

Die Rolle des Eph/Ephrin Systems bei Hirntumoren

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von **Fabian Finkelmeier**
aus **Essen**

Gießen 2010

Aus dem

Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg
GmbH, Standort Gießen

Leiter des Instituts: Professor Dr. med. Till Acker

Gutachter: Prof. Dr. med Till Acker

Gutachter: PD Dr. med. Matthias Oertel

Tag der Disputation: 30.08.2011

*Ich halte dafür,
dass das einzige Ziel der Wissenschaft darin besteht,
die Mühseligkeiten der menschlichen Existenz zu erleichtern.*

(Bertold Brecht)

**Bernd,
Susanne,
Max und Lea
gewidmet.**

Inhaltsverzeichnis

IV-V	Abbildungsverzeichnis	
VI	Tabellenverzeichnis	
VII-VIII	Abkürzungsverzeichnis	
1.	Einleitung	
1.1	Übersicht und Klassifikation von Hirntumoren	1
1.1.1	Gliome	1
1.1.2	Histopathologie	2
1.1.3	Epidemiologie	3
1.1.4	Besondere Charakteristiken hochmaligner Hirntumoren	3
1.2	Biologische Mechanismen der Tumorangiogenese	4
1.2.1	Vaskulogenese und Angiogenese	4
1.2.2	Hypoxie und das HIF-System	6
1.2.3	Pathologische Angiogenese und Tumorangiogenese	8
1.3	Angiogenesefaktoren	9
1.3.1	VEGF	10
1.3.1.1	Geschichte und Übersicht	10
1.3.1.2	VEGF Wirkung	11
1.3.1.3	Regulationen der VEGF Expression	11
1.3.1.4	Der VEGF Rezeptor	12
1.3.1.5	VEGF und physiologische Angiogenese	12
1.3.1.6	Rollen des VEGF bei soliden Tumoren und Hirnödemen	13
1.3.2	Angiopoietin1 und Tie2	14
1.3.2.1	Geschichte und Übersicht	14
1.3.2.2	Rezeptor und Ligand	14

1.3.2.3	Aufgaben des Ang1/Tie2 Systems:	15
1.3.3	Eph und Ephrine	17
1.3.3.1	Geschichte und Überblick	17
1.3.3.2	Aufbau und Funktion	17
1.3.3.3	Funktionsgrundlagen der Eph und Ephrine	20
1.3.3.4	Vaskulogenese und Angiogenese durch EphB4 und EphrinB2	21
1.3.3.5	Eph/Ephrine und Tumorangiogenese	23
1.3.3.6	Eph/Ephrine und Tumoren	26
1.4	Ziele der Arbeit	28
2.	Material und Methoden	
2.1	Material	30
2.1.1	Geräte und Materialien in alphabetischer Reihenfolge	30
2.1.2	Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge	32
2.1.3	Lösungen und Puffer	33
2.1.4	Antikörper	35
2.2	Methoden	36
2.2.1	Versuchstiere und Übersicht Gruppenaufteilung	36
2.2.2	Herstellung der EphrinB2 ^{ΔV/ΔV} Mäuse	37
2.2.3	Herkunft und Herstellung der implantierten Tumorzellen	38
2.2.3.1	Herstellung der EphrinB2 Knockout Zellen	40
2.2.4	Tierhaltung	40
2.2.5	Vorbereitung der Zellen für die Transplantation	40
2.2.6	Narkose und Tumorimplantation	41
2.2.7	Perfusion der Tiere und Präparation der Gehirne	42
2.2.8	Gewebeaufbereitung für histologische und immunhistochemische Färbung	43
2.2.9	Darstellung der Tumormorphologie mit der Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE)	43

2.2.10	Stereologische Quantifizierung des Tumorzvolumens und der Tumorsatelliten	44
2.2.11	Immunhistochemische Darstellung der perfusionierten Gefäße	45
2.2.12	Immunhistochemische Darstellung aller Gefäße	47
2.2.13	Quantifizierung der Gefäßfläche	49
2.2.14	Statistische Auswertung	50
3.	Ergebnisse	
3.1.	Ergebnisse der Versuchsreihe mit EphrinB2-KO Tumorzellen	51
3.1.1	Das Tumorzvolumen	51
3.1.2	Die Anzahl der Tumorsatelliten	53
3.1.3	Die Gefäßfläche in der CD34 Färbung	55
3.1.4	Die Gefäßfläche in der Lektin Färbung	57
3.2	Ergebnisse der Versuchsreihe mit ephrinB2ΔV/ΔV Tieren	58
3.2.1	Das Tumorzvolumen	58
3.2.2	Die Gefäßfläche in der CD34 Färbung	60
3.2.3	Die Gefäßfläche in der Lektin Färbung	62
4.	Diskussion	
4.1.	Versuchsreihe mit EphrinB2-KO Tumorzellen	65
4.1.1	Der angiozentrische vs. den parenchymatösen Invasionstyp	65
4.1.2	Eph/Ephrine agieren als Tumorsuppressoren	66
4.1.3	Invasivität von Hirntumoren	67
4.1.4	HIF als Regulator des invasiven Wachstums	68
4.1.5	HIF unterdrückt EphB/EphrinB und induziert einen invasiven Phänotyp	69
4.1.6.	Anti-angiogene Therapie mittels VEGF Inhibition bei Glioblastomen	72

4.2.	Versuchsreihe mit ephrinB2ΔV/ΔV Tieren	72
4.2.1	<i>Tip Cells</i> und VEGF Interaktion	74
4.2.2	EphrinB2 Δ V - Physiologische und pathologische Angiogenese	75
4.2.3	Funktion des EphrinB2 <i>reverse signalling</i>	77
4.2.4.	EphrinB2 Δ V und VEGF	77
4.2.5	EphrinB2 als Regulator von VEGFR2 und Endothelzellmigration	79
4.3	Anti-angiogene Therapie von Hirntumoren und klinischer Bezug	79
5.	Zusammenfassung	83
6.	Summary	85
7.	Literaturverzeichnis	87
8.	Danksagung	104
9.	Curriculum vitae	105
10.	Erklärung	106

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Bezeichnung	Seite
Abb. 1	Kapillarwachstum durch Sprossung	6
Abb. 2	Tumorangiogenese	9
Abb. 3	Molekularer Aufbau der Eph/Ephrine	19
Abb. 4	Modell der EphrinB2/EphB4 Interaktion	24
Abb. 5	Eph/Ephrin Signalfunktion während der Angiogenese	24
Abb. 6	EphA2/EphrinA1 Interaktion bei pathologischer Angiogenese	25
Abb. 7	Säulendiagramm: Tumorwachstum in der EphrinB2-KO Gruppe	52
Abb. 8	Bild: Tumorwachstum in der EphrinB2-KO Gruppe	52
Abb. 9	Säulendiagramm: Tumorsatelliten in der EphrinB2-KO Gruppe	54
Abb. 10	Bild: Angiozentrisches vs. Parenchymatöses Wachstumsverhalten	54
Abb. 11	Säulendiagramm: Gefäßfläche in der EphrinB2-KO Gruppe, CD34 Färbung	56
Abb. 12	Bild: Gefäßfläche in der EphrinB2-KO Gruppe, CD34 Färbung	56
Abb. 13	Säulendiagramm: Gefäßfläche in der EphrinB2-KO Gruppe, Lektin Färbung	57
Abb. 14	Bild: Gefäßfläche in der EphrinB2-KO Gruppe, Lektin Färbung	58
Abb. 15	Säulendiagramm: Tumorwachstum in der ephrinB2 Δ V/ Δ V Gruppe	59
Abb. 16	Bild: Tumorwachstum in der ephrinB2 Δ V/ Δ V Gruppe	60

Abbildung	Bezeichnung	Seite
Abb. 17	Säulendiagramm: Gefäßfläche in der ephrinB2 Δ V/ Δ V Gruppe, CD34 Färbung	61
Abb. 18	Bild: Gefäßfläche in der ephrinB2 Δ V/ Δ V Gruppe, CD34 Färbung und Filopodienbildung	62
Abb. 19	Säulendiagramm: Gefäßfläche in der ephrinB2 Δ V/ Δ V Gruppe, Lektin Färbung	63
Abb. 20	Bild: Gefäßfläche in der ephrinB2 Δ V/ Δ V Gruppe, Lektin Färbung	63
Abb. 21	Modell der Eph/Ephrin Regulation durch HIF	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Bezeichnung	Seite
Tab. 1	Histologisches Grading nach WHO	2
Tab. 2	Angiogenesefaktoren	10
Tab. 3	Geräte	30
Tab. 4	Materialien	31
Tab. 5	Chemikalien	32
Tab. 6	Lösungen und Puffer	34
Tab. 7	Antikörper	35
Tab. 8	Versuchstiere und Gruppenaufteilung EphrinB2 Funktion Tumorseite	36
Tab. 9	Versuchstiere und Gruppenaufteilung EphrinB2 Funktion Endothelseite	37
Tab. 10	Alkoholreihe der HE-Färbung	44
Tab. 11	Lektin-Färbung Kit	47
Tab. 12	CD34-Färbung Kit	49

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> = Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
ctrl	Kontroll Gruppe
Da	Dalton
DAB	3,3-Diaminobenzidine
dH₂O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPO	Erythropoietin
EZM	Extrazelluläre Matrix
g	Gramm
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green fluorescent protein
h	<i>hour</i> = Stunde
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HIF	Hypoxia inducible factor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
i. p.	intraperitoneal
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter

Abkürzungsverzeichnis

mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
p	Wert der Signifikanz
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> = phosphatgepufferte Salzlösung
pg	Pikogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Proteinkonzentration
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
s	Sekunde(n)
s. / s.o.	siehe / siehe oben
SAM	sterile alpha motif
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen- Sorbitanmonolauret
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität; 1U = 1µmol umgesetztes Substrat pro Minute = 1,67 x 10 ⁻⁸ Katal)
VEGF	Vascular Epidermal Growth Factor
z.B.	zum Beispiel
WHO	World Health Organisation
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1. Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Funktion des Eph/Ephrin Systems im Hirntumorwachstum und der Gefäßversorgung. Im Rahmen der Einleitung wird daher auf Hirntumore im Allgemeinen und auf deren Besonderheiten, wie Hypoxie und Tumorangiogenese, eingegangen. Im Weiteren folgt eine Übersicht zu Angiogenese und deren drei Hauptakteuren, VEGF, Angiopoietin/Tie und das Eph/Ephrin System. Auf Letzteres wird mit besonderer Deutlichkeit eingegangen, da dieses System den Mittelpunkt dieser Arbeit darstellt.

1.1 Übersicht und Klassifikation von Hirntumoren

Zu den häufigsten malignen, im Gehirn vorkommenden Tumoren, zählen Gliome, Metastasen und cerebrale Lymphome. In dieser Arbeit wird als Tumormodell ein malignes Gliom verwendet, aus diesem Grunde im Folgenden Grundlegendes zu dieser Art Tumor.

1.1.1 Gliome

Zu der Gruppe der Gliome zählt man Astrozytome, Glioblastome, Oligodendrogliome und Ependymome. Ob der Ursprung in neuroektodermalen Stammzellen oder reifen Gliazellen liegt, ist bisher ungeklärt. Dennoch wird die pathologische Diagnose aus Ähnlichkeiten der Tumorzellen zu reifen, nicht neoplastischen Astrozyten und Oligodendrozyten, welche zu den Gliazellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) zählen, getroffen (Behin *et al.*, 2003).

Der deutsche Neurologe und Neuropathologe Klaus-Joachim Zülch ordnete 1957 die bis dahin bestehenden Klassifikationen und schuf damit wesentliche Grundlagen für die erste, unter seiner Federführung vorgelegte, WHO Klassifikation von Hirntumoren (Zülch, 1979). Diese wurde von Paul Kleihues und

Einleitung

Webster Cavenee 1993 überarbeitet und 2007 letztmalig aktualisiert (Kleihues und Cavenee, 2000).

Die WHO unterteilt die Gliome je nach Differenzierung und steigender Anaplasie in die Grade I-IV, abhängig von vier histologischen Faktoren: Kernatypien, Mitosen, mikrovaskuläre Proliferation und Nekrosen.

WHO 1°	Pilozytische Astrozytome
WHO 2°	Diffus infiltrierendes Astrozytom, Oligodendrogliome, Ependymom, Oligoastrozytom
WHO 3°	Anaplastische Astrozytome, Anaplastische Oligodendrogliom Anaplastische Oligoastrozytom, Anaplastische Ependymom
WHO 4°	Glioblastome, Medulloblastome, Pinealoblastome, PNET (Primitiver neuroektodermaler Tumor)

Tabelle 1: Histologisches Grading nach WHO (Kleihues und Cavenee, 2000). Unvollständige, exemplarische Aufzählung.

Zu den Gliomen WHO I° gehört das pilozytische Astrozytom, der vorwiegend im Kindes- und Jugendalter auftritt und eine wesentlich bessere Prognose als die restlichen Gliome hat. Die Gliome II° bis IV° sind diffus infiltrierende Tumoren der Erwachsenen, wobei II° häufig als niedrigmaligne und III° bis IV° als hochmaligne bezeichnet werden.

1.1.2 Histopathologie

Die Zellen von Astrozytomen ähneln Astrozyten. Sie infiltrieren umgebende Hirnstrukturen und haben eine Tendenz zur Malignisierung. Eine Ausnahme bildet das pilozytische Astrozytom, dieses zeichnet sich aus durch fehlende

Neigung zur Progression, anderer Tumorlokalisation und eines anderen Infiltrierungsmusters. Während ein Astrozytom WHO II° ein isomorphes Erscheinungsbild bietet, so finden sich beim anaplastischen Astrozytom WHO III° eine Zunahme der Zelldichte, der Mitosen und der Pleomorphie der Zellen und ihrer Kerne. Das Glioblastoma multiforme WHO IV° ist, zusätzlich zu den oben genannten Kriterien, definiert durch Nekrosen und mikrovaskuläre Proliferate (Kleihues und Cavenee, 2000).

1.1.3 Epidemiologie

Der Anteil diffus infiltrierender Astrozytome an primären Hirntumoren des Erwachsenen liegt bei 60%. Jedes Jahr erkranken etwa 5-10 Menschen pro 100.000 Menschen Gesamtpopulation. Der Großteil der Tumoren sind höhergradige Astrozytome, ca. 50-60 % entsprechen dem Glioblastom. Ihre Inzidenz liegt zwischen 3-4 Fälle pro 100.000 Menschen Gesamtpopulation. Das durchschnittliche Erkrankungsalter steigt mit der Malignität und liegt bei Tumoren der Grade II° bis IV° bei durchschnittlich 40 bis 60 Jahren. Das Geschlechterverhältniss liegt bei allen glialen Tumoren etwas über 1 zu Gunsten der Männer (Ohgaki *et al.*, 2005).

Die mediane Überlebenszeit liegt bei einem Tumor II° bei 67 Monaten, bei einem Tumor III° bei 20 Monaten und bei einem Glioblastom bei 4,9 Monaten. Die 5-Jahres Überlebensraten in dieser Reihenfolge liegen bei 58%, 11% und 1,2% beim Glioblastom (Ohgaki *et al.*, 2005).

1.1.4 Besondere Charakteristiken hochmaligner Hirntumoren

Besonders die hochmalignen Astrozytome zeichnen sich durch die extrem hohe Invasivität und ihr schnelles Wachstum aus. Dieses führt im Gebiet des Tumorstwachstums zu einem hypoxischen Milieu, an welches der Tumor sich bestmöglich anpassen muss. Damit einhergehend entstehen besondere

Herausforderungen an Wachstumsmechanismen mit dem Ziel einer besseren Versorgung mit Gefäßen und weiterem Wachstum.

Durch sehr schnelles, unkontrolliertes und infiltratives Wachstum in das umliegende, gesunde Hirngewebe, hat besonders das Glioblastom eine sehr schlechte Prognose. Ein diagnostisch relevantes Merkmal sind die ausgeprägten glomeruloiden, hyperplastischen Gefäßproliferationen, welche das morphologische Korrelat für das enorme angiogene Potential des Tumors darstellen.

Das vasogene Hirnödeme bei Hirntumoren ist einer der Hauptgründe für die Mortalität. Eine Störung der Blut-Hirn Schranke führt zu einer Akkumulation von Flüssigkeit und Plasmaproteinen im umgebenden Hirngewebe. Da dieses kein Lymphsystem aufweist und in einem fest umschriebenen Raum liegt, führt das entstehende Ödem zu erhöhtem Hirndruck. Die Gründe für die Störung der Blut-Hirn Schranke sind vielfältig und bis heute nicht richtig verstanden. Unter anderem exprimieren Hirntumore VEGF, welches nicht nur ein starker Induktor von Gefäßneubildung (Angiogenese), sondern auch der Gefäßpermeabilität ist (Batchelor *et al.*, 2007).

1.2 Biologische Mechanismen der Tumorangiogenese

Die Mechanismen, die im Tumor dazu führen, dass dieser beginnt sich eine eigene Gefäßversorgung aufzubauen und welche Faktoren hierbei eine Rolle spielen, ist Gegenstand intensiver Forschung. Ein wesentlicher Faktor scheint Hypoxie im Tumor und durch diese aktivierte Transkriptionsfaktoren zu sein.

1.2.1 Vaskulogenese und Angiogenese

Das kardiovaskuläre System ist das erste funktionstüchtige Organ des entstehenden Organismus. In dessen Entwicklung spielen zwei Vorgänge eine wesentliche Rolle, die Vaskulogenese und die Angiogenese. Vaskulogenese

beschreibt den Vorgang der Herausbildung eines ersten Gefäßsystems während der Embryogenese aus Angioblasten und Stammzellen der Hämatopoese.

Der Umbau des primären Gefäßsystems und die Blutgefäßneubildung erfolgt durch die Angiogenese. Clark und Clark haben 1939 in grundlegenden Versuchen wesentliche Erkenntnisse zu dem Vorgang der Angiogenese geliefert. Angiogenese wurde hier beschrieben als die Herausbildung neuer Gefäße durch „kapilläres Aussprossen“ aus bestehendem Kapillarendothel. Weiterhin beobachteten sie, dass benachbarte Gefäße anastomosierten, ein Lumen bildeten und sich je nach Blutfluss ummodellierten. Dieser komplexe Prozess kann in mehrere grundlegende Phasen unterteilt werden (Folkman, 1985 und 1986). In einem ersten Schritt setzt das umliegende Gewebe angiogene Faktoren frei, woraufhin die stimulierten Endothelzellen beginnen verschiedene Proteasen zu sezernieren (Kalebic *et al.*, 1983), die enzymatisch den Abbau der Basalmembran und der lokalen extrazellulären Matrix betreiben. Die Endothelzellen verlieren daraufhin ihren engen Zell-Zell Kontakt und beginnen, unter Ausbildung kleiner Fortsätze in Richtung des angiogenen Stimulus, in das angrenzende Gewebe zu migrieren. Weitere Zellen folgen die aneinander adhären und sich zu einer geschlossenen oder fenestrierten Schicht zusammenlegen. Zuletzt folgt die Ausbildung einer länglichen, kapillaren Struktur, die ein Lumen ausbildet. Die Reifung des neu entstandenen Gefäßes erfolgt durch eine erneute Ausbildung der Basalmembran und Anlagerung von Perizyten und glatten Muskelzellen, bildlich dargestellt in Abbildung 1. Die weitere Strukturierung in Bezug auf Größe, Länge, Lumen, Anastomosen nennt man Remodellierung.

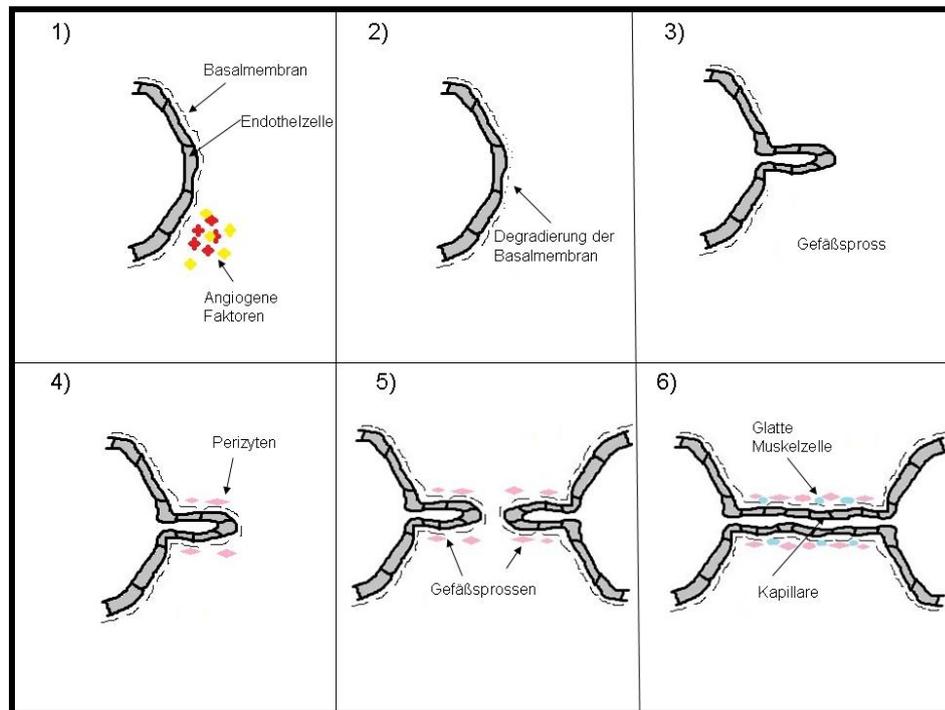


Abbildung 1: **Kapillarwachstum durch Sprossung**

1) und 2) In Antwort auf angiogene Stimuli kommt es zum raschen Abbau der Basalmembran. 3) und 4) Es folgt die Migration und Proliferation von Endothelzellen, die zur Ausbildung eines Gefäßsprosses führt. 5) Zwei Gefäßsprosse fusionieren zu einer neuen Kapillare, die in anschließenden Remodellierungsprozessen von einer neugebildeten Basalmembran, glatten Muskelzellen und Perizyten umgeben wird, 6).

1.2.2 Hypoxie und das HIF-System

Aufgabe der Gefäße ist die Versorgung des Gewebes mit lebenswichtigen Nährstoffen. So ist die ständige Verfügbarkeit von molekularem Sauerstoff (O_2) eine *conditio sine qua non* für die meisten mehrzelligen Lebewesen. Die Fähigkeit des Gewebes den Sauerstoffpartialdruck zu regulieren und diesen innerhalb der engen physiologischen Grenzen zu halten, ist essentiell für das Funktionieren des Körpers. Eine ganz wesentliche Rolle hierbei kommt dem HIF-System zu (*Hypoxia inducible transcription factor*).

Im Zuge der Erforschung der Induktionsvorgänge des Erythropoietin (EPO), welches ganz besonders durch Hypoxie reguliert wird, gelang es 1992 Se-

menza *et al.* einen hypoxieabhängigen Transkriptionsfaktor zu beschreiben, für den sie den Begriff "*Hypoxia-inducible Factor 1*" (HIF-1) prägten. In der Folge konnte auch die HIF-1 bindende DNA-Region weiter eingegrenzt werden. Diese Konsensus-Sequenz bezeichnet man heute als „*Hypoxia Responsive Element*“ (HRE) (Wang und Semenza, 1995; Wang *et al.* 1995). Die Identifikation der wesentlichen DNA Abschnitte ermöglichte die Untersuchung ihrer Aktivität auch in anderen Zellen, und es zeigte sich, dass es sich bei dem HIF- System um einen übergreifenden Mechanismus zur hypoxischen Adaptation handelt. Bis heute sind Dutzende verschiedener Gene identifiziert, die alle durch HIF hypoxisch beeinflusst werden. Man geht davon aus, dass HIF über seine Zielgene überwiegend protektiv auf Zellen wirkt. Es senkt einerseits den Sauerstoffverbrauch (z.B. durch vermehrte anaerobe Glykolyse), andererseits steigert es aber die Sauerstoffzufuhr (z.B. durch Erythropoiese oder Vasodilatation). Weiterhin werden schädliche Einflüsse der Hypoxie gemindert (z.B. pH-Regulation) und protektive Mechanismen gegen die Reoxygenierung (z.B. Radikalfänger) aktiviert. Zu den von HIF beeinflussten Prozessen zählt auch die Angiogenese (z.B. der *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) sowie eine heterogene Gruppe von mehr als 60 bis heute bekannten Zielgenen, die auf Signal-Transduktion und Entscheidungen des Zellüberlebens Einfluss nehmen (Wenger, 2002).

HIF besteht aus einer labilen, sauerstoffabhängig regulierten, α -Untereinheit, und einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit. Unter Normoxie ist die α -Untereinheit an zwei spezifischen Prolyl-Resten hydroxyliert. Diese Hydroxylierung führt dazu, dass HIF- α über das Ubiquitin-Proteasom-System mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Minuten degradiert wird (Huang *et al.*, 1998; Maxwell *et al.*, 1999). Bei Hypoxie ist die Hydroxylierung von HIF- α , und somit die Degradierung, gehemmt. In der Folge akkumuliert HIF- α , transloziert in den Zellkern, bindet an die β -Untereinheit und entfaltet seine Aktivität (Ratcliffe *et al.*, 1998; Semenza *et al.*, 2001).

1.2.3 Pathologische Angiogenese und Tumorangiogenese

Endothelzellen befinden sich normalerweise im Ruhestadium des Zellzyklus und weniger als 0,01% sind mitotisch aktiv (Engerman *et al.*, 1967). Angiogenese im Erwachsenen findet somit nur ausnahmsweise statt, nämlich dann, wenn ein erhöhter Bedarf an Gefäßen besteht, wie z.B. in den weiblichen Reproduktionsorganen während der Gravidität. Ansonsten unterliegt der Vorgang der Angiogenese streng dem Gleichgewicht aus Inhibitoren und Angiogenesestimulatoren (Hanahan und Folkman, 1996). Unkontrollierte Neubildung von Gefäßen wird bei pathologischen Geschehen induziert und ist nicht begrenzt.

Maligne, entartete Zellen ernähren sich zunächst durch Diffusion aus benachbarten Gefäßen (Folkman *et al.*, 1989). Die weitere Vermehrung solcher Zellen zu einem Tumor ist begrenzt auf eine Größe von 2-3 mm. Danach muss der Anschluss an ein kapilläres Netzwerk erfolgen, um eine weitere Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten. Dieser Schritt ist essentiell für die Tumorprogression und Entwicklung, wie Judah Folkman schon 1971 postulierte. Die Mechanismen, wie der Tumor den Anschluss an das Gefäßnetzwerk vollbringt, sind nicht vollständig aufgeklärt. Einer der Schritte muss die Aktivierung des Endothels und ein Verschieben des Gleichgewichts von Angiogenese-Inhibitoren zu Angiogenese-Stimulatoren sein, der sogenannte „*angiogenic switch*“. So können die Endothelzellen in Richtung Tumor und von diesem freigesetzten angiogenetischen Faktoren migrieren, um so letztlich die Vaskularisierung und Blutversorgung des Tumors zu gewährleisten. Nur durch die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung und den Abtransport von Stoffwechselprodukten kann der Tumor weiter expandieren und auch die Möglichkeit erhalten, über den Blutkreislauf Metastasen auszubilden wie in Abbildung 2 dargestellt (Folkman 1985, 1986; Folkman und Hanahan, 1996).

Tumorgefäße unterscheiden sich von physiologisch gebildeten Kapillaren. Die Permeabilität ist erhöht (Öffnungen in den Gefäßwänden, verstärkte

Fenestrierung), die Basalmembran bleibt unvollständig ausgebildet, die Proliferationsrate ist erhöht und der Durchmesser ist ungleichmäßig.

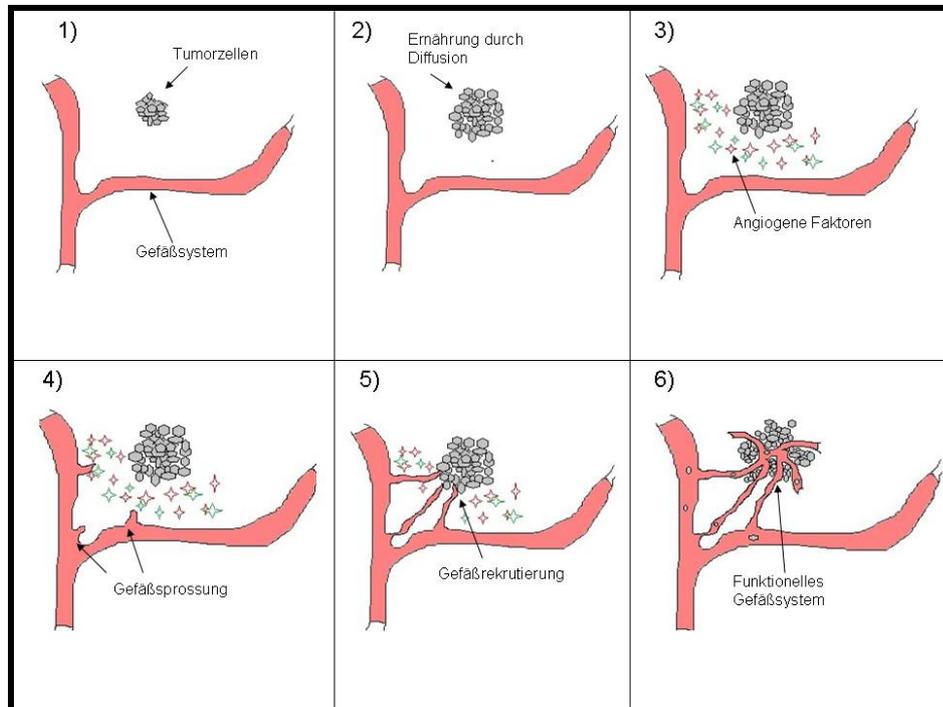


Abbildung 2: **Tumorangiose**

1. und 2. Avaskuläres Tumorstadium, Ernährung durch Diffusion. 3. Aktivierung und Freisetzung von Angiogenefaktoren durch den malignen Tumor. 4. Proteolytischer Abbau der Basalmembran. Migration und Proliferation von Endothelzellen in Richtung der angiogenen Signale. 5. Bildung von Gefäßsprossen. 6. Aufbau eines funktionellen Gefäßsystems im Tumorgewebe mit Metastasierung des Tumors.

1.3 Angiogenefaktoren

Eine Vielzahl von Faktoren, die angiogen und antiangiogen wirken sind bisher entdeckt worden. Vaskuläre Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTKs) spielen eine herausragende Rolle in der Vaskulogenese und angiogenen Prozessen, sowohl im gesunden, als auch besonders in pathologischem Gewebe. In den letzten Jahren haben sich die in Tabelle 2 zusammenfassend aufgelisteten Systeme als besonders bedeutend herausgestellt.

	Rezeptor	Ligand	Wesentliche Aufgabe
1.	VEGFR1 und VEGFR2	VEGF-A	Stimulation der Vaskulo- und Angiogenese; Steigerung der Permeabilität; Leukozytenadhäsion
2.	Tie2	Angiopoietin-1	Gefäßstabilisierung und Ruhezustand; Hemmung der Permeabilität
3.	Eph A und B	Ephrin A und B	Arteriovenöse Differenzierung

Tabelle 2: Angiogenesefaktoren

1.3.1 VEGF

1.3.1.1 Geschichte und Übersicht

Vascular endothelial growth factor A (VEGFA), bekannt als VEGF und/oder vaskulärer Permeabilitätsfaktor, gehört zu einer Ligandenfamilie, zu der unter anderem PLGF (*Placental growth factor*), VEGFB, VEGFC und VEGFD gehören. Im Folgenden wird nur VEGFA behandelt, da dieser einer der Hauptregulatoren von Angiogenese ist. Unter anderem unterliegt VEGFA in Hirntumoren einer gesteigerten Expression und scheint hier mehrere wichtige Rollen hinsichtlich der Regulierung der Tumorangiogenese und Entstehung des tumorassoziierten Ödems zu spielen.

1983 entdeckten Senger *et al.* ein Protein, welches durch Injektion in die Haut von Meerschweinchen die Gefäßpermeabilität erhöhte (Senger *et al.*, 1983). Bezeichnet wurde dieser neue Faktor aufgrund seiner spezifischen Regulation der Permeabilität von Tumorblutgefäßen als Vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF). 1989 fanden Ferrara *et al.* ein Endothelzell-spezifisches Mitogen, welches sie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Vasculotropin nannten (Ferrara und Henzel, 1989). Die Klonierung und Expression von VEGF, VPF und Vasculotropin zeigte, dass es sich um ein und das-

selbe Protein handelte. Ein hoch konserviertes, durch Disulfidbrücken verbundenes, dimeres Glykoprotein der Größe 35 bis 45 kD.

1.3.1.2 VEGF Wirkung

Vielfach *in vitro* nachgewiesen ist die Eigenschaft von VEGF Endothelzellwachstum in Arterien, Venen und Lymphgefäßen zu stimulieren (Ferrara & Davis-Smyth, 1997). Auch in verschiedenen *in vivo* Modellen stimuliert VEGF eine starke angiogene Antwort, ebenso das Lymphgefäßwachstum in Mäusen (Leung *et al.*, 1998; Nagy *et al.*, 2002).

VEGF ist ein „*survival factor*“ für Endothelzellen und hemmt Apoptosevorgänge (Gerber *et al.*, 2002).

Benjamin *et al.* (1999) und Yuan *et al.* (1996) wiesen eine VEGF Wirkung in neugeformten Gefäßen bei Tumorwachstum nach.

Weiterhin ist VEGF als ein Faktor für vaskuläre Permeabilität bekannt, der die Durchlässigkeit der Gefäße erhöht und somit wohl eine wichtige Rolle bei inflammatorischem Geschehen und bei der Entstehung des Hirnödems bei Tumoren spielt (Senger *et al.*, 1983; Dvorak *et al.*, 1995).

1.3.1.3 Regulation der VEGF Expression

Der Sauerstoffpartialdruck spielt eine wesentliche Rolle bei der Expression verschiedener Gene. VEGF mRNA Expression steigt bei niedrigem O₂ Partialdruck des Gewebes, eine wesentlicher Regulator dieses Geschehens scheint der *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1 zu sein (Dor *et al.*, 2001; Semenza, 2002).

Verschiedene Wachstumsfaktoren wie EGF (*epidermal growth factor*), TGF- α , TGF- β , *insulin-like growth factor-1* und verschiedene inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 α und Interleukin-6 steigern die VEGF mRNA Expression, was zu der Annahme passt, dass VEGF eine wesentliche Rolle bei

Angiogenese und inflammatorischem Geschehen spielt (Ferrara und Davis-Smyth, 1997).

1.3.1.4 Der VEGF Rezeptor

Zuerst entdeckt wurden VEGF Rezeptoren auf Endothelzelloberflächen *in vitro* und *in vivo*. VEGF bindet an zwei Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (KDR oder Flk-1), welche beide Co-Rezeptoren, die Neuropiline, besitzen.

VEGFA bindet sowohl VEGFR-1, als auch VEGFR-2. Mehrere Arbeiten deuten darauf hin, dass die Aufgabe des VEGFR1 hauptsächlich darin liegt, die Wirkung von VEGFA an VEGFR2 negativ zu regulieren und kein primäres mitogenes, angiogenetisches Signal weiterzuleiten (Park *et al.*, 1994).

Eine Hauptrolle des VEGFR2 bei der Vaskulogenese und Hämatopoese wurde in VEGFR2 Knockout Mäusen gezeigt, die nicht überlebensfähig waren (Shalaby *et al.*, 1995). Heutzutage besteht die übereinstimmende Meinung, dass VEGFR2 der Hauptmediator für die mitogenen, angiogenen, anti-apoptotischen und permeabilitätssteigernden Wirkungen auf Endothelzellen nach Bindung von VEGFA ist. Diese Effekte werden vermittelt durch Rezeptordimerisation und ligandenabhängige Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen in Endothelzellen, wie C- γ , PI-3 Kinase, Ras und der Src-Familie (Guo *et al.*, 1995).

1.3.1.5 VEGF und physiologische Angiogenese

1996 wiesen Carmeliet und Ferrara eine wesentliche Rolle von VEGF in embryonaler Vaskulogenese und Angiogenese nach. Das Fehlen eines einzelnen VEGF Allels führte zum Absterben des Embryos zwischen Tag 11 und 12. Es waren eine Reihe von Entwicklungsstörungen nachzuweisen, wie defekte Organvaskularisierung und verminderte Anzahl an roten Blutzellen.

Weiterhin scheint VEGF eine wesentlich Rolle in der Entwicklung der Nieren, beim Knochenwachstum und bei der Angiogenese im Ovar zu spielen (Kitamoto *et al.*, 1987; Gerber *et al.*, 1997; Goede *et al.*, 1998).

1.3.1.6 Rolle des VEGF bei soliden Tumoren und Hirnödemen

In situ Hybridisierungsversuche zeigten, dass VEGF mRNA in verschiedensten humanen Tumoren hochreguliert ist (Reviews von Ferrara *et al.*, 1997; Dvorak *et al.*, 1995).

1993 konnten Kim *et al.* zeigen, dass VEGF Antikörper eine starke Inhibition des Tumorwachstums verschiedener Tumorzelllinien in Nacktmäusen verursachen.

Außerdem bewiesen Studien, dass eine Anti-VEGF Behandlung kombiniert mit Chemo- oder Strahlentherapie bei verschiedenen Tumoren der Einzelbehandlung deutlich überlegen ist (Klement *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000).

Van Bruggen *et al.* postulierten 1999 einen Zusammenhang zwischen der Entstehung eines Hirnödems bei ischämischem Geschehen und VEGF. In einem Mausmodell für kortikale Ischämie konnten sie nach Anti-VEGF Behandlung eine signifikante Verringerung des Ödems in Folge der Ischämie und in der gemessenen Infarktgröße Wochen nach der induzierten Ischämie messen. Diese VEGF-abhängige Steigerung der Gefäßpermeabilität soll durch Proteine der Src-Familie vermittelt werden (Eliceiri *et al.*, 1999).

Verschieden Befunde legen somit eine erhebliche Rolle von VEGF in der Steuerung der Tumorangiogenese, dem Tumorwachstum und der Ausbildung eines tumorinduzierten Hirnödems nah.

1.3.2 Angiopoietin1 und Tie2

1.3.2.1 Geschichte und Übersicht

Während VEGFA und VEGFR2 in der frühen Phase der Angiogenese, sowohl embryonal als auch im erwachsenen Organismus, eine wesentliche Rolle spielen, sind andere Faktoren in der späten Phase involviert. Diese beinhaltet die Formierung der Endothelzellen zu einem Lumen, Stabilisierung des Gefäßes und Herausbildung eines hierarchischen Netzwerkes von Gefäßen. Ein System, welches hierbei eine Rolle zu spielen scheint, ist das Angiopoietin1/Tie2 Rezeptor System.

1.3.2.2 Rezeptor und Ligand

Tie Rezeptoren sind endothelspezifische RTKs, zuerst identifiziert 1992 in verschiedenen Endothellinien und Leukämiezellen Tie1 (tie) (Partanen *et al.* 1992), der zweite Rezeptor Tie2 (tek) wurde 1992 von Dumont *et al.* im Herzgewebe beschrieben.

1996 beschrieben Davis *et al.* den ersten Liganden, der Tie2, aber nicht Tie1, bindet, und dessen Phosphorylierung verursacht, das Angiopoietin-1. Im Gegensatz zu VEGF induziert Ang1 *in vitro* keine direkte Endothelzellproliferation. Ang1 wird in der frühen Entwicklung im Myokard, in perivaskulären Zellen in der Entwicklung und später im erwachsenen Gewebe gebildet (Davis *et al.*, 1996).

Ein Ligand für Tie1 ist bis heute nicht beschrieben, verschiedene Hinweise deuten auf eine Tie2 und Tie1 Interaktion hin. Bis heute wurden noch weitere Angiopoietine beschrieben, die an Tie2 binden, Ang2, Ang3, Ang4 von Maisonpierre *et al.* 1997 und Valenzuela *et al.* 1999. Diese haben zum Teil gegensätzliche Aufgaben, nicht alle führen zu einer Rezeptorphosphorylierung. Ang2 wird als Ang1 Antagonist beschrieben (Maisonpierre *et al.*, 1997). Holash *et al.* schreiben Ang2 eine Rolle in der Gefäßremodellierung zu.

1.3.2.3 Aufgaben des Ang1/Tie2 Systems:

Wesentliche Information über die Funktion des Tie2 Rezeptors gewann man aus der Deletion des Tie2 Gens in Mäusen (Dumont *et al.*, 1994 und Sato *et al.*, 1995). Das Fehlen von Tie2 führte zum Absterben des Embryos um den 10.5 Tag herum mit nachgewiesenem Herzversagen, Hämorrhagien und Gefäßdefekten. Sowohl das Herz, als auch die Gefäße bildeten sich normal, aber das Herz zeigte eine fehlende, bzw. falsche Trabekulierung und Vaskularisierung (Dumont *et al.*, 1994 und Sato *et al.*, 1995). Die initiale Phase der Angiogenese und Blutgefäßformierung, inklusive Gefäßsprossung, zeigte keine Auffälligkeiten, aber sowohl eine Remodellierung der Gefäße im Embryo war nicht möglich, als auch die Herausbildung hierarchischer Netzwerke. Dumont *et al.* schlugen des Weiteren noch eine Rolle von Tie2 als Überlebensfaktor für Endothelzellen im Rahmen der Herz- und Blutgefäßentwicklung vor.

Vergleicht man Tie2 defiziente Mäuse mit VEGFR2 defizienten Mäusen zeigt sich die wesentliche Rolle des VEGF Rezeptors in der ganz frühen Gefäßentwicklung. VEGFR2 defiziente Embryos sterben früher, zwischen Tag 8.5 und 9.5 (Shalaby *et al.*, 1995) und zeigen sowohl ein fast komplettes Fehlen der Blutinseln, als auch der Vaskulogenese und Angiogenese.

Angiopoietin-1 defiziente Mäuse zeigen ein ähnliches Bild, wie Tie2 defiziente Mäuse. Die Embryonen sterben um den Tag 12.5 mit Herzdefekten und gestörter Gefäßentwicklung (Suri *et al.*, 1996). Die Herzen zeigten eine gestörte Trabekulisierung der Ventrikel und ein vermindertes Anhaften des Endokards an der darunterliegende Matrix. Hinzu kam ein schwach ausgeprägtes Netzwerk der Gefäße, mit wenig komplexen Gefäßbäumen und verminderter hierarchischer Ordnung. Weiterhin zeigten Ang1 defiziente Mäuse Endothelzellen, die vermindert mit der Basalmembran und perivaskulären Zellen interagieren.

Zudem scheint Angiopoietin-1 eine antiinflammatorische Rolle zu spielen, indem es das Endothel in ein „Ruhe-Stadium“ versetzt. Verschiedenen Stu-

dien zufolge wirkt Ang1 „gefäßabdichtend“ (Thurston *et al.*, 2000), antiinflammatorisch (Jeon *et al.*, 2003), und schützt vor kardialer Allotransplantat-Vaskulopathie (Nykanen *et al.*, 2003), sowie Sepsis (Witzbichler *et al.*, 2005) und strahlenbedingtem Endothelzellschaden (Kwak *et al.*, 2000).

Zusammenfassend kann man also postulieren, dass Ang1 ein ruhendes, antiinflammatorisches Stadium der Endothelzellen hervorruft.

Wiederum zeigt der Vergleich von Ang1 defizienten Mäusen mit VEGF defizienten Mäusen, die wesentliche Rolle des VEGF in der Vaskulogenese. Das Fehlen eines einzelnen VEGF Allels führt zum Absterben des Embryos um den Tag 11.5, wieder mit schweren Defekten bei der Blutinselbildung und Gefäßformierung.

Weitere wesentliche Aspekte des Angiopoietin-1 wurden durch Überexpressionsversuche gewonnen. Suri *et al.* konnten 1998 zeigen, dass eine Angiopoietin-1 Überexpression in der Haut zu einer deutlichen Rötung derselben führte. Die Gefäße zeigten eine deutliche Erweiterung ihres Durchmessers, während die Anzahl der Gefäße im Vergleich mit der Kontrolle gleich blieb. Weiterhin zeigten die Gefäße eine erhöhte Anzahl an Endothelzellen, was auf eine Überlebensfaktorrolle des Ang1 hindeutet, und einen Perizytenmantel, wie Venulen ihn haben (Thurston *et al.*, 1999).

Dies sind weitere Hinweise darauf, dass Angiopoietin eine wesentliche Rolle in der Gefäßremodellierung spielt. Mäuse mit einer VEGF Überexpression hingegen zeigten eine Zunahme der Gefäßanzahl, was wiederum ein Hinweis ist für die wesentliche Rolle von VEGF bei der Neuentstehung von Gefäßen (Thurston *et al.*, 1999).

Zusammenfassung VEGF und Ang1/Tie2:

Zusammenfassend lässt sich postulieren, dass VEGF eine wesentliche Rolle in der Frühphase der Gefäßentwicklung spielt in Hinsicht auf die Initiierung neuen Gefäßwachstums und der Gefäßaussprossung und dass Angiopoietin-

1 eine wesentliche Rolle bei der Gefäßremodellierung, Reifung und Endothelzellüberleben zukommt.

1.3.3 Eph und Ephrine

Die Eph Rezeptoren und ihre dazugehörigen Ephrin Liganden sind das dritte RTK System der Gefäße. Neben vielen verschiedenen Aufgaben, besonders in der neuronalen Entwicklung, steuern Eph/Ephrine die Entwicklung von Gewebegrenzen oder das Richtungswachstum neuer Gefäßsprossen, was wesentlich für die Anordnung der Arterien und Venen und einen funktionierenden Blutfluss ist. Somit sind Eph und Ephrine wesentliche Regulatoren von Zell-Zell Interaktionen, vermittelt durch abstoßende und adhäsive Signale.

1.3.3.1 Geschichte und Überblick

Zuerst beschrieben wurden 1987 die Eph Rezeptoren, zufällig entdeckt bei einem cDNA Datenbank Screening nach homologen Sequenzen der Tyrosin Kinase Domäne des viralen Onkogens v-fps. Der Name leitet sich ab aus der *Erythropoetin-produzierenden-humanen-hepatozellulären-Karzinom* Zelllinie, aus der der Nachweis stammt (Hirai *et al.*, 1987).

Die dazugehörigen Liganden wurden Ephrine getauft, aus der Abkürzung "*Eph family receptor interacting proteins*"

Das Eph/Ephrin System gehört mit 13 Mitgliedern zu größten Subfamilie der humanen RTKs.

1.3.3.2 Aufbau und Funktion

Sowohl die Eph Rezeptoren, als auch die Ephrine sind in jeweils zwei Subklassen unterteilt, A und B, in Abhängigkeit von ihrer Affinität zueinander und ihrer genetischen Konservierung (Gale *et al.*, 1996).

EphA1 bis EphA9 und dazugehörig die EphrineA1 bis A6.

EphB1 bis EphB6 und dazugehörig die EphrineB1 bis B3.

A Rezeptoren binden normalerweise A Liganden und B Rezeptoren die B Liganden, mit der Ausnahme von EphA4, welcher auch EphrinB2 und EphrinB3 binden kann.

Die Eph Rezeptoren sind Typ I Transmembranproteine (Schlessinger, 2000). Extrazellulär enthält der Rezeptor eine hochkonservierte N-terminale Domäne, zuständig für Ligandenerkennung und Bindung. Direkt angrenzend folgt eine Cystein-reiche Domäne, die eine Rolle bei der Rezeptoroligomerisation zu spielen scheint (Boyd *et al.*, 2000). Die beiden folgenden Fibronectin Domänen spielen eine bisher nicht geklärte Rolle.

Auf der zytoplasmatischen Seite folgt auf eine Juxtamembran-Domäne eine hochkonservierten Kinase-Domäne, die sowohl eine Autophosphorylierung, als auch eine Proteinphosphorylierung an Tyrosinresten durchführen kann. Am C-terminalen Ende folgt noch eine SAM-Domäne (Steriles- α -Motiv) und eine PDZ-Bindemotiv für Interaktion mit Signalproteinen. Die Aufgabe der SAM-Domäne ist bisher nicht weiter bekannt.

Allen Ephrinen gemeinsamen ist die hochkonservierte extrazelluläre Rezeptorerkennungsregion. Während die EphrinA Liganden über einen GPI-Anker (Glycosylphosphatidylinositol) mit der Zellmembran verbunden sind, besitzen die EphrinB Liganden eine Transmembran-Domäne, gefolgt von einer kurzen zytoplasmatischen Domäne und einem PDZ-Bindemotiv, dessen Aufgabe im „*reverse-signalling*“ liegt (Holland *et al.*, 1996; Bruckner *et al.*, 1997; Cowan *et al.*, 2001).

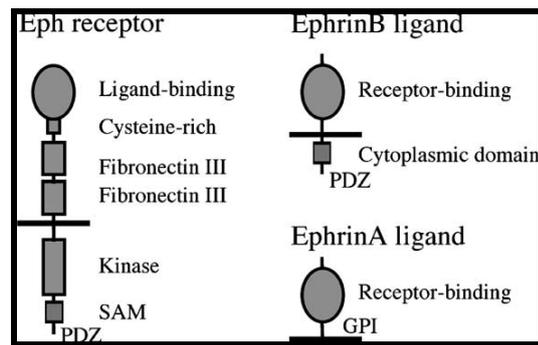


Abbildung 3 aus Himanen *et al.*, 2003: **Molekulares Schema des Eph/Ephrin Systems**

Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus des Eph Rezeptors und der Ephrin Liganden. SAM: Steriles- α -Motiv; PDZ: PDZ- Bindemotiv; GPI: Glycosylphosphatidylinositol Anker.

Eph und Ephrin Interaktion beinhaltet zwei Besonderheiten unter den RTKs. Zum Einen müssen sich, da sowohl Rezeptor, als auch Ligand membrangebunden sind, die beiden interagierenden Zellen zur Signalgebung im direkten Zell-Zell Kontakt befinden und zum Anderen besitzen die Ephrin Liganden, neben der normalen vorwärtsgerichteten Signalgebung über Aktivierung der Rezeptoren die Möglichkeit, auch „rückwärts“ über das PDZ- Bindemotiv in die eigene Zelle zu signalisieren, das sogenannte „*reverse signalling*“ (Holland *et al.*, 1996; Bruckner *et al.*, 1997; Cowan *et al.*, 2001).

Die Rezeptor-Liganden Interaktion ist ein komplexes Geschehen. Himanen *et al.* konnten 2001 die Kristallstruktur des Komplexes nachweisen, in der jeweils zwei Rezeptor Moleküle an zwei Liganden binden, eine Multimerisierung hervorrufen und somit ein zirkuläres Heterotetramer bilden. Eine aufwendige Interaktion untereinander ist die Grundlage für die verschiedenen Affinitäten zueinander und die Einteilung in die A und B Familie.

Der Mechanismus für die bi-direktionale Signalgebung verläuft folgendermaßen:

Gebündelte, aber untereinander ungebundene Ephrine bilden Ephrin-Ephrin Homodimere. Bei Zell-Zell Kontakt binden die Eph-Rezeptoren in einem 1:1 Verhältnis (Toth *et al.*, 2001), woraus ein fixierter heterogener, tetramerer Komplex im Verhältnis 2:2 entsteht. Die Eph-Rezeptor Tyrosinkinasedomä-

nen können sich nun gegenseitig phosphorylieren, woraus die Aktivierung des Rezeptors und die Möglichkeit zur Bindung von Adapterproteinen resultiert (Kalo *et al.*, 1999). Weiterhin befinden sich durch diese Konformation nun auch die zytoplasmatischen Ephrin Domänen in einer räumlichen Lage, in der sie die Möglichkeit haben, selber signalgebend zu werden.

Höchstwahrscheinlich erfolgt dieser, als „*reverse signalling*“ bezeichnete, Vorgang sowohl mittels Phosphorylierung als auch durch die PDZ-Domäne (Himanen *et al.*, 2001; Palmer *et al.*, 2002).

1.3.3.3 Funktionsgrundlage der Eph und Ephrine

Eph und Ephrinen sind bis heute vielfältige Funktionen nachgewiesen worden. Unter anderem die Regulierung von Zellmigration, z.B. in der Neuralleiste, zielgerichtetem Wachstum von Axonen, z.B. in der Sehstrahlung, die Segmentierung des Embryos oder die Herausbildung von Gewebegrenzen, z.B. in der Entwicklung des Rhombencephalons, höchstwahrscheinlich vermittelt durch Beeinflussung des Zytoskeletts und sich untereinander abstoßenden Zell-Zell Interaktion. In der Angiogenese spielt das Eph/Ephrin System ebenso eine Rolle, wie auch bei Tumorwachstum und Metastasierung.

Ein klassisches Beispiel für die Funktionsweise des Eph und Ephrin Systems ist das zielgerichtete Wachstum von Axonen, wie bei der Entstehung der retino-tectalen Topographie, also die Anordnung der retinalen Axone in den Colliculi superiores des Mittelhirns. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass temporal gelegene retinale Axone, die eine große Menge EphA3 exprimierten, zum anterioren Tectum wuchsen, wo die Expression der Liganden EphrinA2 und EphrinA5 niedrig waren. Auf der anderen Seite wuchsen Axone mit niedriger EphA3 Expressierung zu mehr posterior gelegenen Stellen, an denen die Ephrin Expressierung hoch war. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Ausschaltung der Ephrine eine gestörte Topographie zur Folge hatte, so wuchsen die Axone in diesem Falle über

das ihnen bestimmte Areal hinaus (Drescher *et al.*, 1995; Ciossek *et al.*, 1998; Feldheim *et al.*, 2000).

Dies zeigt beispielhaft eine wesentliche Funktion des Eph und Ephrin Systems, die Festlegung der Migrationsrichtung von Axonen und deren Endigung an einem bestimmten Punkt, terminiert durch Vermittlung abstoßender und adhäsiver Zell-Zell Interaktionen. Ähnliche Beobachtungen wurden in verschiedenen Arbeiten bei der Entwicklung des kortikospinalen Traktes oder des Corpus Callosum gemacht.

1.3.3.4 Vaskulogenese und Angiogenese durch EphB4 und EphrinB2

Vaskulogenese beschreibt den Prozess der Differenzierung von mesoderma- len Vorläuferzellen zu Endothelzellen und Gefäßen, während Angiogenese der Prozess der Gefäßneubildung aus zuvor bestehenden ist. Vaskulogenese findet in der embryonalen Entwicklung statt und führt zu der Formation eines ersten Gefäßplexus, während die Angiogenese zur hierarchischen Remodellierung und Reifung dieses Plexus führt. Eph und Ephrine spielen in beiden Vorgängen eine Rolle.

Die Bedeutung für die Vaskulogenese konnte in Mäusen gezeigt werden, die Null-Mutationen für entweder EphB4 (Gerety *et al.*, 1999) oder für EphrinB2 (Wang *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 1999) trugen. Diese Embryos starben um den Tag 10 mit schweren Störungen der vaskulären Remodellierung, unfähig ein strukturiertes, kapilläres Netzwerk auszubilden. Ein weiterer wesentlicher Aspekt wurde in diesen Studien deutlich. So wurde EphrinB2 hauptsächlich auf dem primordialen Endothel der Arterien ausgebildet, wohingegen EphB4 auf der venösen Seite exprimiert wurde. Naheliegend ist es daher eine Rolle von EphrinB2 und EphB4 in der Differenzierung der arteriellen von der venösen Gefäßseite zu postulieren.

Adams *et al.* konnten 2001 zeigen, dass eine Entfernung der zytoplasmatischen Domäne des EphrinB2 den Phänotyp der EphrinB2 Null Mutation kopiert, was auf eine wesentlich Bedeutung des EphrinB2 „*reverse signalling*“ hindeutet.

Auf Grund der fehlenden Überlebensfähigkeit von Embryonen ohne funktionelles EphrinB2 oder EphB4, ist eine Analyse dieser Moleküle in der postnatalen Periode und später äußerst schwierig. Offen ist die Frage, ob die spezifische Verteilung auf arterieller und venöser Seite, wie im Embryo beschrieben, auch im Erwachsenenalter so bestehen bleibt. Ergebnisse hierzu stammen von Shin *et al.*, 2001 und Gale *et al.*, 2001, die das EphrinB2 Gen durch lacZ in heterozygoten Mäusen ersetzten und dieses immunhistochemisch nachwiesen. Sie zeigten, dass die Verteilung von EphrinB2 auf Arterien und EphB4 auf Venen auch im Erwachsenenalter bestehen bleibt. Im Menschen werden EphrinB2 und EphB2 auf arteriellem Endothel exprimiert und EphB4 sowohl auf arteriellem, als auch venösem Endothel (Diehl *et al.*, 2005).

Weiter konnten Gale *et al.* 2001 zeigen, dass EphrinB2 auch auf Kapillarendothel bis zum Umschlagpunkt von terminaler Arteriole auf postkapilläre Venule exprimiert wird. Das deutet darauf hin, dass auch das Kapillarbett eine arterielle und eine venöse Seite aufweist, was gegen die bisherige Ansicht spricht, Kapillaren hätten weder einen venösen, noch einen arteriellen Charakter.

Außerdem wurde gezeigt, dass EphrinB2 im Erwachsenen auch bei Neovaskularisationsvorgängen eine Rolle spielt. So zeigten Gefäßsprossen unter anderem in der Vaskularisierung des Corpus luteum oder eines Muskeltumors eine EphrinB2 Expressierung, was darauf hindeutet, dass der Ursprung der neuen Gefäße eher auf der arteriellen Seite liegt, was entgegen der herrschenden Meinung ist, dass dieser Vorgang seinen Ursprung in postkapillären Venulen hat. Ebenso ist dies ein Hinweis darauf, dass EphrinB2 in physiologischen und aber auch in pathophysiologischen angiogenetischen Prozessen im Erwachsenen eine Rolle spielt.

Eine weitere Rolle im Zusammenhang mit Angiogenese spielt das Eph/Ephrin System bei Endothelzell-Mesenchym Interaktion. Es konnte gezeigt werden, dass auch mesenchymale Zellen, angeordnet um Gefäße, zumindest im Embryo unter anderem EphrinB2 exprimieren (Adams *et al.*, 1999). Da mesenchymale Zellen auch angiogenetische Faktoren, wie VEGF oder Angiopoietin-1, produzieren, ist eine Interaktion des Eph/Ephrin Systems mit diesen anderen beiden Systemen naheliegend. Hinweisend sind Versuche, die zumindest *in vitro*, zeigten, dass Tie-2 die zytoplasmatische Domäne von EphrinB2 phosphorylieren kann.

1.3.3.5 Eph/Ephrine und Tumorangiogenese

Obwohl der wesentliche Beitrag der Eph und Ephrine zu der embryonalen Vaskulogenese als gesichert angesehen werden kann, ist die Lage bei der physiologischen, als auch der pathologischen Angiogenese *in vivo* noch zu großen Teilen unklar.

Einige Experimente zeigten *in vitro*, dass die Ephs und Ephrine aber an wesentlichen Schritten der Angiogenese, wie der Gefäßsprossung beteiligt sind. Füller *et al.* zeigten 2003, dass EphB4 und EphrinB2 Interaktion durch abstoßende und vorantreibende Signale gelenkte Endothelzellmigration und invasive Angiogenese beeinflussen. EphB4 Aktivierung auf Endothelzellen führte demnach zu anti-adhäsiven, anti-migratorischen und anti-angiogenen Signalen, während EphrinB2 Aktivierung pro-adhäsiv, endothelzellmigrationsstimulierend und gefäßsprossungsinduzierend wirkte. Sie schlugen demnach ein Modell für Angiogenese vor, wie es schon für die neuronale Entwicklung beschrieben wurde. Eph und Ephrin Interaktionen steuern so die Richtung der Endothelzellmigration während der invasiven Angiogenese durch abstoßende und anziehende Signale. EphrinB2 exprimierende Endothelzellen zeigen einen propulsiven und invasiven Phänotyp, der mit angiogenen Eigenschaften korreliert.

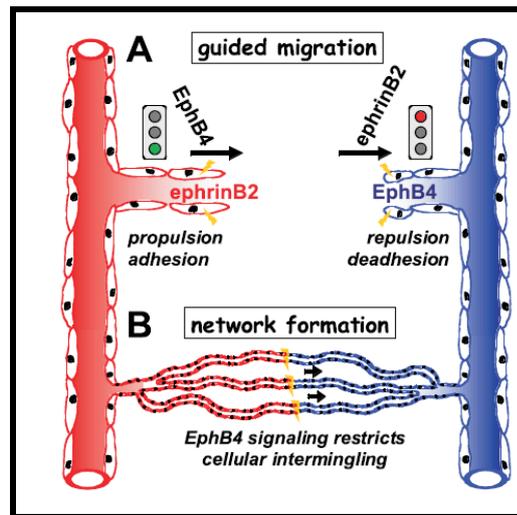


Abbildung 4 aus Füller *et al.*, 2003: **EphrinB2 und EphB4 Interaktion:**

Von Füller *et al.* vorgeschlagenes Modell der EphrinB2 EphB4 Interaktion bei gelenkter Gefäßmigration und Kapillarnetzwerkformation:

EphB4 exprimierende ECs werden in ihrer Migration durch EphB4 Rezeptoraktivierung umliegender Zellen gehemmt, indem Gebiete mit EphrinB2- Liganden ihnen ein repulsives Signal vermitteln. (A, Stop Signal)

Das Gegenteil, die Förderung der Endothelzellmigration geschieht, wenn umgekehrt EphrinB2 exprimierende ECs durch EphB4 aktiviert werden. (A, Start Signal)

Hinzu kommt, dass diese Effekte arteriell und venös differenzierte ECs voneinander trennen und eine arterio-venöses Positionieren der Gefäße fördern. (B, Netzwerkformation)

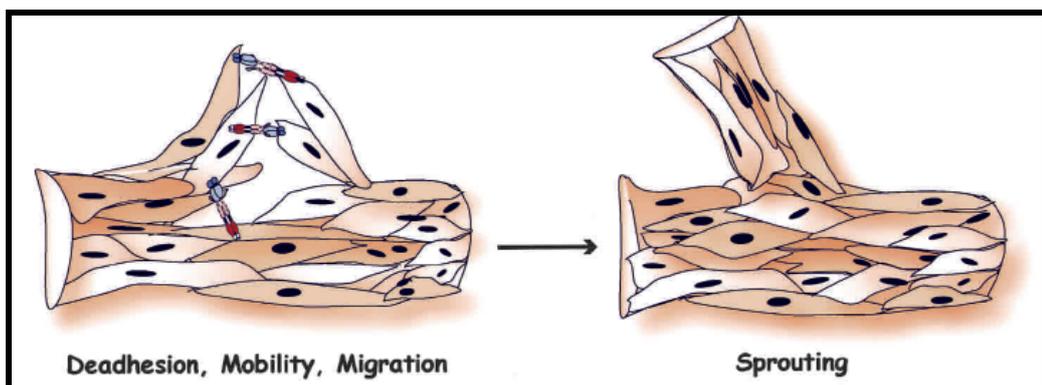


Abbildung 5 aus Palmer und Klein, 2003: **Eph/Ephrin Signalfunktionen während der Angiogenese:**

Ephrine, exprimiert auf Endothelzellen, interagieren mit Eph Rezeptoren auf angrenzenden ECs. Abstoßungskräfte führen zu Deadhäsion, Mobilität und Migration der einzelnen Endothelzellen, was zu einer Auflösung des bestehenden Endothelgeflechts führt und in einem Aussprossen neuer Gefäße und deren Neuformation aus vorbestehenden resultiert.

Neben EphrinB2 und EphB4 zeigten Studien eine besondere Rolle für EphA2 und EphrinA1. EphA2 wird ausschließlich im Zusammenhang mit Neovaskularisation exprimiert und somit weder im Embryo, noch in „nicht-aktivem“ Gefäßendothel. Ogawa *et al.* zeigten 2000, dass sowohl EphA2, als auch EphrinA1 auf Endothelzellen und menschlichen Tumorzellen exprimiert wird. Bestätigt wurde dies durch Brantley *et al.* 2002, die auch den ersten funktionellen Nachweis, mit Hilfe eines löslichen EphA2 Rezeptor, für EphA Rezeptoren in pathologischer Angiogenese brachten. Demnach wird EphrinA1 hauptsächlich auf Tumorzellen exprimiert und EphA2 hauptsächlich auf den Tumorgefäßen. EphrinA1 induziert und lenkt so über direkte Interaktion mit EphA2 neu einsprossende Gefäße in den Tumor. Löslicher EphA2 Rezeptor hemmte sowohl Tumorangiogenese, als auch Tumorwachstum, höchstwahrscheinlich durch eine EphrinA1 Blockierung (Brantley *et al.*, 2002).

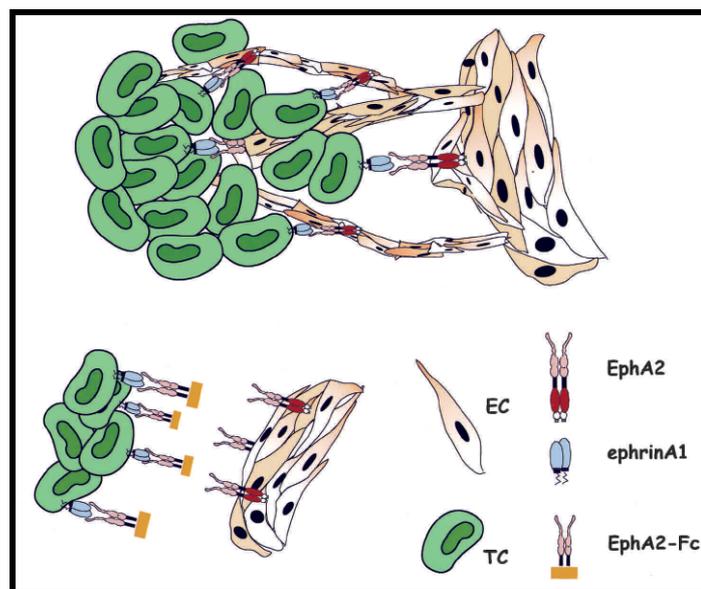


Abbildung 6 aus Palmer und Klein, 2003: **Modell der EphA2/EphrinA1 Interaktion bei pathologischer Angiogenese:**

EphrinA1 wird hauptsächlich auf Tumorzellen exprimiert (TC), EphA2 hauptsächlich auf den Gefäßen. EphrinA1 könnte die Gefäßsprossung induzieren und die einwachsenden Gefäße, die EphA2 exprimieren, durch direkte Rezeptor-Liganden Interaktion lenken. Löslicher EphA2-Fc hemmt die Tumorangiogenese und das Tumorwachstum in vivo höchstwahrscheinlich

lich durch eine Blockierung des EphrinA2 auf den Tumorzellen durch eine Störung der Interaktion mit den Gefäßen.

Ähnliche Ergebnisse konnten zwei weitere Arbeitsgruppen für EphB4 und EphrinB2 zeigen (Martiny-Baron *et al.*, 2004; Kertesz *et al.*, 2006). Martiny-Baron *et al.* untersuchten den Einfluss eines löslichen EphB4 (sEphB4) Rezeptors auf Tumorwachstum und Tumorangiogenese. Sie zeigten, dass sEphB4 durch eine EphrinB2 Blockierung die Angiogenese durch Aussprossung *in vitro* hemmt und sowohl das Wachstum, als auch die Gefäßdichte in einem Tumormodell *in vivo* deutlich gesenkt wird. Weiterhin zeigen sie, dass auch die Interaktion der Tumorzellen untereinander gestört wird, diese zeigten verminderte Zell-Zell Adhäsionen. Kertesz *et al.* konnten dies in ähnlichen Versuchen bestätigen.

1.3.3.6 Eph/Ephrine und Tumoren

Unterschiedliche Eph und Ephrine sind in verschiedenen Tumorenentitäten exprimiert und hochreguliert, besonders in den aggressiven Tumorstadien. EphA1 war das erste Mitglied der Eph-Familie, welches aus einer humanen Erythropoietin produzierenden hepatozellulären Karzinomzelllinie kloniert wurde, es war mehr als zehnfach überexprimiert (Hirai *et al.*, 1987). Dies lieferte den ersten Hinweis einer Verwicklung des Eph/Ephrin Systems in die Tumorphysiologie. Nach und nach folgten weitere verschieden Arten von Tumoren in denen verschiedenste Eph oder Ephrine exprimiert werden oder dysreguliert auftreten.

Häufig beschrieben ist die Hochregulation von EphA2 in verschiedensten Karzinomerkrankungen des Menschen wie kolorektalen Karzinomen (Kataoka *et al.*, 2004), ovariellen Karzinomen (Thaker *et al.*, 2004), Prostatakarzinomen (Walker-Daniels *et al.*, 1999), Melanomen (Easty *et al.*, 1995) oder auch eine fünffache Hochregulation in Glioblastomen (Wykosky *et al.*, 2005;). Die hohen EphA2 Level scheinen mit dem Tumorstadium und der Progression positiv zu korrelieren (Ogawa *et al.*, 2000; Walker-Daniels *et al.*, 2003).

Einer Arbeitsgruppe (Zelinski *et al.*, 2000) zu Folge, ist eine starke EphA2 Überexpression, und damit einhergehend eine deutlich gestörte Ligandeninteraktion, in Epithelzellen der Brust ausreichend, eine maligne Transformation herbeizuführen und tumorigen zu wirken. Normale EphA2 Aktivierung bei normaler EphA2 Expression hingegen senkte die Invasivität und das Wachstum.

Höchstwahrscheinlich geschieht dies nicht durch Beeinflussung der Proliferation, sondern durch Beeinflussung des invasiven Verhaltens der Zellen. Maligne Zellen mit hoher EphA2 Expression zeigen ein gestörtes Ligandenbindungsverhalten und daraus folgend eine erhöhte Adhäsion an die Extrazellulärmatrix und ein gesteigertes metastatisches Potential. EphA2 Aktivierung führt über Zwischenschritte zu einer Inhibierung der integrinvermittelten Zelladhäsion, Zellmigration und –mobilität (Miao *et al.*, 2000). Diese Aktivierung scheint bei einer EphA2 Überexpression gestört zu sein, woraus eine erhöhte Bereitschaft zur Invasivität und eine erhöhte Beweglichkeit der Zellen erfolgt.

Integrine sind Zelloberflächenrezeptoren, die mit der extrazellulären Matrix interagieren und zwischen dieser und dem Aktinskelett der Zelle vermitteln. Sie beeinflussen Zelladhäsion, Migration, Überleben und Differenzierung und somit die Zellbeweglichkeit und das Invasionsverhalten (Hynes, 1992)

Ebenfalls für diese Art der Beeinflussung des Tumorwachstums sprechen weitere Arbeiten mit Inhibierungsversuchen der EphA2 Aktivierung, was zu verminderter Zelladhäsion, verminderter Tumorigenese und vermindertem Tumorwachstum und –metastasierung führte (Brantley *et al.*, 2002; Carles-Kinch *et al.*, 2002).

Weitere Arbeiten zeigen aber auch widersprüchliche Rollen des Eph und Ephrin Systems, besonders gilt das für das EphB/EphrinB System, zu dem deutlich weniger bekannt ist, als zum EphA/EphrinA System. So ist EphB2 in gastrointestinalen und Leberkarzinomen hochreguliert (Lugli *et al.*, 2005).

Überraschenderweise beschreiben jedoch verschiedene neuere Arbeiten EphB4 als Tumorsuppressor bei Brustkrebs (Noren *et al.*, 2006) und EphB2 oder EphB3 als Tumorsuppressor bei kolorektalem Karzinom (Battle *et al.*, 2005; Cortina *et al.*, 2007), der erst von den Tumorzellen ausgeschaltet werden muss, damit ein invasiver Phänotyp ausgeprägt werden kann.

Nakada *et al.* (2004) konnten wiederum zeigen, dass EphB2 in migrierenden Glioblastomzellen überexprimiert wird und die Migration, sowie die Invasion, durch EphB2 Phosphorylierung und damit Aktivierung gefördert und durch EphB2 Blockierung gehemmt wird.

1.4 Ziele der Arbeit

Die hochgradigen Astrozytome, besonders das Glioblastoma multiforme, gehören zu den extrem invasiven und stark vaskularisierten Hirntumoren. Das Glioblastom ist der Hirntumor mit der höchsten Prävalenz und gleichzeitig der tödlichste mit einer medianen Überlebensrate um die 12 Monate. Trotz der bisherigen Standardbehandlung, bestehend aus chirurgischer Resektion und nachfolgender Strahlen- und/oder Chemotherapie, hat sich diese Überlebensrate in den letzten 30 Jahren nur wenig verbessert. Es ist also offensichtlich, dass zwingend ein tieferes Verständnis der Pathophysiologie von malignen Hirntumoren benötigt wird, um daraus folgend neue und erfolgversprechendere Therapiestrategien zu entwickeln.

Wie von Judah Folkman 1971 im New England Journal of Medicine erstmals postuliert ist die Gefäßversorgung ein wesentlicher und beschränkender Mechanismus für Tumorwachstum und Entwicklung.

Somit scheint besonders die Erforschung der Gefäßversorgung ein wesentlicher Ansatz zu sein, neue Behandlungsstrategien der Tumorbehandlung zu liefern, aber auch grundlegende Einsichten zu Eigenheiten der Hirntumoren

zu bekommen, so über welche Mechanismen das stark invasive Wachstumsverhalten oder die Ödembildung gesteuert werden.

Das Ziel der Arbeit war es, die Rolle des EphrinB2 Liganden in diesem Zusammenhang aufzuarbeiten, fehlt doch besonders zu der Eph und Ephrin B Familie grundlegendes Wissen betreffend dessen Rolle bei Hirntumoren.

Aus diesem Grunde hat unsere Arbeitsgruppe unter der Leitung von Professor Till Acker *in vivo* Experimente durchgeführt, bei denen in ein Xenograftmodell hochgradige Astrozytomzellen transplantiert wurden und der EphrinB2 Ligand, durch kompletten Knockout in den Tumorzellen, sowohl einmal auf der Tumorseite gänzlich fehlte, als auch auf der Organismuseite, durch einen funktionellen Knockout im Organismus, in seiner Funktion gestört war. Diese Versuche wurden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe A. Acker-Palmer (Institut für Zellbiologie und Neurowissenschaft, Goethe-Universität Frankfurt) durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Materialien in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Färbewanne		VWR International (Darmstadt)
Kamera Gefäß Bestim- mungen	Nikon DS-U1 Color Camera	Nikon
Kamera Volumen Be- stimmung	Hitachi HV-C20A	Hitachi
Mikroskop Gefäß Best- immungen	Nikon Eclipse 80 I	Nikon
Mikroskop Volumen Be- stimmung	Zeiss Axiophot	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Perfusionspumpe	BVP Zahnradpumpe	Ismatec
pH- Meter	Typ 632	Metrohm (Herisau / Schweiz)
Schlittenmikrotom	Histoslide 2000	Reichert&Jung
Semi-automatisches Stereologisches System zur Volumen Bestim- mung	Stereo Investigator 4.34	MicroBrightField Inc., Williston,VT, USA
Software Gefäß Best- immungen	NIS-Elements AR	Nikon
Sterilfilter (0,22 und 0,44 µm Porengröße)		Millipore (Schwalbach)
Stereotakt	Stereotactic Frame	KopflIndustries

Material und Methoden

Wasserkocher	Multi Gourmet	Braun
Zahnbohrer	MicroDrill	FST

Tabelle 3: Geräte

Material	Bezeichnung	Hersteller
Bepanthen Augensalbe		Roche
Buprenorphin	Temgesic (0,05mg/ml)	Essex Pharma
Butterfly blau		B.Braun
Eppendorfcubes		Eppendorf (Hamburg)
Falcon- Röhrchen (15ml, 50ml)		Falcon (Heidelberg)
Hamilton Nadel	Nicht-konisch 33G	Hamilton, USA
Hamilton Spritze	2,5µl	Hamilton, USA
Handschuhe		Hartmann (Heidenheim)
Heizkissen	61-0121-3	Avena (Bad Kreuznach)
Insulin Spritze		BD Microlance
Ketanest	Ketavet (100mg/ml)	Pfizer
Magnetrührer	REC- G	Kika Labortechnik (Staufen)
Nadelhalter	BM201R	Aesculap (Tuttlingen)
Objektträger	Superfrost® Plus	Sarstedt (Nürnbrecht)
Pasteurpipetten		Sarstedt (Nürnbrecht)
Pinzetten (chirurgisch, anatomisch)	BD533R, BD023R	Aesculap (Tuttlingen)
Pipette		
Pipettenspitzen 0,1- 10µl; 1- 20 µl; 1- 100 µl; 1- 200 µl, 101- 1000 µl		Starlab (Ahrensburg)
Präparierschere (gebo-	BC772R	Aesculap (Tuttlingen)

gen)		
Prolene 4-0 Faden		Ethicon GmbH (Norderstedt)
Skalpell Typ 10		Feather
Xylazin	Rompun 2%	Bayer

Tabelle 4: Materialien

2.1.2 Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge

Chemikalie		Hersteller
30% H ₂ O ₂		B. Braun (Melsungen)
Aqua dest.		B. Braun (Melsungen)
DAB (Diaminobenzidine), DAB-Chromogen		Dako (Hamburg)
EDTA		Carl Roth (Karlsruhe)
Eosin 0,5%		Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol (EtOH) 70%, 95%, 100%		Apotheke des Klinikums der J.W. Goethe Uni- versität (Frankfurt a. M.)
Ethylenglykol		Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerin		Carl-Roth
Hämalaun nach Mayer		Apotheke des Klinikums der J.W. Goethe Uni- versität (Frankfurt a. M.)
KCl		Merck (Darmstadt)
NaCl		Merck (Darmstadt)
NaCl 0,9%		B. Braun (Melsungen)
NaH ₂ PO ₄		B. Braun (Melsungen)
Na ₂ HPO ₄		B. Braun (Melsungen)
NGS (Normal Goat Se-		Sigma (Karlsruhe)

rum)		
Paraformaldehyd (PFA)		
Rinderserumalbumin (BSA)		Sigma (Taufkirchen)
D(+)-Saccharose (D-Sucrose)		Carl Roth (Karlsruhe)
Tissue-Tek O.C.T. Com- pound		Sakura Finetek Europe
Trishydroxymethyl- ami- nomethan (Tris)		AppliChem (Darmstadt)
Triton X-100		Sigma (Karlsruhe)
Trockeneis		Apotheke des Klinikums der J.W. Goethe Uni- versität (Frankfurt a. M.)
Tween 20		AppliChem (Darmstadt)
Xylol		J.T. Baker (Griesheim)

Tabelle 5: Chemikalien

2.1.3 Lösungen und Puffer

Zur Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen wurde, falls nicht anders vermerkt, Reinstwasser (Aqua bidest.) verwendet, das von der Anlage Milli-Q Biocel A10 (Millipore, Eschborn) bezogen wurde. Hitzestabile Lösungen wurden zur Sterilisation autoklaviert.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
30% H ₂ O ₂ /PBS	
4% PFA	80g Paraformaldehyd ad 1,5 l H ₂ O bei 60C ⁰ lösen mit NaOH auf pH 11 einstellen 100ml 20xPBS mit HCl auf pH 7,4 einstellen ad 2l H ₂ O
CO ₂ unabhängiges Medium	Hersteller: Gibco #18045
Cryo Protection Solution (CPS)	500 ml 0,1M PB pH 7,4 250 ml Ethylenglykol 250 ml Glycerin
PB 0,5M pH 7,4	15,87 g NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O 103,19 g Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O 1l aqua dest. pH 7,4
PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Succrose Lösung	30% Succrose in 0,1M PB
Tris-EDTA pH 8.0	1,21 g Trise-Base (10mM) 0,37 g EDTA (1mM) 1000 ml aqua dest. pH 8,0 0,5 ml Tween 20 (0,05%)

Tabelle 6: Lösungen und Puffer

2.1.4 Antikörper

Bezeichnung	Klon	Hersteller/Bezugsquelle
Biotinylated-Lycopersicon Esculentum (Tomato) Lectin		Vector Laboratories B1175
Goat-Anti-Rat Peroxidase Conjugated IgG	Pab	Rockland Immunochemicals 712-1333
Rat mAB to CD34	MEC 14.7	Abcam ab8158-100

Tabelle 7: Antikörper

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Übersicht Gruppeneinteilung

Da die Einflüsse des Eph/Ephrin Systems zum einen im Tumor und zum anderen im Organismus per se untersucht werden sollen, gibt es zwei Versuchsreihen, jeweils unterteilt in eine Kontrollgruppe und eine Interventionsgruppe.

Versuchsreihe EphrinB2 Funktion Tumorseite:

Anzahl =n Versuchstiere	Bezeichnung der Gruppe	Genetischer Hintergrund Maus	Implantierte Zellen	Implantierte Menge der Zellen
11	WT (Wildtype)	NMRI nu/nu	Maus Astrozytom GFP aus C57Bl/6 Mäusen	Implantation von $1 \cdot 10^5$ Zellen
10	EphrinB2-KO („Cre“)	NMRI nu/nu	Maus Astrozytom Ephrin B2 Knockout (cre) aus C57Bl/6 Mäusen	Implantation von $1 \cdot 10^5$ Ephrin B2 KO Zellen

Tabelle 8: Versuchstiere und Gruppeneinteilung EphrinB2 Funktion Tumorseite

Versuchsreihe EphrinB2 Funktion Endothelseite:

Anzahl =n Versuchstiere	Bezeichnung der Gruppe	Genetischer Hintergrund Maus	Implantierte Zellen	Implantierte Menge der Zellen
11	WT (Wildtype)	CD1	Maus Astrozytom aus CD1 Mäusen	Implantation von $5 \cdot 10^4$ Zellen
7	ephrinB2 $\Delta V/\Delta V$ (deltaValin)	CD1	Maus Astrozytom aus CD1 Mäusen	Implantation von $5 \cdot 10^4$ Zellen in Ephrin B2 deltaValin Mäuse

Tabelle 9: Versuchstiere und Gruppeneinteilung EphrinB2 Funktion Endothelseite

Die Mäuse sind folgender Herkunft: CD1 (*Charles River Laboratories*, Sulzfeld, Germany).

Die Mäuse sind folgender Herkunft: C57Bl6 (*Charles River Laboratories*, Sulzfeld, Germany).

Die Mäuse sind folgender Herkunft: NMRI nu/nu (*Charles River Laboratories*, Sulzfeld, Germany).

2.2.2 Herstellung der EphrinB2 ^{$\Delta V/\Delta V$} Mäuse

(Vorarbeit der Arbeitsgruppe)

Die Herstellung der Mäuse erfolgte wie von Mäkinen *et al.* 2005 beschrieben. Diesen Mäusen fehlt das C-terminale Valin des PDZ-Motivs der zytoplasmatischen Seite des EphrinB2 Liganden, womit dieser in seiner reverse-

signalling Funktion gestört ist, nicht aber in der normalen antegraden Signalweiterleitung. Erreicht wurde dieses durch Herstellung von mutierter cDNA und durch das Ersetzen des endogenen EphrinB2 Genlokus mit ebendieser durch homologe Rekombination embryonaler Stammzellen. Normale Lebensfähigkeit zeigten Mäuse mit CD-1 Hintergrund.

2.2.3 Herkunft und Herstellung der implantierten Tumorzellen

(Vorarbeit der Arbeitsgruppe)

Zu Beginn erfolgte die Isolation der Astrozyten aus 1-5 Tage alten C57Bl/6 Mäusen. Nach Eröffnung der Meningen wurden die Hemisphären bei 37C° für 30 min. in Trypsin (# Invitrogen 25200-056) lysiert. Nach Entfernung des Trypsins erfolgte eine dreimalige Waschung in Basal Medium Eagle (BME; Invitrogen) mit 10% Pferde Serum, 1% Streptomycin/Penicillin, 1% Natriumpyruvat, 0,6% Glucose und 0,1% Mito-Serum Extender (Becton Dickinson). Um eine Einzelzelllösung zu erhalten wurden die Hemisphären zwanzig Mal durch eine Pasteur Pipette (1/3 Durchmesser) gesaugt. Nach der Zentrifugation (5 min. bei 79xg) wurde das Zellpellet der beiden Hemisphären resuspendiert und in einer 75cm² NUNC EasY Zellkulturflasche mit 12ml BME in einem 5% CO₂ Inkubator in Kultur genommen. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt und die Zellen wurden bis zum einem 80-100% Zusammenschluss (4-8 Tage) wachsen gelassen. Um die Astrozyten aufzureinigen wurde die Zellkulturflasche zwei Tage bei 37C° und 250 rpm auf einem horizontalen Schüttelbrett belassen. Nach dem zweiten und dem dritten Tage wurde das Medium gewechselt, um den Überstand zu entfernen.

Die Reinheit der so isolierten Astrozyten wurde per Immunfluoreszenz für GFAP validiert.

Die Zellimmortalisierung erfolgte durch Co-Elektroporation (AMAXA) von zwei Plasmiden, von denen eines Träger des Large-T Antigen und das Ande-

re Träger des Resistenz Genes zur Selektion mit G418 (pEYFP-N1 neo) in einem 3:1 Verhältnis. Drei Tage nach der Transfektion, wurde die Selektion mit Genticin (150µg/ml) durchgeführt. Nach 1 bis 3 Wochen, wurden die immortalisierten Kolonien in einem nicht selektiven Medium in Kultur genommen.

In einem letzten Schritt erfolgte die Transformation zu hochgradigen Astrozytomzellen durch das Onkogen H-Ras V12 durch den retroviralen Vektor pBabe puro H-Ras V12. Zur Herstellung des nicht replikationsfähigen Virus, wurde die Hilfszelllinie Phoenix A mit dem obigen Vektor in 10 cm Petrischalen transfiziert. Nach 12 Stunden wurde die Transfektionsmischung durch 4 ml frisches Medium ersetzt. Der Zellkultur Überstand wurde nach weiteren 24 Stunden abgeerntet. Nach der Filtration (0,2 µm Porengröße, niedrige Proteinbindung) wurde entweder direkt infiziert oder der Virus eingefroren bei -80°C. Ein 40-60% konfluierendes 25cm² Flakon mit immortalisierten Astrozyten wurde mit 2ml des Virus enthaltenden Überstandes plus 2,5 ml BME und 5 µl Polybren infiziert. Nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Die Selektion mit 2µg/ml Puromycin erfolgte nach weiteren 2-4 Tagen. Nach Erscheinen der Astrozytomkolonien (1-2 Wochen) wurden diese konzentriert und erneut in nicht-selektivem Medium in Kultur genommen.

SV40 Large T und V12-H-ras Oncogen

V12H-ras wurde hier gewählt, weil die Aktivierung des p21-ras Signalweges nachgewiesenerweise im Zusammenhang steht mit der Astrozytomproliferation als auch mit der Angiogenese (Feldkamp *et al.*,1999; Guha *et al.*,1997). Mausstämme, die V12-H-ras unter einem GFAP Promotor exprimieren, entwickeln hochgradige Astrozytome (Ding *et al.*, 2001). Ebenso bindet und inaktiviert SV40 Large T Antigen die beiden Tumorsuppressoren p53 und Rb, welche beide im Rahmen der Astrozytomprogression verloren gehen. Weiterhin entwickeln transgene Mäuse, die die Rb-bindende Form des Large T

Antigens in Astrozyten exprimieren, hochgradige Astrozytome (Xiao *et al.*, 2002).

2.2.3.1 Herstellung der EphrinB2 Knockout Zellen

Die Astrozytomzellen aus EphrinB2 lox/lox Mäusen wurden zur Herstellung der Knockout Zellen mit adenoviraler cre-Rekombinase behandelt. Hierfür wurde ein 60-70% konfluierendes 75cm² Flakon mit 8ml Medium mit 1*10⁷ PFU (Plaque forming unit) des Adenovirus Ad-Cre-GFP für den Knockout oder Ad-GFP (Vector Biolabs) für den Wildtype infiziert. Das Medium wurde nach 12 Stunden gewechselt.

Um eine zu 99% reine Knockout Zelllinie zu erhalten wurden alle GFP positiven Zellen mittels FACS sortiert.

2.2.4 Tierhaltung

Bei einer Raumtemperatur von 22- 24°C werden bis zu 4 Tiere während der Zeit der Versuchsvorbereitung in einem Plexiglaskäfig mit Trockenstreu und freiem Zugang zum Trinkwasser und Trockenfutter gehalten. Die Tierversuche fanden in den Räumlichkeiten der Zentralen Forschungseinrichtung des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt statt.

2.2.5 Vorbereitung der Zellen für die Transplantation

Präparation der adhärenenten Zellkultur

Zuerst erfolgt eine Waschung in PBS, danach für 5 min. eine Behandlung mit Trypsin zum Lösen der Zellen. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen/min erfolgt die Resuspension der Zellen in CO₂ unabhängiges Medium und die Zählung der benötigten Zellen. In jeweils ein Tube

werden $5 \cdot 10^6$ Zellen in 100 μl CO_2 unabhängiges Medium gegeben, die Transplantation erfolgt mit je nach benötigter Zellzahl bei einem Injektionsvolumen von 2 μl . Die Lagerung der Zellen bis zur Transplantation erfolgt auf Eis.

2.2.6 Narkose und Tumorimplantation

Zur Analgesie erhalten die Tiere 10 min. vor Beginn der Anästhesie 50 μl Temgesic- Lösung/20g Körpergewicht (1 Ampulle in 15 ml 0,9%NaCl). Zur Anästhesie und Muskelrelaxierung erhalten die Tiere 150 μl /20g Körpergewicht der Anästhesie Lösung (2ml Ketavet und 0,5 ml Rompun auf 9ml 0,9%NaCl) intraperitoneal.

Die Tiere werden auf dem Heizkissen platziert und im Stereotaxen über den Maulhalter fixiert. Die Zunge des Tieres hängt heraus, die Augen werden mit Bepanthen Creme feucht gehalten.

Der Skalp wird mit dem Skalpell längs eröffnet, die Schädeldecke mit einem Q-Tip und 5% H_2O_2 gesäubert und das Bregma sowie die Sutura sagitalis aufgesucht. Ein Bohrloch mit einem Zahnbohrer, Durchmesser 0,7mm, wird nach festlegen und fixieren der Koordinaten angefertigt. Die Koordinaten sind 2mm links der Sutura sagitalis und 0,5 mm anterior des Bregma. Die Zellen werden mit einer 2,5 μl Hamilton Spritze und einer nicht-konischen 33G Nadel in einer Tiefe von 3,5 μm ab Dura implantiert. Die Zellen sind in einem CO_2 unabhängiges Medium suspendiert. Je nach Versuch beträgt die Anzahl der Zellen $1 \cdot 10^5$ auf 2 μl oder $4 \cdot 10^5$ auf 1 μl Medium. Das Einführen der Nadel geschieht in 60 Sekunden, danach erfolgt die langsame Einbringung der Zellen, zur Vermeidung eines Rücklaufens eine 60 Sek. Haltezeit und danach das Herausziehen der Nadel in weiteren 60 Sek.

Nach der Implantation erfolgt der Verschluss des Skalp mit 2-3 Einzelknopfnähten mit einem 4-0 Prolene Faden und Abwarten bis zum Aufwachen des Versuchstieres.

2.2.7 Perfusion der Tiere und Präparation der Gehirne

Zur Analgesie erhalten die Tiere 10 min. vor Beginn der Anästhesie 50µl Temgesic- Lösung/20g Körpergewicht (1 Ampulle in 15 ml 0,9%NaCl). Zur Anästhesie und Muskelrelaxierung erhalten die Tiere 150µl/20g Körpergewicht der Anästhesielösung (2ml Ketavet und 0,5 ml Rompun auf 9ml 0,9%NaCl) intraperitoneal.

Nach Anästhesie und 30 min. vor der Perfusion erhalten alle Mäuse eine Injektion Pimonidazol (Hypoxyprome-1) 60µg/g in 0,9% NaCl intraperitoneal und eine Injektion Biotinylated-Lycopersicon Esculentum (Tomato) Lectin 100 µg retrobulbär 5 min. vorher.

Anschließend erfolgt die Fixierung der Tiere in Rückenlage auf einer Styroporplatte. Der Brustkorb wird direkt unterhalb der Rippen quer eröffnet und das Herz dargestellt. Es erfolgt die Kanülierung der linken Herzkammer, sowie die sofortige Eröffnung der rechten Herzkammer, und die Perfusion des Tieres mit 0,9% NaCl für 4 min. und folgend die Perfusion mit 4% PFA für weitere 5 min. über die Perfusionspumpe.

Nun erfolgt die Abtrennung des Kopfes sowie die Freipräparation des Gehirnes in toto.

Zur Entwässerung erfolgt die Lagerung des Hirnes für 4 Tage in Succrose-Lösung, danach erfolgt die Umlagerung in 4% PFA zur Aufbewahrung im 4°C Kühlschrank.

2.2.8 Gewebeaufbereitung für histologische und immunhistochemische Färbung

Mit dem Schlittenmikrotom Histo Slide 2000 (Reichert&Jung) werden die Hirne zur histologischen und immunhistochemischen Färbung geschnitten. Zunächst werden die Hirne mit dem Occipitalpol auf dem, per Trockeneis, gefrorenen Blockträger unter Zuhilfenahme von Tissue Tek® aufgefroren. Dann werden nacheinander je 10 Schnitte von 40 µm Dicke und je 4 Schnitte von 20 µm Dicke geschnitten und in aufeinanderfolgende 1,5 ml Eppendorf Tubes gelegt. Dies hat zur Folge, dass in jedem Tube, je nach Größe des Gehirns, 7-10 Schnitte mit 480 µm Abstand zueinander liegen (jeder 12te Schnitt). Die Tubes sind zur Konservierung mit Cryo Protection Solution (s.o.) gefüllt. Es erfolgt die Lagerung der Schnitte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C.

2.2.9 Darstellung der Tumormorphologie mit der Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE)

Zur Darstellung der Tumormorphologie und der späteren Quantifizierung des Tumorumlumens wird eine Hämatoxylin- Eosin Färbung verwandt. Hierfür wird eine komplette Schnittfolge mit einer Dicke von 40µm genommen.

Kern-Plasma Färbung

Für die HE-Färbung werden die Objektträger 10 min. in Hämalaun nach Mayer getränkt und anschließend einige Sekunden in Aqua dest. getaucht. Nun werden die Schnitte für 1 min. beziehungsweise bis zu einem sichtbaren Farbumschlag der Schnitte in Ammoniumwasser (0,5ml Ammoniak in 200ml Aqua dest.) gebläut. Danach werden die Schnitte 3 min. in 1%igem Eosin (1%iges Eosin in 70% Ethanol reinst gelöst; 1 Tropfen Eisessig pro 100ml Eosin) inkubiert und im Anschluss nochmals für einige Sekunden in Aqua

dest. eingetaucht. Ein längeres Verweilen im Wasserbad mindert die Farbin-
tensität oder führt zu einer Entfärbung der Schnitte. Es folgt das Schema der
aufsteigenden Alkoholreihe wie folgt:

Reihenfolge	Substanz	Verweildauer
1	70% Ethanol	30 Sek. Bis 1 Min.
2	96% Ethanol	2x 30 Sek. Bis 1 Min.
3	100% Ethanol	2x 5 Min.
4	Xylol	2x 3 Min.

Tabelle 10 : Alkoholreihe der HE-Färbung

Eindecken der Schnitte

Mit Entellan® Einschlussmittel werden die gefärbten Schnitte eingedeckt.
Hierfür müssen die Objektträger aus dem Xylol-Bad entnommen, mit zwei
Tropfen Entellan® versehen und einem Deckglas bedeckt werden. Eventuel-
le Luftblasen sollten beseitigt werden. Zur Entfernung von überschüssigem
Einschlussmittel sollte ein kurzes Schwenken in Xylol erfolgen. Nach dem
Trocknen der Schnitte können sie ausgewertet werden.

2.2.10 Stereologische Quantifizierung des Tumorumfanges und der Tu- morsatelliten

Bestimmung des Tumorumfanges

Die Bestimmung des Tumorumfanges erfolgte mit dem semi-automatischen
stereologischen System Stereo Investigator 4.34 (MicroBrightField Inc.,
Williston, VT, USA) und einem Zeiss Axiophot Mikroskop (Carl Zeiss, Jena,
Deutschland), welches mit einer Hitachi HV-C20A Kamera (Hitachi) ausge-
rüstet ist.

Es erfolgt bei 5facher Vergrößerung die komplette Umfahrung des, sich in der HE-Färbung deutlich darstellenden, Tumorgebietes auf jedem 12ten (auf das Gesamthirn bezogenen) Schnitt. Je nach Größe des Tumors sind dies zwischen 3 und 8 Messungen. Die Ausgabe erfolgt als Tumorfläche in μm^2 .

Zur Bestimmung des Tumolvolumens erfolgt folgende Berechnung: die Fläche des Tumors in μm^2 der einzelnen Schnitte wird addiert zu einer Gesamtfläche, diese wird multipliziert mit der Dicke des Schnittes ($40\mu\text{m}$) und nochmals multipliziert mit 12, da nur jeder 12te Schnitt des gesamten Hirnes aufgezo- gen ist. Das ergibt das angenäherte Volumen des Tumors in μm^3 . Dieses wird umgerechnet in mm^3 .

Bestimmung der Satellitenanzahl

Die Bestimmung der Anzahl der Satelliten erfolgt mit dem gleichen oben genannten System. Jeweils die 3 Schnitte eines Hirnes, die den Hauptteil des Tumors enthalten, werden ausgewertet. Es erfolgt die Auszählung aller Tumoranteile im gesamten Schnitt, die nicht mit dem Haupttumor an der Transplantationsstelle zusammenhängen. Dies erfolgt nur in der EphrinB2-KO und deren Kontrollgruppe. Aus der Anzahl der Satelliten der drei verschiedenen Schnitte eines Tumors wird der Mittelwert pro Tumor errechnet.

2.2.11 Immunhistochemische Darstellung der perfusionierten Gefäße

Biotinyliertes – Lektin aus der Tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Lektine sind komplexe Proteine oder Glykoproteine, die spezifische Kohlenhydratstrukturen binden und dadurch in der Lage sind, sich spezifisch an Zellen bzw. Zellmembranen zu binden und von dort aus biochemische Reaktionen auszulösen. Sie haben keine enzymatische Aktivität. Lektine sind ubiquitär, man findet sie bei Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen.

Lektine aus der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) sind ein effektiver Marker für Blutgefäße in Nagetieren. Dieses Lektin besteht aus einem einzelnen Polypeptid, welches N-Acetylglukosamin Oligomere bindet.

Das Lektin wurde 5 min. vor der Perfusion der Versuchstiere retrobulbär appliziert (s.o.) und hat sich somit allen perfusionierten Hirngefäßen angelagert.

Die „Avidin-Biotinylated Enzyme Complex“(ABC) Methode

Zur Darstellung der markierten Gefäße erfolgt eine immunhistochemische Färbung mit dem Vectastain® Elite ABC Kit (s.u.). Avidin ist ein 68.000 Dalton schweres Glykoprotein mit vier Bindungsstellen extrem hoher Affinität zu Biotin. Die ABC Methode beruht auf einer Komplexbildung aus dem biotinylierten Primärantikörper und einem weiteren Komplex aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase (ABC-Reagenz). (Hsu *et al.*, 1981) Der Peroxidase wird Wasserstoffperoxid als Substrat angeboten. Die freiwerdenden Protonen oxidieren das vorher fast farblose Chromogen zu seinem farbigen Endprodukt unter Bildung von Wasser. Das Chromogen in diesem Falle ist DAB (3,3'-Diaminobenzidin), welches eine bräunliche Färbung hervorruft.

Protokoll der Färbung

Gefärbt wird jeder 12te Schnitt eines Hirns.

Der Beginn erfolgt nach dem free-floating Verfahren in 6-well Zellkulturschalen. Zuerst werden die Schnitte in PBS gewaschen. Es folgt die Blockierung der endogenen Peroxidase mit 0,6% H_2O_2 für 30 min. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS werden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und für 3 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur Antigendemaskierung werden die Schnitte in TRIS-EDTA pH 8.0 gekocht. Erst wird der Puffer 20 min. aufgekocht, dann die Schnitte für 10 min. und es folgt eine 20 minütige Abkühlung bei Raumtemperatur.

Nach einer weiteren Waschung erfolgt die Blockierung durch 20% Normal Goat Serum (NGS) und 0,01% Triton gelöst in PBS für 1 Stunde. Nun erfolgt die Zugabe des ABC-Reagenz (s.o.) für eine weitere Stunde. Nach einer weiteren Waschung in PBS erfolgt die Zugabe des Chromogens DAB für 4 min. und ein letzter Waschschrift wiederum in PBS.

Gegenfärbung mit Hämalau:

Es folgt die Kernfärbung in Hämalau (1:5 verdünnt in Aqua dest.) für 8 min. Die Bläuung erfolgt unter fließendem Leitungswasser, danach erfolgt die oben beschriebene Alkoholreihe zur Entwässerung der Schnitte und die Eindeckung mit Xylol.

Name	Substanz	Hersteller
Vectastain® Elite ABC Kit	Vectastain Elite ABC-Reagent	Vector Laboratories, Inc.
	DAB- Chromogen	

Tabelle 11: Zusammensetzung des verwendeten Kits für die Lectin - Färbung

2.2.12 Immunhistochemische Darstellung aller Gefäße

Das CD34 Antigen

Das CD34-Antigen ist ein membranständiges Protein mit einem Molekulargewicht von 116 kD. Es findet sich sowohl auf Endothelzellen, als auch auf unreifen hämatopoetischen Stammzellen. Unter anderem wird dieses Antigen genutzt, um hämatopoetische Stammzellen aus dem peripheren Blut für eine Stammzelltransplantation anzureichern. Der in diesem Fall genutzte Antikörper reagiert mit einem neuraminidasesensitiven Epitop auf Endothelien, besonders in kleinen Gefäßen, neu ausgeprägten Kapillaren und sich entwickelnden Gefäßstrukturen.

Das “CSA II Biotin-free Tryramide Signal Amplification System”

In diesem Fall erfolgt die immunhistochemische Färbung nicht mit dem oben genannten ABC System, sondern mit dem CSA (Catalyzed Signal Amplification System) der Firma DAKO®. Der Primärantikörper ist gegen CD34 gerichtet, zur Darstellung der Gefäße. Der Sekundärantikörper ist Peroxidase gekoppelt. Diese Peroxidase oxidiert ein Fluorescein gekoppeltes Phenol (Fluorescyl-Tyramide), welches sich anlagert („Amplification reagent“). Dieses gebundene Fluorescein wird nun mit einem weiteren, Peroxidase gekoppelten, Fluorescein spezifischen Antikörper detektiert (Toda *et al.*, 1991). Die letztendliche Färbung erfolgt mit DAB.

Der Vorteil dieses Systems ist die extrem hohe Sensitivität durch Verstärkung der Färbung mit Hilfe des Fluoresceins, welches die Menge an Molekülen für den Drittantikörper erhöht. Des Weiteren enthält das System kein Biotin, was den Hintergrund so niedrig wie möglich hält.

Protokoll der Färbung

Gefärbt wird jeder 12te Schnitt eines Hirnes.

Der Beginn erfolgt nach dem free-floating Verfahren in 6-well Zellkulturschalen. Zuerst werden die Schnitte in PBS gewaschen. Es folgt die Blockierung der endogenen Peroxidase mit 0,6% H₂O₂ für 30 min. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS werden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und für 3 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur Antigendemaskierung werden die Schnitte in TRIS-EDTA pH 8.0 gekocht. Erst wird der Puffer 20 min. aufgeköcht, dann die Schnitte für 10 min. und es folgt eine 20 minütige Abkühlung bei Raumtemperatur.

Nach einer weiteren Waschung erfolgt eine doppelte Blockierung erst durch 5% Rinderserumalbumin (BSA) und 0,01% Triton gelöst in PBS für eine Stunde, dann durch 20% Normal Goat Serum (NGS) und 0,01% Triton gelöst in PBS für 1,5 Stunden.

Es folgt die Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4°C. Dieser ist, bei einer Verdünnung von 1:100, gelöst in 10% NGS/0,01%Triton/PBS.

An Tag 2 wird nach einem Waschschrift mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Bei Raumtemperatur, einer Verdünnung von 1:100, gelöst in 10% NGS/0,01%Triton/PBS, für 1 Stunde. Nach einer weiteren Waschung erfolgt die Zugabe des „Amplification reagent“ für 15 min. Dieser Schritt muss im Dunkeln erfolgen. Wieder wird in PBS gewaschen und es folgt der Anti-Fluorescein Antikörper für 1 Stunde. Nach einem letzten Waschschrift erfolgt die Färbung mit DAB .

Gegenfärbung mit Hämalaun:

Es folgt die Kernfärbung in Hämalaun (1:5 verdünnt in Aqua dest.) für 8 min. Die Bläuung erfolgt unter fließendem Leitungswasser, danach folgt die oben beschriebene weitere Verarbeitung in der Alkoholreihe zur Entwässerung der Schnitte und die Eindeckung mit Xylol.

Name	Substanz	Hersteller
CSA II Biotin-free TyramideSignal Amplification System	Amplification reagent	DakoCytomation, Inc.
	Anti-Fluorescein-HRP	
	DAB- Chromogen	

Tabelle 12: Zusammensetzung des verwendeten Kits für die CD34 - Färbung

2.2.13 Quantifizierung der Gefäßfläche

Die Aufnahmen zur Analyse der immunhistochemischen Färbungen werden alle mit dem Mikroskop Nikon Eclipse 80 I in 20x Vergrößerung gemacht. Die Fotos werden mit der Kamera Nikon DS-U1 Color Camera aufgenommen. Die Auswertung erfolgt mit der Software NIS-Elements AR von Nikon. Alle Analysen werden doppelblind durchgeführt. Sowohl die Bestimmung der Flä-

che, als auch Anzahl, der Gefäße wird für die Färbung mit Lektin und CD34 exakt gleich durchgeführt.

Quantifizierung der Gefäßfläche

Es werden von jedem Tumor bis zu zehn einzelne Bilder gemacht, die ausschließlich Tumorgewebe beinhalten (aus diesem Grunde je nach Tumorgroße teilweise weniger Bilder). Im Folgenden werden mit Hilfe eines farblichen Schwellenwertes (Treshold) alle Gefäße auf Grund ihrer immunhistochemischen Färbung markiert. Fehlmarkierungen auf Grund farblicher Schwankungen werden manuell entfernt. Zusammenhängende Gefäße, die nicht als solche markiert wurden, werden manuell zusammengeführt.

Die Ausgabe erfolgt in einer Excel Tabelle als Fläche der markierten Gefäße in Pixeln. Jedes Bild besitzt eine Gesamtfläche von 1228800 Pixeln. Die Größe der einzelnen Gefäße wird angegeben in Prozent dieser Gesamtfläche. Aus den Einzelbildern des jeweiligen Tumors wird der Mittelwert gebildet als Angabe der Gesamtgefäßfläche.

2.2.14 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse wird der Student's T-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Die Berechnung erfolgt mit WinStat® für Microsoft Excel®. Ein p-Wert von $<0,05$ wird als signifikant (*), ein p-Wert von $<0,01$ als hochsignifikant betrachtet (**). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Stichprobenmittelwertes (SEM) angegeben.

3.0 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Versuchsreihe mit EphrinB2-KO Tumorzellen

Zunächst wurde die Funktion von Ephrin B2 auf der Tumorseite untersucht. Hierzu wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, EphrinB2 Knock-out Astrozytome (hier bezeichnet „*ephrinB2-KO*“) mit Wildtype Astrozytomen als Kontrolltumore (hier bezeichnet „*wt*“) verglichen. Die Mäuse sind in beiden Gruppen gleicher Abstammung.

Untersucht wurde das Tumolvolumen, die Gefäßfläche in der CD34 Färbung und der Lectin Färbung, sowie die Anzahl der Satelliten des Haupttumors.

Es wurden 11 Kontrolltumore und 10 EphrinB2-Knockout Tumore intrakraniell transplantiert

Ziel war es, den Einfluss des EphrinB2 Knockouts in den Tumorzellen auf das Tumorstadiumsverhalten und eventuell assoziierte Gefäßveränderungen zu untersuchen.

3.1.1 Das Tumolvolumen

Um Einflüsse des Knockouts auf das Wachstum und die Größe des Tumors zu untersuchen, bestimmten wir zuerst das Volumen der Tumoren in beiden Gruppen. Nach Präparation des Tumors und Herstellung der Dünnschnitte wie beschrieben, erfolgte die Färbung mit HE und die Bestimmung des Volumens in mm^3 nach der in Material und Methoden beschriebenen Formel.

Wir konnten hier zeigen, dass das Tumolvolumen in der *EphrinB2-KO* Gruppe hochsignifikant ($p < 0,01$) mehr als doppelt so groß ($4,13 \pm 0,64$) als die Kontrollgruppe ($1,75 \pm 0,26$) war.

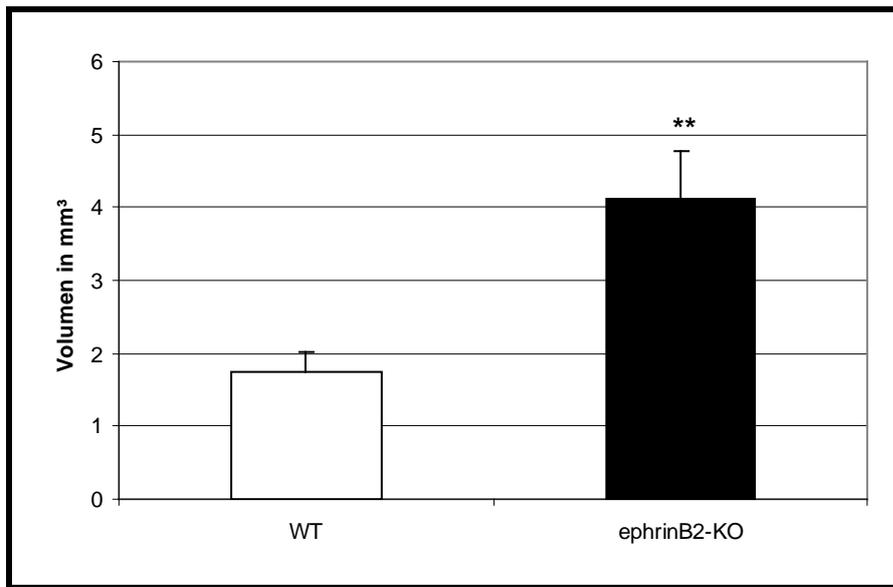


Abbildung 7: Erhöhtes Tumorwachstum in der EphrinB2-KO Gruppe

Vergleichende, quantitative Darstellung des Tumolvolumens, bestimmt in den Tumordünnschnitten beider Gruppen.

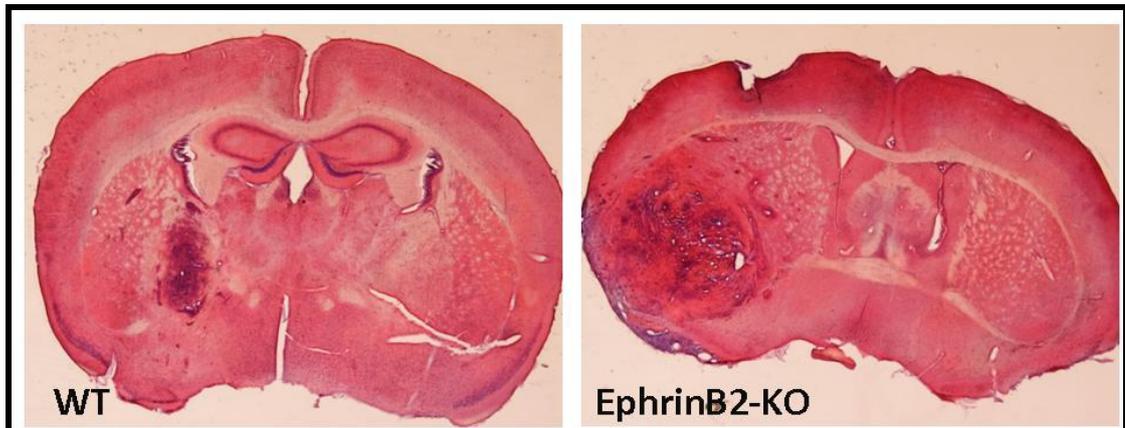


Abbildung 8: Deutlich gesteigertes Tumorwachstum in der EphrinB2-KO Gruppe

Links: HE-Färbung eines Dünnschnittes etwa in der Mitte des Tumors in der WT Gruppe. Rechts: HE-Färbung eines Dünnschnittes etwa in der Mitte des Tumors in der EphrinB2-KO Gruppe.

3.1.2 Die Anzahl der Tumorsatelliten

Bei der Auswertung der Tumorgrößen zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Wachstumsverhalten der Tumoren. Es ließen sich makroskopisch zwei Phänotypen unterscheiden. So zeigten die Wildtype Tumoren eine weitaus größere Streuung des Tumors durch kleine, gefäßassoziierte Tumorsatelliten bei wesentlich kleinerem Haupttumor, während die *EphrinB2-Knockout* Gruppe einen größeren Haupttumor mit verdrängendem, parenchymatösem Wachstum und wesentlich weniger Streuung zeigte.

Zur Quantifizierung dieses Befundes führten wir eine Bestimmung der Anzahl der Tumorsatelliten in beiden Gruppen nach der in Material und Methoden beschriebenen Methode durch.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), während in der *Kontrollgruppe* im Mittelwert $23,35 \pm 4,39$ Tumorsatelliten gezählt wurden, zeigte die *EphrinB2-Knockout* Gruppe im Durchschnitt nur $12,3 \pm 1,63$ und somit nur annähernd die Hälfte der Tumorsatelliten verglichen mit den Wildtype Tumoren

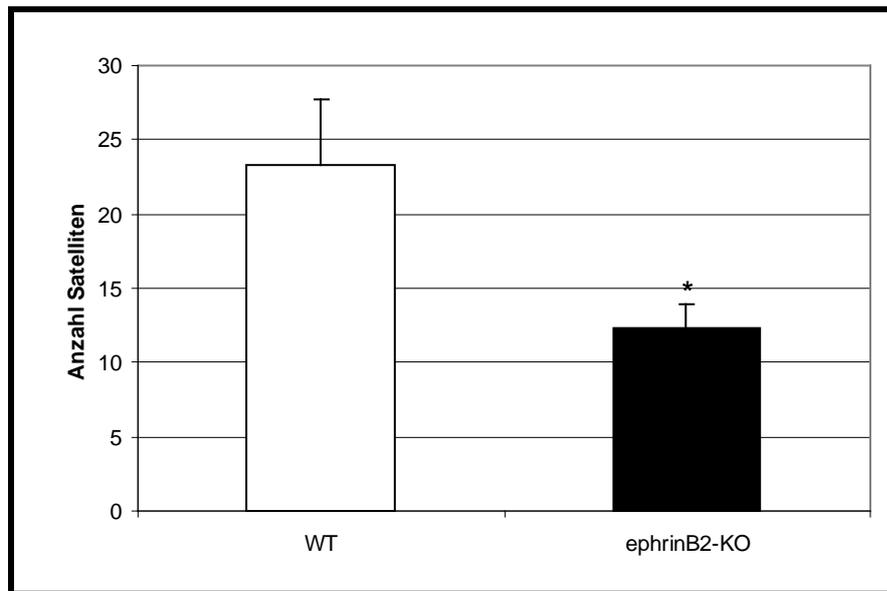


Abbildung 9: Signifikant verminderte Anzahl von Tumorsatelliten in der EphrinB2-KO Gruppe

Vergleichende, quantitative Darstellung der Anzahl der Tumorsatelliten, bestimmt in den Tumordünnschnitten beider Gruppen.

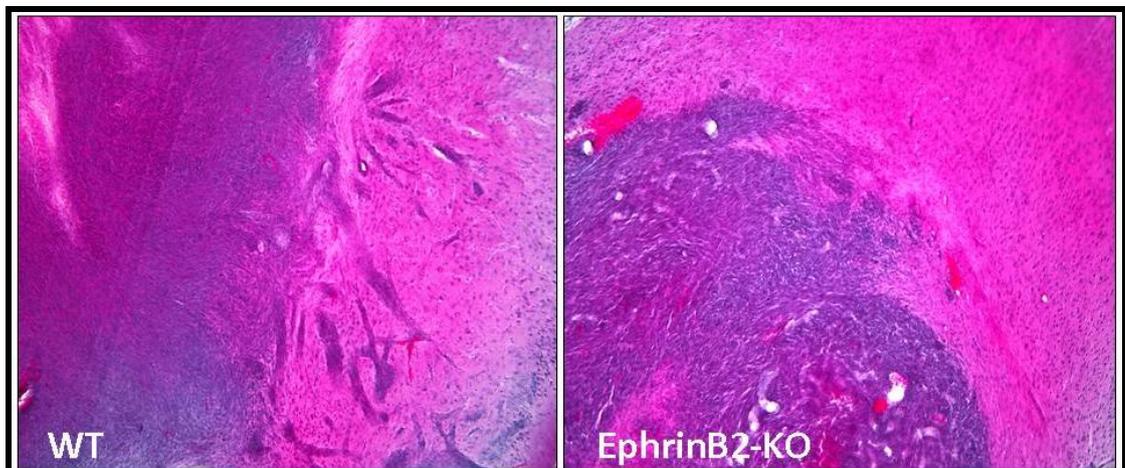


Abbildung 10: Angiozentrisches vs. Parenchymatöses Wachstumsverhalten

Links: HE-Färbung eines Dünnschnittes der WT Gruppe mit deutlich angiozentrischem, satellitären Wachstum der Tumorzellen. Rechts: HE-Färbung eines Dünnschnittes der EphrinB2-KO Gruppe mit parenchymatösem, dem gesunden Gewebe gegenüber abgegrenzten Wachstumsverhalten.

3.1.3 Die Gefäßfläche in der CD34 Färbung

Wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit ist der Einfluss des Eph/Ephrin Systems auf die Gefäßmorphologie der Tumoren und im Weiteren der Zusammenhang zwischen Tumormorphologie und –größe mit dem Gefäßsystem des Tumors.

Um nachzuweisen, dass es sich bei den Änderungen hinsichtlich der Tumorgöße um einen rein tumorintrinsic Effekt des EphrinB2 handelt und zum Ausschluss eines etwaigen *forward-signalling*, führten wir zum Einen die Färbung mit dem CD34 Antikörper und zum Anderen eine funktionelle Färbung über das biotinylierte Lektin durch und bestimmten die Gefäßfläche des Tumors wie in Material und Methoden beschrieben.

In diesem Versuchsteil zeigte sich, als deutlicher Hinweis der rein tumorintrinsic Wirkung des EphrinB2, kein signifikanter Unterschied in der Gefäßfläche. Während in der *Kontrollgruppe* der Mittelwert der Fläche bei $13,94\% \pm 0,86$ lag, ergab die *EphrinB2-KO* Gruppe einen Wert von $13,95\% \pm 1,09$.

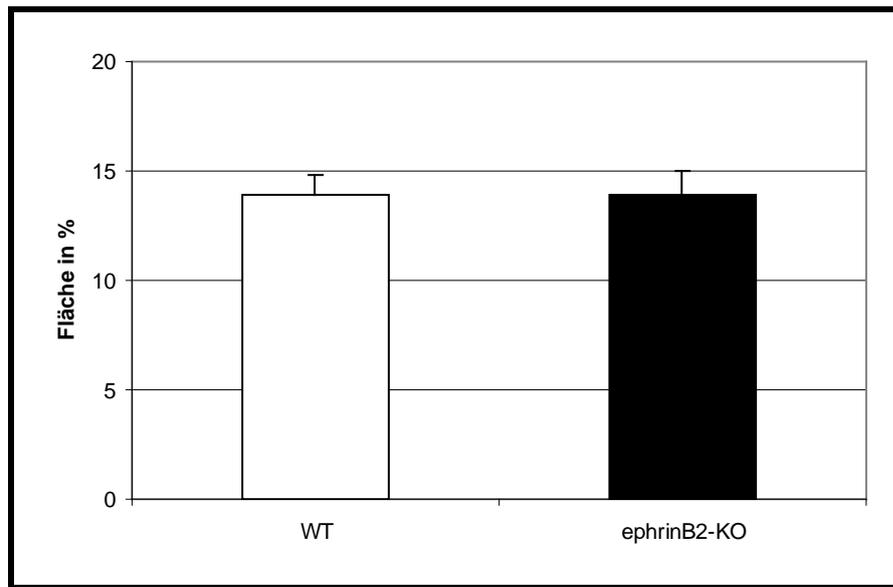


Abbildung 11: Kein signifikanter Unterschied der Gefäßfläche in der CD34 Färbung

Vergleichende, quantitative Darstellung der Gefäßfläche in %, bestimmt in den Tumordünnschnitten beider Gruppen

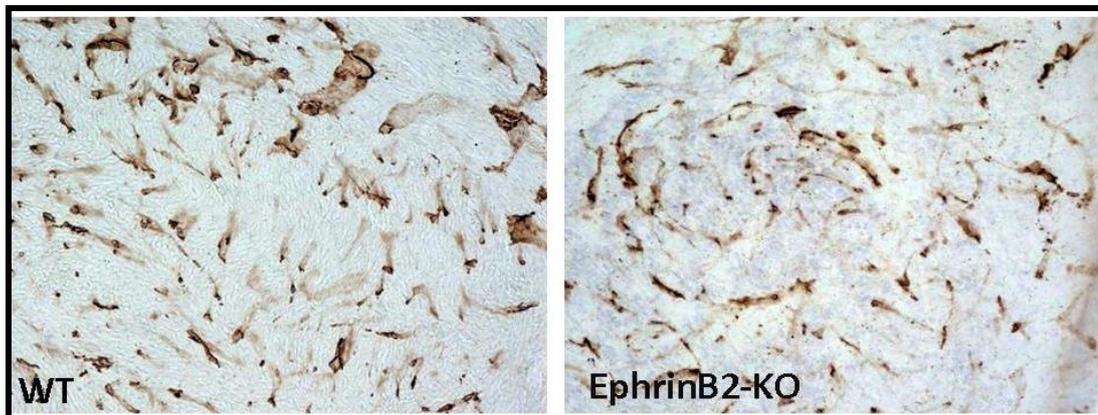


Abbildung 12: Annähernd gleiche Gefäßfläche und Morphologie in beiden Gruppen

Links: CD34 Gefäßdarstellung eines Wildtype Tumors. Rechts: CD34 Gefäßdarstellung eines EphrinB2-KO Tumors.

3.1.4 Die Gefäßfläche in der Lektin Färbung

Wir führten eine weitere immunhistochemische Färbung durch, die Darstellung der perfusionierten Tumorgefäße durch biotinyliertes Lektin.

Die Quantifizierung der Gefäßperfusion mittels Färbung des intravaskulären Lektins zeigte eine Reduktion der funktionellen Gefäßfläche in der *EphrinB2-KO* Gruppe auf 87,6% bezogen auf die Kontrollgruppe (100%), was einer Differenz von 12,4% entspricht. Dieser kleine Unterschied stellte sich als signifikant dar ($p < 0,05$) und lässt sich eventuell auf die verminderte Perfusion der deutlich größeren Tumoren in der Knockout Gruppe zurückführen.

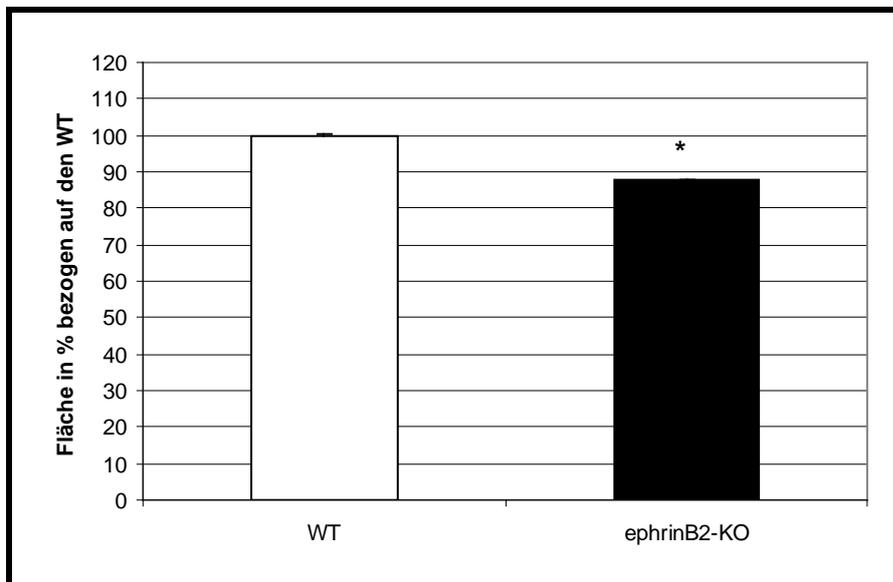


Abbildung 13: Leichte Abnahme der perfusionierten Gefäßfläche in der ephrinB2-KO Gruppe

Vergleichende, quantitative Darstellung der Gefäßfläche in %, bestimmt in den Tumordünnschnitten beider Gruppen. Die bestimmte Fläche der Wildtype Tumoren entspricht 100%.

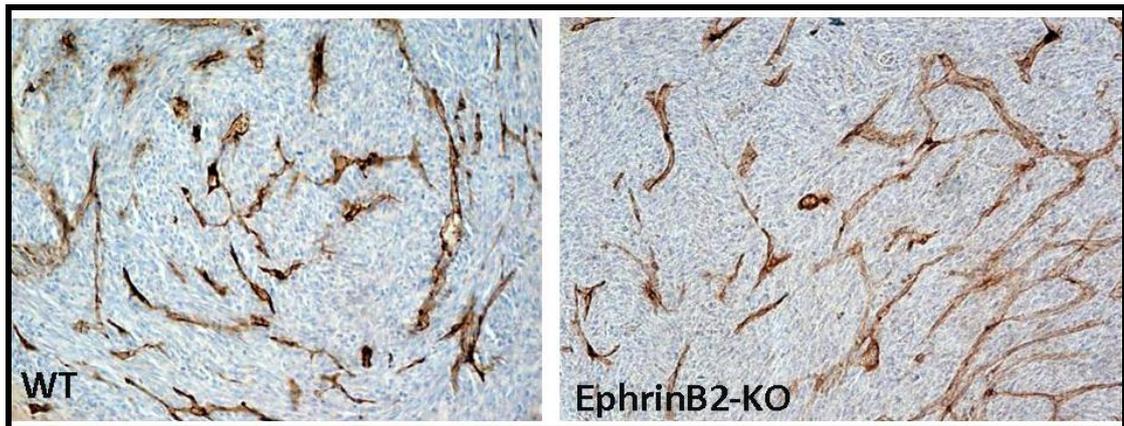


Abbildung 14: Vergleichbare Gefäßfläche in der funktionellen Gefäßfläche

Links: Lektin Gefäßdarstellung eines Wildtype Tumors. Rechts: Lektin Gefäßdarstellung eines EphrinB2-KO Tumors mit leichter Reduktion zur Mitte des Tumors.

3.2 Ergebnisse der Versuchsreihe mit ephrinB2 $\Delta V/\Delta V$ Tieren

In dieser Versuchsreihe wurden die, wie in Material und Methoden beschrieben, EphrinB2 $\Delta V/\Delta V$ Mäuse (hier bezeichnet „ephrinB2 $\Delta V/\Delta V$ “) verglichen mit gesunden Mäusen. In beiden Gruppen wurden Wildtyp-Astrozytom-Tumorzellen transplantiert. Untersucht wurde das Tumolvolumen und die Gefäßfläche in der CD34 und der Lektin Färbung. Auf die Auswertung der Tumorsatelliten wurde bei dieser Versuchsreihe verzichtet, weiterhin wurden zwei Versuchsdurchläufe mit exakt gleichen Bedingungen zusammengelegt.

Ziel war es, den Einfluss des funktionellen EphrinB2 Knockouts auf der Organismusseite auf die oben benannten Parameter zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Wildtyp-Astrozytome mit genetischem CD1 Hintergrund in 11 *wildtype* Kontrolltiere und 7 *ephrinB2 $\Delta V/\Delta V$* Tiere transplantiert.

3.2.1 Das Tumolvolumen

Auch in dieser Versuchsreihe ging es darum zu zeigen, wie sich der funktionelle Knockout des EphrinB2 Liganden, diesmal auf der Seite der Maus, auf

Ergebnisse

das Wachstum eines implantierten Astrozytoms auswirkt. Nach Präparation des Tumors und Herstellung der Dünnschnitte wie beschrieben, erfolgte die Färbung mit HE und die Bestimmung des Volumens in mm^3 nach der in Material und Methoden beschriebenen Formel.

Wir konnten zeigen, dass das Tumolvolumen in der *ephrinB2 $\Delta V/\Delta V$* Gruppe signifikant ($p < 0,05$) ungefähr 4 mal kleiner ist ($5,82 \pm 0,19$) als in der *Kontrollgruppe* ($24,38 \pm 4,61$).

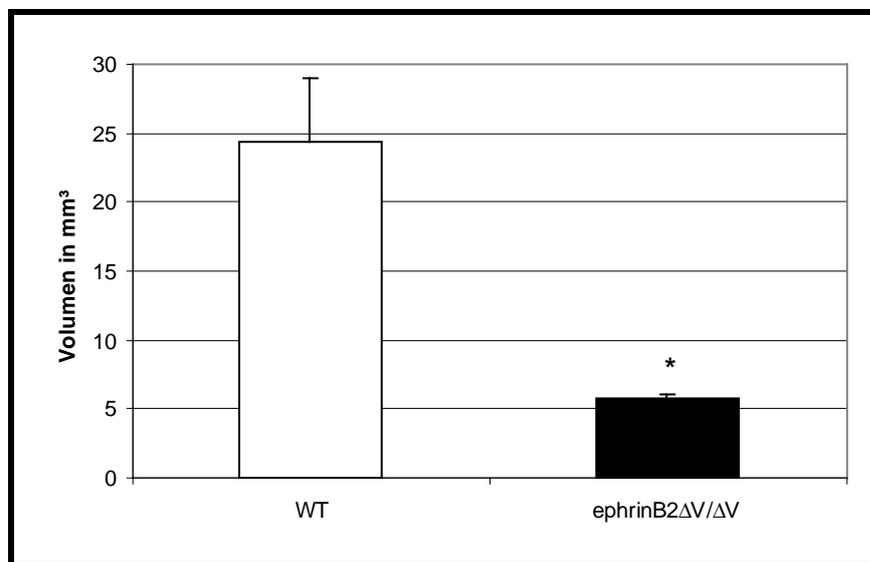


Abbildung 15: Signifikant vermindertes Tumolvolumen in der *ephrinB2 $\Delta V/\Delta V$* Gruppe
Vergleichende, quantitative Darstellung des Tumolvolumens, bestimmt in den Tumordünnschnitten beider Gruppen.

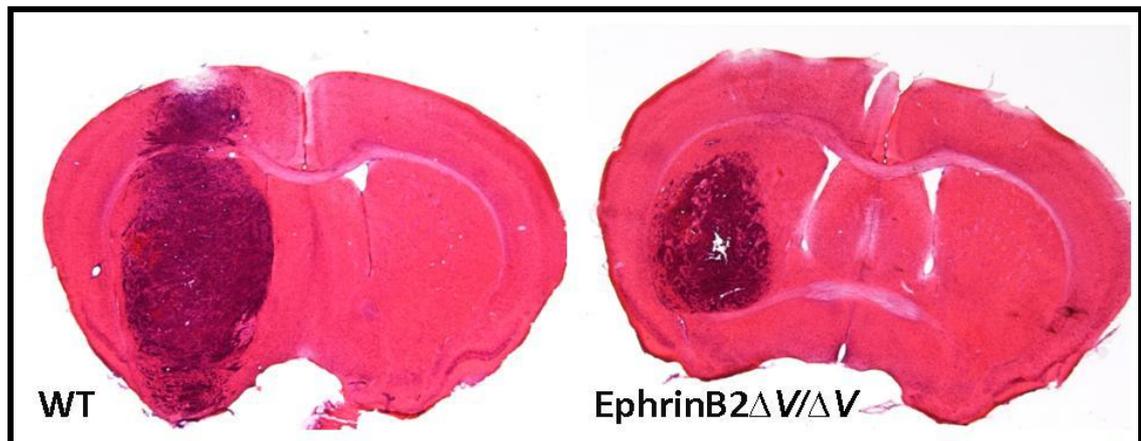


Abbildung 16: Signifikante Abnahme der Tumorgöße in den EphrinB2 Δ V/ Δ V Tumoren
Links : HE Färbung eines Dünnschnittes in der Mitte des Tumors einer wildtype Maus;
Rechts : HE Färbung Färbung eines Dünnschnittes in der Mitte des Tumors einer EphrinB2 Δ V/ Δ V Maus.

3.2.2 Die Gefäßfläche und Anzahl der Gefäße in der CD34 Färbung

Wie in dem vorangegangenen Versuchsteil untersuchten wir auch hier die Gefäßmorphologie des Tumors hinsichtlich der Gefäßfläche bzw. -dichte. Dafür führten wir zwei verschiedene Färbungen durch, die CD34 und die Lektin Färbung. Während die Gefäßfläche in dem ersten Versuch mit den Astrozytom Knockout Zellen sich in beiden Gruppen annähernd gleich darstellte, zeigten sich nun in dieser Versuchsreihe deutliche Unterschiede betreffend Gefäßfläche und -morphologie.

Die *ephrinB2 Δ V/ Δ V* Gruppe zeigte im Mittelwert eine Fläche von $7,78\% \pm 0,65$, während die *Kontrollgruppe* einen Mittelwert von $12,78\% \pm 0,77$ zeigte, womit die *ephrinB2 Δ V/ Δ V* Gruppe hochsignifikant weniger Gefäße aufweist ($p < 0,01$). Morphologisch stellten sich die Gefäße in der *ephrinB2 Δ V/ Δ V* Gruppe weniger torquiert und auch im Durchmesser vermindert dar. Weiterhin konnte man mikroskopisch eine deutlich verminderte Filopodienausbildung an Gefäßspitzen in der *ephrinB2 Δ V/ Δ V* Gruppe feststellen.

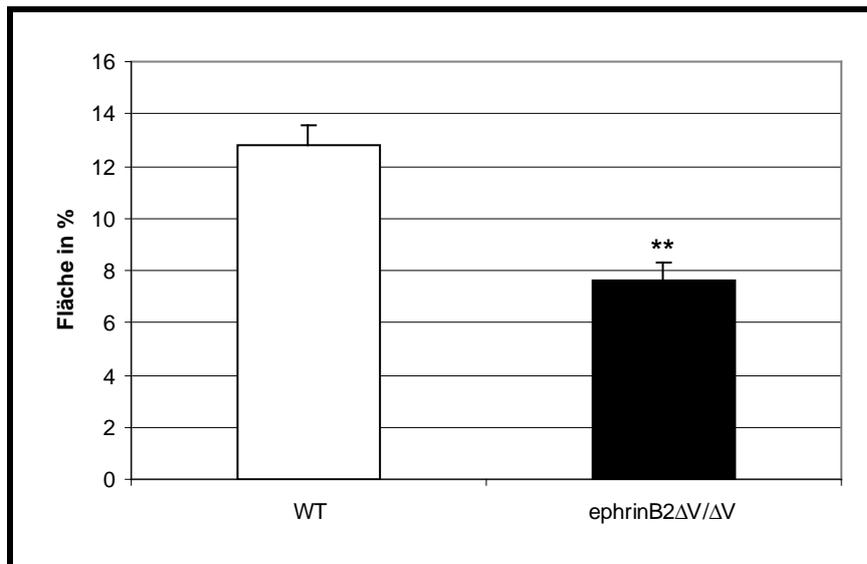


Abbildung 17: Hochsignifikante Abnahme der Gefäßfläche in der ephrinB2ΔV/ΔV Gruppe

Vergleichende, quantitative Darstellung der Gefäßfläche in %, bestimmt in den Tumordünnschnitten beider Gruppen.

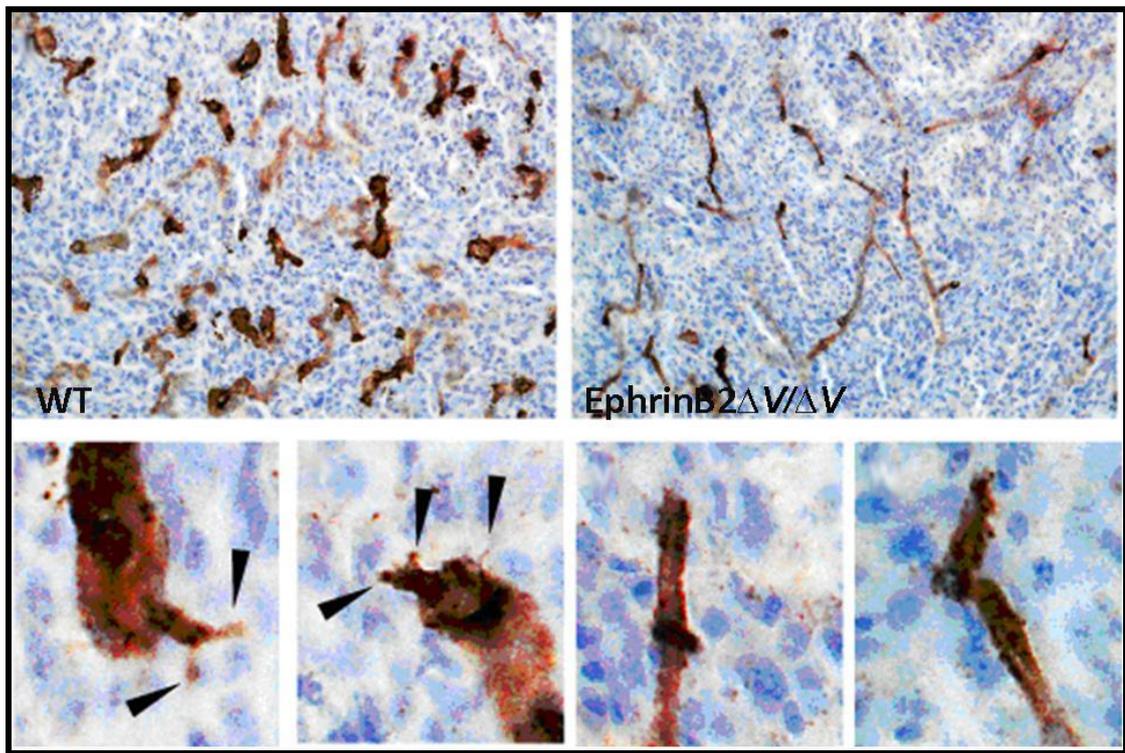


Abbildung 18: Deutliche Abnahme der Gefäßfläche in der *ephrinB2ΔV/ΔV* Gruppe mit reduzierter Filopodienbildung

Links: CD34 gefärbte Gefäße innerhalb des Tumors mit großem Lumen und starker Torquierung. Links Unten: Deutliche Filopodienausbildung an Gefäßspitzen. Rechts: Deutliche Abnahme der Gefäße in der CD34 Färbung innerhalb des Tumors mit reduziertem Gefäßlumen und verminderter Torquierung. Rechts Unten: Fehlender Nachweis von Filopodien an Gefäßspitzen.

3.2.3 Die Gefäßfläche in der Lektin Färbung

Auch in dieser Versuchsanordnung führten wir zur Darstellung der Gefäßsituation der Tumoren eine weitere immunhistochemische Färbung durch, die Darstellung der perfusionierten Tumorgefäße durch biotinyliertes Lektin, wie in Material & Methoden beschrieben.

Die Quantifizierung der Gefäßperfusion mittels Färbung des intravaskulären Lektins zeigte eine Reduktion der funktionellen Gefäßfläche in der *ephrinB2ΔV/ΔV* Gruppe auf 60,23% bezogen auf die Kontrollgruppe (entsprechend 100%), was einer statistisch hochsignifikanten ($p < 0,01$) Differenz

Ergebnisse

von 39,77% entspricht und Korrelat der insgesamt verminderten Gefäßfläche der Tumoren der *ephrinB2 Δ V/ Δ V* Tiere ist.

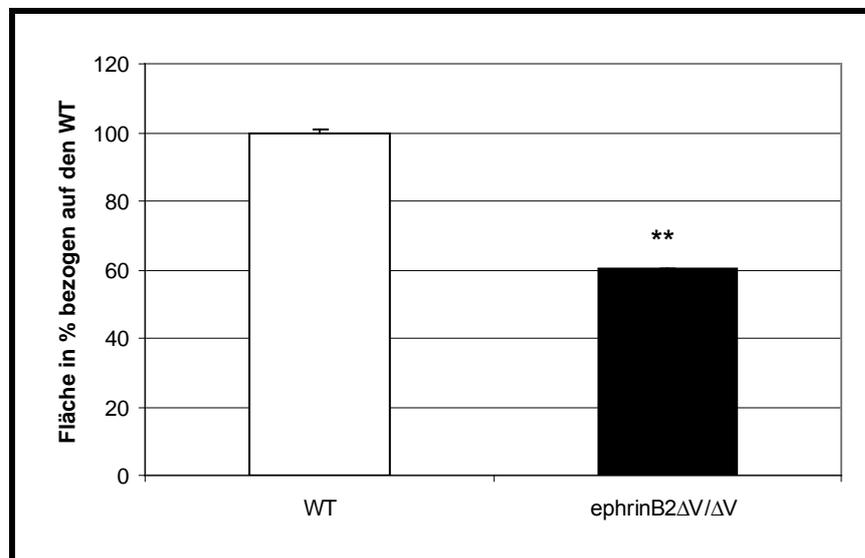


Abbildung 19: Deutliche Abnahme der Gefäßfläche in den EphrinB2 Δ V/ Δ V Tieren

Vergleichende, quantitative Darstellung der Gefäßfläche in %, bestimmt in den Tumordünnschnitten beider Gruppen.

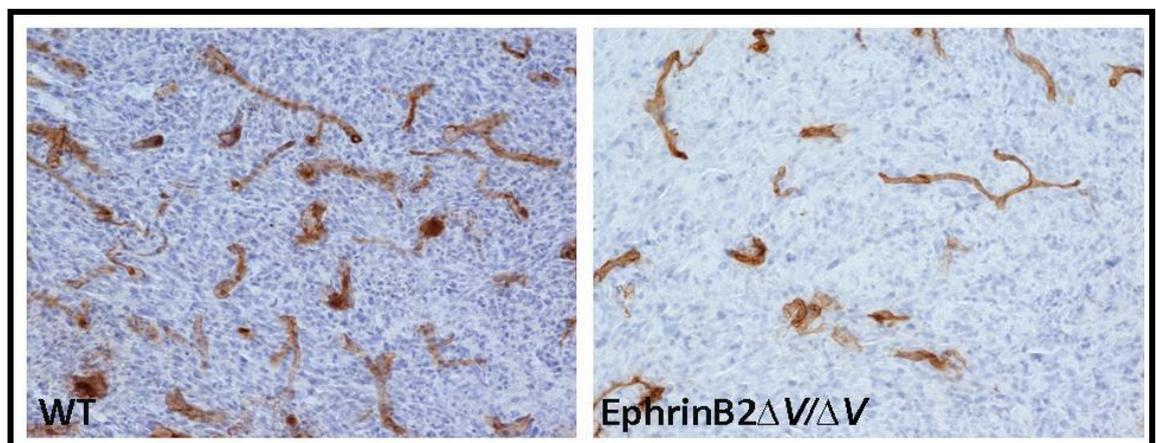


Abbildung 20: Deutliche Abnahme der mit Lektin gefärbten Gefäße in den EphrinB2 Δ V/ Δ V Tieren

Links: Lektin Gefäßdarstellung der Tumoren der wildtype Tiere. Rechts: Lektin Gefäßdarstellung der EphrinB2 Δ V/ Δ V Tiere mit deutlicher Reduktion der Fläche und veränderter Gefäßmorphologie.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, die Rolle des EphrinB2 Liganden im Zusammenhang mit der Angiogenese bei Hirntumoren und deren Wachstumsverhalten zu charakterisieren, da besonders zur Rolle der Eph und Ephrin B Familie bei Hirntumoren grundlegendes Wissen fehlt.

Um zum Einen die Funktion der Tumorzell-intrinsischen und zum Anderen die Tumor-Stroma abhängige Rolle des EphrinB2 zu analysieren haben wir Versuche durchgeführt, bei denen Mäusen ein hochgradiges Astrozytom transplantiert wurde und der EphrinB2 Ligand sowohl einmal auf der Tumorseite gänzlich fehlte, als auch auf der Organismusseite in seiner Funktion gestört war.

Zusammenfassend ergaben sich folgende Befunde: Tumoren mit einem EphrinB2 Knockout der Tumorzellen zeigten ein deutlich gesteigertes Größenwachstum und einen sehr deutlichen Unterschied im Wachstums- und Invasionsverhalten. So wuchs der Knockout Tumor parenchymatös invasiv, während der Wildtyp Tumor ein angiozentrisches, satellitäres Wachstumsmuster zeigte. Ein in beiden Gruppen kaum unterschiedlicher Gefäßphänotyp der Tumoren deutet daraufhin, dass diese Effekte des Knockouts rein tumor-intrinsischer Natur sind.

Im Gegensatz dazu zeigten Astrozytom Wildtyp Tumoren in den EphrinB2 $\Delta V/\Delta V$ Mäusen mit gestörter endothelialer Funktion des EphrinB2 ein deutlich vermindertes Tumorwachstum mit deutlich reduzierter Gefäßfläche und verändertem Gefäßphänotyp verglichen mit den Wildtyp Mäusen.

Da diese Befunde von direkter klinischer Relevanz für die Therapie von Hirntumoren sind, galt es die molekularen Mechanismen weiter herauszuarbeiten.

4.1 Versuchsreihe mit EphrinB2-KO Tumorzellen

4.1.1 Der angiozentrische vs. den parenchymatösen Invasionstyp

Diese Versuchsreihe erbrachte folgende Resultate: Das Tumolvolumen in der EphrinB2 Knockout Gruppe ist mehr als doppelt so groß, als in der Kontrolle. Dahingegen zeigt die Wildtypgruppe fast doppelt so viele Satelliten, als die *ephrinB2-KO* Gruppe. Hinsichtlich des Gefäßphänotyps in beiden Arten von Tumoren zeigt sich kein wesentlicher Unterschied.

Der ganz wesentliche Aspekt ist also der sehr unterschiedliche Tumorphänotyp. Die Kontrollgruppe zeigt den kleineren Tumor und ein charakteristisches Invasionsverhalten. Dieses erfolgt über eine Vielzahl kleiner Satelliten, teilweise relativ weit in das Hirnparenchym vorgedrungen, die zum Großteil gefäßassoziiert liegen. Dieses lässt auf ein gefäßassoziiertes Wachstum schließen, mit vielen kleinen Tumorabsiedelungen um die Gefäße herum.

Die EphrinB2 Knockout Tumoren hingegen zeigen ein parenchymatöses Wachstum mit großen Tumorzell-Clustern, nahe um den großen Haupttumor herum.

Dies legt den Schluss nahe, dass das Ausschalten des EphrinB2 Liganden im Tumor zu einer Umstellung des Wachstums auf einen parenchymatös invasiven Phänotyp führt, eher unabhängig von Gefäßen, während die Tumoren mit funktionierendem EphrinB2 wesentlich kleiner bleiben und eher diffus invasiv entlang der Gefäße sich weiter in das Hirnparenchym vorarbeiten.

So scheint das EphrinB2 der Tumorzellen hier zumindest zwei Aufgaben zu haben: Die kleineren Tumoren der Kontrollastrozytome deuten auf eine Tumorsuppressorfunktion des Eph/Ephrin Komplexes hin, während das gefäßassoziierte Wachstum und die gefäßassoziierte Invasion gleichzeitig auf eine Rolle bei der Gefäßrekrutierung hindeutet.

4.1.2 Eph/Ephrine agieren als Tumorsuppressoren

Verschieden Arbeiten brachten in der Vergangenheit Hinweise darauf, dass Eph-EphrinB Interaktionen tumorsuppressiv wirken, was für Rezeptor Tyrosinkinasen eine eher seltene Wirkweise ist.

Noren *et al.* veröffentlichten 2006 eine Arbeit, in der sie zeigten, dass EphB4, stimuliert von seinem Liganden EphrinB2, in einem Maus Xenograft Model für Brustkrebs, tumorsuppressiv wirkt.

Hohe Level von EphB4 wurden in verschiedenen Tumoren, unter anderem Brustkrebs, mehrfach beschrieben (Berclaz *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004), während der Hauptligand EphrinB2 auf sehr niedrigem Level exprimiert wurde. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass Tumoren die Möglichkeit haben könnten, die EphrinB2 Expression zu senken, um so den tumorsuppressiven Effekt zu umgehen.

Auch Noren *et al.* wiesen die hohe EphB4 Expression und die sehr niedrige EphrinB2 Expression in Brustkrebszellen nach, während sie in gesunden Zellen im Gegenteil hohe EphrinB2 Level zeigten und ein hohes Level an aktivierten EphB4 Rezeptoren. Um die Wirkung des EphrinB2 aufzuzeigen, behandelten sie Mäuse mit einem Brustkrebs Xenograft mit löslichem EphrinB2. Die behandelten Mäuse zeigten, im Gegensatz zur Kontrolle, ein signifikant vermindertes Tumolvolumen, während die Gefäßdichte keine Unterschiede zeigte. Weiterhin zeigten sie in *in vitro* Versuchen, dass die EphrinB2-Fc Behandlung sowohl die Motilität, als auch die Invasivität der Brustkrebszellen signifikant senkt.

Andere Arbeitsgruppen präsentierten ähnliche Ergebnisse bei dem kolorektalen Karzinom (CRC). Battle *et al.* zeigten 2005, dass in humanen CRC Zellen die EphB2 Expression mit steigender Malignität niedriger wurde bzw. teilweise ganz verschwand. In der Adenom-Karzinom Sequenz des CRC von der

Dysplasie, über das kleine Adenom, zum großen und zuletzt zum Karzinom, konstatierten sie, dass die EphB2 Expression stetig niedriger wurde, der Tumor also mit steigender Malignität die EphB2 Expression unterdrückte.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe A. Acker-Palmer (Frankfurt am Main, Deutschland) konnten wir, in bisher unveröffentlichten Ergebnissen, zeigen, dass in *in vitro* Versuchen mit humanen Gliom Invasions Essays, EphrinB2 die Gliom Spheroid Invasion signifikant hemmt, bzw. EphrinB2 Knockout Tumorzellen eine signifikant höhere Invasion aufwiesen.

Diese Ergebnisse decken sich alle hinsichtlich der These, dass EphrinB2 tumorsuppressiv durch Hemmung von Motilität und Invasivität sowie auch Zellwachstum und Überleben wirkt.

4.1.3 Invasivität von Hirntumoren

Diffuse Invasion des umgebenden Hirngewebes ist einer der Hauptgründe für die Schwierigkeit, hochgradige Hirntumoren neurochirurgisch anzugehen. Gliome zeigen verschieden Formen des invasiven Wachstums, das parenchymatöse und das Blutgefäß assoziierte Wachstum. Gehen normalerweise beide Formen gleichzeitig von statten, deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass in den beiden Gruppen jeweils eine Präferenz für einen Invasionstyp zu finden ist.

Während der Tumorprogression invadieren maligne Zellen umgebendes Gewebe und zerstören dessen Architektur. Dieser Vorgang hat zwei Seiten. Zum Einen hat der Tumor die Möglichkeit die Basalmembran zu durchdringen und sich in die Extrazelluläre Matrix (EZM) vorzuarbeiten, zum Anderen bedeutet das auch, dass die EZM nicht mehr die Möglichkeit hat, das Wachstum der malignen Zellen zu kontrollieren. Liotta *et al.* schlugen 1986 drei wesentliche Schritte vor: Die Tumorzellen modifizieren ihre Fähigkeit der Adhäsion

sion an EZM Komponenten, die EZM wird proteolytisch degradiert und die Zellen migrieren in das Gewebe.

Die Adhäsion an die EZM gelingt den Tumorzellen mit Hilfe von verschiedensten Transmembranrezeptoren, wie unter anderem Integrinen und Zelladhäsionsmolekülen (CAMs). Während der malignen Transformation finden Änderungen an diesen Rezeptoren statt, um die Adhäsions- und auch Migrationsfähigkeit zu steigern (Dedar, 1990; Dedar und Saulnier, 1990).

Um die EZM zu degradieren bzw. abzubauen bedienen sich Tumoren einer ganzen Batterie von Proteasen, besonders der Metalloproteinasen (MMPs), Serinproteasen (z.B. Plasmin) oder Cysteinproteasen (Gottesmann, 1990). Während in normalen Geweben ein empfindliches Gleichgewicht von Proteasen und deren Inhibitoren herrschte, um die Funktionalität und Integrität der EZM zu wahren, ist dieses nun in Tumoren gestört (De Clerck *et al.*, 1993).

Die Zellmigration ist der dritte Schritt in diesem Vorgang. Die Beweglichkeit der Tumorzellen beinhaltet eine Menge verschiedener Mechanismen, so z.B. die Ausbildung von Pseudopodien oder die Ausschüttung von autokrinen Faktoren, „*autocrine motility factors*“ genannt (Liotta *et al.*, 1986).

Diese drei Schritte sind wesentlich für den Tumor um ein invasives Wachstumsverhalten auszuprägen, was allein letztlich die Möglichkeit sichert, Zugang zu neuen Gefäßen zu finden, in das Blutgefäßsystem einzudringen und Metastasen auszubilden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass das EphB/EphrinB System in diesem Vorgang eine Rolle zu spielen scheint, zeigen doch beide Gruppen so unterschiedliche Phänotypen der Invasion.

4.1.4 HIF als Regulator des invasiven Wachstums

Auf die vielen verschiedenen Rollen des HIF-Systems ist in der Einleitung hingewiesen worden. Hypoxie ist ein entscheidender Parameter, der das Glioblastom charakterisiert, wiedergegeben in der Histologie des Tumors, die

gekennzeichnet ist durch Nekrosen und vaskuläre Proliferate (Acker und Plate, 2002).

Zahlreiche Befunde unterstützen eine pro-tumorigene Rolle des HIF-Systems. Zagzag *et al.* kamen 2000 zu folgenden Ergebnissen: Die Aktivierung von HIF-1 α korreliert mit der Malignität und der Tumorprogression. Besonders in infiltrierenden Gliomzellen wiesen sie hohe Level von HIF-1 α nach, was die Bedeutung der Hypoxie für ein invasives Verhalten weiter unterstreicht. So ist bekannt, dass Hypoxie die Migration von Endothelzellen stimuliert (Meininger *et al.*, 1988), die Interleukin-8 Expression hochreguliert, was mit dem metastatischen Potential humaner Melanomzellen korreliert (Bar-Eli, 1999), oder die Invasivität muriner Sarkom-, Karzinom- und Melanomzellen fördert (Cuvier, 1997).

Es deuten also zahlreiche Befunde darauf hin, dass Hypoxie und damit einhergehende hohe HIF Level maßgeblich die Invasivität und somit einen aggressiven Tumortyp fördern. In Anbetracht unserer Ergebnisse, dass EphrinB2 eine tumorsuppressive Rolle einnimmt und der großen Bandbreite an regulatorischen Einflüssen des HIF Systems ist es naheliegend, dass zwischen diesen beiden Systemen ein Zusammenhang bestehen könnte.

In der Tat zeigen weitere, bisher unveröffentlichte Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, Ergebnisse, die in diese Richtung deuten.

So konnten wir zeigen, dass transiente Hypoxie über HIF-1 α eine Senkung der EphB/EphrinB Expression zur Folge hat, da ein siRNA gesteuerter HIF-1 α Knockdown diesen Effekt wieder umkehrt.

4.1.5 HIF unterdrückt EphB/EphrinB und induziert einen invasiven Phänotyp

Da EphrinB2 tumorsuppressiv und anti-invasiv wirkt, ist die Inaktivierung des EphrinB2 Systems ein wichtiger Schritt in der Tumorprogression. Unserer These nach geschieht dies in engem Zusammenhang mit der Hypoxie des

Tumors. Hypoxie ist eine wesentliche Charakteristik von hochmalignen Hirntumoren, das molekulare Korrelat der Hypoxie ist die Aktivierung des HIF-Systems.

Den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe und dem Labor von A. Acker-Palmer (Frankfurt am Main, Deutschland) nach scheint HIF-1 α ein negativer Regulator der EphrinB Expression zu sein und so einen invasiven Phänotyp des Tumors zu fördern.

Cortina *et al.* wiesen 2007 einen Mechanismus des EphB als Tumorsuppressor im CRC nach. Sie zeigten *in vitro* und *in vivo*, dass EphB-EphrinB Interaktion Tumorzellen daran hindert, in gesundes Gewebe vorzudringen. Wie auch bei der Vaskulogenese trennt diese Interaktion Gewebegrenzen, je nach Expression verschiedener Eph-Ephrin Muster. In diesem Falle hinderten Ephrin-B1 positive gesunde Zellen EphB positive Tumorzellen daran, in ihr „Gebiet“ vorzudringen, gleiches zeigten sie für die EphrinB2-EphB4 Interaktion. Gesundes Gewebe, das EphrinB exprimiert, hindert also EphB exprimierende Tumorzellen an deren invasivem Vordringen, woraus folgt, dass der Tumor die EphB Wirkung unterdrücken muss, um ein invasives Wachstumsverhalten zu zeigen.

Auf Grund dieser Befunde lässt sich ein Modell aufstellen, wonach Tumorphypoxie Tumorinvasion über Herunterregulation des repulsiv und anti-invasiv wirkenden EphrinB2 Systems stimuliert, wie es in Abbildung 21 schematisch dargestellt ist.

sen der Versuche mit den EphrinB2 Δ V/ Δ V Mäusen, die annähernd gleiche Gefäßdichte, wie die Kontrollen.

So scheint das EphrinB2 besonders bei der Bindung von Tumorzellen an das Gefäßsystem eine Rolle zu spielen.

4.1.6. Anti-angiogene Therapie mittels VEGF Inhibition bei Glioblastomen

Anti-angiogene Therapie hat sich in jüngster Zeit als ein vielversprechender Behandlungsansatz bei verschiedensten Tumorentitäten herausgestellt. Seit Mai 2009 ist das Medikament Bevacizumab (Avastin®) von der FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) zur Behandlung des rezidivierenden Glioblastoms zugelassen. Es handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen VEGF-A. Obwohl eine Behandlung mit Avastin in ersten nicht-randomisierten Phase-II Studien ein gesteigertes medianes progressionsfreies Überleben zeigte (Poulsen *et al.*, 2009; Vredenburgh *et al.*, 2007), stehen Arbeiten zum Gesamtüberleben nach Avastin Therapie noch aus. Interessanterweise zeigte sich ein unvermuteter Effekt nach anti-angiogener Therapie des Glioblastoms, welcher die Wirksamkeit der Behandlung stark in Frage stellt. Der Phänotyp des Tumors wechselt nach Behandlung zu einem hochinvasiven Typ.

Tumorzellen im perinekrotischen Bereich von Glioblastomen fördern hypoxiegesteuert über VEGF Tumorangiogenese. Entlang der Invasionsfront invadieren Tumorzellen gut vaskularisierte weiße Hirnsubstanz entlang der Gefäße (Giese und Westphal, 1996; Lefranc *et al.*, 2005). Diese hirneigenen Gefäße zur metabolischen Versorgung des Tumors zu nutzen, bezeichnet als „*vessel co-option*“, ist ein effizienter Mechanismus des Tumors der anti-angiogenen Medikamentenwirkung zu entgehen, besonders da diese Gefäße von der anti-angiogenen Behandlung nicht betroffen sind (Rubenstein *et al.*, 2000; Leenders *et al.*, 2004; Lamszus *et al.*, 2003; Martens *et al.*, 2008).

Somit ist es nachvollziehbar, dass der Tumor bei anti-angiogener Therapie sein Wachstumsverhalten stark in Richtung Invasion verschiebt, um eine weitere Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten. Diese Theorie deckt sich mit Arbeiten die zeigten, dass VEGF Inhibition den invasiven Phänotyp fördert (Paez-Ribes *et al.*, 2009), wobei der Mechanismus nicht aufgeklärt wurde

Somit sind die Ergebnisse dieser Arbeit von hoher aktueller klinischer Relevanz. Zum Einen ist die hohe Invasionseigenschaft einer der Gründe für die hohe Rezidivneigung der hochmalignen Gliome. Zum Anderen scheinen die Gliomzellen auf eine antiangiogene Therapie, die sich gegen die tumorinduzierte Gefäßrekrutierung richtet, über Migration zu oxygenierten Hirnarealen zu entgehen. Dies scheint einen wichtigen Resistenzmechanismus gegen die momentane antiangiogene Therapie darzustellen.

Man kann spekulieren, dass der hier beschriebene Mechanismus, die HIF-1 α induzierte Repression von EphrinB2 bei besonders nach anti-angiogener Therapie zunehmender Hypoxie, diesem Verhalten zu Grunde liegen könnte und einen invasiven Phänotyp des Tumors fördert.

4.2 Versuchsreihe mit ephrinB2 Δ V/ Δ V Tieren

In dem zweiten Teil der Versuche wurde untersucht, welche Folgen es hat, wenn der EphrinB2 Ligand, bzw. EphrinB2 *reverse signalling*, auf der Organismuseite inaktiviert ist, während das Ligandensystem auf Tumorseite intakt ist.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Tumoren der EphrinB2 Δ V/ Δ V Gruppe ungefähr viermal kleiner sind als in der Kontrolle. Der Wachstums-/Invasionsphänotyp war bei beiden Gruppen annähernd gleich, im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen. Dahingegen ist die Gefäßdichte innerhalb des Tumors konsequent niedriger in der Wildtyp Gruppe.

In diesem Falle muss das gestörte EphrinB2 *signalling* auf Stromaseite also wesentlichen Einfluss auf die Vaskularisierung des Tumors haben mit sekun-

därer Inhibition des Tumorwachstums. Welche Mechanismen hierbei eine Rolle spielen, wurde auch in diesem Falle mit der Arbeitsgruppe A. Acker-Palmer (Frankfurt am Main, Deutschland) herausgearbeitet.

4.2.1 Tip Cells und VEGF Interaktion

Es ist bekannt, dass VEGF-A einer der Hauptregulatoren von Blutgefäßwachstum, -formation, und -funktion ist. Nur ist es bis heute auf weiten Strecken nicht bekannt, wie diese komplexen Vorgänge exakt ablaufen, besonders das Aussprossen, die Fusion von Gefäßen und das tubuläre, zielgerichtete Wachstum. Gerhardt *et al.* beschrieben 2003 in einer Arbeit eine besondere Art von Endothelzelle an der Spitze von neuen vaskulären Aussprossungen, die *Tip Cells*, welche durch VEGF-A reguliert werden.

Verschiedene Arbeiten weisen daraufhin, dass endotheliale Sprossen multiple Filopodien an ihren distalen Enden ausbilden, was dafür spricht, dass wachsende vaskuläre Sprossen mit speziellen Strukturen an ihrer Spitze ausgerüstet sein müssen, die in der Lage sind, Migration und dessen Richtung zu regulieren (Bär *et al.*, 1972; Marin-Padilla, 1985).

Diese *Tip Cells* wurden von Gerhardt *et al.* beschrieben und charakterisiert. Die Arbeitsgruppe wies spezielle, an der Spitze neuer Gefäßsprossen in der Mausretina gelegene, hoch polarisierte, endotheliale Zellen nach, die Filopodien ausbildeten. Die Identität dieser speziellen Zellen sicherten sie durch immunhistochemische Färbungen (PECAM-1, Endomucin, VEGFR2) und ein distinktes Genexpressionsprofil. *Tip Cells* selbst sind nicht proliferativ, Wachstum und Proliferation gehen von weiter proximal liegenden Zellen aus, sogenannten *Stalk Cells*. Die Beobachtung, dass die Ausbildung von Filopodien durch *Tip Cells* entlang VEGF-A mRNA positiver Astrozyten besonders ausgeprägt ist, führte zu der Annahme, dass VEGF-A ein möglicher Induktor der Filopodienausbildung sein könnte. In der Tat konnten Gerhardt *et al.* zeigen, dass VEGF-A Überexpression kontinuierliche Filopodienausbildung,

Gefäßsprossung und Hyperperfusion induziert. Weiter zeigten sie, dass auf *Tip Cell* Filopodien VEGF-R2 (Flk-1) Expression sehr prominent ist. Inhibition dieses Rezeptors durch Antikörper zeigte eine zügige Retraktion der Filopodien und einen Stopp des Plexuswachstums in der Retina. So ist nahelegend, dass VEGF-A durch VEGFR2 Interaktion die Ausbildung der Filopodien an *Tip Cells* stimuliert. Im Folgenden zeigte die Arbeitsgruppe, dass besonders eine gleichmäßige Verteilung eines VEGF-A Gradienten für eine korrekte Ausbildung der Filopodien verantwortlich ist. VEGF-A/ VEGFR2 Interaktion mit weiter proximal liegenden Zellen (*Stalk Cells*) stimuliert die Proliferation der Gefäßsprossen. Es gibt also unterschiedliche Reaktionen der *Tip Cells* und der proximalen Zellen auf das VEGF-A Signal. Eine genaue Balance zwischen Migration der *Tip Cells* und Proliferation der proximalen Zellen kann also nur herrschen, wenn sowohl der VEGF-A Gradient, als auch die Konzentration, exakt durch die Umgebung (Astrozyten, Sauerstoff, Transkription) reguliert werden. Dies stellt ein hochinteressantes Beispiel dar, wie nur ein Faktor ein so komplexes Geschehen wie die Organvaskularisierung regulieren kann und ebenso, wie pathologische Angiogenese durch VEGF Konzentrationsänderungen beeinflusst werden kann.

4.2.2 EphrinB2 Δ V - Physiologische und pathologische Angiogenese

Zu den *in vivo* Versuchen, die Gegenstand dieser Arbeit sind, machte unsere Arbeitsgruppe und die Arbeitsgruppe A. Acker-Palmer (Frankfurt am Main, Deutschland) eine große Anzahl weiterer Versuche, um sowohl eine Erklärung für den oben genannten Phänotyp der Tumoren zu finden, als auch eine etwaige Rolle der Eph/Ephrin Familie bei physiologischer Angiogenese darzustellen.

Die molekularen Mechanismen, wie EphrinB2 die Entwicklung und die Funktion von Gefäßen beeinflusst, sind bisher weitestgehend unbekannt. Gefäße und Nerven besitzen beide spezielle Strukturen, die oben genannten *Tip*

Cells bei Gefäßen und die sog. *Growth Cones* bei Nerven, die durch Filopodienausbildung ihre Migration in das umliegende Gewebe steuern. Anziehende und abstoßende Signale aus der Umgebung steuern die Regulierung der Richtung dieser Migration. Besonders den Eph/Ephrinen kommt hier eine tragende Rolle, vor allem bei dem Axonwachstum, zu, wie in der Einleitung dargestellt. Es ist also naheliegend, eine etwaige Beziehung zwischen dem Eph/Ephrin System und den, das Gefäßwachstum steuernden, *Tip Cells* zu untersuchen.

Dazu nutzten wir in dieser Arbeit EphrinB2 $\Delta V/\Delta V$ Mäuse. Tiere, bei denen ein Valin der zytoplasmatischen Domäne des EphrinB2 fehlt und somit das PDZ-abhängige *reverse signalling* gestört ist.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe A. Acker-Palmer zeigten, dass die retinale Vaskularisation bei neugeborenen EphrinB2 $\Delta V/\Delta V$ Mäusen gestört war und zu einem späteren Zeitpunkt eine stark verminderte Verästelung der Gefäße zeigte. Weiterhin war die Gefäßdichte in anderen Hirnregionen, wie Kortex, Thalamus und Striatum bis zu 30% vermindert. Eine Störung der PDZ-Domänen Interaktion führte nachweislich zu einer Verminderung von Gefäßsprossen, quantifiziert durch die Menge der Filopodien. Ein deutlicher Hinweis, dass reverse EphrinB2 Signalwege in Gefäßsprossung und eventuell der *Tip Cell* Funktion involviert sind. Ähnliche Ergebnisse erzielte unsere Arbeitsgruppe in dem hier beschriebenen Tumormodell und pathologischer Angiogenese. Ein um teilweise 75% reduziertes Tumolvolumen, verminderte Vaskularisation, und damit einhergehend auch der funktionellen Gefäßfläche, quantifiziert durch die Gefäßperfusion mit intravaskulärem Lektin.

Morphologisch stellten sich die Gefäße der Kontrolltumoren hochverzweigt und stark gewunden dar, vaskuläre Sprossen und Filopodien waren sichtbar.

Im Gegensatz dazu stellen sich die Gefäße innerhalb der Tumoren in den EphrinB2 $\Delta V/\Delta V$ Mäusen weniger gewunden und weniger verzweigt, mit starker Ähnlichkeit zu normalen Hirngefäßen dar. Die Störung der PDZ-

abhängigen Signalwege scheint zu einer einer Gefäßmorphologie zu führen, die sich durch verminderte Sprossung und Filopodien darstellt, sowohl in physiologischer, als auch pathologischer Angiogenese.

4.2.3 Funktion des EphrinB2 *reverse signalling*

Um den Nachweis zu führen, dass EphrinB2 *reverse signalling* für die Endothelzellfunktion eine wesentliche Rolle spielt, führte die Arbeitsgruppe von A. Acker-Palmer eine Serie von Experimenten mit Endothelzellen durch, die einen konditionellen EphrinB2 Knockout aufwiesen. Überexpression von EphrinB2 in isolierten primären Endothelzellen führte zu einem Phänotyp, der stark instabile filopodiale Strukturen ausbildete. Diese Zellen wurden weiterhin aus multizellulären, tubulären Strukturen verdrängt, wenn sie mit Kontrollzellen vermischt wurden, was auf eine interzellulär repulsive Aktivität hindeutet, wie sie von Eph/Ephrin Interaktionen bekannt ist.

Im Gegensatz hierzu zeigten EphrinB2 Knockout Zellen eine stabile Integration in tubuläre Strukturen. Diese Vorgänge sind *reverse signalling* abhängig, da mutierte Zellen, denen die zytoplasmatische EphrinB2 Seite fehlt, nicht den repulsiven Phänotyp zeigten.

Die Untersuchung der Menge der Filopodien einzelner *Tip Cells* zeigte, dass EphrinB2 Δ V Mutanten eine deutliche Reduktion der Fähigkeit, Filopodien auszubilden, aufwiesen.

4.2.4. EphrinB2 Δ V und VEGF

Wie bei Gerhardt *et al.* 2003 beschrieben, spielt VEGF-A/ VEGFR2 Interaktion eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung von Filopodien in der Vaskularisierung der Retina. So untersuchte unsere Arbeitsgruppe, ob ein Zusammenhang zwischen der verminderten Sprossung und verminderten Filopodienanzahl in sowohl den EphrinB2 Δ V/ Δ V Retinamodellen, als auch dem Tumormodell und der VEGF Rezeptorfunktion besteht.

Die Internalisierung des VEGFR2 ist ein wichtiger Mechanismus der Rezeptorregulierung und seiner signalgebenden Eigenschaften. VE-Cadherin spielt eine wesentliche Rolle dabei, die Internalisierung des Rezeptors und seine signalgebende Funktion zu hemmen. VEGFR2, an der zellulären Oberfläche verbleibend, wird dephosphoryliert und inaktiviert durch die membranassoziierte Protease CD148. Umgekehrt beendet die Internalisierung des Rezeptors nicht die Signalgebung, sondern führt sie in intrazellulären Kompartementen, wie den Endosomen, fort (Lampugnani *et al.*, 2006). Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob die EphrinB2 mit der VEGFR2 Funktion in Zusammenhang steht. Es zeigte sich, dass EphrinB2 Knockout Endothelzellen, mit VEGF-A behandelt, eine circa um das vierfache verminderte Rezeptorinternalisierung aufwiesen. Zellen der EphrinB2 $\Delta V/\Delta V$ Mäuse wiesen das gleiche Ergebnis auf, was die besondere Bedeutung der PDZ-Domänen Interaktion unterlegt. Diese Ergebnisse korrelieren mit den *in vivo* Ergebnissen der verminderten Gefäßsprossung in unserem Tumormodell. Weitere Versuche bestätigten die hier beschriebene Aufgabe des *reverse signalling* der EphrinB2 Liganden, denn eine Aktivierung desselben durch EphB4 führte zu einer starken Co-Lokalisierung der EphrinB2 Liganden und VEGFR2 und dessen Internalisierung. EphB4 *forward signalling* führte im Gegensatz dazu zu keiner Triggerung einer VEGFR2 Endozytose. Genauso waren EphrinB2-Knockout oder EphrinB2 $\Delta V/\Delta V$ Endothelzellen refraktär auf eine EphB4 Behandlung.

Zuletzt konnte die Arbeitsgruppe A. Acker-Palmer (Frankfurt am Main, Deutschland) in Kollaboration mit unserer Arbeitsgruppe noch zeigen, dass sowohl EphrinB2 Knockout, als auch die EphrinB2 ΔV Zellen eine stark verminderte Tyrosinphosphorylierung des VEGFR2 aufwiesen, was für dessen verminderte Aktivierung spricht.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass EphrinB2 *reverse signalling* die Aktivität des VEGFR2 über Induktion der Internalisierung entscheidend beeinflusst.

4.2.5 EphrinB2 als Regulator von VEGFR2 und Endothelzellmigration

Oberflächenrezeptoren, die invasive Migration steuern, funktionieren offensichtlich häufig durch Rezeptortyrosinkinase-Endozytose, was garantiert, dass lenkende Signale von außen, intrazellulär lokalisiert umgesetzt werden können. Beschrieben zum Beispiel während der Oogenese der *Drosophila*. Unsere Ergebnisse unterstützen diese These auch für den Vorgang der Angiogenese. EphrinB2 Aktivierung an den Filopodien der *Tip Cells* reguliert die exakte, räumliche Aktivierung und Signalweiterleitung des VEGFR2 durch Endozytose. Die adäquate Aktivierung von VEGFR2 führt zu einer zielgerichteten, räumlich organisierten Migration vaskulärer Endothelzellen.

In diesem Fall führte die Ausschaltung des EphrinB2 PDZ Signalweges zu Tumoren mit verminderter Gefäßdichte und –menge und zu stark verkleinerten Tumoren. Es ist also offensichtlich, dass EphrinB2 *reverse signalling* eine wesentliche Rolle bei pathologischer Angiogenese in Tumoren spielt und das Ausschalten von EphrinB2 *reverse signalling* Tumorwachstum und –angiogenese inhibiert. Wenn EphrinB2 über VEGFR2 das Gefäßwachstum positiv beeinflusst und EphrinB2 Ausschaltung endotheliale VEGF Signalgebung inhibiert, könnte hier ein vielversprechender Ansatz einer anti-angiogenen Therapie liegen.

4.3 Antiangiogene Therapie von Hirntumoren und klinischer Bezug

Die mehrfach beschriebene Abhängigkeit des Tumorwachstums und der Metastasierung von der Angiogenese deutet darauf hin, dass eine antiangiogene Therapie ein vielversprechender Ansatz zu einer Tumorthherapie ist (Folkman 1971 und 2007; Carmeliet und Jain 2000). Die Besonderheiten der Hirntumore, wie die hohe endotheliale Proliferation, die erhöhte vaskuläre Permeabilität und die Rolle der pro-angiogenen Faktoren, wie z.B. VEGF, ma-

chen besonders diese Art von Krebs zu einem besonderen Kandidaten für diese Therapieform.

Trotzdem gibt es bisher in Europa noch kein offiziell zugelassenes Präparat für die Hirntumorthherapie, zwei Medikamente dieser Art sind für Nicht-ZNS Tumoren zugelassen: der Anti-VEGF Antikörper Bevacizumab, der VEGF neutralisiert (metastasiertes Kolonkarzinom, Brustkrebs, Nierenzellkarzinom) und die VEGF-Rezeptor Tyrosin Kinase Inhibitoren (TKIs) Sorafenib und Sunitinib (hepatozelluläres Karzinom und gastrointestinale Stromatumore). Bevacizumab (Avastin®) zeigt sich nur bei Hirntumoren effektiv, wenn es mit anderen Standardchemotherapeutika kombiniert wird (Cloughesy *et al.*, 2008) und der Behandlungserfolg, besonders hinsichtlich einer nachweisbaren Lebenszeitverlängerung, und die Art der Wirkung bleibt bislang fragwürdig und nicht ausschließlich positiv, wie weiter oben in der Diskussion ausgeführt. TKIs scheinen gleichzeitig auf Krebs- und stromale Zellen zu wirken (Jain *et al.*, 2006).

Hier offenbart sich ein interessantes Paradoxon. Wie können Medikamente, die dafür eingesetzt werden, das Gefäßwachstum zu hemmen und zu stören, dazu führen, dass Medikamente wie Chemotherapeutika, die ein gut ausgebildetes Gefäßsystem brauchen, effektiver wirken?

Die Hypothese dazu lässt sich ableiten, unter anderem aus den Wirkungen der einzelnen, in der Einleitung erwähnten, Faktoren:

Die erwähnten, anti-angiogenen Wirkstoffe, „normalisieren“ die Tumorgefäße und fördern so die Wirkung der komplementär verabreichten Zytostatika (Yuan *et al.*, 1996; Jain *et al.*, 1998; Jain, 2001; Tong *et al.*, 2004) (Winkler *et al.*, 2004) (Willett *et al.*, 2004). Hinzu kommen aber noch eine ganze Vielzahl anderer Wirkungen der Anti-VEGF Behandlungen, was in Anbetracht der Komplexität dieses Systems nicht verwundert.

Batchelor *et al.* konnten 2004 diese „Normalisierung“ bei Glioblastom Patienten unter antiangiogener Therapie nachweisen, hinzu kam noch eine Minderung des Ödems.

Was bedeutet diese Normalisierung: Im gesunden Zustand besteht eine Balance zwischen angiogenen und anti-angiogenen Faktoren, die ein organisiertes und effizientes Gefäßsystem aufrecht erhalten. Tumoren produzieren nun angiogene Faktoren, die letztlich zu überschießender Angiogenese mit einem abnormalen, nicht effizienten Gefäßnetzwerk und Ödembildung führen. In diesem Falle ist auch die Ankunft der Zytostatika an ihrem Bestimmungsort gestört. Eine antiangiogene Therapie führt nun zu einer, wohl temporären, Wiederherstellung der Balance mit besserer Perfusion und somit besserer Zytostatikaversorgung.

Zurzeit laufen eine Vielzahl von klinischen Studien mit anti-angiogenen Therapeutika (wirksam im VEGF System) bei hochgradigen Hirntumoren, die erste Erfolge hinsichtlich verschiedener Marker, wie Verminderung des Ödems, Zytostatika Response und Tumorgröße zeigen. Das weist darauf hin, dass der Ansatz, neben den Tumorzellen selbst, auch die Gefäße anzugreifen bzw. zu modulieren auch bei Hirntumoren vielversprechend ist.

Ist auch das Eph/Ephrin System ein möglicher Ansatzort für antiangiogene, bzw. grundsätzlich klinische, Therapiemöglichkeiten?

Das Screening einer Phagen Bibliothek konnte unlängst einige Peptide identifizieren, die hoch affin spezifische EphB Rezeptoren erkannten und eine sehr geringe Kreuzreaktion mit anderen EphB Rezeptoren zeigten (Koolpe *et al.*, 2005). Die zukünftige Entwicklung von spezifischen Präparaten, die in das Eph/Ephrin System eingreifen, wie Antikörper oder Rezeptor/Liganden „Traps“ oder kleinmolekulare Inhibitoren, wie z.B. klassische Eph Kinase Inhibitoren, werden zum Einen dazu führen, dass neue potentielle Medikamente entwickelt werden, zum Beispiel in der Tumorthherapie und zum Anderen

wesentliche neue Möglichkeiten eröffnen, das sehr komplexe und teilweise sehr widersprüchliche Eph/Ephrin System tiefergehend und umfassender zu erforschen und zu verstehen. Dies ist zwingend notwendig, da das bisherige Verständnis dieses Rezeptor/Liganden Systems zu gering ist, und Ergebnisse, wie in dieser Arbeit, zeigen, dass z.B. eine einfache Hemmung oder Ausschaltung des EphrinB2 längst nicht nur positive Ergebnisse erzielt. So zeigt sich bei Hemmung von EphrinB2 auf der Tumorseite ein gesteigertes, invasives Wachstum, während die Hemmung von EphrinB2 auf der Endothelseite das Tumorstadium hemmt. Ein mögliches Therapietarget, das unsere Untersuchungen aufgedeckt haben, ist die intrazelluläre Interaktion zwischen EphrinB2 und VEGFR2. Kleinmolekulare Inhibition könnte die EphrinB2 mediierte Internalisierung von VEGFR2 verhindern und so mögliche generelle negative Effekte einer EphrinB2 Inhibition auf Tumorseite umgehen.

Aber unter anderem die Entdeckung, dass viele Tumoren bestimmte Ephs überexprimieren (z.B. EphA2 in Lungentumoren, s.o.) zeigt eine Möglichkeit auf, über diesen Weg gezielt nur bestimmte Tumorzellen anzugreifen, z.B. mittels antikörpergekoppelter Tumorsuppressiva.

Mit der Entdeckung und Erforschung des Eph/Ephrin Systems ist ein neues Gebiet in dem Verständnis der Tumorbioogie eröffnet worden. Es ist ohne Zweifel, dass die klinische Anwendung des Wissens auf diesem Gebiet kurz bevor steht und neue Wege aufzeigen wird Tumoren effektiver und gezielter zu bekämpfen.

5. Zusammenfassung

Bi-direktionale Signalgebung durch EphB Rezeptoren (*forward signalling*) und ihren Liganden EphrinB (*reverse signalling*) ist in unterschiedliche physiologische, wie etwa neuronale Entwicklung, Vaskulogenese, Angiogenese und pathologische Vorgänge, wie etwa dem Tumorwachstum, involviert. Das EphB/EphrinB System ist ein wesentlicher Regulator von Zell-Zell Interaktionen, die durch abstoßende und anziehende Signale vermittelt werden. Zunehmend wird deutlich, dass Mitglieder der EphB/EphrinB Familie eine wichtige Rolle sowohl bei der pathologischen Tumorangiogenese als auch bei Tumorwachstum spielen, was sie zu attraktiven Zielen innovativer onkologischer Therapiekonzepte macht.

Ihre breite Expression in Tumorzellen und auch stromalen Zellen deutet auf eine komplexe Rolle im Tumorwachstum hin. Das Ziel dieser Arbeit war es, ein wichtiges Mitglied der Eph/Ephrin Familie, den Liganden EphrinB2 hinsichtlich seiner Aufgaben bei Tumorangiogenese und –wachstum zu untersuchen und insbesondere, zwischen tumorintrinsic (Tumorseite) und tumorextrinsic (stromale Seite) Funktionen zu unterscheiden.

Aus diesem Grunde führten wir eine genetische Inaktivierung des EphrinB2, sowohl auf Tumorseite, als auch auf der Stromaseite durch. Dazu konzipierten wir zwei Arten von *in vivo* Experimenten, bei denen wir Astrozytomzellen in ein Xenograft Mausmodell transplantierten. So transplantierten wir zunächst EphrinB2 Knockout Tumorzellen in Wildtyp-Mäuse und verglichen diese mit transplantierten Wildtyp-Tumorzellen. In einem weiteren, zweiten Experiment, transplantierten wir dann Wildtyp-Tumorzellen in Mäuse mit einer funktionellen Ausschaltung des EphrinB2 *reverse signalling* (EphrinB2dV) im Stroma und verglichen diese wiederum mit Wildtyp-Mäusen.

Die Tumoren der EphrinB2-KO Zellen entwickelten sich zu doppelter Größe verglichen mit den Wildtyp-Tumoren. Interessanterweise wandelte sich der

Invasionsphänotyp des Tumors von einem angiozentrischen, satellitären zu einem parenchymatösen. Die Tumolvaskularisierung änderte sich dabei nicht. Diese Ergebnisse zeigen, dass die tumorintrinsic Wirkung von EphrinB2 tumorsuppressiv ist. Die Runterregulation oder Inaktivierung des EphrinB Systems könnte dementsprechend also ein wichtiger Schritt in der Tumorprogression sein. Weitere Untersuchungen identifizierten Hypoxie als einen physiologischen Repressor der EphrinB2 Expression, vermittelt durch den *hypoxia inducible factor-1 α* (HIF-1 α), einen bekannten Regulator adaptiver Reaktionen auf Hypoxie. Zudem deutet die Änderung des Invasionsphänotyps auf eine wichtige Rolle des EphrinB2 bei der *vessel co-option* des Tumors hin.

Die Inaktivierung von EphrinB2 auf der stromalen Seite (EphrinB2dV Mäuse) ergab viermal kleinere Tumoren als in den Wildtyp-Mäusen. Weiterhin zeigten die EphrinB2dV Mäuse eine signifikant verminderte Gefäßfläche und reduzierte Angiogenese. Diese Ergebnisse zeigen daher eine wesentliche tumorextrinsische Funktion des EphrinB2 als Regulator der Tumorangiogenese und daraus folgend dem Tumorwachstum auf.

Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse, dass EphrinB2 grundlegende, aber divergente Funktionen im Tumorwachstum innehat, welche sich stark dahingehend unterscheiden, ob EphrinB2 auf der Tumorseite (tumorsuppressiv) oder auf der stromalen Seite (pro-angiogen, wachstumsfördernd) wirkt. Diese deutlich differenten Wirkweisen müssen genauestens in Betracht gezogen werden, wenn es in Zukunft darum geht, EphrinB2 als ein therapeutisches Ziel onkologischer Behandlungskonzepte zu betrachten.

6. Summary

Bidirectional signalling by EphB receptors (forward signalling) and their ligands EphrinB (reverse signalling) is involved in various aspects of normal physiology and disease pathogenesis including neuronal development, vasculogenesis, angiogenesis as well as tumor progression. The EphB/EphrinB system is an essential regulator of cell-cell interaction mediated by repulsive and adhesive signals. A mounting body of evidence indicates that members of the EphB/EphrinB family exert an essential role in tumor angiogenesis and tumor growth, making them attractive anti-tumor targets. However, their widespread expression in tumor and stromal cells suggest a more complex function in the control of tumor growth. The aim of this study was to investigate the role of the prominent member ephrinB2 in tumor angiogenesis and growth and to distinguish tumor intrinsic (tumor side) from extrinsic (stromal side) function of ephrinB2

For this reason we genetically inactivated ephrinB2 on the tumor side and the stromal side. We conducted two types of *in vivo* experiments in which we transplanted high grade astrocytoma cells into a xenograft mouse model. First, we transplanted ephrinB2 knockout (KO) tumor cells into wildtype mice and compared these to wildtype tumor cells (tumor side). Then, in the second experiment, we transplanted wildtype tumor cells into mice with a functional inactivation of ephrinB2 reverse signalling (ephrinB2dV) and the respective wildtype background (stromal side).

Tumors of ephrinB2-KO cells grew two times larger than wildtype tumors. Furthermore there was a considerable change in the invasive phenotype of the tumor from an angiocentric, satellite-like growth to a parenchymatous type. Notably, tumor vascularization did not change. These data demonstrate that the tumor intrinsic function of ephrinB2 is tumor suppressive. The down-regulation or inactivation of the ephrinB system may therefore be an important step in tumor progression. Further analyses identified hypoxia is a

Summary

physiological repressor of ephrinB2 expression via upregulation of hypoxia inducible factor-1 α , a common regulator of adaptive responses to hypoxia. The change in growth from an angiocentric to a parenchymatous type of invasion indicates a crucial role of ephrinB2 in vessel co-option of the tumor.

On the other hand, Inactivation of ephrinB2 on the stromal side (ephrinB2dV mice) revealed that tumors were four times smaller than tumors in wildtype mice. Furthermore the ephrinB2dV mice showed a significantly reduced vessel area and angiogenesis. These data are in line with an essential tumor extrinsic function of ephrinB2 as a positive regulator of tumor angiogenesis and subsequently tumor growth.

Taken together, these data show that ephrinB2 has essential but divergent functions in tumor growth depending on whether it acts on the tumor side (tumor suppressive) or the stromal side (pro-angiogenic, tumor promoting). These contrasting functions of ephrinB2 in tumor growth have to be carefully taking into account when using ephrinB2 as a potential anti-tumor therapy target.

7. Literaturverzeichnis

- ACKER T., PLATE KH. (2002)
A role for hypoxia and hypoxia inducible transcription factors in tumor physiology
J. Mol. Med., **80**, 562-575.
- ADAMS RH., DIELLA F., HENNIG S., HELMBACHER F., DEUTSCH U., KLEIN R. (2001)
The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration.
Cell, **104**, 57–69.
- ADAMS RH., WILKINSON GA., WEISS C., DIELLA F., GALE NW., DEUTSCH U., RISSAU W., KLEIN R. (1999)
Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: Demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis and sprouting angiogenesis.
Genes & Dev., **13**, 295–306.
- BAR-ELI M. (1999)
Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma.
Pathobiology, **67**, 12–18.
- BATCHELOR TT. ET AL. (2007).
AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients.
Cancer Cell, **11**, 83–95.
- BATLLE E., BACANI J., BEGTHEL H., JONKHEER S., GREGORIEFF A., VAN DE BORN F., MALATS N., SANCHO E., PAWSON T., GALLINGER S., PALS S., CLEVERS H. (2005)
EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression.
Nature, **435**, 1126–1130.
- BÄR T., WOLFF JR. (1972).
The formation of capillary basement membranes during internal vascularization of the rat's cerebral cortex.
Zellforsch Mikrosk. Anat., **133**, 231–248.
- BEHIN A., HOANG-XUAN K, CARPENTIER AF, DELATTRE JY (2003).
Primary brain tumors in adults.
Lancet, **361**, 323-331.

- BENJAMIN LE., GOLIJANIN D., ITIN A., PODE D., KESHET E. (1999)
Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal.
J. Clin. Invest., **103**, 159–165
- BERCLAZ G., *et al* (1996).
Expression of the receptor protein tyrosine kinase myk-1–htk in normal and malignant mammary epithelium.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **226**, 869–875.
- BOYD AW., LACKMANN M. (2001)
Signals from Eph and ephrin proteins: a developmental tool kit.
Science, **STKE 112**, RE20.
- BRANTLEY DM., CHENG N., THOMPSON EJ., LIN Q., BREKKEN RA., THORPE PE., MURAOKA RS., CERRETTI DP., POZZI A., JACKSON D., *ET AL.* (2002)
Soluble Eph A receptors inhibit tumor angiogenesis and progression in vivo. *Oncogene*, **21**, 7011–7026.
- BRUCKNER K., PASQUALE EB., KLEIN R. (1997)
Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors.
Science, **275**, 1640–1643.
- CARLES-KINCH K., KILPATRICK KE., STEWART JC., KINCH MS. (2002)
Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior.
Cancer Res., **62**, 2840– 2847.
- CARMELIET P., *ET AL.* (1996)
Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele.
Nature **380**, 435–439
- CARMELIET P., JAIN RK. (2000).
Angiogenesis in cancer and other diseases.
Nature **407**, 249–257.
- CIOSEK T., MONSCHAU B., KREMOSER C., LÖSCHINGER J., LANG S., MÜLLER BK., BONHOEFFER F., DRESCHER U. (1998)
Eph receptor-ligand interactions are necessary for guidance of retinal ganglion cell axons in vitro.
Eur. J. Neurosci., **10(5)**, 1574-80.
- CLARK ER., CLARK EL. (1939)
Microscopic observations on the growth of blood capillaries in the living mammal.
Am. J. Anat., **64**, 251–301.
-

CLOUGHESY TF., PRADOS MD, WEN PY., MIKKELSEN T., ABREY LE., SCHIFF D., YUNG WK., MAOXIA Z., DIMERY I., FRIEDMAN HS. (2008)

A phase II, randomized, non-comparative clinical trial of the effect of bevacizumab (BV) alone or in combination with irinotecan (CPT) on 6-month progression free survival (PFS6) in recurrent, treatment-refractory glioblastoma (GBM).

J. Clin. Oncol., **26**, May 20 suppl, 2010b

CORTINA C., PALOMO-PONCE S., IGLESIAS M., FERNÁNDEZ-MASIP JL., VIVANCOS A., WHISSELL G., HUMÀ M., PEIRÓ N., GALLEGO L., JONKHEER S., DAVY A., LLORETA J., SANCHO E., BATLLE E.(2007)

EphB-ephrin-B interactions suppress colorectal cancer progression by compartmentalizing tumor cells.

Nat. Genet., **39(11)**, 1376-83.

COWAN CA., HENKEMEYER M. (2001)

The SH2/SH3 domain adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals.

Nature, **413**, 174–179.

CUVIER C., JANG A., HILL RP. (1997)

Exposure to hypoxia, glucose starvation and acidosis: effect on invasive capacity of murine tumor cells and correlation with cathepsin (L1 B) secretion.

Clin. Exp. Metastasis., **15**, 19 –25.

DAVIS S., ALDRICH TH., JONES PF., ACHESON A., COMPTON DL., JAIN V., RYAN TE., BRUNO J., RADZIEJEWSKI C., MAISONPIERRE PC., YANCOPOULOS GD. (1996)

Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning.

Cell, **87**, 1161–1169.

DE CLERCK YA., LAUG WE. (1993)

The role of the extracellular matrix in tumor invasion, metastasis and angiogenesis.

Drug Resistance in Oncology, 121-163.

DEDHAR S. (1990)

Integrins and tumor invasion.

Bioessays, **12**, 583- 590.

DEDHAR S., SAULNIER R. (1990)

Alterations in integrin receptor expression on chemically transformed human cells: specific enhancement of laminin and collagen receptor complexes.

J Cell Bio., **1100**, 481-489.

- DIEHL S., BRUNO R., WILKINSON GA., LOOSE DA., WILTING J., SCHWEIGERER L., KLEIN R. (2005)
Altered expression patterns of EphrinB2 and EphB2 in human umbilical vessels and congenital venous malformations.
Pediatr. Res., **57**, 537–544.
- DING H., RONCARI L., SHANNON P., WU X., LAU N., KARASKOVA J., GUTMANN DH., SQUIRE JA., NAGY A., GUHA A. (2001)
Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas.
Cancer Res., **61**, 3826–3836.
- DOR Y., PORAT R., KESHET E. (2001)
Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis.
Am. J. Physiol., **280**, C1367–C1374
- DRESCHER U., KREMOSER C., HANDWERKER C., LÖSCHINGER J., NODA M., BONHOEFFER F. (1995)
In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for eph receptor tyrosine kinases.
Cell, **82**, 359-370.
- DUMONT DJ., GRADWOHL G., FONG GH., PURI MC., GERTSENSTEIN M., AUERBACH A., BREITMAN ML. (1994)
Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo.
Genes Dev., **8**, 1897–1909.
- DUMONT DJ., YAMAGUCHI TP., CONLON RA., ROSSANT J., BREITMAN ML. (1992)
Tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors.
Oncogene, **7**, 1471–1480.
- DVORAK HF., BROWN LF., DETMAR M., DVORAK AM. (1995)
Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis.
Am. J. Pathol., **146**, 1029–1039.
- DVORAK HF., BROWN LF., DETMAR M., DVORAK AM. (1995)
Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis.
Am. J. Pathol. **146**,, 1029–1039

- EASTY DJ., GUTHRIE BA., MAUNG K., FARR CJ., LINDBERG RA., TOSO RJ., HERLYN M., BENNETT DC. (1995)
Protein B61 as a new growth factor: expression of B61 and up-regulation of its receptor epithelial cell kinase during melanoma progression.
Cancer Res., **55**, 2528-2532.
- ELICEIRI BP., ET AL. (1999)
Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability.
Mol. Cell, **4**, 915–924.
- ENGERMAN RL., PFAFFENBACH D., DAVIS MD. (1967).
Cell turnover of capillaries.
Lab. Invest., **17**, 738–743.
- FELDHEIM DA., KIM YI., BERGEMANN AD., FRISEN J., BARBACID M., FLANAGAN JG. (2000)
Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping.
Neuron, **25**, 563–574.
- FELDKAMP MM., LAU N., RAK J., KERBEL RS., GUHA A. (1999)
Normoxic and hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) by astrocytoma cells is mediated by Ras.
Int. J. Cancer, **81**, 118–124.
- FERRARA N., HENZEL WJ. (1989)
Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **161**, 851-858.
- FERRARA N., DAVIS-SMYTH T. (1997).
The biology of vascular endothelial growth factor
Endocr. Rev., **18**, 4-25.
- FERRARA N., ET AL. (1996)
Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene.
Nature **380**, 439–442
- FOLKMAN, J., WATSON, K., INGBER, D., HANAHAN, D. (1989).
Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia.
Nature, **339**, 58-61.

- FOLKMAN J. (1971).
Tumor angiogenesis: therapeutic implications.
New England Journal of Medicine, **285**, 1182-1186.
- FOLKMAN, J. (1985).
Tumor Angiogenesis.
Adv. Cancer Res., **43**, 175-203.
- FOLKMAN, J. (1986).
How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue?
Cancer Research, **46**, 467-473.
- FOLKMAN J. (2007).
Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?
Nature Rev. Drug Discov., **6**, 273–286.
- FÜLLER T., KORFF T., KILIAN A., DANDEKAR G., AUGUSTIN HG. (2003)
Forward EphB4 signalling in endothelial cells controls cellular repulsion and segregation from ephrinB2 positive cells.
J. Cell Sci., **116**, 2461–2470.
- GALE NW., ET AL. (1996)
Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis.
Neuron, **17**, 9–19.
- GALE NW., BALUK P., PAN L., KWAN M., HOLASH J., DECHIARA TM., McDONALD DM., YANCOPOULOS GD. (2001)
Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells.
Dev. Biol., **230**, 151– 160.
- GERBER HP., DIXIT V., FERRARA N. (1998)
Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells.
J. Biol. Chem., **273**, 13313–13316.
- GERBER HP., ET AL. (1999)
VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation.
Nat. Med. **5**, 623–628
- GERETY SS., WANG HU., CHEN ZF., ANDERSON DJ. (1999)
Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrinB2 in cardiovascular development.
Mol. Cell, **4**, 403–414.

- GERHARDT H., GOLDING M., FRUTTIGER M, RUHRBERG C., LUNDKVIST A., ABRAMSON A., JELTSCH M, MITCHELL C., ALITALO K., SHIMA D., BETSHOLTZ C. (2003)
VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia
The Journal of Cell Biology, **161 (6)**, 1163–1177.
- GIESE A., WESTPHAL M. (1996)
Glioma invasion in the central nervous system.
Neurosurgery, **39**, 235-250.
- GOEDE V., SCHMIDT T., KIMMINA S., KOZIAN D., AUGUSTIN HG. (1998).
Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab. Invest.* **78**, 1385–1394
- GOTTESMAN MM. (1990).
The role of proteases in cancer.
Seminars in Cancer Biology. W.B. Saunders. Philadelphia, 97-160.
- GUO D., JIA Q., SONG HY., WARREN RS., DONNER DB. (1995)
Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains.
J. Biol. Chem. **270**, 6729–6733
- GUHA A., FELDKAMP MM., LAU N., BOSS G., PAWSON A. (1997)
Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation.
Oncogene, **15**, 2755–2765.
- HANAHAN D., FOLKMAN J. (1996).
Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis
Cell, **86**, 353–364.
- HIMANEN JP., NIKOLOV DB. (2003)
Molecules in focus: Eph receptors and ephrins.
Int. J. Biochem. & Cell Bio., **35**, 130–134.
- HIMANEN JP., RAJASHANKAR KR., LACKMANN M., COWAN CA., HENKEMEYER M., NIKOLOV DB. (2001)
Crystal structure of an Eph receptor–ephrin complex.
Nature, **414**, 933–938.
- HIRAI H., MARU Y., HAGIWARA K., NISHIDA J., TAKAKU F. (1987)
A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene.
Science, **238(4834)**, 1717–20.

- HOLASH J., MAISONPIERRE PC., COMPTON D., BOLAND P., ALEXANDER CR., ZAGZAG D., YANCOPOULOS GD., WIEGAND SJ. (1999)
Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angio-
poietins and VEGF.
Science, **284**, 1994–1998.
- HOLLAND SJ., ET AL. (1996).
Bidirectional signalling through the EPH family receptor Nuk and its
transmembrane ligands.
Nature, **383**, 722–725.
- HUANG LE., GU J., SCHAU M., BUNN HF. (1998)
Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-
dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 7987-7992.
- HSU SM., RAINE L., FANGER H. (1981)
The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in
immunoperoxidase technics.
Am. J. Clin. Pathol., **75(6)**, 816-21.
- HYNES RO. (1992)
Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion.
Cell, **69(1)**, 11–25.
- JAIN RK., ET AL. (1998).
Endothelial cell death, angiogenesis, and microvascular function after
castration in an androgen-dependent tumor: role of vascular endothe-
lial growth factor.
Proc. Natl Acad. Sci. USA, **95**, 10820–10825.
- JAIN RK. (2001).
Normalizing tumor vasculature with antiangiogenic therapy: a new
paradigm for combination therapy.
Nature Med., **7**, 987–989.
- JAIN RK., DUDA DG., CLARK JW., LOEFFLER JS. (2006).
Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer.
Nature Clin. Pract. Oncol., **3**, 24–40.
- JEKELY G., SUNG HH., LUQUE CM., RORTH P. (2005)
Regulators of endocytosis maintain localized receptor tyrosine kinase
signalling in guided migration.
Developmental Cell, **9**, 197-207.

- JEON BH., KHANDAY F., DESHPANDE S., HAILE A., OZAKI M., IRANI K. (2003)
Tie-ing the antiinflammatory effect of angiotensin-1 to inhibition of NF-
KB.
Circ. Res., **92**, 586–588.
- KALEBIC T., GARBISA S., GLASER B., LIOTTA LA. (1983).
Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial
cells.
Science, **221**, 281-283.
- KALO MS., PASQUALE EB. (1999)
Multiple *in vivo* tyrosine phosphorylation sites in EphB receptors.
Biochemistry, **38**, 14396–14408.
- KATAOKA H., IGARASHI H., KANAMORI M., ET AL. (2004)
Correlation of EPHA2 overexpression with high microvessel count in
human primary colorectal cancer.
Cancer Sci., **95**, 136 – 41.
- KERTESZ N., KRASNOPEROV V., REDDY R., LESHANKSI L., RAM KUMAR S., ZOZULYA
SS., GILL P. (2006)
The soluble extracellular domain of EphB4 (sEphB4) antagonizes
EphB4-EphrinB2 interaction, modulates angiogenesis and inhibits tu-
mor growth
Blood, **107**, 2330-2338.
- KITAMOTO Y., TOKUNAGA H., TOMITA K. (1997)
Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse
kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis.
J. Clin. Invest., **99**, 2351–2357.
- KIM, KJ., ET AL.. (1993)
Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis
suppresses tumor growth *in vivo*.
Nature, **362**, 841–844.
- KLEIHUES P, CAVENEE WK (2000).
World Health Organisation Classification of Tumors.
*Pathology and genetics of tumours of the nervous system. IARC Press
Lyon.*
- KLEMENT G., ET AL. (2000)
Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2
antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity.
J. Clin. Invest. **105**, R15–R24.

- KOOLPE M., BURGESS R., DAIL M., PASQUALE EB. (2005)
EphB receptor-binding peptides identified by phage display enable design of an antagonist with ephrin-like affinity.
J. Biol. Chem., **280**, 17301–17311.
- KWAK HJ., LEE SJ., LEE YH., RYU CH., KOH KN., CHOI HY., KOH GY. (2000)
Angiopoietin-1 inhibits irradiation- and mannitol induced apoptosis in endothelial cells.
Circulation, **101**, 2317–2324.
- LAMPUGNANI MG., ET AL. (2006).
Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signalling from intracellular compartments.
The Journal of cell biology, **174**, 593-604.
- LAMSZUS K., KUNKEL P., WESTPHAL M. (2003)
Invasion as limitation to antiangiogenic glioma therapy.
Acta Neurochir. Suppl., **88**, 169-177.
- LEE CG., ET AL. (2000)
Anti-vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions.
Cancer Res., **60**, 5565–5570.
- LEENDERS WP., KUSTERS B., VERRIJP K., MAASS C., WESSELING P., HEERSCHAP A., RUITER D., RYAN A., DE WAAL R. (2004)
Antiangiogenic therapy of cerebral melanoma metastases results in sustained tumor progression via vessel co-option.
Clin. Cancer Res., **10**, 6222-6230.
- LEFRANC F., BROTCHE J., KISS R. (2005)
Possible future issues in the treatment of glioblastomas: Special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis.
J. Clin. Oncol., **23**, 2411-2422.
- LEUNG DW., CACHIANES G., KUANG WJ., GOEDDEL DV., FERRARA N. (1989)
Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen.
Science, **246**, 1306–1309.
- LIOTTA LA. (1986).
Tumor invasion and metastases - role of the extracellular matrix.
Rhoads Memorial Award lecture.
Cancer Res., **46**, 1-7.
-

LIOTTA LA., MANDLER R., MURANO G., KATZ DA., GORDON RK., CHIANG PK., SCHIFFMANN E. (1986)

Tumor cell autocrine motility factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 3302-3306.

LIU W., ET AL. (2002).

Coexpression of ephrin-Bs and their receptors in colon carcinoma.
Cancer, **94**, 934–939.

LUGLI A., SPICHTIN H., MAURER R., MIRLACHER M., KIEFER JP., HUUSKO D., AZORSA L., TERRACCIANO F., SAUTER G., KALLIONIEMI OP., MOUSSES S., TORNILLO L.(2005)

EphB2 expression across 138 human tumor types in a tissue microarray: high levels of expression in gastrointestinal cancers.
Clin. Cancer Res., **11**, 6450– 6458.

MAISONPIERRE PC., SURI C., JONES PF., BARTUNKOVA S., WIEGAND SJ., RADZIEJEWSKI C., COMPTON D., MCCLAIN J., ALDRICH TH., PAPADOPOULOS N., ET AL. (1997)

Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, **277**, 55–60.

MARIN-PADILLA M., (1985).

Early vascularization of the embryonic cerebral cortex:
Golgi and electron microscopic studies.
J. Comp. Neurol., **241**, 237–249.

MARTENS T., LAABS Y., GUNTHER HS., KEMMING D., ZHU Z., WITTE L, HAGEL C., WESTPHAL M., LAMSZUS K. (2008)

Inhibition of glioblastoma growth in a highly invasive nude mouse model can be achieved by targeting epidermal growth factor receptor but not vascular endothelial growth factor receptor-2.
Clin. Cancer Res., **14**, 5447-5458.

MARTINY-BARON G., KORFF T., SCHAFFNER F., ET AL. (2004)

Inhibition of tumor growth and angiogenesis by soluble EphB4.
Neoplasia, **6**, 248-257.

MAXWELL PH., WIESENER MS., ET. AL. (1999)

The tumour supressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.
Nature, **399**, 271-275.

MÄKINEN T., ADAMS RH., BAILEY J., LU Q., ZIEMIECKI A, ALITALO K, KLEIN R., WILKINSON GA. (2005)

PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature.
Genes Dev., **19(3)**, 397-410.

- MEININGER CJ., SCHELLING ME., GRANGER HJ. (1988)
Adenosine and hypoxia stimulate proliferation and migration of endothelial cells.
Am. J. Physiol., **255**, 554–562.
- MIAO H., BURNETT E., KINCH M., SIMON E., WANG B. (2000)
Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation.
Nat. Cell Biol., **2(2)**, 62–9.
- NAGY JA. ET AL. (2002)
Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis.
J. Exp. Med., **196**, 1497–1506.
- NAKADA M., NISKA JA., MIYAMORI H., McDONOUGH WS., WU J., SATO H., BERENS ME. (2004)
The phosphorylation of EphB2 receptor regulates migration and invasion of human glioma cells.
Cancer Res., **64(9)**, 3179-85.
- NOREN K., FOOS GA., HAUSER C., PASQUALE EB. (2005)
The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway
Nature Cell Biology, **8**, 815-825.
- NYKANEN AI., KREBS R., SAARISTO A., TURUNEN P., ALITALO K., YLA-HERTTUALA S., KOSKINEN PK., LEMSTROM KB. (2003)
Angiopoietin-1 protects against the development of cardiac allograft arteriosclerosis.
Circulation, **107**, 1308–1314.
- OGAWA K., PASQUALINI R., LINDBERG RA., KAIN R., FREEMAN AL., PASQUALE EB. (2000).
The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization.
Oncogene, **19**, 6043–6052.
- OHGAKI H., KIEIHUES P. (2005).
Epidemiology and etiology of gliomas.
Acta Neuropathol., **109**, 93–108.
- PAEZ-RIBES M., ALLEN E., HUDOCK J., TAKEDA T., OKUYAMA H., VINALS F., INOUE M., BERGERS G., HANAHAN D., CASANOVAS O. (2009)
Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis.
Cancer Cell, **15**, 220-231.

PALMER A., ET AL. (2002)

EphrinB phosphorylation and reverse signalling: regulation by Src kinases and PTP- BL phosphatase.
Mol. Cell, **9**, 725–737.

PARK JE., CHEN HH., WINER J., HOUCK KA., FERRARA N. (1994)

Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, *in vitro* and *in vivo*, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR.
J. Biol. Chem., **269**, 25646–25654.

PARTANEN J., ARMSTRONG E., MAKELA TP., KORHONEN J., SANDBERG M., RENKONEN R., KNUUTILA S., HUEBNER K., ALITALO K. (1992)

A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains.
Mol. Cell. Biol., **12**, 1698–1707.

PAUL R., ET AL. (2001)

Src deficiency or blockade of Src activity in mice provides cerebral protection following stroke.
Nat. Med., **7**, 222–227.

POULSEN HS., GRUNNET K., SORENSEN M., OLSEN P., HASSELBALCH B., NELAUSEN K., KOSTELJANETZ M., LASSEN U. (2009)

Bevacizumab plus irinotecan in the treatment patients with progressive recurrent malignant brain tumours.
Acta Oncol, **48**, 52-58.

RATCLIFFE PJ., O'ROURKE JF., ET AL. (1998)

Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression.
J. Exp. Biol., **201**, 1153-1162.

RUBENSTEIN JL., KIM J., OZAWA T., ZHANG M., WESTPHAL M., DEEN DF., SHUMAN MA. (2000)

Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption.
Neoplasia, **2**, 306-314.

SATO TN., TOZAWA Y., DEUTSCH U., WOLBURG-BUCHHOLZ K., FUJIWARA Y, GENDRON-MAGUIRE M., GRIDLEY T., WOLBURG H., RISAU W., QIN Y. (1995)

Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation.
Nature, **376**, 70–74.

SCHLESSINGER J., (2000)

Cell signalling by receptor tyrosine kinases,
Cell, **103**, 211–225.

- SEMENZA GL. (2001)
HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing.
Curr. Opin. Cell Biol., **13**(2), 167-171.
- SEMENZA GL. (2002)
Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1.
Biochem. Pharmacol., **64**, 993–998
- SEMENZA GL. AND WANG GL. (1995)
Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1.
J. Biol. Chem., **270**, 1230-1237.
- SEMENZA GL. AND WANG GL. (1992)
A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation.
Mol. Cell Biol., **12**, 5447-5454.
- SENGER DR., ET AL. (1983)
Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.
Science, **219**, 983–985.
- SHALABY F., ROSSANT J., YAMAGUCHI TP., GERTSENSTEIN M., WU XF., BREITMAN ML., SCHUH AC. (1995)
Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice.
Nature, **376**, 62–66.
- SHIN D., GARCIA-CARDENA G., HAYASHI SI, GERETY S., ASAHARA T., STAVRAKIS G., ISNER J., FOLKMAN J., GIMBRONE MA., ANDERSON DJ. (2001)
Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization.
Dev. Biol., **230**, 139–150.
- SURI C., JONES PF., PATAN S., BARTUNKOVA S., MAISONPIERRE PC., DAVIS S., SATO TN., YANCOPOULOS GD. (1996)
Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis.
Cell, **87**, 1171–1180.
- THAKER PH., DEAVERS M., CELESTINO J., ET AL. (2004)
EphA2 expression is associated with aggressive features in ovarian carcinoma.
Clin. Cancer Res., **10**, 5145 – 5150.
-

THURSTON G., RUDGE JS., IOFFE E., ZHOU H., ROSS L., CROLL SD., GLAZER N., HOLASH J., McDONALD DM., YANCOPOULOS GD. (2000)
Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage.
Nat. Med., **6**, 460–463.

TODA Y., KONO K., ABIRU H. (1999)
Application of tyramide signal amplification system to immunohistochemistry : a potent method to localize antigens that are not detectable by ordinary method.
Pathol. Int., **49**, 479-83.

TONG RT., ET AL. (2004)
Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors.
Cancer Res., **64**, 3731–3736.

TOTH J., CUTFORTH T., GELINAS AD., BETHONEY KA., BARD J., HARRISON CJ., (2001)
Crystal structure of an ephrin ectodomain,
Dev. Cell, **1**, 83–92.

VALENZUELA DM., GRIFFITHS JA., ROJAS J., ALDRICH TH., JONES PF., ZHOU H., McCLAIN J., COPELAND NG., GILBERT DJ., JENKINS NA., ET AL. (1999)
Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 1904–1909.

VAN BRUGGEN N., ET AL. (1999)
VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain.
J. Clin. Invest. **104**, 1613–1620.

VREDENBURGH JJ., DESJARDINS A., HERNDON JE., DOWELL JM., REARDON DA., QUINN JA., RICH JN., SATHORNSUMETEE S., GURURANGAN S., WAGNER M., ET AL. (2007)
Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma.
Clin Cancer Res., **13**, 1253-1259.

WALKER-DANIELS J., COFFMAN K., AZIMI M., ET AL. (1999)
Overexpression of the EphA2 tyrosine kinase in prostate cancer.
Prostate, **41**, 275 – 80.

WALKER-DANIELS J., HESS AR., HENDRIX MJ., KINCH MS. (2003)
Differential regulation of EphA2 in normal and malignant cells.
Am. J. Pathol., **162**, 1037– 1042.

- WANG GL., JIANG BH., RUE EA., SEMENZA GL. (1995)
Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, **92**, 5510-5514.
- WANG HU., CHEN ZF., ANDERSON DJ. (1998)
Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4.
Cell, **93**,741–753.
- WENGER RH. (2002)
Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression.
FASEB J., **16**, 1151-1162.
- WILLETT CG., ET AL. (2004)
Direct evidence that the VEGFspecific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer.
Nature Med., **10**, 145–147.
- WINKLER F., ET AL. (2004).
Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1 and matrix metalloproteinases.
Cancer Cell, **6**, 553–563.
- WITZENBICHLER B., WESTERMANN D., KNUEPPEL S., SCHULTHEISS HP., TSCHOPE C. (2005)
Protective role of angiopoietin-1 in endotoxic shock.
Circulation, **111**, 97–105.
- WU Q., ET AL. (2004).
Expression of Ephb2 and Ephb4 in breast carcinoma.
Pathol. Oncol. Res., **10**, 26–33.
- WYKOSKY J., GIBO DM., STANTON C., DEBINSKI W. (2005)
EphA2 as a novel molecular marker and target in glioblastoma multiforme.
Mol. Cancer Res., **3(10)**, 541-51.
- XIAO A., WU H., PANDOLFI PP., LOUIS DN., VAN DYKE T. (2002)
Astrocyte inactivation of the pRb pathway predisposes mice to malignant astrocytoma development that is accelerated by PTEN mutation.
Cancer Cell **1**, 157–168.

YUAN F., *ET AL.* (1996)

Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 14765–14770.

ZAGZAG D., ZHONG H., *ET AL.* (2000)

Expression of hypoxia-inducible factor HIF1 α in brain tumors: association with angiogenesis, invasion and progression.
Cancer, **88(11)**, 2606-2618.

ZELINSKI DP., ZANTEK ND., STEWART JC., IRIZARRY AR., KINCH MS. (2001)

EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells.
Cancer Res., **61(5)**, 2301–6.

ZÜLCH KJ. (1979).

World Health Organization. Histological typing of tumours of the central nervous system.
World Health Organization Geneva.

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Till Acker für die Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung in den vergangenen Jahren herzlichst danken.

Durch seine direkte, engagierte und ehrgeizige Art die ich kennenlernen durfte, hat er nicht nur meine Freude an der medizinischen Forschung als Solche geweckt, sondern er hat mir zudem auch vorgelebt, dass Ausdauer und Ehrgeiz die unverzichtbare Basis einer erfolgreichen Arbeit in der Forschung darstellen. Darüber hinaus habe ich ihn auch als Privatmensch kennen und schätzen gelernt und hoffe, dass der wissenschaftliche Kontakt auch in Zukunft bestehen bleibt.

In gleichem Maße zu Dank verpflichtet fühle ich mich Sascha Seidel, Cornelia Depner und Anne-Theres Henze.

Sie waren jeder meiner Fragen gegenüber geduldig aufgeschlossen und haben mich mit viel Geduld in die Laborarbeit eingeführt. Nicht zuletzt wäre die Zeit im Labor ohne sie auch nur halb so unterhaltsam und angenehm und die Strecken nachlassender Motivation deutlich schwerer zu bewältigen gewesen.

Und zuletzt möchte ich denen danken, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre. Die zu jedem Zeitpunkt für alle meine Fragen und Frustrationen ein offenes Ohr hatten und auch ohne deren finanzielle Unterstützung das Alles in der kurzen Zeit nicht möglich gewesen wäre. Meinen Eltern Bernd und Susanne. Und meinen Geschwistern Max und Lea, die jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

10. Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen,