wurden die Zellen in Kryo-Röhrchen (Sarstedt) in einem Stickstofftank bei -196°C gelagert. Damit ihre Funktionsfähigkeit möglichst wenig eingeschränkt wird, wurden sie beim Auftauen direkt in das 37°C warme Wasserbad überführt. Nach 1 Minute im Wasserbad wurden die Zellen sofort in vorgewärmtes Medium (ECGM2/ECM) in die Zellkulturflaschen überführt und für ca. 8h inkubiert. Dann erfolgte der erste Medienwechsel.

5.5.2. Kultivierung von HUVEC-Zellen

Die HUVEC-Zellen wurden in einem Spezialmedium (ECGM2 (Promocell) + Supplemente; + Gentamicin/Amphotericin) in 25cm² und 75cm² Zellkulturflaschen (Falcon®) im Brutschrank bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5%-igem CO₂-Kammerluftanteil kultiviert.

5.5.2.1. Splitten von HUVEC-Zellen

Sobald die Zellen eine ca. 90-%ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie mit dem Detach-Kit von Promocell gesplittet. Dafür wurde das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und mit einem HEPES-Puffer gewaschen. Nun wurde Trypsin/EDTA (0,04%/0,03%) in die Zellkulturflasche gegeben, die dann für 5 min im Brutschrank inkubiert wurde. Trypsin ist eine Serinprotease und spaltet Peptidbindungen, was dafür sorgt, dass sich die Zellen vom Flaschenboden lösen. Nun wurde das neutralisierende TNS (Trypsin Neutralisation Solution) in die Flasche gegeben und die Zellen geerntet. In einem Rundkolbenröhrchen (Falcon®) wurden die Zellen nun bei 900rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet am Boden wurde in 1ml Medium resuspendiert. Davon wurden 10µl entnommen und in eine 96-Well-Platte 1:10 in Trypanblau verdünnt. Nun wurden 10µl aus der verdünnten Lösung aufgenommen und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert, die mit einem Deckplättchen versehen wurde. Nun konnte die Anzahl der Zellen in zehnfacher Vergrößerung lichtmikroskopisch in den vier Quadranten der Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Da Trypanblau tote Zellen anfärbt, konnten diese so von der Zählung ausgeschlossen werden. Unter Berücksichtigung der zehnfachen Verdünnung mit Trypanblau entsprach die Anzahl der Zellen im Raster der Neubauer-Zählkammer einer Konzentration von:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Summe der Zellzahlen}}{4 \text{ Quadranten}} \times 10^5 \times 1 \text{ml}$$

Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden die Zellen je nach Bedarf wieder ausgesät.

5.5.2.2. Einfrieren von HUVEC-Zellen

Wie beim Splitten wurden die Zellen zunächst vom Flaschenboden abgelöst. Statt sie auszusäen, wurden sie in Cryo SFM (PromoCell) resuspendiert und in einer Konzentration von 7,5 x10⁵ Zellen/ml in Kryo-Röhrchen (Sarstedt) pipettiert und dann mittels eines speziellen Einfriercontainers (NalgeneTM; Cryo 1°C Freezing-Container) langsam über 24h auf -80°C heruntergekühlt. Anschließend wurden die Zellen im Stickstofftank bei -196°C dauerhaft gelagert.

5.5.3. Kultivierung von HBMEC-Zellen

HBMEC-Zellen wurden in einem Spezialmedium (ECM, SCIENCECELL + ECGS + P/S) in 25cm² Zellkulturflaschen (Falcon®) im Brutschrank bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5%igem CO₂-Kammerluftanteil kultiviert. Die Zellkulturflaschen wurden am Tag bevor die Zellen in Kultur genommen wurden, mit 15µg/ml Fibronectin (Fibronectin, Human Plasma, Sigma-Aldrich) beschichtet. Das Zellkulturmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

5.5.3.1. Splitten von HBMEC-Zellen

Bei Erreichen einer 90%igen Konfluenz, wurden die Zellen gesplittet. Alle notwendigen Reagenzien wurden auf Raumtemperatur vorgewärmt, da der Hersteller der Zellen von einem Aufwärmen im Wasserbad abrät. Das Medium wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nun wurden 3ml Trypsin/EDTA (0,025%/0,01mM) in die Zellkulturflasche gegeben, die dann für 2 min im Brutschrank inkubiert wurde. Nach Ablauf der 2 Minuten wurde die Zellmorphologie am Mikroskop beurteilt. Ein Großteil der Zellen sollte nun eine rundliche Form haben. Während der Inkubation wurde ein 14ml Rundkolbenröhrchen (Falcon®) mit 2ml FBS vorbereitet. Die Zell-Trypsin/EDTA-Lösung wurde nun vorsichtig abpipettiert und zu den 2ml FBS gegeben. Da sich im ersten Schritt nicht alle Zellen vom Flaschenboden lösen, wurde die T25er-Flasche erneut für 1-2 min inkubiert. Nun wurde unter dem Mikroskop erneut geprüft, ob sich die restlichen Zellen vom Boden gelöst hatten. Falls nicht, wurde sanft von beiden Seiten gegen die Zellkulturflasche geklopft. Sobald sich alle Zellen gelöst hatten, wurden 2ml TNS in die Flasche pipettiert, diese sanft hin und her gekippt und der TNS-Zelllösung in das Rundkolbenröhrchen zu den restlichen Zellen gegeben. Nun wurden die Zellen bei 900rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet am Boden wurde in 500µl Medium resuspendiert. Mittels der Neubauer Zählkammer wurden die Zellkonzentration, wie oben für die HUVEC beschrieben, bestimmt und je nach Bedarf wieder ausgesät.

5.5.3.2. Einfrieren von HBMEC-Zellen

Der Einfrierprozess erfolgte wie bei den HUVEC wie in 5.5.2.2 Einfrieren beschrieben, mit dem einzigen Unterschied, dass 1x10⁶ Zellen/ml eingefroren wurden.

5.5.4. Proliferationsassay

Das Proliferationsverhalten der Endothelzellen unter Einfluss von CXCL2, IL8 und VEGF in unterschiedlichen Konzentrationen wurde mittels des CyQuant-Assays beurteilt. Dafür wurden die Zellen auf 80-90%ige Konfluenz kultiviert, gesplittet und dann zu 16.000-25.000 Zellen pro Well in 96-Well-Platten mit flachem Boden ausgesät und für 24h inkubiert. Anschließend

wurden die Zellen über 16h in Basalmedium + 0,1% FCS ohne Wachstumsfaktoren gehungert. Nun wurden CXCL2, IL8 und VEGF in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 5, 10, 20, 50ng/ml) hinzugegeben und die Zellen wurden für weitere 24h inkubiert. Abschließend wurde nun das CyQuant-Reagenz für 1h hinzugegeben. Nach Ablauf der Stunde erfolgte die Fluoreszenzmessung am Multiwell-Spektrophotometer (Tecan) bei einer Exzitationswellenlänge von 480nm und einer Emissionswellenlänge von 535nm. Des Weiteren wurden alle Wells mikroskopiert und fotografiert. Die weitere Bildverarbeitung und Analyse erfolgte in Image J, Excel und Graphpad Prism.

5.5.5. Stimulationssassay

5.5.5.1. Stimulation mit proangiogenen Proteinen

HUVEC und HBMEC wurden in 6-Well-Platten ausgesät und auf 75-80%ige Konfluenz kultiviert. Für die HBMEC wurden die 6-Well-Platten am Vortag mit 15µg/ml Fibronectin beschichtet. Ein Mediumwechsel erfolgte in dem Zeitraum alle 2 Tage. Sobald die Zellen die richtige Konfluenz erreichten, wurde das Vollmedium abgesaugt und die Zellen für 4h in Hungermedium (Basalmedium +0,5% FCS, +G/A bzw. P/S) weiter kultiviert, um möglichst alle Zellen in einen Zellzyklus-Arrest zu bringen. Dann erfolgte die Behandlung in Voll- und Hungermedium für 4, 16 und 24h mit folgenden Konditionen jeweils in Triplikaten (**Tabelle 7**).

Tabelle 7: Übersicht aller Konditionen der *in vitro* Stimulation mit Proteinen

| HUVEC und HBMEC | |
|--------------------|--|
| Kontrolle | Vollmedium/Basalmedium |
| Kondition A | 5ng/ml VEGF A in Vollmedium/Basalmedium |
| Kondition B | 25ng/ml VEGF A in Vollmedium/Basalmedium |
| Kondition C | 5ng/ml CXCL2 in Vollmedium/Basalmedium |
| Kondition D | 25ng/ml CXCL2 in Vollmedium/Basalmedium |
| Kondition E | 5ng/ml IL8 in Vollmedium/Basalmedium |
| Kondition F | 25ng/ml IL8 in Vollmedium/Basalmedium |

5.5.5.2. Behandlung mit TMZ und SB225002

Aufbauend auf dem in 5.5.5 beschriebenen Stimulationssassay wurde der Effekt von Temozolomid (TMZ) und des CXCR2-Antagonisten SB225002 auf die Endothelzellen untersucht. Dafür wurden HUVEC wie in 5.5.5.1 Stimulation mit proangiogenen Proteinen beschrieben, kultiviert und gehungert und dann in Triplikaten für 24h in Voll- und Hungermedium mit folgenden Konditionen behandelt (**Tabelle 8**).

Für weiterführende Analysen wurde das gleiche Assay auch auf 8-Well-glassbottom-Chamber-Slides durchgeführt (**Abbildung 6**).

Tabelle 8: Übersicht aller Konditionen der *in vitro* Stimulation mit TMZ/SB225002

| HUVEC | |
|--------------------|--|
| Kontrolle | ECGM2/ECBM2 +1% DMSO |
| Kondition 1 | ECGM2/ECBM2 +1% DMSO +25ng/ml CXCL2/IL8 |
| Kondition 2 | ECGM2/ECBM2 +1% DMSO +25ng/ml CXCL2/IL8 +10µM TMZ |
| Kondition 3 | ECGM2/ECBM2 +1% DMSO +25ng/ml CXCL2/IL8 +0,03µM SB225002 |
| Kondition 4 | ECGM2/ECBM2 +1% DMSO +25ng/ml CXCL2/IL8 +10µM TMZ +0,03µM SB225002 |
| Kondition 5 | ECGM2/ECBM2 +1% DMSO +25ng/ml CXCL2/IL8 +10µM TMZ +0,03µM SB225002 |

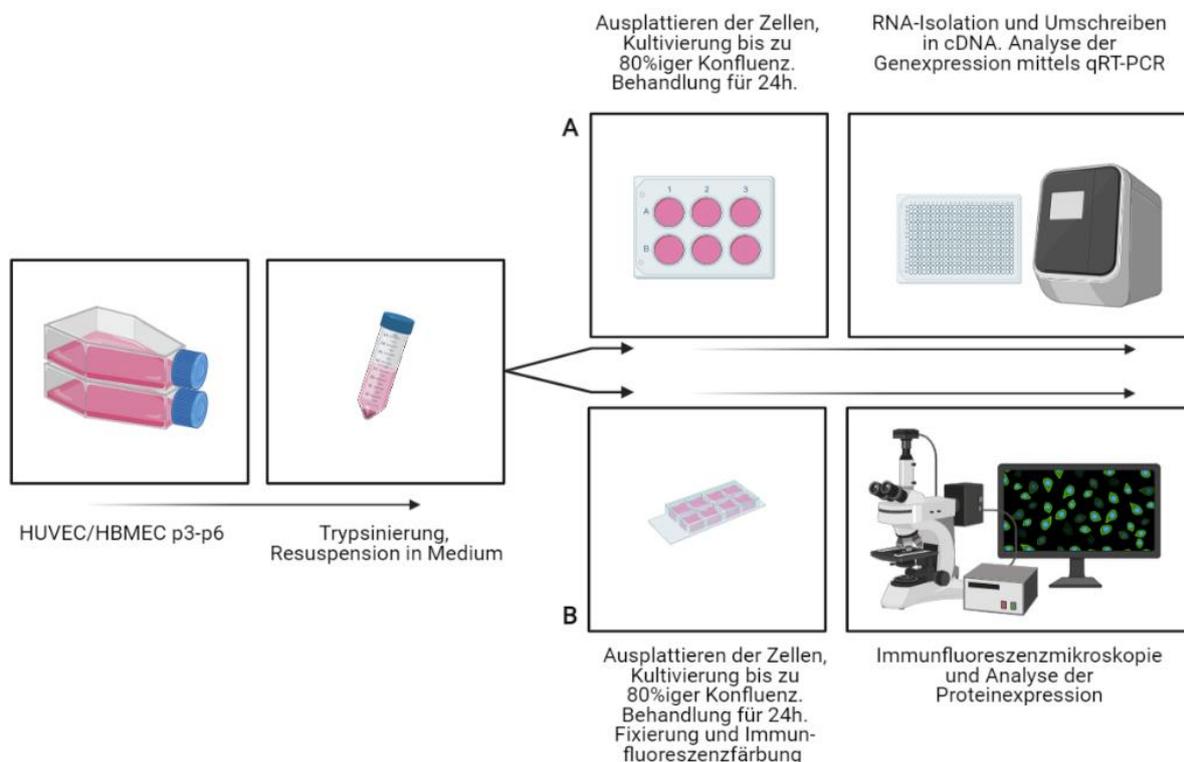


Abbildung 6: Ablauf des Stimulationsassays (HUVEC und HBMEC). Zunächst Kultivierung von HUVEC und HBMECs, splitten und dann A ausplattieren in 6-Well-Platten, Behandlung mit CXCL2, IL8, VEGF, SB225002 sowie Temozolomid nach Protokoll. Nach 24h erfolgt die RNA-Isolation und nachfolgend qRT-PCR. In B (ausschließlich HUVEC) ausplattieren in 8-Well-µ-Slides, Behandlung mit CXCL2, IL8, VEGF, SB225002 sowie Temozolomid nach Protokoll. Im Anschluss Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung von CXCR2 und VEGFR2 und Aufnahme von Bildern am Fluoreszenzmikroskop. Die Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.

5.5.5.3. Zellfixierung

Die wie in 5.5.5.2 Behandlung mit TMZ und SB225002 auf 8-Well-glassbottom-Chamber-Slides kultivierten Zellen, sollten nun fixiert werden. Dafür wurde zunächst das Medium abgesaugt. Dann wurden die Objektträger 2x mit PBS gewaschen und in 4% PFA bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 20 min wurde das 4%ige PFA vorsichtig abpipettiert und die Zellen wurden erneut 2x mit PBS gewaschen. Zur Lagerung wurde dann in jedes Well 100µl PBS gegeben und die Objektträger bei 4°C im Kühlschrank verwahrt.

5.5.5.4. Immunfluoreszenzfärbung

Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden die in 5.5.5.3 Zellfixierung präparierten μ -Slides zunächst mit einer 1%-Casein/PBS-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Dann wurden die Schnitte, je nach Kondition mit einem CXCR2-AK (1:200), VEGFR2-AK (1:200) plus jeweils Phalloidin (1:200) für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörperlösungen wurden anschließend verworfen und die Objektträger 2x für jeweils 5 min in 0,5%iger Casein/PBS-Lösung gewaschen. Nun konnte die Behandlung mit den Sekundäantikörpern, die an ein Fluorchrom gebunden waren, begonnen werden. Um eine ausreichende Antikörper-Antikörper-Reaktion zu gewährleisten, wurden die Schnitte erneut für 90 min in einer Dunkelkammer inkubiert. Die Entfernung der Antikörperlösung erfolgte in 2 Wachschritten auf dem Schüttler für 5 min in PBS. Anschließend wurde noch 1x für 5 min mit bi-distilliertem Wasser (Millipore®) gewaschen. Die 8-Well-Kammern wurden von den Objektträgern abgelöst. Auf die nun trockenen Schnitte wurde dann ein spezielles DAPI- (4',6-Diamidin-2-phenylindol-) Einbettmedium aufgetragen, um auch die Zellkerne anzufärben. Die Objektträger wurden nun eingedeckelt und bei 4°C über Nacht im Dunklen getrocknet. Am nächsten Morgen wurden sie mit Nagellack versiegelt, um ein Austrocknen zu verhindern.

5.5.6. Transwell Migrationsassay

Um das Migrationsverhalten der Endothelzellen unter Einfluss verschiedener Chemokine zu beurteilen, wurde das Transwellassay durchgeführt. Dabei werden die Zellen in ein sogenanntes Insert, eine Art Kammer, ausgesät, welches dann in eine 12 Well-Platte eingesetzt wird. In die Wells werden dann verschiedene Lockstoffe pipettiert. Der Boden der Inserts besteht aus einer semipermeablen Membran mit Poren, durch die die Zellen dann in Richtung des Lockstoffes wandern können.

Beide primären Endothelzellarten wurden bis zu einer 80%igen Konfluenz kultiviert. Dann wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen wurden mit Hungermedium, bestehend aus 0,1% BSA (Bovines Serumalbumin) in Basalmedium ohne Wachstumsfaktoren, gewaschen und anschließend darin für 4h im Inkubator weiter kultiviert. Währenddessen wurden die Inserts mit 10 μ g/ml Fibronectin beschichtet und für 2h bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5%igem CO²-Kammerluftanteil inkubiert. Anschließend wurde das Fibronectin abgesaugt und die Inserts trockneten für 30 min bei Raumluft. Nach Ablauf der 4h wurden die Endothelzellen, wie bereits beschrieben gesplittet und in 0,1% BSA-Hungermedium resuspendiert und gezählt. Mit der gewünschten Zellzahl (5 x 10⁴/ml) wurden nun jeweils 200 μ l in jedes Insert gegeben. Das zu testende Chemokin (CXCL2, IL8 und VEGF) wurde dann in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 5, 10 respektive 20ng/ml) in die 24-Well-Platten pipettiert. Die Inserts wurden vorsichtig in die 24-Well-Platten eingehängt, sodass der Boden der Inserts das Chemokin-haltige-Medium in den Wells

berührte und anschließend für 16h inkubiert. Danach mussten die Zellen fixiert werden, um ihr Migrationsverhalten beurteilen zu können. Dafür wurden sie 5 Minuten in kaltes Methanol gegeben, anschließend für weitere 5 Minuten getrocknet und abschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit DAPI (1:50 in PBS) gefärbt. Nun konnten die Inserts am Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Die aufgenommenen Bilder wurden in ImageJ/Fiji weiterverarbeitet bzw. analysiert.

5.5.7. μ -Slide Chemotaxis

5.5.7.1. Vorbereitung

Tag 1: Zur Gas-Äquibrierung wurden am Tag vor dem Experiment alle μ -Slides sowie die Deckel, Stöpsel und das Medium über Nacht in den Inkubator gestellt. Für das Experiment sind zudem spezielle Pipettenspitzen mit einer abgerundeten Spitze nötig, damit beim Pipettieren nicht zu viel Druck aufgebaut wird.

5.5.7.2. Durchführung

Tag 2: Die Zellen wurden auf 90-95% Konfluenz kultiviert. Nun wurden sie nach dem jeweiligen Protokoll gesplittet und zu einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Die ausgepackten μ -Slides wurden dann in eine quadratische Petrischale gestellt. Um eine allzeit hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten, wurden 2 sterile Tupfer, die zuvor in sterilem PBS getränkt wurden in die Petrischale hineingegeben (**Abbildung 7**).

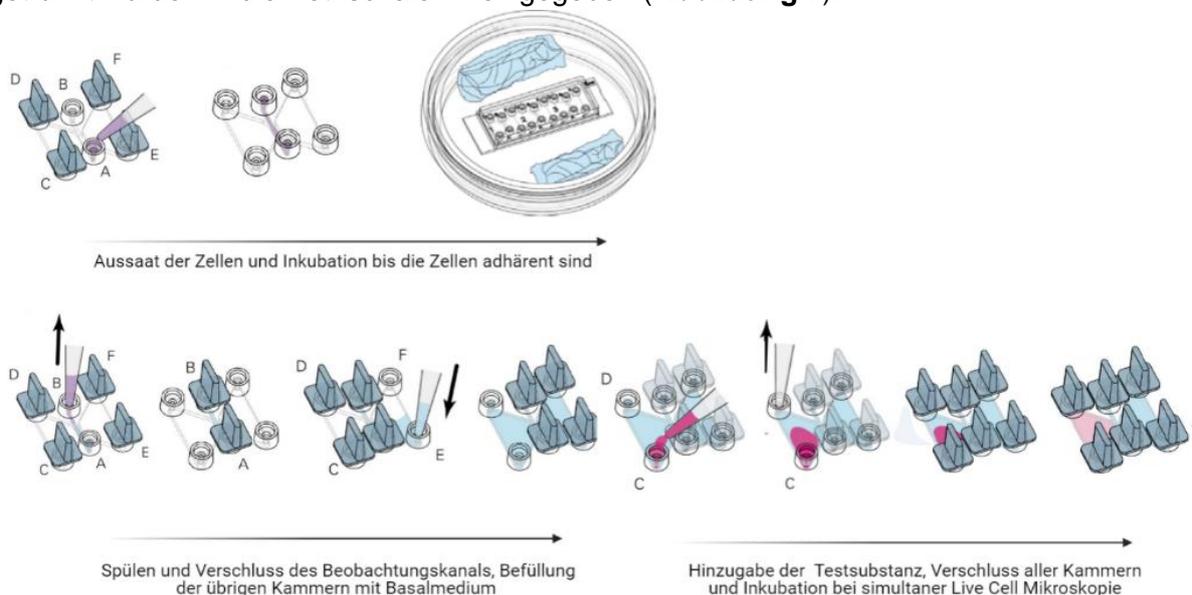


Abbildung 7: Ablauf der μ -Slide-Chemotaxis. Verschließen der Einfüllöffnungen C, D, E und F und anschließende Aussaat der Zellen in den Beobachtungskanal. Inkubation für 1-1,5h des gesamten μ -Slides in einer verschlossenen Petrischale mit eingelegten befeuchteten sterilen Tupfern. Waschen der Zellen zur Entfernung von Zelldebris und Befüllen der beiden die Zellen umgebenden Kammern mit Medium. Dann Hinzugabe der Testsubstanz und Inkubation auf dem Mikroskopiertisch für bis zu 24h bei zeitgleicher Live Cell Mikroskopie. Frei adaptiert nach Ibidi Application Note 17 (115) in Biorender.com

Anschließend wurden die Einfüllöffnungen D, C, E und F vorsichtig mit den dafür vorgesehenen Stöpseln verschlossen (**Abbildung 7**). Daraufhin wurden 6µl der Zellsuspension auf die Einfüllöffnung A pipettiert und direkt danach mit der gleichen Pipettenspitze 6µl Luft aus der Einfüllöffnung B aspiriert. Dafür wurde die Pipettenspitze direkt auf die Einfüllöffnung gesetzt. Durch den Unterdruck wurde die Zellsuspension in den Observationskanal gesogen. Anschließend wurden die Stöpsel von allen Einfüllöffnungen entfernt und das µ-Slide mit dem dafür vorgesehenen Deckel abgedeckt und inkubiert bis die Zellen sich am Boden absetzten und adhärten (ca. 1-1,5h). Die Adhärenz der Zellen wurde am Lichtmikroskop überprüft. Dann wurden die Einfüllöffnungen A, B, C und D mit den Stöpseln verschlossen. In die Einfüllöffnung E wurden nun 65µl Hungermedium gegeben. Anschließend wurden die Stöpsel von den Einfüllöffnungen C und D auf E und F transferiert, sodass nun auch 65µl Hungermedium in Einfüllöffnung C pipettiert werden konnte (**Abbildung 7**). Da nun alle Kammern mit Chemokin-freiem Medium gefüllt waren, wurden die µ-Slides zunächst weiter inkubiert. Die Medien mit jeweils 20 und 200ng/ml CXCL2, IL8 und VEGF-A in Hungermedium wurden nun vorbereitet. Um nun die Chemotaxis zu starten, wurden die µ-Slides aus dem Inkubator genommen und die Einfüllöffnungen A, B, E und F mit den Stöpseln verschlossen. Mit der abgerundeten Pipettenspitze wurden nun 15µl der jeweiligen Lösung wie in **Tabelle 9** angegeben auf die Einfüllöffnung C gegeben. Direkt danach wurden 15µl Hungermedium aus der gegenüberliegenden Einfüllöffnung D aspiriert. Der Vorgang wurde nochmal wiederholt, sodass sich letztendlich 30µl der jeweiligen Lösung in der Kammer befanden. Durch die schon vorher vorhandenen 65µl Hungermedium wurde das Proteinhaltige Medium so um den Faktor 1:1 verdünnt. Die Endkonzentration der Proteine betrug somit 10 und 100ng/ml (**Tabelle 9**) (115). Die µ-Slides wurden nun in das auf 37°C vorgewärmte Widefield-Mikroskop hineingestellt und unter Inkubationsbedingungen (37°C, 5% CO₂) mikroskopiert. Aufnahmen des gesamten Observationskanals wurden in 20-facher Vergrößerung alle 10 min über 12-18h angefertigt und abgespeichert.

Tabelle 9: µ-Slide-Chemotaxis – Etablierung verschiedener Konditionen

| Kondition | HUVEC und HBMEC |
|------------|------------------------------|
| Kontrolle | Basal-/Vollmedium |
| VEGF | 10ng/ml in Basal-/Vollmedium |
| CXCL2 | 10ng/ml in Basal-/Vollmedium |
| IL8 | 10ng/ml in Basal-/Vollmedium |
| SB225002 | in Basal-/Vollmedium |
| CXCL2 + SB | 10ng/ml in SB22002-Medium |

5.5.7.3. Etablierung der Kontrolle und wichtige Messparameter als Grundlage für den Versuchsaufbau

Zur Unterscheidung einer gerichteten Chemotaxis im Vergleich zu einer ungerichteten Chemokinese musste zunächst eine Kontrollgruppe etabliert werden. Dafür wurde das Assay mit einer Negativkontrolle (-/-), die ausschließlich Basalmedium enthielt, einer Positivkontrolle, die ausschließlich Basalmedium + 0.1% FCS enthielt, sowie die Versuchsgruppe mit (-/+) bei der eine der Kammern mit Basalmedium und die zweite Kammer mit Basalmedium + 0.1% FCS befüllt wurde. In diesem Versuchsaufbau galt 0,1% FCS als Lockstoff. Die in der Videomikroskopie aufgenommenen Migrationsverläufe einzelner Zellen wurden in Pixelwerte und Positionsangaben in μm umgerechnet und nachfolgend in ein Koordinatensystem eingeordnet. Der Startpunkt jeder einzelnen Zelle wurde als $x = 0$ und $y = 0$ zum Zeitpunkt $t = 0$ normiert. Die Migrationsverläufe konnten so graphisch dargestellt werden, zudem ermöglicht diese Einteilung eine normierte Analyse der einzelnen Zellen hinsichtlich der Chemotaxis und Chemokinese. Der COM (center of mass) gibt den Schwerpunkt der Streckenendpunkte aller untersuchten Zellen an. Die Forward migration indices (x-FMI und y-FMI) beschreiben die Zellbewegung entlang der jeweiligen Achse. In diesem Versuchsssetup steht der y-FMI (FMI^{\parallel}) parallel zum Gradienten und der x-FMI (FMI^{\perp}) senkrecht zum Gradienten. Bei einer gerichteten Zellmigration sollte der $\text{FMI}^{\perp} > 0$ sein und der FMI^{\parallel} möglichst um 0 herum liegen. Zur Quantifizierung der Zellmigration wurden COM, FMI, Rayleigh-Test, Zellgeschwindigkeit und die Direktheit untersucht (**Tabelle 10**).

Tabelle 10: μ -Slide Chemotaxis – Etablierung der Kontrolle.

| HUVEC | COM | FMI | | p-Value | Direktheit | Velocity |
|-------|-----------------------------|-------------|---------|-----------------|------------|------------------------------|
| | ($\mu\text{m}/6\text{h}$) | \parallel | \perp | (Rayleigh-Test) | | ($\mu\text{m}/\text{min}$) |
| -/- | 5,32 | -0,001 | 0,006 | 0,89 | 0,30 | 0,47 (0,07-1,00) |
| +/+ | 28,50 | -0,041 | 0,126 | 0,02 | 0,37 | 0,61 (0,26-1,27) |
| +/- | 29,83 | 0,077 | -0,089 | 0,14 | 0,39 | 0,61 (0,22-1,34) |

Repräsentatives Experiment zur Etablierung der Kontrolle (0.1% FCS). COM (center of mass), FMI (forward migration index) mit x-FMI = FMI^{\parallel} parallel und y-FMI = FMI^{\perp} senkrecht zum Gradienten, p-Value (Rayleigh-Test), Direktheit (Direktheit), Velocity (Zellgeschwindigkeit, mit Angabe von Min und Max).

Die Nullhypothese des Rayleigh-Tests beruht auf einer gleichmäßigen kreisförmigen Verteilung von Punkten - in unserem Fall den Zellen. Ist $p < 0,05$ wird die Nullhypothese verworfen und die Zellen gelten als nicht homogen verteilt (116) und eine gerichtete Chemotaxis als wahrscheinlich. Die „Direktheit“ ist ein Maß für die Geradlinigkeit der Migration von Zellen. $D = 1$ beschreibt die direkte geradlinige Migration der Zellen vom Start- zum Endpunkt und wird berechnet in dem man die euklidische Strecke (euclidian distance) durch

die akkumulierte Strecke (accumulated distance) der Zellen teilt. Es handelt sich hierbei nicht um einen direkten Parameter, um die Chemotaxis einzuschätzen. Die „Direktheit“ kann allerdings hilfreich sein, um die Migration der Zellen besser zu charakterisieren.

In Abwesenheit eines Gradienten sollten die Zellen homogen in alle Richtungen wandern. Unter dieser Annahme sollte der COM-Wert der Positiv- und Negativkontrolle klein sein und somit nahe am Koordinatenursprung liegen. Ein hoher COM-Wert deutet theoretisch auf ein gerichtetes Migrationsmuster hin. Diese Annahme konnte für die Negativkontrolle (5,32 μ m) bestätigt werden, allerdings zeigte sich bei der Positivkontrolle (28,50 μ m) widererwarten auch ein hoher COM-Wert. Chemotaktische Effekte sind zudem definiert durch einen hohen FMI^{||}-Wert (positiv oder negativ) und einen niedrigen FMI[⊥]-Wert, da sich die Zellen parallel zum Lockstoffgradienten bewegen. Hier zeigte sich erneut, dass die FMI-Indices für die Negativkontrolle beide um 0 herum lagen, während sich für die Positivkontrolle höhere x- und y-FMI-Werte zeigten. Die Zellen wanderten demnach sowohl entlang des Konzentrationsgradienten als auch senkrecht zu diesem. Für die Lockstoffmessung mit 0,1% FCS zeigte sich der höchste FMI^{||}-Wert mit 0,077. Zuletzt ist noch der Rayleigh-Test ausschlaggebend. Dabei zeigte sich eine homogene Verteilung der Zellen der Negativkontrolle ($p=0,89$) und auch hier widererwarten eine inhomogene Verteilung der Positivkontrolle ($p=0,02$). Der Rayleigh-Test in der Lockstoffgruppe zeigte lediglich eine Tendenz zur inhomogenen Verteilung der Zellen. Die „Direktheit“ lagen für (-/-) bei 0,30, für (+/+) bei 0,37 und für (+/-) bei 0,39. Demnach migrierten die Zellen in der Lockstoffgruppe am direktesten zu ihrem Endpunkt. Die Geschwindigkeit im Mittel lag für die (+/-) Gruppe bei 0,61 μ m/min mit einer Spanne von 0,22-1,34 μ m/min. Für die (+/+) Gruppe war diese identisch (Spanne 0,26 - 1,27). Damit waren die Zellen, die den Lockstoff erhielten schneller als die der Negativkontrolle. Diese wanderten im Durchschnitt mit einer Geschwindigkeit von 0,47 μ m/min (0,07-1,0 μ m/min). In der Zusammenschau der Ergebnisse kann also nicht auf einen chemotaktischen Effekt von 0,1% FCS geschlossen werden, sondern lediglich auf einen chemokinetischen Effekt. In **Abbildung 8a** sind die Plots des Migrationsverhaltens der einzelnen Zellen in den unterschiedlichen Gruppen dargestellt. Der Lockstoffgradient der (+/-) Gruppe verläuft dabei parallel zur Y-Achse.

Repräsentative Bilder zum Zeitpunkt des Beginns sowie des Endes eines Versuchs sind in **Abbildung 8b** dargestellt. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass 0,1% FCS als Kontrollmedium für den darauffolgenden eigentlich Versuch genutzt werden konnte und keinen spezifischen chemotaktischen Effekt auf die HUVEC hatte.

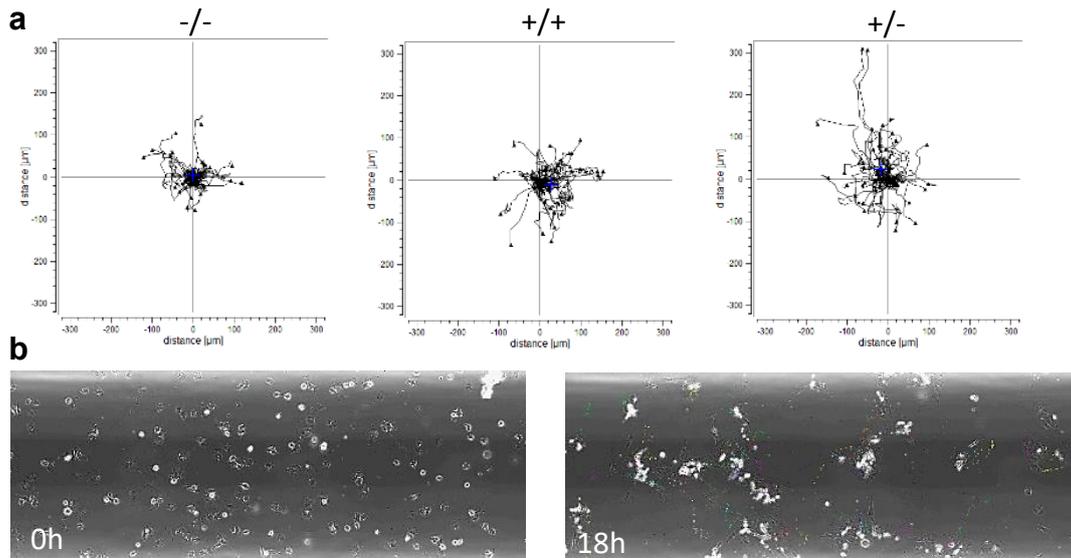


Abbildung 8: μ -Slide Chemotaxis - Etablierung der Kontrolle mit 0.1% FCS. Durchführung der μ -Slide Chemotaxis mit (+) und ohne (-) 0.1% FCS. (a) Darstellung der individuellen Wege aller beobachteten Zellen. COM: blaues Kreuz, Angabe der Distanz in μm . (b) Repräsentative Bilder des Beobachtungskanals zu Beginn ($t = 0\text{h}$) und nach 18h mit eingezeichneten Wegen der einzelnen Zellen; repräsentatives Experiment; $n \geq 40$ Zellen/Kondition.

5.5.8. 3D Sphäroid-basierte Angiogenese

Die Sphäroid-basierte Angiogenese ist ein für eine Vielzahl an Endothelzellen etabliertes 3-dimensionales Modell, welches eine Nachahmung der Neubildung von Gefäßen durch das „Sprouting“ von Endothelzellen *in vitro* ermöglicht (117, 118). Für die HBMEC hingegen existieren bis dato nur Daten zu multizellulären Sphäroiden (119, 120), sodass ein Protokoll zur Generierung von HBMEC-Sphäroiden und für die Durchführung des Assays erst etabliert werden musste.

5.5.8.1. Vorbereitung

Herstellung von 1,2% Methocel: 1,5g Methylcellulose wurden mit der Feinwaage abgewogen und in einer Glasflasche bei 127°C autoklaviert. Nun wurde das jeweilige Basalmedium (ECGM2 oder ECM) im Wasserbad auf 37°C aufgewärmt. Unter der Sterilbank wurden 125ml Basalmedium unter ständigem Rühren auf einer Heizplatte zur Methylcellulose hinzugegeben und für 30 min bei 60°C weiter gemischt. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde sie über Nacht bei 4°C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden dann 50ml Aliquots der Lösung für 3 Stunden bei 4000rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand erneut aliquotiert und bei 4°C im Kühlschrank für maximal 3 Monate gelagert. Für die Herstellung von 0,6% Methocel wurde dementsprechend weniger Methylcellulose abgewogen und wie oben beschrieben weiter verarbeitet.

5.5.8.2. Durchführung

Tag 1: Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert und dann nach dem jeweiligen Protokoll gesplittet. Für 120 Sphäroide wurden 1ml 0,6% (für HUVEC) respektive 1,2% (für HBMEC) Methocel mit 4ml Basalmedium mit 20.000 (HUVEC) respektive 40.000 (HBMEC) Zellen/ml gemischt. Das entspricht 500/1000 Zellen pro Sphäroid (25µl). Die optimale Zellzahl wurde im Rahmen des Etablierungsverfahrens mit 500-3000 Zellen pro Sphäroid je nach Zellreihe ausprobiert. Mit einer Multikanalpipette wurden nun 120-mal je 25µl auf eine quadratische Petrischale ausplattiert und für 24h falschherum als „hanging drops“ inkubiert (**Abbildung 9**). Da sich die quadratischen Petrischalen nicht mikroskopieren lassen, wurden als Kontrolle der Sphäroidformierung jeweils auch 10 Sphäroide in eine 96-Well-Rundboden-Platte pipettiert und nach 24h mikroskopiert.

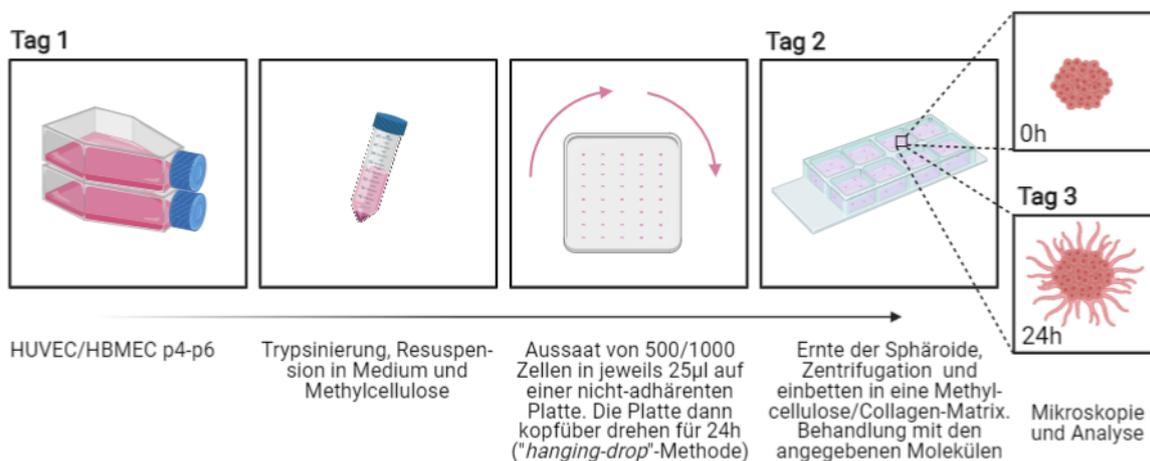


Abbildung 9: Schematische Darstellung des 3D-Sphäroid-basierten Angiogeneseassays. Zunächst wurden HUVEC und HBMEC kultiviert, dann gesplittet und schließlich mittels der „hanging drop“-Methode Sphäroide generiert. Diese wurden nach 24h in eine Methylcellulose-Kollagen-Matrix ausgesät und wie angegeben behandelt. Weitere 24h erfolgte die Konfokalmikroskopie und anschließende Analyse hinsichtlich der Sproutlänge und Sproutingfläche. Erstellt mit Biorender.com

Tag 2: 0,125ml Basalmedium (ECGM2/ECM) und 1ml Kollagen-Stammlösung (3mg/ml; Ibdirat tail collagen) wurden vorsichtig in einem 2ml Eppendorf-Gefäß gemischt und anschließend auf Eis platziert. Anschließend wurden die Sphäroide mit 5ml PBS/10% FCS geerntet. Die 10%ige FCS-Lösung wurde vorsichtig auf die quadratischen Petrischalen verteilt und anschließend mit einer 5ml sterilen Glaspipette wieder aufgenommen und in ein 15ml konisches Falcon-Gefäß gegeben. Die Sphäroide wurden nun für drei Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Darauf folgend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Falcon-Gefäße rasch über einen unebenen Untergrund gezogen. Dies ist notwendig, damit die Sphäroide nicht aneinanderkleben. Zusätzlich musste darauf geachtet werden, dass das Pellet

spätestens nach 15-20 Minuten resuspendiert wird. 1,125ml Methocelstammlösung (1,2%) wurden nun auf das Pellet herauf pipettiert. Direkt bevor die Kollagenstammlösung mit dem Sphäroid-Methocel pellet vermischt wurde, musste diese neutralisiert werden, damit sie nicht vorher polymerisierte. Der pH-Wert der Kollagenstammlösung sollte optimalerweise bei 7,4 liegen und wurde mittels eiskalter Neutralisierungslösung (0,2 N NaOH) eingestellt. Die neutralisierte Kollagenlösung musste weiterhin auf Eis gelagert werden. Nun wurden die 1,125ml Kollagenlösung rasch, aber vorsichtig mit den Sphäroiden in 1,125ml Methocel vermischt. Eine homogene Dispersion ist hier enorm wichtig zur Formierung einer klaren, Sproutbildung unterstützenden Matrix. Die Kollagen-Sphäroidmischung wurde nun gleichmäßig auf vorgewärmte 8-Well μ -Slide Glasplatten (8 x 0,15ml) pipettiert und im Inkubator platziert (37°C, 5% CO₂, 100% Feuchtigkeit). Nach 1-1,5h konnten die Sphäroide nun stimuliert werden. Dafür wurden 150-200 μ l Medium mit dem zu testenden Molekül (z.B. VEGF, CXCL2, IL8, SB225002 s. **Tabelle 11** und **Tabelle 12.**) in der gewünschten Konzentration in jedes Well pipettiert und weiter inkubiert. Nach 24h wurden dann von jedem Sphäroid konfokale Hellfeld- oder Phasenkontrastbilder in 10- bzw. 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

Tabelle 11: 3D-Sphäroid basierte Angiogenese – Konditionen Schritt 1

| Kondition | HUVEC und HBMEC |
|-----------|----------------------------|
| Kontrolle | Basalmedium |
| VEGF | 25/50/100ng/ml Basalmedium |
| CXCL2 | 25/50/100ng/ml Basalmedium |
| IL8 | 25/50/100ng/ml Basalmedium |

Tabelle 12: 3D-Sphäroid basierte Angiogenese – Konditionen Schritt 2

| Kondition | HBMEC |
|------------|--|
| Kontrolle | Basalmedium |
| VEGF | 50ng/ml in Basalmedium |
| CXCL2 | 25ng/ml in Basalmedium |
| IL8 | 50ng/ml in Basalmedium |
| SB225002 | 0,125/0,06/0,03 μ M in Basalmedium |
| VEGF +SB | 50ng/ml/0,06 μ M SB22002-Medium |
| CXCL2 + SB | 25/0,06 μ M SB22002-Medium |
| IL8 + SB | 50/0,06 μ M SB22002-Medium |

5.6. Molekularbiologische Methoden

5.6.1. RNA-Isolierung

Aus den in 5.5.5.1 und 5.5.5.2 gewonnenen Zellen wurde mit Hilfe des PureLink™ RNA Mini Kit von ambion® nach Herstellerangaben RNA isoliert. Die Aufreinigung erfolgte über Kieselgelsäulen. Nach Auftragen der Proben inklusive multipler Waschschriffe wurde die RNA mit 35µl RNase freiem Wasser mit Hilfe eines Zentrifugationsschrittes (12.000g für 2 min) eluiert. Die RNA wurde umgehend auf Eis gegeben und bei -80°C gelagert.

5.6.2. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung von RNA mittels eines Spektrophotometers ist eine gängige Methode. Es ist in der Lage die durchschnittliche Konzentration, sowie die Reinheit der RNA in der vorliegenden Probe zu messen. Verwendet wurde das Photometer Tecan Infinite® 200 PRO. Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung beruht dabei darauf, dass Nukleinsäuren ultraviolettes Licht in einem bestimmten Muster absorbieren. Das Absorptionsmaximum liegt bei 260nm. Wird die RNA nun UV-Licht mit einer Wellenlänge von 260nm ausgesetzt, misst ein Photometer das Licht, dass durch die Probe hindurch geht. Je mehr UV-Licht von der Probe absorbiert wird, desto höher ist die Nukleinsäurekonzentration, also auch die optische Dichte (OD) der Probe. Mit Hilfe des Verdünnungsfaktors und eines für RNA spezifischen Faktors (40) kann man nun mit Hilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes die RNA-Konzentration bestimmen:

$$c (\mu\text{g/ml}) = OD_{260\text{nm}} \times 40 \times VF$$

Zur Bestimmung der Reinheit der Probe wird dann ein Quotient aus der OD bei 260nm und bei 280nm gebildet, dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Reine RNA-Proben bewegen sich im Rahmen von 1,8-2,0. Liegt der Wert darunter, ist der Anteil an Proteinen höher und die Probe somit verunreinigt. Man sollte diese Methode also nur dann verwenden, wenn man sich sicher ist, dass die Probe auch wirklich RNA enthält (121).

5.6.3. Reverse Transkription

Die in 5.6.1 gewonnene RNA sollte nun für weitere Analysen in komplementäre cDNA umgeschrieben werden, um sie anschließend im Rahmen einer quantitativen Real-Time PCR zu quantifizieren. Zur Reversen Transkription wurde das PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser von TAKARA verwendet. Die Reverse Transkription besteht grundlegend aus zwei Schritten. Im ersten Schritt wird die genomische DNA eliminiert. Diese kann durch Verunreinigung bei der RNA-Isolation anfallen. Im zweiten Schritt findet dann die eigentliche Reverse Transkription statt. Für den ersten Schritt wurde ein Mastermix nach Angaben in **Tabelle 13** hergestellt. Es wurden pro Probe 500ng RNA eingesetzt. Das Reaktionsgemisch

wurde im Thermocycler (Bio-Center, GE4852T) auf 42°C erhitzt, für 2 min inkubiert und dann auf Eis gelagert. Nun wurde der Mastermix zur cDNA-Synthese (Schritt 2, **Tabelle 14**) zum Reaktionsgemisch aus Schritt 1 hinzugefügt und für 25 min bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Darauf folgte die 2-minütige Inaktivierung der Transkriptase, um so ein Ende der Reaktion herbeizuführen. Die Tubes mit 20µl Gesamtvolumen wurden nun 1:10 in RNase freiem Wasser verdünnt und dann bei -20°C gelagert.

Tabelle 13: Schritt 1 - gDNA Eliminierung

| Reagenz | Volumina | Inkubationsdauer |
|--|----------|------------------|
| 5X gDNA Erase Buffer | 2,0µl | 2 min bei 42°C |
| gDNA Eraser | 1,0µl | |
| RNA (500ng) in RNase free H ₂ O | 7,0µl | |

Tabelle 14: Schritt 2 – Reverse Transkription

| Reagenz | Volumina | Inkubationsdauer |
|---|----------|--------------------|
| 5X PrimeScript Buffer 2 (for Real Time) | 4,0µl | 25 min bei 37°C |
| PrimScript RT Enzyme Mix I | 1,0µl | |
| RT Primer Mix | 1,0µl | 5 sek bei 85°C |
| RNase free H ₂ O | 4,0µl | Lagerung bei -20°C |

5.6.4. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Eine moderne Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren in Echtzeit ist die Real Time quantitative PCR zu Deutsch quantitative Echtzeit-PCR. Der Begriff ist etwas ungenau gewählt und wird besser beschrieben als quantitative Real Time Detection PCR. Der Unterschied zur herkömmlichen PCR ist, dass bereits während des Amplifikationsvorgangs der eingesetzten Nukleinsäuren Messungen mittels eine Fluoreszenzsignals durchgeführt werden können. Dadurch ist die Quantifizierung deutlich präziser. Für sämtliche Analysen wurde das TB Green™ Premix Ex Taq™ Kit von TaKaRa genutzt. Darin enthalten ist der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green. Dieser interkaliert zwischen doppelsträngiger DNA und lässt sich bei einer charakteristischen Wellenlänge anregen und führt dadurch wiederum zu Lichtemissionen. Sobald der Farbstoff zu einer Probe hinzugegeben wird, bindet er an jede doppelsträngige DNA in der Probe. Während der PCR amplifiziert die DNA-Polymerase die Zielsequenz der spezifisch eingesetzten Primerpaare (**Tabelle 16**) und erzeugt so die PCR-Produkte. Der SYBR-Farbstoff bindet an jede neue Kopie der doppelsträngigen DNA. Das Fluoreszenzsignal erhöht sich so proportional zur Menge des hergestellten PCR-Produkts. Ein wesentlicher Vorteil des SYBR Farbstoffs ist, dass jede beliebige DNA-Sequenz mit dessen Hilfe amplifiziert werden kann. Die Quantifizierung erfolgt allerdings nicht über absolute Mengen an PCR-

Produkt. Stattdessen wird die Kinetik der PCR-Reaktion genutzt. Während in frühen PCR-Runden eine mehr oder weniger exponentielle Vermehrung an cDNA-Fragmenten stattfindet, erreicht diese im Verlauf ein Plateau und stagniert schließlich. Quantifiziert wird der Zeitpunkt bzw. die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal durch die exponentielle Vermehrung erstmals deutlich vom Hintergrund abhebt. Dies nennt man den cycle threshold (C_T -Wert) (121, 122). Die Quantifizierung erfolgt dann relativ, indem der C_T -Wert des Zielgens mit dem C_T -Wert eines ubiquitär exprimierten Gens verglichen wird. Als interne Kontrolle wurde 18S genutzt. Der C_T -Wert des Kontrollgens wird in jeder Probe vom C_T -Wert des Zielgens subtrahiert, wodurch sich der ΔC_T -Wert ergibt. Die ΔC_T -Werte der Zielgene werden dann von den ΔC_T -Werten der Kontrollen subtrahiert. Daraus ergeben sich die $\Delta\Delta C_T$ -Werte (122). Die relative Expression eines Zielgens im Verhältnis zum Referenzgen lautet also:

$$\Delta C_T = C_{T\text{ZIELGEN}} - C_{T\text{KONTROLLE}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{BEHANDELTE GRUPPE}} - \Delta C_{T\text{REFERENZGRUPPE}}$$

$$\text{Potenz} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Der Mastermix für die qPCR setzte sich wie in **Tabelle 15** beschrieben zusammen. Er wurde mit einer Multistepper Pipette auf eine 384-Well Platte (MicroAmp®) pipettiert. Alle Proben wurden in Triplikaten ausplattiert. Die Platte wurde anschließend mit dem Applied Biosystems™ MicroAmp™ Optical Adhesive Film verschlossen, bei 1000rpm zentrifugiert und in das Messgerät gegeben (QuantStudio 6 Flex, Thermo Scientific). Die Einstellung des Geräts erfolgte über QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.3. Die weitere Analyse erfolgte in eben diesem, Microsoft Excel und Graphpad Prism. Die zur Amplifikation genutzten Primer wurden von der Firma TIB MolBiol synthetisiert (**Tabelle 16**). Wenn nicht anders angegeben, wurden die Primer mit Hilfe der Datenbank „Primer-BLAST“ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) des „NCBI National Center for Biotechnology Information“ entworfen.

Tabelle 15: Zusammensetzung des bei der qPCR verwendeten Mastermixes

| Reagenz | Volumina | PCR-Programm | |
|----------------------|----------|--------------|-----|
| SYBR Green | 5,0µl | 95°C 30 sek | |
| Primer fw+rev (10µM) | 0,4µl | 95°C 5 sek | |
| ROX II (1:3) | 0,2µl | 60°C 30 sek | 40x |
| RNAse free H2O | 0,4µl | 95 °C 15 sek | |
| cDNA (1:20) | 4,0µl | 60°C 60 sek | |
| | | 95 °C 15 sek | |
| | | | |

Tabelle 16: qPCR-Primersequenzen

| Gen | | Primersequenz 5' → 3' | Ref. | Hersteller |
|---------------|-----|---------------------------|-------|--------------------|
| 18S | fwd | GGCCCTGTAATTGGAATGAGTC | (123) | |
| | rev | CCAAGATCCAACACTACGAGCTT | | |
| VEGFR1 | fwd | CAGGCCAGTTTCTGCCATT | * | |
| | rev | TTCCAGCTCAGCGTGGTCGTA | | |
| VEGFR2 | fwd | CATGTACGGTCTATGCCATTCCTC | * | |
| | rev | TTGGCGCACTCTTCCTCCAAC | | |
| hVEGFA | fwd | TGCAGATTATGCGGATCAAACC | (124) | |
| | rev | TGCATTCACATTTGTTGTGCTGTAG | | |
| CXCR2 | fwd | GGTGTCTACAGGTGAAAAG | * | |
| | rev | TGTCACTCTCCATGTTAAAA | | |
| hCXCR1 | fwd | GCAGCTCCTACTGTTGGACA | * | TIB Molbiol Berlin |
| | rev | GCCCTACCCACAGAAAGTC | | |
| hCXCL2 | fwd | TCCCTTGGACATTTTATGTCTTTC | * | |
| | rev | TCTCTGCTCTAACACAGAGGGA | | |
| hIL8 | fwd | CTGAGAGTGATTGAGAGTGG | (125) | |
| | rev | ACAACCCTCTGCACCCAGTT | | |
| hBAX | fwd | GCCTTTTGCTTCAGGGTTT | * | |
| | rev | TGAGACACTCGCTCAGCTTC | | |
| hBCL2 | fwd | TGCGGCCTCTGTTTGATTTC | * | |
| | rev | GGCAGGCATGTTGACTTCAC | | |

* = eigener Entwurf

5.7. Mikroskopiemethoden

5.7.1. Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist eine Form der Lichtmikroskopie und nutzt bestimmte Eigenschaften fluoreszenter Stoffe, sogenannter Fluorochrome, aus. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und dadurch auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Dieser Zustand ist instabil, sodass sie wenige Nanosekunden später auf das Ausgangsniveau zurückfallen. Dabei wird die freigesetzte Energie in Form eines Photons in einer veränderten Wellenlänge wieder abgegeben. Dies macht man sich zu Nutze, indem bestimmte Filter angewendet werden, um ausschließlich das abgestrahlte Licht zu detektieren und lokalisieren. Je nach Immunfluoreszenzfarbstoff gibt es spezifische Anregungs- und Emissionsspektren (126-128). Um Zellstrukturen darzustellen, müssen diese vor der Mikroskopie mit einem Fluorochrom-markierten Antikörper angefärbt werden. Mikroskopiert wurde mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Zeiss Axio Observer Z1, Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, München, Deutschland). Mit Hilfe der Kamera (Camera AxioCam MRc, Carl Zeiss, Micro Imaging, GmbH, München

Deutschland) und der Fotosoftware AxioVision (Release 4.8.2 (06-2010)) wurden pro Tumorfärbung 5-25 Bilder bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Anzahl der Bilder der Zellkulturen siehe dort. Die Bilder entsprechen eine Fläche von 0,351mm² und haben eine Auflösung von 1388x1040 Pixeln. Jedes Bild wurde mit vier verschiedenen Fluoreszenzfiltern (DAPI-Filter [Zellkerne], GFP-Filter für die CXCL2-, IL8- sowie CXCR2-Färbung, Cy5-Filter für die Iba-1-Färbung [Mikroglia und Makrophagen], Cy3-Filter für die Blutgefäße) aufgenommen und als Gesamtbild der Überlagerung aller Kanäle sowie als Einzelbilder abgespeichert. Insgesamt entstanden ca. 3000 Bilder der Tumorschnitte sowie weitere 200 Bilder der Zellkulturen.

5.7.2. Konfokalmikroskopie

Die konfokale Mikroskopie ist eine moderne Methode, die es ermöglicht Zellen, Organoide oder sonstige Zielstrukturen 3-dimensional und punktgenau darzustellen. Die Probe wird vom Mikroskop sequenziell also Punkt für Punkt in x-, y- und z-Richtung beleuchtet und abgebildet. Zu jedem Zeitpunkt wird nur ein Teil der Probe angeleuchtet. Im Strahlengang des detektierten Lichts ist eine Lochblende integriert, die nur Licht aus dem scharf abgebildeten Bereich durchlässt, sodass nur wenig Licht direkt um den Fokuspunkt zum Detektor gelangt, wodurch Schnittbilder mit einem guten Kontrast ermöglicht werden (129) (**Abbildung 10**).

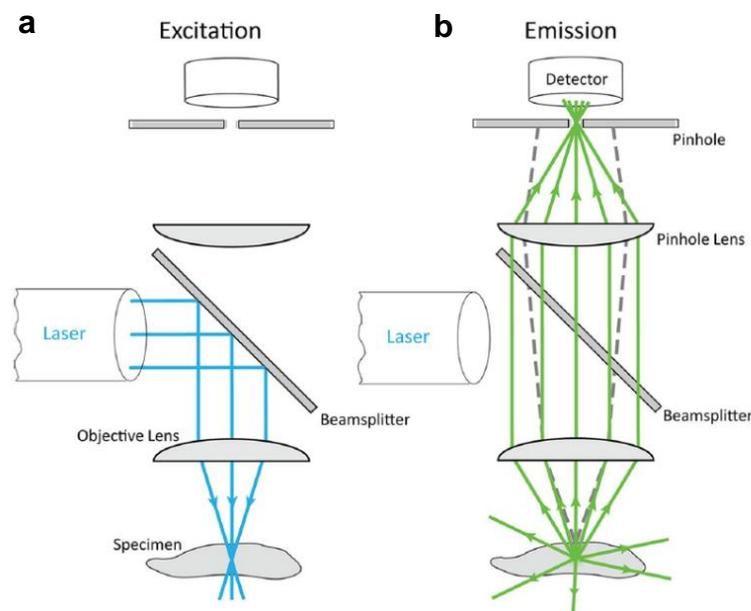


Abbildung 10: Prinzip der Konfokalen Mikroskopie. Schematisches Bild zur Veranschaulichung des Prinzips der Konfokalmikroskopie. In (a) ist die Exzitation und in (b) die Emission des Lichts dargestellt. Ein Laserstrahl (blaue Linien) wird auf einen Punkt der Probe fokussiert und vom gesamten Lichtkegel angeleuchtet. Das vom Fokus emittierte Licht (grüne Linien) wird von der Objektivlinse gebündelt und von einer zweiten Linse durch eine Lochblende (pinhole Lens) auf den Detektor fokussiert. Licht, das von außerhalb des Fokus emittiert wird, z.B. von der Oberfläche der Probe (grau gestrichelte Linie), wird nicht durch die Lochblende abgebildet und ist demzufolge weitgehend blockiert. Entnommen aus: *Methods in Cell Biology*, Jennifer Waters und Torsten Wittmann, Figure 7.2, Kapitel 7, S.116. (130)

Je kleiner die Lochblende, desto geringer ist auch die Fokustiefe. Mit den Pixel-Informationen zu jedem Punkt wird dann ein 2-dimensionales Rasterbild generiert. Durch das Ändern des Fokus kann eine ganze Probe in allen Ebenen abgebildet werden. Die Einzelbilder werden dann am Computer zu einem 3D-Bild zusammengefügt (129, 130). Verwendet wurde das Nikon A1Rsi+ Mikroskop für Hellfeld- und Phasenkontrastaufnahmen von Sphäroiden. Vorteile der Konfokalmikroskopie sind scharfe Bilder, das hohe Auflösungsvermögen und die Möglichkeit präzise 3D-Rekonstruktionen zu erschaffen. Auch die Morphologie bis auf Zellebene und Interaktion mehrerer Zellen miteinander lässt sich mittels der Konfokalmikroskopie beurteilen. Nachteile sind hingegen der hohe Zeitaufwand sowohl während des Mikroskopierprozesses als auch bei der Weiterverarbeitung der Daten.

5.7.3. Live-Cell-Mikroskopie

In der Live-Cell-Mikroskopie können lebende Zellen in Echtzeit mikroskopiert und so über einen definierten Zeitraum beobachtet werden. Dadurch erhält man Einblicke in die Dynamik und Interaktion der Zellen untereinander. Verwendet wurde das Nikon Widefield Ti2 Mikroskop und die dazugehörige Mikroskopie-Software. In der Widefield-Mikroskopie wird die Probe im Gegensatz zur Konfokal-Mikroskopie zu jeder Zeit als Ganzes angeleuchtet. Durch Phasenkontrast kann die Bildqualität noch gesteigert werden, deshalb wurde das Chemotaxis-Assay im Phasenkontrast mikroskopiert. Diese Art der Analyse wurde genutzt, um das Migrationsverhalten von den Endothelzellen in den μ -Slides aus 5.5.7 zu beobachten. Genutzt wurde eine Lebendzellkammer, in der die gleichen Bedingungen wie in einem Inkubator vorherrschten, also 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5%-igem CO₂-Kammerluftanteil. Zu Beginn wurde der Software-gesteuerte Mikroskopiertisch, auf dem jeweils drei μ -Slides Platz hatten, programmiert. Die Positionen des Tisches wurden so eingestellt, dass er in einem Intervall von 10 Minuten alle 9 Beobachtungskanäle der 3 μ -Slides abfuhr und von jedem Kanal ein Mosaikbild anfertigte. Dadurch war es möglich zeitgleich alle 9 Kammern innerhalb eines Experiments zu beobachten. Pro Kammer wurden je nach Beobachtungsdauer 91 bis 144 Aufnahmen (15, 18 bzw. 24 Stunden x 60 Minuten ÷ 10 Minuten) gemacht. Diese wurden von der Software pro Kammer zu einer Videosequenz zusammengefügt, sodass sie der Reihe nach als Film abgespielt und ausgewertet werden konnten.

5.8. Datenanalyse

5.8.1. Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyse erfolgte mittels der Bildbearbeitungssoftware ImageJ 1.50i (National Institute of Health, USA). Mithilfe der integrierten Tools wurden Zellen und Blutgefäße ausgezählt sowie Flächen inklusive der Gesamtfläche der Tumorschnitte und der Gefäße ermittelt. Für das Stimulationsassay wurde zudem die mean intensity der aufgenommenen Bilder berechnet. Grundlage dessen ist es, dass alle Bilder mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen werden konnten und somit die Fluoreszenz quantitativ messbar ist. Im Verlauf dieser Dissertation wird die mean intensity des gesamten Bildes angegeben. Im Rahmen der Etablierung der Auswertung wurde auch die mean intensity einzelner Zellen (pro Kondition 120 Zellen) ausgewertet, die aber keinen wesentlichen Unterschied zur konventionellen Methode des gesamten Bildes zeigte. Dies ist zu erklären durch wenig bzw. kaum vorhandene Hintergrundfluoreszenz. Da die Einzelzellmessung wesentlich aufwendiger ist und keinen Mehrwert zur mean intensity des gesamten Bildausschnitts zeigte, wurde die letztere Methode zur Auswertung der Rezeptorexpression nach Stimulation der Zellen verwendet. In Microsoft Excel 2016/365 und Graphpad Prism wurden dann verschiedene Parameter aus den erhobenen Daten berechnet und anschließend in Graphpad Prism graphisch dargestellt. Als signifikant wurde $p < 0,05$ bestimmt. p -Werte $>0,01$ mit *, $p < 0,01$ mit **, $p < 0,001$ mit *** und $p < 0,0001$ mit **** gekennzeichnet.

5.8.2. Auswertung der 3D-Sphäroid-basierten Angiogenese

Die Bildersequenzen wurden als .nd2-Dateien abgespeichert und in Image J weiterverarbeitet. Von jedem Datensatz wurde ein Bild der maximalen Projektion angefertigt. Dieses wurde in das „Weka Trainable Weka Segmentation“ Plugin importiert und dort in drei Gruppen klassifiziert (Core, Sprouts, Background). Die dadurch entstandenen Probability Maps sowie einzelne Bilder der segmentierten Teile des Sphäroids wurden dann als binäre Bilder abgespeichert und weiter händisch in ImageJ ausgewertet. Gemessen wurde die Sprouting-Fläche, sowie die durchschnittliche Länge der Sprouts. Die weitere statistische Auswertung erfolgte in Microsoft Excel und Graphpad Prism.

5.8.3. Auswertung der μ -Slide-Chemotaxis

Auch die Bilder der μ -Slide-Chemotaxis wurden als .nd2-Dateien abgespeichert und in Image J weiterverarbeitet. Zunächst wurde im „Bioformats-Importer“ jeder Datensatz in die zugrundeliegenden Serien (Stimulationsbedingungen) unterteilt. Dann wurde jede Serie einzeln mittels des Plugins „Manual Tracking“ verarbeitet. Pro Serie wurden zwischen 40 und 60 Zellen verfolgt. Die Datentabellen mit den X-, Y- sowie Zeitwerten wurden als .csv- und .txt-Tabellen abgespeichert. Die grafische Darstellung sowie die statistische Auswertung wurde

dann im „Chemotaxis und Migration Tool“ von Ibidi fortgesetzt. Der Vergleich der Gruppen erfolgte in Graphpad Prism.

5.8.4. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden Excel, Chemotaxis and Migration Tool, SPSS sowie Graphpad Prism benutzt. Verwendet wurden, wie angegeben und je nach experimentellem Setup, der ungepaarte/gepaarte Student's t-test oder One- bzw. Two-Way ANOVA. Die Signifikanzangaben wurden im NEJM (New England Journal of Medicine) Stil wiedergegeben, d.h. p-Werte >0.05 werden mit ns, Werte >0.01 mit *, $p < 0.01$ mit **, $p < 0.001$ mit *** und $p < 0.0001$ mit **** gekennzeichnet. Sofern nicht anderweitig angegeben, wurden Versuche mindestens 3 x wiederholt, wobei die Ergebnisse aller Wiederholungen vergleichbar waren. Die Graphen zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung sofern nicht anders angegeben.

5.8.5. Korrelationsanalysen und Lineare Regression

Eine Möglichkeit den linearen Zusammenhang zweier Merkmale von Patienten und Patientinnen zu berechnen, ist die Pearson Korrelation. Der Korrelationskoeffizient (r) nach Pearson gibt dabei an wie sehr sich eine Variable ändert, wenn sich auch die andere Variable ändert und ist somit ein Maß für die Stärke der Korrelation zweier Merkmale. Er reicht von -1 bis 1. Wenn $r = 0,0$ ist, bedeutet das, dass es keine Beziehung zwischen Variable x und Variable y gibt. Wenn r positiv ist, zeigt dies den Trend an, dass wenn eine Variable steigt auch die andere steigt. Dementsprechend zeigt ein negatives r , dass die Werte der Variable x steigen, während die der Variable y fallen. In dieser Arbeit wurden Korrelationsanalysen genutzt, um den Zusammenhang verschiedener Merkmale von Patienten und Patientinnen zu untersuchen. Neben der Korrelationsanalyse erfolgte eine einfache lineare Regressionsanalyse. Dabei wird eine Gerade mithilfe zweier Parameter durch die Punktwolke gelegt, umso den Zusammenhang zwischen den Variablen x und y möglichst gut zu beschreiben bzw. darzustellen. Zum Test der Signifikanz des Korrelationskoeffizienten wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet (131).

5.8.6. Cox-Regressionsanalyse

Eine weitere Möglichkeit um den Einfluss mehrerer Variablen auf die Überlebenszeit respektive progressionsfreie Zeit zu untersuchen, ist die Cox-Regression (132). Zudem lässt sich mit diesem Modell ein Schätzwert für die Größe des Einflusses berechnen, den man auch Hazard Ratio nennt. Die Bedingung für diese Berechnung ist jedoch, dass sich das Ereignisrisiko der zu vergleichenden Gruppen proportional verhält (132). Vereinfacht gesagt, kann man davon ausgehen, wenn sich die Kaplan-Meier Kurven nicht überschneiden. Das bedeutet auch, dass das Hazard Ratio sich in den Gruppen unterscheiden kann, solange es

sich über die Zeit hinaus proportional verhält. Für die Analyse der verschiedenen Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben, das progressionsfreie Überleben und das Überleben vom Rezidiv bis zum Tod wurde zunächst eine univariate Analyse für Infiltration von TAMs, VEGF, CXCL2, IL8, die Gefäßanzahl, Gefäßfläche sowie CXCR2⁺ Gefäßanzahl und Gefäßfläche sowie die erhaltenen Zyklen TMZ berechnet. Alle Einflussfaktoren mit $p < 0,20$ wurden eingeschlossen für die multiple Analyse, um eine mögliche Abhängigkeit der Einflussfaktoren vorhersagen zu können. Neben dem Hazard Ratio und dem p-Wert wurde stets auch das 95% Konfidenzintervall berechnet und angegeben.

6. Ergebnisse

6.1. Der CXCR2-Signalweg *ex vivo* - Analyse von gematchten Primär- und Rezidivtumoren

6.1.1. Analyse klinischer Patientendaten sowie der diagnostischen Merkmale

Von den 38 eingeschlossenen Patienten und Patientinnen war in etwa ein Drittel (34%) weiblich. Das Alter bei Diagnosestellung des pGBM (primäres Glioblastom) lag bei $58,7 \pm 12,9$ Jahren (Standard: $56,8 \pm 12,3$; Nicht-Standard: $60,3 \pm 13,5$ Jahre). Bei Auftreten des Rezidivs waren die Patienten und Patientinnen im Schnitt $59,7 \pm 12,8$ Jahre alt (Standard: $58,2 \pm 12,3$; Nicht-Standard: $61 \pm 13,5$ Jahre) (**Tabelle 17** und für die Einzeldarstellung **Tabelle 18**). Aufgrund des schnellen Auftretens von Rezidiven, ist die Standardtherapie, bestehend aus der chirurgischen Resektion und der Radiochemotherapie nach Stupp-Schema (4), nicht immer möglich. Dies ist in dieser Arbeit, wie in 5.3.2 beschrieben, u.a. durch die Nicht-Standard-Gruppe widergespiegelt. Eine Hypermethylierung des O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase (MGMT)-Gens ist mit einem besseren Therapieansprechen und somit einem längerem Überleben assoziiert (11, 133, 134), was das MGMT-Gen zu einem wichtigen Prognosefaktor macht. Aus diesem Grund gehört er zu der Routinediagnostik nach OP. Weniger als die Hälfte, nämlich 16 von 38 (42%) Patienten und Patientinnen zeigten eine Hypermethylierung bei einem Cut-off-Wert von 10. In der Standard-Gruppe hatten 55% (10/18) der Patienten und Patientinnen ein hypermethyliertes MGMT-Promotor-Gen, wohingegen in der Nicht-Standard-Gruppe nur 30% (6/20) eine Hypermethylierung aufwiesen (**Tabelle 17**). Neben dem MGMT-Status wird in der Routinediagnostik auch immer die Mutation der IDH sowie von TP53 untersucht (1). Wie bereits beschrieben, ist eine Mutation der IDH mit sekundären Glioblastomen assoziiert. Diese sind seltener als primäre Glioblastome und haben zudem eine bessere Prognose (1). Eine Mutation von TP53 ist charakteristisch für das Glioblastom, gehört jedoch nicht zu den Diagnosekriterien (1). Fast alle Patienten und Patientinnen mit Ausnahme von #22 zeigten einen IDH-Wildtyp in der Mutationsanalyse. Diese eine Patientin gehörte der Standard-Gruppe an. Des Weiteren wurde der TP53-Mutationsstatus des Patientenkollektivs retrospektiv analysiert. Im Primärtumor zeigten 89,5% der Patienten und Patientinnen ein mutiertes TP53 (Standard: $18/18 = 100\%$; Nicht-Standard: $16/20 = 80\%$). Zu der neuropathologischen Standarddiagnostik gehört auch die Proliferationsaktivität der Tumore, die durch den Marker Ki-67 angefärbt werden kann. Angegeben wird dann der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen. In der Standard-Gruppe reichte er von 10 – 40% und in der Nicht-Standard-Gruppe von 5 – 40% im Primärtumor.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die beiden Gruppen sich in Bezug auf die Patientencharakteristika ähnlich waren (**Tabelle 17**). Bezüglich des Alters bei Diagnosestellung, der Geschlechterverteilung, des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus und der IDH-Mutation gab es keine Unterschiede in den Gruppen (**Tabelle 17**). Somit die Gruppen als vergleichbar anzusehen.

Tabelle 17: Überblick der Patientencharakteristika

| Studienkohorte: n = 38 | n | % | p-Wert |
|--|-------------|-----------|---------------|
| Geschlecht (f/m) | 13/25 | 34/66 | |
| Standard | 8/10 | 44/56 |] 0,22 |
| Nicht-Standard | 5/20 | 25/75 | |
| Alter in Jahren bei Diagnose des pGBM (MW ± SD) | 58,7 ± 12,9 | | |
| Standard | 56,8 ± 12,3 | |] 0,41 |
| Nicht-Standard | 60,3 ± 13,5 | | |
| Alter in Jahren bei Diagnose des rGBM (MW ± SD) | 59,6 ± 12,8 | | |
| Standard | 58,2 ± 12,3 | |] 0,50 |
| Nicht-Standard | 61,0 ± 13,5 | | |
| MGMT (methyliert ≥10%/unmethyliert <10%) | 16/22 | 42/58 | |
| Standard | 10/8 | 55/45 |] 0,22 |
| Nicht-Standard | 6/20 | 30/70 | |
| IDH1/2-Status (wt/mut) | 37/1 | 97,4/2,6 | |
| Standard | 17/1 | 94,5/5,5 |] 0,30 |
| Nicht-Standard | 20/0 | 100/0 | |
| TP53 (+/-) | 34/4 | 89,5/10,5 | |
| Standard | 18/0 | 100/0 |] 0,05 |
| Nicht-Standard | 16/4 | 80/20 | |

Standard ≥ 4 Zyklen Temozolomidtherapie; Nicht-Standard ≤ 3 Zyklen Temozolomidtherapie; pGBM = primäres Glioblastom; rGBM = rezidiertes Glioblastom; MGMT = O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Promotor; IDH = Isozitatdehydrogenase

Tabelle 18: Individuelle klinische Patientencharakteristika

| ID | Alter (Jahre) | Geschlecht | Intervall (Monate) | Therapie- regime | TMZ (Zyklen) | MGMT (MW) | IDH | Lokalisation |
|----|------------------|------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------|--------------|-----|---|
| 1 | 61,57 | m | 6,25 | Stupp | 4 | 10 | wt | temporal re. |
| 2 | 54,69 | m | 1,87 | Stupp abgelehnt | 0 | 5,8 | wt | parietal re. |
| 3 | 59,61 | f | 6,64 | Stupp | 3 | 8 | wt | temperomesial li. |
| 4 | 62,64 | m | 3,22 | Stupp Abbruch* | 0 | 3,6 | wt | parieto- occipital li. |
| 5 | 71,94 | m | 2,07 | Nordic Glioma | 0 | 2,6 | wt | temperomesial li. |
| 6 | 66,87 | m | 5,92 | Stupp Abbruch* | 0 | 3 | wt | parietal parafalzin |
| 7 | 63,49 | m | 4,08 | Stupp | 3 | 5,4 | wt | temporo-lateral re. |
| 8 | 54,89 | m | 5,36 | Stupp | 2 | 4,4 | wt | li. frontal |
| 9 | 63,15 | f | 6,97 | Stupp | 3 | 7 | wt | Gyrus cinguli |
| 10 | 23,70 | f | 4,47 | Stupp | 3 | 31,6 | wt | parietookzipital li. |
| 11 | 81,86 | m | 7,04 | Nordic Glioma | 0 | 60,4 | wt | parietookzipital re. |
| 12 | 62,76 | f | 4,77 | Stupp abgelehnt | 0 | 36,6 | wt | temporal li. |
| 13 | 70,87 | m | 4,37 | Stupp | 0 | 10,2 | wt | Gyrus supra- marginalis re., hochparietal |
| 14 | 54,52 | m | 5,95 | Stupp | 4 | 8 | wt | Gyrus angula- ris, okzipital li. |
| 16 | 55,17 | m | 6,58 | Stupp | 0 | 3 | wt | okzipital re. |
| 17 | 54,81 | m | 4,80 | zunächst abgelehnt Stupp | 2 | 17,6 | wt | n.a. |
| 18 | 66,57 | m | 3,85 | Stupp | 1 | 3,4 | wt | n.a. |
| 19 | 75,03 | m | 7,33 | Nordic Glioma | 0 | 7,2 | wt | parietookzipital re. |
| 21 | 65,35 | f | 36,39 | Stupp | 6 | 29,6 | wt | temperomesial |
| 22 | 46,98 | m | 21,99 | Stupp | 6 | 32,2 | mut | temporal |
| 23 | 30,90 | m | 15,98 | Stupp begonnen | 0 | 33 | wt | temporal re. |
| 24 | 46,54 | f | 11,01 | Stupp | 6 | 8,4 | wt | präzentral li. |
| 25 | 50,69 | f | 12,20 | Stupp | 6 | 2,6 | wt | frontal li. |
| 26 | 61,44 | m | 9,04 | Stupp | 6 | 5 | wt | temperomesial re. |
| 27 | 69,68 | f | 12,46 | Stupp | 6 | 0,4 | wt | temporoinsulär re. |

| | | | | | | | | |
|-----------|-------|---|-------|-----------------|----|------|----|--|
| 28 | 50,54 | f | 8,52 | Stupp | 6 | 1,6 | wt | frontolateral li. |
| 29 | 65,09 | m | 23,61 | Stupp | 6 | 26,4 | wt | temporopolar li. |
| 30 | 70,20 | f | 32,48 | Nordic Glioma | 0 | 2,6 | wt | temporal li., Gyrus fusiforme |
| 31 | 60,31 | m | 7,63 | Stupp | 3 | 0,4 | wt | temporofrontal li. |
| 32 | 56,57 | m | 25,28 | Stupp abgelehnt | 0 | 3,8 | wt | temporoparietal-insulär re. |
| 33 | 50,61 | m | 15,35 | Stupp | 6 | 20,6 | wt | temporoparietal li., Gyrus supramarginalis |
| 34 | 73,51 | f | 14,96 | Stupp | 6 | 14,6 | wt | parietotemporal li. |
| 35 | 63,65 | m | 12,43 | Stupp | 6 | 44,8 | wt | parieto-okzipital re. |
| 36 | 70,42 | m | 11,08 | Stupp | 6 | 7,2 | wt | n.a. |
| 37 | 49,53 | m | 19,82 | Stupp | 6 | 7 | wt | temporobasal re. |
| 38 | 63,98 | f | 29,03 | Stupp | 22 | 18,2 | wt | frontal re. |
| 39 | 57,64 | m | 21,60 | Stupp | 6 | 47 | wt | frontal re., Infiltration des Balkens |
| 40 | 21,23 | f | 22,45 | Stupp | 5 | 17,4 | wt | n.a. |

Patienten und Patientinnen IDs: 1 bis 40, Patient 15 und 20 wurden nach Zuweisung der ID aufgrund von fehlendem Probenmaterial der Rezidive ausgeschlossen. Geschlecht definiert als m = männlich, f = weiblich, Alter bei Diagnosestellung und Intervall als PFS. Das Therapieregime beschreibt kurz die geplanten und erhaltenen Therapien, Stupp = konkomitante Radiochemotherapie nach Stupp (4) und Nordic Glioma (alleinige hypofraktionierte Bestrahlung), dabei gilt *= Abbruch aufgrund einer Thrombozytopenie. TMZ in Zyklen gibt die Anzahl der voll erhaltenen Zyklen Temozolomid als adjuvante Chemotherapie an. MGMT gibt den Mittelwert der MGMT-Methylierung an. Der IDH-Status wird mit wt = Wildtyp oder mut = mutiert angegeben und unter Lokalisation wird das örtliche Auftreten des Glioblastoms, sofern dokumentiert, angegeben. Die Farbkodierung in Hellgrau und Dunkelgrau ist zur Hilfestellung und unmittelbaren Gruppenzugehörigkeit gedacht. Dunkelgrau zeigt dabei Patienten und Patientinnen der Standard-Gruppe und Hellgrau die Zugehörigkeit zur Nicht-Standard-Gruppe.

In den Rezidivtumoren lagen die Daten zur TP53-Mutation nicht für alle Patienten und Patientinnen vor. Dort zeigten 75% ein mutiertes TP53 (Standard: 11/15 = 73%; Nicht-Standard: 15/17 = 88,2%). Die Proliferationsaktivität der Tumorzellen war auch im Rezidivtumor sehr heterogen. In der Standard-Gruppe reichte sie von 2 – 50% und in der Nicht-Standard-Gruppe von 5 – 40%. Anschließend sollte nun die Analyse des Einflusses der MGMT-Methylierung und der Proliferationsaktivität auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben untersucht werden.

6.1.1.1. Korrelation diagnostischer Merkmale mit dem Gesamtüberleben

Vor dem Hintergrund, dass die MGMT-Hypermethylierung einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben von GBM Patienten und Patientinnen hat (134), wurde diese in Hinsicht auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben untersucht. Bei der Analyse aller Patienten und Patientinnen zeigte sich eine signifikante Korrelation des PFS und OS mit der Hypermethylierung der MGMT-Promotorregion (**Abbildung 11a** und **b**), womit die vorbeschriebenen Daten bestätigt werden konnten.

Ki67, ein Marker, mit dem die Zellproliferation evaluiert werden kann, wurde in der neuropathologischen Routinediagnostik ebenfalls untersucht. Dies ist von Relevanz, da man davon ausgehen kann, dass stark proliferierende Zellen, also sich schnell teilende Gewebe, zu einem beschleunigten Tumorwachstum führen. Deshalb wurde der Einfluss der Ki67-Expression im Primärtumor auf das PFS und OS untersucht. Dabei zeigte sich keine Korrelation (**Abbildung 11c** und **d**).

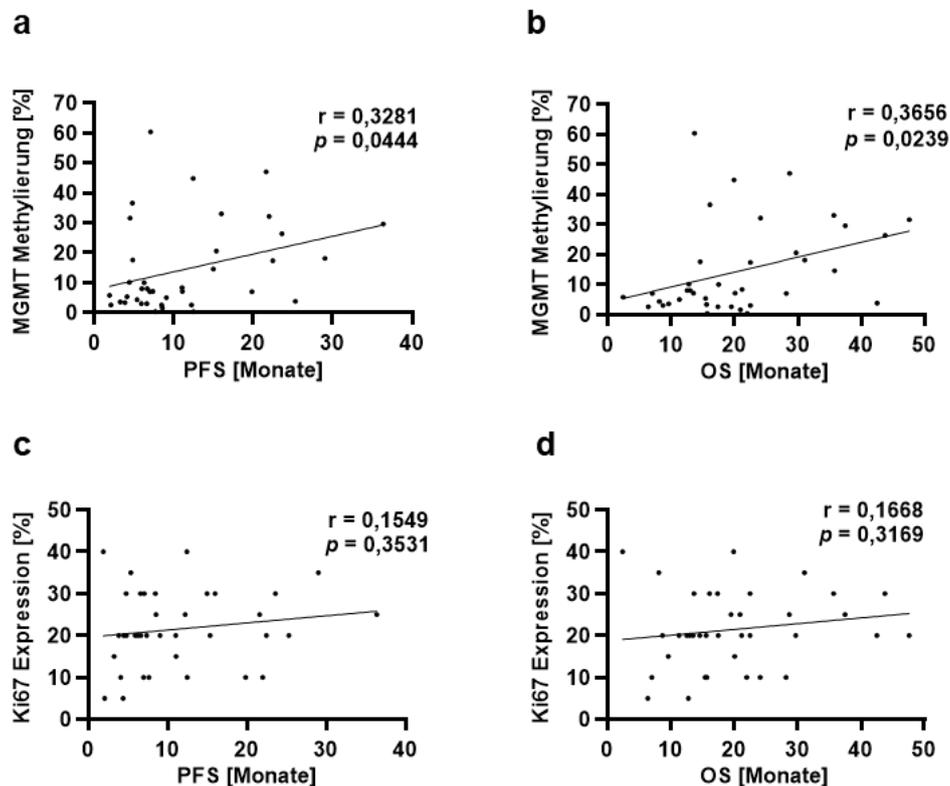


Abbildung 11: Eine MGMT-Promotorhypermethylierung korreliert mit einem längeren PFS und OS.

Korrelationsanalysen der MGMT-Promotor Methylierung und der Ki67-Expression in den primären Glioblastomen mit linearer Regression wurden erstellt. Dargestellt ist das progressionsfreie Überleben (**a**) in Abhängigkeit vom MGMT-Status ($r = 0,3281$; $p = 0,0444$) und das Gesamtüberleben (**b**) ($r = 0,3656$; $p = 0,0239$). Die Analyse der prozentualen Ki67-Expression korrelierte nicht mit dem progressionsfreien ($r = 0,1549$; $p = 0,3531$) (**c**) und Gesamtüberleben ($r = 0,1668$; $p = 0,3169$) (**d**). $n = 38$, Korrelationskoeffizient nach Pearson, lineare Regression, zweiseitiger t-Test

6.1.2. Zeit bis zum Rezidiv und Gesamtüberleben der Patientenkohorte

Die Zeit bis zum Rezidiv lag im Durchschnitt bei 12 Monaten (Median = 8 Monate), unterschied sich innerhalb der Gruppen allerdings signifikant ($p = 0,0002$). So war das mediane progressionsfreie Überleben in der Nicht-Standard-Gruppe mit 5,64 Monaten deutlich kürzer als in der Standard-Gruppe (13,71 Monate) **Abbildung 12a**. Das Gesamtüberleben der Patienten und Patientinnen lag im Mittelwert bei 19,4 Monaten ($\pm 9,7$ Monate), der Median betrug 16,7 Monate. In der Standard-Gruppe war das mediane Überleben mit 28,2 Monaten beinahe doppelt so hoch wie in der Nicht-Standard mit 14,6 Monaten ($p = 0,0525$). Bei den Patienten und Patientinnen, von denen zum Zeitpunkt der Analyse noch kein Sterbedatum vorlag, wurde der letzte Kontakt zur Analyse genutzt und die Daten dementsprechend zensiert. Des Weiteren wurde das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben hinsichtlich der Expression von Iba -1 (Marker für die TAMs), VEGF, CXCL2 und IL8 analysiert.

Die Patienten und Patientinnen wurden hinsichtlich der Anzahl an TAMs in 3 Gruppen eingeteilt: *sehr hoch* mit ≥ 1000 Zellen pro mm^2 , *hoch* mit 520-1000 Zellen pro mm^2 und *niedrig* mit < 520 Zellen pro mm^2 . Diese Einteilung erfolgte, da Hori et al. in einer Arbeit zeigen konnten, dass hohe Level des von TAM exprimierten Interleukin 6 im Liquor mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind und, dass das IL6-Level mit der Infiltration von TAMs im GBM korrelierten (55). In der Iba-1-Gruppe *sehr hoch* zeigte sich ein signifikant früheres Rezidiv gegenüber der Iba-1-Gruppe *hoch* (PFS: *sehr hoch* = 6,25 Monate, *hoch* = 16,05 Monate; $n = 5-6$, $p = 0,008$). Die Infiltration von TAMs in Patienten und Patientinnen der Iba-1-Gruppe *niedrig* zeigte kein Vorteil hinsichtlich des PFS gegenüber der *hoch* oder *sehr hoch* Gruppe (PFS: 7,63 Monate) (**Abbildung 12c**). Zudem konnte die Tendenz beobachtet werden, dass eine sehr hohe Infiltration von TAMs im Primärtumor zu einem kürzeren OS führt (OS: *sehr hoch*: 13 Monate; *hoch*: 28.2 Monate, *niedrig*: 19.9 Monate) **Abbildung 12d**. Demnach scheint sich eine sehr hohe oder sehr niedrige Infiltration von TAMs negativ auf das progressionsfreie und das Gesamtüberleben der Patienten und Patientinnen auszuwirken.

Die Analyse des PFS und OS nach Kaplan-Meier ergab keinen Unterschied in Hinsicht einer hohen oder niedrigen Expression von VEGF (**Abbildung 12e,f**). Als Cutoff-Wert wurde der Mittelwert der VEGF-Expression im Primärtumor gewählt. Auch eine hohe oder niedrige CXCL2 Expression zeigte in dieser Patientenkohorte bei der Analyse der Kaplan-Meier-Kurven keinen Einfluss auf das progressionsfreie bzw. das Gesamtüberleben der Patienten und Patientinnen (**Abbildung 12g,h**). Die Expression von IL8 im primären GBM hatte ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf das PFS und OS der Patienten und Patientinnen (**Abbildung 12i,j**).

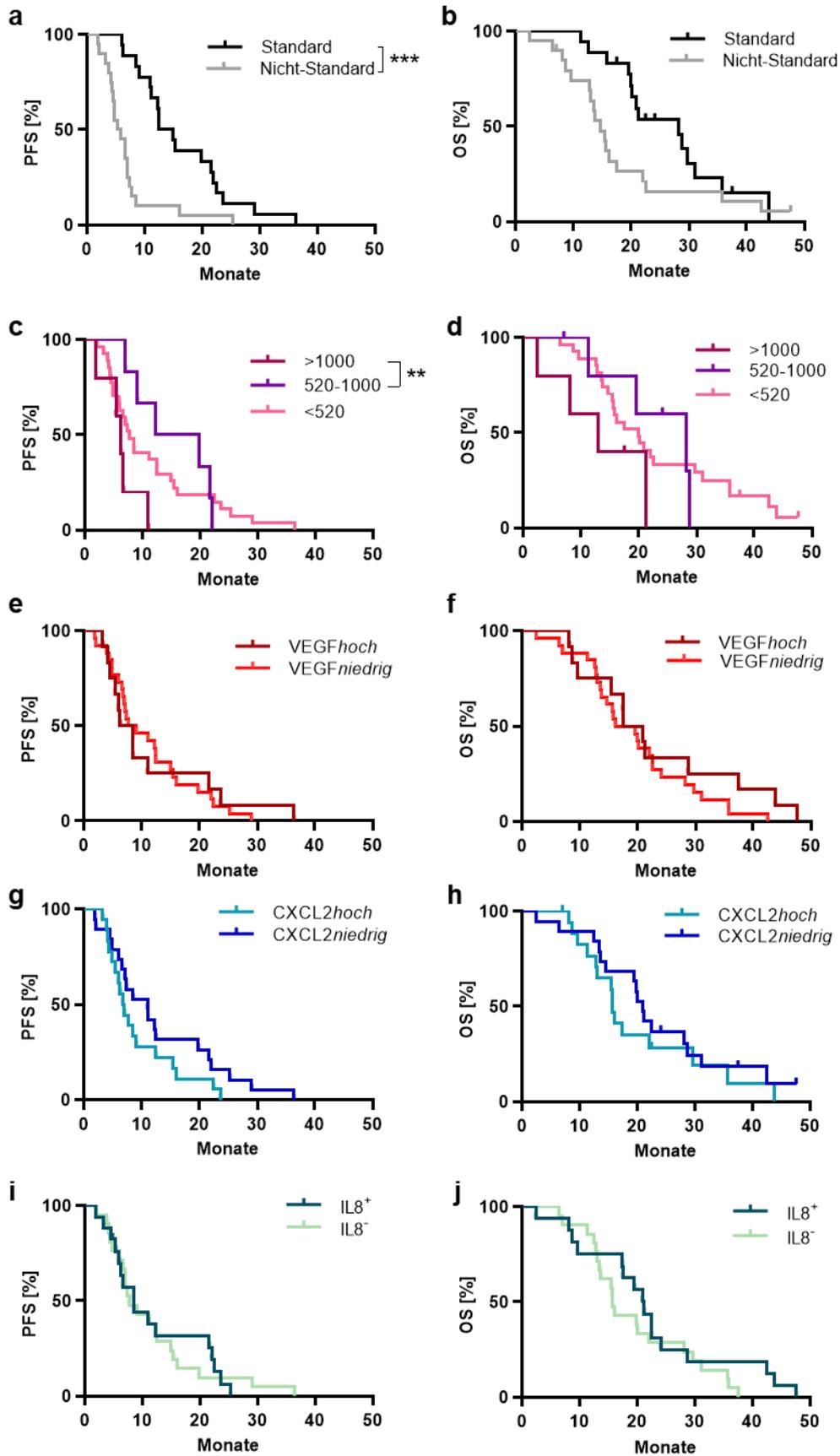


Abbildung 12: Das progressionsfreie und Gesamtüberleben der Patientenkohorte nach Therapieregime und Expression verschiedener Merkmale. Analyse des PFS und OS nach Kaplan-Meier anhand verschiedener Patientencharakteristika. In der linken Spalte stets das PFS und in der rechten das OS. Die Graphen (a) und (b) zeigen in schwarz die Patienten und Patientinnen der Standard-Gruppe und in grau Patienten und Patientinnen der Nicht-Standard-Gruppe. Die Zeit bis zum Rezidiv beider Gruppen zeigte einen signifikanten Unterschied. Das mediane progressionsfreie Überleben in der Standard-Gruppe: 13,71 Monate; in der Nicht-Standard-Gruppe: 5,64 Monate; $p = 0,0058$. (b) das mediane Überleben in der Standard-Gruppe lag bei 28,2 Monaten im Vergleich zu 14,6 Monaten in der Nicht-Standard-Gruppe, $p = 0,0525$; $n = 18$ (Standard), $n = 20$ (Nicht-Standard); Die Analyse hinsichtlich der Infiltration von TAMs nach Unterteilung der Patienten und Patientinnen in drei Gruppen ist in (c) (PFS) und (d) (OS) dargestellt. Die Gruppeneinteilung erfolgte anhand der Infiltration von Mikroglia/Makrophagen im Primärtumor in >1000 (*sehr hoch*), $520-1000$ (*hoch*) und <520 TAMs/mm² (*niedrig*). Als Cutoff-Werte dienten die Mittelwerte der Gesamtpopulation für die Einteilung in *hoch/niedrig* und zur weiteren Unterteilung der *hoch* Gruppe wiederum der Mittelwert dieser. Bemerkenswert war, dass die Patienten und Patientinnen in der Gruppe mit >1000 TAMs/mm² signifikant früher an einem Rezidiv erkrankten als Patienten und Patientinnen der Gruppe mit $520-1000$ TAMs/mm² (6,25 vs 16,01 Monate, $p = 0,008$, $n = 5/6/27$). Patienten und Patientinnen der *niedrig*-Gruppe zeigten nach durchschnittlich 7,63 Monaten ein Rezidiv. Das Gesamtüberleben unterschied sich nicht signifikant zwischen der *sehr hoch* und *hoch* Gruppe ($p = 0,1081$, $n = 5/6$, OS: *sehr hoch*: 13 Monate; *hoch*: 28,2 Monate; *niedrig*: 19,9 Monate). Die Kaplan-Meier-Kurve und Analyse (e und f) zeigte keinen Vorteil des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens unabhängig davon, ob viel oder wenig VEGF exprimiert wurde. Der Median der Zeit bis zum Rezidiv lag in der VEGF*hoch*-Gruppe bei 7,4 Monaten gegenüber 8,3 Monaten in der VEGF*niedrig*-Gruppe (e). Das mediane Gesamtüberleben für VEGF*hoch* lag bei 19,2 Monaten gegenüber 17,8 Monaten in der VEGF*niedrig*-Gruppe (f). Diese Unterschiede waren nicht signifikant. Als Cutoff-Wert für die Patienteneinteilung wurde der Mittelwert der VEGF-Expression im primären Tumor gewählt (MW = 2,159; e: $p = 0,4113$; f: $p = 0,2292$), VEGF*hoch*: $n = 12$; VEGF*niedrig*: $n = 26$. Das PFS und OS der Patienten und Patientinnen in Abhängigkeit der CXCL2-Expression wurde wie bei VEGF gemäß der Expression im *hoch* und *niedrig* CXCL2 eingeteilt. Als Cutoff-Wert wurde der Mittelwert im pGBM (MW = 3,07) gewählt. Die Analyse zeigte keine signifikanten Unterschiede der CXCL2*hoch*- vs. der CXCL2*niedrig*-Gruppe in Bezug auf das progressionsfreie Überleben (g) und das Gesamtüberleben (h); $p = 0,3963$ für (g) und $p = 0,3243$ für (h); $n = 15-16$. In Bezug auf die IL8-Expression wurden die Patienten und Patientinnen in IL8⁺ und IL8⁻ eingeteilt. Die Kaplan-Meier-Kurve und Analyse (i, j) zeigte keinen Unterschied hinsichtlich des PFS und OS unabhängig davon, ob IL8 exprimiert wurde oder nicht. IL8⁺ $n = 16$; IL8⁻ : $n = 21$, (g): $p = 0,66$; (h): $p = 0,23$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, LogRank-Test (Mantel-Cox)

6.1.3. Vergleich der Infiltration von TAMs in Primär – und Rezidivglioblastomen

Nach der Analyse der klinischen und histologischen Routineparameter der Patientenkohorte, sollte nun die Relevanz des CXCR2 Signalwegs hinsichtlich der Resistenzentwicklung und die Vaskularisierung sowie potenzielle Unterschiede durch die Therapie mit Temozolomid untersucht werden. Dafür wurden verschiedene Immunfluoreszenzfärbungen an den Tumorkohorten durchgeführt. Die Infiltration von Immunzellen, speziell von TAMs, macht rund die Hälfte des zellulären Anteils in Glioblastomen aus (39, 48). Insbesondere die Mikroglia sind nicht nur Teil des residenten Immunsystems, sondern exprimieren zudem eine Vielzahl an Chemokinen u.a. auch CXCL2 und IL8 die Liganden des CXCR2 Rezeptors (28, 75, 85). In der Literatur wird seit einiger Zeit auch eine potenzielle protumorale Funktion dieser Zellen diskutiert (28, 135). Die Infiltration von Mikroglia/Makrophagen in den primären und

rezidierten Glioblastomen zu untersuchen, war somit ein wichtiger Bestandteil der Arbeit. Nach der Immunfluoreszenzfärbung mit dem Iba-1-Antikörper erfolgte die Auszählung der Iba-1⁺-Zellen. Die Akkumulation von TAMs in den Primärtumoren war unabhängig von der Gruppe signifikant höher als in den Rezidivtumoren mit einem Mittelwert von 520 Zellen/mm² im pGBM (Standard: 517 ± 309; Nicht-Standard: 523 ± 356) und 309 Zellen/mm² in rGBM ($p= 0,0004$) (Standard: 282 ± 135; Nicht-Standard: 330 ± 147). Einen Unterschied in der Infiltration von Iba-1⁺-Zellen im pGBM oder rGBM im Vergleich der Therapiegruppen gab es nicht (**Abbildung 13a, b**).

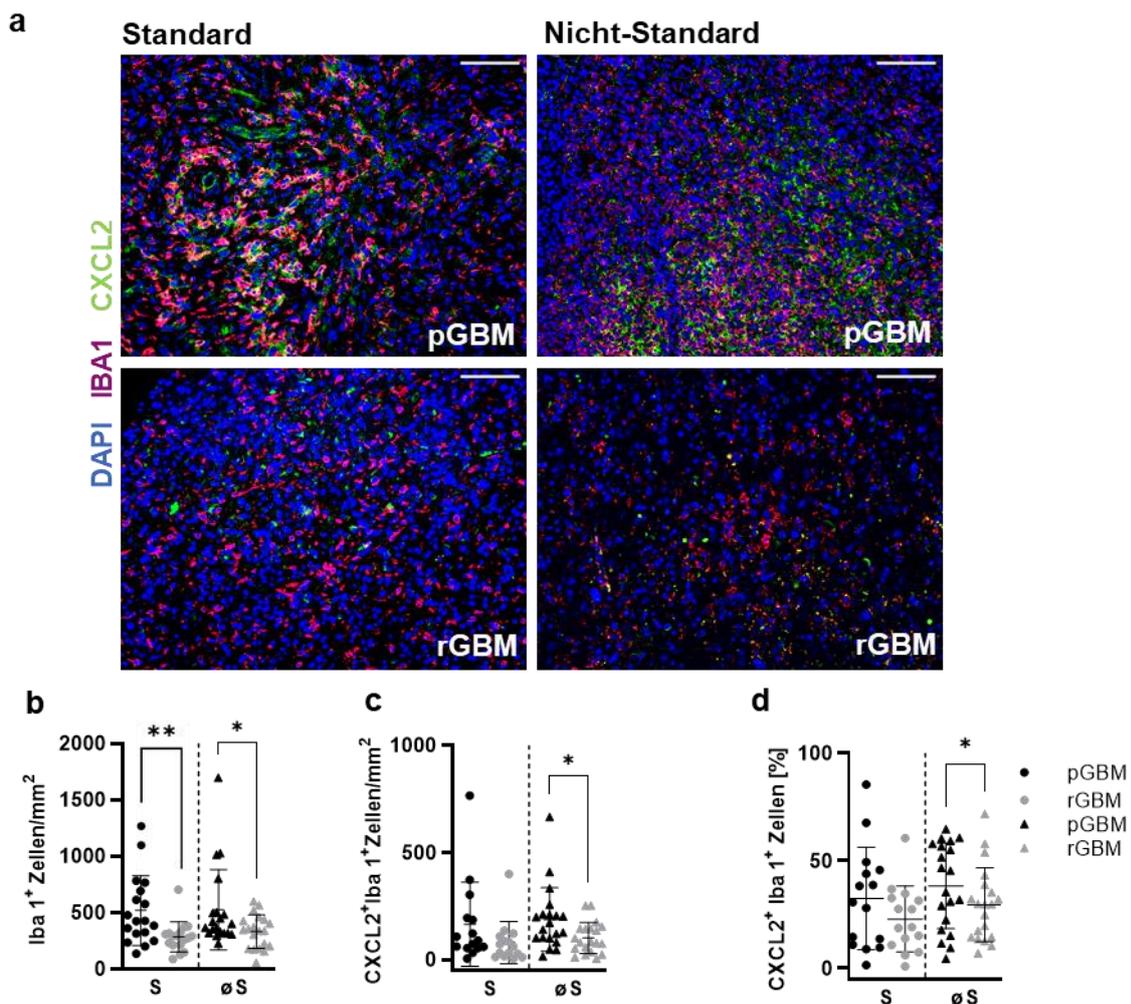


Abbildung 13: Höhere Infiltration von TAMs im primären Glioblastom. (a) Immunfluoreszenzfärbung der Infiltration von Mikroglia/Makrophagen in magenta (Iba-1) und Zellkernen in blau (DAPI) und CXCL2 in grün. Die Anzahl der infiltrierenden TAMs pro Quadratmillimeter (b) war unabhängig von den Gruppen im Rezidiv signifikant geringer als im Primärtumor (Mittelwert Standard: pGBM: 517 ± 309, rGBM: 283 ± 135; Nicht-Standard: pGBM: 523 ± 356, rGBM: 331 ± 147; Standard: $p = 0,0059$, Nicht-Standard: $p = 0,0137$). In (c) sind die CXCL2⁺ TAMs pro Quadratmillimeter dargestellt. In der Nicht-Standard-Gruppe kommt es zu einer signifikanten Reduktion in den Rezidivtumoren ($p = 0,0147$). Die Auswertung des prozentualen Anteils an CXCL2 positiven TAMs (d) ergab ebenfalls eine signifikante Reduktion im Rezidivtumor ($p = 0,0383$). Maßstab Balken 100µm; Standard dargestellt als „S“ und Nicht-Standard dargestellt als „øS“; Standard: $n = 18$, Nicht-Standard: $n = 20$; * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; gepaarter t-test, one-way ANOVA mit Bonferroni Korrektur.

Da TAMs proangiogene Moleküle wie CXCL2 sezernieren, wurde nun auch die Anzahl der CXCL2 positiven TAMs innerhalb der Gruppen und im Primär- sowie Rezidivtumor ausgewertet. In beiden Gruppen nahm die Anzahl der CXCL2 positiven TAMs ((**Abbildung 13a c**) sowie der prozentuale Anteil an der Gesamtanzahl an TAMs ((**Abbildung 13a d**) im Rezidivtumor ab. Diese Abnahme war für beide Parameter jedoch nur in der Nicht-Standard-Gruppe signifikant (CXCL2⁺Iba-1⁺Zellen/mm²: $p = 0.0147$; prozentualer Anteil der CXCL2⁺Iba-1⁺Zellen: $p = 0,0383$). Zusammenfassend gesagt, zeigte sich also eine signifikant geringere Infiltration von TAMs in den Rezidivtumoren - unabhängig von der Therapie-Gruppe. Außerdem nimmt der Anteil an CXCL2 exprimierenden TAMs im Rezidivtumor ab, insbesondere dann, wenn die Patienten und Patientinnen kein oder wenig Temozolomid erhielten.

6.1.4. Analyse proangiogener Moleküle in Primär – und Rezidivglioblastomen

Schon seit einiger Zeit ist die Rolle von VEGF im Glioblastom bekannt und wird auch therapeutisch insbesondere bei rezidierten Glioblastomen eingesetzt (136-138). Allerdings führen Therapieansätze, die den VEGFR/VEGF Signalweg hemmen, allein nicht zu einem verlängerten Gesamtüberleben (139-141). Diese Arbeit hat das Ziel, die Rolle des alternativen proangiogenen Signalwegs mittels CXCR2 in der Resistenzentwicklung zu untersuchen und die Mechanismen besser zu verstehen. Über das Chemokin CXCL2, eines der Liganden von CXCR2 ist bis dato im humanen Glioblastom insbesondere in Bezug auf die Resistenzentwicklung noch wenig bekannt.

6.1.4.1. Expression von VEGF in Primär – und Rezidivglioblastomen

Die Expression des gut untersuchten VEGF wurde im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbungen als Referenz für die proangiogene Aktivität des Tumors untersucht. Insgesamt zeigte sich ein sehr heterogenes Expressionsmuster mit Tumorregionen in denen sehr wenig VEGF zu finden war und solchen, wo es eine sehr starke Expression gab (**Abbildung 14**). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den primären und rezidierten Tumoren in beiden Gruppen. Auch ein Vergleich zwischen der Standard- und Nicht-Standard-Gruppe gab es keine signifikanten Unterschiede (**Abbildung 14**). Ebenso zeigte es sich in Bezug auf die VEGF-A-Expression als nicht relevant, ob die Patienten und Patientinnen die Standardtherapie erhielten oder nicht.

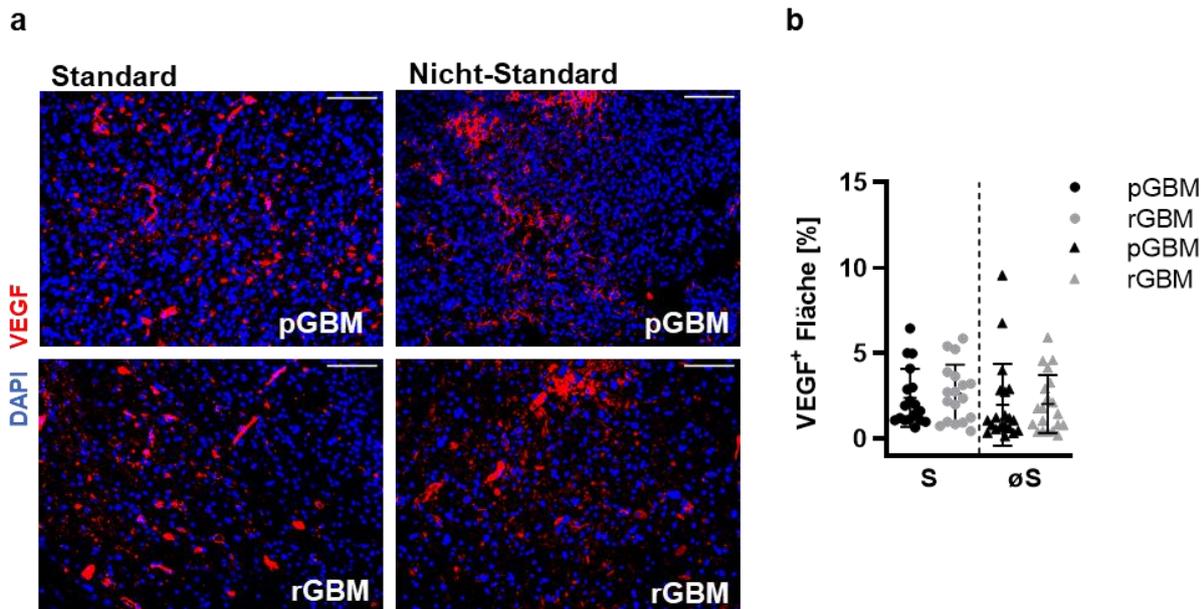


Abbildung 14: Kein Unterschied in der VEGF Expression im pGBM und rGBM. (a) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung der VEGF Expression (in rot) im pGBM und rGBM in beiden Gruppen; Maßstabbalken 100µm. Die VEGF Expression war interindividuell, aber auch innerhalb der Gruppen sowohl im pGBM als auch im rGBM sehr heterogen. (b) Hier ist die VEGF Expression der pGBMs und rGBMs anhand der Gruppen dargestellt. Der Mittelwert der Standard-Gruppe lag im pGBM bei $2,37 \pm 1,69 \text{ mm}^2$ und im rGBM bei $2,64 \pm 1,69 \text{ mm}^2$. Dazu zeigten sich keine relevanten Unterschiede in der Nicht-Standard Gruppe mit $1,97 \pm 2,4 \text{ mm}^2$ im pGBM und $2,0 \pm 1,69 \text{ mm}^2$ im rGBM. Standard dargestellt als „S“ und Nicht-Standard dargestellt als „øS“. Standard: n = 18, Nicht-Standard: n = 20, gepaarter t-test, one-way ANOVA mit Bonferroni Korrektur.

6.1.4.2. Expression von CXCL2 und IL8 in Primär – und Rezidivglioblastomen

Die alternativen proangiogenen Chemokine CXCL2 und IL8 sind in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus von neuroonkologischen Wissenschaftlern gerückt. CXCR2 und seine Liganden CXCL2 und IL8 sind im Glioblastom überexprimiert (82, 83, 86). Außerdem ist dieser Signalweg an der Bildung von gefäßähnlichen Strukturen, der sogenannten „Vaskulären Mimikry“ im Glioblastom beteiligt (73, 83). Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Expression von CXCL2 *in vitro* und IL8 *in vivo* durch den therapeutischen Stress des alkylierenden Chemotherapeutikums TMZ verändert wird. Deshalb wurde im Folgenden die Expression dieser Moleküle im Primär- und Rezidivtumor der beiden Patientengruppen untersucht.

Die Immunfluoreszenzfärbungen mit einem spezifischen Antikörper gegen CXCL2 zeigte, dass alle Patienten und Patientinnen im primären als auch im rezidierten Glioblastom CXCL2 exprimierten. In der vorliegenden Patientenkohorte konnte lediglich in der Nicht-Standard-Gruppe ein signifikanter Unterschied, nämlich eine Reduktion der CXCL2-Expression im Rezidiv gezeigt werden (**Abbildung 15**). Ebenso wie bei VEGF fiel auch bei CXCL2 eine heterogene Expression innerhalb desselben Tumors auf. So gab es Teile innerhalb eines

Tumors, in denen fast kein CXCL2 exprimiert wurde und wiederum andere, wo sich viel CXCL2 anfärben ließ.

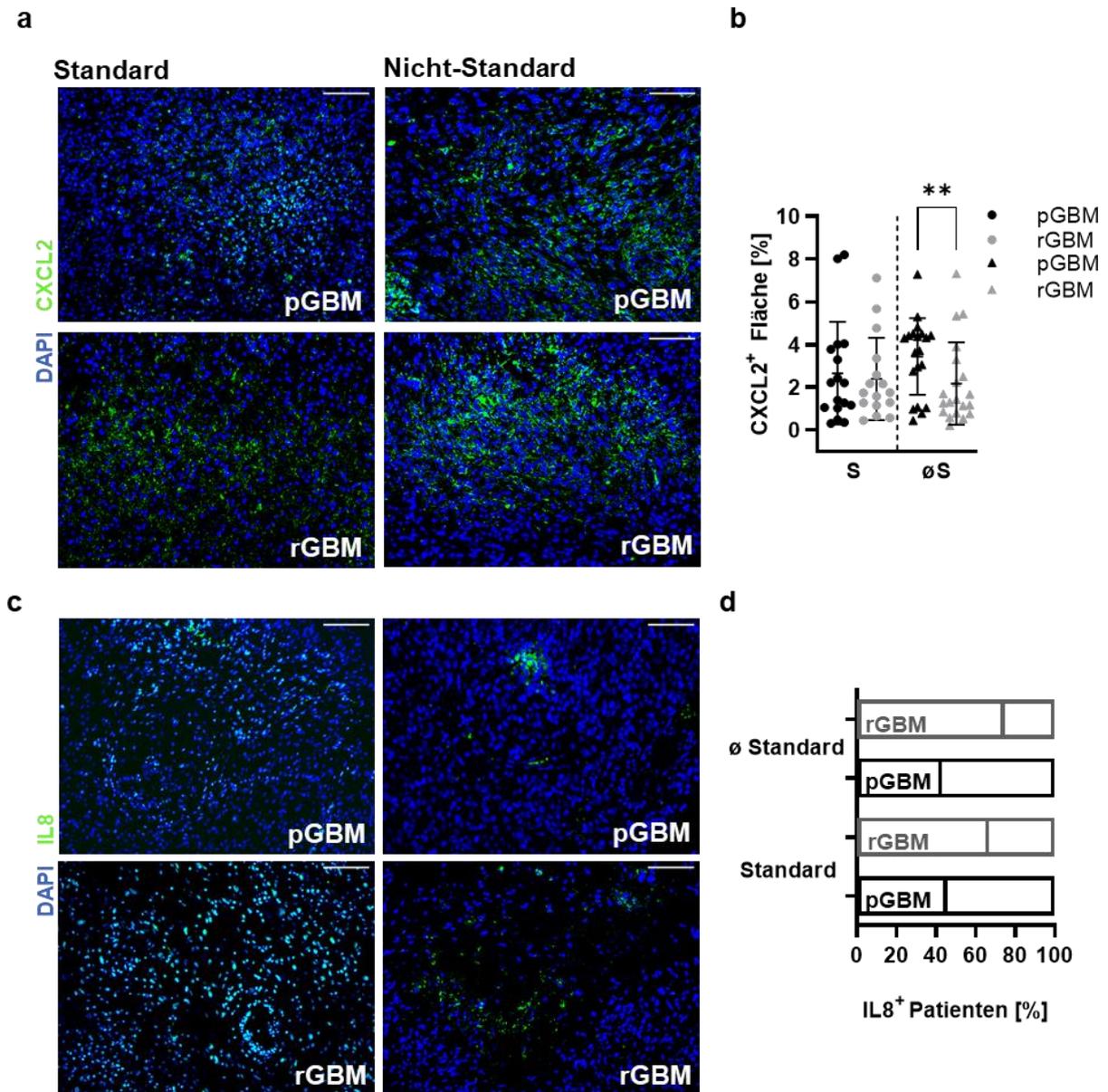


Abbildung 15: Die Expression von CXCL2 in Rezidivtumoren ist bei Patienten und Patientinnen, die weniger TMZ erhielten geringer und IL8 ist im Rezidivtumor hochreguliert. Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung (a) der CXCL2 und (c) der IL8 Expression (beide in grün) im pGBM und rGBM in beiden Gruppen; Maßstabbalken 100µm. (b) Die Expression von CXCL2 in den Rezidivtumoren der Nicht-Standard Gruppe war signifikant geringer als in den Primärtumoren (Mittelwert pGBM = $3,4 \pm 1,8$ mm² und rGBM = $2,2 \pm 1,9$ mm², $p = 0,0055$) wohingegen es keinen Unterschied in der Standard-Gruppe gab (Mittelwert pGBM = $2,7 \pm 2,4$ mm² und rGBM = $2,4 \pm 1,9$ mm², $p = 0,55$). Standard dargestellt als „S“ und Nicht-Standard dargestellt als „øS“. Standard: $n = 18$, Nicht-Standard: $n = 20$, $**p < 0,01$, gepaarter t-test, one-way ANOVA mit Bonferroni Korrektur. (d) In den Primärtumoren konnte bei 43% eine Expression von IL8 im Primärtumor festgestellt werden (Standard: 44,4%; Nicht-Standard: 42,1%). Ein deutlich höherer Anteil an Patienten und Patientinnen exprimierte IL8 im Rezidivtumor: 67,6% (Standard: 61,1%; Nicht-Standard: 77,8%). Standard: $n = 18$, Nicht-Standard: $n = 19$.

Da die Quantifizierung der IL8 Expression sich als sehr schwer erwies und da auch schon bekannt ist, dass diese in Rezidivtumoren nach Temozolomidtherapie erhöht ist (70), wurde IL8 nur hinsichtlich einer vorhandenen bzw. nicht vorhandenen Expression analysiert. Dabei fiel auf, dass mehr Patienten und Patientinnen im Rezidivtumor IL8 exprimierten (**Abbildung 15**). In den Primärtumoren konnte bei 43% eine Expression von IL8 festgestellt werden (Standard: 44,4%; Nicht-Standard: 42,1%), wohingegen in den Rezidivtumoren 67,6% IL8 (Standard: 61,1%; Nicht-Standard: 77,8%). Zudem schien die Regulation der Expression davon unabhängig zu sein, ob IL8 im Primärtumor exprimiert wurde oder nicht. So gab es Patienten und Patientinnen, bei denen im pGBM IL8 nachgewiesen werden konnte und im Rezidiv nicht (**Tabelle 19**). Genauso gab es aber auch solche, bei denen IL8 nur im Rezidiv per Immunfluoreszenzfärbung dargestellt werden konnte (**Tabelle 19**).

Tabelle 19: IL8 Expression in Primären- und Rezidivtumoren

| Standard | | | Nicht-Standard | | |
|----------|------|------|----------------|------|------|
| Pat. | pGBM | rGBM | Pat. | pGBM | rGBM |
| #1 | + | + | #2 | + | - |
| #14 | - | - | #3 | - | + |
| #21 | - | + | #4 | + | + |
| #22 | + | + | #5 | - | - |
| #24 | + | - | #6 | + | + |
| #25 | + | + | #7 | - | + |
| #26 | - | - | #8 | + | + |
| #27 | - | + | #9 | - | + |
| #28 | + | - | #10 | + | + |
| #29 | + | + | #11 | - | + |
| #33 | - | + | #12 | - | - |
| #34 | - | + | #13 | - | - |
| #35 | - | - | #16 | / | + |
| #36 | - | - | #17 | + | + |
| #37 | - | + | #18 | - | + |
| #38 | - | - | #19 | - | - |
| #39 | + | + | #23 | - | + |
| #40 | + | + | #30 | + | - |
| | | | #31 | - | + |
| | | | #32 | + | + |

6.1.5. Die Vaskularisierung in Primär – und Rezidivglioblastomen

Das Glioblastom ist ein hoch vaskularisierter Tumor, was die Angiogenese und generell die Architektur der Gefäße zu einem spannenden Ziel von Untersuchungen macht. Die Neubildung aber auch die Aufrechterhaltung der Gefäßstrukturen sind für den Tumor essenziell, um die Tumorzellen mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen. Schon seit mehr als einem Jahrzehnt wird der VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®) in der Behandlung von rezidivierten Glioblastomen eingesetzt, jedoch mit mäßigem Erfolg. So führt eine Behandlung mit Bevacizumab nur zu einem längeren PFS, nicht aber zu einem längeren OS (26). Die Bedeutung des CXCR2-Signalwegs und die potenzielle Rolle als Alternativ-Signalweg zu VEGF in der Vaskularisierung von Glioblastomen sollte in dieser Arbeit beleuchtet werden. Dass Endothelzellen den CXCR2 Rezeptor exprimieren, ist seit einigen Jahren bekannt (78). Zudem wird seit einiger Zeit auch diskutiert, dass Tumorzellen selbst CXCR2 exprimieren (70, 83). Außerdem konnten in den letzten Jahren mehrere Studien CXCR2 an Tumorzell-initiierten gefäßähnlichen Strukturen nachweisen (73, 83). Nach einer intensiven Etablierungsphase gelang es, CXCR2 und CD31 – ein Oberflächenmarker von Endothelzellen – gemeinsam anzufärben.

Die Anzahl an Gefäßen, Gefäßgröße und auch die Gefäßfläche unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. In der Standard-Gruppe gab es jedoch signifikant weniger Gefäße in den Rezidivtumoren (**Abbildung 16b**). Die Gefäßfläche und Gefäßgröße waren nahezu identisch in beiden Gruppen sowie in den primären sowie rezidivierten GBMs (**Abbildung 16c** und **d**). Die Variabilität der einzelnen Patienten und Patientinnen war auch hier sehr hoch. So gab es sehr stark vaskularisierte Tumorareale mit vielen kleinen Gefäßen und solche in denen nur einzelne größere Gefäße nachgewiesen werden konnten (siehe **Abbildung 16a**). Nicht an allen Gefäßen war der CXCR2 nachweisbar. In manchen Patienten und Patientinnen ließ sich der Rezeptor gar nicht anfärben ($n = 28$; davon in pGBM 5 negativ und im rGBM 7 negativ für den CXCR2). Die CXCR2-positiven Gefäße zeigten in den jeweiligen Gruppen keine Unterschiede hinsichtlich der Größe. Sie waren sowohl im Primär- als auch im Rezidivtumor in etwa gleich groß. Auch wenn die Patienten und Patientinnen CXCR2 exprimierten, so bedeutete das nicht, dass der Rezeptor an allen Gefäßen nachgewiesen werden konnte. Auch dabei gab es keine Unterschiede zwischen den pGBMs und rGBMs sowie innerhalb der Gruppen (**Abbildung 16f** und **g**).

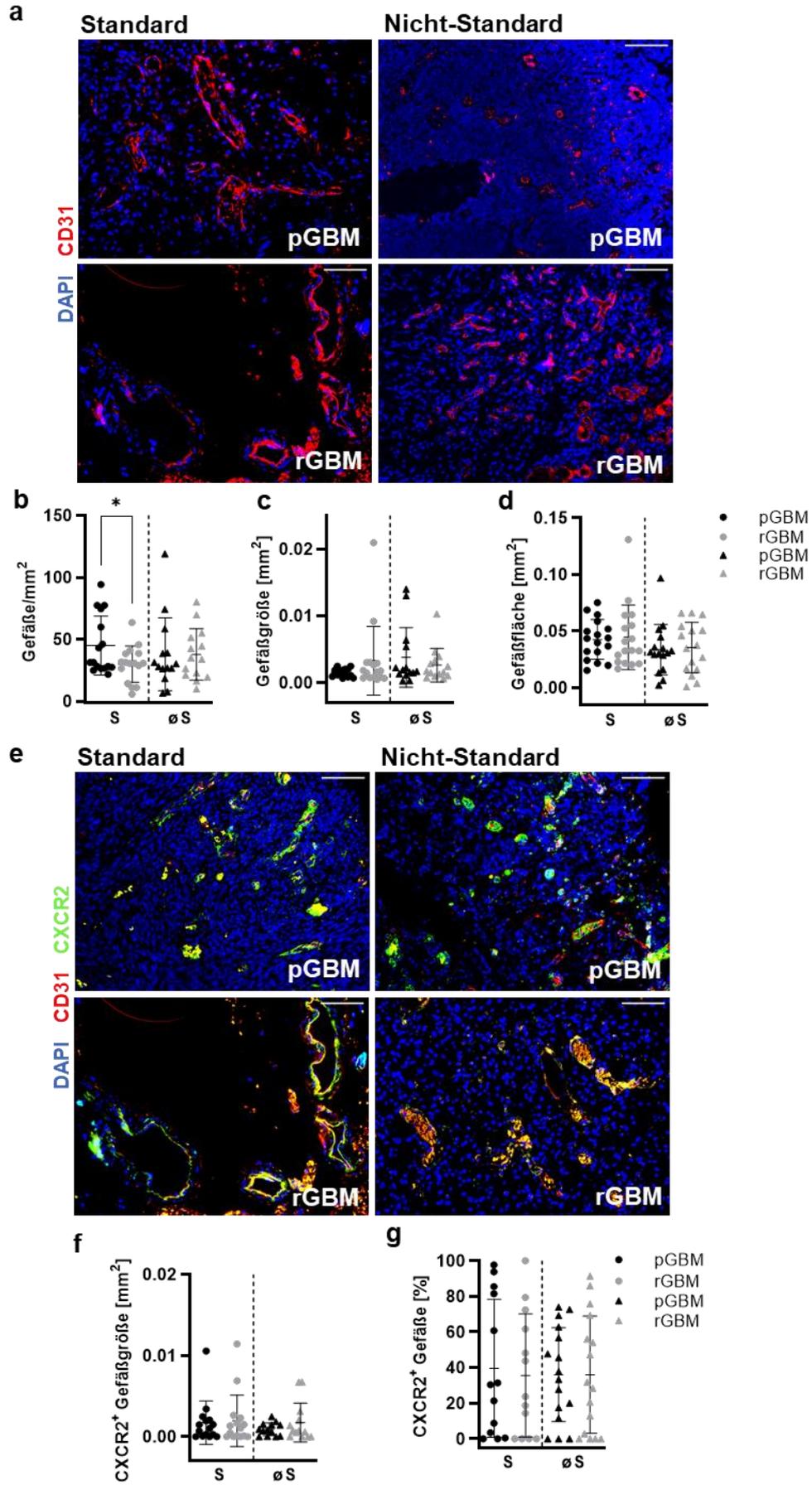


Abbildung 16: Die Vaskularisierung im pGBM und rGBM im Vergleich. (a) Analyse der Immunfluoreszenzfärbung der Gefäße mittels CD31 hinsichtlich der Gefäßanzahl (b) der durchschnittlichen Gefäßgröße (c) und der gesamten Gefäßfläche (d) in beiden therapeutischen Gruppen sowie im primären und rezidivierten GBM. Die Größe der CXCR2⁺ Gefäße (f) sowie deren prozentualer Anteil (g) wurden untersucht; Maßstab 100µm. (b) Anzahl der Gefäße pro Quadratmillimeter pro Gruppe sowie pGBM und rGBM dargestellt (Standard: pGBM: MW = 43,8 ± 23,5 pro mm²; rGBM: MW = 31,2 ± 14,7 pro mm²; Nicht-Standard: pGBM: MW = 37,9 ± 29,3 pro mm²; rGBM: MW = 37,6 ± 20,7 pro mm²). In der Standard-Gruppe wiesen die Rezidivtumore eine signifikant geringere Gefäßanzahl auf ($p = 0,0369$). Die durchschnittliche Gefäßfläche pro Quadratmillimeter unterschied sich nicht signifikant innerhalb der Gruppen sowie zwischen pGBM und rGBM (Standard: pGBM MW = 0,04 ± 0,02mm²; rGBM MW = 0,04 ± 0,02mm²; Nicht-Standard: pGBM: MW = 0,04 ± 0,02mm²; rGBM MW = 0,05 ± 0,03 mm²). Auch die Fläche pro Gefäß unterschied sich nicht signifikant (Standard: pGBM: MW = 0,0014 ± 0,0005 mm²; rGBM MW = 0,0030 ± 0,0052 mm²; Nicht-Standard: pGBM: MW = 0,0038 ± 0,0045 mm²; rGBM MW = 0,0026 ± 0,0025 mm²). Für beide Gruppen galt $n = 15$. Die anderen 8 Patienten mussten aufgrund von mangelndem Material von der Auswertung ausgeschlossen werden. (f) Die CXCR2-exprimierenden Gefäße waren sowohl innerhalb der Therapiegruppen als auch im pGBM und im rGBM nicht unterschiedlich groß (f). Es gab zudem keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil der CXCR2 positiven Gefäße innerhalb der Therapiegruppen und zwischen den pGBMs und rGBMs (g); $n = 28$ (Standard = 13; Nicht-Standard = 15), * $p < 0,05$; gepaarter t -test, one-way-ANOVA mit Bonferroni-Korrektur.

6.1.6. Korrelationsanalyse des OS aller Patienten und Patientinnen hinsichtlich der Einteilung nach Therapieregime in Standard- und Nicht-Standard nach Pearson

Die Korrelation der Infiltration von TAMs, die Expression der proangiogenen Moleküle VEGF und CXCL2 sowie die Anzahl der Gefäße im Primärtumor mit dem Gesamtüberleben wurde nachfolgend analysiert (**Abbildung 17**). Die Korrelationsanalyse zeigte, dass eine hohe Infiltration von TAMs tendenziell zu einem früheren Tod führt. Dieser Effekt war nicht signifikant, aber schien vor allem für die Patienten und Patientinnen der Standard-Therapiegruppe eine Bedeutung zu haben ($r = -0,4644$; $p = 0,0520$). In der Nicht-Standard Gruppe ergab sich keine Korrelation (**Abbildung 17a-c**). Die Expression von VEGF korrelierte nicht mit dem OS. Das zeigte die Analyse aller Patienten und Patientinnen und die, der Nicht-Standard-Gruppe (**Abbildung 17d-f**). Auch hinsichtlich der CXCL2-Expression zeigte sich keine signifikante Korrelation mit dem OS insgesamt, sowie in beiden Gruppen. Interessanterweise wies die lineare Regression jedoch eine gegenläufige Tendenz in der Standard- und Nicht-Standard-Gruppe auf; sodass in der Standard-Gruppe die Patienten und Patientinnen mit einem höheren CXCL2 im pGBM ein längeres OS hatten, während in der Nicht-Standard Gruppe niedrige Expressionen im pGBM von Vorteil zu sein schienen. Die Ergebnisse waren allerdings nicht signifikant (**Abbildung 17g-i**). Die Anzahl der Gefäße im Primärtumor korrelierte weder insgesamt noch in der Standard- oder Nicht-Standard Gruppe mit dem Gesamtüberleben (**Abbildung 17j-l**).

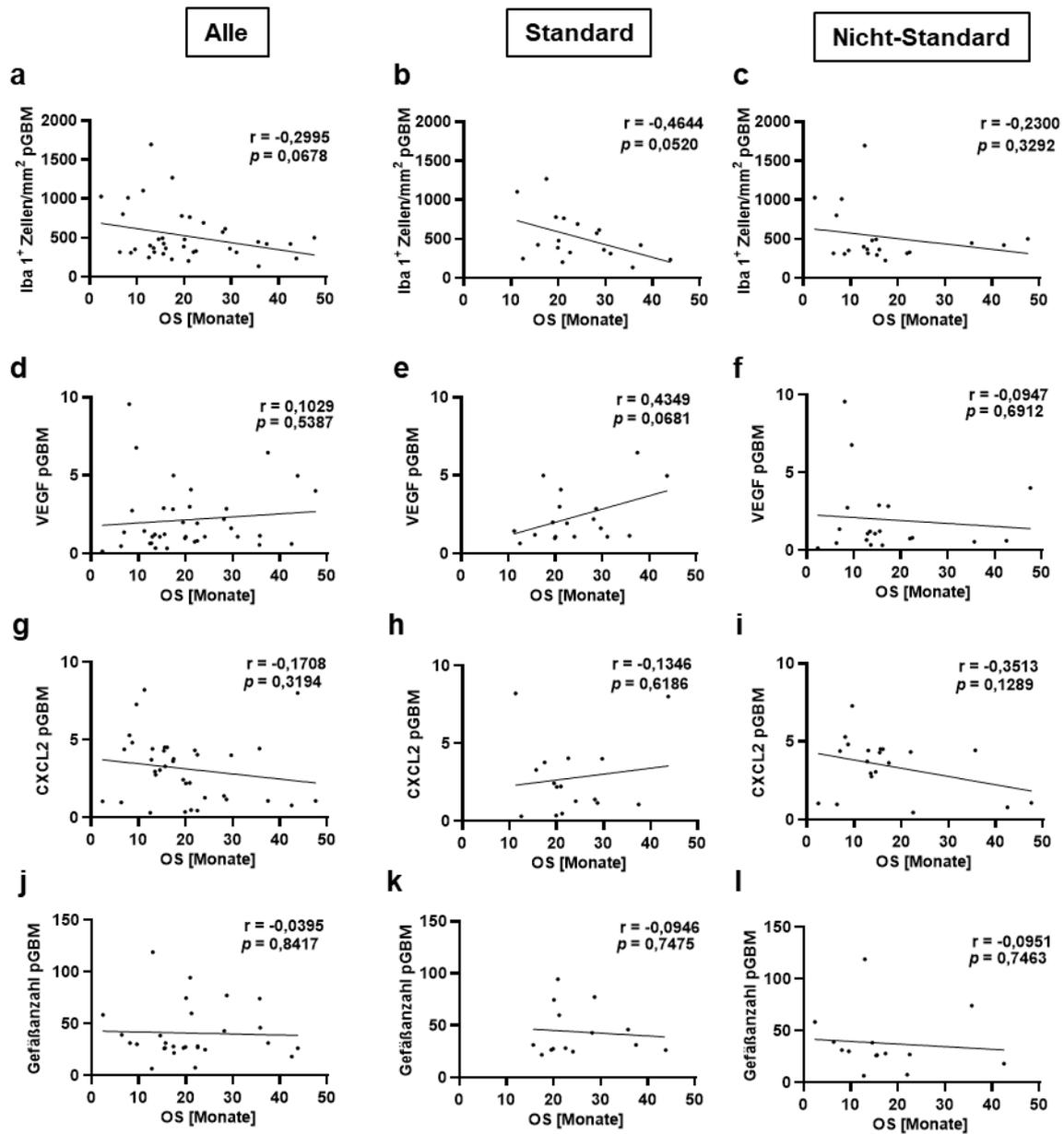


Abbildung 17: Korrelationsanalysen in Bezug auf das Gesamtüberleben der Patienten. Hier wurde eine mögliche Korrelation zwischen dem OS und der Infiltration von TAMs (Iba-1; **a-c**), der Expression von VEGF (**d-f**), CXCL2 (**g-i**) und der Gefäßanzahl (**j-l**) analysiert. Die linke Spalte zeigt alle Patienten, die mittlere die Standard-Gruppe und die rechte die Nicht-Standard Gruppe. Eine höhere Infiltration von TAMs (**a-c**) im pGBM zeigt eine Tendenz zur Korrelation mit einem kürzeren OS, insbesondere in der Standard-Gruppe. (**d-f**) die Expression von VEGF korrelierte in keiner der Gruppen mit dem OS. (**g-i**) auch die CXCL2 Expression korrelierte nicht mit dem Gesamtüberleben der Patienten. Ebenso zeigte sich keine Korrelation zwischen der Gefäßanzahl und dem Gesamtüberleben (**a-i**) Standard: $n = 18$; Nicht-Standard: $n = 20$; (**j-l**) Standard: $n = 14$; Nicht-Standard: $n = 14$; r - und p -Werte wie angegeben; Pearson Korrelation mit linearer Regression.

6.1.7. Eine hohe Infiltration von TAMs korreliert negativ mit dem Gesamtüberleben

Zur weiteren explorativen Analyse des Einflusses der untersuchten Parameter, wurde nun eine Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Untersucht wurde dabei der Einfluss von der TAM-Infiltration, der Expression von VEGF, CXCL2, und IL8 sowie vaskuläre Parameter wie die Gefäßanzahl, Gefäßfläche inklusive der CXCR2⁺ Gefäße auf das OS, das PFS und die Zeit vom Rezidiv bis hin zum Tod. Um den Einfluss der Temozolomidtherapie besser abschätzen zu können, wurde auch die Anzahl der erhaltenen Zyklen analysiert. Zunächst wurde der Einfluss dieser Variablen einzeln untersucht, gefolgt von einer multiplen Analyse. Diese wurde nur dann durchgeführt, wenn $p \leq 0,20$ in der univariaten Analyse war, um zu schauen, ob der Einfluss einer spezifischen Variablen unabhängig von anderen Variablen ist. Die Analyse der TAM-Infiltration zeigte, dass diese ein positiver Prädiktor für ein signifikant reduziertes OS in der univariaten Analyse ist. Mit Anstieg der TAM-Infiltration im Primärtumor um bereits eine Zelle, stieg auch das Risiko der Patienten und Patientinnen früher zu versterben. Die multiple Analyse bestätigte zudem, dass TAM-Infiltration ein unabhängiger positiver Prädiktor ist und, dass die CXCR2⁺ Gefäßfläche ebenfalls einen unabhängigen Prädiktor für das Gesamtüberleben darstellt (**Tabelle 20**). Dabei zeigte sich, dass eine geringe CXCR2⁺ Gefäßfläche in den Primärtumoren als negativer Prädiktor für das Gesamtüberleben der Patienten und Patientinnen gilt (**Tabelle 20**). Demnach überleben Patienten und Patientinnen länger, die eine größere CXCR2⁺ Gefäßfläche im Primärtumor aufweisen. Es gab zudem Hinweise darauf, dass Patientinnen und Patienten länger überleben, die mehr TMZ-Zyklen erhalten. Dieser Effekt erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau (**Tabelle 20**).

Tabelle 20: Cox-Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens

| OS | Univariate Analyse | | | Multiple Analyse | | |
|--------------------------------------|--------------------|------|-----------------|------------------|------|-------------|
| | p-Wert | HR | 95% KI | p-Wert | HR | 95% KI |
| pIba-1 | 0,02 | 1,00 | 1,00-1,00 | 0,02 | 1,00 | 1,00 – 1,03 |
| pVEGF | 0,57 | 1,07 | 0,85-1,33 | | | |
| pCXCL2 | 0,60 | 1,04 | 0,85-1,22 | | | |
| pIL8 | 0,57 | 0,80 | 0,37-1,73 | | | |
| pGefäßanzahl | 0,77 | 1,00 | 0,99-1,02 | | | |
| pGefäßfläche | 0,45 | 0,00 | 0,00-1873571,60 | | | |
| pCXCR2⁺ Gefäße | 0,72 | 1,00 | 0,99-1,02 | | | |
| pCXCR2⁺Gefäßfläche | 0,12 | 0,00 | 0,00-8874E+22 | 0,04 | 0,00 | 0,00-,001 |
| TMZ Zyklen | 0,20 | 0,94 | 0,86-1,03 | 0,07 | 0,86 | 0,73-1,012 |

p steht für Primärtumor; TMZ = Temozolomid; HR = Hazard Ratio; 95% KI = 95% Konfidenzintervall

Die Cox-Regressionsanalyse der Variablen mit dem PFS zeigte lediglich, dass die erhaltenen TMZ-Zyklen als Prädiktor für das PFS dienen können. Der signifikante negative Koeffizient (-0,151) zeigt an, dass die Hazard Ratio für die Entwicklung eines früheren Rezidivs bei Patienten und Patientinnen, die weniger Temozolomid-Zyklen erhalten haben, höher ist

(Tabelle 21). Somit sinkt die Gefahr der Entwicklung eines Rezidivs, je mehr Zyklen TMZ die Patienten und Patientinnen erhalten.

Tabelle 21: Cox-Regressionsanalyse des PFS

| PFS | Univariate Analyse | | | Multiple Analyse | | |
|--------------------|--------------------|---------|---------------|------------------|----|--------|
| | p-Wert | HR | 95% KI | p-Wert | HR | 95% KI |
| pIba-1 | 0,60 | 1,00 | 0,99-1,00 | | | |
| pVEGF | 0,35 | 0,90 | 0,73-1,12 | | | |
| pCXCL2 | 0,29 | 1,08 | 0,93-1,26 | | | |
| pIL8 | 0,60 | 0,82 | 0,39-1,72 | | | |
| pGefäßanzahl | 0,48 | 1,01 | 0,99-1,02 | | | |
| pGefäßfläche | 0,49 | 1114,81 | 0,00-6,63E+11 | | | |
| pCXCR2+ Gefäße | 0,25 | 0,99 | 0,98-1,01 | | | |
| pCXCR2+Gefäßfläche | 0,32 | 0,00 | 0,00-4,34E+41 | | | |
| TMZ Zyklen | 0,01 | 0,86 | 0,77-0,96 | | | |

p steht für Primärtumor; TMZ = Temozolomid; HR = Hazard Ratio; 95% KI = 95% Konfidenzintervall

In der univariaten Analyse der Zeit vom Rezidiv bis zum Tod ergab, dass die möglicherweise die VEGF-Expression im Rezidivtumor sowie die IL8-Expression im Rezidivtumor Prädiktoren für ein kürzeres Intervall zwischen Rezidiv und dem Tod darstellen (Tabelle 22). Dabei galt eine Zunahme der VEGF⁺ Fläche als potenzieller Prädiktor für einen früheren Tod nach dem Rezidiv, der jedoch in der univariaten und multiplen Analyse nicht das Signifikanzniveau erreichte (Tabelle 22). Die IL8 Expression in der univariaten Analyse war negativ prädiktiv für einen früheren Tod nach dem Rezidiv. Sofern Patienten und Patientinnen IL8 im Rezidivtumor exprimierten, war demnach das Risiko früher zu versterben geringer, als wenn sie kein IL8 im Rezidiv exprimierten. Die darauffolgende multiple Analyse zeigte, dass diese Variablen jedoch keinen unabhängigen Einfluss haben, da keine das Signifikanzniveau erreichte (Tabelle 22).

Tabelle 22: Cox-Regressionsanalyse des Überlebens nach Rezidiv

| Zeit vom rGBM bis zum Tod | Univariate Analyse | | | Multiple Analyse | | |
|---------------------------|--------------------|----------|---------------|------------------|------|-----------|
| | p-Wert | HR | 95% KI | p-Wert | HR | 95% KI |
| rIba-1 | 0,14 | 1,00 | 0,99-1,01 | 0,31 | 1,00 | 1,00-1,00 |
| rVEGF | 0,07 | 1,22 | 0,98-1,52 | 0,20 | 1,16 | 0,92-1,45 |
| rCXCL2 | 0,34 | 1,11 | 0,89-1,39 | | | |
| rIL8 | 0,03 | 0,41 | 0,18-0,93 | | | |
| rGefäßanzahl | 0,41 | 1,01 | 0,98-1,04 | | | |
| rGefäßfläche | 0,26 | 0,00 | 0,00-1738,45 | | | |
| rCXCR2+ Gefäße | 0,80 | 0,99 | 0,99-1,01 | | | |
| rCXCR2+Gefäßfläche | 0,71 | 1614E+10 | 0,00-2294E+75 | | | |
| TMZ Zyklen | 0,35 | 1,06 | 0,94-1,19 | | | |

r steht für Rezidivtumor; TMZ = Temozolomid; HR = Hazard Ratio; 95% KI = 95% Konfidenzintervall

6.2. Der CXCR2-Signalweg an HUVEC und HBMEC *in vitro*

6.2.1. Der Einfluss des CXCR2-Signalwegs auf die Proliferation von primären humanen Endothelzellen

Da der CXCR2-Signalweg eine wichtige Rolle in der Tumorangiogenese spielt und diese klassischerweise von Endothelzellen ausgeht, wurde der Signalweg nun anhand von primären Endothelzellen untersucht (73, 83). In vorangegangenen Studien wurde hauptsächlich die Wirkung von IL8 auf Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) untersucht (79, 80). CXCL2 ist bis dato kaum evaluiert und vor allem ist über das proangiogene Potential von CXCL2 und IL8 im Vergleich zu VEGF wenig bekannt. Da Endothelzellen aus verschiedenen Körperregionen unterschiedlich auf angiogene Reize reagieren können, war es zudem wichtig, dass neben den gut etablierten HUVEC auch primäre Hirnendothelzellen, HBMEC, untersucht wurden (142, 143). Zur Untersuchung der Proliferationskapazität der Endothelzellen wurde das CyQuant-Proliferationsassay verwendet.

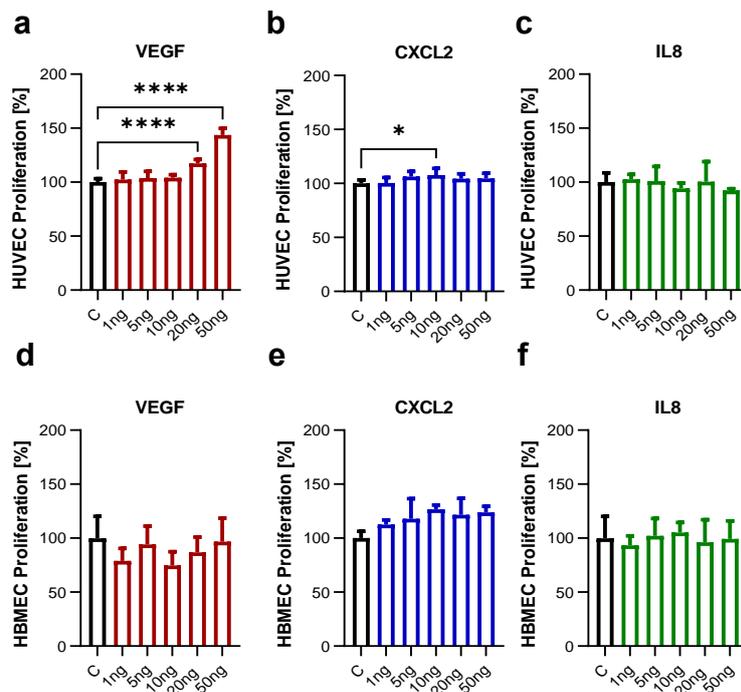


Abbildung 18: Proliferation von HUVEC und HBMEC unter Einfluss von proangiogenen Molekülen. Bei dem CyQuant-Proliferations-Assay wird das Proliferationsverhalten der Zellen analysiert, nachdem sie mit verschiedenen Molekülen stimuliert wurden. (a), (b), und (c) zeigen die Proliferation von HUVEC nach Stimulation mit VEGF (a), CXCL2 (b) und IL8 (c) verglichen zur Kontrolle „C“ (0,1% FCS in Basalmedium). Hier zeigt sich der signifikante Einfluss von VEGF in hohen Konzentrationen sowie der Effekt von CXCL2 in mittleren Konzentrationen. Unter Stimulation durch IL8 konnte hier kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. $n = 5$, repräsentatives Experiment. Die Graphen in (d), (e) und (f) zeigen die Proliferation von HBMECs nach Stimulation mit VEGF (d), CXCL2 (e) und IL8 (f) verglichen zur Kontrolle „C“ (0,1% FCS in Basalmedium). Hier konnten keine signifikanten Unterschiede durch die Stimulation mit den jeweiligen Molekülen gezeigt werden. $n = 3-4$, repräsentatives Experiment aus mehreren ähnlichen Experimenten. ns = nicht signifikant, $*p < 0,05$; $**** p < 0.0001$; one-way ANOVA, Bonferroni Korrektur.

Die Stimulation der primären Endothelzellen mit verschiedenen Konzentrationen von VEGF, CXCL2 und IL8 zeigte bei den HUVEC einen signifikanten Effekt von CXCL2 und insbesondere VEGF in höheren Konzentrationen, während keines der Moleküle einen signifikanten Effekt auf die Proliferation von HBMEC hatte (**Abbildung 18**).

Das CyQuant-Proliferationsassay ist ein für viele Zelltypen und -linien etabliertes Assay. Aufgrund der benötigten hohen Zellzahlen ergab sich insbesondere mit den HBMEC ein Problem, da diese als primäre humane Gehirnendothelzellen zum einen nur bis für wenige Passagen zu verwenden waren und sich zum anderen extrem schlecht expandieren ließen, sodass eine andere Möglichkeit gesucht werden musste, den Einfluss der proangiogenen Moleküle auf diese Zellen zu beobachten.

6.2.2. Stimulation von HUVEC und HBMEC und der Einfluss auf die Genexpression

6.2.2.1. Stimulation mit proangiogenen Proteinen

Als mögliche Option das Proliferationsassay in anderer Form durchzuführen und potenzielle Veränderungen auf zellulärer Ebene, insbesondere auf Genexpressionsebene zu sehen erfolgte eine Stimulation mit proangiogenen Molekülen. Zunächst wurden die Endothelzellen kultiviert und dann mit VEGF, CXCL2 und IL8 in unterschiedlichen Konzentrationen für 24h stimuliert.

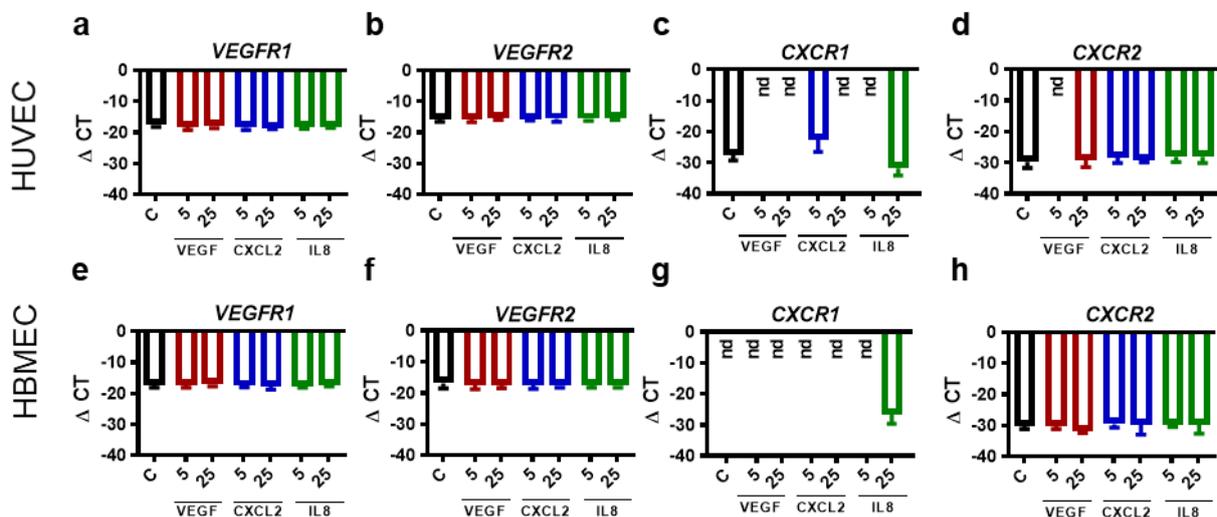


Abbildung 19: Genexpression von HUVEC und HBMECs nach Stimulation mit proangiogenen Molekülen. Analyse von *VEGFR1* (a, e), *VEGFR2* (b, f), *CXCR1* (c, g) und *CXCR2* (d, h) in HUVEC und in HBMEC. Nach Stimulation mit VEGF, CXCL2 und IL8 in Konzentrationen von 5 respektive 25ng/ml zeigten sich nach 24h keine relevanten Unterschiede in der Genexpression proangiogener Rezeptoren in HUVEC und HBMEC. Als Kontrolle diente 0,1% FCS in ECGM2 respektive ECM. Der *CXCR1*-Rezeptor (c,g) war nicht bei allen Konditionen nachweisbar, insbesondere dann nicht, wenn mit VEGF stimuliert wurde. Im Vergleich von HUVEC und HBMEC konnte lediglich für *VEGFR2* (b, f) nach Stimulation mit 25ng/ml IL8 ein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p = 0,0319$). Die RNA-Isolation erfolgte nach 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils 3 Wells/Kondition, die weiteren Analysen wurden auch in Triplikaten durchgeführt. nd = nicht detektierbar; one-way ANOVA, Bonferroni Korrektur.

Die Genexpressionsanalysen zeigten bei den HUVEC und HBMEC keinen Unterschied in Hinsicht auf die Expression von *VEGFR1*, *VEGFR2*, *CXCR1* oder *CXCR2* nach 24h (**Abbildung 19**). Der direkte Vergleich zwischen HUVEC und HBMEC zeigte nur für die *VEGFR2*-Expression nach Stimulation mit 25ng/ml IL8 Unterschiede.

Um zu ermitteln, ob bereits nach 4 bzw. 18h der Stimulation Effekte auf die Genexpression zu sehen waren, wurde der Versuch für die HUVEC wiederholt. Dabei erfolgte die Stimulation zunächst nach 18h mit und ohne VEGF im Kontrollmedium. Da sich auch nach 18h keine Unterschiede in der Rezeptorexpression nach Stimulation mit VEGF, CXCL2 und IL8 zeigten und das Vorhandensein von VEGF in der Kontrollgruppe keinen Einfluss hatte (**Abbildung 20a-c**), wurde nun der Effekt von VEGF auch nach 4h untersucht. Auch dabei zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Expression der Rezeptoren (**Abbildung 20d-f**). Folglich waren die Moleküle in verschiedenen Konzentrationen nicht in der Lage die Rezeptorexpression in HUVEC und HBMEC zu modulieren.

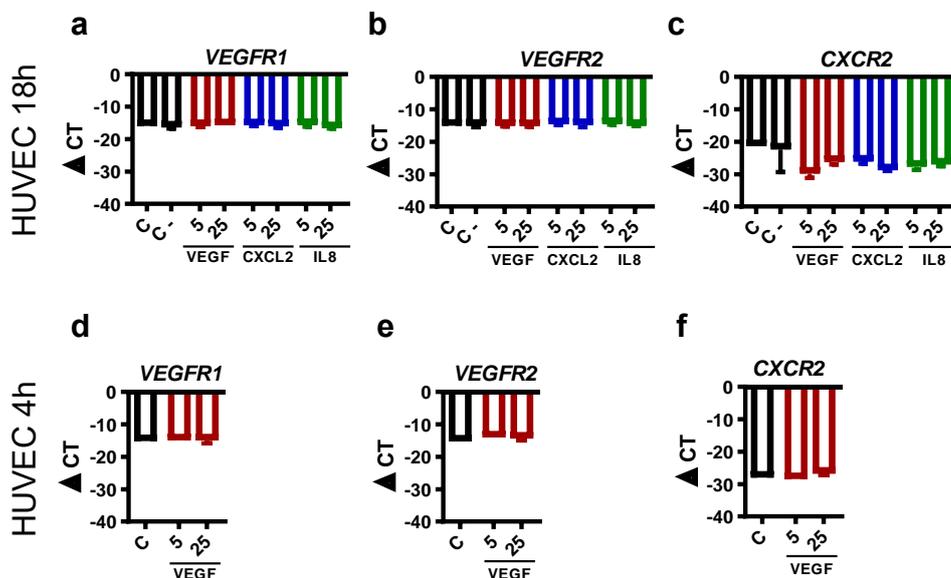


Abbildung 20: Genexpression von HUVEC zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation mit proangiogenen Molekülen. Analyse von *VEGFR1* (a), *VEGFR2* (b), *CXCR2* (c) nach Stimulation mit VEGF, CXCL2 und IL8 in Konzentrationen von 5 respektive 25ng/ml. Als Kontrolle „C“ wurde hier 0,1% FCS in ECGM2 verwendet. Die Gruppe „C-“ erhielt nur 0,1% FCS in Basalmedium ohne jeglichen Zusatz von VEGF. Es zeigten sich nach 18h keine Unterschiede in der Genexpression von *VEGFR1* (a), *VEGFR2* (b) und *CXCR2* (c) in HUVEC auf RNA-Ebene. Zudem zeigte auch die Kontrolle ohne VEGF-Zusatz keinen Unterschied hinsichtlich der Genexpression von *VEGFR1* (a), *VEGFR2* (b) und *CXCR2* (c). Die proangiogenen Rezeptoren waren auch nach 4h Stimulation mit 5 bzw. 25ng/ml VEGF nicht verändert (d-f). Repräsentative Experimente, n ≥ 2 Wells; one-way ANOVA, Bonferroni Korrektur.

6.2.2.2. Der Effekt der Behandlung mit TMZ und SB auf die Genexpression

Aufbauend auf den Daten aus den Stimulationsassays stellte sich nun die Frage, inwiefern sich die Genexpression auf RNA-Ebene sowie auf Proteinebene unter Einfluss der Standardchemotherapie im Glioblastom – Temozolomid (TMZ) – und in Kombination dem

CXCR2-Antagonisten – SB225002 (SB) verändern würde. Neben der Stimulation mit CXCL2/IL8 (STIM), die eine wie im Krankheitszustand zu erwartende Hochregulation der beiden Moleküle *in vitro* widerspiegeln sollte, folgte nun auch die Behandlung mit TMZ allein und in Kombination mit den vorher genannten sowie mit dem CXCR2-Antagonisten über 24h.

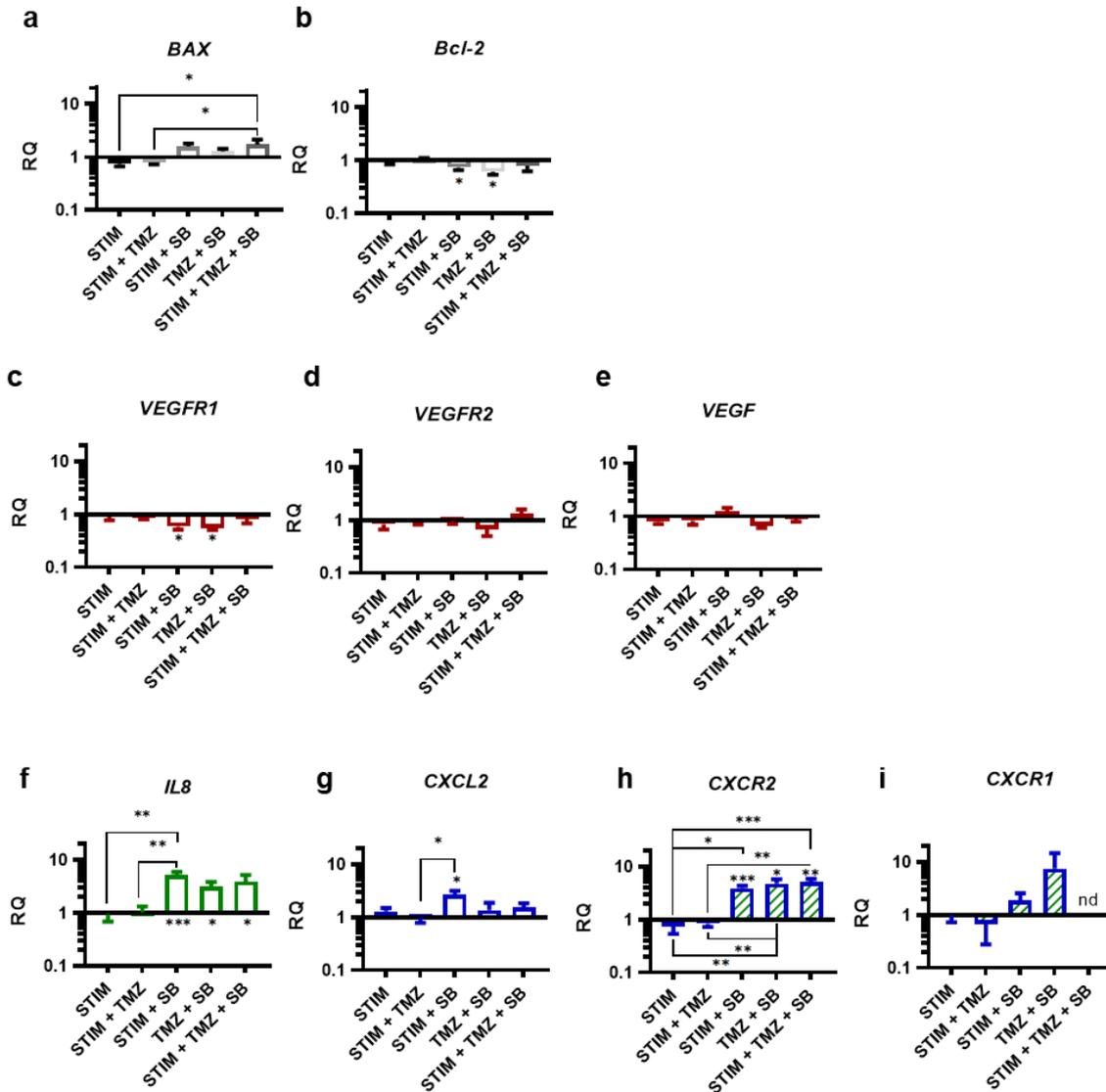


Abbildung 21: Genexpression von HUVEC nach Behandlung mit TMZ und SB. Nach Stimulation mit 25ng/ml CXCL2/IL8 (STIM), 10 μ M für TMZ und 0.03 μ M für SB zeigten sich nach 24h relevante Unterschiede in der Genexpression von HUVEC auf RNA-Ebene. Untersucht wurden *BAX* (proapoptotisch), *BCL-2* (antiapoptotisch), Gene des *VEGFR*-Signalwegs (*VEGF*, *VEGFR1* und *VEGFR2*) sowie Gene des *CXCR2*-Signalwegs (*IL8*, *CXCL2*, *CXCR2*, *CXCR1*). *BAX* (a) war signifikant hochreguliert nach Behandlung mit CXCL2/IL8 und SB. Das antiapoptotische *BCL-2* (b) hingegen war in den Konditionen, die mit dem Antagonisten behandelt wurden, herunter reguliert. Von den Genen des *VEGF*-Signalwegs zeigte sich lediglich bei *VEGFR1* (c) eine signifikante Herabregulation nach Behandlung mit STIM + SB und TMZ + SB. In den Gruppen, die mit STIM + SB, TMZ + SB respektive der Kombination der beiden behandelt wurden, zeigte sich eine signifikante Überexpression von *IL8* (f) und *CXCR2* (h). Eine Überexpression von *CXCL2* (g) ließ sich auch beobachten, allerdings war diese nur nach Behandlung mit STIM + SB signifikant. Die Expression von *CXCR1* (i) zeigte zwar eine Dynamik, die jedoch nicht signifikant war. Nd = nicht detektierbar; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; one-way ANOVA, Bonferroni Korrektur.

Mittels der quantitativen Realtime PCR wurde die Genexpression von pro - (*BAX*) und antiapoptotischen Molekülen (*BCL-2*), sowie von *VEGF*, *CXCL2*, *IL8* und deren Rezeptoren untersucht (**Abbildung 21**). Die Expression von *BAX* (**Abbildung 21a**) und *BCL-2* (**Abbildung 21b**) war signifikant verändert, vor allem dann, wenn die Zellen zuvor mit dem Antagonisten behandelt wurden. Das proapoptotische *BAX* wurde in den Zellen hoch reguliert, die mit dem Antagonisten unter Stimulation oder in Kombination mit TMZ behandelt wurden. Passend dazu war das antiapoptotische *BCL-2* herunter reguliert. Die Zellen, die nur *CXCL2/IL8* (STIM) oder *CXCL2/IL8* in Kombination mit TMZ (STIM +TMZ) erhielten, zeigten keine signifikant veränderte Expression von *BAX* und *BCL-2*. Die Expression von den Genen des *VEGFR/VEGF*-Signalwegs war nur teilweise verändert. So zeigte sich nach Behandlung mit *CXCL2/IL8* (STIM) respektive *CXCL2/IL8* und SB (STIM + SB) eine signifikante Herunterregulierung von *VEGFR1* (**Abbildung 21c**), während die Expression von *VEGFR2* (**Abbildung 21**) und *VEGF* (**Abbildung 21e**) in keiner der Gruppen signifikant verändert war. Interessanterweise war die Expression der Proteine bzw. Rezeptoren des *CXCR2*-Signalwegs signifikant verändert. (**Abbildung 21f-i**). Alle Konditionen, die den Antagonisten enthielten, zeigten eine signifikante Hochregulation von *IL8*. Am stärksten verändert war diese nach Behandlung mit *CXCL2/IL8* (STIM) in Kombination mit SB. Die alleinige Stimulation mit *CXCL2/IL8* sowie die Behandlung mit *CXCL2/IL8* und TMZ zeigte keine signifikante Veränderung der *IL8*-Expression. Das gleiche galt auch für die Expression von *CXCL2* (**Abbildung 21g**), obwohl im Gegensatz zu *IL8* die Hochregulation nach Behandlung mit dem Antagonisten in allen Konditionen weniger stark ausfiel. Analog zur Expression von *IL8* und *CXCL2* war in den Gruppen, die mit dem Antagonisten behandelt wurden, auch die Expression des gemeinsamen Rezeptors *CXCR2* (**Abbildung 21h**) signifikant hochreguliert. Eine Tendenz dazu zeigte sich auch für den *CXCR1* (**Abbildung 21i**).

6.2.2.3. Der Effekt der Behandlung mit TMZ und SB auf die Rezeptorexpression von VEGFR1 und CXCR2

Nach gleichem Protokoll wie in 6.2.2.2 beschrieben wurden die Zellen wieder kultiviert und für 24h in verschiedenen Kombinationen behandelt. Anders als bei dem vorangehenden Experiment wurden die Zellen auf Glas kultiviert und nach Ablauf der Behandlungszeit fixiert um anschließend eine Immunfluoreszenzfärbung durchzuführen (vgl. 5.5.5.3 **Zellfixierung** und 5.5.5.4 **Immunfluoreszenzfärbung**). Untersucht wurde hier die Expression von *VEGFR2* und *CXCR2* auf Proteinebene (**Abbildung 22**). Anders als in der Analyse auf mRNA-Ebene zeigte sich hier, dass nach Stimulation von *CXCL2/IL8* (STIM) beide Rezeptoren im Vergleich zur Kontrolle deutlich überexprimiert wurde. Bei ausschließlicher Behandlung mit der Kombinationstherapie (TMZ + SB) wurde die Expression von *CXCR2* auch signifikant hochreguliert, was sich mit den mRNA-Leveln des Rezeptors deckte. Gegensätzlich zu den

Ergebnissen auf RNA-Ebene war jedoch die CXCR2-Expression unter simulierter Überexpression mit der Kombinationstherapie (STIM + TMZ + SB) signifikant herunter reguliert (Abbildung 22c).

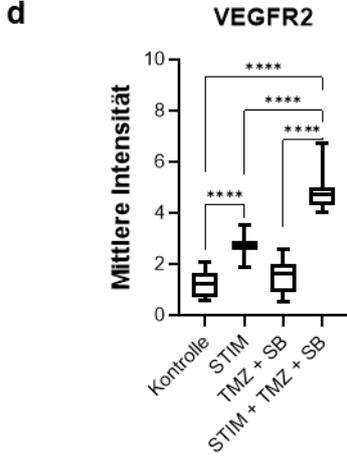
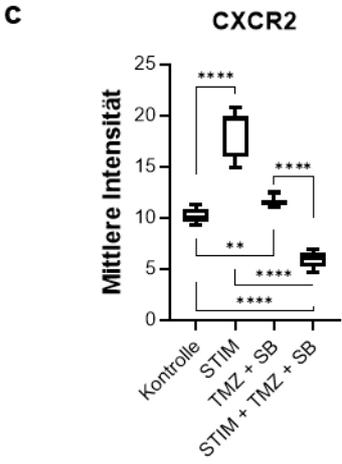
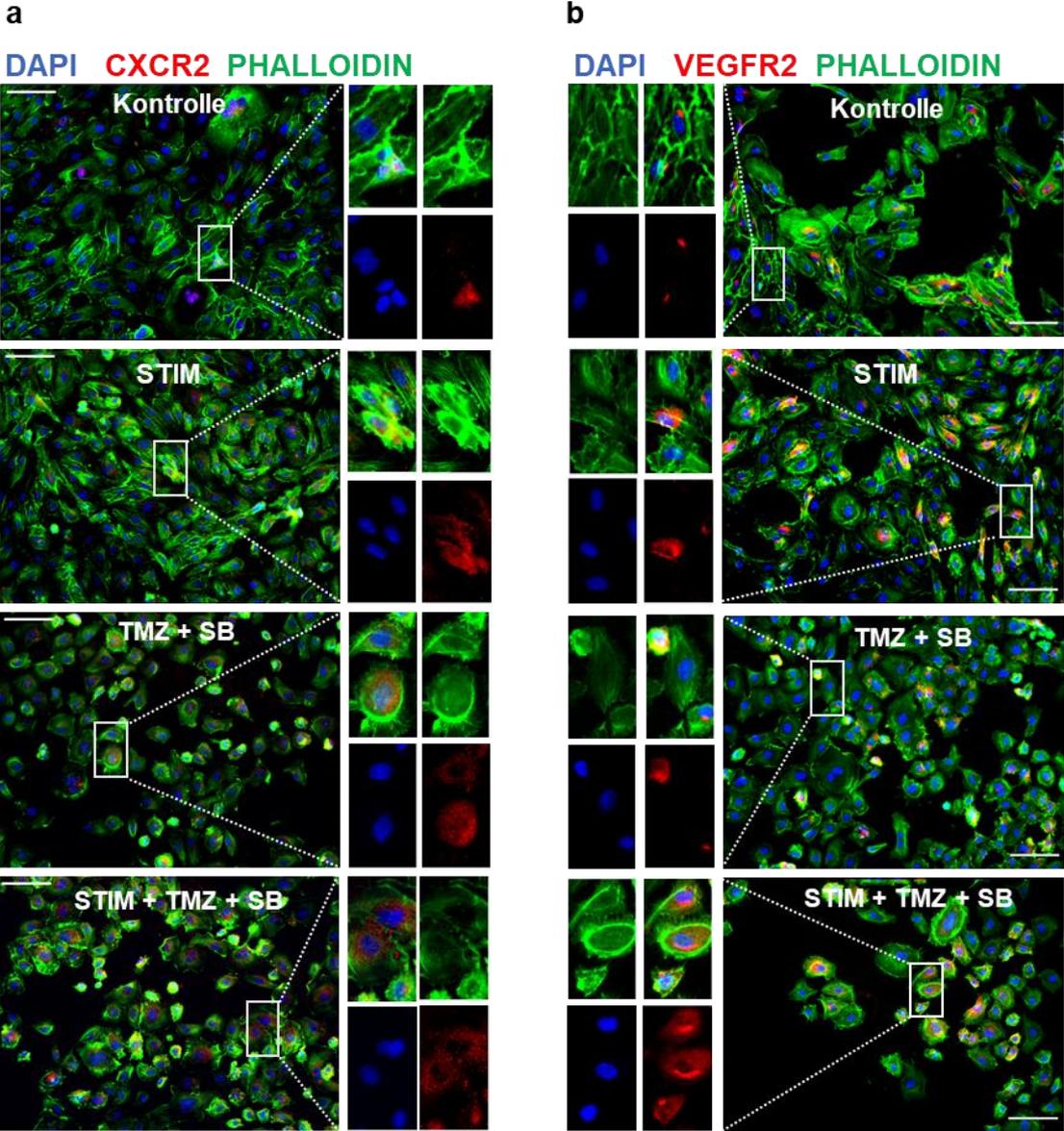


Abbildung 22: Die Expression von CXCR2 und VEGFR2 von HUVEC nach Behandlung mit der Kombinationstherapie. Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von CXCR2 (a) und VEGFR2 (b) nach 24h Behandlung mit CXCL2/IL8 (STIM) in Konzentrationen von 25ng/ml, 10 μ M für TMZ und 0,03 μ M für SB. DAPI (Zellkernmarker) in blau, CXCR2 in a und VEGFR2 in b in rot (Cy3) und PHALLOIDIN (Zellgerüstmarker) in grün. Auswertung der mittleren Intensität des jeweiligen Rezeptors. Es zeigten sich relevante und signifikante Unterschiede in der Expression von HUVEC auf Rezeptor-Ebene sowohl für CXCR2 (c) als auch für VEGFR2 (d). Die Expression von CXCR2 war signifikant erhöht in den Gruppen, die 1. mit CXCL2/IL8 und 2. mit TMZ/SB behandelt wurden. Eine Kombination der Moleküle zeigte hingegen eine signifikante Herunterregulation der CXCR2-Expression auf Rezeptorebene. Auch der Vergleich der Gruppen zeigte signifikante Unterschiede (c). Die Expression hinsichtlich des VEGFR2 war in den Gruppen hochreguliert, die mit CXCL2/IL8 allein oder in Kombination mit TMZ/SB behandelt wurden. Auch hier zeigten sich signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen. Repräsentatives Experiment, n = 10 Bilder pro Kondition; ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; one-way ANOVA, Bonferroni Korrektur

Die VEGFR2-Expression war in diesem Experiment in allen Konditionen nach Stimulation mit CXCL2/IL8 signifikant hochreguliert. Bei alleiniger Applikation der Kombinationstherapie (TMZ+SB) gab es keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (**Abbildung 22d**).

6.2.3. Der Einfluss des CXCR2-Signalwegs auf die Migration von primären humanen Endothelzellen

Die Migration von Zellen, insbesondere von Endothelzellen, ist eine unabdingbare Fähigkeit. Endothelzellen benötigen diese Fähigkeit, um neue Gefäße ausbilden zu können. Mittels des Transwellmigrationsassays kann der Effekt eines Lockstoffes auf die Zellen getestet werden. Dabei wird der Lockstoff in eine untere Kammer gegeben. Die Endothelzellen werden in eine andere Kammer, die obere Kammer ausgesät, und wandern dann, je nach Potenz, in Richtung des Lockstoffes. Dabei werden die beiden Kammern durch eine Membran mit winzigen Poren getrennt, die die Zellen überwinden müssen.

Die Anzahl (**Abbildung 23a**) sowie der prozentuale Anteil (**Abbildung 23b**) der migrierten HUVEC unter Einfluss von VEGF, CXCL2 und IL8 in unterschiedlichen Konzentrationen war lediglich durch VEGF verändert. VEGF hatte je nach Konzentration einen bis zu 500%igen Effekt auf das Migrationsverhalten der HUVEC. Im Zuge von Etablierungsarbeiten erfolgte auch eine Versuchsreihe mit den HBMEC. Bei diesen Endothelzellen ließ sich sowohl in der absoluten Anzahl als auch am prozentualen Anteil kein signifikanter Effekt von VEGF nachweisen. Tendenziell war die Migration bei Stimulation mit VEGF leicht erhöht ($p = 0,07$; **Abbildung 23c** und **d**).

Da für das Transmigrationsassay verhältnismäßig viele Zellen verwendet werden mussten, war schnell klar, dass nach einer Alternative gesucht werden musste. Insbesondere auch aufgrund der beschränkten Kapazitäten die HBMEC zu expandieren sowie wegen des Verkaufstopps auf dem europäischen Markt.

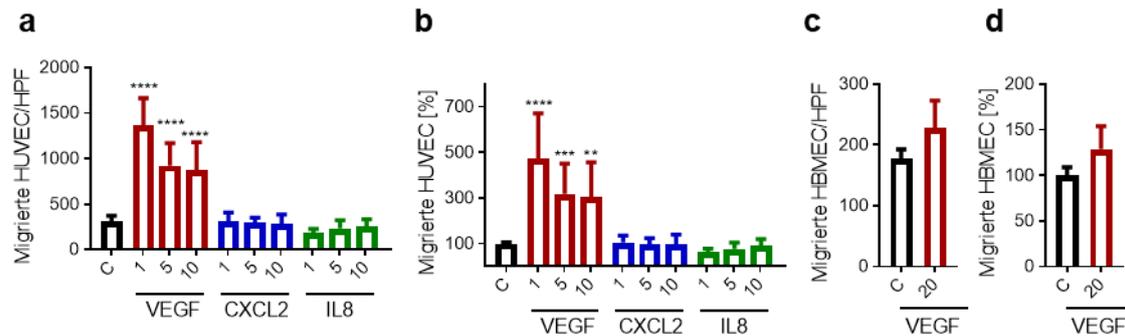


Abbildung 23: Migrationsverhalten von HUVEC und HBMEC. Analyse des Migrationsverhaltens von HUVEC und HBMEC anhand des Transwellassays unter Einfluss von VEGF (für HUVEC und HBMECs), CXCL2 und IL8 (HUVEC) in Konzentrationen von 1, 5, 10 respektive 20ng/ml. Zellzahl pro Hauptgesichtsfeld (HPF) (a) und prozentualer Anteil an migrierten HUVEC (b), Mittelwerte mit Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit je 3-4 Wells pro Kondition pro Versuch. (c) Zellzahl pro Hauptgesichtsfeld und prozentualer Anteil an migrierten HBMECs (d) unter Einfluss von VEGF. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, repräsentatives Experiment für HBMECs. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; one-way ANOVA, Bonferroni Korrektur (a, b) und $n = 1$ (4/Kondition), ungepaarter student's t-test.

6.2.4. μ -Slide Chemotaxis

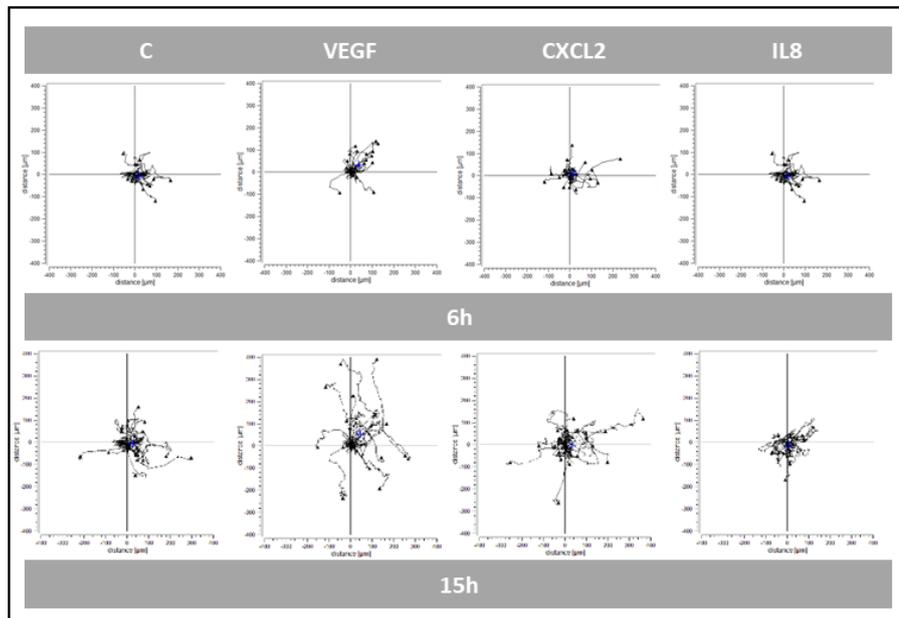
6.2.4.1. Chemotaktische und chemokinetische Potenz von CXCL2 und IL8

Die μ -Slide Chemotaxis macht es möglich das Migrationsverhalten von Zellgruppen zu analysieren, ohne dabei eine hohe Anzahl von Zellen aussäen zu müssen. So genügen 100.000 Zellen, um theoretisch mehr als 16 Beobachtungskanäle zu füllen, also 16 verschiedene Konditionen zu untersuchen. Zudem kann eine Beobachtung des Migrationsverhaltens dank moderner Mikroskopiemethoden in Echtzeit erfolgen.

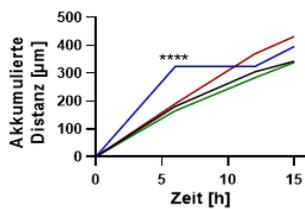
Zu Beginn wurde der Aufbau eines stabilen Gradienten mit Lebensmittelfarbe getestet. Dabei wurde fest gestellt, dass eine Diffusion des Farbstoffs von einer zur anderen Kammer nicht komplett zu unterbinden war, was bei der Interpretation der Ergebnisse als Limitation angesehen werden muss. Nach der Etablierung der Kontrolle wie im Kapitel „Etablierung der Kontrolle und wichtige Messparameter“ beschrieben, wurden nun die schon zuvor untersuchten Moleküle zur Initiierung der Chemotaxis ausgetestet. VEGF, CXCL2 und IL8 wurden in verschiedenen Konzentrationen (10ng/ml und 100ng/ml) hinzugegeben und das Migrationsverhalten von HUVEC videomikroskopisch über mehrere Stunden beobachtet. Die Analyse der Gesamtstrecke, der Euklidischen Strecke, des COM (Center of Mass), der Direktionalität, des FMI (Forward Migration Index), der Geschwindigkeit und der Rayleigh Test wurde nach 6, 12 und 15h durchgeführt (**Abbildung 24b-h**). Hierbei zeigte sich ein signifikanter Rayleigh Test bei Hinzugabe von VEGF zu allen Zeitpunkten und für IL8 nach 12h (**Abbildung 24h**). Durch die Stimulation mit CXCL2 waren die Zellen immer homogen verteilt, sodass der Rayleigh Test nicht signifikant ausfiel. Allerdings war die Akkumulierte Strecke und die Euklidische Strecke lediglich unter Einfluss von CXCL2 nach 6h signifikant

größer als die der Kontrollgruppe (**Abbildung 24b,c**). Der COM, die Direktionalität, der FMI und die Geschwindigkeit unterschieden sich für keines der Moleküle signifikant von der Kontrolle (**Abbildung 24d-g**).

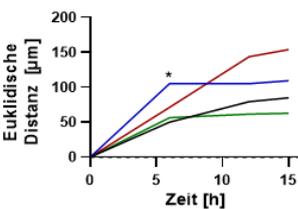
a



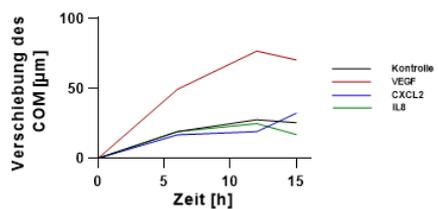
b



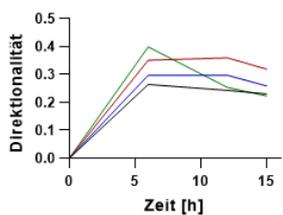
c



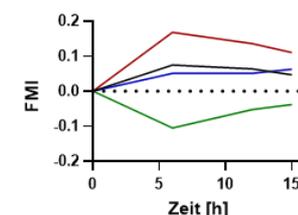
d



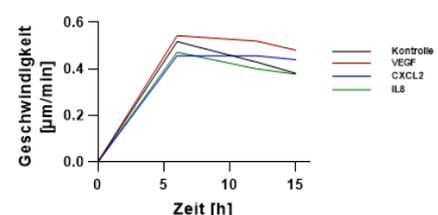
e



f



g



h

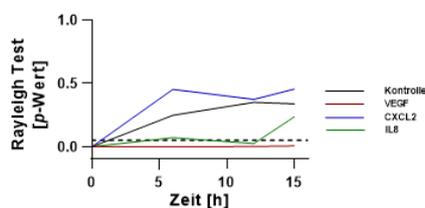


Abbildung 24: VEGF, CXCL2 und IL8 haben keinen chemotaktischen Effekt auf HUVEC. Behandlung von HUVEC mit 10ng/ml VEGF, CXCL2 und IL8 mittels der μ -Slide Chemotaxis mit 0.1% FCS als Kontrolle. (**a**) Darstellung der individuellen Wege aller beobachteten Zellen mit den angegebenen Molekülen nach 6h (obere Reihe) und nach 15h (untere Reihe); COM: blaues Kreuz; Angabe der Distanz in μ m. Darstellung der einzelnen Messparameter wie die (**b**) Akkumulierte Distanz, (**c**) die Euklidische Distanz, (**d**) Verschiebung des COM, (**e**) die Direktionalität, (**f**) der FMI, (**g**) die Geschwindigkeit sowie (**h**) des Rayleigh Tests im Zeitverlauf. Ein repräsentatives Experiment; $n \geq 40$ Zellen/Kondition; * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$; two-way ANOVA, Bonferroni Korrektur

Es ließen sich jedoch einige Tendenzen feststellen. Der FMI erreichte für alle Moleküle sein Maximum bereits nach 6h. Interessanterweise wanderten die Zellen in Anwesenheit von IL8 nicht entlang des Konzentrationsgradienten, sondern von diesem weg, was durch die negativen FMI-Werte dargestellt wird (**Abbildung 24f**). Ebenso wie der FMI erreichten auch die Direktionalität und auch die Geschwindigkeit bereits nach 6h ihr Maximum und nahmen danach stetig ab, was in diesem Zusammenhang für einen instabilen Gradienten sprechen könnte. Da für keine Kondition die Bedingungen für eine gerichtete Zellwanderung erfüllt wurden, muss von einer ungerichteten Migration ausgegangen werden. Die beobachteten Unterschiede sind damit am ehesten durch eine gesteigerte chemokinetische Wirkung von VEGF, CXCL2 und IL8 zu erklären. Zu der chemotaktischen Potenz lässt sich anhand dieser Daten somit keine Aussage treffen.

6.2.4.2. Die Wirkung von SB225002 auf die Chemotaxis und Chemokinese

Um die Mechanismen der CXCR2-Blockade besser verstehen zu können, wurden nun weiterführende Analysen nach Hinzugabe des Antagonisten durchgeführt. Da IL8 als Ligand des CXCR2 in vielerlei Hinsicht besser erforscht ist als CXCL2 lag der Fokus auch hier auf letzterem. So wurde das Migrationsverhalten von HUVEC über 15h nach Hinzugabe von CXCL2, SB225002 sowie einer Kombination aus beiden, videomikroskopisch beobachtet (**Abbildung 25a**). Als Kontrolle diente auch hier 0.1% FCS. Es zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante p-Werte im Rayleigh-Test (**Abbildung 25h**). Die Zellen, die mit dem Antagonisten behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu CXCL2 eine signifikant geringere akkumulierte Distanz nach allen Zeitpunkten, eine geringere euklidische Strecke nach 6h sowie reduzierte Geschwindigkeit zu allen Zeitpunkten. Somit wurde die Geschwindigkeit der Zellen durch den Antagonisten signifikant reduziert. Der COM, die Direktionalität und der FMI unterschieden sich jedoch nicht signifikant von denen unter alleiniger CXCL2 Stimulation. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich unter Behandlung mit dem Antagonisten lediglich in der akkumulierten Strecke nach 6 und 12h ein Unterschied. Alle anderen Parameter waren nicht signifikant verändert. Unter CXCL2 als Lockstoff waren die akkumulierte Strecke und die euklidische Strecke nach 6h jedoch signifikant größer als die der Kontrolle. Nichtsdestotrotz zeigten sich auch hier keine signifikanten Veränderungen des COM, der Direktionalität, des FMI und der Geschwindigkeit (**Abbildung 25d-g**). Der Vergleich vom Antagonisten allein zur Kombination mit CXCL2 ergab keinerlei Unterschiede. Die Kombination von CXCL2 mit dem Antagonisten im Vergleich zur CXCL2 allein zeichnete sich durch eine signifikante Reduktion der akkumulierten Strecke, der euklidischen Strecke und der Geschwindigkeit zu allen Zeitpunkten aus, wohingegen diese Parameter durch alleinige Behandlung mit dem Antagonisten weniger stark reduziert waren (**Abbildung 25b,c,g**). Obwohl für keines der

Moleküle ein signifikanter Einfluss auf die Chemotaxis zu beobachten ist, da die dafür notwendigen Kriterien nicht erfüllt wurden, lässt sich doch schlussfolgern, dass der Antagonist die Migrationsgeschwindigkeit und damit die zurückgelegte Strecke reduziert. Die Kombination von CXCL2 und SB225002 sollte hier die im Glioblastom nachgewiesene CXCL2 Überexpression nachstellen (67, 86, 114). Der signifikante Effekt des Antagonisten auf primäre humane Endothelzellen unter Standardbedingungen (SB) sowie in der nachgeahmten Überexpression (CXCL2 + SB), bestätigt seine hohe Wirksamkeit *in vitro*.

a

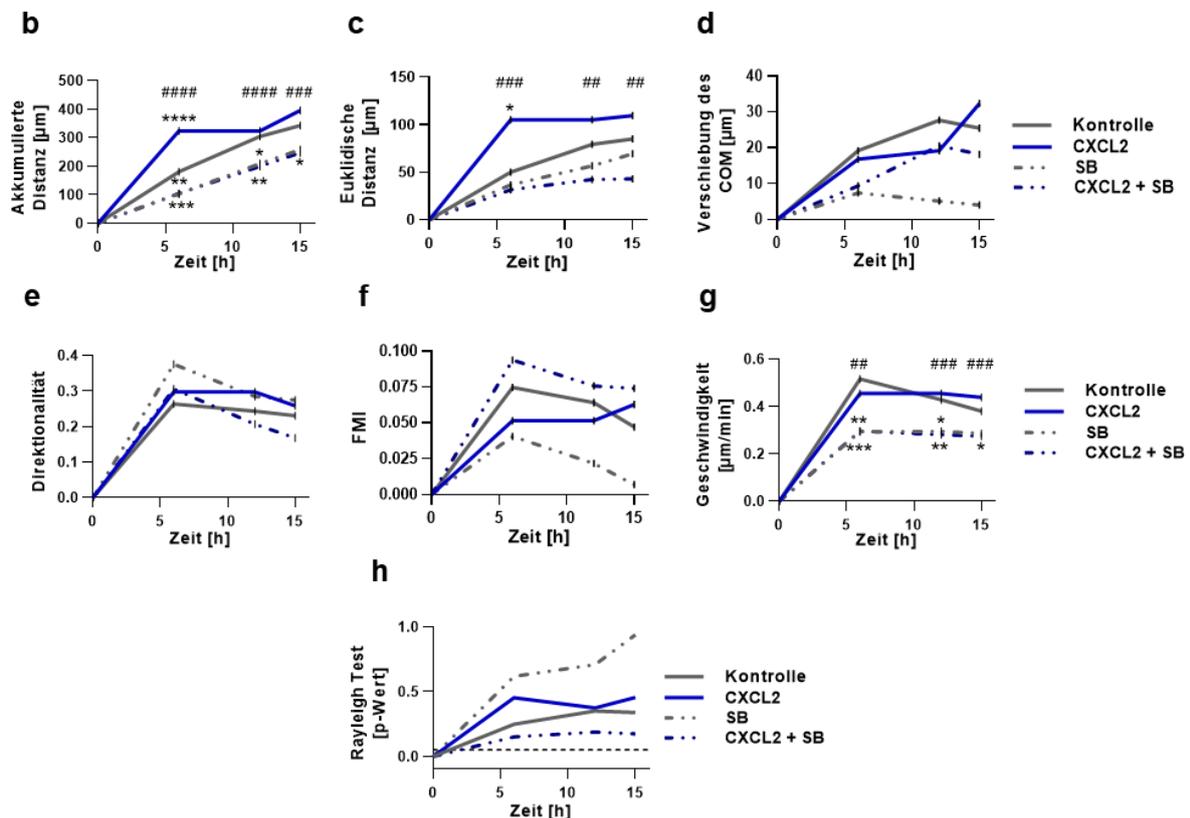
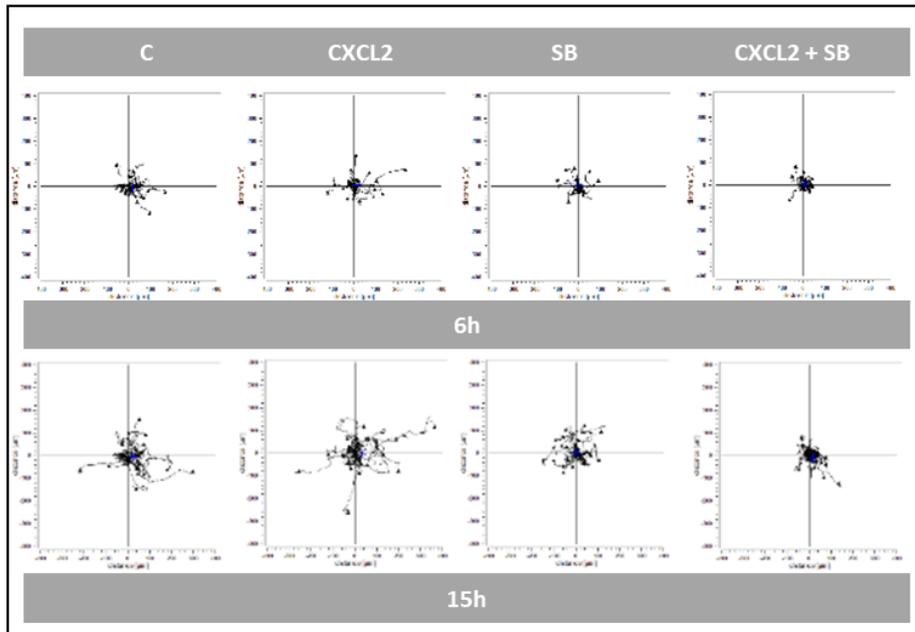


Abbildung 25: SB225002 reduziert die Migrationsgeschwindigkeit und die zurückgelegte Distanz von HUVEC. Die Endothelzellen wurden in die μ -Slides ausgesät und sobald sie adhären waren, wurde mittels CXCL2 (10ng), SB225002 (SB; 0,03 μ M) und einer Kombination aus beiden (CXCL2 + SB) in 0.1% FCS in ECBM2 ein Chemokingradient aufgebaut. Die Zellen wurden über 15h videomikroskopisch beobachtet und nach 6,12 und 15h analysiert. **(a)** Darstellung der individuellen Wege aller beobachteten Zellen mit den angegebenen Molekülen nach 6h (obere Reihe) und nach 15h (untere Reihe); COM: blaues Kreuz; Angabe der Distanz in μ m. Darstellung der einzelnen Messparameter wie die **(b)** Akkumulierte Distanz, **(c)** die Euklidische Distanz, **(d)** Verschiebung des COM, **(e)** die Direktionalität, **(f)** der FMI, **(g)** die Geschwindigkeit sowie **(h)** des Rayleigh Tests im Zeitverlauf. Die p -Werte des Rayleigh Tests waren zu keiner Zeit signifikant, was ein Zeichen der inhomogenen Verteilung der Zellen zu allen Zeiten bedeutet. * zeigt das Signifikanzniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe an; # zeigt das Signifikanzniveau im Vergleich von CXCL2 zu CXCL2+SB an. Ein repräsentatives Experiment; $n \geq 40$ Zellen/Kondition; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ one-way ANOVA, Bonferroni Korrektion.

6.2.5. 3D Sphäroid-basierte Angiogenese

6.2.5.1. Etablierung der Sphäroid-basierten Angiogenese an HBMEC

Die Sphäroid-basierte Angiogenese ist ein dreidimensionales *in vitro* Modell der Neubildung von Gefäßen. Zur Etablierung des Modells an HBMEC wurden unterschiedliche Zellzahlen (500, 1000, 2000, 3000 Zellen/Sphäroid) sowie verschiedene Konzentrationen der Methocel (0,6% und 1,2%) - und Collagen-Matrix (1,0 -3,0 mg/ml) ausprobiert. Es zeigte sich, dass die HBMEC im Vergleich zu den HUVEC bei einer Aussaat von 1000 Zellen die stabilsten Sphäroide bildeten. Für die HUVEC waren es 500 Zellen pro Sphäroid. Die Stabilität der Sphäroide garantierte eine Vergleichbarkeit der beiden Zelltypen. Zur Generierung der HBMEC-Sphäroide wurden diese in 1,2%iger Methocellösung ausplattiert wohingegen die HUVEC-Sphäroide in einer 0,6%igen Lösung die beste Stabilität erreichten. Zur Testung des Modells wurden beide Sphäroidtypen mit unterschiedlichen Konzentrationen VEGF stimuliert, was für die HUVEC-Zellen ein gut etabliertes Modell ist (118). An HUVEC- und HBMEC-Sphäroiden führten die unterschiedlichen Konzentrationen von VEGF (25, 50 und 100ng/ml) nach 24h zu einer Steigerung der Sproutingfläche und Sproutlänge im Vergleich zur Kontrollgruppe. Interessanterweise zeichneten sich die HBMEC-Sphäroide durch sehr lange feine Sprouts aus, wohingegen die HUVEC-Sphäroide eher kürzere Sprouts mit einer breiten Basis aufwiesen (**Abbildung 26a**). Diese morphologische Veränderung wurde weiter untermauert durch die signifikant gesteigerte mittlere und maximale Sproutlänge der HBMEC-Sphäroide (**Abbildung 26e-f**), wohingegen die HUVEC-Sphäroide im Vergleich zur Kontrolle lediglich signifikante Veränderungen der mittleren Sproutlänge und der Sproutingfläche aufwiesen. Ausschließlich bei 100ng/ml VEGF zeigte sich eine signifikante Zunahme der maximalen Sproutlänge in HUVEC (**Abbildung 26a-d**). Der Vergleich von HUVEC- zu HBMEC-Sphäroiden zeigte zudem hoch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Sproutingfläche ($p < 0,0001$), der mittleren Sproutlänge ($p < 0,0001$) und der maximalen Sproutlänge ($p < 0,0001$) (**Abbildung 26h-j**).

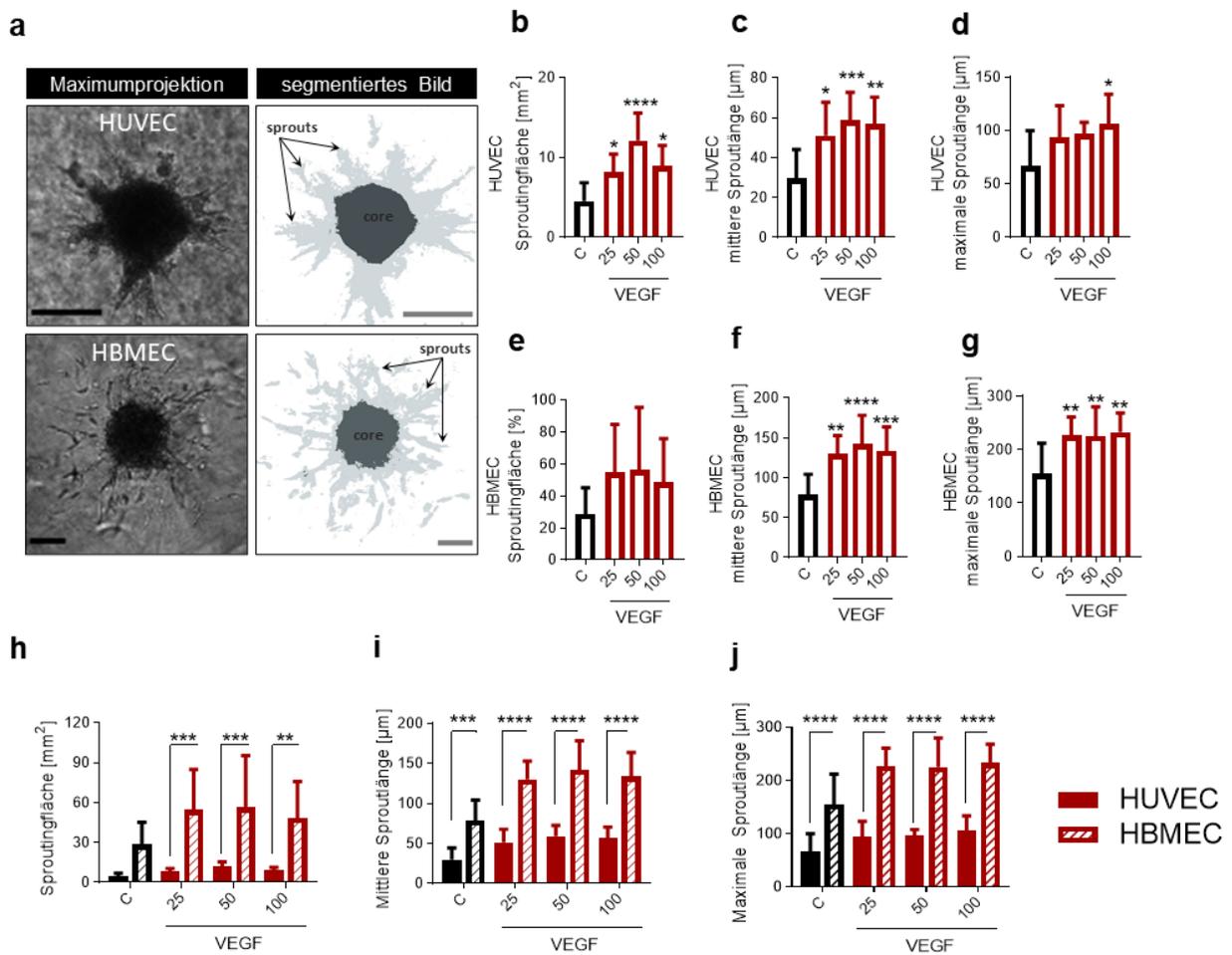


Abbildung 26: Etablierung der HUVEC- und HBMEC-Sphäroide. 3D Sphäroid-basierte Angiogenese (b-d) an HUVEC und (e-g) HBMEC sowie (h-j) im direkten Vergleich nach Behandlung mit VEGF für 24h in aufsteigenden Konzentrationen (25, 50, 100ng/ml), 0,1% FCS in ECBM bzw. EBM diente als Kontrolle und ist mit „C“ gekennzeichnet. (a) Repräsentative Bilder der HUVEC- und HBMEC-Sphäroide in maximaler Projektion und daneben Bilder des jeweiligen klassifizierten Sphäroids mit dem „core“ (aus dem Englischen, Kern) in dunkelgrau und den „Sprouts“ in hellgrau. Maßstab 100µm. Die Abbildungen zeigen die Sproutingfläche (b, e), die mittlere Sproutlänge (c, f) und die maximale Sproutlänge (d, g) nach Behandlung mit VEGF (25, 50 und 100ng/ml) wie angegeben. Der Vergleich von HUVEC zu HBMEC zeigte (für b-d vs.e-f) signifikante Unterschiede ($p < 0,01-0,0001$). 3-4 unabhängige Versuche mit jeweils $n \geq 3$ Sphäroide/Kondition, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; one-way ANOVA, Bonferroni Korrektur

6.2.5.2. Der Einfluss von CXCL2 und IL8 auf die Angiogenese

Um die proangiogene Wirksamkeit von CXCL2 und IL8 im Vergleich zu VEGF analysieren zu können, wurde das 3D Sphäroid basierte Sprouting Model nun herangezogen. Der Einfluss der Moleküle auf die Endothelzellen in unterschiedlichen Konzentrationen wurde untersucht. Die Daten zeigen, dass CXCL2 und IL8 potente Alternativen zum VEGF-Signalweg sind.

Sowohl auf die HUVEC als auch auf die HBMEC hatte VEGF den erwarteten proangiogenen Effekt (**Abbildung 27a-c**).

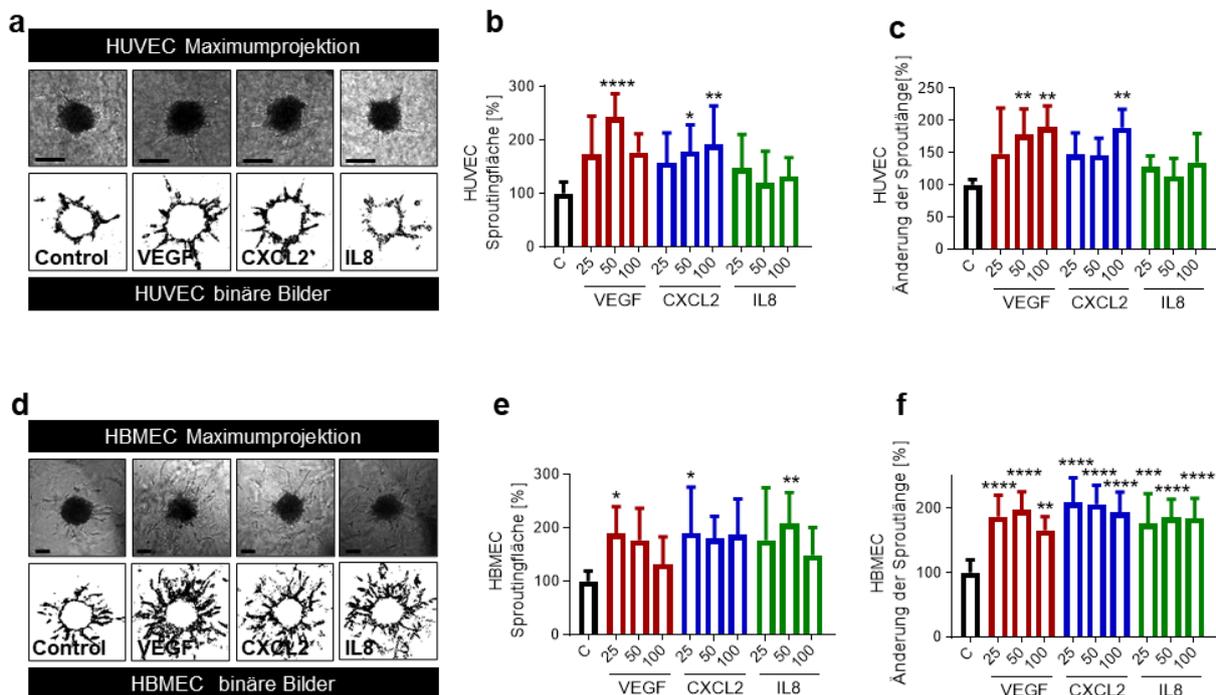


Abbildung 27: 3D-Angiogenese von HUVEC und HBMEC unter Einfluss von CXCL2 und IL8. Der proangiogene Effekt von CXCL2 und IL8 im Vergleich zu VEGF wurde nach 24h Stimulation der Sphäroide untersucht. Alle Moleküle hatten einen Effekt. **(a)** zeigt repräsentative Bilder der HUVEC-Sphäroide in der Maximumprojektion und darunter binäre Bilder der Sprouts für die Kontrollgruppe und unter Stimulation mit VEGF, CXCL2 und IL8 (100ng/ml), Maßstab 100µm. **(b)** und **(c)** zeigen die prozentuale Änderung der Sproutingfläche und der Sproutlänge von HUVEC-Sphäroiden nach 24h Stimulation mit VEGF, CXCL2 und IL8 in den angegebenen Konzentrationen (25, 50 und 100ng/ml), 0,1% FCS in ECBM diente als Kontrolle und ist mit „C“ gekennzeichnet. In **(d)** Darstellung repräsentativer Bilder der HBMEC-Sphäroide in der Maximumprojektion und darunter binäre Bilder der Sprouts für die Kontrollgruppe und unter Stimulation mit VEGF, CXCL2 und IL8 (100ng/ml), Maßstab 100µm. **(e)** und **(f)** zeigen die prozentuale Änderung der Sproutingfläche und der Sproutlänge von HBMEC-Sphäroiden nach 24h Stimulation mit VEGF, CXCL2 und IL8 in den angegebenen Konzentrationen (25, 50 und 100ng/ml), 0,1% FCS in EBM diente als Kontrolle und ist mit „C“ gekennzeichnet. $n = 6-12$ Sphäroide/Kondition, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; one-way ANOVA, Bonferroni Korrektur.

So waren die Sproutingfläche und die Sproutlänge durch die verschiedenen Moleküle unterschiedlich stark gesteigert. Unter VEGF-Stimulation kam es zu einer Steigerung der Sproutingfläche und Sproutlänge bei beiden primären humanen Endothelzelltypen wie in **Abbildung 27b, c, e** und **f** dargestellt. Auch durch die alternativen proangiogenen Moleküle wurde die Sproutingfläche und Sproutlänge der HUVEC und HBMEC signifikant gesteigert (**Abbildung 27b, c, e** und **f**). Während bei den HUVEC höhere Konzentrationen von VEGF (≥ 50 ng/ml) wirksamer waren, war der Effekt bei den HBMEC hinsichtlich geringerer Konzentrationen verschoben (vgl. **Abbildung 27e** und **f**).

CXCL2 und auch IL8 steigerten die Angiogenese der Hirnendothelzellen sowohl was die Fläche als auch die Sproutlänge anging, signifikant. CXCL2 hatte in allen Konzentrationen einen ähnlich großen Effekt auf die Hirnendothelzellen wie VEGF. Im Gegensatz zu den HUVEC, wurden die Angiogenese der HBMEC durch IL8 signifikant gesteigert. Somit lässt sich schlussfolgern, dass CXCL2 und IL8 in allen Konzentrationen ähnliche Effekte auf die HBMEC hatte.

6.2.5.3. Der Effekt des CXCR2-Antagonisten auf die Angiogenese

Als potenzielle Therapieoption im GBM war der antiangiogene Effekt des CXCR2-Antagonisten insbesondere in Hinsicht auf die Gehirnendothelzellen interessant, da die alternativen proangiogenen Moleküle CXCL2 und IL8 die Neoangiogenese dieser Zellen besonders stark steigerten, wohingegen ihr Effekt auf die HUVEC geringer ausfiel (**Abbildung 27**). Deshalb wurden diese Zellen genutzt, um den Effekt des CXCR2-Antagonisten, SB225002, auf die Angiogenese zu analysieren. Dabei zeigte sich, dass der Antagonist allein schon einen starken antiangiogenen Effekt auf die HBMEC hatte (**Abbildung 28a-g**). Zunächst wurde die Wirksamkeit des Antagonisten in verschiedenen Konzentrationen allein und in Kombination mit CXCL2 untersucht. Bei der Dosisfindung ergab die Literaturrecherche sehr stark unterschiedliche Konzentrationen, die von 0,004 μ M bis 10 μ M reichten (82, 88, 94). Da die HBMEC als primäre humane Endothelzellen sehr empfindlich sind, erfolgten Testversuche mit den geringsten bereits bekannten Konzentrationen, die in der Arbeitsgruppe an einer murinen Gehirnendothelzelllinie bereits erprobt waren (85). Es wurden Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen von SB225002 (0,125 μ M, 0,06 μ M und 0,03 μ M) durchgeführt, um zu evaluieren in welcher Konzentration der Antagonist auf die Endothelzellen besonders wirksam ist. Es zeigte sich, dass bei der Behandlung der Zellen in der Zellkultur schon sehr niedrige Konzentrationen eine enorme Wirkung zeigten, deshalb wurden diese hier dann angewandt. Die Sphäroide wurden für 24h allein mit dem Antagonisten SB225002 oder in Kombination mit CXCL2 behandelt. Als Kontrollgruppen wurden die Zellen mit Basalmedium + 0,1% FCS oder CXCL2 stimuliert. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Sproutingfläche und Sproutlänge sowohl bei alleiniger Behandlung mit SB225002 als auch in Kombination mit CXCL2 in allen Konzentrationen (**Abbildung 28a,b**).

Zwischen der alleinigen Behandlung mit dem Antagonisten und der Stimulation mit CXCL2 gab es in keiner der Konzentrationen signifikante Unterschiede, was für einen Effekt sprechen würde, der über den alleinigen CXCR2-Antagonismus hinaus geht. Um diesen möglichen Effekt weiter zu quantifizieren wurde der Versuch auch in Kombination mit IL8 und VEGF wiederholt. Hierfür wurden die eben genannten Moleküle mit der bestwirksamen Konzentration (0,06 μ M) von SB225002 kombiniert. Auch in diesem Versuchsaufbau führte der Antagonist

allein und in Kombination mit den Molekülen zu einer signifikanten Reduktion der Sproutingfläche und der Sproutlänge.

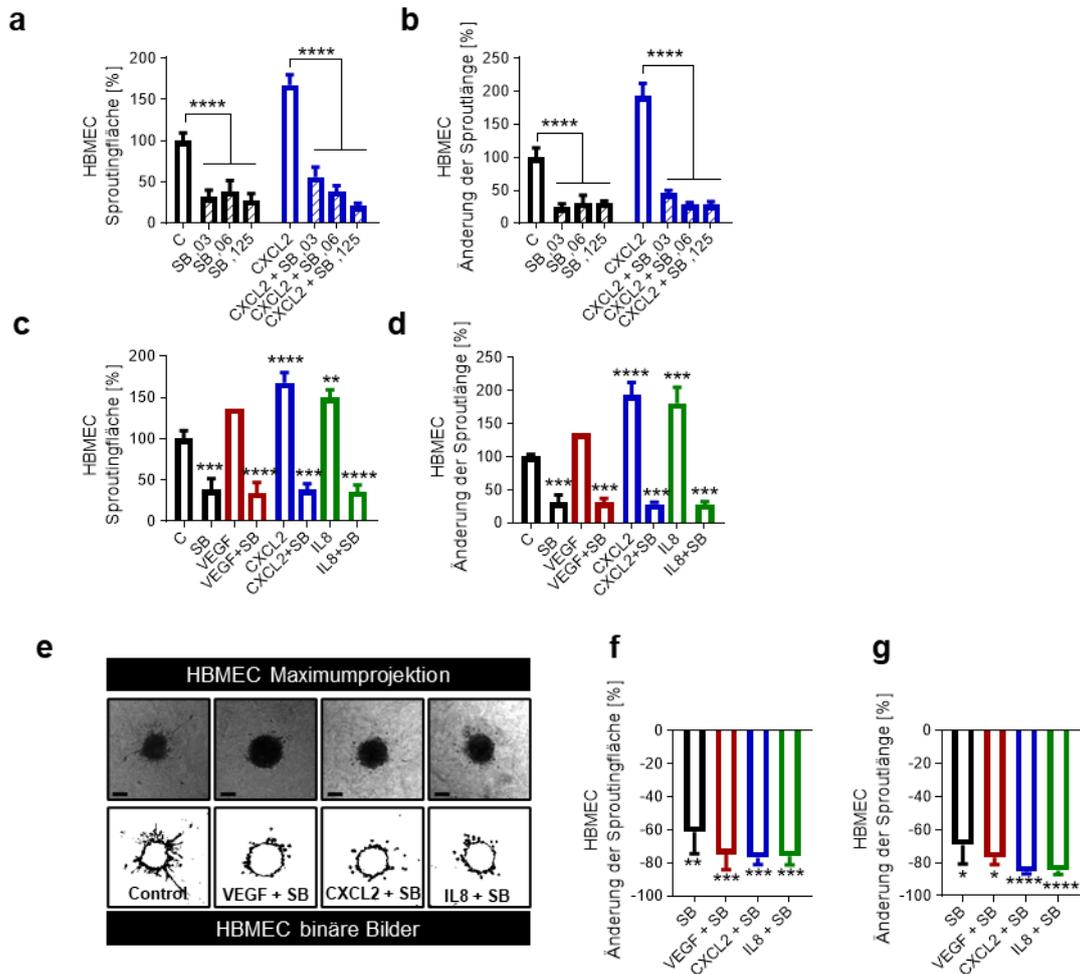


Abbildung 28: 3D-Angiogenese unter Behandlung mit dem CXCR2-Antagonisten. Um die Wirkungsweise des CXCR2-Antagonisten SB225002 analysieren zu können wurden HBMEC Sphäroide zunächst mit dem Antagonisten SB225002 (SB) allein in verschiedenen Konzentrationen (0,03µM; 0,06µM; 0,125µM) sowie unter Stimulation von CXCL2 (25ng/ml) behandelt. EBM mit 0,1% FCS diente als Kontrolle und ist mit „C“ gekennzeichnet. Dargestellt sind die prozentuale Sproutingfläche (a) und die Änderung der Sproutlänge (b). $n = 3-4$ Sphäroide/Kondition, Daten aus zwei unterschiedlichen Experimenten. Da SB in einer Konzentration von 0,06µM die beste Wirksamkeit zeigte, folgte anschließend eine Behandlung mit VEGF (50ng/ml), CXCL2 (25ng/ml) und IL8 (50ng/ml) sowie SB (0,06µM) allein und in Kombination der proangiogenen Moleküle mit dem Antagonisten. Interessanterweise hatte SB in allen Kombinationen einen antiangiogenen Effekt, auch in Kombination mit VEGF. (c) und (d) zeigen die Änderung der Sproutingfläche und der mittleren Sproutlänge von HBMEC-Sphäroiden nach 24h Stimulation mit VEGF, CXCL2 und IL8 sowie dieser in Kombination mit SB und SB allein. (e) zeigt repräsentative Bilder der HBMEC-Sphäroide in der Maximumprojektion und darunter binäre Bilder der Sprouts für die Kontrollgruppe und unter Stimulation mit VEGF + SB (50ng/ml/0,06µM), CXCL2 + SB (25ng/ml/0,06µM) und IL8 + SB (50ng/ml/0,06µM), Maßstab 100µm. (f) und (g) zeigen die prozentuale Abnahme der Sproutingfläche und mittlere Sproutlänge von HBMEC-Sphäroiden nach 24h Stimulation mit SB, VEGF + SB, CXCL2 + SB und IL8 + SB im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe (für VEGF + SB vs. VEGF usw.). $n = 1-4$ Sphäroide/Kondition, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; one-way ANOVA, Bonferroni Korrektur

Die filigranen Sprouts, die unter mono-Stimulation mit VEGF, CXCL2 und IL8 entstanden, waren in Kombination mit SB zudem nicht mehr sichtbar. Stattdessen zeigten sich oft auch einzelne losgelöste einzelne Zellen (**Abbildung 28e**), die so ohne SB nicht auftraten. Die Stärke des Effekts von SB auf die Sproutingfläche der HBMEC-Zellen in Kombination mit den anderen Molekülen ist in **Abbildung 28c** und **f** abgebildet. Die prozentuale Abnahme der Angiogenese in der Kontrollgruppe (SB vs. 0.1% FCS) lag bei -61%. Für VEGF lag sie im Durchschnitt bei -74%, für CXCL2 bei -77% und für IL8 bei -76%. Hier gab es kaum Unterschiede zwischen den Gruppen. Die prozentuale Reduktion der Sproutlänge (**Abbildung 28d** und **g**) lag für VEGF bei -76%, für CXCL2 und IL8 bei -85% und für die Kontrolle (SB vs. 0.1% FCS) bei -69% im Durchschnitt. Interessanterweise war die Sproutingfläche und Sproutlänge bei der Kombinationsbehandlung mit VEGF ähnlich stark reduziert wie bei einer kombinierten Behandlung mit CXCL2 oder IL8. Dies bestätigt nochmals die Theorie, dass der Wirkmechanismus von SB225002 über einen reinen CXCR2- Antagonismus hinaus gehen muss.

7. Diskussion

7.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse dieser Arbeit

In der retrospektiv untersuchten Patientenkohorte erlitten diejenigen Patienten und Patientinnen erwartungsgemäß später ein Rezidiv, die die Standardtherapie nach Stupp-Schema erhielten. Die Rezidivtumore waren im Vergleich zu den Primärtumoren von signifikant weniger TAMs infiltriert. Zudem hatten Patienten mit einer sehr hohen TAM-Infiltration ein signifikant verkürztes PFS und eine hohe TAM-Infiltration zeigte sich als positiver Prädiktor für ein kürzeres OS von Glioblastompatienten und -patientinnen. Entgegen der Erwartung gab es keine Unterschiede innerhalb der Patientengruppen bezüglich der VEGF-, CXCL2- und IL8-Expression und auch das PFS und OS der Patienten war durch eine Überexpression der Moleküle nicht beeinflusst. CXCL2 war jedoch in den Rezidivtumoren der Nicht-Standard-Gruppe signifikant reduziert und es fanden sich auch weniger CXCL2 exprimierende TAMs in den Rezidivtumoren dieser Gruppe. Auch wenn diese retrospektive Analyse der Tumorproben keine ausschlaggebende Rolle des CXCR2 Signalwegs in der Resistenzentwicklung im Glioblastom feststellen konnte, ist bekannt, dass dieser bei einer Überexpression mit einem Überlebensdefizit assoziiert ist und die Angiogenese im GBM fördert (70, 83, 86). So zeigten CXCL2 und IL8 eine mit VEGF vergleichbare proangiogene Kapazität an humanen Hirnendothelzellen im neu etablierten 3D Sphäroid-basierten Angiogeneseassay und der CXCR2 Antagonist SB225002 hemmte die Angiogenese und Chemokinese *in vitro*. Die Anwendung von SB225002 allein und in Kombination mit Temozolomid führte zu einer veränderten Genexpression von pro- und antiapoptotischen Genen sowie von Genen des VEGFR und CXCR2 Signalwegs. Im Folgenden sollen die Stärken und Schwächen dieser Arbeit beleuchtet und die Ergebnisse vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur eingeordnet werden.

7.2. Vergleich der Patientenmerkmale mit der Literatur – kritische

Betrachtung der untersuchten Kohorte

In dieser Arbeit wurde die Relevanz des CXCR2 Signalwegs in der Angiogenese und Resistenzentwicklung im Glioblastom untersucht. Dafür wurden zunächst klinische Routineparameter und anschließend Immunfluoreszenzfärbungen an insgesamt 76 Tumorproben einer retrospektiven Patientenkohorte analysiert. Eine der wichtigsten Fragen, die man sich als Forscher stellen sollte, ist, ob das angewandte Modell, in diesem Fall die Patientenkohorte, ein repräsentatives Bild der zu untersuchenden Situation, hier der am Glioblastom erkrankten Menschen, abbildet. Diese Frage lässt sich zumindest teilweise durch einen Vergleich der Gruppenmerkmale wie Geschlecht, Alter, MGMT- und IDH-Status, progressionsfreies Überleben, Gesamtüberleben mit anderen Studien klären.

Allgemein erkranken mehr Männer als Frauen am Glioblastom sowie auch durch die Patientenkohorte hier dargestellt, allerdings liegt das Verhältnis laut WHO und dem Deutschen Krebsregister eher bei 1,1-1,5:1 (♂:♀)(1, 5, 134). In dieser Arbeit war das Verhältnis mit 2:1 leicht verschoben. Das durchschnittliche Erkrankungsalter von Patienten und Patientinnen mit IDH-Wildtyp Glioblastom liegt laut mehreren Studien zwischen 56 und 63 Jahren (1, 4, 27, 134), somit scheint die hier untersuchte Kohorte mit einem mittleren Erkrankungsalter von 58,7 Jahren repräsentativ zu sein.

Zu der molekularen Routinediagnostik gehören die MGMT-Promotor-Methylierung die IDH1/2 Mutation, und weitere Mutationen von Genen wie z.B. ATRX (Alpha-Thalassämie-X-linked), TP53 (Tumorsuppressor Protein p53) und dem TERT-Promotor (Telomerase Reverse Transkriptase) die im Folgenden diskutiert werden sollen (1, 144).

Der Status der MGMT-Methylierung ist von besonderer Bedeutung, da eine Hypermethylierung mit einem besseren Ansprechen auf Temozolomid und dadurch einem verlängerten Gesamtüberleben einhergeht (11, 133). Zahlreiche Studien zeigten, dass Patienten und Patientinnen mit einer MGMT-Hypermethylierung gegenüber Patienten und Patientinnen ohne MGMT-Hypermethylierung sowohl ein signifikant verlängertes PFS und OS haben (11, 133, 134). Per Definition wird von einer MGMT-Hypermethylierung ab einem Wert von 10% gesprochen. Radke et al. zeigten 2019, dass dieser strenge Cutoff-Wert obsolet zu sein scheint. In der Studie, die 111 Patienten und Patientinnen mit IDHwt GBM nach GTR und Standardtherapie nach Stupp-Schema einschloss, hatten Patienten und Patientinnen mit einem Methylierungsgrad von >20% ein deutlich verlängertes OS als solche mit <10% oder 10-20% (134). Auch in der in dieser Arbeit untersuchten Patientenkohorte hatte eine starke MGMT-Promotormethylierung einen positiven Einfluss auf das PFS und das OS, was mit den Daten in der Literatur einhergeht bzw. diese unterstützt.

Des Weiteren wurden die Daten hinsichtlich der IDH-Expression analysiert. Seit etwas über 10 Jahren werden Tumorproben auf eine Mutation des Enzyms untersucht (9). Mutationen im IDH-1, seltener der IDH-2 treten in 5-10% der Glioblastompatienten und -patientinnen auf (1, 144, 145). Diese Patienten und Patientinnen haben im Vergleich zu Patienten und Patientinnen mit IDHwt eine bessere Prognose (10, 145). Eine retrospektive Studie, die mehr als 300 Patienten und Patientinnen einschloss, konnte zeigen, dass eine IDH1/2-Mutation bei knapp einem Drittel der Patienten und Patientinnen nachgewiesen werden konnte, die länger als 36 Monate überlebten wohingegen nur 4 % der Patienten und Patientinnen, die weniger als 36 Monate überlebten eine solche Mutation aufwiesen. Allerdings macht der Anteil der Patienten mit mutierter IDH, also die Anzahl an sogenannten sekundären Glioblastomen (siehe 4.1) nur ca. 10% aller Glioblastompatienten aus (1). In dieser Studie wies nur ein Patient eine IDH-Mutation auf, sodass keine statistische Auswertung erfolgte. Da in dieser Arbeit die Entwicklung eines Rezidivtumors eine Voraussetzung war und Patienten mit einer IDH-

Mutation generell eine bessere Prognose haben, ist es durchaus möglich, dass aufgrund dieser nur ein Patient mit IDH-Mutation in die Studie eingeschlossen werden konnte.

Weitere molekulare Diagnosekriterien wie ATRX, TP53 und TERT, die spätestens seit der WHO-Klassifikation von 2016 zum Standard der neuropathologischen Untersuchungen gehören (1), wurden in dieser Studie nicht ausgewertet, da Patienten und Patientinnen mit Primärtumoren aus den Jahren 2012-2016 eingeschlossen wurden und die diagnostischen Daten nur für einen kleinen Anteil der Gruppe vorlagen. Die Kriterien helfen hauptsächlich dabei die Tumoren neuropathologisch sicher als Glioblastom einordnen zu können. Außer dem TERT-Promotor, dessen Mutation mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist, haben diese Moleküle keine übergeordnete prognostische Relevanz für Glioblastompatienten und -patientinnen (1, 144). Somit sollte das Fehlen dieser diagnostischen Parameter keinen negativen Einfluss auf diese Studie haben.

Die Log-Rank-Test-Analysen des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens konnten zeigen, dass Patienten und Patientinnen der Standardtherapie Gruppe wie erwartet länger überlebten als die Patienten und Patientinnen, die nicht die Standardtherapie erhielten. In der Standardtherapiegruppe lag das PFS bei 13,71 Monaten und das OS bei 28,2 Monaten und somit deutlich über dem in der Literatur angegebenen OS von 15 Monaten für IDHwt Tumore (1, 4). Aber auch das Gesamtüberleben der Nicht-Standardtherapiegruppe war mit 14,6 Monaten gegenüber 9,9 Monaten bedeutend höher als in anderen Studienpopulationen, die nicht die Standardtherapie erhielten (1). Diese deutlich bessere Prognose im Vergleich zur Literatur könnte daran liegen, dass zum einen nicht alle Patienten und Patientinnen ein Rezidiv entwickeln und zum anderen nur 20-30% der Glioblastompatienten und -patientinnen überhaupt eine Rezidivoperation erhalten, was ein Einschlusskriterien dieser Studie war (146). Eine günstige Prognose hängt bei Re-OP maßgeblich vom guten Allgemeinzustand, Alter, einem längeren Intervall zwischen 1. und 2. OP sowie dem Ausmaß der 2. OP ab (147-149), sodass diese Faktoren die Kriterien für eine Re-OP ausmachten. Somit ließe sich das deutlich bessere OS in der hier untersuchten Patientenkohorte auch durch einen generell besseren klinischen Zustand der Patienten und Patientinnen zum Zeitpunkt des Rezidivs erklären. Diese Selektion könnte das verlängerte PFS und OS im Vergleich zu anderen Studien erklären (1, 4).

Das Glioblastom ist für seine Heterogenität bekannt, welche ein Grund für die schnelle Rezidiventwicklung ist (150-153). Diese Heterogenität und große interindividuelle Variabilität innerhalb desselben Tumors zeigten sich auch in dieser Arbeit. So muss bei der Entwicklung neuer Therapieansätze stets beachtet werden, dass die konkrete Strategie vielleicht nicht für alle Patienten und Patientinnen relevant ist.

Was diese Studie besonders positiv auszeichnet ist, dass hier erstmals in einem größeren Rahmen ($n_{\text{matched}} = 38$) gematchte Primär- und Rezidivtumoren analysiert wurden. Studien

dieser Art existieren bis dato nur mit geringeren Fallzahlen von $n_{\text{matched}} = 14-17$ Patienten und Patientinnen (70, 154). Dies erlaubt den enorm wichtigen direkten Vergleich von primären und rezidierten Glioblastomen. Insgesamt muss diese Fallzahl trotzdem kritisch betrachtet werden, da 38 Patienten und Patientinnen bei einem so heterogenen Tumor natürlich nicht unbedingt repräsentativ für ein Kollektiv von tausenden Patienten und Patientinnen sein kann. Wenn man aber bedenkt, dass die Charité eines der größten neuroonkologischen Zentren Europas hat und alle Patienten und Patientinnen mit ausreichend Primär- und Rezidivtumormaterial aus den Jahre 2012 – 2017 eingeschlossen wurden, ist dies als eine beachtliche Anzahl anzusehen.

Um möglichst viele Patienten und Patientinnen einschließen zu können, wurden in dieser Studie FFPE-Tumorproben verwendet, die zuvor auch von den Neuropathologen der Charité zu diagnostischen Zwecken verwendet wurden. Dies hatte den entscheidenden Vorteil, dass von Beginn an bewusst nur Patienten und Patientinnen eingeschlossen wurden, die zwei Mal aufgrund des Glioblastoms operiert wurden. Von den initial 65 (130 Tumoren) Patienten und Patientinnen, die identifiziert wurden, konnten aufgrund von fehlendem Patientenmaterial nur 38 (76 Tumore) eingeschlossen werden. Der Vorteil Gewebe in FFPE zu fixieren ist, dass es dadurch für Jahrzehnte haltbar gemacht wird (155). Zudem ist es ein standardisierter Prozess, der weltweit durchgeführt wird und zu einer Vergleichbarkeit von nachfolgenden immunhistochemischen Analysen führt (155). Ein Nachteil der Formalin-Fixierung ist, dass es zu einer Veränderung der DNA und einem „Cross-Linking“ zwischen Proteinen und Nukleinsäuren kommt (156). Davon ist vor allem die RNA durch Degradation und chemische Modifikationen betroffen (157). Auch wenn es inzwischen Methoden gibt, trotzdem RNA und DNA zu isolieren, werden FFPE-konservierte Gewebeproben häufig nicht für molekulare Analysen genutzt (155, 158). Eine weitere Limitation stellt auch die manuelle Auswertung dar, die trotz Verblindung und zufälliger Anordnung keine objektive Methode darstellt. Nichtsdestotrotz sind die in dieser Arbeit durchgeführten H.E.- und Immunfluoreszenzfärbungen als Bereicherung anzusehen, da sie zur Erweiterung des wissenschaftlichen Kenntnisstands beitragen. Weiterführende molekulargenetische Untersuchungen wären in der Zukunft allerdings wünschenswert, um den Ergebnissen dieser Arbeit mehr Gewicht zu verleihen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier untersuchte Patientenkohorte aufgrund der klinischen und diagnostischen Parameter als repräsentativ angesehen werden kann für all jene Glioblastompatienten und -patientinnen, die zwei Mal aufgrund des GBM operiert werden müssen. Die Verwendung von gematchten Tumorproben zeichnet diese Studie aus, wohingegen die Fallzahl von 38 Patienten und ausschließliche Verwendung von FFPE-Material als Limitationen genannt werden müssen.

7.3. Die Relevanz der Mikroglia/Makrophagen-Infiltration im Primär- und Rezidivtumor

Im Glioblastom werden Mikroglia und infiltrierenden Makrophagen kontroverse Rollen zugeschrieben. Dass diese Zellen hochrelevant für den Tumor sind, liegt nahe, da sie knapp die Hälfte seiner zellulären Anteile ausmachen (39, 48). In den letzten Jahren konnten TAMs sowohl protumorale (50-52) als auch antitumorale (49) Eigenschaften nachgewiesen werden. Die lang angenommene strikte Einteilung in M1 (antitumoral) - und M2-Phänotypen (protumoral) ist auf dem Hintergrund neuerer Daten nicht mehr haltbar (62, 159). Zunehmend zeigt sich auch in der Population der TAMs die Heterogenität des Glioblastoms (62-65). Warum sind diese Zellen nun aber so wichtig? TAMs fördern wie eingangs in Kapitel 4.3 beschrieben das Tumorstadium und die Angiogenese durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie VEGF (28, 39, 65) und Chemokinen wie CXCL2 und IL8 (28, 67, 160). Zudem konnte in präklinischen und klinischen Studien anderer solider Tumoren gezeigt werden, dass eine hohe Infiltration von TAMs mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (161-163). In Gliomen korreliert die Anzahl an infiltrierenden TAMs positiv mit dem Tumorstadium (53) und negativ mit dem progressionsfreien Überleben (54). In dieser Studie konnten wir zeigen, dass die Anzahl der infiltrierenden TAMs im Rezidivtumor unabhängig von der Gruppe signifikant reduziert ist. Dies bestätigt Daten einer kleineren Studie, die dies bei 3 Patienten und Patientinnen mit rezidiviertem Glioblastom bereits beobachtet hatte (164). Während eine hohe Infiltration von TAMs nicht mit dem PFS korrelierte, sprechen mehrere Analysen dafür, dass eine hohe Anzahl von TAMs im Primärtumor mit einem kürzeren Gesamtüberleben korreliert. Die Pearson-Korrelationsanalyse zeigte dahingehend eine Tendenz (Alle: $p = 0,07$) und die Cox-Regressionsanalyse bestätigte schließlich diesen Verdacht (univariat: $p = 0,02$; multipel $p = 0,02$) und zeigte, dass die TAM Infiltration einen positiven Prädiktor für ein kürzeres Gesamtüberleben darstellt. Diese Daten unterstützen die These, dass TAMs hauptsächlich protumorale Eigenschaften aufweisen. Interessanterweise zeigte eine Subgruppenanalyse der Überlebensdaten im Log-Rank-Test, dass insbesondere Patienten und Patientinnen mit einem sehr hohen Anteil an TAMs (>1000 Zellen/ mm^2 , $n = 5$) gegenüber Patienten und Patientinnen mit einer hohen Infiltration ($520-1000$ Zellen/ mm^2 , $n = 6$) beim PFS ($p < 0,01$) und auch tendenziell beim OS einen Überlebensnachteil hatten. Somit tragen Mikroglia/Makrophagen zur Tumorstadium bei und ihre Modulation bietet ein hochrelevantes therapeutisches Target. Aber wie entfalten sie ihre protumorale Wirkung? Neben der in Kapitel 4.3 beschriebenen Sekretion von Wachstumsfaktoren und zahlreichen Chemokinen (28, 39, 65-67, 160) beeinflussen sie die Tumormikroumgebung (56) und spielen so auch eine wichtige Rolle in der Tumorstadium (68). So ist das Versagen antiangiogener Therapien auch mit einer stärkeren Infiltration von TAMs assoziiert (106, 161). Auf die Vaskularisierung und die Expression proangiogener Moleküle soll deshalb nachfolgend eingegangen werden.

7.4. Die Vaskularisierung vor und nach TMZ-Therapie

Die Angiogenese gehört zu den „Hallmarks of Cancer“ (100) und ist ein wichtiger therapeutischer Angriffspunkt der GBM Therapie (100, 165, 166). Die Blutversorgung des Tumors ist notwendig, um ihn zum einen mit Nährstoffen zu versorgen und zum anderen, um ihn für Therapeutika zugänglich zu machen. Die Gefäßarchitektur im Glioblastom ist eine besondere, da die Gefäße oft desorganisiert, unreif und dysfunktional sind (167, 168). Eine besondere Rolle spielt hier auch die vaskuläre Mimikry (168). Darunter versteht man, dass Gefäße entstehen, die nicht von Endothelzellen gebildet werden, sondern von Gliomastammzellen, die dann an der Expression von spezifischen Stammzell- und Endothelzellmarkern erkennbar sind (169). Baisiwala et al. zeigten, dass Temozolomid *in vitro* und in einem Glioma-Xenograft-Mausmodell *in vivo* zu einer Induktion der vaskulären Mimikry führte (169). In unserer Studie zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Gefäßanzahl, Gefäßfläche und Gefäßgröße zwischen der Standard- und Nicht-Standard-Gruppe. Auch auf das OS oder PFS hatte die Vaskularisierung keinen Einfluss. Mit Ausnahme der Gefäßanzahl, die in den Rezidivtumoren der Standard-Gruppe reduziert war ($p < 0,05$), gab es auch keine Unterschiede zwischen den Primär- und Rezidivtumoren. Die Reduktion der Gefäßanzahl bei gleichbleibender Fläche könnte in der Standard-Gruppe eine Folge der vaskulären Mimikry und der daraus resultierenden Gefäßnormalisierung sein, denn es ist auch bekannt, dass TMZ zumindest im Xenograft-Modell *in vivo* zu einer Reduktion der Tumorgefäße führt (170, 171). Zudem haben wir die Gefäße auch hinsichtlich der CXCR2-Expression untersucht. Dies war kein einfaches Unterfangen, da sich die Ko-Färbung von Gefäßen (CD31) und CXCR2 als sehr kompliziert herausstellte, sodass letztendlich auch nur ein Teil der Patienten und Patientinnen untersucht werden konnte ($n = 28$; Standard: $n = 13$; Nicht-Standard: $n = 15$). Allerdings zeigten sich auch hinsichtlich der CXCR2⁺-Gefäßen und ihrer Anzahl keine Unterschiede innerhalb der Gruppen bzw. in Primär- und Rezidivtumoren. Angara et al. wiesen kürzlich nach, dass insbesondere CXCR2⁺-Gliomastammzellen im Falle einer erfolgten antiangiogenen Therapie für die vaskuläre Mimikry *in vivo* verantwortlich sind (83). Ein CXCR2 knockdown in diesen Tumorzellen bewirkte neben einem reduzierten Tumorwachstum auch inkomplette Gefäßstrukturen, die ihren mutmaßlichen Ursprung in der vaskulären Mimikry hatten (83). CXCR2 ist in der alternativen Angiogenese im Glioblastom demnach ein wichtiges therapeutisches Ziel. In dieser Kohorte hatte eine Behandlung mit Temozolomid allerdings keinen Einfluss auf die Expression von CXCR2 in Endothelzellen der untersuchten Tumorproben. Gründe dafür könnten auch hier die kleine Kohorte sein, denn nur 18 der 38 Patienten und Patientinnen erhielten eine zyklische TMZ-Therapie nach dem Stupp-Schema. Ein weiterer Einflussfaktor könnte auch die Kontrollgruppe sein, denn diese bestand nicht ausschließlich aus TMZ-naiven Patienten und Patientinnen, denn das Einschlusskriterium war ≤ 3 Zyklen TMZ. Da die kombinierte Radiochemotherapie der alleinigen Radiotherapie in den

meisten Altersgruppen jedoch überlegen ist (22), wäre es unethisch Patienten für eine Studie zu rekrutieren ohne ihnen, bei der ohnehin schon fatalen Diagnose, eine Temozolomidtherapie anzubieten. Des Weiteren sind die Voraussetzung der Entwicklung eines Rezidivs und das Matching der Tumorproben auch als limitierender Faktor anzusehen, da dadurch nur ein Bruchteil der an der Klinik behandelten Patienten und Patientinnen in die Studie eingeschlossen werden konnte. Deshalb sind diese Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten. Zwar können die Daten für diese Subgruppe an Glioblastompatienten und -patientinnen als repräsentativ angesehen werden, nichtsdestotrotz ist es möglich, dass die Ergebnisse dieser Studie nicht auf alle am Glioblastom erkrankten Menschen anwendbar sind. Neben Endothelzellen, die durch die Ko-Markierung mit CD31 zu identifizieren waren, wurden allerdings auch andere Zellen von dem CXCR2 Antikörper angefärbt. Welche Relevanz diese Zellen im Glioblastom haben, lässt sich mit dieser Arbeit nicht klären, sodass weitere Untersuchungen notwendig sind, um die Relevanz von CXCR2⁺ Tumorzellen zu klären.

7.5. Die Relevanz des CXCL2/CXCR2 Signalwegs und der Einfluss auf das Überleben der Patienten und Patientinnen

Es gibt viele Hinweise zur Relevanz von CXCL2 und IL8 in Hinsicht auf die Tumorprogression und Angiogenese im Glioblastom (70, 73, 83, 85, 86, 172). Hasan et al. wiesen 2019 nach, dass die Überexpression von IL8 im Rezidivtumor von GBM Patienten und Patientinnen mit einem reduzierten progressionsfreien Überleben und einem verkürzten Gesamtüberleben einhergeht (70). Zudem wurde anhand einer kleinen GBM Patientenkohorte mit gleichzeitiger Überexpression von IL8 und CXCR2 ein signifikant reduziertes progressionsfreies Überleben (n = 4) und Gesamtüberleben (n = 10) gezeigt (83). Die Analyse dieser Patientenkohorte hinsichtlich der Expression alternativer proangiogener Moleküle im Vergleich zu VEGF zeigte, dass CXCL2 von allen Patienten und Patientinnen exprimiert wurde und, dass der Anteil der IL8 exprimierenden Patienten und Patientinnen im Rezidivtumor zunahm (vgl. 6.1.4). Bruyère et al. demonstrierten 2012, dass eine Langzeitbehandlung mit TMZ zu einer Überexpression von CXCL2 und IL8 *in vitro* führt. Diese konnten anhand dieser Kohorte zwar nicht nachgewiesen werden, allerdings weisen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe darauf hin, dass CXCL2 und IL8 bei ca. 1/3 der Patienten und Patientinnen bereits im Primärtumor überexprimiert sind (86). Unsere Analyse von über 500 Patienten und Patientinnen aus der TCGA-Datenbank (The Cancer Genome Atlas) zeigte, dass eine Überexpression von CXCL2 und IL8, aber auch VEGF mit einem reduzierten OS assoziiert sind (86). Eine hohe Expression der Rezeptoren hingegen zeigte keinen Überlebensnachteil (86). Die Analyse der 38 Patienten und Patientinnen dieser Studie, konnte der Überexpression der drei Moleküle im Log-Rank-Test keinen Einfluss auf das PFS und OS nachweisen, was an der geringen Fallzahl liegen könnte. Bei der in dieser Arbeit untersuchten Patientenkohorte wurde die Proteinexpression

von CXCL2, IL8 und VEGF analysiert, wohingegen in unserer Vorarbeit mittels der TCGA-Datenbank die Genexpression der proangiogenen Moleküle untersucht wurde (86). Dass sich Protein- und Genexpression durchaus unterscheiden können, wurde in dieser Arbeit im Kapitel „Stimulation mit proangiogenen Proteinen“ *in vitro* nachgewiesen.

Allerdings können auch anhand der hier untersuchten Patientenproben neue Aussagen getroffen werden. Erstens konnte in der Cox-Regressionsanalyse nachgewiesen werden, dass eine vorhandene IL8-Expression im Rezidivtumor als negativer Prädiktor für einen früheren Tod gilt (univariat; $p = 0,03$). Somit leben Patienten, die IL8 im Rezidiv exprimieren möglicherweise länger als solche, die es nicht exprimieren. Dies ist allerdings mit Vorsicht zu betrachten, da die multiple Analyse die IL8-Expression nicht als unabhängigen prädiktiven Faktor identifizieren konnte (vgl. **Tabelle 22**) und, da die Höhe der IL8-Expression in dieser Studie nicht betrachtet wurde. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, dass bekannterweise die Patienten und Patientinnen mit einer IL8 und CXCL2 Überexpression auf Genexpressionsebene eine kürzere Lebenserwartung haben als diejenigen ohne Überexpression (70, 73, 86). Dies konnten wir kürzlich unter Verwendung eines großen Patientenkollektivs mit mehr als 500 GBM Proben aus der TCGA Datenbank aufzeigen (86). Außerdem zeigte sich in der hier untersuchten Kohorte eine Tendenz dazu, dass die CXCR2⁺Gefäßfläche im Primärtumor möglicherweise einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben hat (univariat; $p = 0,12$). Die multiple Analyse ergab, dass die CXCR2⁺Gefäßfläche das OS unabhängig von der TAM-Infiltration ($p = 0,02$) und unabhängig von der Anzahl an erhaltenen TMZ-Zyklen ($p = 0,07$) beeinflusst (vgl. **Tabelle 20**). Das ist überraschend, denn Yang et al. zeigten, dass eine Hochregulation von CXCR2 auf Proteinebene in Gliomen mit einer schlechten Prognose verbunden ist (82). Anders als in dieser Studie untersuchten die Autoren dort jedoch den ganzen Tumor und nicht nur die Gefäße, was ein Grund für die gegensätzlichen Ergebnisse sein könnte (82). Außerdem muss auch die Größe der hier untersuchten Kohorte ($n = 23$) als Faktor für eine limitierte Aussagekraft des Ergebnisses angesehen werden. Nichtsdestotrotz handelt es sich um ein interessantes Ergebnis, was in zukünftigen Patientenkohorten weitergehend analysiert werden sollte.

Zweitens war die CXCL2-Expression bei der mit TMZ behandelten Gruppe im Rezidivtumor gleich, wohingegen sie in der Nicht-Standard-Gruppe im Rezidivtumor signifikant sank. Außerdem konnte auch gezeigt werden, dass in den Rezidivtumoren weniger TAMs CXCL2 sezernierten und dieses demnach vermehrt von anderen Zellen exprimiert wurde. Auch hier zeigte die Nicht-Standard-Gruppe eine signifikante Reduktion, was mit der dort reduzierten CXCL2 Expression einhergeht. Somit lässt sich die Rolle des CXCR2/CXCL2 Signalweges zwar nicht abschließend klären, dennoch unterstützen diese Daten, was bereits über den Signalweg bekannt ist und untermauern seine Relevanz im Glioblastom. Die Vorerkenntnisse

und Subgruppenanalyse der eigenen Vorarbeiten und die Arbeit Hasan et al. legen nahe, dass der Signalweg insbesondere für eine spezielle Subgruppe der GBM Patienten relevant ist (70, 86). Darüber hinaus konnten wir unter Verwendung der TCGA-Datenbank mit mehr als 500 eingeschlossenen GBM Tumorproben ermitteln, dass ca. 30% der Patientinnen und Patienten CXCL2 überexprimierten (86).

7.6. Kritische Betrachtung des gewählten *in vitro* Modells

Um auch *in vitro* ein möglichst realitätsnahes Modell zur Untersuchung der angiogenetischen, proliferativen, chemotaktischen Potenz und der Genexpression der alternativen prangiogenen Moleküle CXCL2 und IL8 zu haben, wurden primäre humane Endothelzellen verwendet. Primäre Zellen werden direkt aus Geweben isoliert und unterscheiden sich maßgeblich von immortalisierten Zelllinien und weisen dadurch verschiedene Vorteile auf. Zum einen haben sie weiterhin die *in vivo* Zellmorphologie, zum anderen behalten sie viele der *in vivo* beobachteten Zellmarker und Funktionen bei (173, 174). Ein weiterer Vorteil des gewählten *in vitro* Modells dieser Arbeit ist, dass humane Zellen gegenüber primären tierische Zellen, die eine weitere Option zur Untersuchung dargestellt hätten, durch die unterschiedliche Expression von Arzneimitteltransportern und anderen Rezeptoren zur Evaluation des Signalwegs im Menschen überlegen sind (175). Ein Nachteil von primären Zellen allgemein ist jedoch, dass sie eine begrenzte Lebensdauer und Expansionskapazität aufweisen und schwieriger zu kultivieren sind. In dieser Arbeit wurden Humane Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC) und humane Gehirnendothelzellen (HBMEC) verwendet. So wurden die beiden Endothelzelltypen bewusst und sorgfältig ausgewählt, denn HUVEC sind einfach und kostengünstig zu gewinnen und ein weit verbreitetes, gut erforschtes und zuverlässiges Modell (79, 80). Ein Nachteil ist aber, dass sie nicht aus dem ZNS stammen und somit zur Analyse von ZNS-spezifischen Pathologien und -relevanten Prozessen nur bedingt geeignet sind. HBMEC hingegen haben den Vorteil aus dem Gehirn zu stammen, sind allerdings schwer zu gewinnen und zu kultivieren bzw. zu expandieren und nur für wenige Passagen verwendbar (176), was als klarer Nachteil angesehen werden muss. Die Blutgefäße des Gehirns unterscheiden sich von anderen Gefäßen des menschlichen Körpers u.a. durch ihre außergewöhnliche Funktion: die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Bluthirnschranke (111). Inwieweit primäre Hirnendothelzellen diese Funktion *in vitro* beibehalten, ist umstritten. So gibt es Daten, die darauf hinweisen, dass Hirnendothelzellen gemeinsam mit Perizyten (177) bzw. Astrozyten oder deren Überstand kultiviert werden müssen (178, 179), um die *in vivo* Charakteristika beizubehalten. Eine andere Studie, die vier immortalisierte Hirnendothelzelllinien untersuchte und miteinander verglich, darunter auch immortalisierte HBMEC, zeigte, dass eben diese in einer Monokultur *in vitro* die besonderen Eigenschaften am besten beibehalten (113).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das gewählte *in vitro* Modell der Situation im Menschen und vor allem auch im ZNS von den derzeit verfügbaren Modellen sehr nahekommt. Insbesondere die Kombination gut erforschter peripherer Zellen im Vergleich zu den weniger erforschten, aber spezifischen Hirndothelzellen zeichnet diese Arbeit aus. Für die Experimente wurden 2 Vials HBMEC gekauft und für die Etablierung der Assays sowie die Versuche verwendet. Noch während der Arbeit nahm der Hersteller die Zellen vom europäischen Markt, weshalb nicht alle Experimente mit beiden Zelltypen durchgeführt werden konnten.

7.7. Der Effekt der alternativen proangiogenen Moleküle auf die Proliferation, Chemotaxis, Angiogenese und Genexpression von humanen Endothelzellen

Im Gegensatz zu IL8 ist über die Wirkung von CXCL2 auf Endothelzellen noch wenig bekannt. Im Verlauf der letzten 30 Jahre wurde gezeigt, dass IL8 die Chemotaxis (80, 81), die Proliferation, das Zellüberleben und die Angiogenese (79, 80) verschiedener Endothelzellen fördert. Es ist bekannt, dass die Reaktion von Endothelzellen aus unterschiedlichen Körperregionen auf angiogene Stimuli sich unterscheidet (142, 143), weshalb es wichtig war neben dem gut etablierten Standard, HUVEC, auch Hirndothelzellen zu untersuchen. Ein entscheidender Faktor der angiogenetischen Kapazität ist die Expression von CXCR1 und CXCR2 (74) bei der es massive Unterschiede zwischen den verschiedenen Endothelzelltypen wie z.B. HUVEC, mikrovaskuläre Endothelzellen und Hirndothelzellen gibt (74, 78, 79, 108). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass neben VEGF auch CXCL2 und IL8 einen signifikanten Effekt auf die Proliferation und Migration von HUVEC haben (86). Zum Erlernen der Methodik wurden diese Versuche wiederholt und konnten den Effekt von VEGF und CXCL2 bestätigen (6.2.1, 6.2.3). Für IL8 konnte kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Vergleichend dazu sollten beide Assays auch für HBMEC etabliert werden. In den Etablierungsversuchen zeigte CXCL2 eine vergleichbare Wirkung wie VEGF in HBMEC, die aber kein Signifikanzniveau im Vergleich zur Kontrolle erzielte (6.2.1). Nach mehreren Testversuchen stellte sich heraus, dass aufgrund der reduzierten Expansionsfähigkeit der Zellen diese Assays mit enorm hohen Zellzahlen nicht durchführbar war. Eine T25-Zellkulturflasche HBMEC ergab zwischen 500.000 und 750.000 Zellen wohingegen für das Proliferations- und Migrationsassay ca. 1,5 Mio. respektive 750.000 Zellen pro Versuchsdurchlauf benötigt wurden.

Folglich wurde nach alternativen Möglichkeiten gesucht. Um den Einfluss der simulierten Überexpression auf HUVEC und HBMEC zu untersuchen, wurden diese mit VEGF, CXCL2 und IL8 in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Anschließend erfolgten die RNA-Isolation und eine Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR. Die Genexpression von VEGFR1/VEGFR2 und CXCR1/CXCR2 in HUVEC und HBMEC änderte sich nach 24h

Stimulation mit den proangiogenen Molekülen *in vitro* nicht (6.2.2.1). Die Vermutung, dass dies ein zeitabhängiger Effekt sei, bestätigte sich nach Analyse zusätzlicher Zeitpunkte (4h und 18h) nicht. Während einige Studien gezeigt haben, dass unter physiologischen Bedingungen nach Behandlung mit VEGF der Proteinspiegel von VEGFR1 sinkt und der mRNA-Spiegel steigt (180) konnte das in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Ähnlich wie in dieser Arbeit haben andere Studien jedoch gezeigt, dass VEGF die Expression seiner Rezeptoren nicht erhöht (181, 182). Statt VEGFR2 zeigten Saito et al., dass die Expression des löslichen (soluble) VEGFR1, der antiangiogene Funktionen besitzt und eine Splicevariante von VEGFR1 ist, hochreguliert wird (182). Die Überexpression vom löslichen VEGFR1 erfolgte durch die Hochregulation des von VEGF vermittelten VEGFR2-MEK-PKC-Signalwegs in Endothelzellen (182). Somit könnte die durch VEGF, CXCL2 und IL8 initiierte Reaktion von HUVEC und HBMEC *in vitro* trotz der nicht veränderten Genexpression durch alternatives Spleißen, post-transkriptionelle Veränderungen oder eine erhöhte nachgeschaltete Signalübertragung erklärt werden (86).

Um die Migration der Endothelzellen zu untersuchen, ergab die Literaturrecherche das Ibidi μ -Slide-Chemotaxis Assay als Alternative zum zuvor verwendeten Boyden-Kammer-Transwellmigrationsassay. Offensichtliche Vorteile dieses Assays sind, dass nur sehr geringe Zellzahlen verwendet werden müssen. So werden für einen Versuch mit 9 verschiedenen Konditionen nur ca. 180.000-200.000 Zellen benötigt, was bedeutete, dass nach der Ernte einer Zellkulturflasche zeitgleich das Chemotaxis-Assay und das 3D Angiogenese-Assay durchgeführt werden konnte. Ein weiterer Grund warum die Entscheidung auf das μ -Slide-Chemotaxis fiel, war da dieses mit HUVEC bereits etabliert war und es eine Arbeit gab, die dieses mit der Boyden-Kammer verglich (183-185). Zu den voraussehbaren Nachteilen gehörten die hohen Kosten sowie der aufwendige Versuchsaufbau. Zunächst wurde der Versuchsablauf an die Fragestellung angepasst. Für die Etablierung wurden HUVEC verwendet. Dabei zeigte sich, dass ein Konzentrationsgradient aufbaut, der jedoch nicht konstant über 18h gehalten werden konnte, was durch die Diffusion von Lebensmittelfarbe dargestellt werden konnte. Unter den genannten Aspekten, sollten die Ergebnisse des μ -Slide-Chemotaxis-Assays deshalb vorsichtig betrachtet werden. Nichtsdestotrotz steigerten VEGF und CXCL2 das Migrationsverhalten von HUVEC in verschiedenen Testversuchen. Zwar wurde die gerichtete Chemotaxis durch CXCL2 nicht gesteigert, so aber die Chemokinese. Dies geschah durch die Steigerung der Gradlinigkeit (Euklidische Distanz) und der akkumulierten Distanz der Zellen insbesondere innerhalb der ersten 6h des Beobachtungszeitraums. Die Ergebnisse gehen zumindest teilweise mit den beobachteten Effekten während des Transwellassays (6.2.3; **Abbildung 23**) einher. Dort hatte lediglich VEGF einen signifikanten Einfluss auf die Migration von HUVEC. Das steht jedoch im

Widerspruch mit anderen Studien die zeigten, dass IL8 (80, 81) und CXCL2 (86) die Migration von HUVEC steigern.

Durch die gelungene Etablierung des 3D-Sphäroid-basierten Angiogeneassays konnte erstmals gezeigt werden, dass HUVEC und HBMEC unterschiedlich auf die alternativen proangiogenen Moleküle CXCL2 und IL8 reagieren (6.2.5.2). CXCL2 und IL8 zeigten eine hohe Wirksamkeit in dem neu etablierten 3D-Angiogenesemodell durch eine starke Steigerung der angiogenetischen Aktivität von HBMEC. Die Wirkung der alternativen proangiogenen Moleküle war in HBMEC vergleichbar mit VEGF, während sie in HUVEC VEGF unterlegen waren (6.2.5.2). Diese Ergebnisse untermauern die Relevanz des CXCR2 Signalweges in der Angiogenese und zeigen erstmalig auch, dass CXCL2 mindestens genauso potent ist wie das gut erforschte IL8 (73, 74, 82, 83, 186). Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass in Abhängigkeit der Herkunft von Endothelzellen CXCL2 und IL8 variable Effekte haben. Die unterstreicht die Bedeutung der CXCR2-Achse in der Umgehung der VEGF-vermittelten Angiogenese generell und bietet einen Erklärungsansatz für die Resistenzentwicklung im Glioblastom.

7.8. Der CXCR2-Antagonist SB225002 reduziert die Chemokinese, Angiogenese und verändert die Genexpression der Endothelzellen

Da sich der CXCR2-Signalweg als möglicher Therapieansatz im Glioblastom anbietet, wurde dessen Wirksamkeit in verschiedenen Versuchen an den Endothelzellen untersucht. Der ausgeprägte Effekt des CXCR2-Antagonisten SB225002 auf die Angiogenese und das chemokinetische Verhalten von Endothelzellen legt eine hohe Wirksamkeit auch unter simuliertem Überangebot von CXCL2, wie es im GBM zu erwarten wäre, nahe. Dies bestätigt die Ergebnisse einer durch die Arbeitsgruppe durchgeführten Studie an murinen Endothelzellen *in vitro* und im Glioma-Mausmodell (85). Nach Behandlung mit SB225002 *in vivo* zeigte sich dort eine verringerte Gefäßdichte, eine reduzierte Infiltration von Tumor-assoziierten Mikroglia/Makrophagen und kleinere Tumervolumina (85). In dem hier verwendeten 3D-Sphäroid-basierten Angiogenesemodell reagierten auch Sphäroide der Kontroll- sowie der VEGF-behandelten Gruppe auf den Antagonisten. Dieser Effekt könnte durch die zuvor beschriebenen antimittotischen und antiproliferativen Wirkungen des Antagonisten erklärt werden (88, 94). Petreacea et al. zeigten zudem, dass die Aktivierung von CXCR2 in humanen mikrovaskulären Endothelzellen zu einer VEGF-unabhängigen Ko-Aktivierung von VEGFR2 führen kann (187). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf einen „Crosstalk“, also eine gegenseitige Beeinflussung zwischen dem VEGF- und CXCL2/IL8-Signalweg (86). Dieser wird durch das antiapoptotische BCL-X_L und BCL-2 vermittelt wird (188-190). Dabei kommt es zu einer durch BCL-X_L über den MAPK / ERK-Signalweg vermittelten Überexpression von VEGF. Über den VEGFR2-Signaweg führt VEGF dann zur

Expression von BCL-2. Es ist bekannt, dass eine Hochregulierung von BCL-2 zur Expression von IL8 in menschlichen Endothelzellen führt (189). Durch die Anwendung von SB225002 könnte dieser „Crosstalk“ möglicherweise auch umgekehrt funktionieren. Dafür spricht auch, dass nach Behandlung mit dem Antagonisten die Genexpression des VEGF-Signalweges insbesondere VEGFR2 nicht beeinflusst war, auf Proteinebene VEGFR2 jedoch in simulierter Überexpression von CXCL2/IL8 allein sowie in Kombination mit dem Antagonisten hochreguliert war (**Abbildung 22**). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Hemmung von CXCR2 indirekt die VEGFR-Signalübertragung über jene Signalwege beeinträchtigt, die in Kombination mit den antimitotischen, antiproliferativen Wirkungen den Effekt des Antagonisten auf die Kontrollgruppen, sowie die VEGF- behandelten Gruppen erklären könnte.

7.9. Erste *in vitro* Versuche der Kombinationstherapie

Die starke Wirkung des Antagonisten nicht nur auf murine Tumor- und Endothelzellen, sondern auch auf die humanen Endothelzellen warf die Frage auf, wie sich SB225002 in Kombination mit der Standardchemotherapie Temozolomid auf die Gen- und Proteinexpression auswirken würde. In 6.2.2.2 wurde gezeigt, dass das proapoptotische *BAX* durch den Antagonisten allein signifikant, aber auch in Kombination mit Temozolomid hochreguliert, und das antiapoptotische *BCL-2* signifikant herunter reguliert wurde. de Vasconcellos et al. zeigten 2015, dass es durch SB225002 zur Einleitung der Apoptose durch Triggerung eines sonst für die Tubulinbindung typischen Transkriptionsprogramms kommt (94). IL8 und CXCR2 wurden durch den Antagonisten allein und durch die Kombinationstherapie induziert, nicht aber durch TMZ allein. Interessanterweise wurde die Expression von CXCL2 nicht durch die Behandlung mit TMZ induziert. Dies widerspricht der von Bruyère et al. 2011 gezeigten Überexpression von CXCL2 und IL8 *in vitro* nach Behandlung mit TMZ (75). Allerdings erfolgte die TMZ Applikation anders als in dieser Arbeit als Langzeitbehandlung über mehrere Wochen, was mit den hier verwendeten primären humanen Endothelzellen nicht möglich war. Ein direkter Vergleich zu der Studie von Bruyère et al. ist somit nicht zulässig. Eine wichtige Frage wäre, ob die Kombinationstherapie einen additiven Effekt auf die Endothelzellen hat. Anhand der Genexpressionsanalysen nach Kurzzeitbehandlung konnte kein Effekt festgestellt werden, was nicht bedeutet, dass eine Kombination von SB225002 und TMZ keine synergistische Wirkung hat. Um diese Frage zu klären sind weiterführende präklinische Studien *in vitro* und *in vivo* notwendig.

7.10. Zukünftige Therapieansätze als „Targeted Therapies“

Das katastrophale mittlere Überleben von Patienten mit GBM sowie zahlreiche Studien und Therapieversuche sprechen dafür, dass ein einzelner Therapieansatz im Glioblastom nicht zielführend ist. Auch wenn in dieser Patientenkohorte kein bestimmtes Verteilungsmuster der CXCL2 Überexpression nachgewiesen werden konnte, geht es darum, für den einzelnen

Patienten die beste Therapie zu finden. Diese These wird durch die TCGA-Analyse gestützt, die zeigte, dass ca. 30% der 528 untersuchten Patienten und Patientinnen CXCL2 hoch regulieren und gegenüber anderen Personen ohne Überexpression ein Überlebensdefizit haben (86). Für diese Patienten und Patientinnen könnte eine Kombinationstherapie mit einem CXCR2-Antagonisten wie SB225002 von Bedeutung sein. Wie diese Arbeit zeigen konnte, hat dieser einen großen Effekt auf primäre humane Endothelzellen *in vitro* sowie zahlreiche antitumorale Effekte in verschiedenen Mausmodellen (83, 85). Die Relevanz des Signalwegs insbesondere in der Angiogenese wurde anhand des neu etablierten 3D Angiogeneseassays an Hirnendothelzellen nachgewiesen. Zudem ist bekannt, dass CXCR2 zur Entstehung von Gefäßähnlichen Strukturen beiträgt, die sogenannte Vaskuläre Mimikry (73, 83), und damit direkt an der Resistenzentwicklung im Glioblastom beteiligt ist. Erste klinische Studien, mit personalisierten Therapieansätzen gegen andere Chemokinrezeptoren wie z.B. CXCR4 zeigten sowohl allein als auch in Kombination mit der Standardtherapie bzw. antiangiogenen Therapien vielversprechende Ergebnisse (191-193). Somit wäre es höchst relevant den Effekt von SB225002 in Kombination mit der etablierten Standardtherapie *in vivo* und schließlich auch in klinischen Studien zu untersuchen.

8. Literaturverzeichnis

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-20.
2. Brierley JD, M.K G, C W, editors. *TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition.* Oxford: Wiley Blackwell2017.
3. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol.* 2019;21(Suppl 5):v1-v100.
4. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, 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, 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. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-96.
5. Krebsregisterdaten Zf, E.V. GdeKD. *Krebs in Deutschland für 2015/2016.* Robert Koch-Institut, Berlin2019.
6. Tamimi AF, Juweid M. *Epidemiology and Outcome of Glioblastoma.* In: S DV, editor. *Glioblastoma Brisbane (AU): Codon Publications2017.*
7. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol.* 1999;1(1):44-51.
8. Peiffer J, Kleihues P. Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research. *Brain Pathol.* 1999;9(2):241-5.
9. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Jr., Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321(5897):1807-12.
10. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360(8):765-73.
11. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):997-1003.
12. Herrlinger U, Rieger J, Koch D, Loeser S, Blaschke B, Kortmann RD, Steinbach JP, Hundsberger T, Wick W, Meyermann R, Tan TC, Sommer C, Bamberg M, Reifenberger G, Weller M. Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. *J Clin Oncol.* 2006;24(27):4412-7.

13. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000;343(19):1350-4.
14. Chang SM, Parney IF, Huang W, Anderson FA, Jr., Asher AL, Bernstein M, Lillehei KO, Brem H, Berger MS, Laws ER, Glioma Outcomes Project I. Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma. *JAMA*. 2005;293(5):557-64.
15. Diwanji TP, Engelman A, Snider JW, Mohindra P. Epidemiology, diagnosis, and optimal management of glioma in adolescents and young adults. *Adolesc Health Med Ther*. 2017;8:99-113.
16. McFaline-Figueroa JR, Lee EQ. Brain Tumors. *Am J Med*. 2018;131(8):874-82.
17. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*. 2001;95(2):190-8.
18. Li YM, Suki D, Hess K, Sawaya R. The influence of maximum safe resection of glioblastoma on survival in 1229 patients: Can we do better than gross-total resection? *J Neurosurg*. 2016;124(4):977-88.
19. Sanai N, Polley MY, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J Neurosurg*. 2011;115(1):3-8.
20. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G, Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol*. 2002;64(3):259-73.
21. Gliome S2k Leitlinie: Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) – Ständige Kommission Leitlinien, Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie [cited 2020. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-099l_S2k_Gliome_2015-06-abgelaufen.pdf].
22. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, 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(10):987-96.
23. Cabrera AR, Kirkpatrick JP, Fiveash JB, Shih HA, Koay EJ, Lutz S, Petit J, Chao ST, Brown PD, Vogelbaum M, Reardon DA, Chakravarti A, Wen PY, Chang E. Radiation therapy for glioblastoma: Executive summary of an American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *Pract Radiat Oncol*. 2016;6(4):217-25.
24. Corso CD, Bindra RS, Mehta MP. The role of radiation in treating glioblastoma: here to stay. *J Neurooncol*. 2017;134(3):479-85.
25. Malmstrom A, Gronberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, Abacioglu U, Tavelin B, Lhermitte B, Hegi ME, Rosell J, Henriksson R, Nordic Clinical Brain Tumour Study G. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(9):916-26.

26. Morisse MC, Etienne-Selloum N, Bello-Roufai D, Blonski M, Taillandier L, Lorgis V, Noel G, Ahle G, Duran-Pena A, Boone M, Chauffert B. Long-term survival in patients with recurrent glioblastoma treated with bevacizumab: a multicentric retrospective study. *J Neurooncol.* 2019;144(2):419-26.
27. Stensjoen AL, Solheim O, Kvistad KA, Haberg AK, Salvesen O, Berntsen EM. Growth dynamics of untreated glioblastomas in vivo. *Neuro Oncol.* 2015;17(10):1402-11.
28. Brandenburg S, Muller A, Turkowski K, Radev YT, Rot S, Schmidt C, Bungert AD, Acker G, Schorr A, Hippe A, Miller K, Heppner FL, Homey B, Vajkoczy P. Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors. *Acta Neuropathol.* 2016;131(3):365-78.
29. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Carpentier AF, Hoang-Xuan K, Kavan P, Cernea D, Brandes AA, Hilton M, Abrey L, Cloughesy T. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014;370(8):709-22.
30. Herrlinger U, Schafer N, Steinbach JP, Weyerbrock A, Hau P, Goldbrunner R, Friedrich F, Rohde V, Ringel F, Schlegel U, Sabel M, Ronellenfitch MW, Uhl M, Maciaczyk J, Grau S, Schnell O, Hanel M, Krex D, Vajkoczy P, Gerlach R, Kortmann RD, Mehdorn M, Tutenberg J, Mayer-Steinacker R, Fietkau R, Brehmer S, Mack F, Stuplich M, Kebir S, Kohnen R, Dunkl E, Leutgeb B, Proescholdt M, Pietsch T, Urbach H, Belka C, Stummer W, Glas M. Bevacizumab Plus Irinotecan Versus Temozolomide in Newly Diagnosed O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Nonmethylated Glioblastoma: The Randomized GLARIUS Trial. *J Clin Oncol.* 2016;34(14):1611-9.
31. Gerstner ER, Batchelor TT. Antiangiogenic therapy for glioblastoma. *Cancer J.* 2012;18(1):45-50.
32. Becher OJ, Hambardzumyan D, Fomchenko EI, Momota H, Mainwaring L, Bleau AM, Katz AM, Edgar M, Kenney AM, Cordon-Cardo C, Blasberg RG, Holland EC. Gli activity correlates with tumor grade in platelet-derived growth factor-induced gliomas. *Cancer Res.* 2008;68(7):2241-9.
33. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia.* 2012;60(3):502-14.
34. Yin J, Valin KL, Dixon ML, Leavenworth JW. The Role of Microglia and Macrophages in CNS Homeostasis, Autoimmunity, and Cancer. *J Immunol Res.* 2017;2017:5150678.
35. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(12):953-64.
36. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:643-75.
37. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* 2007;10(12):1538-43.
38. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 2010;330(6005):841-5.

39. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci.* 2016;19(1):20-7.
40. Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. *Neuron Glia Biol.* 2011;7(1):47-53.
41. Prinz M, Erny D, Hagemeyer N. Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat Immunol.* 2017;18(4):385-92.
42. Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2011;14(10):1227-35.
43. Nakajima KS, K. Neuroprotective roles of microglia in the central nervous system. In: Streit WJ, editor. *Microglia in the Regenerating and Degenerating Central Nervous System.* New York: Springer; 2002. p. 188-208.
44. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005;308(5726):1314-8.
45. Garcia-Segura LM, Chowen JA, Naftolin F. Endocrine glia: roles of glial cells in the brain actions of steroid and thyroid hormones and in the regulation of hormone secretion. *Front Neuroendocrinol.* 1996;17(2):180-211.
46. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1387-94.
47. Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:619-43.
48. Morisse MC, Jouannet S, Dominguez-Villar M, Sanson M, Idbaih A. Interactions between tumor-associated macrophages and tumor cells in glioblastoma: unraveling promising targeted therapies. *Expert Rev Neurother.* 2018;18(9):729-37.
49. Galarneau H, Villeneuve J, Gowing G, Julien JP, Vallieres L. Increased glioma growth in mice depleted of macrophages. *Cancer Res.* 2007;67(18):8874-81.
50. Zhai H, Heppner FL, Tsirka SE. Microglia/macrophages promote glioma progression. *Glia.* 2011;59(3):472-85.
51. Gabrusiewicz K, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M, Sielska M, Frankowska M, Kaminska B. Characteristics of the alternative phenotype of microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas. *PLoS One.* 2011;6(8):e23902.
52. Markovic DS, Glass R, Synowitz M, Rooijen N, Kettenmann H. Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64(9):754-62.
53. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol.* 2008;216(1):15-24.
54. Dorward IG, Luo J, Perry A, Gutmann DH, Mansur DB, Rubin JB, Leonard JR. Postoperative imaging surveillance in pediatric pilocytic astrocytomas. *J Neurosurg Pediatr.* 2010;6(4):346-52.

55. Hori T, Sasayama T, Tanaka K, Koma YI, Nishihara M, Tanaka H, Nakamizo S, Nagashima H, Maeyama M, Fujita Y, Yokozaki H, Hirose T, Kohmura E. Tumor-associated macrophage related interleukin-6 in cerebrospinal fluid as a prognostic marker for glioblastoma. *J Clin Neurosci.* 2019;68:281-9.
56. da Fonseca AC, Badie B. Microglia and macrophages in malignant gliomas: recent discoveries and implications for promising therapies. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:264124.
57. Kiefer R, Supler ML, Toyka KV, Streit WJ. In situ detection of transforming growth factor-beta mRNA in experimental rat glioma and reactive glial cells. *Neurosci Lett.* 1994;166(2):161-4.
58. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23(11):549-55.
59. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677-86.
60. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol.* 2017;35:441-68.
61. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13.
62. Szulzewsky F, Pelz A, Feng X, Synowitz M, Markovic D, Langmann T, Holtman IR, Wang X, Eggen BJ, Boddeke HW, Hambardzumyan D, Wolf SA, Kettenmann H. Glioma-associated microglia/macrophages display an expression profile different from M1 and M2 polarization and highly express *Gpnmb* and *Spp1*. *PLoS One.* 2015;10(2):e0116644.
63. Muller S, Kohanbash G, Liu SJ, Alvarado B, Carrera D, Bhaduri A, Watchmaker PB, Yagnik G, Di Lullo E, Malatesta M, Amankulor NM, Kriegstein AR, Lim DA, Aghi M, Okada H, Diaz A. Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment. *Genome Biol.* 2017;18(1):234.
64. Pires-Afonso Y, Niclou SP, Michelucci A. Revealing and Harnessing Tumour-Associated Microglia/Macrophage Heterogeneity in Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3).
65. Darmanis S, Sloan SA, Croote D, Mignardi M, Chernikova S, Samghababi P, Zhang Y, Neff N, Kowarsky M, Caneda C, Li G, Chang SD, Connolly ID, Li Y, Barres BA, Gephart MH, Quake SR. Single-Cell RNA-Seq Analysis of Infiltrating Neoplastic Cells at the Migrating Front of Human Glioblastoma. *Cell Rep.* 2017;21(5):1399-410.
66. Wesolowska A, Kwiatkowska A, Slomnicki L, Dembinski M, Master A, Sliwa M, Franciszewicz K, Chouaib S, Kaminska B. Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma invasion--an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor. *Oncogene.* 2008;27(7):918-30.
67. Blank A, Kremenetskaia I, Urbantat RM, Acker G, Turkowski K, Radke J, Schneider UC, Vajkoczy P, Brandenburg S. Microglia/macrophages express alternative proangiogenic factors depending on granulocyte content in human glioblastoma. *J Pathol.* 2020.

68. Held-Feindt J, Hattermann K, Muerkoster SS, Wedderkopp H, Knerlich-Lukoschus F, Ungefroren H, Mehdorn HM, Mentlein R. CX3CR1 promotes recruitment of human glioma-infiltrating microglia/macrophages (GIMs). *Exp Cell Res.* 2010;316(9):1553-66.
69. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol.* 2006;7(12):243.
70. Hasan T, Caragher SP, Shireman JM, Park CH, Atashi F, Baisiwala S, Lee G, Guo D, Wang JY, Dey M, Wu M, Lesniak MS, Horbinski CM, James CD, Ahmed AU. Interleukin-8/CXCR2 signaling regulates therapy-induced plasticity and enhances tumorigenicity in glioblastoma. *Cell Death Dis.* 2019;10(4):292.
71. Hillyer P, Mordelet E, Flynn G, Male D. Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. *Clin Exp Immunol.* 2003;134(3):431-41.
72. Subileau EA, Rezaie P, Davies HA, Colyer FM, Greenwood J, Male DK, Romero IA. Expression of chemokines and their receptors by human brain endothelium: implications for multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009;68(3):227-40.
73. Sharma I, Singh A, Siraj F, Saxena S. IL-8/CXCR1/2 signalling promotes tumor cell proliferation, invasion and vascular mimicry in glioblastoma. *J Biomed Sci.* 2018;25(1):62.
74. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol.* 2005;7(2):122-33.
75. Bruyere C, Mijatovic T, Lonez C, Spiegl-Kreinecker S, Berger W, Kast RE, Ruyschaert JM, Kiss R, Lefranc F. Temozolomide-induced modification of the CXC chemokine network in experimental gliomas. *Int J Oncol.* 2011;38(5):1453-64.
76. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:659-702.
77. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):6735-41.
78. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, Buechi L, Walz A, Richmond A, Strieter RM. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol.* 2000;165(9):5269-77.
79. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol.* 2003;170(6):3369-76.
80. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.* 1992;258(5089):1798-801.
81. Szekanecz Z, Shah MR, Harlow LA, Pearce WH, Koch AE. Interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are involved in human aortic endothelial cell migration. The possible role of these cytokines in human aortic aneurysmal blood vessel growth. *Pathobiology.* 1994;62(3):134-9.

82. Yang L, Liu Z, Wu R, Yao Q, Gu Z, Liu M. Correlation of C-X-C chemokine receptor 2 upregulation with poor prognosis and recurrence in human glioma. *Onco Targets Ther.* 2015;8:3203-9.
83. Angara K, Borin TF, Rashid MH, Lebedyeva I, Ara R, Lin PC, Iskander A, Bollag RJ, Achyut BR, Arbab AS. CXCR2-Expressing Tumor Cells Drive Vascular Mimicry in Antiangiogenic Therapy-Resistant Glioblastoma. *Neoplasia.* 2018;20(10):1070-82.
84. Groblewska M, Litman-Zawadzka A, Mroczko B. The Role of Selected Chemokines and Their Receptors in the Development of Gliomas. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10).
85. Acker G, Zollfrank J, Jelgersma C, Nieminen-Kelha M, Kremenetskaia I, Mueller S, Ghori A, Vajkoczy P, Brandenburg S. The CXCR2/CXCL2 signalling pathway - An alternative therapeutic approach in high-grade glioma. *Eur J Cancer.* 2020;126:106-15.
86. Urbantat RM, Blank A, Kremenetskaia I, Vajkoczy P, Acker G, Brandenburg S. The CXCL2/IL8/CXCR2 Pathway Is Relevant for Brain Tumor Malignancy and Endothelial Cell Function. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5).
87. White JR, Lee JM, Young PR, Hertzberg RP, Jurewicz AJ, Chaikin MA, Widdowson K, Foley JJ, Martin LD, Griswold DE, Sarau HM. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J Biol Chem.* 1998;273(17):10095-8.
88. Goda AE, Koyama M, Sowa Y, Elokely KM, Yoshida T, Kim BY, Sakai T. Molecular mechanisms of the antitumor activity of SB225002: a novel microtubule inhibitor. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(12):1741-52.
89. Qu Y, Zhou F, Xu XY. [Selective non-peptide CXCR2 antagonist SB225002 inhibits choroidal neovascularization in rat model]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2009;45(8):742-5.
90. Wang B, Hendricks DT, Wamunyokoli F, Parker MI. A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. *Cancer Res.* 2006;66(6):3071-7.
91. Matsuo Y, Campbell PM, Brekken RA, Sung B, Ouellette MM, Fleming JB, Aggarwal BB, Der CJ, Guha S. K-Ras promotes angiogenesis mediated by immortalized human pancreatic epithelial cells through mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Cancer Res.* 2009;7(6):799-808.
92. Yu M, Berk R, Kosir MA. CXCL7-Mediated Stimulation of Lymphangiogenic Factors VEGF-C, VEGF-D in Human Breast Cancer Cells. *J Oncol.* 2010;2010:939407.
93. Saintigny P, Massarelli E, Lin S, Ahn YH, Chen Y, Goswami S, Erez B, O'Reilly MS, Liu D, Lee JJ, Zhang L, Ping Y, Behrens C, Solis Soto LM, Heymach JV, Kim ES, Herbst RS, Lippman SM, Wistuba II, Hong WK, Kurie JM, Koo JS. CXCR2 expression in tumor cells is a poor prognostic factor and promotes invasion and metastasis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2013;73(2):571-82.
94. de Vasconcellos JF, Laranjeira AB, Leal PC, Bhasin MK, Zenatti PP, Nunes RJ, Yunes RA, Nowill AE, Libermann TA, Zerbini LF, Yunes JA. SB225002 Induces Cell Death and Cell Cycle Arrest in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells through the Activation of GLIPR1. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134783.
95. Alberts B. *Molecular biology of the cell.* 4th ed. New York: Garland Science; 2002. xxxiv, 1548 p. p.

96. Félétou M. *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2011.
97. Fischer CS, M; Carmeliet P. Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. Moncada SH, A, editor2006.
98. Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*. 1996;87(7):1153-5.
99. Bagley RG. Commentary on Folkman: "Tumor Angiogenesis Factor". *Cancer Res*. 2016;76(7):1673-4.
100. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
101. Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev*. 1999;13(9):1055-66.
102. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380(6573):439-42.
103. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995;376(6535):62-6.
104. 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*. 1996;380(6573):435-9.
105. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(8):592-603.
106. 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(11):1379-92.
107. Soda Y, Myskiw C, Rommel A, Verma IM. Mechanisms of neovascularization and resistance to anti-angiogenic therapies in glioblastoma multiforme. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91(4):439-48.
108. Murdoch C, Monk PN, Finn A. Cxc chemokine receptor expression on human endothelial cells. *Cytokine*. 1999;11(9):704-12.
109. Salcedo R, Resau JH, Halverson D, Hudson EA, Dambach M, Powell D, Wasserman K, Oppenheim JJ. Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. *FASEB J*. 2000;14(13):2055-64.
110. Schinkel AH. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999;36(2-3):179-94.

111. Weksler BB, Subileau EA, Perriere N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* 2005;19(13):1872-4.
112. Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol.* 2002;38(6):323-37.
113. Eigenmann DE, Xue G, Kim KS, Moses AV, Hamburger M, Oufir M. Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids Barriers CNS.* 2013;10(1):33.
114. Sharma I, Singh A, Sharma K, Saxena S. Gene Expression Profiling of Chemokines and Their Receptors in Low and High Grade Astrocytoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(5):1307-13.
115. Ibidi. Application Note 17 - 2D and 3D Chemotaxis Assays Using μ -Slide Chemotaxis online: ibidi GmbH; 2016 [updated 8 June 2016. Version 1.5:[Available from: https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN17_Chemotaxis2Dand3D.pdf.
116. Fisher NI. Statistical analysis of circular data. Cambridge England ; New York, NY, USA: Cambridge University Press; 1993. xviii, 277 p. p.
117. Koff T. Three-Dimensional in Vitro Angiogenesis Assays. In: Augustin HG, editor. *Methods in Endothelial Cell Biology*: Springer, Berlin, Heidelberg; 2004. p. 116-23.
118. Laib AM, Bartol A, Alajati A, Korff T, Weber H, Augustin HG. Spheroid-based human endothelial cell microvessel formation in vivo. *Nat Protoc.* 2009;4(8):1202-15.
119. Cho CF, Wolfe JM, Fadzen CM, Calligaris D, Hornburg K, Chiocca EA, Agar NYR, Pentelute BL, Lawler SE. Blood-brain-barrier spheroids as an in vitro screening platform for brain-penetrating agents. *Nat Commun.* 2017;8:15623.
120. Zhu H, Dai C, He L, Xu A, Chen T. Iron (II) Polypyridyl Complexes as Antiglioblastoma Agents to Overcome the Blood-Brain Barrier and Inhibit Cell Proliferation by Regulating p53 and 4E-BP1 Pathways. *Front Pharmacol.* 2019;10:946.
121. Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics.* 6. Auflage ed. Heidelberg: Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
122. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
123. Kiselak EA, Shen X, Song J, Gude DR, Wang J, Brody SL, Strauss JF, 3rd, Zhang Z. Transcriptional regulation of an axonemal central apparatus gene, sperm-associated antigen 6, by a SRY-related high mobility group transcription factor, S-SOX5. *J Biol Chem.* 2010;285(40):30496-505.
124. Chung JY, Song Y, Wang Y, Magness RR, Zheng J. Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(5):2484-90.
125. Feuser K, Thon KP, Bischoff SC, Lorentz A. Human intestinal mast cells are a potent source of multiple chemokines. *Cytokine.* 2012;58(2):178-85.

126. Lichtman JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nat Methods*. 2005;2(12):910-9.
127. Spring KR, Davidson, Michael W. Introduction to Fluorescence Microscopy 2020, April 07 [Available from: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>].
128. Schmitz S, Desel C. *Der Experimentator Zellbiologie* 2018.
129. Waters JC, Wittmann T. *Methods in cell biology : quantitative imaging in cell biology*. First edition. ed. San Diego, CA: San Diego, CA : Elsevier; 2014. 1 online resource (609 p.) p.
130. Taatjes DJ, Mossman BT. *Cell Imaging Techniques* edited by Douglas J. Taatjes, Brooke T. Mossman. 1st ed. 2006. ed. Totowa, NJ: Totowa, NJ : Humana Press : Imprint: Humana; 2006. 1 online resource (518 p.) p.
131. Timischl W. *Angewandte Statistik: Eine Einführung für Biologen und Mediziner*. Springer: Springer, Vienna; 2013.
132. Cox DR. Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. 1972;34(2):187-202.
133. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, Jeraj R, Brown PD, Jaeckle KA, Schiff D, Stieber VW, Brachman DG, Werner-Wasik M, Tremont-Lukats IW, Sulman EP, Aldape KD, Curran WJ, Jr., Mehta MP. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014;370(8):699-708.
134. Radke J, Koch A, Pritsch F, Schumann E, Misch M, Hempt C, Lenz K, Lobel F, Paschereit F, Heppner FL, Vajkoczy P, Koll R, Onken J. Predictive MGMT status in a homogeneous cohort of IDH wildtype glioblastoma patients. *Acta Neuropathol Commun*. 2019;7(1):89.
135. Buonfiglioli A, Hambarzumyan D. Macrophages and microglia: the cerberus of glioblastoma. *Acta Neuropathol Commun*. 2021;9(1):54.
136. Buie LW, Valgus J. Bevacizumab: a treatment option for recurrent glioblastoma multiforme. *Ann Pharmacother*. 2008;42(10):1486-90.
137. Diaz RJ, Ali S, Qadir MG, De La Fuente MI, Ivan ME, Komotar RJ. The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma. *J Neurooncol*. 2017;133(3):455-67.
138. Turkowski K, Brandenburg S, Mueller A, Kremenetskaia I, Bungert AD, Blank A, Felsenstein M, Vajkoczy P. VEGF as a modulator of the innate immune response in glioblastoma. *Glia*. 2018;66(1):161-74.
139. Soffiatti R, Trevisan E, Bertero L, Bosa C, Ruda R. Anti-angiogenic approaches to malignant gliomas. *Curr Cancer Drug Targets*. 2012;12(3):279-88.
140. Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Antiangiogenic therapy in malignant gliomas. *Curr Opin Oncol*. 2008;20(6):652-61.
141. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*. 2011;2(12):1097-105.

142. Auerbach R, Akhtar N, Lewis RL, Shinnars BL. Angiogenesis assays: problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Rev.* 2000;19(1-2):167-72.
143. Man S, Ubogu EE, Williams KA, Tucky B, Callahan MK, Ransohoff RM. Human brain microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells differentially facilitate leukocyte recruitment and utilize chemokines for T cell migration. *Clin Dev Immunol.* 2008;2008:384982.
144. van den Bent MJ, Weller M, Wen PY, Kros JM, Aldape K, Chang S. A clinical perspective on the 2016 WHO brain tumor classification and routine molecular diagnostics. *Neuro Oncol.* 2017;19(5):614-24.
145. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Tonn JC, Heese O, Krex D, Nikkhah G, Pietsch T, Wiestler O, Reifenberger G, von Deimling A, Loeffler M. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol.* 2009;27(34):5743-50.
146. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, Henriksson R, Le Rhun E, Balana C, Chinot O, Bendszus M, Reijneveld JC, Dhermain F, French P, Marosi C, Watts C, Oberg I, Pilkington G, Baumert BG, Taphoorn MJB, Hegi M, Westphal M, Reifenberger G, Soffiatti 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.* 2017;18(6):e315-e29.
147. Ammirati M, Galicich JH, Arbit E, Liao Y. Reoperation in the treatment of recurrent intracranial malignant gliomas. *Neurosurgery.* 1987;21(5):607-14.
148. Bloch O, Han SJ, Cha S, Sun MZ, Aghi MK, McDermott MW, Berger MS, Parsa AT. Impact of extent of resection for recurrent glioblastoma on overall survival: clinical article. *J Neurosurg.* 2012;117(6):1032-8.
149. Oppenlander ME, Wolf AB, Snyder LA, Bina R, Wilson JR, Coons SW, Ashby LS, Brachman D, Nakaji P, Porter RW, Smith KA, Spetzler RF, Sanai N. An extent of resection threshold for recurrent glioblastoma and its risk for neurological morbidity. *J Neurosurg.* 2014;120(4):846-53.
150. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer cell.* 2006;9(3):157-73.
151. Qazi MA, Vora P, Venugopal C, Sidhu SS, Moffat J, Swanton C, Singh SK. Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Ann Oncol.* 2017;28(7):1448-56.
152. Skaga E, Kuleskiy E, Fayzullin A, Sandberg CJ, Potdar S, Kytala A, Langmoen IA, Laakso A, Gaal-Paavola E, Perola M, Wennerberg K, Vik-Mo EO. Intertumoral heterogeneity in patient-specific drug sensitivities in treatment-naive glioblastoma. *BMC cancer.* 2019;19(1):628.
153. Lauko A, Lo A, Ahluwalia MS, Lathia JD. Cancer cell heterogeneity & plasticity in glioblastoma and brain tumors. *Semin Cancer Biol.* 2021.

154. Flüh C, Hattermann K, Mehdorn HM, Synowitz M, Held-Feindt J. Differential expression of CXCR4 and CXCR7 with various stem cell markers in paired human primary and recurrent glioblastomas. *Int J Oncol.* 2016;48(4):1408-16.
155. Mathieson W, Thomas G. Using FFPE Tissue in Genomic Analyses: Advantages, Disadvantages and the Role of Biospecimen Science. *Curr Pathobiol Rep.* 2019;7(3):35-40.
156. Lewis F, Maughan NJ, Smith V, Hillan K, Quirke P. Unlocking the archive--gene expression in paraffin-embedded tissue. *J Pathol.* 2001;195(1):66-71.
157. Chung JY, Braunschweig T, Hewitt SM. Optimization of recovery of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol.* 2006;15(4):229-36.
158. Zhang P, Lehmann BD, Shyr Y, Guo Y. The Utilization of Formalin Fixed-Paraffin-Embedded Specimens in High Throughput Genomic Studies. *Int J Genomics.* 2017;2017:1926304.
159. Brandenburg S, Blank A, Bungert AD, Vajkoczy P. Distinction of Microglia and Macrophages in Glioblastoma: Close Relatives, Different Tasks? *Int J Mol Sci.* 2020;22(1).
160. Stoolman JS, Duncker PC, Huber AK, Giles DA, Washnock-Schmid JM, Soulika AM, Segal BM. An IFN γ /CXCL2 regulatory pathway determines lesion localization during EAE. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):208.
161. Lu-Emerson C, Snuderl M, Kirkpatrick ND, Goveia J, Davidson C, Huang Y, Riedemann L, Taylor J, Ivy P, Duda DG, Ancukiewicz M, Plotkin SR, Chi AS, Gerstner ER, Eichler AF, Dietrich J, Stemmer-Rachamimov AO, Batchelor TT, Jain RK. Increase in tumor-associated macrophages after antiangiogenic therapy is associated with poor survival among patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2013;15(8):1079-87.
162. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol.* 2002;196(3):254-65.
163. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med.* 2001;193(6):727-40.
164. Fu W, Wang W, Li H, Jiao Y, Huo R, Yan Z, Wang J, Wang S, Wang J, Chen D, Cao Y, Zhao J. Single-Cell Atlas Reveals Complexity of the Immunosuppressive Microenvironment of Initial and Recurrent Glioblastoma. *Frontiers in immunology.* 2020;11:835.
165. Wang N, Jain RK, Batchelor TT. New Directions in Anti-Angiogenic Therapy for Glioblastoma. *Neurotherapeutics.* 2017;14(2):321-32.
166. Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Mol Neurobiol.* 2020;57(5):2461-78.
167. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 2005;307(5706):58-62.
168. Das S, Marsden PA. Angiogenesis in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2013;369(16):1561-3.

169. Baisiwala S, Auffinger B, Caragher SP, Shireman JM, Ahsan R, Lee G, Hasan T, Park C, Saathoff MR, Christensen AC, Ahmed AU. Chemotherapeutic Stress Induces Transdifferentiation of Glioblastoma Cells to Endothelial Cells and Promotes Vascular Mimicry. *Stem Cells Int.* 2019;2019:6107456.
170. Kim JT, Kim JS, Ko KW, Kong DS, Kang CM, Kim MH, Son MJ, Song HS, Shin HJ, Lee DS, Eoh W, Nam DH. Metronomic treatment of temozolomide inhibits tumor cell growth through reduction of angiogenesis and augmentation of apoptosis in orthotopic models of gliomas. *Oncol Rep.* 2006;16(1):33-9.
171. Jo MY, Kim YG, Kim Y, Lee SJ, Kim MH, Joo KM, Kim HH, Nam DH. Combined therapy of temozolomide and ZD6474 (vandetanib) effectively reduces glioblastoma tumor volume through anti-angiogenic and anti-proliferative mechanisms. *Molecular medicine reports.* 2012;6(1):88-92.
172. Conroy S, Kruyt FAE, Wagemakers M, Bhat KPL, den Dunnen WFA. IL-8 associates with a pro-angiogenic and mesenchymal subtype in glioblastoma. *Oncotarget.* 2018;9(21):15721-31.
173. Alge CS, Hauck SM, Priglinger SG, Kampik A, Ueffing M. Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *J Proteome Res.* 2006;5(4):862-78.
174. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(3):443-50.
175. Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y, Ikeda C, Suzuki T, Kamiie J, Terasaki T. Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem.* 2011;117(2):333-45.
176. ScienCell Research Laboratories. Human Brain Microvascular Endothelial Cells (HBMEC) [PDF]. Online2021 [cited 2021 Feb 12]. Available from: <https://www.sciencellonline.com/PS/1000.pdf>.
177. McRae M, LaFratta LM, Nguyen BM, Paris JJ, Hauser KF, Conway DE. Characterization of cell-cell junction changes associated with the formation of a strong endothelial barrier. *Tissue Barriers.* 2018;6(1):e1405774.
178. Gray KM, Jung JW, Inglut CT, Huang HC, Stroka KM. Quantitatively relating brain endothelial cell-cell junction phenotype to global and local barrier properties under varied culture conditions via the Junction Analyzer Program. *Fluids Barriers CNS.* 2020;17(1):16.
179. Arthur FE, Shivers RR, Bowman PD. Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Brain Res.* 1987;433(1):155-9.
180. Wang D, Donner DB, Warren RS. Homeostatic modulation of cell surface KDR and Flt1 expression and expression of the vascular endothelial cell growth factor (VEGF) receptor mRNAs by VEGF. *J Biol Chem.* 2000;275(21):15905-11.
181. Steiner HH, Karcher S, Mueller MM, Nalbantis E, Kunze S, Herold-Mende C. Autocrine pathways of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in glioblastoma multiforme: clinical relevance of radiation-induced increase of VEGF levels. *J Neurooncol.* 2004;66(1-2):129-38.

182. Saito T, Takeda N, Amiya E, Nakao T, Abe H, Semba H, Soma K, Koyama K, Hosoya Y, Imai Y, Isagawa T, Watanabe M, Manabe I, Komuro I, Nagai R, Maemura K. VEGF-A induces its negative regulator, soluble form of VEGFR-1, by modulating its alternative splicing. *FEBS Lett.* 2013;587(14):2179-85.
183. Rothmeier AS, Ischenko I, Joore J, Garczarczyk D, Furst R, Bruns CJ, Vollmar AM, Zahler S. Investigation of the marine compound spongistatin 1 links the inhibition of PKC α translocation to nonmitotic effects of tubulin antagonism in angiogenesis. *FASEB J.* 2009;23(4):1127-37.
184. Zengel P, Nguyen-Hoang A, Schildhammer C, Zantl R, Kahl V, Horn E. μ -Slide Chemotaxis: a new chamber for long-term chemotaxis studies. *BMC Cell Biol.* 2011;12:21.
185. Schreyer A-C. Charakterisierung des μ -Slides zur Analyse von Chemotaxis: ein Vergleich zur Boyden-Kammer. Online: LMU München; 2014.
186. Dwyer J, Hebda JK, Le Guelte A, Galan-Moya EM, Smith SS, Azzi S, Bidere N, Gavard J. Glioblastoma cell-secreted interleukin-8 induces brain endothelial cell permeability via CXCR2. *PLoS One.* 2012;7(9):e45562.
187. Petreaca ML, Yao M, Liu Y, Defea K, Martins-Green M. Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability. *Mol Biol Cell.* 2007;18(12):5014-23.
188. Nor JE, Christensen J, Liu J, Peters M, Mooney DJ, Strieter RM, Polverini PJ. Up-Regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth. *Cancer Res.* 2001;61(5):2183-8.
189. Karl E, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Soengas MS, Koch AE, Polverini PJ, Nunez G, Nor JE. Unidirectional crosstalk between Bcl-xL and Bcl-2 enhances the angiogenic phenotype of endothelial cells. *Cell Death Differ.* 2007;14(9):1657-66.
190. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer.* 2006;42(6):768-78.
191. Thomas RP, Nagpal S, Iv M, Soltys SG, Bertrand S, Pelpola JS, Ball R, Yang J, Sundaram V, Lavezo J, Born D, Vogel H, Brown JM, Recht LD. Macrophage Exclusion after Radiation Therapy (MERT): A First in Human Phase I/II Trial using a CXCR4 Inhibitor in Glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2019;25(23):6948-57.
192. Rios A, Hsu SH, Blanco A, Buryanek J, Day AL, McGuire MF, Brown RE. Durable response of glioblastoma to adjuvant therapy consisting of temozolomide and a weekly dose of AMD3100 (plerixafor), a CXCR4 inhibitor, together with lapatinib, metformin and niacinamide. *Oncoscience.* 2016;3(5-6):156-63.
193. Lee EQ, Duda DG, Muzikansky A, Gerstner ER, Kuhn JG, Reardon DA, Nayak L, Norden AD, Doherty L, LaFrankie D, Stefanik J, Vardam T, Smith KH, McCluskey C, Gaffey S, Batchelor TT, Jain RK, Wen PY. Phase I and Biomarker Study of Plerixafor and Bevacizumab in Recurrent High-Grade Glioma. *Clin Cancer Res.* 2018;24(19):4643-9.

9. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| 3D | drei-dimensional |
| A | Amphotericin B |
| BAX | Bcl-2-associated X protein |
| BCL-2 | B-cell lymphoma 2 |
| COM | Center of mass |
| CXCL2 | CXC Motiv Chemokine 2 |
| CXCR1 | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1 |
| CXCR2 | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2 |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| ECM | Endothelzellbasalmedium (für HBMEC) |
| ECBM | Endothelzellbasalmedium (für HUVEC) |
| ECGM | Endothelzellwachstumsmedium (für HUVEC) |
| FBS | Fetales Kälberserum |
| GBM | Glioblastom |
| HBMEC | human brain microvessel endothelial cells |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HPF | Hauptgesichtsfeld |
| HUVEC | human umbilical vein endothelial cells |
| G | Gentamicin |
| GTR | Gross Total Resection |
| Gy | Gray |
| h | Stunde |
| Iba 1 | ionized calcium-binding adapter molecule 1 |
| IC ₅₀ | mittlere inhibitorische Konzentration |
| IL8 | Interleukin 8 |
| IDH1/2 | Isozitat Dehydrogenase 1/2 |
| Ki67 | Kiel 67 |
| max | maximal |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| MGMT | O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase |
| mm | Millimeter |
| MRT | Magnetresonanztomografie |
| mRNA | messenger RNA |
| MW | Mittelwert |
| nd | nicht detektierbar |

| | |
|--------|---|
| ns | nicht signifikant |
| pGBM | primäres Glioblastom |
| PBS | Phosphat buffered saline |
| P/S | Penicillin/Streptomycin |
| SB | SB225002 (CXCR2-Antagonist) |
| SD | Standardabweichung |
| sek | Sekunde |
| TAMs | Tumorassoziierte Mikroglia/Makrophagen |
| TMZ | Temozolomid/Temodal |
| TNS | Trypsin Neutralisation Solution |
| TP53 | Tumorsuppressorprotein p53 |
| rGBM | rezidiertes Glioblastom |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| VEGFR1 | Vascular endothelial growth factor receptor 1 |
| VEGFR2 | Vascular endothelial growth factor receptor 2 |
| vgl. | vergleiche |
| µl | Microliter |
| µm | Micrometer |

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ruth Maria Urbantat, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Rolle des CXCR2/CXCL2 Signalwegs in der Resistenzentwicklung und Angiogenese im humanen Glioblastom 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/innen 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/der Erstbetreuer/in, 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.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung

Ruth Maria Urbantat hatte folgenden Anteil an der angegebenen Publikation:

Publikation 1: R.M. Urbantat*, A. Blank*, I. Kremenetskaia, P. Vajkoczy, G.Acker† und S. Brandenburg†. **The CXCL2/IL8/CXCR2 pathway is relevant for brain tumor malignancy and endothelial cell function.** *International Journal of Molecular Sciences*, März 2021, doi: 10.3390/ijms22052634;

*/† Diese Autoren haben gleichermaßen beigetragen;

Beitrag im Einzelnen: Kultivierung und Expansion der primären humanen Endothelzellen (HUVEC und HBMEC), RNA-Isolierung mit anschließendem Umschreiben in cDNA- und Durchführung der quantitativen realtime PCR. Eigenständiges Design der angegebenen Primer. Etablierung und Durchführung des 3D-Angiogeneseassays und Chemotaxisassays. Lebendzell- und Konfokalmikroskopie sowie Aufnahme entsprechender Datensätze. Statistische Analyse und Interpretation der Daten mithilfe von den Programmen Excel, Chemotaxis and Migration Tool, ImageJ und Graphpad Prism sowie Erstellung der Abbildungen 3, 5 und 6. Verfassen des Manuskriptes und Einreichen des Papers, Beantwortung und Diskussion der Fragen der Reviewer, Revision des Datensatzes und des Manuskriptes, Korrespondenz mit den Editoren bis zur Veröffentlichung.

Aus der oben genannten Publikation sind Teile der Figure 3 in dieser Arbeit wiederzufinden als „Abbildung 18: Proliferation von HUVEC und HBMEC unter Einfluss von proangiogenen Molekülen.“ Die als Figure 5 veröffentlichten Daten finden sich nachfolgend zum Teil in „Abbildung 26: Etablierung der HUVEC- und HBMEC-Sphäroide.“, „Abbildung 27: 3D-Angiogenese von HUVEC und HBMEC unter Einfluss von CXCL2 und IL8.“ wieder. Daten aus Figure 6 der oben genannten Publikation lassen sich zudem in „Abbildung 25: SB225002 reduziert die Migrationsgeschwindigkeit und die zurückgelegte Distanz von HUVEC.“ und „Abbildung 28: 3D-Angiogenese unter Behandlung mit dem CXCR2-Antagonisten.“ finden. Die Ergebnisse der oben genannten Abbildungen werden in dieser Arbeit in den Kapiteln 6.2.2.1, 6.2.4.2, 6.2.4.1, 6.2.5.1, 6.2.5.2, und 6.2.5.3 beschrieben.

Publikation 2: R.M. Urbantat*, C. Jelgersma*, S. Brandenburg, M. Nieminen-Kelhä, I. Kremenetskaia, J. Zollfrank, S. Mueller, K. Rubarth, A. Koch, P. Vajkoczy und G. Acker. **Tumor-Associated Microglia/Macrophages as a Predictor for Survival in Glioblastoma and Temozolomide-Induced Changes in CXCR2 Signaling with New Resistance Overcoming Strategy by Combination Therapy.** *International Journal of Molecular Sciences*, Oktober 2021, doi: 10.3390/ijms222011180;

*Diese Autoren haben gleichermaßen beigetragen;

Beitrag im Einzelnen: Identifikation der Patienten und Patientinnen, Akquise der Patientenproben, Etablierung und Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen, Fluoreszenzmikroskopie sowie Aufnahme entsprechender Datensätze. Statistische Analyse und Interpretation der Daten mithilfe von

den Programmen Excel, ImageJ, SPSS und Graphpad Prism sowie Erstellung der Abbildungen 1, 2, 3 und 7 sowie der Tabellen 1, 2 und 3. Verfassen des Manuskriptes und Einreichen des Papers, Beantwortung und Diskussion der Fragen der Reviewer, Revision des Datensatzes und des Manuskriptes, Korrespondenz mit den Editoren bis zur Veröffentlichung.

Aus der oben genannten Publikation sind Teile der Figure 1 in dieser Arbeit wiederzufinden als Abbildung 12: Das progressionsfreie und Gesamtüberleben der Patientenkohorte nach Therapieregime und Expression verschiedener Merkmale. und Abbildung 13: Höhere Infiltration von TAMs im primären Glioblastom. Die als Figure 2 und 3 veröffentlichten Daten finden sich nachfolgend zum Teil in Abbildung 14: Kein Unterschied in der VEGF Expression im pGBM und rGBM. Abbildung 15: Die Expression von CXCL2 in Rezidivtumoren ist bei Patienten und Patientinnen, die weniger TMZ erhielten geringer und IL8 ist im Rezidivtumor hochreguliert. und Abbildung 16: Die Vaskularisierung im pGBM und rGBM im Vergleich. Daten aus der Tabelle 1 der oben genannten Publikation lassen sich zudem in Tabelle 17: Überblick der Patientencharakteristika und Tabelle 18: Individuelle klinische Patientencharakteristika finden. Die Daten der Tabelle 2 finden sich in dieser Monographie in Tabelle 20: Cox-Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens und die Daten der Tabelle 3 entsprechen den Daten der Tabelle 21: Cox-Regressionsanalyse des PFS der vorliegenden Monographie. Die Ergebnisse der oben genannten Abbildungen werden in dieser Arbeit im Kapitel 6.1 und seinen Unterkapiteln 6.1.1 bis 6.1.7 beschrieben.

Publikation 3: R.M. Urbantat, C. Jelgersma, P. Vajkoczy, S. Brandenburg[†], und G. Acker[†]. **Combining TMZ and SB225002 induces changes of CXCR2 and VEGFR signalling in primary human endothelial cells in vitro.** *Oncology Reports*, Juli 2022, doi: 10.3892/or.2022.8373;

[†] Diese Autoren haben gleichermaßen beigetragen;

Beitrag im Einzelnen: Kultivierung und Expansion der primären humanen Endothelzellen (HUVEC und HBMEC), RNA-Isolierung mit anschließendem Umschreiben in cDNA- und Durchführung der quantitativen realtime PCR. Eigenständiges Design der angegebenen Primer. Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen, Fluoreszenzmikroskopie sowie Aufnahme entsprechender Datensätze. Statistische Analyse und Interpretation der Daten mithilfe von den Programmen Excel, Chemotaxis and Migration Tool, ImageJ und Graphpad Prism sowie Erstellung der Abbildungen. Verfassen des Manuskriptes und Einreichen des Papers, Beantwortung und Diskussion der Fragen der Reviewer, Revision des Datensatzes und des Manuskriptes, Korrespondenz mit den Editoren bis zur Veröffentlichung.

Aus der oben genannten Publikation sind Teile der Figure 2, 3, 4, 5 in dieser Arbeit wiederzufinden als **Abbildung 21: Genexpression von HUVEC nach Behandlung mit TMZ und SB. und Abbildung 22: Die Expression von CXCR2 und VEGFR2 von HUVEC nach Behandlung mit der Kombinationstherapie.** Die Ergebnisse der oben genannten Abbildungen werden in dieser Arbeit im Kapitel 6.2.2. und seinen

Unterkapiteln beschrieben.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Urbantat RM, Jelgersma C, Vajkoczy P, Brandenburg S[†], Acker G[†]. Combining TMZ and SB225002 induces changes of CXCR2 and VEGFR signalling in primary human endothelial cells in vitro. *Oncology Reports*, Juli 2022, doi: 10.3892/or.2022.8373;

Griese M, Panagiotou P, Manali ED, Stahl M, Schwerk N, Costa V, Douros K, Kallieri M, **Urbantat RM**, von Bernuth H, Kolilekas L, Morais L, Ramos A, Landwehr K, Knoflach K, Gothe F, Reiter K, Papaevangelou V, Kaditis AG, Kanaka-Gantenbein C, Papisiris SA. Autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in children. *ERJ Open Research* Jan 2022, 8 (1) 00701-2021; DOI: 10.1183/23120541.00701-2021

Urbantat RM, Jelgersma C, Brandenburg S, Nieminen-Kelhä M, Kremenetskaia I, Zollfrank J, Mueller S, Rubarth K, Koch A, Vajkoczy P, Acker G. Tumor-Associated Microglia/Macrophages as a Predictor for Survival in Glioblastoma and Temozolomide-Induced Changes in CXCR2 Signaling with New Resistance Overcoming Strategy by Combination Therapy. *Int J Mol Sci*. 2021. October 10; 22(20):11180. [10.3390/ijms222011180](https://doi.org/10.3390/ijms222011180)

Urbantat RM, Vajkoczy P, Brandenburg S: Advances in Chemokine Signaling Pathways as Therapeutic Targets in Glioblastoma. *Cancers*. 2021; June 15;13(12):2983. doi: 10.3390/cancers13122983

Urbantat RM, Blank A, Kremenetskaia I, Vajkoczy P, Acker G, Brandenburg S: The CXCL2/IL8/CXCR2 Pathway Is Relevant for Brain Tumor Malignancy and Endothelial Cell Function. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 5;22(5):2634. doi: 10.3390/ijms22052634.

Urbantat RM, Popper V, Menschel E, Pfeilstöcker M, Forjan E, Nader A, Sieghart CR, Keil F, Koller E: CPX-351 (Vyxeos®) can cause severe rash in acute myeloid leukemia - A case report. *Clin Case Rep*. 2021 Feb 12;9(4):1933-1936. doi: 10.1002/ccr3.3909. eCollection 2021 Apr.

Blank A, Kremenetskaia I, **Urbantat RM**, Acker G, Turkowski K, Radke J, Schneider UC, Vajkoczy P, Brandenburg S: Microglia/macrophages express alternative proangiogenic factors depending on granulocyte content in human glioblastoma. *J Pathol*. 2021 Feb;253(2):160-173. doi: 10.1002/path.5569. Epub 2020 Nov 24.

Kongressbeiträge:

Poster: Popper V, **Urbantat RM**, Menschel E, Pfeilstöcker M, Forjan E, Nader A, Sieghart CR, Keil F, Koller E: **CPX-351 (Vyxeos®) can cause severe rash in acute myeloid**

leukemia-A case report. Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Oktober 2020

Poster: Urbantat RM. Acker G, Brandenburg S, Koch A, Vajkoczy P. **Impact of temozolomide on the CXCR2 signaling pathway in matched primary and recurrent GBM tumors.** 10th Brain Tumor Meeting, Mai 2019, Berlin

Poster: Urbantat RM. Acker G, Brandenburg S, Koch A, Vajkoczy P. **The CXCR2/CXCL2 signaling pathway in the development of resistance in matched GBM patients.** 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), Mai 2019 in Würzburg. doi: 10.3205/19dgnc387

Poster: Urbantat RM. Jelgersma C, Vajkoczy P, Brandenburg S, Acker G **Combining TMZ and SB225002 induces changes of CXCR2 and VEGFR signalling in primary human endothelial cells in vitro.** 73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), Juni 2022 in Köln.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. Güliz Acker, die mir diese Dissertation ermöglicht und mich über die letzten Jahre intensiv begleitet hat. Ich danke für den wissenschaftlichen Beistand, die Offenheit für neue Ideen und das Vertrauen, das sie mir entgegen gebracht hat.

Von Herzen möchte ich mich zudem bei meiner Zweitbetreuerin Dr. rer. nat. Susan Brandenburg bedanken, die mir stets tatkräftig und enthusiastisch zur Seite stand. Ich bin dankbar für den konstruktiven wissenschaftlichen Austausch und die bedingungslose Unterstützung während der gesamten Promotion.

Herrn Prof. Dr. med. Peter Vajkoczy möchte ich danken für die wissenschaftlichen Denkanstöße und die Möglichkeit in der Experimentellen Neurochirurgie zu promovieren. Sabine Seidlitz bin ich dankbar für die administrative und mentale Unterstützung und Irina Kremenetskaia für die Einarbeitung in die Zellkultur. PD Dr. med. Julia Onken möchte ich danken für die Bereitstellung von Tumorschnitten zur Etablierung der Immunfluoreszenzfärbungen. Ein großes Dankeschön geht an alle anderen Mitarbeiter*innen des AZH, die immer ein offenes Ohr für mich hatten. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle meine Mitdoktoranden, insbesondere Alexander Bungert, Julia Zollfrank und Claudius Jelgersma.

Unserem Kooperationspartner PD Dr. med. Arend Koch, Dr. med. Josefine Radke und dem ganzen Team der Neuropathologie danke ich für die Unterstützung bei der Akquise der Tumorschnitte. Für die wissenschaftliche Beratung und Unterstützung danke ich dem Team von AMBIO (Advanced Medical BioImaging Core Facility), insbesondere Dr. rer. nat. Jörg Schmoranzer und Jutta Schüler.

Für die finanzielle Unterstützung und das Ermöglichen eines Urlaubssemesters möchte ich der Berliner Krebsgesellschaft danken.

Rob Hodson danke ich für die unermüdliche Unterstützung, das offene Ohr zu jeder Tages- und Nachtzeit und den Halt, den er mir in den letzten Jahren gegeben hat.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden ganz besonders Eva, Aleks, Sylvie, Anna, Elena und Sarah, die mich durch die Hochs und Tiefs der letzten Jahre begleitet haben und mir immer Mut gemacht haben. Mein Dank gilt auch meinen Eltern, Großeltern, meinen Geschwistern und deren Familien sowie allen anderen, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben.