

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Onkologisches Zentrum
II. Medizinische Klinik und Poliklinik
Onkologie, Hämatologie und Knochenmarktransplantation
mit der Sektion Pneumologie

Direktor: Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

Maligne periphere Nervenscheidentumoren bei Neurofibromatose Typ 1: Angiogeneseprofil

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Janna-Lisa Velthaus
aus Papenburg

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.03.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. L. Oliveira-Ferrer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. W. Fiedler

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNST) im Rahmen der Neurofibromatose	
Typ 1	1
1.1.1	Neurofibromatose Typ 1 (NF1)	1
1.1.2	MPNST	3
1.1.3	Tumorgenese der MPNST	4
1.1.4	Therapie	5
1.2	Angiogenese.....	6
1.2.1	Blutgefäßsystem.....	6
1.2.2	Gefäßneubildung.....	7
1.3	Die einzelnen pro- und antiangiogene Faktoren	9
1.3.1	VEGF-Familie.....	9
1.3.2	Neuropiline	11
1.3.3	Semaphorine	13
1.3.4	Integrine	14
1.3.5	Endogene Inhibitoren der Angiogenese.....	17
1.3.6	Cilengitide.....	19
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Zellen	21
2.1.2	Tumormaterial.....	21
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien, Medien	21

2.1.4	Verbrauchsmaterialien	23
2.1.5	Geräte und sonstige Materialien	24
2.1.6	Antikörper	25
2.1.7	Primer	26
2.1.8	Plasmide	26
2.1.9	Puffer	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Kultivierung von MPNST-Zellen	28
2.2.2	Kultivierung von PAE-Zellen	29
2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	29
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl	29
2.2.5	Durchflusszytometrie	30
2.2.6	RNA-Isolierung	31
2.2.7	cDNA-Synthese	32
2.2.8	Quantitative Real-Time-PCR	32
2.2.9	Herstellung von konditionierten Medien (CM) und Aufkonzentrieren der von PAE-sezernierenden Faktoren	33
2.2.10	Western-Blot	34
2.2.11	Proliferations-Assays	35
2.2.12	Apoptose-Assays	36
2.2.13	Invasion-Assays	37
2.2.14	Immunhistochemische Färbungen (IHC)	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Expression angiogener Faktoren in MPNST	40

3.1.1	Expressionsanalysen in MPNST-Zelllinien	40
3.1.2	Expression angiogener Faktoren in Gewebeproben	44
3.2	Wirkung antiangiogener Faktoren auf MPNST-Zellen	47
3.2.1	Einfluss von anti-VEGF-D auf die Proliferation von MPNST-Zelllinien	47
3.2.2	Einfluss von Sema3F, sNrp-1, Tum, mEs, TSP-2 auf die Proliferation von MPNST-Zelllinien	49
3.2.3	Einfluss von Sema 3F, sNrp-1 und TSP-2 auf die Invasivität von MPNST-Zellen	53
3.2.4	Einfluss von CGT	54
3.2.5	Apoptose-Assays nach Inkubation mit CGT	56
4	Diskussion	59
5	Zusammenfassung	68
5.1	Abstract	69
6	Abkürzungsverzeichnis	- 70 -
7	Literaturverzeichnis	- 74 -
8	Danksagung	- 91 -
9	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
10	Eidesstattliche Erklärung	- 93 -

1 Einleitung

1.1 Maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNST) im Rahmen der Neurofibromatose Typ 1

1.1.1 Neurofibromatose Typ 1 (NF1)

Die Neurofibromatose Typ 1, auch Morbus Recklinghausen genannt, ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die erstmals 1881 von Friedrich von Recklinghausen beschrieben wurde. Sie betrifft vor allem Haut und Nervensystem, sodass sie zum Formenkreis der Phakomatosen gezählt wird. Die NF1 tritt mit einer Inzidenz von etwa 1:2500 bis 1:3000 auf, wobei ca. 50% vererbt sind und 50% Neumutationen (Lammert et al., 2005; Evans et al., 2010). Vererbt wird die Erkrankung dabei mit voller Penetranz, die klinischen Manifestationen können jedoch variieren (Viskochil, 2002).

Zu den typischen Charakteristika gehören Café-au-lait Flecken, das sogenannte Freckling, Lischknötchen der Iris, ossäre Dysplasien, kardiovaskuläre Anomalien, psychomotorische Entwicklungsstörungen und Intelligenzminderung sowie vor allem auch die Entwicklung von benignen und malignen Tumoren v.a. ausgehend vom Nervensystem (periphere Nervenscheidentumore, Optikusgliome), aber auch andere Neoplasien (Leukämien, Phäochromozytome) (National Institutes of Health Consensus Development Conference 1988; Huson et al., 1989).

Allen voran steht die Bildung der benignen Neurofibrome, die gleichzeitig namensgebend für die Erkrankung waren. Sie treten als kutane, subkutane oder plexiforme Nervenscheidentumore auf und bestehen aus verschiedenen Zellarten, den Schwannzellen als Hauptkomponente und als die Zellen, die die Bildung der Neurofibrome initiieren, sowie den Fibroblasten, Mastzellen und Perineuralzellen, die ebenfalls zur Tumorbildung beitragen (Kluwe et al, 1999; Rubin und Gutmann, 2005).

Kutane Neurofibrome treten bei fast allen Patienten mit NF1 auf, gehäuft am Rumpf, seltener am Hals-/ Kopfbereich. Sie beginnen meist erst in der 2. Lebensdekade zu wachsen, ihre Anzahl vermehrt sich dann aber über das ganze Erwachsenenalter, wobei die Vermehrung phasenweise abläuft mit Zeiten einer starken Tumormehrung abwechselnd mit Ruhephasen ohne weitere Bildung von Neurofibromen (Huson et al., 1989; Rubin & Gutmann, 2005). Die plexiformen Neurofibromen dagegen sind kongenital und deren Wachstum umgekehrt proportional zum Lebensalter (Kehrer-Sawatzki und Mautner, 2009).

Das Hauptproblem der kutanen Neurofibrome ist ein kosmetisches und die daraus entstehende psychosoziale Belastung, sie führen fast nie zu Schmerzen oder neurologischen Defiziten und bergen sozusagen kein Risiko einer malignen Entartung (Kehrer-Sawatzki & Mautner, 2009). Die Plexiformen Neu-

rofibrome wachsen entlang des Nerven, können das umliegende Gewebe infiltrieren und zu Knochenhypertrophien föhren, wodurch diese Neurofibrome vermehrt mit Schmerzen und neurologischen Defiziten einhergehen (Kehrer-Sawatzki & Mautner, 2009; Mautner et al., 2006). Zudem können die plexiformen Neurofibrome im Gegensatz zu den kutanen maligne entarten (Riccardi, 2007; Ferner & Gutman 2002). Bei Patienten mit intern wachsenden plexiformen Neurofibromen ist dabei das Vorkommen von MPNST etwa 20-fach häufiger als bei Patienten ohne interne Neurofibrome; die superfi-ziell wachsenden plexiformen Neurofibrome sind nicht mit einem gehäuften Vorkommen von MPNST assoziiert (Tucker et al, 2005). Mittels MRT-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass etwa 50% der NF1-Patienten interne plexiforme Neurofibrome aufweisen (Mautner et al., 2008). Dabei scheint, eine hohe Tumorlast an internen plexiformen Neurofibromen auch mit einem erhöhten Risiko für MPNST einherzugehen (Mautner et al., 2008).

Genetik der NF1: Zu Grunde liegt der Erkrankung eine Mutation des NF1-Gens, welches auf dem Chromosom 17 im Bereich q11.2 lokalisiert ist (Ledbetter et al., 1989; Viskochil et al., 1990). Dabei kommen verschiedenste Mutationen vor, von großen Deletionen, die neben dem NF1-Gen noch einige andere umfassen, bis zu kleinen Mutationen, die nur einige Basenpaare umfassen (Daston et al., 1992).

Das Genprodukt, für das das NF1-Gen kodiert, ist das Neurofibromin, welches v.a. im Nervensystem exprimiert wird und zwar von den Nervenzellen, Oligodendrozyten und myelinisierenden Schwannzellen (Daston et al., 1992).

Neurofibromin fungiert als Tumorsuppressor, indem seine GAP (GTPase activating protein) verwandte Domäne (GRD, GAP related domain) zu einer vermehrten Umwandlung des aktiven GTP-gebundenen Ras in das inaktive GDP-gebundene Ras föhrt (Xu et al., 1990; Martin et al., 1990). Folglich föhrt das Fehlen des Neurofibromins zu einer Überaktivierung von Ras und der dadurch ausgelösten Signalkaskaden. Das aktivierte Ras vermittelt über seine Effektoren wie Raf und den nachfolgenden MAP-Kinase Signalweg, sowie PI3K mit nachfolgender Aktivierung von u.a. AKT und mTOR eine gesteigerte Zellproliferation und Zellüberleben bei verminderter Apoptose (Johannessen et al., 2005; Le & Parada 2007; Weiss et al., 1999). Dazu passend konnte bei verschiedenen NF1-assozierten Tumoren in den primären Tumorzellen ein Verlust des zweiten *NF1*-Allels im Sinne des 2-Treffer Modells (Two-Hit Model) für Tumorsuppressorgene nach Kudson nachgewiesen werden mit der Folge eines Verlusts des Neurofibromins. In Mausversuchen konnte entsprechend gezeigt werden, dass der biallelische Verlust des *NF1*-Gens ein notwendiger Schritt in der Tumorgenese ist (Kluwe et al., 1999; Rasmussen et al., 2000; Cichowski 1999; Kehrer-Sawatzky & Mautner, 2009; Rubin & Gutmann 2005)

1.1.2 MPNST

Die malignen peripheren Nervenscheidentumoren sind hochaggressive Tumoren und gehören zu der Gruppe der Weichteilsarkome, innerhalb welcher sie einen Anteil von etwa 5-10% ausmachen. Sie stammen als Tumore der Nervenscheide meist von Schwannzellen, seltener aber auch von Fibroblasten oder Perineuralzellen ab (Hirose et al., 1998; Weiss and Goldblum, 2007). Lokalisiert sind sie häufig am Stamm und den proximalen Extremitäten, weniger häufig auch im Kopf-/ Halsbereich, und entstehen entsprechend oft entlang großer Nervenstämmen wie dem Nervus ischiadicus, dem Plexus brachialis oder sacralis (Weiss und Goldblum, 2007). Klinisch präsentieren sich die MPNST als wachsende Tumormasse, die Schmerzen und auch motorische sowie sensible Nervenausfälle verursachen können (Ducatman, et al., 1986). Zudem neigen die Tumoren zur Fernmetastasierung, wobei die häufigste Lokalisation die Lunge ist, unter anderem aber auch Leber, Knochen, Weichteilgewebe, Mediastinum oder Gehirn betroffen sind (Ducatman et al., 1986; Anghileri et al., 2006)

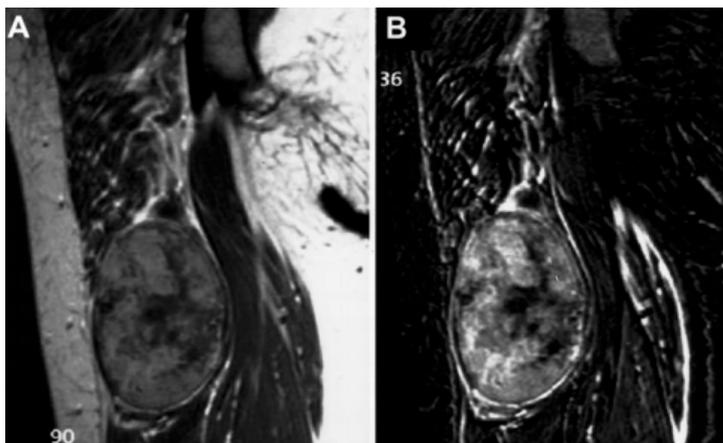


Abbildung 2.1: MRT eines histologisch hyperzellulären MPNST des rechten Oberschenkel vor (A) und nach (B) Kontrastmittelgabe (Mautner et al., 2003).

In ca. 50% der Fälle treten die MPNST bei Patienten mit NF1 auf, bei denen wiederum das Lebenszeitrisiko einen MPNST zu entwickeln bei ca.8-13% liegt, im Gegensatz zur Normalbevölkerung, in der es bei 0,001% liegt (Ducatman et al., 1986, Evans et al., 2002). Die NF1-assoziierten MPNST entstehen dabei im Gegensatz zu den spontan auftretenden häufig aus vorbestehenden Neurofibromen, z.B. den plexiformen Neurofibromen (Woodruff, 1999).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass das Erkrankungsalter bei Patienten mit NF1 signifikant niedriger ist als bei Patienten mit spontan auftretenden MPNST (Evans et al., 2002; Hagel et al., 2007; Ducatman et al., 1986). Zudem kommt es bei MPNST im Rahmen von NF1 früher zur Fernmetastasierung und auch Lokalrezidiven (Hagel et al., 2007). Insgesamt wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass das Überleben von MPNST-Patienten mit NF1 deutlich kürzer ist als bei spora-

dischen MPNST und damit MPNST im Rahmen der NF1 mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet sind (Stucky et al., 2012; Evans et al., 2002; Hagel et al., 2007).

Prognostisch wirken sich zudem auch eine große Tumormasse bei Diagnosestellung oder das frühzeitige Auftreten von Lokalrezidiven negativ auf das Überleben aus (Stucky et al., 2012). Positiv wirkt sich dagegen eine Lokalisation an den peripheren Extremitäten auf die Prognose aus (Hagel et al., 2007).

1.1.3 Tumorgenese der MPNST

Das oben beschriebene *NF1*-Gen bzw. dessen Inaktivierung spielt eine wichtige Rolle in der Tumorgenese der MPNST. Dabei konnte eine biallelische Inaktivierung dieses Gens sowohl bei NF1-assoziierten, als auch bei sporadischen MPNST nachgewiesen werden (Legius et al., 1993; Lothe et al., 1995; Perry et al., 2001). Entsprechend wurde auch in MPNST-Zelllinien ein stark vermindertes bis fehlendes Neurofibromin beschrieben. Passend zur Funktion des Neurofibromin, s.o., zeigte sich in diesen Zellen ebenfalls eine Überaktivierung von Ras (DeClue et al., 1992; Basu et al., 1992).

Da ein Verlust der Heterozygotie im *NF1*-Gen aber auch bei benignen Tumoren, wie kutanen oder plexiformen Neurofibromen, nachweisbar ist, scheinen für die Entwicklung der MPNST zum einen die Art der Mutation des *NF1*-Gens relevant zu sein, zum anderen scheinen aber auch weitere Schritte notwendig zu sein (Serra et al., 1997; Rasmussen et al., 2000; Upadhyaya et al., 2008).

Es konnten viele verschiedene genetische Aberrationen auf unterschiedlichen Chromosomen in den Tumorzellen von MPNST beschrieben werden, die sich nicht in benignen Tumoren finden lassen (Schmidt, H et al., 2000; Mechttersheimer et al., 1999). Beispielsweise konnte ein Verlust des *TP53*-Gens, ebenfalls ein Tumorsuppressorgen und ebenfalls auf dem Chromosom 17 lokalisiert, gehäuft in MPNST nachgewiesen werden, nicht jedoch in benignen Neurofibromen (Menon et al., 1990; Kindblom et al., 1995; Kourea et al., 1999b; Upadhyaya et al., 2008). Auch in in-vivo Versuchen konnte bestätigt werden, dass es bei Mäusen mit einer gleichzeitigen Inaktivierung des *NF1*- und des *TP53*-Gens zu einer Entwicklung von MPNST kommt, so dass angenommen werden kann, dass der Verlust beider Gene die maligne Transformation fördert (Cichowski et al., 1999; Vogel et al., 1999). Gehäuft wurden auch Deletionen in dem Tumorsuppressorgen *CDKN2A*-Gen, ebenso bekannt als *INK4A*-Gen, bei MPNST nachgewiesen, nicht dagegen bei benignen Neurofibromen (Kourea et al., 1999a; Nielsen et al., 1999).

Darüber hinaus spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MPNST. Abgesehen davon, dass die MPNST eine starke Vaskularisierung aufweisen, konnte gezeigt werden, dass es zu einer gesteigerten Angiogenese kommt und verschiedene proangiogene Faktoren wie VEGF, Neu-

ropilin, Angiopoietin 1, etc. hochreguliert werden (Angelov et al., 1999; Thomas und De Vries, 2007). Es konnte u.a. gezeigt werden, dass Ras die VEGF-Expression hochreguliert und so zur Tumorangiogenese beitragen könnte (Rak et al., 1995).

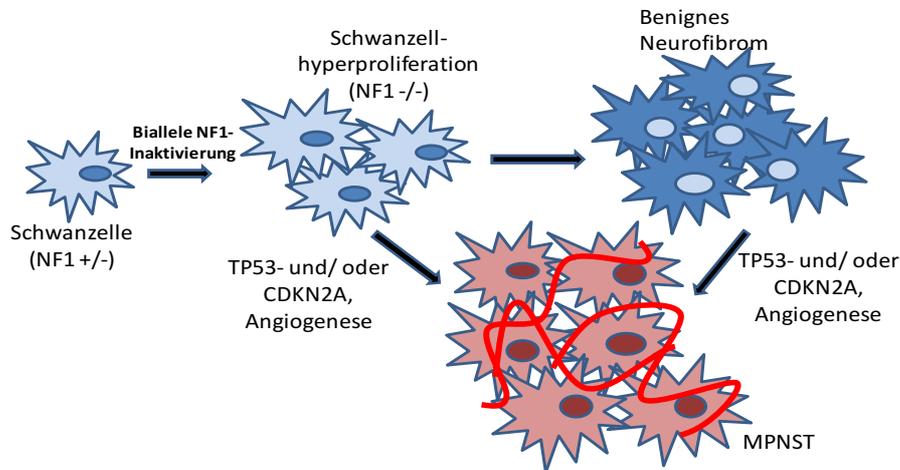


Abbildung 1.2: Tumorentstehung eines MPNST. Durch einen biallelen NF1-Verlust der Schwanzzellen kommt es zur Hyperproliferation. Für eine weitere maligne Entartung direkt oder über eine benigne Vorstufe (Neurofibrom) sind weitere Schritte wie eine TP53- oder CDKN2A-Mutation und u.a. eine gesteigerte Angiogenese notwendig (Abbildung nach Rubin und Gutmann, 2005).

1.1.4 Therapie

Die Therapie von MPNST entspricht prinzipiell der Therapie der übrigen Weichteilsarkome. Therapie der Wahl und möglicher kurativer Ansatz ist die radikale Resektion des Tumors im Gesunden. Es konnte in verschiedenen Studien belegt werden, dass die R0-Resektion einer der wichtigsten prognostischen Faktoren für das Überleben ist (Ferner und Gutmann, 2002; Baehring et al., 2003; Carli et al., 2005; Kahn et al., 2014). Zum einen ist jedoch eine R0-Resektion aus verschiedenen Gründen (Tumorgröße, Tumorlage, primär nicht lokalisierte Erkrankung) häufig nicht möglich, zum anderen kommt es bei einem Teil (je nach Studie ca. 30% oder mehr) der Patienten auch trotz radikaler Operation mit tumorfreien Rändern zum lokalen Rezidiv, wodurch die Prognose deutlich verschlechtert wird, ebenso wie durch das Auftreten von Fernmetastasen (Baehring et al., 2003; Anghileri et al., 2006; Zou et al., 2009).

Einige Studien konnten zeigen, dass durch (neo-)adjuvante Strahlentherapie zumindest die lokale Kontrolle verbessert wird, ohne dass ein wesentlicher Effekt auf das Langzeitüberleben nachgewiesen werden konnte (Wong et al., 1998; Ferner und Gutmann, 2002; Carli et al., 2005). MPNST zeigen auch gegenüber Chemotherapie nur mäßige Ansprechraten. Wie auch bei anderen Weichteilsarkomen kommen vor allem Doxorubicin in Kombination mit Ifosfamid zum Einsatz und spielen ebenfalls in

der (neo-) adjuvanten sowie palliativen Therapie eine Rolle (Ferner und Gutmann, 2002). Carli et al. z.B. konnten immerhin eine Ansprechrate auf neoadjuvante Chemotherapie von ca. 45% nachweisen und zeigen, dass diese dann einen Benefit für das Gesamtüberleben bietet (Carli et al., 2005).

Verschiedene weitere Substanzen wurden in klinischen und präklinischen Studien getestet (Upadhyaya et al., 2008), u.a. auch antiangiogene Therapiestrategien. Angelov et al. konnten in Xenograft-Modellen mit MPNST eine Reduktion der Tumormasse durch Inhibierung der VEGFR-2 nachweisen (Angelov et al., 1999).

Bei immer noch sehr ungünstiger Prognose der MPNST (Kolberg et al., 2013) stellt die Therapie der MPNST weiterhin eine große Herausforderung dar. Außer der radikalen Tumoresektion sind die Therapieoptionen aufgrund der mäßigen Therapieerfolge durch Strahlentherapie und konventionelle Chemotherapie deutlich eingeschränkt, sodass der Entwicklung von neuen, möglichst zielgerichteten Therapiestrategien eine wesentliche Bedeutung zukommt.

1.2 Angiogenese

1.2.1 Blutgefäßsystem

Das Blutgefäßsystem ist als Transportsystem des Körpers wesentlich an der Aufrechterhaltung lebenswichtiger Körperfunktionen beteiligt. Hierüber werden u.a. Nährstoffe, Gase, Hormone, Immunzellen und Wärme den Zielgeweben und -organen zugeführt und im Gegenzug die Stoffwechselprodukte wieder abtransportiert. Es ist beim Menschen so aufgebaut, dass man zwischen dem Körperkreislauf, über den die einzelnen Organe und Gewebe versorgt werden, und dem Lungenkreislauf, der dem Austausch von Kohlenstoffdioxid und Sauerstoff dient, unterscheidet (Lüllmann-Rauch, 2009). Die größeren Gefäße dienen dabei rein dem Transport (Arterien und Venen), die kleinere dagegen dem Stoffaustausch (Arteriolen, Kapillaren, Venolen) (Benninghoff und Drenckhahn, 2004). Die Wände größerer und kleinerer Gefäße sind entsprechend ihrer unterschiedlichen Funktion verschieden aufgebaut. Bei den größeren Gefäßen besteht die Gefäßwand aus drei Schichten, der Tunica interna, media und externa. Die Tunica interna besteht aus dem, dem Lumen zugewandten, Gefäßendothel mit angrenzender Basalmembran und einer sich anschließenden, Bindegewebsschicht. Daran schließt sich die Tunica media aus glatter Muskulatur mit elastischen und kollagenen Fasern an. Die Tunica externa, auch Adventitia genannt, schließlich ist die äußerste Schicht, die das Gefäß in der Umgebung verankert. Sie besteht aus Bindegewebe und aus das Gefäß versorgenden Gefäßen und Nerven. Bei den kleineren Gefäßen ist der Wandaufbau weit weniger komplex. So besteht bei Arteriolen die Tunica Media nur noch aus einer Schicht glatter Muskelzellen. Bei den Kapillaren besteht die ganze Ge-

fäßwand nur noch aus dem Endothel mit Basalmembran, welches stellenweise von Stützzellen, den Perizyten, umgeben ist (Benninghoff und Drenckhahn, 2004).

Lymphkapillaren sind sehr dünnwandig und besitzen im Gegensatz zu Blutgefäßkapillaren keine Perizyten und keine durchgängige Basalmembran. Um auch bei erhöhtem Gewebsdruck offen zu bleiben und die Gewebsflüssigkeit abtransportieren zu können, haben sie Filamente, die sie mit der Extrazellulärmatrix verankern (Lohela et al., 2003).

1.2.2 Gefäßneubildung

Gefäßneubildung ist nicht nur während der Embryonalentwicklung, sondern auch postnatal ein Leben lang essentiell. Man unterscheidet zwei verschiedene Formen der Gefäßneubildung: die Angiogenese und Vaskulogenese.

Von Vaskulogenese spricht man, wenn Gefäße de novo aus endothelialen Vorläuferzellen (Angioblasten) entstehen, die sich zu Endothelzellen differenzieren und zu unreifen Gefäßgeflechten zusammenlagern (Risau und Flamme, 1995). Sie findet vor allem in der Embryogenese statt, während der sich zunächst aus dem Mesoderm entstandene Vorläuferzellen zu Blutinseln zusammenlagern. Die im Inneren gelegenen Zellen sind hämatopoetische Vorläuferzellen, aus denen die Blutzellen entstehen, die äußeren sind die endothelialen, die später die Gefäße bilden (Risau und Flamme, 1995). Man konnte nachweisen, dass endotheliale Vorläuferzellen nicht nur auf die Embryogenese beschränkt sind, sondern auch im Adulten im Knochenmark, peripheren Blut und anderen Organen zu finden sind. Das spricht dafür, dass Vaskulogenese nicht nur in der Embryogenese, sondern als sogenannte postnatale Vaskulogenese auch im Adulten stattfindet und beispielsweise an der Neovaskularisation von Tumoren oder bei der Wundheilung beteiligt ist (Asahara et al., 1999).

Im Gegensatz dazu entstehen bei der Angiogenese neue Gefäße aus bereits existierenden Gefäßen, indem entweder Endothelzellen aus diesen Gefäßen aussprossen oder bestehende Gefäße durch Septen aus Extrazellulärmatrix geteilt werden und so neue Gefäße entstehen (Risau, 1997). Sie spielt sowohl in der Embryonalentwicklung eine Rolle, v.a. aber auch postnatal. Im Erwachsenenalter kommt es physiologischerweise nur in Ausnahmen wie in der Uterusschleimhaut während des Menstruationszyklus oder bei der Vaskularisierung der Plazenta zu Angiogenese (Josoko et al., 2000). Dafür ist die Dysregulation der Gefäßneubildung aber bei einer Reihe pathologischer Zustände von großer Bedeutung. Bekannte Beispiele, bei denen die Gefäßneubildung verstärkt ist, sind inflammatorische Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis oder auch ophtalmologische, wie die Rethinopathie (Carmeliet, 2005; Folkman, 1995). Ein weiteres wichtiges Beispiel sind maligne Erkrankungen. Bis zu einer Größe von etwa 2 mm³ können Tumoren wachsen, ohne dass es zu einer Neovaskularisierung kommen muss, indem sie mittels Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Ist das nicht mehr

möglich, löst dies im Tumor eine Hypoxie aus. Der Progress von einem nicht gefäßabhängigen Tumor zu einem Tumor, der Gefäße benötigt, wird auch als „Angiogener Switch“ bezeichnet (Carmeliet und Jain, 2000).

Die Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der mehrere Schritte umfasst und in den eine Vielzahl pro- und antiangiogener Faktoren involviert ist. Beim Überwiegen der angiogenen Faktoren im Vergleich zu den antiangiogenen durch entsprechende Hoch- bzw. Runterregulation wird die Angiogenese induziert (Folkman, 1995). Die Hypoxie ist dabei ein wichtiger Stimulus, der die Angiogenese einleitet, auf die der Tumor nun angewiesen ist (Bikfalvi, 2006; Bondke und Buschmann, 2011). Sie induziert den Anstieg des HIF (Hypoxie-induzierter Faktor) und dieses wiederum die Hochregulierung vieler proangiogener Gene, unter anderem die für die VEGF-Familie codierenden, welche zu den wichtigsten der Angiogenese gehören (Bikfalvi, 2006). Dieses veränderte Genexpressionsmuster der Endothelzellen führt nun dazu, dass die Gefäßpermeabilität erhöht wird und die Endothelzellen proteolytische Enzyme produzieren, wie Metalloproteinasen und Plasmin, die die Extrazellulärmatrix und Basalmembran abbauen können. Außerdem beginnen sie selbst zu proliferieren und zu migrieren. Sie ordnen sich dann so röhrenförmig an, dass neue Gefäße entstehen, die dann im weiteren Verlauf durch die Ausbildung einer neuen Basalmembran und Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen stabilisiert werden (Josoko et al., 2000).

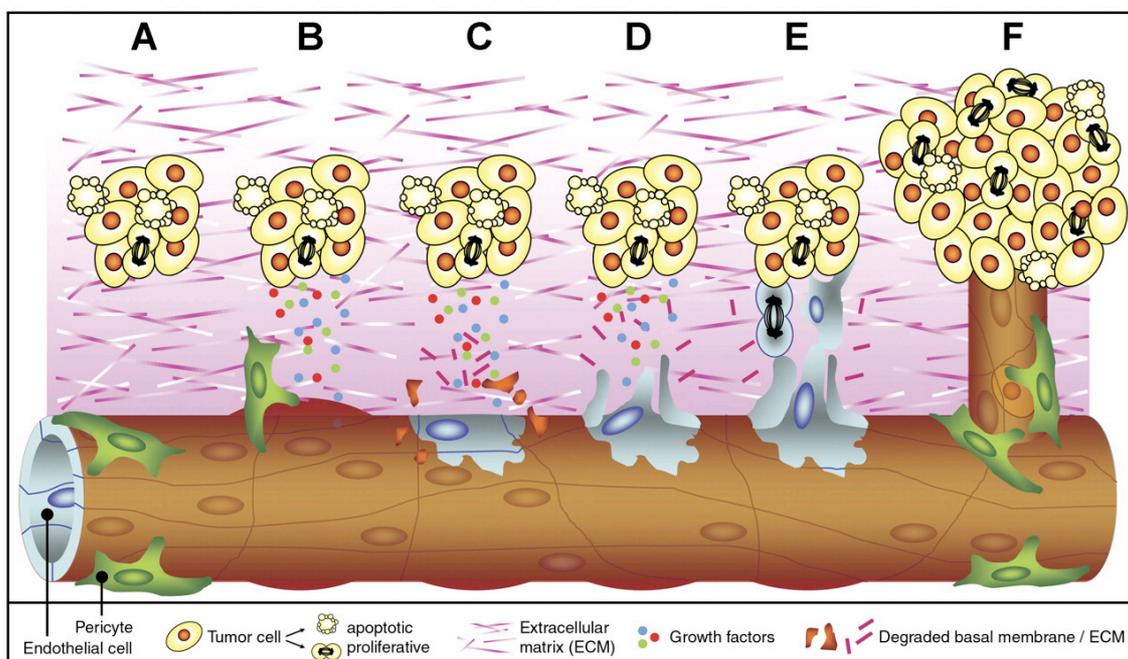


Abbildung 2.3: Tumorangiogenese. Die Abbildung zeigt schematisch eine tumorinduzierte Gefäßneubildung. Durch Sekretion von Wachstumsfaktoren durch den Tumor kommt es zur Steigerung der Gefäßpermeabilität, Produktion proteolytischer Enzyme, die die Basalmembran und Extrazellulärmatrix abbauen, sowie Proliferation und Migration von Endothelzellen (Thijssen et al., 2007).

Neben der Hypoxie spielt auch der metabolische Stress durch u.a. Hypoglykämie und erniedrigten pH-Wert eine Rolle als Initiator der Angiogenese; zudem mechanischer Stress, Entzündungsreaktionen oder auch Genmutationen in Tumorzellen, durch die Onkogene aktiviert oder Tumorsuppressorgene deaktiviert werden, die an der Regulation der Angiogenese beteiligt sind (Carmeliet und Jain, 2000), (Carmeliet, 2000). Auch Makrophagen, die durch vom Tumor sezernierte chemotaktische Stoffe in diesen gelotst wurden, können dort proangiogene Faktoren produzieren und hierdurch die Gefäßneubildung induzieren (Avraamides et al., 2008).

1.3 Die einzelnen pro- und antiangiogene Faktoren

Da es eine Vielzahl von Faktoren sind, die an der Regulation der Angiogenese beteiligt sind, sollen im Folgenden hauptsächlich die für diese Arbeit relevanten vorgestellt werden.

1.3.1 VEGF-Familie

Von den an der Angiogenese beteiligten Faktoren gehören die der VEGF-Familie mit ihren Rezeptoren wie bereits erwähnt zu den wichtigsten und am besten untersuchten. Es sind zurzeit sieben Mitglieder der VEGF-Familie bekannt: VEGF-A, -B, -C, -D, -E, svVEGF und PlGF (Takahashi, H. und Shibuya, 2005). Dazugehörig existieren drei Rezeptoren, VEGFR-1, -2 und -3, die alle zur Gruppe der Tyrosin-Kinase Rezeptoren gehören (Roskoski, 2008).

VEGF-A (auch nur VEGF oder VPF – Vascular permeability factor) wurde 1983 als ein Faktor entdeckt, der zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwand führt und eine Schlüsselrolle bei der Blutgefäßneubildung spielt (Takahashi, S. 2011). Er wird u.a. von Endothelzellen, Makrophagen, aber auch einer Vielfalt anderer Zellen gebildet. Z.B. ist er auch in verschiedenen Tumoren überexprimiert (Takahashi, H. und Shibuya, 2005; Takahashi, S., 2011). Er wirkt dabei sowohl auto- wie auch parakrin (Koch, S und Claesson-Welsh, 2012). Zu den wichtigen Stimuli zählen neben der Hypoxie beispielsweise auch Wachstumsfaktoren, Mutationen des p53-Onkogens oder Tumorpromotoren (Takahashi, H und Shibuya, 2005). Er entfaltet seine Wirkung über eine Bindung an die Rezeptoren VEGFR-1 und -2, wobei er zum VEGFR-1 eine viel höhere Affinität hat (van Hoeben et al., 2004). Seine Effekte vermittelt er jedoch hauptsächlich über den VEGFR-2. Diese bestehen v.a. darin, dass die Proliferation von Endothelzellen angeregt wird, die Bildung von Serinproteasen und Metalloproteinasen induziert wird, wodurch die Migration von Endothelzellen gefördert wird, und wie oben bereits erwähnt die Gefäßpermeabilität erhöht wird (Ferrara und Davis-Smyth, 1997). Durch die genann-

ten Funktionen trägt er wesentlich zur Angiogenese bei. In Mausversuchen wurde entsprechend gezeigt, dass schon das Fehlen eines Allels zum Tod des Embryos führt (Carmeliet et al., 1996).

VEGF-C und -D sind sich sehr ähnlich. Beide werden zunächst als Vorläuferproteine gebildet, die durch einmalige proteolytische Spaltung zwar aktiv werden, allerdings nur mittelgradig und in dieser Form nur in der Lage sind an VEGFR-3 zu binden. Durch eine weitere proteolytische Spaltung erhalten sie ihre volle Aktivität und können zusätzlich an VEGFR-2 binden (Lohela et al., 2003). Sie stimulieren die Proliferation und Migration von u.a. (Lymph-)Endothelzellen und spielen eine wichtige Rolle bei der Lymphangiogenese, können aber auch bei der Angiogenese mitwirken (McColl et al., 2003; Takahashi, H und Shibuya, 2005). VEGF-C ist essentiell für die embryonale Entwicklung des Lymphsystems. Entsprechend konnten Karkkainen et al. durch Mausmodelle zeigen, dass schon das Fehlen eines Allels des VEGF-C-Gens zu einer gestörten Lymphangiogenese führt und beim Fehlen beider kein Mausembryo lebend geboren wurde, wohingegen das Fehlen von VEGF-D eine normale Lymphangiogenese zulässt (Karkkainen et al., 2004).

Neben diesen drei Mitgliedern der VEGF-Familie gibt es noch den VEGF-B, dessen Struktur dem VEGF-A sehr ähnelt, dessen Rolle aber nicht ganz geklärt ist (Li et al., 2012). Außerdem gibt es noch VEGF-E, der ähnlich stark wie VEGF-A zu einer erhöhten Endothelzellproliferation und Gefäßpermeabilität führt, aber nur an den VEGFR-2 bindet (Ogawa et al., 1998). Des Weiteren gibt es noch die Snake venom VEGF (svVEGF), eine Gruppe von VEGF, die im Gift von Schlangen entdeckt wurden und vermutlich zu dessen Toxizität beitragen sowie den PlGF (Placenta growth factor), der ebenfalls dem VEGF-A ähnelt und v.a. für die Angiogenese bei Ischämien, Entzündungszuständen, Wundheilung und Tumoren eine Rolle zu spielen scheint (Takahashi, H. und Shibuya, 2005).

VEGFR-1, auch bekannt als Flt-1 Rezeptor, ist vor allem auf Endothelzellen, hämatopoetischen Stammzellen, aber auch Monozyten und Makrophagen zu finden. Außerdem gibt es noch eine lösliche Form (Takahashi, S. 2011). Seine Expression wird ebenfalls über Hypoxie mittels des HIF reguliert (Otrock et al., 2007). Er wird über die Faktoren VEGF-A, VEGF-B, PlGF und svVEGF stimuliert und induziert Proliferation und Zellüberleben von Endothelzellen. Seine biologische Aktivität ist im Vergleich zum VEGFR-2 jedoch deutlich geringer (Takahashi, H. und Shibuya, 2005). In Verbindung mit der viel höheren Affinität zum Faktor VEGF-A als der VEGFR-2 hat der VEGFR-1 zusammen mit seiner löslichen Form eine antiangiogene Wirkung (Koch, S und Claesson-Welsh, 2012). Mit VEGFR-1-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass dieses in der frühen Embryonalentwicklung als negativer Regulator der Gefäßneubildung eine Rolle spielt, in der Tumorentwicklung trägt er im Gegensatz dazu jedoch zur Induktion der Angiogenese mit bei (Olsson et al., 2006; Takahashi, S., 2011).

VEGFR-2, auch als KDR bekannt, ist ebenfalls vorwiegend auf Gefäßendothelzellen, lymphatischen Endothelzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert und kommt ebenso auch als löslicher Rezeptor, sVEGFR-2, vor (Takahashi, H. und Shibuya, 2005; Takahashi, S., 2011). Im Gegensatz zum VEGFR-1 bindet er neben VEGF-A auch die prozessierten Formen von VEGF-C und -D und spielt dadurch bei der Angiogenese von sowohl Blut-, als auch Lymphgefäßen eine Rolle (Takahashi, H. und Shibuya, 2005). Eine Aktivierung des Rezeptors führt zu den für die Gefäßneubildung essenziellen Effekten wie einer erhöhten Gefäßpermeabilität, Migration, Proliferation und verminderte Apoptose der Endothelzellen (Koch, S und Claesson-Welsh, 2012). Der VEGFR-2 ist für die Gefäßneubildung in der Embryonalentwicklung aber auch postnatal, z.B. im Rahmen neoplastischer Erkrankungen, der wichtigste Rezeptor. So konnten Shalaby et al. nachweisen, dass Mäuseembryos ohne das Gen für VEGFR-1 schon um den 9. Tag nach der Befruchtung sterben (Shalaby et al., 1995).

VEGFR-3, auch bekannt als Flt-4, bindet VEGF-C und -D und wird vorwiegend auf Lymphendothelzellen exprimiert, spielt also somit v.a. in der Lymphangiogenese eine große Rolle. Mutationen im *VEGFR-3 Gen* führen entsprechend zu hereditären Lymphödemen beim Menschen (Otrock et al 2007). Seine Effekte sind u.a. die Migration, Proliferation, das Zellüberleben von v.a. Lymphendothelzellen (Koch, S und Claesson-Welsh, 2012). Außerdem konnten Dumont et al. zeigen, dass der VEGFR-3 in der frühen Entwicklung des Blutgefäßsystems auch auf Endothelzellen von Blutgefäßen exprimiert werden und notwendig für die frühe Angiogenese ist (Dumont et al., 1998). Nach der Embryogenese ist VEGFR-3 zudem unter pathologischen Umständen in Blutgefäßendothelzellen exprimiert, etwa bei chronisch entzündlichen Erkrankungen und v. a. auch in verschiedenen Tumorentitäten (Otrock et al 2007).

1.3.2 Neuropiline

Neuropiline sind Transmembranrezeptoren, die in zwei Varianten, dem Neuropilin 1 (Nrp 1) und Neuropilin 2 (Nrp 2) vorliegen. Sie spielen eine wichtige Rolle als Rezeptoren bei der axonalen Wegfindung während der Entwicklung des Nervensystems. Dabei agieren sie als Co-Rezeptoren für Plexine. Zusätzlich dienen die Neuropiline auch als Co-Rezeptoren für die Rezeptoren der VEGF-Familie. Hierüber spielen sie zusätzlich eine wesentliche Rolle in der Angiogenese. (Bielenberg et al., 2006)

Die Neuropiline binden zwei Gruppen von Liganden, die Semaphorine, die unten näher erläutert werden sowie die Faktoren der VEGF-Familie. Dabei haben die beiden Neuropiline verschiedene Bindungsverhalten: Nrp 1 dient als Co-Rezeptor für VEGFR-1 und -2 und bindet VEGF-A sowie VEGF-B und PlGF, wobei es den VEGF-A sogar mit einer dreimal höheren Affinität als VEGFR-2 bindet (Koch, S und Claesson-Welsh, 2012). Aus der Gruppe der Semaphorine bindet er das Semaphorin 3A (Sema 3A) und 3B (Favier et al., 2006). Es wird im Hinblick auf das Gefäßsystem vor allem in Arterien exprimiert und wirkt über VEGFR-2 und VEGF-A proangiogen, während das Sema 3A als kompetitiver Inhibitor für das VEGF-A wirkt (Bielenberg et al., 2006). In dieser Arbeit wurde mit dem

Nrp 2 gearbeitet, das v.a. in Venen und Lymphgefäßen exprimiert wird und als Co-Rezeptor für VEGFR-3 und -2 dient. Im Hinblick auf die VEGF-Familie bindet es ebenfalls VEGF-A und PlGF, und zudem noch VEGF-C und -D, im Hinblick auf die Semaphorine das Semaphorin 3F (Sema 3F) und -3B (Koch, S und Claesson-Welsh, 2012; Favier et al., 2006; Kärpänen et al., 2006).

Für Nrp2 Knockout Mäuse konnte durch Yuan et al. beispielsweise nachgewiesen werden, dass v.a. Lymphgefäße und kleine Kapillaren eine defekte Entwicklung zeigen, diese Mäuse aber nicht sterben (Yuan et al., 2002). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass Nrp2 durch eine Interaktion mit VEGFR-3 nach VEGF-C Stimulation zu einem Aussprossen von Lymphgefäßen führt (Xu et al., 2011). Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass das Binden von VEGF-C und -A außerdem eine Interaktion des Nrp 2 mit dem VEGFR-2 auslöst, welche zu einer verstärkten Phosphorylierung des VEGFR-2 führt. Dies bewirkt wiederum besseres Zellüberleben und eine vermehrte Migration von Endothelzellen (Favier et al., 2006). Dagegen werden durch eine Interaktion mit dem weiteren Liganden Sema 3F die gerade beschriebenen proangiogenen Effekte inhibiert, was zu einer Negativregulation der Angiogenese führt (Favier et al., 2006). Es verwundert im Hinblick auf die Rolle im Bereich der Lymphangiogenese nicht, dass Nrp2 auch eine Rolle in der Metastasierung spielt. So konnte durch Blockierung des Nrp2 durch einen Antikörper eine verminderte Lymphknoten- und Fernmetastasierung beobachtet werden (Bagri et al., 2009).

Neben den beiden membranständigen Isoformen gibt es auch ein natürlich auftretendes lösliches Neuropilin 1, sNrp-1, ein Antagonist des VEGF-A. Das sNrp-1 bindet dieses und inhibiert dadurch dessen Bindung an entsprechende Rezeptoren. Für Prostatakarzinomzellen von Ratten konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Expression des sNrp-1 zu defekten Gefäßen und apoptotischen Tumorzellen führt (Gagnon et al., 2000).

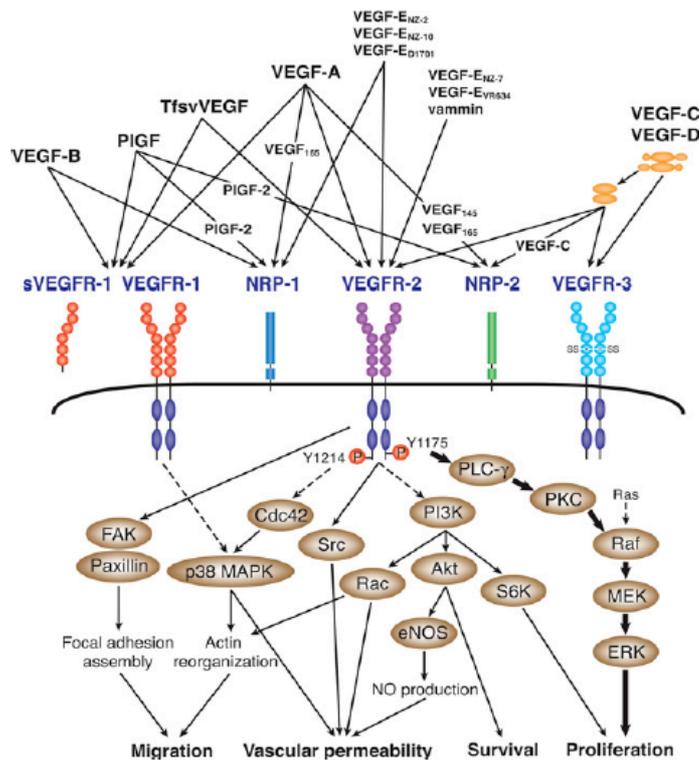


Abbildung 1.4: Die VEGF-Familie und ihre Co-Rezeptoren die Neuropiline. Der obere Teil der Abbildung zeigt schematisch die verschiedenen Faktoren der VEGF-Familie mit ihrem Bindungsverhalten hinsichtlich der drei VEGFR und der Neuropiline. Im unteren Teil sind beispielhaft für den VEGFR-2 die ausgelösten Signaltransduktionswege und die daraus resultierenden Effekte auf zellulärer Ebene dargestellt (Takahasi, H. und Shibuya, 2005)

1.3.3 Semaphorine

Die Semaphorine gehören zu einer Familie von Proteinen, die in acht Subgruppen unterteilt werden kann. Von ihnen liegen einige Gruppen als membranständige Proteine andere, u.a. die Gruppe 3, als lösliche Proteine vor (Schmidt, EF et al., 2003; Pasterkamp, 2012). Sie wurden zwar zunächst als Funktionäre in der Entwicklung des zentralen Nervensystems beschrieben, werden jedoch auch in einer Vielzahl anderer Organsystemen exprimiert und spielen auch in der Angiogenese, Lymphangiogenese, im Immunsystem und in der Entwicklung von Tumoren eine Rolle. Sie entfalten dabei ihre Wirkung hauptsächlich über die Rezeptorgruppe der Plexine, meist über eine direkte Bindung, im Fall der Gruppe 3 jedoch über die Neuropiline als Co-Rezeptoren der Plexine (Pasterkamp, 2012).

Das oben bereits erwähnte Sema3F, der Subgruppe 3 zugehörig, ist der Subtyp, mit dem in dieser Arbeit gearbeitet wurde, und der vorwiegend Nrp2 bindet. Sema3F ist ein potenter Inhibitor der Angiogenese. Es hemmt das VEGF-A und -C induzierte Zellüberleben von Endothelzellen und deren Migration, was eine wichtige Rolle des Sema3F im Rahmen der Angiogenese impliziert (Favier et al., 2006). In weiteren Studien konnte die negativregulierende Bedeutung von Sema3F für die Angiogenese ge-

stützt werden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Tumorsuppressor p53 an der Regulation von Sema3F und darüber an der Antiangiogenese beteiligt ist. Der p53 kann die Expression von Sema3F deutlich erhöhen; im Gegensatz dazu ist bei Tumoren aus p53-Knockout-Zelllinien von Kolorektalkarzinomen die Expression von Sema3F erniedrigt und es kommt dafür zu einem deutlichen Anstieg der Gefäßdichte und -neubildung (Futamura et al., 2007). Bielenberg et al. entdeckten außerdem, dass Tumorzellen, die das Sema3F exprimieren, chemorepulsiv auf Gefäß- und Lymphendothelzellen wirken, was einen weiteren Mechanismus darstellt, über den die Tumor(lymph)angiogenese gehemmt werden kann (Bielenberg et al., 2004).

1.3.4 Integrine

Die Integrine gehören zu den wichtigsten Rezeptoren für die Vermittlung von Zelladhäsionen. Zusätzlich können sie über Interaktionen mit dem Zytoskelett eine Reihe von intrazellulären Signalwegen induzieren. Dadurch sind die Integrine auf zellulärer Ebene an u.a. Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose beteiligt und spielen insgesamt für eine Vielzahl von physiologisch-biologischen Prozessen wie allgemeine Zelladhäsion, Entwicklung/Embryogenese, Vasculo- und Angiogenese, Leukozytenfunktion und Immunantwort, Hämostase und Wundheilung sowie Entzündungsreaktionen oder auch für die Entwicklung von malignen Geschehen eine Rolle (Jones und Walker, 1999; Hynes, 2002a). Sie sind transmembranäre Proteine, die als Heterodimere aus jeweils einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind; in Vertebraten sind 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten bekannt, die insgesamt 24 verschiedene Integrine bilden, welche jeweils eine ganz spezifische Funktion besitzen (Zhang, K. und Chen, JF, 2012; Hynes, 2002a).

Im Folgenden soll vor allem auf die für diese Arbeit relevanten Subtypen eingegangen werden.

Integrin $\alpha v \beta 3$ ist auch bekannt als Vitronectin-Rezeptor, obwohl es neben dem Vitronectin viele weitere Moleküle der Extrazellulärmatrix bindet, die das Tripeptid RGD enthalten. Es wird im Gegensatz zu anderen Integrinen nicht ubiquitär exprimiert, sondern hauptsächlich von Knochen resorbierenden Osteoklasten, aktivierten Makrophagen sowie einigen glatten Muskelzellen und aktivierten, angiogenen Endothelzellen, z.B. während der Tumorgefäßneubildung, nicht jedoch von ruhenden Endothelzellen (Wilder, 2002). Seine Expression auf Endothelzellen wird durch angiogene Faktoren wie bFGF, TNF α oder IL-8 stimuliert (Avraamides et al., 2008).

Dadurch, dass dieses Integrin stark in angiogenen Blutgefäßen, wie Tumorblutgefäßen, exprimiert wird, wurde schon früh assoziiert, dass es proangiogene Eigenschaften hat. In der Tat konnte gezeigt werden, dass Integrin- $\alpha v \beta 3$ -Antagonisten zu einer verminderten Angiogenese führen (Hynes 2002b). U.a. induzieren die Antagonisten dabei eine Apoptose der Endothelzellen, aktivieren das Caspase-8-

abhängige Zelltod-Programm und erhöhen die Aktivität des Tumorsuppressors p53 (Avraamides et al., 2008). Ebenso induziert auch das nicht ligandengebundene Integrin $\alpha\beta_3$ den Zelltod über den Caspase-8-abhängigen Weg (Avraamides et al., 2008). Im ligandengebundenem Zustand dagegen schützt das Integrin $\alpha\beta_3$ die Endothelzellen vor Apoptose und induziert dagegen Proliferation und Migration der Endothelzellen und deren Streuung, u.a. durch eine Aktivierung verschiedener Kinasen und der MMP-2, welche am Abbau der Extrazellulärmembran mit beteiligt ist (Avraamides et al., 2008; Danhier et al., 2012). Hierdurch kann es, zumindest im ligandengebundenem Zustand, zur Gefäßneubildung beitragen.

Das Integrin $\alpha\beta_3$ wird dabei für die durch bFGF (basic fibroblast growth factor) und TNF- α (tumor necrosis factor α) induzierte Angiogenese benötigt, wohingegen das Integrin $\alpha\beta_5$ für die durch VEGF und TGF- α (transforming growth factor α) ausgelöste Angiogenese benötigt wird (Friedlander et al., 1995). Die nachfolgenden Signalwege, über die die Angiogenese induziert wird, sind bei den beiden $\alpha\beta$ Integrine ebenfalls unterschiedlich, s.a. Abb.2.6, (Hood, 2003).

Abgesehen davon konnte gezeigt werden, dass das $\alpha\beta_3$ -Integrin Komplexe mit dem VEGFR-2 bilden kann, welches dadurch wiederum phosphoryliert und aktiviert wird. Andersrum kann auch VEGF mittels VEGFR-2 zur Phosphorylierung und Aktivierung von $\alpha\beta_3$ -Integrin führen (Mahabeleshwar et al., 2006). Auch über diese Interaktion trägt das $\alpha\beta_3$ -Integrin zur Angiogenese bei.

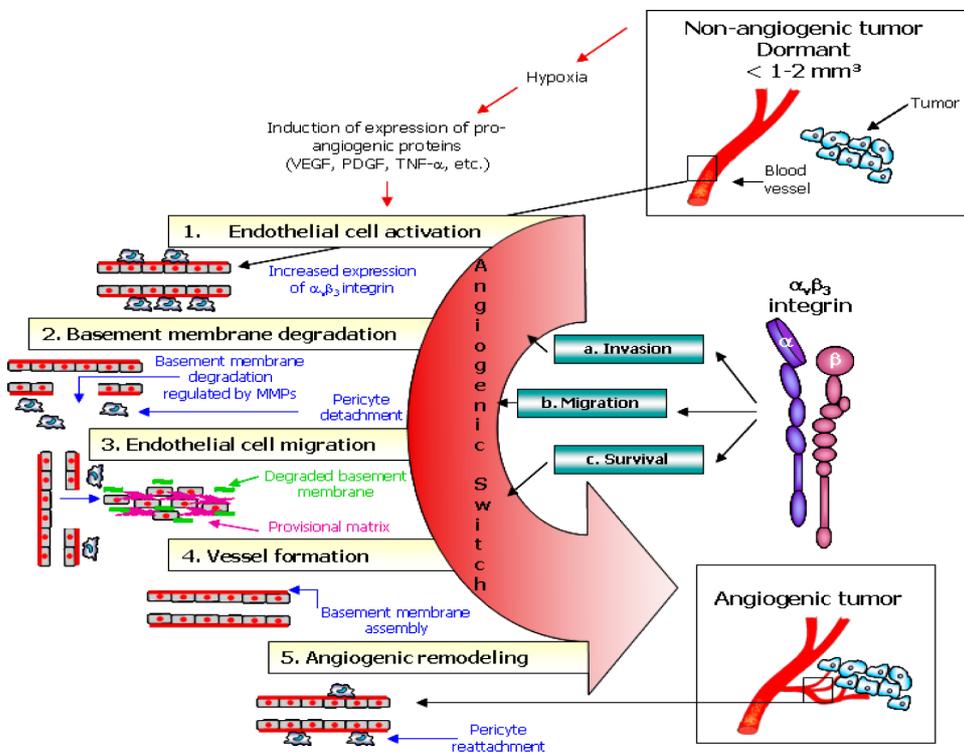


Abbildung 1.5: Die Rolle des Integrin $\alpha\beta_3$ bei der Tumorangio-genese. Die Abbildung stellt schematisch den Ablauf des Angiogenen Switches in der Tumorentwicklung und die Rolle des Integrin $\alpha\beta_3$ dabei dar. Es ist an den für die Angiogenese wesentlichen Prozessen wie Zellüberleben, -migration und -invasion beteiligt (Danhier et al., 2012)

Integrin $\alpha\beta5$ ist mit dem $\alpha\beta3$ Integrin verwandt, bindet ebenfalls das Vitronectin und vermittelt auch Zelladhäsionen und -migrationen (Klemke et al., 1994; Huang et al., 2000). Es ist das mit am weitesten verbreitete Integrin der ν -Integrine und so auf verschiedensten Zellen exprimiert, beispielsweise auf Epithelien, u.a. Keratinocyten und Epithelien der Atemwege, Fibroblasten, Osteoklasten, Monocyten, Endothelzellen und außerdem auf Tumorzellen vieler Tumorentitäten (Brooks et al., 1997; Huang et al., 2000; Sheppard, 2004).

Auch für das Integrin $\alpha\beta5$ wurde aufgrund von Versuchen mit Antagonisten vermutet, es sei im pro-angiogenetischem Sinne von Bedeutung für die Gefäßneubildung (Hynes, 2002b). Wie oben bereits erwähnt, konnten Friedlander et al. nachgewiesen, dass das Integrin $\alpha\beta5$ für eine durch VEGF induzierte Angiogenese benötigt wird (Friedlander et al., 1995). Durch weitere Studien wurde noch bestätigt, dass dieses Integrin in einen von VEGF induzierten Signalweg involviert ist, der zu einer gesteigerten Angiogenese führt, s.a. Abb. 2.6, (Hood, 2003). Untersuchungen mit $\beta5$ -Knockout-Mäusen zeigten, dass diese eine deutlich reduzierte durch VEGF induzierte und über das Integrin $\alpha\beta5$ vermittelte vaskuläre Permeabilität besitzen (Eliceiri, 2002).

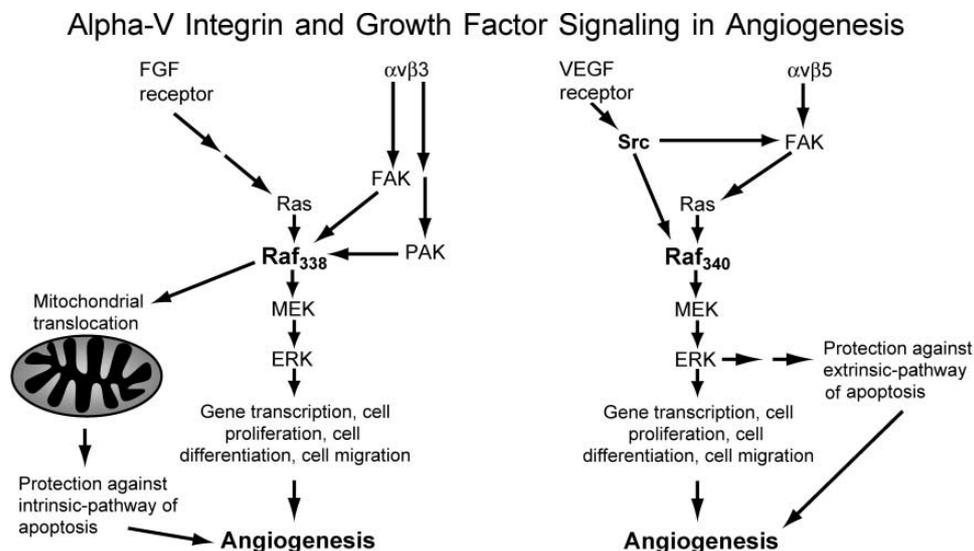


Abbildung 1.6: Angiogenese, induziert durch unterschiedliche $\alpha\nu$ -Integrin vermittelte Signalwege. In der obigen Abbildung sind die etwas unterschiedlichen Signalwege und die durch diese vermittelten, im Endeffekt gleichen zellulären Effekte dargestellt, durch die die beiden Integrine $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$ zur Angiogenese beitragen. Das $\alpha\beta3$ ist an einer durch die FGF-Rezeptoren ausgelösten Angiogenese beteiligt, während das $\alpha\beta5$ an einer durch die VEGF-Rezeptoren vermittelten Angiogenese involviert ist. (Hood 2003).

Integrin $\alpha 5 \beta 1$ ist ein Rezeptor, der hauptsächlich einen Liganden bindet, das Fibronectin, und das ebenfalls über die RDG-Sequenz des Fibronectin (Avraamides et al, 2008). Es konnte u.a. in Hühnerembryos gezeigt werden, dass es weit verbreitet ist und in vielen Geweben expremiert wird, im Adulten jedoch die Expression des Integrins deutlich abnimmt; ähnliches konnte für viele humane Gewebe und Organsysteme gezeigt werden (Yang et al., 1993). Die große Bedeutung dieses Integrins gerade in der Entwicklung konnte durch Beobachtungen gestützt werden, die zeigten, dass $\alpha 5$ -Null-Mäuse - das $\beta 1$ Integrin ist der einzige Kombinationspartner für das $\alpha 5$ Integrin - am Tag 10 bis 11 der Embryonalentwicklung sterben. Dabei weisen sie neben einigen anderen Defekten auch welche in der Entwicklung des Gefäßsystems auf (Yang et al., 1993).

Dass dieses Integrin nicht nur eine Rolle in der Entwicklung des Gefäßsystems spielt, sondern auch später wichtig ist für die Gefäßneubildung, zeigt u.a. der Umstand, dass im Adulten die Expression des Integrins $\alpha 5 \beta 1$ auf Endothelzellen von Gefäßen in Tumoren oder in Geweben, welche mit Wachstumsfaktoren stimuliert wurden, deutlich hochreguliert wird. In ruhenden Endothelzellen dagegen wird das Integrin entsprechend nur auf einem niedrigen Level expremiert. (Kim, S et al., 2000a) Dazu passend konnten Kim et al. zeigen, dass Antikörper gegen das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ eine durch Wachstumsfaktoren ausgelöste Angiogenese inhibieren; dabei hatten sie jedoch nur Einfluss auf eine durch bFGF, TNF- α und Il-8 induzierte Angiogenese, und keinen bzw. nur einen minimalen Einfluss auf die durch VEGF induzierte Angiogenese (Kim, S et al., 2000a). Das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ vermittelt dabei die Migration von Endothelzellen und deren Überleben, während Antikörper gegen dieses Integrin entsprechend die Migration unterdrücken und über den Caspase-8-abhängigen Weg eine Apoptose der Endothelzellen induzieren (Kim, S et al., 2000b; Kim, S et al., 2002). Passend dazu wiesen Kim et al. durch Versuche mit humanen Tumoren in Mausmodellen nach, dass die Antikörper gegen das Integrin zu einer verminderten Tumorangio-genese führen und dadurch zur Hemmung des Tumorstwachstums bzw. sogar zu einer Rückbildung des Tumors (Kim, S et al., 2000a).

1.3.5 Endogene Inhibitoren der Angiogenese

Tumstatin ist ein Fragment der $\alpha 3$ -Kette des Typ IV Kollagens, welches durch die Matrix Metalloproteinase-9 abgespalten wird. Die $\alpha 3$ -Kette des Typ IV Kollagens ist u.a. Bestandteil der Basalmembran verschiedener Organe und v.a. auch der vaskulären Basalmembranen in diversen Organen. (Hamano et al., 2003)

Dem Tumstatin konnten durch in vivo und in vitro Versuche antiangiogene Effekte nachgewiesen werden, die durch eine Bindung an das $\alpha v \beta 3$ -Integrin vermittelt werden. Dies geschieht über eine Bindungsstelle unabhängig von der, die die RGD-Sequenzen bindet, wodurch letztlich entscheidend die von dem Integrin ausgelöste Signalkaskade inhibiert wird. Dadurch verhindert Tumstatin die Gefäß-

neubildung durch Inhibierung der Proliferation von Endothelzellen und wirkt zudem proapoptotisch auf Endothelzellen, hat aber keinen Einfluss auf deren Migration im Gegensatz zu Endostatin, was auch ein endogener Inhibitor der Angiogenese ist. (Maeshima et al., 2000; Sudhakar et al., 2003). Passend dazu zeigten Versuche mit Tumstatin-Knockout-Mäusen eine deutlich gesteigerte Angiogenese und schnelleres Tumorwachstum als in Mäusen mit physiologischer Tumstatin-Produktion (Sund et al., 2005). Interessanterweise konnte in Mausmodellen ebenfalls gezeigt werden, dass Tumstatin auf molarer Ebene etwa 10-fach effektiver in der Inhibierung des Tumorwachstums ist als das Endostatin (Maeshima et al., 2001).

Endostatin ist ebenfalls ein endogener Inhibitor der Angiogenese und Fragment von einem Kollagen, in diesem Fall jedoch der $\alpha 1$ Kette des Kollagen Typ XVIII, welches ubiquitär in den Basalmembranen im Körper, v.a. denen der Epithelien und der Gefäße, vorkommt (O'Reilly 1997; Saarela et al., 1998). Ihm konnte nachgewiesen werden, dass es sowohl Angiogenese als auch das Tumorwachstum von verschiedenen Tumoren deutlich hemmt (O'Reilly et al., 1997).

Seine Effekte vermittelt es u.a. über eine Bindung an das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ und wirkt letztlich antiangiogen, u.a. durch Inhibierung von Migration und Tube-Formation der Endothelzellen (Sudhakar et al., 2003). Abgesehen davon gibt es noch diverse andere Wege über die das Endostatin in die Regulierung der Angiogenese involviert ist. Es bindet beispielsweise an den VEGFR-2, verhindert so die Bindung des VEGF an den VEGFR-2 und damit dessen Phosphorylierung und Aktivierung weiterer Signalkaskaden, was in einer Inhibition von Endothelzellproliferation und -migration resultiert (Kim, YM et al.; 2002). Außerdem führt Endostatin bei Endothelzelzellen zu einer Induktion von Apoptose (Dhanabal et al, 1999).

Die Thrombospondine sind eine Familie von extrazellulären Glykoproteinen, die aus fünf Mitgliedern besteht und an der Entstehung und dem Remodelling von verschiedenen Geweben beteiligt ist (Adams und Lawler, 2004).

Das in dieser Arbeit verwendete Mitglied Thrombospondin 2 (TSP-2) ist ebenfalls ein endogener Inhibitor der Angiogenese. Entsprechend wurde in TSP-2 Knock-Out-Mäusen u.a. ein signifikanter Anstieg der Gefäßdichte beschrieben (Kyriakides et al., 1998). Dazu passend zeigten Streit et al. anhand von Plattenepithelkarzinomzellen, die mit einem TSP-2 Expressionsvektor transfiziert wurden, dass die TSP-2-Expression in vivo zu einer deutlichen Inhibition des Tumorwachstums führt, indem es die Tumorangio-genese hemmt und so zu einer merklich verringerten Dichte und Größe der Tumorgefäße führt (Streit et al., 1999). Zudem konnte eine verminderte Metastasierung von Mamma-

Karzinomzellen durch TSP-2 vermittelte Inhibition der Tumorangiogenese nachgewiesen werden (Koch, M et al., 2011).

TSP-2 bewirkt eine Abnahme der VEGF-vermittelten Endothelzellmigration und der Tube-Formation, wobei diese Effekte über den CD36-Rezeptor vermittelt werden. Außerdem erhöht TSP-2 die Apoptoserate von Endothelzellen, ebenfalls CD36-vermittelt, (Koch, M et al., 2011) und führt zu einem Zellzyklusarrest in Phase G0/G1 (Armstrong et al., 2002), vermutlich auch CD6 vermittelt (Zhang and Lawler, 2007). Für das Thrombospondin 1 (TSP-1) wurde nachgewiesen, dass in größeren Gefäßen, deren Endothelzellen für CD36 negativ sind, β 1-Integrine den antiangiogenen Effekt auslösen und in kleineren Gefäßen zusammen mit dem CD36 diesen Effekt vermitteln (Short et al., 2005). Da TSP-1 und -2 nahe verwandt sind und die antiangiogen wirkenden Sequenzen, die auch die β 1-Integrine binden, in beiden vorhanden sind, ist es wahrscheinlich, dass auch TSP-2 eine ähnliche Funktion inne hat (Zhang und Lawler, 2007).

Weitere Rezeptoren sind Heparanproteoglykane und u.a. das Integrin α v β 3, welches über die Bindung von Thrombospondin zur Adhäsion von Endothelzellen führt (Chen, H et al., 1994; Bornstein et al., 2000). TSP-2 verhindert zudem eine Aktivierung von MMP-2 und -9 (Matrixmetalloproteinasen), was ebenfalls, u.a. durch eine verminderte Freisetzung von Extrazellulärmatrix-gebundenem VEGF, zu einer verminderten Angiogenese beiträgt (MacLauchlan et al., 2008).

1.3.6 Cilengitide

Cilengitide ist ein künstlich hergestelltes zyklisches Pentapeptid, das als Antagonist der Integrine α v β 3 und α v β 5 fungiert und deren Bindung an die Extrazellulärmatrix blockiert (Mitjans et al., 2000). Durch in vitro Versuche konnte nachgewiesen werden, dass Cilengitide die Migration, Differenzierung, so wie Proliferation von Endothelzellen inhibiert und zu einer gesteigerten Apoptoserate dieser führt, wodurch die Angiogenese gehemmt wird (Nisato et al., 2003), (Oliveira-Ferrer et al., 2008). Auch in in vivo Untersuchungen an Mäusen konnte die antiangiogene Wirkung nachgewiesen werden, was wiederum zu einer Inhibition des Tumorwachstums, bzw zur Tumorrückbildung führte (MacDonald et al., 2001; Eskens et al., 2003).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Malignen peripheren Nervenscheidentumore (MPNST) sind hochaggressive Weichteiltumore, die sporadisch auftreten können, in der Hälfte der Fälle jedoch mit der Neurofibromatose Typ 1 assoziiert

sind. Ihre Prognose ist unverändert ungünstig, da die Tumore zumeist chirurgisch nicht resezierbar sind und eine adjuvante Therapie mit Chemo- und Radiotherapie das Überleben nicht maßgeblich beeinflussen kann. Aus diesem Grund muss unbedingt an neuen therapeutischen Konzepten gearbeitet werden. Entsprechend soll Ziel des Projektes die Identifikation eines neuen Therapietargets für die Behandlung von NF1- assoziierten Tumoren wie MPNST sein.

Wie für alle soliden Tumoren ist auch für die MPNST die Angiogenese ein bedeutender Schritt für Tumorwachstum und -progression, sodass Moleküle, die an der Angiogenese beteiligt sind, interessante Ziele in der Krebstherapie sind. Hinzu kommt, dass durch verschiedene Arbeiten gezeigt werden konnte, dass ebendiese an der Angiogenese beteiligten Moleküle auch von Tumorzellen exprimiert und sezerniert werden und so direkt an deren Proliferation und Migration beteiligt sein können. Optimalerweise wäre ein Zielmolekül zu finden, mit dem nicht nur eine Hemmung der Tumorangiogenese, sondern auch ein direkter Effekt auf die Tumorzellen erzielt werden könnte.

Hierfür soll zum einen an zwei MPNST-Zelllinien (S462 und S1507.2) mit Hilfe von Flow Cytometry die Expression von den angiogenen Rezeptoren VEGFR-1/-2/-3, Nrp-2, Integrin α V β 5, Integrin α V β 3 und Integrin α 5 β 1 untersucht werden. Außerdem werden die beiden Zelllinien mittels Real time-PCR auf die Expression von den angiogenen Faktoren VEGF- D und VEGF-C hin überprüft.

Zum anderen wird an archivierten in Paraffin eingebetteten Gewebeproben, aus elf verschiedenen, an NF 1-assozierten MPNST erkrankten Patienten, mittels Immunhistochemie die Expression von den angiogenen Rezeptoren VEGFR-2, -3 und Nrp 2 untersucht und analysiert, inwiefern die genannten Rezeptoren nicht nur in Blut- und/oder Lymphgefäßen, sondern auch in den Tumorzellen selbst vorhanden sind.

Anhand dieser Ergebnisse wird *in vitro* untersucht, inwiefern sich eine Inhibition/Blockierung der relevanten Faktoren und Rezeptoren auf die Proliferation auswirkt. Dazu werden antiangiogene Substanzen wie Sema3F, sNrp-1, Endostatin, Tumstatin, TSP-2, Antikörper gegen VEGF-D und der Integrin-Antagonist Cilengitide verwendet. Desweiteren wird untersucht, welchen Effekt eine Hemmung mit den Substanzen Sema3F, sNrp-1 und TSP-2 auf die Invasivität der MPNST-Zelllinien hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

In dieser Arbeit wurden die beiden adhärent wachsenden MPNST-Zelllinien S462 und S1507.2 verwendet, die von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Viktor Mautner (Klinik und Poliklinik für Neurologie, Neurofibromatose-Ambulanz, Uniklinik Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bereitgestellt wurden. Bei beiden handelt es sich um etablierte Zelllinien aus humanen malignen peripheren Nervenscheidentumoren.

Außerdem wurde mit Wildtyp-Porcine aortic endothelial cells (PAE)-Zellen und stabil transfizierten PAE-Zellen (PAE-Sema3F, -Tumstatin, -mEs, -sNP und -TSP2) gearbeitet. Diese waren in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Leticia Oliveira-Ferrer (II Medizinische Klinik und Poliklinik, Hämatologie und Onkologie, Uniklinik Hamburg Eppendorf, Deutschland) bereits etabliert.

2.1.2 Tumormaterial

In dieser Arbeit wurde zudem Tumormaterial von elf verschiedenen NF 1-assoziierten MPNST-Patienten in Form von in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten verwendet. Diese wurden freundlicherweise von dem Neuropathologen Prof. Dr. Christian Hagel (Institut für Neuropathologie, Uniklinik Eppendorf, Hamburg, Deutschland) hergestellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Medien

70% Ethanol	Walter CMP, Kiel
80% Ethanol	Walter CMP, Kiel
96% Ethanol	Walter CMP, Kiel
99% Ethanol	Walter CMP, Kiel
AB-Serum	Biotest, Dreieich
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare, Fairfield, USA

Ammoniaklösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Annexin Binding Buffer	BD Biosciences, Franklin Lake, NY, USA
Annexin-V-FITC	BD Biosciences, Franklin Lake, NY, USA
Aqueous Mount	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
DEPC-behandeltem Wasser	Invitrogen, Carlsbad, USA
DiffQuick Färbeset	Medion Diagnostics, Düringen, Schweiz
Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit 4,5g/l D-Glukose und Glutamin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen, Carlsbad, USA
DTT	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eosin (0,2 %)	Medite, Burgdorf
FAST Start DNAMaster Sybr Green Kits	Roche, Basel, Schweiz
F12- Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Fetales bovines Serum (FBS)	Biochrom, Berlin
Geneticin	PAA, Pasching, Österreich
Hämalaunlösung nach Mayer (sauer)	Merck, Darmstadt
Hygromycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Laemmli-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Matrigel	BD, Franklin Lake, USA
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden

Natrium-Pyruvat (100x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage 4-12%Bis-Tris-Gele	Invitrogen, Carlsbad, USA
PageRuler Plus Prest. Prot. Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Penecillin/ Streptomycin-Lösung (100x)	PAA, Pasching, Österreich
Propidiumiodid (Stock 100 µg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Random Primer for cDNA-Synthesis	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads	GE Healthcare, Fairfield, USA
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy-Kit	Qiagen, Hilden
Target Retrieval Solution, Citrate pH6	Dako, Hamburg
Xylolersatz	Vogel, Gießen
ZytoChem (HRP) Broad Spectrum (AEC) Kit	Zytomed Systems, Berlin

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

24Well-Platten	Greiner, Frickenhausen
24Well-Einsätze mit 8µm ² Poren (transluzent)	Greiner, Frickenhausen
Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflasche T-25	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflasche T-75	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturschale (8 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturschale Cell ⁺ (8 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Nunc, Rochester, USA
Nitrocellulose-Membran	Whatman, Dassel

Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshafen
Petrischale quadratisch (120x120mm ²)	Greiner; Frickenhausen
Pipettenspitzen 10µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 200µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Quarzglaskapillare für LightCycler	Roche, Basel, Schweiz
Reaktionsgefäß 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß 2ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL)	GE Healthcare, Fairfield, USA
Serologische Pipette 1ml	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Serologische Pipette 2ml	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Serologische Pipette 5ml	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Serologische Pipette 10ml	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Serologische Pipette 25ml	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Zellkulturröhrchen 15ml	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturröhrchen 50ml	Greiner, Frickenhausen

2.1.5 Geräte und sonstige Materialien

Dampfgarer (Multi Gornet)	Braun GmbH, Kronberg/Taunus
FACSCalibur (Software CellQuest 3.3)	BD, Franklin Lakes, USA
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg
Light Cycler	Roche, Basel, Schweiz
Mikroskop (Axiovert 25)	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop (AxioScope A1)	Carl Zeiss, Jena

Mikroskop-Kamera (AxioCam MRc)	Carl Zeiss, Jena
Mini-Cell Gelelektrophoresekammer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Mini-PROTEAN II CellBlotting-Kammer	Bio-Rad, Hercules, Californien, USA
Nanadrop-1000	Peqlab, Erlangen
Pipettierhilfen für Stabpipetten	Hirschmann, Eberstadt
Power-Supply	Bio-Rad, Hercules, Californien, USA
Röntgenfilmentwicklungsmaschine (Curix 60)	Agfa, Mortsel, Belgium
Rührgerät	Janke & Kunkel, Staufen
Schüttelgerät	Edmund Bühler, Hechingen
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
ViCell-Gerät	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Werkbank (LaminAir)	Heraeus, Hanau
Wasserbad	GFC, Burgwedel
Zellkultur-Inkubator	Labotect, Göttingen
Zentrifuge (Centrifuge 5810R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Labofuge 400 R)	Heraeus, Hanau

2.1.6 Antikörper

Alpha _v beta ₃ (LM609) für FACS	R&D Systems, Minneapolis, USA
Alpha _v beta ₅ (P1F6) für FACS	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-goat IgG-HRP für Westernblot	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Anti-mouse IgG-HRP für WesternBlot	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Flt-1 für FACS (49560)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Flt-4 für FACS (54733)	R&D Systems, Minneapolis, USA

Flt-4 für IHC	Reliatech, Wolfenbüttel
His-Tag (27E8) für WesternBlot	Cell Signaling, Danvers, USA
Human VEGF-D AB, goat IgG, für Proliferation	R&D Systems, Minneapolis, USA
KDR für FACS (89106)	R&D Systems, Minneapolis, USA
KDR für IHC (55B11)	Cell Signaling, Danvers, USA
mES für WesternBlot	R&D Systems, Minneapolis, USA
Neuropilin 2 für FACS/IHC	R&D Systems, Minneapolis, USA
Normal goat IgG (Kontrolle)	R&D Systems, Minneapolis, USA
TSP für WesternBlot	Santa Cruz, Santa Cruz, USA

2.1.7 Primer

Alle Primer, die für die quantitativen RT-PCR-Analysen genutzt wurden, waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden. Sie waren mit Hilfe der Primer-3-Software (Whitehead Institute for Biomedical Research, Boston, MA, USA) designed und von der MWG Eurofins GmbH (Ebersberg) synthetisiert worden.

GAPDH for: 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGG-3'

GAPDH rev: 5'-TTTCTTACTCCTTGGAGGCC-3'

VEGF-C for: 5'-GCCAACCTCAACTCAAGGAC-3'

VEGF-C rev: 5'-CCCACATCTGTAGACGGACA-3'

VEGF-D for: 5'-ATGGACTCTCGCTCAGCATC-3'

VEGF-D rev: 5'-ATCGGAACACGTTACACAA-3'

2.1.8 Plasmide

Für die quantitative RT-PCR wurden Standard-Plasmide verwendet, die die zu amplifizierende PCR-Sequenz enthielten. Diese waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden. Für ihre Herstellung waren

die entsprechenden PCR-Produkte mit Hilfe des TA Cloning Sets von Invitrogen in einen pCRII-Vektor kloniert worden.

2.1.9 Puffer

10x Protein-Binding-Buffer:

500 mM NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
150 mM NaCl	J.T.Baker, Deventer, Netherlands
100 mM Imidazol	Merck, Darmstadt
mit NaOH auf pH 8,0	Merck, Darmstadt

10x Transfer-Puffer:

1M Tris base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1,93M Glycin	Carl Roth, Karlsruhe

10x Tris-Hepes-SDS-Puffer:

121g Tris base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
238g Hepes	Carl Roth, Karlsruhe
10g SDS	Bio-Rad, Hercules, Californien, USA
Ad 1L dH ₂ O	

PBS-BSA-NaN₃:

100 ml PBS (0,1M) pH 7,4	s.u.
200 mg Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
100 mg NaN ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

PBS-Puffer:

8,9g Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	Merck, Darmstadt
--	------------------

8,0g NaCl	J.T.Baker, Deventer, Netherlands
mit HCL auf pH7,4	Carl Roth, Karlsruhe
Ad 1L dH ₂ O	

TBS-T-Puffer:

20 mM Tris base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
0,137 M NaCl	J.T.Baker, Deventer, Netherlands
1 ml Tween-20/L	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
mit HCL auf pH 7,6	Carl Roth, Karlsruhe

Waschpuffer für Nickel-NTA:

50 mM NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
300 mM NaCl	J.T. Baker, Deventer, Netherlands
20mM Imidazol	Merck, Darmstadt
0,05 % Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
mit NaOH auf pH 8,0	Merck, Darmstadt

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von MPNST-Zellen

Beide MPNST-Zelllinien S462 und S1507.2 wurden in DMEM, dem 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Natriumpyruvat zugesetzt wurde, in einem Zellkultur-Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen gesplittet (ca 1:3). Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5ml DPBS gewaschen und anschließend mit 2ml Trypsin-EDTA-Lösung (1x konzentriert) zwei Minuten im Zellkultur-Inkubator inkubiert, was zur Ablösung der Zellen vom Boden führt. Durch Zugabe von 4ml frischem Medium wurde die durch die Trypsin-EDTA-Lösung hervorgerufene Reaktion gestoppt, ca. 4 ml der Zellsuspension wurde verworfen und zu dem

Rest frisches Medium hinzugefügt. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden zur Wahrung der Sterilität unter einer Werkbank durchgeführt.

2.2.2 Kultivierung von PAE-Zellen

Das Grundmedium für die PAE-Zellen war F12, dem 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde. Für die stabil transfizierten PAE-Zellen wurde außerdem, je nachdem mit welchem Vektor die PAE-Zell-Klone transfiziert worden waren, 1% Geneticin (PAE-mES, PAE-sNP, PAE-TSP2) oder 0,3% Hygromycin (PAE-Sema3F, PAE-Tum) dem Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden in T-25 Zellkulturflaschen gezüchtet. Die Zellen wurden ähnlich wie im 3.2.1 beschrieben kultiviert.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese vom Boden der Kulturflasche gelöst (s. 3.2.1) und die 6ml Zellsuspension in ein 15ml Zellkulturröhrchen gegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1400 rpm fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, um dann den Überstand abzusaugen und das Zellpellet in Cryosafe-Lösung zu resuspendieren. Dabei wurde für ein Kryoröhrchen 0,8ml Cryosafe-Lösung und etwa 1,5 bis 2 Millionen Zellen verwendet und diese dann bei -80°C eingefroren.

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurde sofort 10ml frisches Medium hinzugefügt, um die bei Raumtemperatur toxische Wirkung von dem in der Cryosafe-Lösung enthaltenen DMSO abzuschwächen und am nächsten Tag das Medium gewechselt, um das DMSO und die durch das Einfrieren und Auftauen getöteten Zellen zu entfernen.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden $10\mu\text{l}$ der zu zählenden Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben, die Zellzahl von vier Quadraten bestimmt und dann die durchschnittliche Zahl für ein Quadrat errechnet. Die Länge und Breite eines Quadrates messen jeweils 1mm, der Abstand zum Deckgläschen beträgt 0,1mm, so dass das Volumen über einem Quadrat $0,1\text{mm}^3$ beträgt. Die Zellzahl pro Milliliter berechnet sich dann wie folgt:

$$\text{Anzahl der Zellen in 4 Quadraten} / 4 \times 10^4 = \text{Zellen} / \text{ml}$$

2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence-activated cell sorting) ist eine Methode mittels derer man Zellen auf verschiedene Parameter wie Größe und Granularität untersuchen kann. Zudem können die Emission von Fluoreszenzfarbstoffen erfasst werden, um mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper, die gegen bestimmte Proteine gerichtet sind, zu detektieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen an einem Argon-Laser vorbeigeleitet, wodurch sie angeregt werden, und die verschiedenen Emissionsmuster der einzelnen Zellen werden dann von mehreren Detektoren erfasst. Der FSC (Forward light scatter) erfasst dabei das Vorwärtsstreulicht und lässt damit Aussagen über die Größe der Zellen treffen, der SSC (Sideward light scatter) erfasst dementsprechend das Seitwärtsstreulicht, womit man Aussagen über die Granularität der Zellen treffen kann.

2.2.5.1 Analyse der Expression von Angiogenese Faktoren in MPNST-Zellen

Beide in dieser Arbeit verwendeten MPNST-Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer Expression folgender Faktoren untersucht: VEGFR-1 (Flt1), VEGFR-2 (KDR), VEGFR-3 (Flt4), Integrin $\alpha_v\beta_3$, Integrin $\alpha_v\beta_5$, Integrin $\alpha_5\beta_1$ und Neuropilin-2.

	10% AB-Serum/PBS	Antikörper	FITC- Isotypenkontrolle	PE- Isotypenkontrolle
Negativkontrolle	100 μ l	-	-	-
FITC-Isotypenkontrolle	97 μ l	-	3 μ l	-
PE-Isotypenkontrolle	93 μ l	-	-	7 μ l
VEGFR-1-PE	93 μ l	7 μ l	-	-
VEGFR-2-PE	93 μ l	7 μ l	-	-
VEGFR-3-PE	93 μ l	7 μ l	-	-
Integrin- $\alpha_v\beta_5$ -PE	93 μ l	7 μ l	-	-
Integrin- $\alpha_v\beta_3$ -FITC	97 μ l	3 μ l	-	-
Integrin- $\alpha_5\beta_1$ (Mouse)	98 μ l	2 μ l	-	-
Anti-Mouse-FITC	98 μ l	2 μ l	-	-

Neuropilin-2 (Goat)	93 μ l	7 μ l	-	-
Anti-Goat-FITC	93 μ l	7 μ l	-	-

Tabelle 2.1: Pipettierschema für Expressionsanalysen

Für alle Ansätze wurden die zu untersuchenden Zellen geerntet und bei 1400 rpm fünf Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in einem Milliliter PBS resuspendiert und gezählt. In jedes FACS-Röhrchen wurden etwa 500×10^3 Zellen gegeben. Die Zellen wurde erneut abzentrifugiert und die Ansätze entsprechend der Tabelle 3.1 mit 10% AB-Serum/PBS und ggf. den Antikörpern bzw. der FITC- und der PE-Isotypenkontrolle versehen. Dann wurden die Ansätze 20-30 Minuten im Kühlschrank bei Dunkelheit inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen und zum Schluss in 500 μ l PBS resuspendiert. Die Ansätze, bei denen mit PE oder FITC gekoppelte Antikörper verwendet wurden (VEGFR-1 (Flt1), VEGFR-2 (KDR), VEGFR-3 (Flt4), Integrin $\alpha_v\beta_3$, Integrin $\alpha_v\beta_5$), konnten nun direkt am Durchflusszytometer FACSCalibur mit der Software CellQuest 3.3 analysiert werden.

Bei Neuropilin-2 und dem Integrin $\alpha_5\beta_1$ handelte es sich um ungekoppelte Antikörper. Hier wurde zunächst gleich vorgegangen, siehe Tabelle 3.1. Nach der Inkubation mit dem ungekoppelten Antikörper gegen den jeweiligen Faktor schloss sich für diese Ansätze nach einmaligem Waschen mit PBS noch eine zweite 20-30minütige Inkubation mit den FITC gekoppelten Anti-Goat bzw. -Mouse Antikörpern an. Das weitere Prozedere glich dem schon beschriebenen. Als Kontrolle für diese Ansätze dienten die gekoppelten Anti-Goat bzw. -Mouse Antikörper.

Pro Zelllinie und zu untersuchendem Marker wurden drei Ansätze pro Analyse gemacht, die Messung wurde zweimal durchgeführt.

2.2.6 RNA-Isolierung

RNA-Isolierung wurde an beiden MPNST-Zelllinien sowie an HMEC-Zellen vorgenommen. Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. An den Zellpellets wurde dann die RNA-Isolierung mittels des RNeasy Kits nach Herstellerangaben mit DNase-Verdau mittels RNase-Free DNase Set vorgenommen. Die gewonnene RNA wurde dann in 30 μ l DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert und dann die RNA-Konzentration am Nanodrop-1000 gemessen.

2.2.7 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 3 µg RNA auf ein Volumen von 30 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde dann für 10 Minuten bei 65 °C im Thermocycler inkubiert und danach für zwei Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads und des noch zuzufügenden 3 µl Random-Primers nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

2.2.8 Quantitative Real-Time-PCR

Die konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mittels derer bestimmte Genabschnitte amplifiziert werden können. Das erfolgt in Zyklen, die jeweils in die Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation unterteilt werden können. In der Phase der Denaturierung werden die Wasserstoffbrückenbindungen durch Erhitzen auf 94-96°C aufgebrochen, sodass DNA-Einzelstränge entstehen. Bei der sich anschließenden Annealing-Phase lagern sich die nachzuweisenden DNA-Sequenz einrahmenden Primer an die Einzelstränge. Dazu muss eine für diese Primer spezifische Temperatur eingestellt sein. Bei der folgenden Elongation werden die komplementären DNA-Stränge von der DNA-Polymerase synthetisiert. Das PCR-Produkt kann dann durch beispielsweise Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Bei der quantitativen Realtime-PCR mit dem Light Cycler ist es möglich, diese PCR-Produkte noch zu quantifizieren. Hierfür gibt man Fluoreszenzfarbstoffe zur Probe dazu, in dieser Arbeit SYBR Green I, die in der amplifizierten doppelsträngigen DNA interkalieren, was zu einem Anstieg ihrer Fluoreszenzintensität führt. Die so proportional zur PCR-Produkt-Amplifikation zunehmende Fluoreszenz kann dann gemessen werden, wodurch ebenfalls eine Quantifizierung des PCR-Produktes möglich ist.

Für die Quantifizierung der cDNA wurde in dieser Arbeit eine Standardreihe verwendet. Diese wurde mit Plasmiden –mit einer bekannten Konzentration- hergestellt, die die zu untersuchende cDNA enthielten und in vier verschiedenen log-Verdünnungsstufen eingesetzt wurden. Zur Normierung der Gen-Expression der jeweiligen Zielgene wurde das Housekeeping-Gen GAPDH verwendet.

2.2.8.1 Analyse der Expression von VEGF-C und VEGF-D

In dieser Arbeit sollte die Expression von den beiden proangiogenen Faktoren VEGF-C und VEGF-D in MPNST-Zellen untersucht werden, weswegen die aus beiden MPNST-Zelllinien gewonnene cDNA hinsichtlich ebendieser analysiert wurde. Als Positivkontrolle wurde außerdem die cDNA eines

HMEC-Zellpellets auf VEGF-C und -D untersucht, da bei diesen Zellen bekannt war, dass sie beide Faktoren exprimieren.

Die Expressionswerte von VEGF-C und VEGF-D wurden wie oben erwähnt auf das Haushaltsgen GAPDH normiert. Von den MPNST-Zellen wurde zweimal cDNA gewonnen und beide Male jeweils pro Faktor zwei PCR-Läufe durchgeführt. Von den HMEC-Zellen wurde nur einmal cDNA gewonnen, wobei ebenfalls pro Faktor zwei Läufe gemacht wurden.

Zunächst wurde die zu untersuchende cDNA mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Verhältnis 1:3 verdünnt. Anschließend wurde unter Verwendung des FAST Start DNAMaster Sybr Green Kits nach Herstellerangaben vorgegangen und die Proben dann am Light Cycler analysiert. Dazu wurden 40 Amplifikationszyklen zu den in der Tabelle 3.2 aufgeführten Bedingungen ausgeführt.

	Denaturierung	Amplifikation	Elongation
GAPDH	95°C (15s)	61°C (10s)	72°C (26s)
VEGF-C	95°C (15s)	60°C (10s)	72°C (26s)
VEGF-D	95°C (15s)	60°C (10s)	72°C (26s)

Tabelle 2.2: Bedingungen für die quantitative RT-PCR

2.2.9 Herstellung von konditionierten Medien (CM) und Aufkonzentrieren der von PAE-sezernierenden Faktoren

PAE-Zellen wurden in einer T-75 Gewebekulturflasche bis zum Erreichen von Konfluenz kultiviert und dann über 24 bis 48 Stunden mit 10ml serumfreiem DMEM inkubiert. Das konditionierte Medium (CM) wurde abgenommen, zentrifugiert, um tote Zellen zu entfernen und mit 4% FCS versetzt.

Die rekombinanten Proteine, die von den stabil transfizierten PAE-Zellen sezerniert wurden, wurden aus den CM der jeweiligen PAE-Zellen aufkonzentriert, um sie anschließend mit einem Western Blot nachzuweisen. Als Negativkontrolle wurde das CM der Wildtyp-PAE-Zellen ebenfalls aufkonzentriert. Hierfür wurden jeweils 4ml des CM mit 400 µl 10x Protein Binding Buffer und 15µl Nickel-NTA versetzt.

Diese Suspension wurde dann über Nacht bei 4°C beim Drehen inkubiert und danach bei ebenfalls 4°C 5-10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit dem Waschpuffer für Nickel-NTA gewaschen, dann 10 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend bei

4°C und 4000 rpm 5-10 Minuten zentrifugiert. Das Überstand wurde wieder abgenommen und das Pellet in 20µl Laemmli-Puffer (2x) resuspendiert, nachdem dem Laemmli-Puffer zuvor 1µl DDT hinzugefügt worden war. Zuletzt wurden die Proben 5 Minuten bei 95°C erhitzt und so denaturiert. Diese Vorgehensweise wurde bei den Wildtyp-PAE-Zellen und den stabil transfizierten PAE-Sema3F, -sNP und -Tum Zellen angewendet.

Für die CM der PAE-mES und -TSP Zellen wurde eine etwas andere Methode angewendet. Hierzu wurden 5-10 ml Überstand mit 20µl Heparin-Agarose versetzt. Auch diese Proben wurden dann bei 4°C über Nacht gedreht, dann bei 4000 rpm und 4°C 5-10 Minuten zentrifugiert und anschließend allerdings mit PBS gewaschen. Dann wurden die Proben wiederum bei 4°C und 4000 rpm 5-10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet in 20µl Laemmli-Puffer versetzt mit 1µl DDT resuspendiert und danach bei 95°C erhitzt.

2.2.10 Western-Blot

Die aufkonzentrierten Proteine wurden durch das Gelelektrophorese-Verfahren aufgetrennt. Dazu wurde das NuPage 4-12%Bis-Tris-Gel in die dafür vorgesehene Mini-Cell-Elektrophoresekammer eingespannt und der Pufferbehälter mit 1x Tris-Hepes-SDS-Puffer aufgefüllt. Die aufkonzentrierten Proben wurden in Taschen pipettiert, wobei maximal 30µl pro Tasche appliziert wurden. Leere Taschen wurden mit 1x Laemmli-Puffer aufgefüllt und eine Tasche pro Gel mit 7µl des Markers PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, der zur Bestimmung der Proteingröße genutzt wurde. Die Auftrennung erfolgte durch Anschließen an den Power Supply und Anlegen einer 170V Spannung für etwa 1 Stunde.

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dazu wurden das Gel und die Nitrocellulose-Membran nach der „Sandwich“-Methode in Halterungen eingespannt, wobei die erste Lage in Transferpuffer eingelegtes Filterpapier bildete, die nächste das Gel, darüber die Membran und zum Schluss nochmal in Transferpuffer getränktes Filterpapier. Es wurde darauf geachtet, dass eventuelle Luftblasen zwischen den Schichten entfernt wurden. Die Halterungen wurden dann zusammen mit einem Kühlpack in eine mit Transferpuffer gefüllte Mini-PROTEAN II CellBlotting-Kammer eingespannt und für etwa 1 Stunde an den Power Supply angeschlossen, der auf 350mA eingestellt war.

Als nächstes wurden die auf die Membran übertragenen Proteine geblockt, damit unspezifische Bindungen möglichst vermieden werden. Hierzu wurde 2,5g Milchpulver in 50ml (5%) TBS-T-Puffer gelöst und die Membran für 1 Stunde mit dieser Lösung bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-T-Puffer für 10 Minuten wurde dann der jeweilige erste

Antikörper auf die Membran gegeben. Für Abschnitte der Membran mit den Proben für Wildtyp, Sema3F, sNP und Tumstatin wurde der HisTaq-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet, wobei mit dem TBS-T-Puffer verdünnt wurde. Für die Abschnitte der Membran mit den Proben mES und TSP wurde der mES-Antikörper in einer Verdünnung 1:500 bzw. der TSP-Antikörper in einer Verdünnung 1:200 verwendet. Für die Verdünnung wurde ebenfalls TBS-T-Puffer verwendet. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler mit dem Antikörper inkubiert.

Anschließend wurde, nachdem dreimal 10 Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen worden war, für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Für die Proben, die zuvor mit dem HisTaq-Antikörper inkubiert worden waren, wurde ein HRP-gekoppelter Anti-mouse Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet. Für die anderen beiden Proben wurde ein HRP-gekoppelter Anti-goat Antikörper verwendet. Beide wurden in 5% Milchpulver in TBS-T verdünnt. Daran schloss sich noch zweimaliges Waschen für fünf und zweimaliges Waschen für 20 Minuten an.

Abschließend wurde das ECL-Kit nach Herstellerangaben verwendet, so dass an den Stellen auf der Membran, auf denen der HRP-gekoppelte zweite Antikörper gebunden hatte, eine chemilumineszente Substanz frei wurde. Die Membran wurde dann in eine Röntgenkassette zwischen zwei transparente Folien eingelegt und in einer Dunkelkammer einmal für zwei und danach noch einmal für fünf Minuten einem Röntgenfilm exponiert, der dann von einer Röntgenfilmentwicklungsmaschine entwickelt wurde.

2.2.11 Proliferations-Assays

Alle Proliferations-Assays wurden mit beiden MPNST-Zelllinien durchgeführt. Die Analysen wurden mit dem ViCell Gerät der Firma Beckman & Coulter vorgenommen, mit dem nicht nur die Zellzahl und damit die Proliferationsrate, sondern auch die Zellvitalität bestimmt werden konnte.

2.2.11.1 Stimulation mit Sema3F, sNP, Tum, mES, TSP-2

Für die Proliferations-Assays wurden Gewebekulturschalen Cell⁺ mit einer Fläche von 8cm² genutzt, von denen jeweils sechs in eine quadratische Petrischale mit einer Fläche von 120mm x120mm gesetzt wurden. Pro Gewebekulturschale wurden von den MPNST 462 45 x10³ Zellen ausgesät, von den MPNST 1507.2 30x10³ Zellen. Sie wurden dann über 24 Stunden mit 2ml ihres normalen Kulturmediums inkubiert.

Anschließend wurden sie mit 1,5 ml CM der stabil transfizierten PAE-Zellen bzw. die Kontrolle mit dem CM der Wildtyp-PAE-Zellen stimuliert. Die Zellzahl wurde nach 24 und 48 Stunden, bzw. nach 48 und 72 Stunden bestimmt. Pro zu untersuchendem Faktor bzw. Kontrolle und Tag gab es drei Ansätze. Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen geerntet und zusammen mit dem jeweiligen Überstand und den darin enthaltenen toten Zellen dem ViCell zur Analyse gegeben. Wichtig war, dass nicht nur die lebenden, adhärenen, sondern auch die toten im Medium schwimmenden gezählt wurden, um genauere Werte im Hinblick auf Zellproliferation und Vitalität zu erhalten.

2.2.11.2 Stimulation mit Anti-VEGF -D Antikörpern

Diese Versuche wurden wie die oben beschriebenen (3.2.11.1) durchgeführt. Hierbei wurde allerdings mit 4% FCS angereichertes DMEM, in dem der blockierende Anti-VEGF-D IgG Goat gelöst war, verwendet. Es wurden drei Konzentrationen untersucht: 50ng/ml, 100ng/ml und 600ng/ml Anti-VEGF-D. Als Kontrolle wurde das mit 4% FCS angereicherte DMEM mit einem nicht spezifischen IgG Goat in einer Konzentration von 600ng/ml benutzt. Zudem gab es eine zweite Kontrolle mit 4% FCS angereichertem DMEM ohne einen Antikörper. Pro Konzentration und für die Kontrollen gab es ebenfalls je drei Ansätze.

2.2.11.3 Stimulation mit CGT

Für diese Versuche wurde ebenso vorgegangen wie oben. Hierbei wurde allerdings mit 4% FCS angereichertes DMEM, in dem CGT gelöst war, verwendet, wobei drei Konzentrationen untersucht wurden: 1µg/ml, 5µg/ml und 50µg/ml CGT. Als Kontrolle wurde das mit 4% FCS angereicherte DMEM ohne CGT benutzt. Pro Konzentration und für die Kontrolle gab es ebenfalls je drei Ansätze.

2.2.12 Apoptose-Assays

Mit dieser Methode sollte die Frage nach einem möglichen Einfluss von CGT auf die Apoptoserate der MPNST-Zellen untersucht werden. Dazu machte man sich die Eigenschaften von Annexin V-FITC zunutze, das an das Phospholipid Phosphatidylserin bindet, welches in apoptotischen Zellen von der Innenseite der Phospholipidmembran an die Außenseite transportiert wird und dann von dem Annexin V-FITC detektiert werden kann. Allerdings kann dieses auch bei nekrotischen Zellen an Phosphatidylserin binden, da bei diesen Zellen die Membran zerstört und dadurch durchlässig für diesen Stoff ist. Um nekrotische von apoptotischen Zellen zu unterscheiden, wurde gleichzeitig mit

Propidiumiodid (PI) gefärbt, das in der DNA einer Zelle interkaliert. Lebendige und apoptotische Zellen sind im Gegensatz zu nekrotischen Zellen undurchlässig für diesen Stoff. Zellen, die negativ für PI, aber positiv für Annexin V-FITC sind, sind also apoptotische Zellen, Zellen, die für beides positiv sind, sind nekrotische Zellen, Zellen, die für beides negativ sind, sind lebendig.

Angelehnt an die Proliferations-Assays wurden die gleichen drei verschiedenen CGT-Konzentrationen untersucht und eine Kontrolle mit dem 4% FCS DMEM gemacht. Außerdem gab es noch vier unbehandelte Proben, die in normalen Medium gewachsen waren, von denen eine ungefärbt blieb, eine nur mit PI, eine nur mit Annexin V-FITC und eine mit beiden Farbstoffen gefärbt wurde. Diese dienten als Referenz für die Messung am Durchflusszytometer. Die Apoptoserate wurde nach 48 Stunden gemessen und sie wurde ebenfalls an beiden Zelllinien untersucht. Es wurden pro Tag und Konzentration bzw. Kontrolle zwei Ansätze gemacht und der Versuch wurde dreimal mit jeder MPNST-Zelllinie durchgeführt.

Es wurde bis zum Ernten der Zellen genauso vorgegangen wie bei den oben beschriebenen Proliferations-Assays, nur dass von den Zellen der Linie MPNST-462 75×10^3 pro Gewebekulturschale ausgesät wurde und von denen der Linie MPNST-1507.2 60×10^3 . Die geernteten Zellen wurden dann, ebenfalls mit ihrem Überstand, in FACS-Röhrchen gegeben, zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden sie in $100 \mu\text{l}$ 1x Annexin Binding Buffer resuspendiert und jeweils $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC und/oder $5 \mu\text{l}$ PI hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Abschließend wurden weitere $400 \mu\text{l}$ Annexin Binding Buffer pro Probe hinzugefügt und innerhalb einer Stunde die Messungen am Durchflusszytometer durchgeführt.

2.2.13 Invasion-Assays

Es sollte untersucht werden, ob die Invasivität der Zellen der beiden in dieser Arbeit verwendeten MPNST-Zelllinien durch die antiangiogenen Faktoren Sema3F, sNrp-1 und TSP-2 beeinflusst werden kann. Zunächst wurde in Vorversuchen die Invasivität der beiden Zelllinien getestet. Da die Zelllinie MPNST S1507.2 dabei keine Invasivität zeigte, wurden die Invasion-Assays nur mit Zellen der Linie MPNST S462 durchgeführt.

Hierzu wurde zunächst Matrigel über Nacht im Kühlschrank auf Eis aufgetaut und im nächsten Schritt mit kaltem serumfreien DMEM 1:9 verdünnt. Von dieser Lösung wurden jeweils $100 \mu\text{l}$ in 24-Well-Einsätze mit $8 \mu\text{m}$ großen transluzenten Poren ausplattiert, die in dafür vorgesehene 24-Well-Platten eingehängt worden waren. Dafür wurden zuvor gekühlte Pipettenspitzen benutzt. Die Matrigel-Lösung wurde über Nacht im Zellkulturinkubator bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, sodass sie am nächsten Tag geliert war. In die Einsätze mit dem Matrigel wurden dann jeweils 30×10^3 MPNST S462-Zellen ausgesät zu-

sammen mit jeweils 400µl von serumfreien CM der stabil transfizierten PAE-Sema3F, -sNrp und -TSP-2 Zellen. Als Kontrolle wurde das CM von Wildtyp-PAE-Zellen genutzt. Pro Faktor bzw. Kontrolle wurden drei Ansätze hergestellt und die Versuche 2 Mal durchgeführt. In die Wells wurden 750µl DMEM mit 10% FCS gegeben, wobei das FCS den Anreiz für die Zellen darstellte, durch das Matrigel nach unten zu wandern. Nach 72 stündiger Inkubation im 37°C Zellkultur-Inkubator wurden die Zellen, die sich oben auf der transluzenten Membran der Einsätze befanden, zusammen mit dem Medium abgenommen bzw. -gewischt. Dadurch blieben nur noch die Zellen übrig, die durch das Matrigel und die Membran gewandert waren und nun an deren Unterseite hafteten. Diese Zellen wurden mit dem DiffQuick Färbeset nach Herstellerangaben angefärbt. Dazu wurden die Einsätze mit den Membranen und damit den zu färbenden Zellen in mit der jeweiligen Lösung gefüllten Wells der 24-Well-Platten gehängt. Auf die gleiche Weise wurden die Zellen anschließend noch zwei Mal zwei Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit den angefärbten Zellen aus den Einsätzen herausgelöst und mit Aqueous Mount eingedeckelt, sodass die Anzahl angefärbter Zellen pro Well unter dem Mikroskop (Axiovert 25) bei 10facher Vergrößerung gezählt werden konnte.

2.2.14 Immunhistochemische Färbungen (IHC)

Mit immunhistochemischen Färbungen wurden in dieser Arbeit die Gewebeschnitte von elf verschiedenen MPNST-Patienten hinsichtlich der Expression der Rezeptoren VEGFR-2, -3 und Nrp-2 untersucht (bei VEGF-R-3 fehlt die Tumorprobe E077).

Zunächst wurde von jedem der elf verschiedenen MPNST-Gewebeschnitte ein Schnitt HE-gefärbt, um die Tumorstruktur beurteilen zu können. Das diente dazu, einen Vergleich für die immunhistochemisch gefärbten Schnitte zu haben.

Für die HE-Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst entparaffiniert. Dafür wurde sie zunächst für zwei Mal zehn Minuten in Xylolersatz gegeben, dann jeweils fünf Minuten in 99%, 96%, 80% und zuletzt 70% Ethanol. Abschließend wurden sie fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden sie für fünf Minuten in saurer Hämalaun-Lösung nach Mayer gefärbt. Es folgte zweimaliges Waschen mit destilliertem Wasser für je zwei Minuten und dann zweimaliges Eintauchen in Ammoniaklösung, bis die Färbung eine blaue Farbe annahm. Nach weiterem zweimaligem zweiminütigen Waschen mit destilliertem Wasser wurde für zehn Minuten mit einer 0,2%igen Eosin-Lösung gefärbt. Nach der Färbung wurden die Schnitte dann durch eine aufsteigende Ethanolreihe mit Xylolersatz als Abschluss dehydriert und mit Eukitt-Lösung eingedeckelt.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde zunächst wie bei der HE-Färbung entparaffiniert. Daran schloss sich dann allerdings eine Antigendemaskierung an. Für die Färbungen mit den Antikörpern gegen VEGFR-3 und Nrp2 wurden die Schnitte im vorgewärmten Puffer Dako REAL Target Retrieval Solution, pH 6, 20 Minuten im Dampfgerat erhitzt. Für die Färbungen mit Antikörpern gegen VEGFR-2 wurden die Schnitte 20 Minuten in ebenfalls vorgewärmter 1mM EDTA-Lösung erhitzt. Nach der Antigendemaskierung kühlten die Schnitte 20 Minuten ab, bevor sie zehn Minuten mit PBS gewaschen wurden. Daran schloss sich die eigentliche Färbung an, die mit dem ZytoChem-HRP-Kit (AEC) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Dieses Kit arbeitet nach dem Streptavidin-Biotin-Prinzip. Die entsprechenden ersten Antikörper für die Färbungen wurden mit dem Puffer PBS/BSA/NaN₃ verdünnt. Der Antikörper gegen Flt-4 wurde 1:100 verdünnt und dann eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, der gegen Nrp2 1:20 und über Nacht bei 4°C inkubiert und der gegen KDR 1:300 und er wurde wiederum eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entwicklungszeit betrug bei allen Färbungen etwa zehn Minuten bevor die Reaktion mit destilliertem Wasser gestoppt wurde. Zum Schluss wurde noch eine Gegenfärbung durchgeführt mit Hämalaun-Lösung nach Mayer (sauer) und Ammoniaklösung und danach mit Aqueous Mount eingedeckelt.

Zur Auswertung wurden die gefärbten Schnitte unter dem Axio Scope A1 bei 10 und 32 facher Vergrößerung angeschaut. Bewertet wurde zum einen die Positivität der Tumorproben für die entsprechende Färbung und in die Gruppen 0 (0% der Tumorzellen), 1 (1-40% der Tumorzellen), 2 (41-70% der Tumorzellen), 3 (71-100% der Tumorzellen) eingeteilt. Zum anderen wurde die Intensität der Färbung beurteilt, wobei zwischen den Intensitätsstufen 0, 1, 2 und 3 unterschieden wurde. In Anlehnung an eine Arbeit von Remmele und Stegner wurde anschließend aus den Werten der beiden Gruppen das Produkt gebildet, was dann dem jeweiligen Präparat zugeordnet wurde (Remmele und Stegner, 1987). Die Spezifität der jeweiligen Antikörper war in Vorversuchen und durch die freundliche Mitbeurteilung durch Prof. Dr. C. Hagel, Institut für Neuropathologie, Uniklinik Hamburg Eppendorf, bestätigt worden.

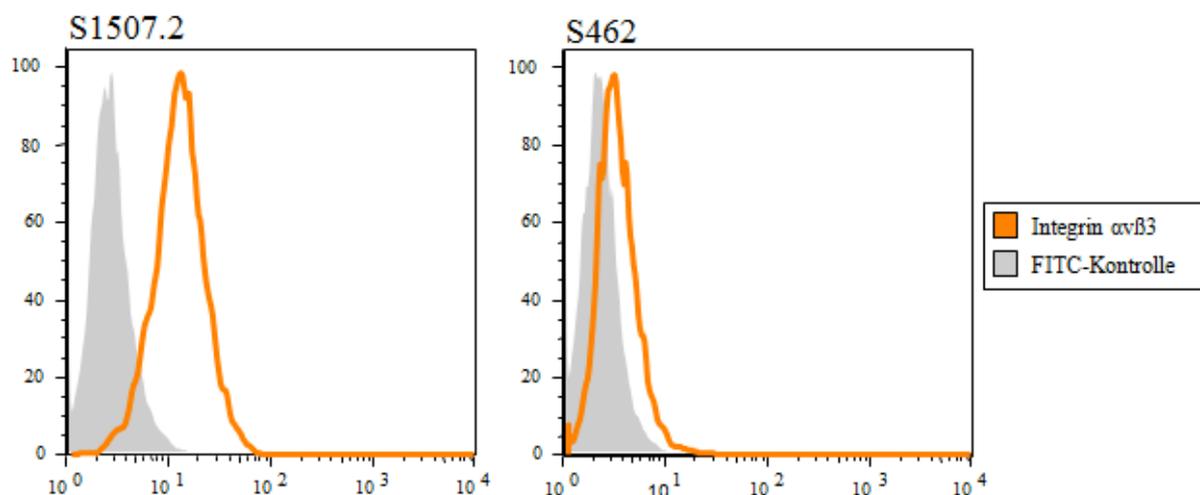
3 Ergebnisse

3.1 Expression angiogener Faktoren in MPNST

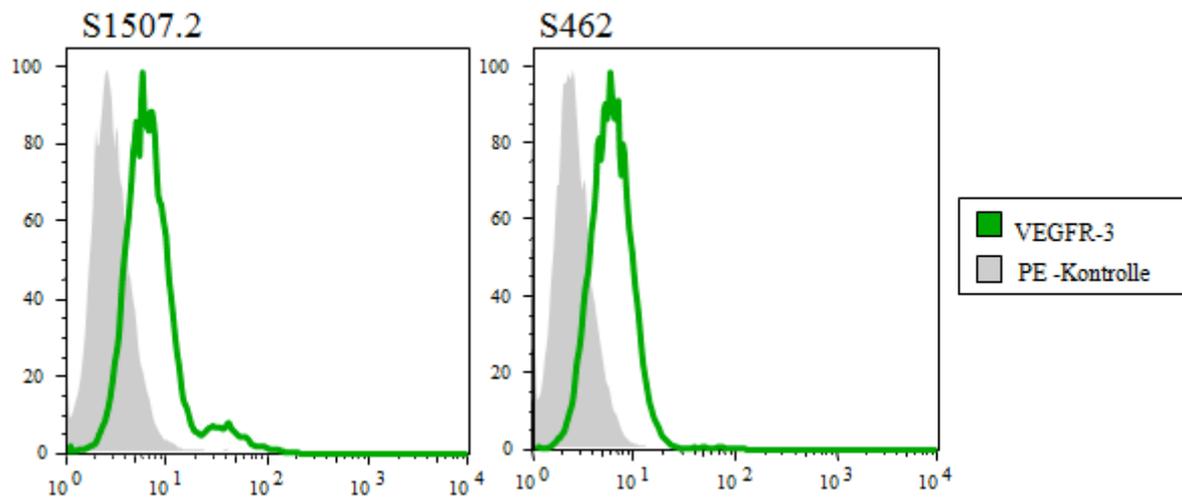
3.1.1 Expressionsanalysen in MPNST-Zelllinien

Die MPNST-Zelllinien S462 und S1507.2 wurden mittels FACS-Analyse auf die Expression von an der Angiogenese beteiligten Rezeptoren untersucht. Der Fokus lag bei der Expressionsanalyse auf den Rezeptoren der für die Angiogenese sehr bedeutenden VEGF-Familie, VEGFR-1, -2 und -3, sowie Nrp 2, ein Co-Rezeptor für den VEGFR-2 und VEGFR-3. Zudem wurde die Expression der Integrine, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ überprüft, welche ebenfalls eine Rolle bei der Angiogenese spielen.

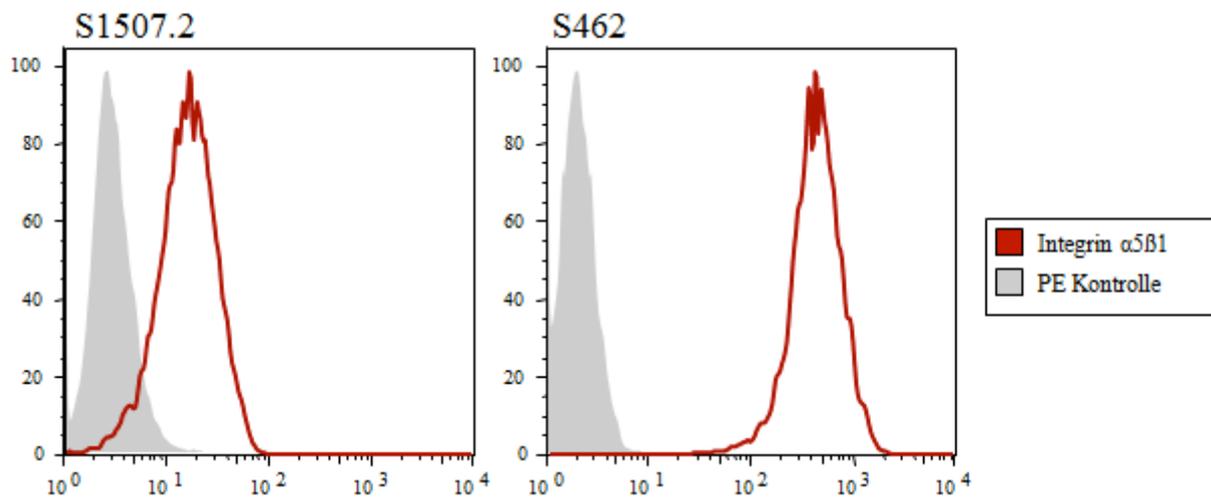
Durch die FACS-Analysen, siehe Abbildung 4.1 und 4.2, konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass Integrin $\alpha 5\beta 1$ von beiden Zelllinien (in 98% bzw. 78% der Zellpopulation) stark exprimiert wird, Integrin $\alpha v\beta 3$ jedoch nur von der Zelllinie S1507.2. Integrin $\alpha v\beta 5$ sowie VEGFR-2 werden von keiner der beiden Zelllinien exprimiert. Die höchste Expressionsrate unter den VEGF-Rezeptoren zeigte der VEGFR-3 (mit 30% und 15% der Zellpopulation bei den S462 bzw. S1507.2). Das Nrp-2 wurde etwas weniger exprimiert als der VEGFR-3 mit aber ebenfalls höheren Raten in den S462. Der VEGFR-1 wurde noch etwas schwächer exprimiert mit etwas höheren Raten in den S1507.2.



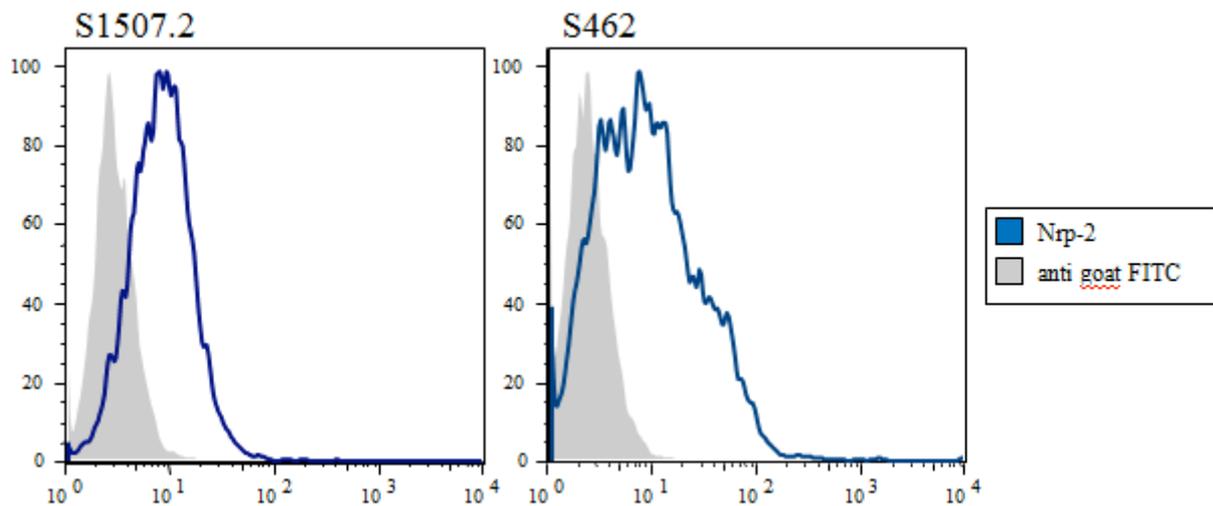
a)



b)



c)



d)

Abbildung 3.2: Expressionsanalysen einzelner angiogener Rezeptoren in MPNST-Zelllinien auf Proteinebene mittels FACS. Die Abbildungen a) - d) zeigen exemplarisch die Ergebnisse der FACS-Analysen hinsichtlich der Expression des Integrin $\alpha\beta 3$, des VEGFR-3, des Integrin $\alpha 5\beta 1$ und des Nrp-2 durch die beiden MPNST-Zelllinien S1507.2 und S462. Die jeweiligen Rezeptoren sind farblich dargestellt, die dazugehörigen Isotyp-Kontrollen jeweils in grau. Y-Achse: Zellzahl, X-Achse: Intensität der jeweiligen Fluoreszenz.

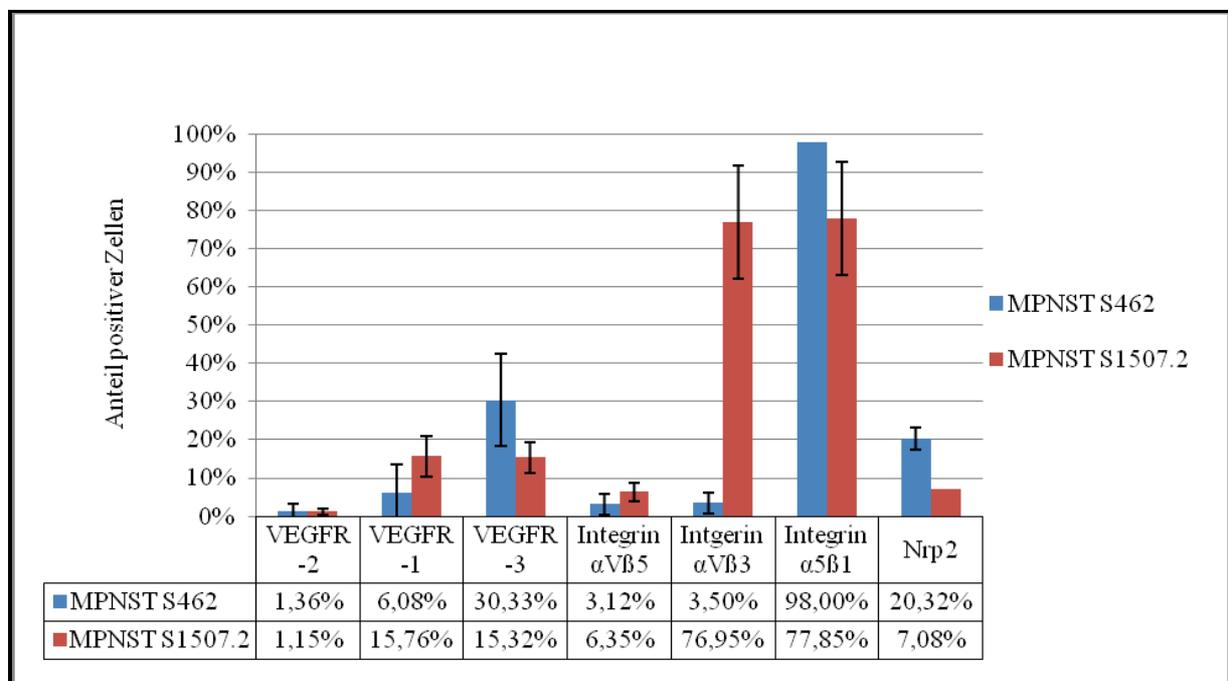
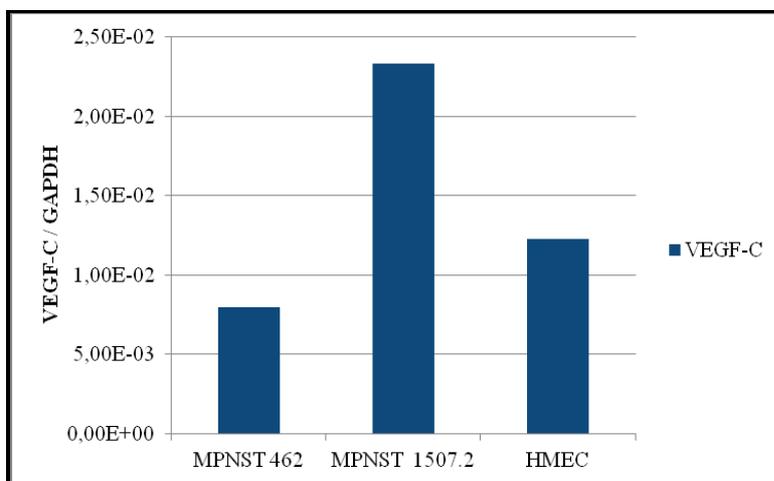


Abbildung 3.1: Expressionsanalyse angiogener Rezeptoren in MPNST-Zelllinien auf Proteinebene mittels FACS. Die beiden Zelllinien S462 und S1507.2 wurden jeweils auf ihre Expression der für die Angiogenese bedeutsamen Rezeptoren VEGFR-1, -2, -3, Nrp-2, Integrin $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ durchflusszytometrisch untersucht und die Ergebnisse in der obigen Abbildung einander gegenübergestellt.

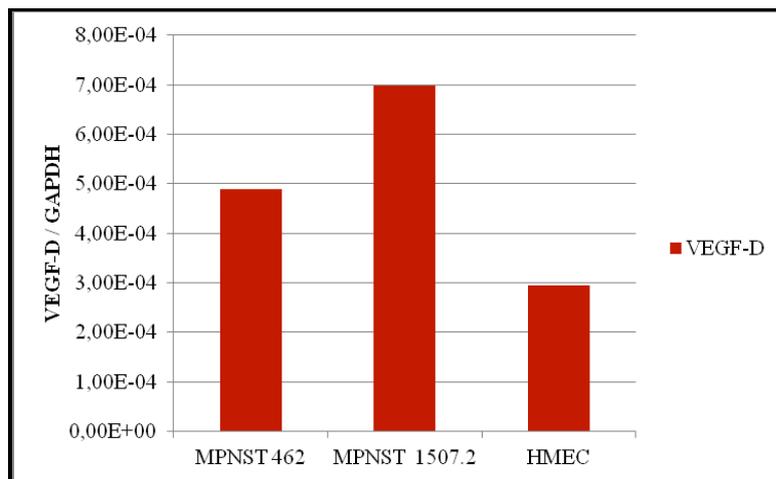
Von den Rezeptoren der VEGF-Familie, eine der wichtigsten im Rahmen der Angiogenese, war die Expression des VEGFR-3 am höchsten. Daher wurde sich in einem weiteren Schritt auf die Untersuchung der Expression von VEGF-C und -D, Liganden des VEGFR-3 sowie des Nrp2, konzentriert. Dazu wurde nach Gewinnung von cDNA aus beiden Zelllinien, wie oben beschrieben, mittels quantitativer RealTime-PCR Expressionsanalysen hinsichtlich der beiden Faktoren auf mRNA-Ebene durchgeführt.

Wie in der Abbildung 4.2 dargestellt, zeigte sich, dass sowohl VEGF-C, als auch -D von den beiden Zelllinien S462 und S1507.2 exprimiert wird. In den S1507.2 werden dabei beide Faktoren im Vergleich zu den S462 stärker exprimiert. Außerdem fällt auf, dass insgesamt in beiden Zelllinien VEGF-C um ein bis zwei Zehnerpotenzen mehr exprimiert wird im Vergleich zu VEGF-D.

Als Positivkontrolle wurde die Endothelzelllinie HMEC-1 verwendet, von der bekannt ist, dass sie die Faktoren VEGF-C und VEGF-D exprimiert.



a)



b)

Abbildung 4.2: Expression von VEGF-C und -D in MPNST-Zelllinien auf mRNA-Ebene. In a) ist die Expression von VEGF-C dargestellt, in b) die von VEGF-D. In beiden Fällen wurden HMEC-Zellen als Positivkontrollen eingesetzt und die Expression der beiden Faktoren auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert.

3.1.2 Expression angiogener Faktoren in Gewebeproben

Es sollte nicht nur das Angiogeneseprofil von immortalisierten MPNST-Zelllinien untersucht werden, sondern auch das von Tumormaterial aus Patienten selbst und so auch verglichen werden, inwiefern sich das Angiogeneseprofil von MPNST-Zelllinien und den Tumoren *in vivo* ähnelt. Hierfür wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. C. Hagel, (Institut für Neuropathologie, Uniklinikum Hamburg Eppendorf) in Paraffin eingebettete Gewebeproben von NF1-assoziierten MPNST von elf verschiedenen Patienten überlassen.

Aufgrund der Begrenztheit des verfügbaren Materials sollte entsprechend der Ergebnisse der FACS-Analysen mittels Immunhistochemischer Färbungen das Tumormaterial von den elf verschiedenen Patienten jeweils auf die Expression von VEGFR-3 und Nrp2 untersucht werden (bei VEGFR-3 fehlt die Tumorseite E077). Um zu überprüfen, ob auch das Negativergebnis für VEGFR-2 der MPNST-Zelllinien auf das Tumormaterial zu reproduzieren ist, wurde ebenso jeweils ein Gewebsschnitt auf dessen Expression gefärbt. Um eine Referenz für die o.g. zielgerichteten Färbungen zu haben, wurde zunächst jeweils ein Gewebsschnitt pro Probe in HE-Färbung gefärbt.

Das Tumormaterial wurde auf den Anteil positiver Tumorzellen und die Intensität der Färbung für den jeweiligen Antikörper untersucht. Insbesondere wurde dabei auch analysiert, inwiefern nicht nur Blut- und Lymphgefäße angefärbt waren, sondern auch die Tumorzellen. In der Tabelle 4.1, s.u., wurden die Ergebnisse der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zusammengefasst.

Tumor	Ergebnis		
	VEGFR-2	VEGFR-3	Neuropilin 2
E 864 (1997 II B)	0	2 (fokal 4)	3
E 782 (2000 B)	2	1	2
E 109 (2001 A)	1	4	3 (fokal 6)
E 110 (2001 A)	1	1	6
E 884 (2003 F2)	1	0	2
E534 (2004 A)	1	2	6 (fokal 9)
E 470 (2005 A)	1	2	3
E 1184 (2006 III B)	1	3 (fokal 6)	6 (fokal 9)
E 1167 (2006)	1	2 (fokal 4)	6-9
E 025 (2006 A)	3 (fokal 6)	2	3-6
E 077 (2007 A)	1	//	6

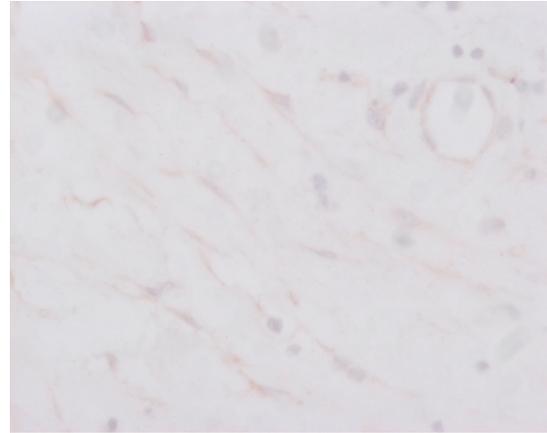
Tabelle 3.1: Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen. Gefärbt wurden die Rezeptoren VEGFR-2, -3 und Nrp2 (bei der VEGFR-3-Färbung fehlt der Tumor E 077 (2007 A)). Die Proben wurden auf den Anteil positiver Tumorzellen und die Intensität der entsprechenden Färbung ausgewertet. Je nach Anteil gefärbter Zellen wurden die Präparate in 4 Gruppen eingeteilt (0 (0% der Zellen), 1 (1-40% der Zellen), 2 (41-70% der Zellen), 3 (71-100% der Zellen)). Außerdem wurden die Präparate auch nach Intensität der Färbung in 4 Gruppen eingeteilt (0, 1, 2 und 3). Anschließend wurde ein aus den Werten der beiden Gruppen ein Produkt gebildet und der entstandene Score den Präparaten zugeordnet. Bei Tumorproben, die sehr heterogen aufgebaut waren und sich die fokale Intensität der Färbung deutlich von der Gesamtfärbung unterschied, wurde ein gesonderter Score für diese Areale in Klammern angegeben.

Bei allen drei Färbungen konnte eine Expression der Rezeptoren auf Gefäßen nachgewiesen werden, wobei aber nicht alle Gefäße positiv waren. Außerdem konnte bei allen drei Färbungen ebenso eine Expression durch die Tumorzellen selber nachgewiesen werden, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Zu beachten war zudem, dass auch ein Tumor teilweise sehr heterogen aufgebaut war, was dazu führte, dass teilweise einige Stellen viel stärker positiv angefärbt waren als andere Teile. Diesem Umstand wurde bei der Auswertung Rechnung getragen, indem bei solch einer Heterogenität neben einem Gesamtscore für die Areale, deren Scores sich deutlich vom gesamten Tumor unterschieden, auch fokale Scores angegeben wurden. Insgesamt variierte der Anteil positiver Tumorzellen teilweise stark zwischen den verschiedenen Tumorproben, wobei insgesamt tendenziell bei der VEGFR-2- Färbung weniger Tumorzellen positiv gefärbt waren, bei der Nrp-2-Färbung tendenziell die meisten gefärbten Tumorzellen vorlagen. Auch die Intensität war durchschnittlich am schwächsten bei der Färbung für VEGFR-2 und am stärksten bei der Färbung für Nrp-2. Entsprechend waren die Scores für die Färbung auf VEGFR-2 durchschnittlich geringer als die Scores für VEGFR-

3und Nrp-2. Am höchsten waren dabei die Scores der Färbung für Nrp2.

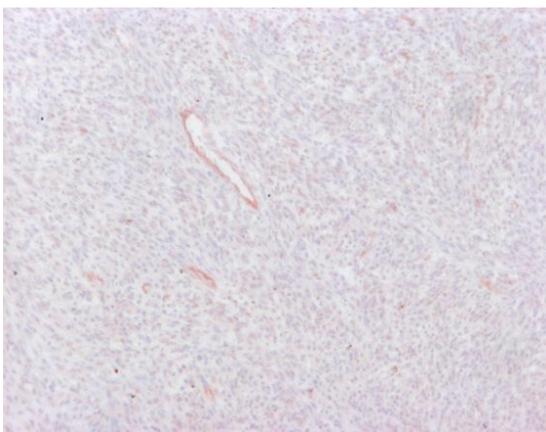


a) 10x vergrößert

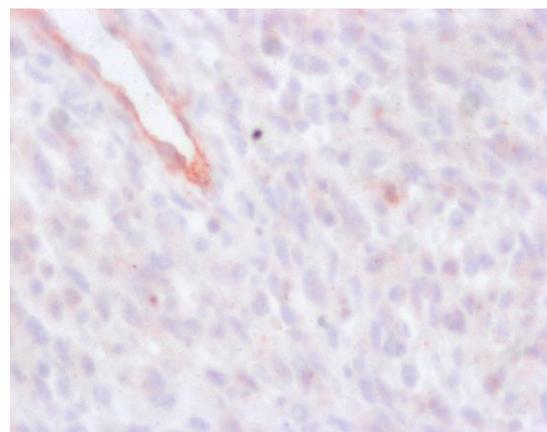


b) 40x vergrößert

Abbildung 3.3: VEGFR-2 Färbung an Tumorgewebe. In den Abbildungen a) und b) sind jeweils Ausschnitte von dem Tumor E 534 (2004 A) zu sehen, die für VEGFR-2 gefärbt sind. Es handelt sich um ein Beispiel für den Score 1. In Abbildung a) zeigt sich eine Färbung der mitabgebildeten größeren und kleineren Gefäße sowie eine schwache Färbung einiger Tumorzellen. In b) ist ein vergrößerter Ausschnitt (40x vergrößert) des gleichen Tumors abgebildet mit hauptsächlich positiven Tumorzellen und einem Gefäß.

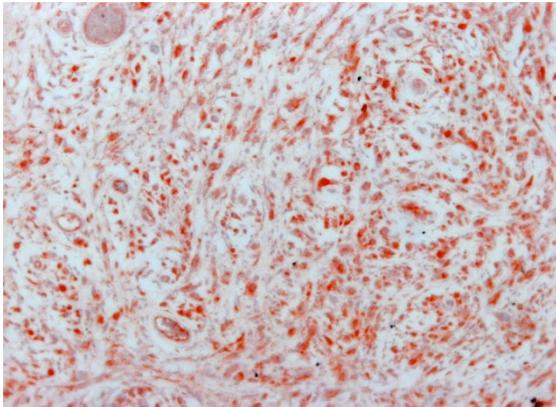


a) 10x vergrößert

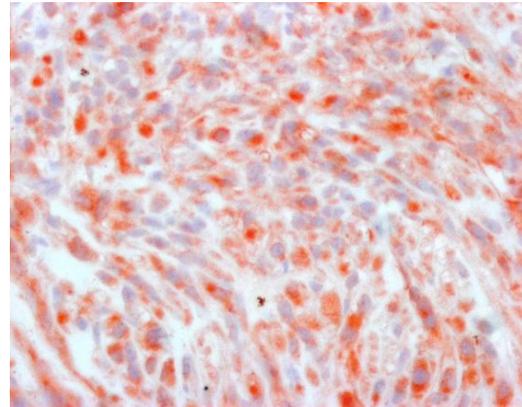


b) 40x vergrößert

Abbildung 3.4: VEGFR-3 Färbung an Tumorgewebe. In den Abbildungen a) und b) sind jeweils Ausschnitte des Tumors E 025 (2006 A) zu sehen, die für VEGFR-3 gefärbt worden sind. Hierbei handelt es sich um den Score 2. Abbildung a) zeigt einige gefärbte Gefäße. Zudem ist auch ein guter Anteil der Tumorzellen positiv für die Färbung bei schwacher Intensität. In Abbildung b) ist eine Vergrößerung der gefärbten Tumorzellen sowie Anschnitte von Gefäßen zu sehen.



a) 10x vergrößert



b) 40x vergrößert

Abbildung 3.5: Nrp2 Färbung an Tumorgewebe. Die Abbildungen a) und b) zeigen jeweils Ausschnitte des Tumors E 1184 (2006 III B) gefärbt für Nrp2 und dem Score 9 zugeordnet. Die Abbildung a) zeigt wiederum einen größeren Ausschnitt mit vielen, sehr intensiv angefärbten Tumorzellen sowie einigen ebenfalls teils intensiv gefärbten Gefäßen. Die Abbildung b) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt mit vielen, sehr intensiv gefärbten Tumorzellen.

3.2 Wirkung antiangiogener Faktoren auf MPNST-Zellen

Da beide MPNST-Zelllinien - wie in 4.1 beschrieben - angiogene Faktoren sowie die entsprechenden Rezeptoren exprimieren, lag die Vermutung nahe, dass eine Hemmung ebendieser Faktoren einen direkten Effekt auf die Zellen haben kann. In einem nächsten Schritt sollte deswegen die Wirkung von antiangiogenen Substanzen auf die Proliferation, Invasivität und das Überleben von MPNST-Zellen untersucht werden. Entsprechend der oben beschriebenen Ergebnisse der Expressionsanalyse wurden verschiedene antiangiogene Substanzen ausgewählt, mit denen die MPNST-Zellen inkubiert werden sollten.

3.2.1 Einfluss von anti-VEGF-D auf die Proliferation von MPNST-Zelllinien

Es konnte in beiden Zelllinien sowie auch in den Tumorproben eine Expression des VEGFR-3 und des Nrp2 nachgewiesen werden, beides Rezeptoren für VEGF-D. Außerdem konnte, wie oben beschrieben, für beide Zelllinien eine Expression von VEGF-D, das beide Rezeptoren aktiviert, auf mRNA-

Ebene nachgewiesen werden. Aus diesem Grund sollte die Wirkung eines blockierenden VEGF-D Antikörpers auf das Proliferationsverhalten beider Zelllinien *in vitro* analysiert werden.

In einem ersten Versuch wurden Zellen der Linie MPNST S462 mit dem blockierenden Antikörper gegen VEGF-D in einer Konzentration von 600 ng/ml inkubiert. Als Kontrolle diente zum einen die Inkubation mit einer Isotypen-Kontrolle in gleicher Konzentration, zum anderen die Inkubation nur mit Medium. In der Messung nach 24 Stunden zeigte sich kein Unterschied in der Zellzahl. Nach 48 Stunden konnte eine signifikante Reduktion der Zellproliferation bei den mit dem Anti-VEGF-D inkubierten Zellen im Vergleich zu den mit reinem Medium inkubierten beobachtet werden. Allerdings zeigte sich eine noch geringere Zellzahl bei den mit dem unspezifischen IgG aus der Ziege inkubierten Zellen im Vergleich zu den mit dem Anti-VEGF-D inkubierten Zellen. Die Reduktion der Zellproliferation bei dem unspezifischen IgG war sowohl im Vergleich zum Medium als auch zum anti-VEGF-D signifikant.

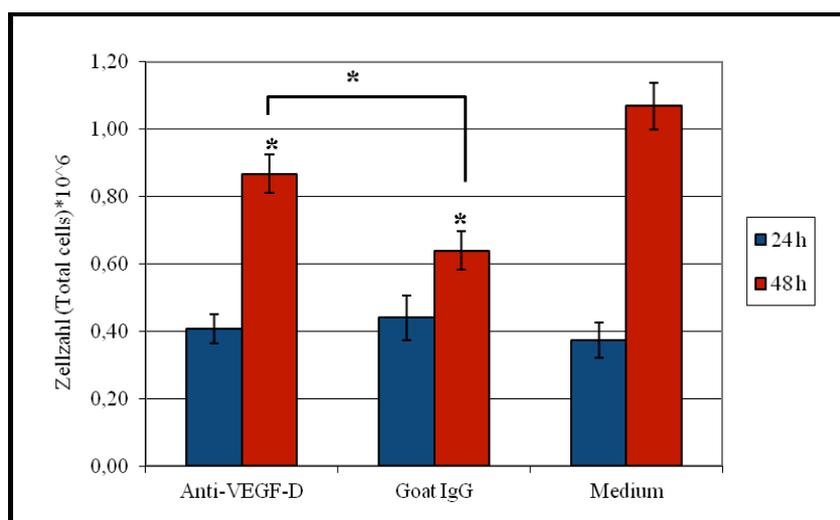


Abbildung 3.6: Einfluss von Anti-VEGF-D auf S462. Die Graphik zeigt die Gesamtzellzahlen nach Inkubation der Zellen der Linie S462 mit einem blockierenden VEGF-D-Antikörper (600 ng/ml), mit einem Kontroll-goat-IgG (600 ng/ml) und Medium ohne Antikörper. Gemessen wurde nach 24 und 48 Stunden. Ein Balken steht für einen Mittelwert \pm SE (n=3). Das Zeichen * über den Balken markiert eine statistische Signifikanz im Vergleich zum Medium ($P < 0,05$). Über einer Verbindungslinie markiert es eine statistische Signifikanz zwischen den jeweiligen Gruppen.

In einem weiteren Versuch sollte die Inkubation über einen längeren Zeitraum erfolgen, da im oben beschriebenen Versuch Unterschiede in der Zellzahl erst nach 48 Stunden beobachtet wurden. Außerdem sollten die S462 zusätzlich noch mit zwei weiteren, niedrigen Konzentrationen des VEGF-D-Antikörpers (50 ng/ml und 100 ng/ml) inkubiert werden. Es konnte jedoch in diesem Versuch kein

Unterschied in der Zellproliferation bei den mit dem Anti-VEGF-D Antikörper inkubierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden. Der signifikante Unterschied aus dem ersten Versuch konnte auch in weiteren Versuchen nicht reproduziert werden.

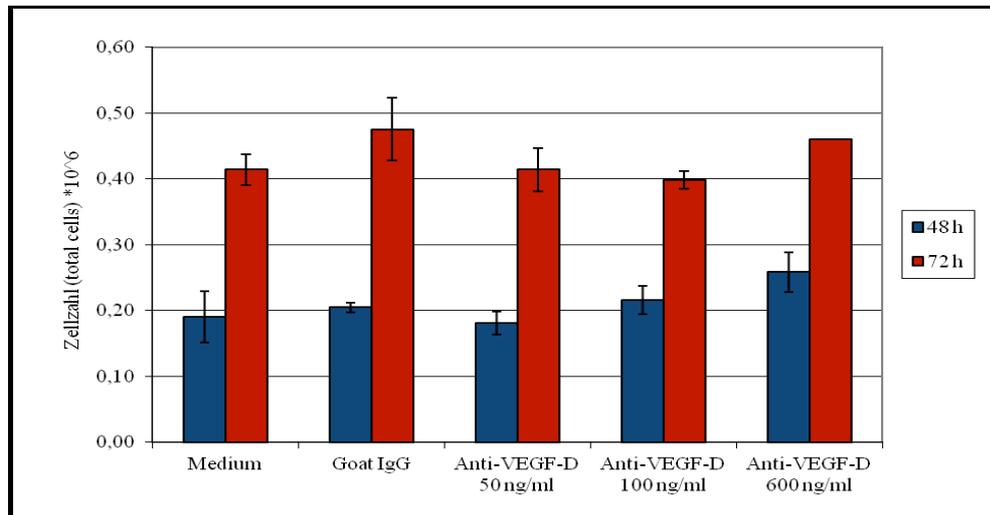


Abbildung 3.7: Einfluss von Anti-VEGF-D in verschiedenen Konzentrationen auf S462. In dieser Grafik sind die Gesamtzellzahlen nach Inkubation der Zellen der Linie S462 mit einem blockierenden VEGF-D-Antikörper in drei verschiedenen Konzentrationen (50, 100 und 600 ng/ml), mit einem Kontroll-goat-IgG (600 ng/ml) und nur mit Medium dargestellt. Gemessen wurde nach 48 und 72 Stunden. Ein Balken steht für einen Mittelwert +/- SE (n=3). Der Unterschied in der Zellzahl zwischen den einzelnen Konzentrationen Anti-VEGF-D und Medium war nicht signifikant.

Ebenso konnte für die Zelllinie S1507.2 kein signifikanter Unterschied in der Zellproliferation nach Inkubation mit dem Anti-VEGF-D Antikörper, ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen, im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden.

3.2.2 Einfluss von Sema3F, sNrp-1, Tum, mEs, TSP-2 auf die Proliferation von MPNST-Zelllinien

Neben dem Anti-VEGF-D Antikörper sollten weitere antiangiogene Substanzen auf Wirkung auf die Proliferation von MPNST-Zellen untersucht werden. Diese Substanzen wurden entsprechend der Ergebnisse der Expression verschiedener an der Angiogenese beteiligter Rezeptoren auf den MPNST-Zellen ausgesucht. Überprüft werden sollte die Wirkung von Sema 3F, dessen Rezeptor Nrp2 sowohl von den Zelllinien als auch den Tumorproben exprimiert wurde. Außerdem von sNrp-1, der als Anta-

gonist des VEGF-A, eine inhibitorische Wirkung auf dessen Rezeptoren besitzt. Des Weiteren wurden die Wirkung von Tum, das seine Effekte über das Integrin $\alpha\beta3$ vermittelt, mEs, dessen Rezeptoren das Integrin $\alpha5\beta1$ sowie der VEGFR-2 sind, und TSP-2, der ebenfalls seine Wirkung u.a. über das Integrin $\alpha\beta3$ vermittelt, untersucht.

Dazu wurden zunächst die CM der stabil transfizierten PAE-mEs, -Tum, -Sema3F, -sNrp-1, -TSP-2 mittels Aufkonzentrierung und Western-Blot auf die Expression der s.g. Faktoren untersucht. Die CM von den positiv getesteten Zellen wurden in den Proliferations-Assays mit beiden MPNST-Zelllinien eingesetzt. Als Kontrolle wurde das CM von den WT-PAE Zellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert wurden, verwendet.

Die MPNST-Zellen wurden hierfür mit den unverdünnten CM der jeweiligen PAE-Zellen inkubiert und dann die Zellzahl ausgewertet. In Vorversuchen zeigten sich Unterschiede in der Proliferation überwiegend erst ab 48 Stunden, sodass wir die Zellzahl nach 48 und 72 Stunden auswerteten.

Es zeigte sich für ES keine Auswirkung auf die Proliferation der MPNST-Zellen im Vergleich zu der Kontrolle.

Bei sNrp-1 zeigte sich jeweils eine leichte Hemmung der Proliferation der MPNST-Zellen, die nach 72 Stunden ausgeprägter war, allerdings war sie für sNrp-1 nicht statistisch signifikant.

Ebenso wurde bei der Inkubation mit Tum in drei unabhängigen Versuchen eine Hemmung der Zellproliferation gemessen. Eine statistische Signifikanz konnte nur für einen Versuch nach 72 h nachgewiesen werden.

Interessanterweise konnte für TSP-2 und für Sema3F eine signifikante Hemmung der Proliferation der MPNST-Zellen nach 72 Stunden nachgewiesen werden, welche reproduzierbar war. Durchschnittlich konnte für TSP-2 eine Senkung der Proliferation um 31% nach 72 Stunden, für Sema3F um 40% erreicht werden. Nach 48 Stunden war bei beiden Faktoren ebenfalls eine leichte Hemmung der Proliferation nachzuweisen, welche aber je nur in einem Versuch statistisch signifikant war.

Für jeden Faktor wurden mindestens zwei Versuchsreihen durchgeführt mit je Triplets pro Zeitpunkt und Versuch.

In der nachfolgenden Abbildung 4.8 ist für jeden angiogenen Faktor die Proliferation eines repräsentativen Versuchs jeweils im Verhältnis zur Kontrolle, dem WT, abgebildet.

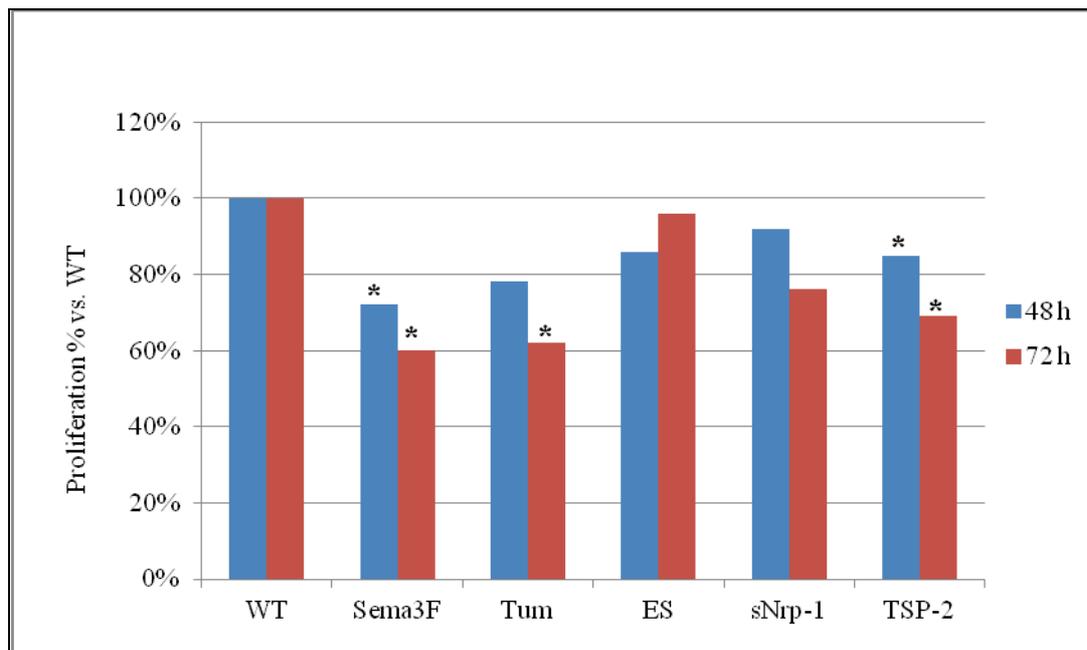
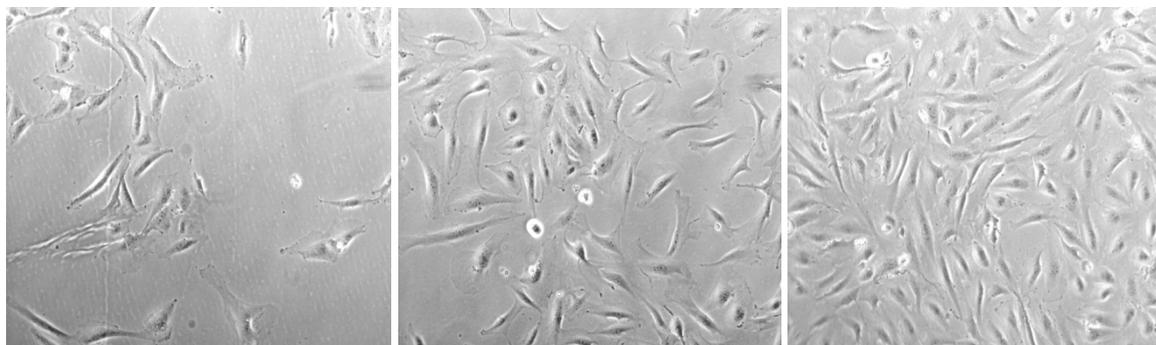


Abbildung 3.8: Einfluss von angiogenen Faktoren auf die Proliferation von MPNST S1507.2 Zellen. Ein Balken zeigt die Proliferation der MPNST S1507.2 unter Einfluss eines angiogenen Faktors im Vergleich zur Kontrolle, dem WT. Er entspricht jeweils einem Mittelwert ($n=3$) im Verhältnis zu dem jeweiligen Mittelwert ($n=3$) des WT aus dem jeweiligen gleichen Versuch. Dabei werden jeweils für einen Faktor die Werte einer repräsentativen Versuchsreihe dargestellt. Das Zeichen * über einem Balken markiert dessen statistische Signifikanz im Vergleich zum WT des jeweiligen Versuchs ($P < 0,05$).

Beispielhaft sind in der Abbildung 4.9 Wells mit MPNST S1507.2 Zellen nach 72 stündiger Inkubation mit Sema-3F-, TSP-2- und WT-CM dargestellt.



a)

b)

c)

Abbildung 3.9: MPNST S1507.2 Zellen nach Inkubation mit CM über 72 h, 10x Vergrößerung. a) Inkubation mit Sema 3F-CM, b) Inkubation mit TSP-2-CM und c) Kontrolle mit WT-CM

Auch mit der zweiten Zelllinie, S462, wurden diese Proliferations-Assays mit den gleichen antiangiogenen Faktoren durchgeführt.

Es zeigte sich weder für Tum, mES noch TSP-2 eine relevante Inhibition der Proliferation.

Für sNrp-1 konnte eine leichte Hemmung der Zellproliferation nachgewiesen werden, die aber nur in einem von drei Versuchen nach 72 Stunden statistisch signifikant war.

Bei Sema 3F dagegen konnte nach 72 Stunden eine signifikante Hemmung der Proliferation im Vergleich zum WT beobachtet werden. Im Mittel lag diese Hemmung bei etwa 22% im Vergleich zum WT. Nach 48 Stunden Inkubation konnte eine leichte Verminderung der Proliferation nachgewiesen werden, die aber nicht statistisch signifikant war.

Für jeden Faktor wurden mindestens zwei Versuchsreihen durchgeführt mit je Triplets pro Zeitpunkt und Versuch.

In der nachfolgenden Abbildung 4.10 ist für jeden angiogenen Faktor die Proliferation eines repräsentativen Versuchs jeweils im Verhältnis zur Kontrolle, dem WT, abgebildet.

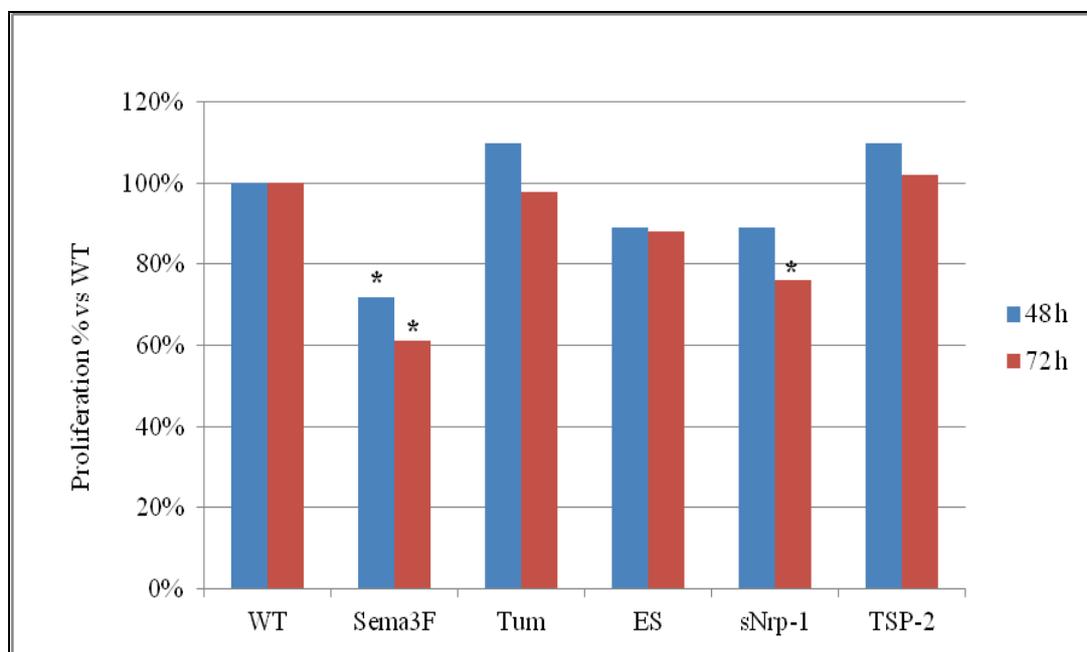


Abbildung 3.10: Einfluss von angiogenen Faktoren auf die Proliferation von MPNST S462 Zellen. Ein Balken zeigt die Proliferation der MPNST S462 unter Einfluss eines angiogenen Faktors im Vergleich zur Kontrolle, dem WT. Er entspricht jeweils einem Mittelwert (n=3) im Verhältnis zu dem jeweiligen Mittelwert (n=3) des WT aus dem jeweiligen gleichen Versuch. Dabei werden jeweils für einen Faktor die Werte einer repräsentativen Versuchsreihe dargestellt. Das Zeichen * über einem Balken markiert dessen statistische Signifikanz im Vergleich zum WT des jeweiligen Versuchs ($P < 0,05$).

3.2.3 Einfluss von Sema 3F, sNrp-1 und TSP-2 auf die Invasivität von MPNST-Zellen

Nachdem die antiproliferative Wirkung der oben genannten Faktoren auf die beiden MPNST-Zelllinien untersucht wurde, sollte auch eine mögliche antiinvasive Wirkung durch antiangiogene Faktoren überprüft werden. Dabei sollte sich auf die antiangiogenen Faktoren beschränkt werden, die im oben beschriebenen Proliferations-Assay eine gewisse antiproliferative Wirkung gezeigt hatten. Zunächst wurden beide Zelllinien in Vorversuchen auf ihr Invasivitätspotential getestet. Im einen in-vitro Invasion-Assay konnte dieses für die Zelllinie S462 bestätigt werden, im Gegensatz zu der S1507.2, sodass folgende Versuche nur mit der Linie S462 durchgeführt wurden. Wir analysierten, in Anlehnung an die Proliferationsversuche, die Faktoren Sema 3F, sNrp-1 und TSP-2. Als Kontrolle diente wiederum CM aus WT-PAE-Zellen.

Die MPNST Zellen der Linie S462 wurden in Einsätze mit einer transluzenten Membran ausgesät und mit 0,1% FCS-Medium inkubiert, das mit den oben genannten Faktoren bzw. der Kontrolle angereichert war. Die Einsätze waren in Wells mit Medium mit 10% FCS eingehängt, was für die Zellen den Stimulus zur Durchwanderung der Membran darstellte. Nach 72 Stunden Inkubation wurden die Zellen, die die Membran durchwandert hatten gefärbt und gezählt. Es konnte für alle drei Angiogeneseinhibitoren eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringere Zahl von durchwanderten Zellen gezählt werden. Die Inhibierung der Invasivität war dabei bei den mit Sema3F inkubierten Zellen am größten.

Für jeden Faktor wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt mit je Triplets pro Zeitpunkt und Versuch.

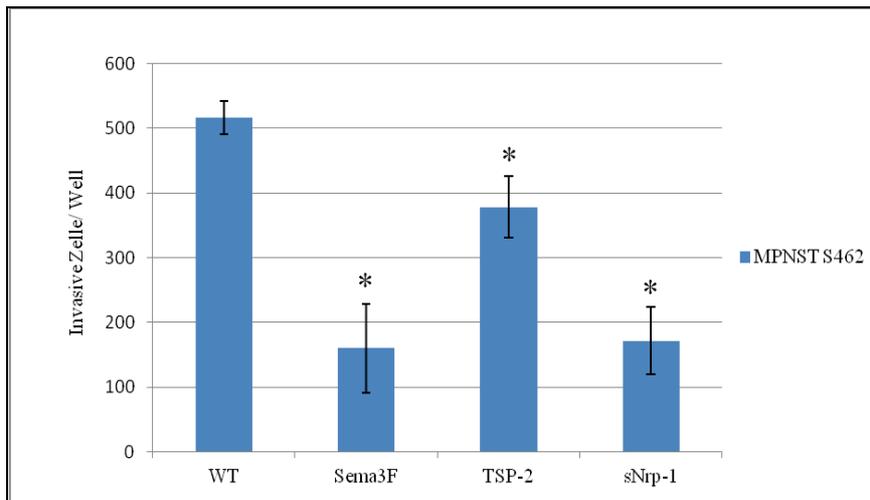


Abbildung 3.11: Einfluss von Sem3F, TSP-2 und sNrp-1 auf die Invasivität der MPNST S462. Die nebenstehende Grafik zeigt beispielhaft einen Invasions-Assay mit MPNST S462 inkubiert mit den aufgelisteten Faktoren. Gemessen wurde nach 72 Stunden. Ein Balken steht für einen Mittelwert \pm SE (n=3, Ausnahme: WT: n=2)). Das Zeichen * markiert eine statistische Signifikanz des jeweiligen Balken im Vergleich zum WT ($P < 0,05$)

3.2.4 Einfluss von CGT

In einer weiteren Versuchsreihe sollte die Wirkung des CGT (Cilengitide), ein Antagonist der Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$, auf die Proliferation beider MPNST Zelllinien getestet werden. Dazu wurden beide Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen des CGT – 1 $\mu\text{g/ml}$ sowie 5 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ – inkubiert und die Zellzahl nach 48 und 72 Stunden gemessen.

Bei den MPNST S1507.2 zeigte sich nach 72 Stunden für jede Konzentration eine signifikante Hemmung der Proliferation. Diese Ergebnisse konnten in zwei weiteren Versuchen reproduziert werden. Es konnte eine Verminderung der Zellzahl um bis zu 67% erreicht werden. Dabei zeigte sich aber keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit. Nach 48 Stunden zeigte sich ebenfalls tendenziell eine Verminderung der Zellzahl. Die Ergebnisse zeigten aber nur teilweise eine statistische Signifikanz, eine Konzentrationsabhängigkeit war nicht nachzuweisen.

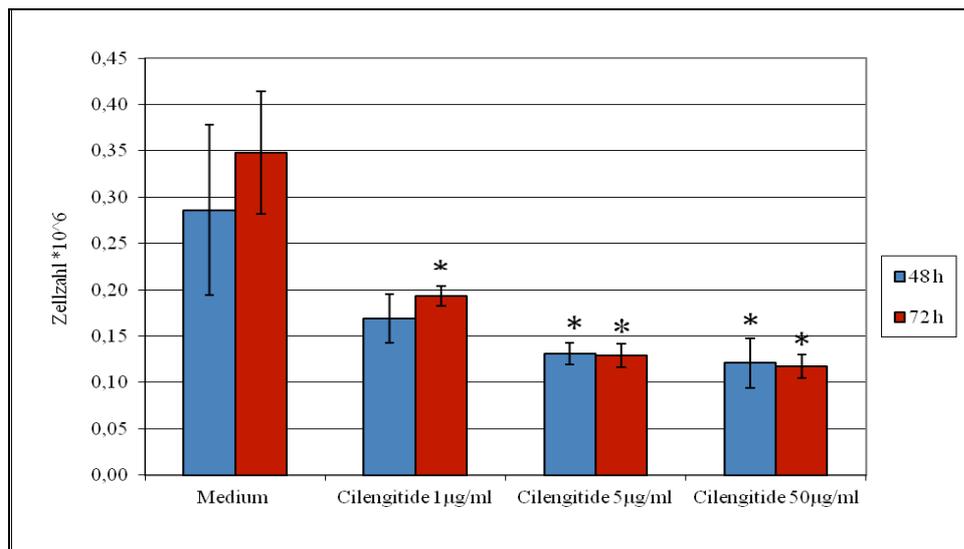


Abbildung 4.12: Antiproliferative Wirkung von CGT auf die MPNST S1507.2. Diese Abbildung zeigt beispielhaft einen Proliferationsversuch mit MPNST S1507.2 inkubiert mit CGT in den aufgelisteten Konzentrationen. Gemessen wurde nach 48 und 72 Stunden. Ein Balken steht für einen Mittelwert \pm SE (n=3). Das Zeichen * markiert eine statistische Signifikanz des jeweiligen Balken im Vergleich zum Medium ($P < 0,05$).

Bei den MPNST S462 zeigte sich nach 72 Stunden in zwei von drei Versuchen eine signifikante Hemmung der Proliferation. Allerdings war der Einfluss auf die Verminderung der Zellzahl durchschnittlich geringer als bei den S1507.2 Zellen. Insgesamt zeigte sich eine stärkere Inhibition bei den Konzentrationen 5 und 50 µg/ml als bei 1 µg/ml, wobei es zwischen ersteren beiden keinen eindeutigen Unterschied gab. Nach 48 Stunden zeigte sich ebenfalls tendenziell eine Verminderung der Zellzahl. Die Ergebnisse zeigten aber nur teilweise eine statistische Signifikanz, eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit war auch hier nicht nachzuweisen.

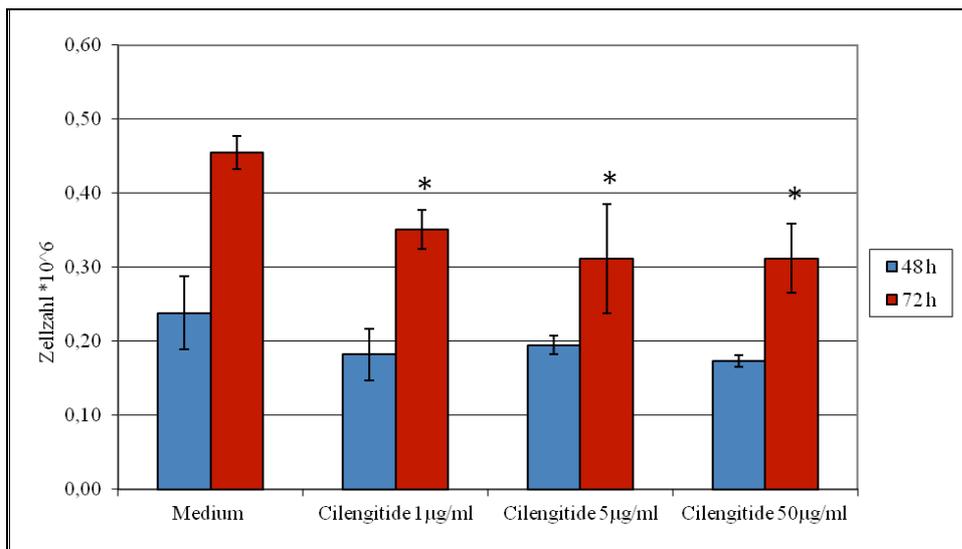
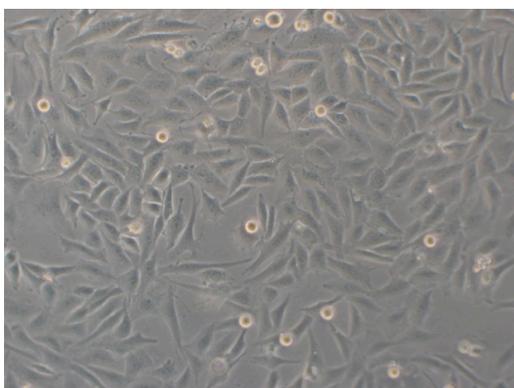


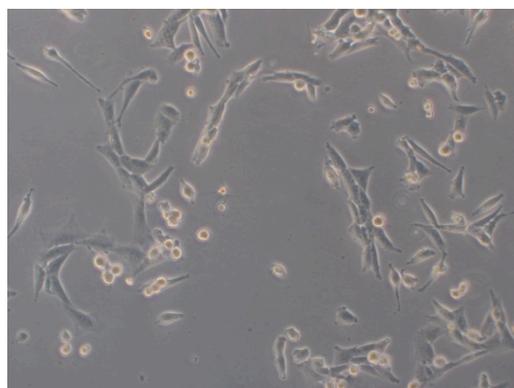
Abbildung 4.13: Antiproliferative Wirkung von CGT auf die MPNST S462 Diese Abbildung zeigt beispielhaft einen Proliferationsversuch mit MPNST S462 inkubiert mit CGT in den aufgelisteten Konzentrationen. Gemessen wurde ebenfalls nach 48 und 72 Stunden. Ein Balken steht für einen Mittelwert \pm SE (n=3). Das Zeichen * markiert eine statistische Signifikanz des jeweiligen Balken im Vergleich zum Medium ($P < 0,05$).

3.2.5 Apoptose-Assays nach Inkubation mit CGT

Bei beiden Zelllinien konnte mikroskopisch beobachtet werden, dass bei der Inkubation mit CGT die Adhäsion der Zellen verloren ging und sie eine rundliche Form annahmen. Dieses Phänomen war bei den beiden Konzentrationen 5 und 50 $\mu\text{g/l}$ deutlich ausgeprägter als bei $1 \mu\text{g/ml}$, so dass bei ersteren beiden keine adhärenen Zellen mehr zu sehen waren.



a) 20x



b) 20x

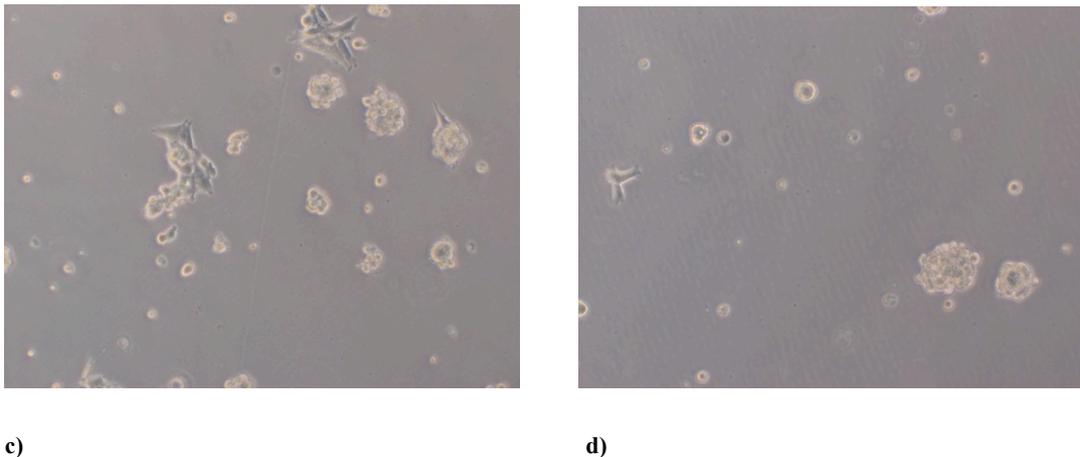


Abbildung 3.14: MPNST S462 Zellen nach 72h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen CGT. Abbildung a) zeigt die Kontrolle nur mit Medium inkubierten MPNST S462. Bei b) handelt es sich um die Inkubation mit 1 µg/ml, bei c) mit 5 µg/ml, bei d) mit 50 µg/ml CGT. Jeweils 20x Vergrößerung.

Inwiefern es sich bei den Zellen um einen programmierten Zelltod durch die Inkubation mit CGT handelt, sollte mittels Apoptose-Assays weiter untersucht werden. Hierzu wurden, wie auch bei den Proliferations-Assays, beide Zelllinien mit den drei verschiedenen Konzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml und 50 µg/ml inkubiert. Da sich die oben beschriebenen Veränderungen genauso deutlich schon nach 48 Stunden zeigten, wurde die Inkubation für die Apoptose-Assays bereits nach 48 Stunden beendet. Als Kontrolle dienten nur mit Medium inkubierte MPNST Zellen. Im Anschluss wurden die Zellen jedoch nicht gezählt, sondern mit Annexin V-FITC und gleichzeitig Propidiumiodid gefärbt und dann am Durchflusszytometer der jeweilige prozentuale Anteil von nicht-apoptotischen, früh-apoptotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen bestimmt.

Für beide Zelllinien konnte das schon mikroskopisch vermutete Absterben der MPNST-Zellen durch Inkubation mit CGT bestätigt werden und außerdem gezeigt werden, dass es sich hierbei hauptsächlich um einen programmierten Zelltod handelt. Schon bei der niedrigsten Konzentration nahm der Anteil der früh- und spät-apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle deutlich zu. Der Anteil der apoptotischen Zellen war dabei auch deutlich größer als der der nekrotischen Zellen. Mit steigender Konzentration des CGT nahm der Anteil der apoptotischen Zellen, früh- und spät-apoptotische Zellen zusammen, noch weiter zu, so dass man von einer konzentrationsabhängigen apoptotischen Wirkung der CGT auf die MPNST-Zellen sprechen kann.

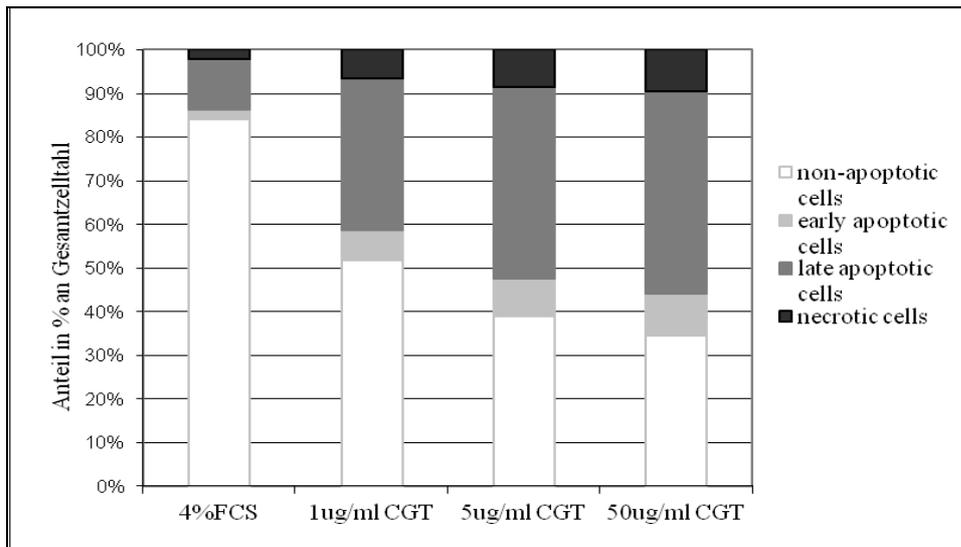


Abbildung 4.15: Anteil an apoptotischen Zellen bei den S1507.2 nach Inkubation mit CGT. Ein Balken zeigt den Anteil von apoptotischen Zellen in % an der Gesamtzellzahl nach 72h Inkubation mit CGT in je einer Konzentration bzw. mit der Kontrolle, 4%FCS-Medium. Nach Färbung der Zellen mit Annexin V FITC und Propidiumiodid wurden die dargestellten Zellpopulationen durchflusszytometrisch bestimmt.

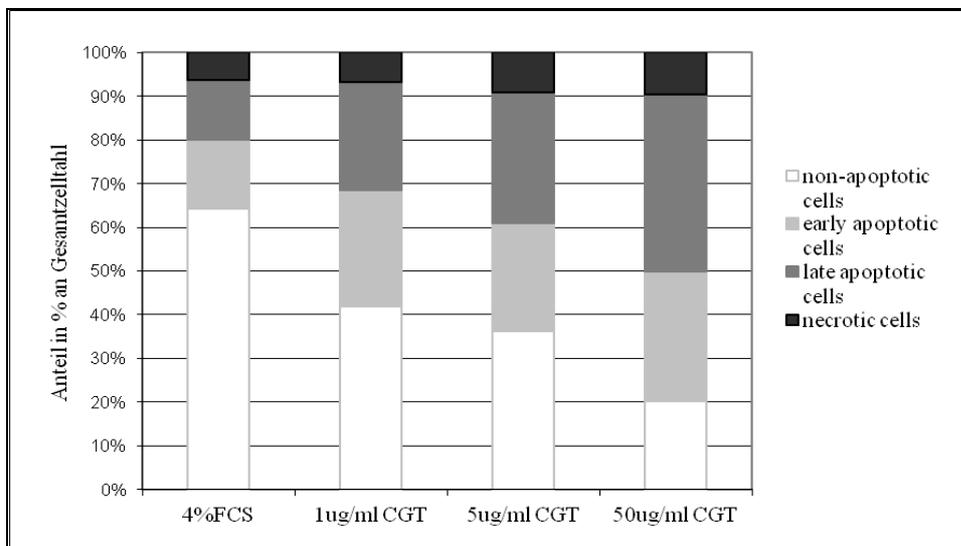


Abbildung 4.16: Anteil an apoptotischen Zellen bei den S1507.2 nach Inkubation mit CGT. Ein Balken zeigt den Anteil von apoptotischen Zellen in % an der Gesamtzellzahl nach 72h Inkubation mit CGT in je einer Konzentration bzw. mit der Kontrolle, 4%FCS-Medium. Nach Färbung der Zellen mit Annexin V FITC und Propidiumiodid wurden die dargestellten Zellpopulationen durchflusszytometrisch bestimmt.

4 Diskussion

Die MPNST bilden zwar mit einer Inzidenz von ca. 0,001% nur eine sehr seltene Tumorentität, leider sind sie jedoch sehr aggressiv und nach wie vor mit einer extrem schlechten Prognose verbunden (Mrugala et al., 2005). Neue effektivere Therapieoptionen werden für diese Tumorentität daher dringend benötigt. Eine neuere Strategie in der Krebstherapie ist die Hemmung der Angiogenese, da ein Tumor ab einer Größe von etwa 2 mm² nicht mehr nur durch Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden kann, sondern auf die Bildung neuer Gefäße angewiesen ist. In den letzten Jahren wurden antiangiogene Therapien bereits bei verschiedenen Tumorentitäten zugelassen und in der klinischen Anwendung eingesetzt (Ebos und Kerbel, 2011; Gacche und Meshram, 2014).

Interessanterweise konnte durch präklinische Arbeiten bereits für einige der an der Angiogenese beteiligten Moleküle beschrieben werden, dass diese nicht nur von den Endothelzellen der Gefäße, sondern auch von den Tumorzellen selbst exprimiert werden (Partanen und Paavonen, 2001; Wilder, 2002; McColl et al., 2003; Su et al., 2006; Bagri et al., 2009; Ricono et al., 2009; Gesundheit et al. 2010; Takahashi, S., 2011; Weis und Cheresh, 2011; Schaffner et al., 2013). Auch die Tumor- und Stromazellen der MPNST bilden selbst zum einen lösliche proangiogene Faktoren und exprimieren zum anderen die entsprechenden Rezeptoren (Thomas und De Vries, 2007; Gesundheit et al. 2010). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Moleküle möglicherweise im Sinne eines autokrinen Mechanismus die Proliferation und Migration der Tumorzellen selbst beeinflussen. Dazu passend konnte für den proangiogenen Faktor Midkine beispielsweise eine proliferationsstimulierende Aktivität für von MPNST abstammenden Schwanzzellen nachgewiesen werden (Mashour et al., 2001).

Zunächst sollten also in dieser Arbeit zur näheren Beschreibung des „Angiogeneseprofiles“ von NF1-assoziierten MPNST zwei MPNST-Zelllinien auf die Expression angiogener Faktoren und Rezeptoren untersucht werden. Folgende Moleküle wurden ausgewählt: die in die VEGF-Achse involvierten VEGF-C und -D, VEGFR-1, -2, -3, Neuropilin-2 sowie die drei für die Angiogenese ebenfalls bedeutenden Integrine $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$. Für VEGF-C wie auch -D sowie für deren gemeinsamen Rezeptor VEGFR-3 ist bekannt, dass sie, abgesehen von Endothelzellen, u.a. auch von Tumorzellen verschiedener Entitäten gebildet werden (Partanen und Paavonen, 2001; McColl et al., 2003; Su et al., 2006). Ebenso werden die beiden anderen VEGFRs von einigen Tumorzellen selbst exprimiert (Takahashi, S., 2011). Und auch Nrp-2, ein Co-Faktor des VEGFR-3, wird auf verschiedenen Tumorzellen exprimiert und führte in präklinischen Arbeiten direkt zu deren Zellvermehrung, vermehrten Migration, Invasion und verminderter Apoptose. Entsprechend ist eine Überexpression der Neuropiline in Tumorzellen mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (Ellis, 2006; Caunt et al., 2008; Bagri et al., 2009). Auch für die drei Integrine wurde eine Expression durch Tumorzellen einiger solider

Tumorentitäten selbst nachgewiesen (Wilder, 2002; Ricono et al., 2009; Weis und Cheresch, 2011; Schaffner et al., 2013). Eine solche Expression war interessanterweise auch häufig mit einem verstärktem Tumorwachstum und einer gesteigerten Invasivität der Tumore sowie und einer vermehrten Metastasierung verbunden (Brooks et al., 1997; Ricono et al., 2009; Weis und Cheresch, 2011; Schaffner et al., 2013).

Tatsächlich konnte in dieser Arbeit die Expression verschiedener angiogener Moleküle durch die MPNST-Zelllinien nachgewiesen werden. Hinsichtlich der VEGF-Achse wurden v.a die Rezeptoren VEGFR-1 und -3 sowie Neuropilin-2 exprimiert sowie beide überprüften Liganden, v.a. aber VEGF-C. Von den Integrinen wurde das $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ exprimiert. Dabei gab es zum Teil jedoch deutliche Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den beiden Zelllinien. Die Ergebnisse hinsichtlich der Expression der angiogenen Moleküle waren ähnlich den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe. Auch zeigten sich in deren Arbeit merkliche Unterschiede in der Expression einzelner Faktoren zwischen verschiedenen MPNST-Zelllinien (Thomas und De Vries, 2007). Dies unterstreicht die Heterogenität von verschiedenen MPNST, was hinsichtlich der Etablierung möglicher Therapien sicherlich eine weitere Herausforderung darstellen wird (Spurlock et al., 2010).

Zum Vergleich der Expression angiogener Faktoren in MPNST-Zelllinien mit der Expression in situ, wurde in dieser Arbeit zusätzlich Tumorgewebe von MPNST aus 11 verschiedenen Patienten mit Neurofibromatose-1 evaluiert. Da dieses Tumormaterial nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung stand, konzentrierten wir uns auf die Analyse der Rezeptoren der für die Angiogenese sehr entscheidenden VEGF-Achse und wählten in Anlehnung an die Expressionsanalysen der Zelllinien die stärker exprimierten VEGFR-3 und Nrp-2 sowie den VEGFR-2, welcher durch unsere Tumorzelllinien gar nicht exprimiert wurde. Interessanterweise konnte letzterer aber durch die Arbeitsgruppe um Gesundheit et al. in den Tumorzellen und Stromazellen in MPNST-Gewebeschnitten nachgewiesen werden (Gesundheit et al., 2010). Und auch in unserer Arbeit wies ein relevanter Teil von Tumorzellen der MPNST-Gewebeschnitte eine VEGFR-2 Expression auf. Im Vergleich zum VEGFR-2 waren die Expression des VEGFR-3 und v.a. des Nrp-2 jedoch merklich stärker ausgeprägt sowohl was die Anzahl gefärbter Tumorzellen als auch was die Intensität betrifft. Auch bei diesen beiden Faktoren war ein deutlicher Unterschied zwischen der Expression in den Zelllinien und der Expression im Gewebe zu verzeichnen. Bei den Zelllinien lag die Expressionsrate bei maximal 20-30% der Tumorzellen, im Gewebe bei 40 bis teilweise weit über 70%. Es wird also ersichtlich, dass es doch einen relevanten Unterschied in der Expression von angiogenen Molekülen in vitro und in vivo gibt und dies in entsprechenden folgenden in vitro Modellen berücksichtigt werden muss. Ursächlich für diese Unterschiede könnte mitunter sein, dass die Interaktion der Tumorzellen mit dem Tumorstroma essentiell für die Expression von angiogenen Faktoren durch die Tumorzellen ist. Die wichtige Bedeutung dieser Inter-

aktion für die Angiogenese wurde bereits durch verschiedene Arbeiten nachgewiesen (Kalluri und Zeisberg, 2006; Tsai et al., 2014).

Da in unseren Versuchen eine Expression des Rezeptor VEGFR-3 und seines Co-Rezeptor Nrp-2 sowie deren Liganden VEGF-D und -C nachgewiesen wurden, sollte anschließend der Effekt einer Inhibition des VEGF-D durch einen blockierenden Antikörper auf die MPNST-Zelllinien überprüft werden. Leider konnten in keiner der beiden Zelllinien reproduzierbar relevante antiproliferative Effekte auf die Tumorzellen erzielt werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die genannten Faktoren nicht wesentlich an der Proliferation dieser Tumorzellen beteiligt sind. Andererseits ist aber bekannt, dass beide Rezeptoren noch weitere Liganden neben dem VEGF-D binden (Takahasi, H. und Shibuya, 2005), von denen wir nur noch den VEGF-C auf seine Expression durch unsere MPNST-Zelllinien untersucht haben und eine solche auch nachweisen konnten. Es ist durchaus möglich, dass die genannten Rezeptoren trotz der Inhibition des VEGF-D durch die Bindung anderer Liganden aktiviert werden und so weiterhin zur Proliferation der Tumorzellen beitragen können. Für die Hemmung der Endothelzellproliferation und damit Entwicklung anti-angiogener Therapiestrategien ist dies eine bekannte Herausforderung (Loges et al., 2010). Prinzipiell wäre es daher interessant, eine Hemmung des ebenfalls untersuchten und exprimierten VEGF-C und die entsprechende Wirkung auf die Proliferation bei MPNST-Zellen zu analysieren. Vor allem auch eine Kombination von blockierenden Antikörpern gegen beide nachgewiesenen Liganden wäre spannend. Da jedoch kein blockierender VEGF-C Antikörper zur Verfügung stand, beschränkten wir uns auf die Analyse mit dem VEGF-D Antikörper. Als alternative Inhibitionsmöglichkeit böte sich zudem auch eine Inhibition des Rezeptors selber an, z.B. durch einen blockierenden VEGFR3-Antikörper. Eine Inhibition des Rezeptors selber macht gerade auch vor dem Hintergrund Sinn, dass es durch Versuche mit VEGFR-3 Knockout-Mäusen bzw. VEGF-D und -C Knockout-Mäusen Hinweise darauf gab, dass es neben der ligandenabhängigen Aktivität des VEGFR-3 auch eine ligandenunabhängige Aktivität gibt (Haiko et al., 2008). Tammela et al. konnten bereits zeigen, dass durch eine Inhibition des VEGFR-3 mit einem blockierenden monoklonalen Antikörper eine effektive Hemmung der Endothelzellproliferation und damit einhergehend Tumorangio-genese möglich ist (Tammela et al., 2008). Diesbezüglich ist weiterhin interessant, dass durch die Kombination monoklonaler Antikörper mit unterschiedlichen Angriffspunkten am VEGFR-3, zum einen die Ligandenbindung, zum anderen die Rezeptordimerisation, die Effektivität der Antikörper Angiogenese zu inhibieren, gesteigert werden kann (Tvorogov et al., 2010). Die Analyse der Wirkung entsprechender Antikörper auf die Proliferation von den MPNST-Zellen wäre auf jeden Fall eine interessante Erweiterung unserer Versuche.

Neben der Wirkung des blockierenden Anti-VEGF-D Antikörpers wurden auch die Effekte auf die Proliferation von MPNST-Zellen durch verschiedene andere Moleküle, die bekannterweise eine anti-

angiogene Wirkung haben, untersucht. Wiederum auf Grundlage der Expressionsanalysen wählten wir folgende antiangiogene Moleküle aus: Sema3F, sNrp1, Tum, ES, TSP-2.

Spannenderweise wurden in dieser Arbeit zum Teil deutliche antiproliferative Effekte auf unsere MPNST-Zelllinien durch die aufgeführten Faktoren gesehen. Diese Effekte variierten, wie auch schon bei den Expressionsanalysen, wiederum zwischen den beiden MPNST-Zelllinien.

Dem u.a. in dieser Arbeit untersuchten Endostatin konnten präklinisch bereits direkte antiproliferative, antiinvasive und proapoptotische Wirkungen auf Tumorzellen nachgewiesen werden (Dkhissi et al., 2003; Nyberg et al., 2003). In dieser Arbeit jedoch zeigte das Endostatin auf keine der beiden MPNST-Zelllinien einen antiproliferativen Effekt, obwohl tatsächlich beide Zelllinien das Integrin $\alpha 5\beta 1$, ein Rezeptor des Endostatin, zu einem hohen Prozentsatz exprimierten. Es ist denkbar, dass dieses Integrin gerade für die antiproliferative Wirkung nicht bzw. nicht hauptsächlich von Relevanz ist, sondern andere Rezeptoren dafür von größerer Bedeutung sind. In der Tat konnten Sudakar et al. zumindest an Endothelzellen zeigen, dass Endostatin über Integrin $\alpha 5\beta 1$ v.a. eine Hemmung der Migration, nicht der Proliferation bewirkt (Sudakar et al., 2003). Dagegen ist Endostatin u.a. über das VEGFR-2 auch antiproliferativ wirksam (Kim, YM et al.; 2002). Dieses aber wurde durch unsere Zelllinien sozusagen gar nicht exprimiert, und ist somit eine mögliche Erklärung für den nicht vorhandenen antiproliferativen Effekt.

Zudem wurden die Effekte der beiden weiteren endogenen Inhibitoren neben Endostatin, das Tumstatin und TSP-2, analysiert. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten dem Tumstatin neben seiner antiproliferativen Wirkung auf Endothelzellen in vitro auch eine direkte antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen nachweisen, wobei dieser Effekt ebenfalls über das $\alpha \nu \beta 3$ -Integrin vermittelt wird (Han et al., 1997; Shahan et al., 1999; Maeshima et al., 2000). Entsprechend wurde ihm in mehreren in vivo Versuchen nachgewiesen, das Tumorwachstum signifikant zu reduzieren, u.a. bei Nierenzellkarzinomen, Prostatakarzinomen, hepatozellulären Karzinomen und Teratokarzinomen (Maeshima et al., 2000; Eikesdal et al., 2008; Goto et al., 2008).

Bei dem TSP-2 ist ein direkter Effekt auf Tumorzellen selbst nicht so eindeutig nachgewiesen worden. Es gibt präklinische Daten, dass TSP-2 keinen Effekt auf Tumorzellen hat, andere wiederum konnten einen antiproliferativen Effekt und wiederum andere einen proproliferativen Effekt auf Tumorzellen nachweisen (Streit et al., 1999; Meng et al., 2009; Chen, J et al., 2013). Zudem konnte Nakamura et al. dem TSP-2 über eine Herunterregulation von Matrixmetalloproteinasen einen antiinvasiven Effekt auf Pankreaskarzinomzellen nachweisen (Nakamura et al., 2008).

TSP-2 und Tumstatin zeigten in dieser Arbeit beide einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferationsrate der Zellen der Linie MPNST S1507.2, nicht jedoch auf die der Linie S462. Dazu passen die Er-

gebnisse der Expressionsanalyse, die zeigten, dass das Integrin $\alpha\beta 3$ v.a. von den Zellen der Linie S1507.2 in hohem Maße, von denen der Linie S462 sozusagen gar nicht exprimiert wird. Über diesen Rezeptor entfalten beide o.g. Substanzen ihre Wirkung. In beiden Fällen war die Proliferationshemmung nach 48 ausgeprägter als nach 24 h. Aufgrund unserer Expressionsanalysen könnte man hinsichtlich des TSP-2 vermuten, dass die Proliferationshemmung über das Integrin $\alpha\beta 3$ vermittelt wird. Da aber das TSP-2 sehr viele Interaktionspartner hat, deren Expression wir nicht überprüft haben, besteht natürlich die Möglichkeit, dass die Proliferationshemmung über andere Rezeptoren und Signalwege vermittelt wird (Chen, J et al., 2013). Es wären weitere Versuche notwendig, um zu klären, inwieweit das Integrin $\alpha\beta 3$ tatsächlich an der Hemmung der Proliferation unserer MPNST S1507.2 Zellen beteiligt ist. Im Vergleich zum TSP-2 ist bei dem Tumstatin das Integrin $\alpha\beta 3$ dessen einzig nachgewiesener Bindungspartner, über den er seine antiangiogenen und antitumorigenen Effekte vermittelt (Maeshima et al., 2002; Sudhakar et al., 2003). Es ist daher für ihn sehr wahrscheinlich, dass auch bei unseren MPNST-Zellen die antiproliferative Wirkung durch dieses Integrin entfaltet wurde.

Auch der VEGFR-1 und dessen Ligand VEGF-A werden wie bereits erwähnt von Tumorzellen selbst exprimiert. Eine Möglichkeit der Hemmung des VEGF-A ist dessen Antagonist sNRP-1 (Gagnon et al., 2000), dessen Effekt auf die MPNST-Proliferation in dieser Arbeit untersucht werden sollte. Bislang gibt es noch keine veröffentlichten Daten, ob das sNrp-1 antiproliferative Effekte auf Tumorzellen selbst vermitteln kann. Allerdings wurden die Effekte des blockierenden VEGF-A Antikörper Bevacizumab, durch den eine alternative Hemmung des VEGF-A gegeben ist und der in der Klinik bereits seit mehreren Jahren zugelassen ist, viel untersucht. Die Daten zu direkten antiproliferativen Wirkungen auf Tumorzellen sind kontrovers (Videira et al., 2011), (Hein und Graver, 2014). Bei den Proliferations-Assays mit dem sNrp-1 in dieser Arbeit zeigte sich ein relevanter antiproliferativer Effekt, allerdings wiederum nur auf eine der beiden Zelllinien, in diesem Fall aber auf die Linie S462. Dies ist insofern verwunderlich, als dass das sNRP-1 ein Antagonist des VEGF-A ist, dessen Rezeptoren u.a. VEGFR-1 und -2 sind. Letzteres wurde in unseren Expressionsanalysen von keiner der beiden Zelllinien exprimiert, das VEGFR-1 v.a. von der Linie S1507.2 und nicht von der S462. Allerdings sind auch die beiden Neuropiline Bindungspartner des VEGF-A. Von ihnen wird das Nrp-2 von beiden unserer Zelllinien exprimiert, in größerem Maße jedoch von der Linie S462, was somit möglicherweise die antiproliferativen Effekte des sNrp-1 auf diese Linie erklärt.

Des Weiteren sollte auch die Wirkung des Sema3F, Ligand des Nrp-2, auf die beiden MPNST-Zelllinien überprüft werden. Auch ihm konnten bereits für andere Tumorentitäten direkte inhibitorische Effekte auf Tumorwachstum sowie Proliferation und Invasion von Tumorzellen nachgewiesen werden (Xiang et al., 1996; Xiang et al., 2002; Bagri et al., 2009). Nicht zuletzt ist es auch negativregulierend an der Metastasierung von Tumoren beteiligt, was sich durch seine direkte Wirkung auf Tumorzellen sowie auf die Lymphangiogenese erklären lässt (Bielenberg et al., 2004). Es stellt somit

ein interessantes Therapiemolekül für die Krebstherapie dar, mit dem sowohl die Angiogenese und Lymphangiogenese gehemmt werden kann als auch die Proliferation der Tumorzellen selbst. Das Sema3F zeigte als einziges der oben genannten Moleküle eine antiproliferative Wirkung auf beide untersuchten Zelllinien. Die Zellen der Linie S462 exprimierten dabei zwar zu einem deutlich höheren Prozentsatz dessen Rezeptor Nrp-2 als die der Linie 1507.2. Dennoch war die Hemmung der Proliferation interessanterweise bei beiden etwa gleich ausgeprägt. Von dem Sema3F wie von allen Semaphorinen ist bekannt, dass sie neben den Neuropilinen eine zweite Gruppe von Rezeptoren binden, die Plexine. In dieser Arbeit wurde die Expression dieser Rezeptorgruppe an den MPNST Zelllinien nicht überprüft. Es ist aber unter Umständen denkbar, dass auch sie von unseren MPNST Zellen exprimiert werden und an deren Proliferation beteiligt sind. Beispielsweise konnten Shimizu et al. zeigen, dass Sema3F über eine Komplexbildung mit Nrp-2 und dem Plexin A1 zu einem Kollaps des Zytoskeletts von humanen Gliomazellen und den damit verbundenen funktionellen Einschränkungen wie Migrationshemmung führt (Shimizu et al., 2008). Es gibt noch keine veröffentlichten Daten zu einer Expression von Plexinen in MPNST. Um den Mechanismus der antiproliferativen Wirkung des Sema3F auf unsere MPNST-Zellen besser zu verstehen, wäre es durchaus interessant, eine mögliche Expression von Plexinen auch in unseren MPNST-Zelllinien zu überprüfen und des Weiteren auch eine potentielle Beteiligung derer an der Proliferation sowie Migration der Tumorzellen.

Da es für maligne Erkrankungen ganz charakteristisch ist, nicht nur an Ort und Stelle zu wachsen, sondern sich im ganzen Körper auszubreiten und in Lymphknoten oder Organen Metastasen zu bilden, ist die Fähigkeit der Migration von essentieller Bedeutung für eine Tumorzelle. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit auch eine mögliche Inhibition ebendieser Fähigkeit überprüft werden. Wir wählten dazu Substanzen, die schon in den Proliferations-Assays einen Effekt zeigen konnten, so dass man optimalerweise ein Molekül hätte, welches Proliferation und Migration der Tumorzellen selbst hemmen kann und gleichzeitig noch antiangiogen wirkt. Da in Vorversuchen nur die Zelllinie S462 eine relevante Invasivität zeigte, wählten wir entsprechend das Sema3F und das sNrp-1 aus. Zusätzlich überprüften wir auch die antiinvasive Wirkung des TSP-2, auch wenn dieses nur auf die Zelllinie S1507.2 einen antiproliferativen Effekt hatte, weil von ihm bekannt ist, dass es eine antiinvasive Wirkung u.a. auf Pankreaskarzinomzellen über eine Herunterregulation von Matrixmetalloproteinasen bewirkt (Mac Lauchlan et al, 2008; Nakamura et al., 2009). Tatsächlich konnte in dieser Arbeit eine signifikante antiinvasive Wirkung des TSP-2 auf die Zellen der Linie S462 nachgewiesen werden. Hinsichtlich des Sema3F waren unsere Ergebnisse ähnlich denen anderer Arbeitsgruppen, die auch schon nachweisen konnten, dass Sema3F die Migration der Tumorzellen verschiedener Entitäten wie Mammakarzinome, Melanome und Kolorektalkarzinome hemmen kann (Nasarre et al., 2002; Bielenberg et al., 2004; Wu et al., 2011). Hinsichtlich des sNrp-1 gibt es bislang noch keine vergleichbaren Arbeiten, die eine antiinvasive Wirkung dessen auf Tumorzellen selbst untersucht hätten. Sowohl das

Sema3F als auch das sNrp-1 zeigten in dieser Arbeit eine ausgeprägte antiinvasive Wirkung auf die S462-Zellen. Dabei war die Reduktion der Invasivität bei den Zellen, die mit Sema3F und mit sNrp-1 behandelt wurden, etwa gleich hoch, aber interessanterweise bei den mit TSP-2 behandelten deutlich geringer ausgeprägt.

Es wäre jedenfalls äußerst interessant in weiterführenden Versuchen die Effekte der Substanzen, die in unserer Arbeit *in vitro* antitumorogene Effekte gegen die die MPNST-Zelllinien gezeigt haben, auch *in vivo* zu untersuchen. Vor allem die beiden Substanzen sNrp-1 und Sema3F, die sowohl antiproliferative wie auch antiinvasive Effekte *in vitro* zeigen konnten, stellen optimale potentielle neue Therapiemoleküle dar und sollten in weiteren Untersuchungen hinsichtlich ihrer Effektivität *in vivo* analysiert werden.

Nicht zuletzt sollte in dieser Arbeit noch die antitumorogene Wirkung des CGT getestet werden, ein Antagonist der Integrine $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$, da auch dessen Wirkung sich nicht nur auf Endothelzellen beschränkt. Beispielsweise konnte auch eine antiproliferative und proapoptotische Wirkung auf Gliomzellen wie auch auf andere Tumorzellen nachgewiesen werden (MacDonald et al., 2001; Oliveira-Ferrer 2008). Ein inhibierender Effekt auf $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$ Integrin exprimierende Tumorzellen selbst konnte auch in *in vivo* Versuchen belegt werden (Taga et al., 2002), so dass ein vermindertes Tumorstadium sowohl auf die antiproliferative als auch antitumorogene Wirkung des CGT zurückgeführt werden kann, was auch dieses Molekül zu einem interessanten Molekül für die Krebstherapie macht. Erfreulicherweise konnte in dieser Arbeit auch ein antitumorogener Effekt auf die beiden MPNST-Zelllinien S462 und S1507.2 nachgewiesen werden. Eine etwaige Konzentrationsabhängigkeit war hierbei nur geringfügig ausgeprägt. Insgesamt konnte eine im Vergleich zu den bislang beschriebenen Substanzen stärkere Reduktion der Proliferation bis etwa 70% erreicht werden. Dabei war jedoch die Reduktion der Proliferation bei den S1507.2 deutlich ausgeprägter als bei den S462. Dies passt gewissermaßen zu den Expressionsanalysen, die zeigten, dass die S1507.2 zu einem deutlich höheren Prozentsatz das Integrin $\alpha\beta3$ exprimieren. Erstaunlich ist allerdings, dass die Zelllinie S462 überhaupt eine relevante Inhibition der Proliferation nach Inkubation mit dem Cilengitide zeigte, obwohl sie weder das Integrin $\alpha\beta3$ exprimieren noch das Integrin $\alpha\beta5$. Es wäre denkbar, dass Cilengitide in Abwesenheit von den beiden Integrinen $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$, wie bei den MPNST S264 letztlich der Fall, über die Interaktion mit anderen Integrinen ähnliche Wirkungen entfalten kann (Mas-Moruna et al., 2011; Meyer dos Santos et al., 2014).

Auffällig waren die Formänderung und Verlust der Adhäsion der MPNST-Zellen bei den Proliferations-Assays mit CGT, wobei das Phänomen mit steigender Konzentration des CGT stärker wurde. Es konnte in weiterführenden Versuchen gezeigt werden, dass es unter Inkubation mit dem CGT zu einer deutlichen Zunahme des Anteils apoptotischer MPNST-Zellen an der Gesamtzellzahl kam. Hier zeigte

sich eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit. Insgesamt war bei der Zelllinie S1507.2 der Anteil der apoptotischen Zellen etwas größer als bei den S462. Ob die Zellen durch einen direkten Effekt des CGT apoptotisch werden oder durch den durch CGT ausgelösten Verlust der Adhäsion, was als Anoikis bezeichnet wird, wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Für Gliomazellen beispielsweise konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es sich bei der Apoptose durch CGT a.e. um eine Anoikis handelt (Oliveira-Ferrer et al., 2008). Auch die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen des CGT auf die MPNST-Zellen wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Beides wären interessante Fragestellungen für Folgearbeiten.

Insgesamt konnte eine ausgeprägte antiproliferative und proapoptische Wirkung des CGT auf beide untersuchten MPNST-Zelllinien beobachtet werden, so dass es nach diesen Ergebnissen äußerst interessant wäre, diese Wirkung auch in vivo weiter zu überprüfen. Gerade bei den Substanzen, die das Integrin $\alpha v \beta 3$ als Zielstruktur haben, wie eben auch das CGT, wäre ein weiterer Vorteil in vivo, dass dieses Integrin kaum in normalem adulten Gewebe exprimiert wird, so dass man vermuten kann, dass sie möglicherweise als Therapien recht nebenwirkungsarm sind (Danhier et al., 2012). Tatsächlich war Cilengitide in klinischen Studien recht gut verträglich. Leider zeigte sich in den letzten Jahren aber, dass das CGT trotz sehr guter präklinischer Ergebnisse die klinischen Ergebnisse bei verschiedenen Tumorentitäten, u.a. Glioblastomen, Kopf-Hals-Tumoren, weniger überzeugend waren. Nachdem bei z.B. den Glioblastomen verschiedene Phase-I und -II-Studien noch Hinweise dafür erbrachten, dass CGT zumindest in Kombination mit Standard-Radiochemotherapie das Überleben von Patienten verbessern könnte, zeigte eine große Phase III Studie keinen Überlebensvorteil (Reardon et al., 2008; Stupp et al., 2010; Nabors et al., 2012; Stupp et al., 2014). Auch bei Kopf-Hals-Tumoren konnte dem CGT in Kombination mit einer Chemotherapie mit Cisplatin und 5-FU sowie Cetuximab kein Effekt auf das Patientenüberleben nachgewiesen werden, allerdings exprimieren Kopf-Hals-Tumoren auch nicht das Integrin $\alpha v \beta 3$ (Vermorken et al., 2013).

Es ist sehr gut denkbar, dass u.a. verschiedene Resistenzmechanismen ursächlich für die fehlende klinische Wirkung des CGT sind (Desgrosellier et al., 2009).

Gerade aufgrund der potentiellen Resistenzbildung wäre eine Kombination von antiproliferativ wirksamen Substanzen, die unterschiedliche Therapie-Targets haben, interessant. Präklinisch konnte beispielsweise bei Glioblastomzellen durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Kombination der beiden Substanzen Tumstatin und Endostatin, die verschiedene Zielmoleküle haben, den jeweiligen einzelnen Substanzen hinsichtlich der antitumorigen Effektivität überlegen sind (Oliveira-Ferrer et al., 2013). In dieser Arbeit zeigte neben dem CGT auch das Sema3F relevante antitumorogene Eigenschaften, beide haben mit den Integrinen auf der einen Seite und Nrp-2 und damit die VEGF-Achse, auf der anderen Seite ebenfalls ganz unterschiedliche Zielmoleküle. Die Überprüfung ebendie-

ser Kombination bei MPNST-Zellen, aber auch der Kombination anderer Substanzen, die in dieser Arbeit antitumorigen wirkten und in unterschiedlichen Signalwegen involviert sind, wären spannende Untersuchungen für zukünftige Arbeiten.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit mit den untersuchten Molekülen erfreuliche Ergebnisse mit z.T. deutlichen antiproliferativen, antiinvasiven und proapoptischen Effekten auf die Tumorzellen der beiden MPNST-Zelllinien erzielt werden. Gerade das CGT, Sema3F, aber auch Tumstatin, sNrp-1 und TSP-2 konnten sich als interessante potentielle Therapiemoleküle erweisen, die zwei Angriffspunkte, die Angiogenese und die Tumorzellen selber, haben. Daher wäre eine weitere Analyse der Effektivität dieser Moleküle in vivo eine sehr interessante Fragestellung für folgende Arbeiten, ebenso wie eine Analyse von Kombinationen der o.g. Substanzen, die dann möglichst unterschiedliche Zielmoleküle haben sollten. Vor allem für die beiden antiproliferativ und antiinvasiv wirksamen Substanzen sNrp-1 und Sema3F wäre eine weiterführende Analyse der Effektivität in vivo sehr interessant, gerade weil beiden bereits antiangiogene und antitumorigene Effekte in vivo bei anderen Tumorentitäten nachgewiesen werden konnte (Schuch et al., 2003; Wong et al., 2012). Sema3F beispielsweise führt bei Schwannomen in Neurofibromatose Typ 2 Patienten zu einer Inhibition der Angiogenese und Reduktion der Tumorlast, was allerdings hauptsächlich auf antiangiogene Eigenschaften des Sema3F zurückzuführen war (Wong et al., 2012). Bei unseren MPNST wäre die Vermutung, dass auch in vivo durch einen additiven antiangiogenen und antiinvasiven Effekt beider Faktoren diese ein deutliches antitumorignes Potential besitzen. Durch in vivo Versuche wäre es zudem nicht nur möglich, diese in vitro nachgewiesenen Effekte auf die Tumorzellen zu bestätigen, sondern auch eine potentielle doppelte Wirkung auf die Gefäße bzw. die Endothelzellen und die Tumor zu untersuchen. Dazu kommt, dass eine Analyse in vivo insbesondere auch deshalb interessant ist, weil die beiden untersuchten MPNST-Zelllinien nur zu maximal 20-30% der relevanten Rezeptoren exprimieren, bei den Gewebeschnitten die Expression jedoch wie beschrieben deutlich höher lag. Daher könnte man unter Umständen vermuten, dass im Gewebe, also in vivo, auch die Ansprechwahrscheinlichkeit auf die genannten Substanzen noch größer ist. Gerade vor dem Hintergrund, dass die Prognose der MPNST weiterhin sehr schlecht ist und die Therapie, gerade auch die systemische, nur unzureichend effektiv ist, stellen die in dieser Arbeit identifizierten, antiangiogenen und antitumorigen auf MPNST-Zellen wirkenden Substanzen eine interessante potentielle Therapiemöglichkeit dar, welche so dringend benötigt wird.

5 Zusammenfassung

MPNST sind seltene aber aggressive Tumoren mit nach wie vor sehr eingeschränkter Prognose. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass die einzige kurative Therapieoption die radikale chirurgische Entfernung ist, welche aber aufgrund des häufig lokal fortgeschrittenen Wachstums bei Diagnosestellung selten erreicht werden kann. Neue Therapien sind daher unbedingt notwendig. Zu den neueren Strategien in der Krebstherapie gehört die antiangiogene Therapie, da Angiogenese einen essentiellen Schritt in der Entwicklung und dem Wachstum von Tumoren darstellt. Seit einigen Jahren sind antiangiogene Therapien bereits in der Therapie einiger Entitäten etabliert. Interessant ist, dass verschiedene proangiogene Faktoren und vor allem auch die entsprechenden Rezeptoren nicht nur von Endothelzellen, sondern auch von Tumorzellen selbst exprimiert werden und diese dadurch in die Proliferation und Migration der Tumorzellen direkt involviert sein könnten. Dies gilt auch für die Entität der MPNST.

Mit dieser Arbeit sollte daher eine Substanz ermittelt werden, mit der eine inhibitorische Wirkung sowohl auf die Endothelzellen und damit die Angiogenese sowie auf die Tumorzellen selbst erreicht werden kann. Dazu wurde zunächst die Expression löslicher proangiogener Faktoren (VEGF-C, -D) und Rezeptoren (VEGFR-1, -2, -3, Nrp-2, Integrin α V β 5, α V β 3 und α 5 β 1) in zwei verschiedenen MPNST-Zelllinien (S462, S1507.2) untersucht. Zudem wurde die Expression von VEGFR -1, -2 und Nrp-2 in Geweben von elf verschiedenen Neurofibromatose-1 assoziierten MPNST-Patienten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass beide Zelllinien VEGF-C und -D exprimieren sowie einige der überprüften Rezeptoren (VEGFR-1, -3, Nrp-2, Integrine α V β 3, α 5 β 1). Auch im Gewebe zeigte sich eine ausgeprägte Expression v.a. von VEGFR-3 und Nrp-2. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse sollte der Effekt verschiedener antiangiogener Substanzen (Sema3F, sNrp, Tumstatin, Endostatin, TSP-2 und CGT) auf die Proliferation und Invasion beider MPNST-Zelllinien analysiert werden. Gerade das Sema3F, das Nrp-2 mit einer hohen Affinität bindet, hatte eine deutlich hemmende Wirkung auf die Proliferation sowie Invasion beider Zelllinien. CGT hatte ebenfalls eine ausgeprägte Wirkung auf die Proliferation. Aber auch einige der weiteren Substanzen (Tumstatin, TSP-2, sNrp) zeigten Effekte auf Proliferation und teils auch Invasion der MPNST-Zellen. Dabei zeigten sich teilweise merkbare Unterschiede zwischen beiden Zelllinien hinsichtlich der Expression angiogener Faktoren wie auch der Wirkung der antiangiogenen Substanzen.

Zusammenfassend konnten interessante Substanzen identifiziert werden, denen neben ihren antiangiogenen Eigenschaften in dieser Arbeit auch direkt antitumorogene Wirkungen auf Proliferation und Invasivität der MPNST-Zellen nachgewiesen werden konnten. Gerade der Sema3F/Nrp-2 Signalweg stellt mit seiner antiproliferativen und antiinvasiven Wirkung auf beide Zelllinien einen vielversprechenden Target in der Entwicklung neuer Therapieoptionen für MPNST dar.

5.1 Abstract

MPNST are rare but aggressive tumors, which still have a very poor prognosis. That is because the only curative treatment option is a radical surgical removal, which rarely can be achieved due to the often locally advanced growth at time of diagnosis. Therefore new therapies are crucial. One of the novel strategies in cancer treatment is the anti-angiogenic therapy. Angiogenesis is an essential step in the development and growth of tumors. For several years, anti-angiogenic therapies have been established in the treatment of some entities. It is interesting that several pro-angiogenic factors and especially their respective receptors are not only expressed by endothelial cells, but also by tumor cells themselves and thus could be directly involved in the proliferation and migration of tumor cells. This also applies to the entity of the MPNST.

Therefore, this paper aims to identify a substance, which has an inhibitory effect on both the endothelial cells and thereby the angiogenesis and the tumor cells themselves. For this reason, the expression of soluble pro-angiogenic factors (VEGF-C, D) and pro-angiogenic receptors (VEGFR-1, -2, -3, Nrp-2 integrin α V β 5, α V β 3 and α 5 β 1) was analyzed in two different MPNST cell lines (S462, S1507.2). In addition, the expression of VEGFR-1, -2 and No. 2 was examined in tumor tissue samples of eleven different neurofibromatosis-1 associated MPNST patients. It could be shown that both cell lines express the soluble factors VEGF-C and D as well as some of the reviewed receptors (VEGFR-1, -3, Nrp-2, Integrin α V β 3, α 5 β 1). Furthermore a pronounced expression, mainly of VEGFR-3 and Nrp-2, was detected in the tissue samples. Taking these results into account, the aim was to analyze the effect of various anti-angiogenic substances (Sema3F, sNrp, Tumorstatin, Endostatin, TSP-2 and CGT) on the proliferation and invasion of both MPNST cell lines. Especially Sema3F, which binds Nrp-2 with high affinity, had a clear inhibitory effect on the proliferation and invasion of both cell lines. CGT had a strong effect on the proliferation as well and some of the other substances (Tumorstatin, TSP-2, sNrp) also showed effects on the proliferation and in some cases the invasion of the MPNST cells. Partly there were some significant differences between the two cell lines regarding the expression of angiogenic factors and the effect of the anti-angiogenic substances.

In summary, interesting substances could be identified, which have direct anti-tumorigenic effects on proliferation and invasiveness of MPNST cells in addition to their anti-angiogenic properties. Especially the Sema3F/ Nrp2 pathway with its anti-proliferative and anti-invasive effect on both cell lines provides a promising target in the development of new therapeutic options for MPNST.

6 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
AEC	Amoniethyl carbazole
AKT	Proteinkinase B
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
Cdc42	Cell division control protein 42
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
CGT	Cilengitide
CM	Konditioniertes Medium
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbeco`s Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuclease
DPBS	Dulbeco`s Phosphate-Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase

ERK	extracellulat signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAK	Focal Adhesion Kinase
FBS	Fetales bovines Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Firbopalst growth factor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Flt	fms-related tyrosine kinase
FSC	Forward light scatter
GAP	GTPase activating protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GRD	GAP related domain
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
His-Tag	Polyhistidin-Tag
HMEC	Human Mammary Epithelial Cells
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
ICH	Immunhistochemie
IL	Interleukin
KDR	Kinase insert domain receptor
MAP	Mitogen-activated protein

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
mES	murine Endostatin
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
mRNA	messengerRNA
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
n	Anzahl
NF1	Neurofibromatose Typ 1
Nrp	Neuropilin
NTA	Nitrilotriacetic acid
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PAE	Porcin aortic endothelial
PAK	p21-activated kinase
PBS	Phosphate-buffered saline
PCK	Proteinkinase C
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PLC	Phospholipase C
PIGF	Placental growth factor

R0-Resektion	Entfernung des Tumors im Gesunden
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RGD	Arginylglycylaspartic acid
RNA	Ribonuclein acid
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	Real-Time PCR
S6K	Ribosomal s6 kinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SE	Standardfehler
Sema	Semaphorin
sNrp	soluble Neuropilin
SSC	Sideward light scatter
sVEGFR-2	soluble VEGFR-2
svVEGF	snake venom VEGF
TBS	Tris-buffered Saline
TNF	Tumornekrosefaktor
TP53	humanes Tumorsuppressorgen des Protein P53
TSP	Thrombospondin
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VPF	Vascular permeability
WT	Wildtyp

7 Literaturverzeichnis

- Adams, JC; Lawler J (2004): The thrombospondins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36(6): 961–968
- Angelov, L; Salhia, B; Roncari, L; McMahon, G; Guha, A (1999): Inhibition of Angiogenesis by Blocking Activation of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Leads to Decreased Growth of Neurogenic Sarcomas. *Cancer Research* 59(21): 5536–5541
- Anghileri, M; Miceli, R; Fiore, M; Mariani, L; Ferrari, A; Mussi, C; Lozza, L; Collini, P; Olmi, P; Casali, P G; Pilotti, S; Gronchi, A (2006): Malignant peripheral nerve sheath tumors. *Cancer*. 107(5): 1065–1074
- Armstrong, LC; Björkblom, B; Hankenson, KD; Siadak, AW; Stiles, CE; Bornstein, P (2002): Thrombospondin 2 Inhibits Microvascular Endothelial Cell Proliferation by a Caspase-independent Mechanism. *Molecular Biology of the Cell* 13(6): 1893–1905
- Asahara, T; Masuda, H; Takahashi, T; Kalka, C; Pastore, C; Silver, M; Kearne, M; Magner, M; Isner, JM (1999): Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85(3): 221–228
- Avraamides, CJ; Garmy-Susini, B; Varner, JA (2008): Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8(8): 604–617
- Baehring, JM; Betensky, RA; Batchelor, TT (2003): Malignant peripheral nerve sheath tumor: the clinical spectrum and outcome of treatment. *J Neurooncol* 61(3): 237-248
- Bagri, A; Tessier-Lavigne, M; Watts, RJ (2009): Neuropilins in Tumor Biology. *Clinical Cancer Research* 15(6): 1860–1864
- Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J (1992): Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature* 356(6371): 713–715
- Benninghoff, A; Drenckhahn, D (2004): Anatomie. Band 2: Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrine Drüsen, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. 16. Aufl. 2 Bände: Urban&Fischer in Elsevier
- Bielenberg, DR; Hida, Y; Shimizu, A; Kaipainen, A; Kreuter, M; Kim, CC; Klagsbrun, M (2004): Semaphorin 3F, a chemorepellent for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype. *Journal of Clinical Investigation* 114(9): 1260–1271

- Bielenberg, DR; Pettaway, C; Takashima, S; Klagsbrun, M (2006): Neuropilins in neoplasms: Expression, regulation, and function. *Experimental Cell Research* 312(5): 584–593
- Bikfalvi A (2006): Angiogenesis: health and disease. *Annals of Oncology* 17(Suppl 10): x65–70
- Bondke, PA; Buschmann IR (2011): Vascular growth in health and disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 4: 14: 1–15
- Bornstein, P; Armstrong, LC; Hankenson, KD; Kyriakides, TR; Yang, Z (2000): Thrombospondin 2, a matricellular protein with diverse functions. *Matrix Biology* 19(7): 557–568. DOI: 10.1016/S0945-053X(00)00104-9.
- Brooks, C; Klemke, RL; Schön, S; Lewis, JM; Schwartz, MA; Cheresh, DA (1997): Insulin-like Growth Factor Receptor Cooperates With Integrin $\alpha v\beta 5$ to Promote Tumor Cell Dissemination In Vivo. *Journal of Clinical Investigation* 99(6): 1390–1398
- Carli, M; Ferrari, A; Mattke, A; Zanetti, I; Casanova, M; Bisogno, G; Cecchetto, G; Alaggio, R; Sio, L de; Koscielniak, E; Sotti, G; Treuner, J (2005): Pediatric Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor: The Italian and German Soft Tissue Sarcoma Cooperative Group. *Journal of Clinical Oncology* 23(33): 8422–8430
- Carmeliet, P. (2000): Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 6(3): 389–395
- Carmeliet, P (2005): Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438(7070): 932–936
- Carmeliet, P; Ferreira, V; Breier, G; Pollefeyt, S; Kieckens, L; Gertsenstein, M; Fahrig, M; Vandenhoeck, A; Harpal, K; Eberhardt, C; Declercq, C; Pawling, J; Moons, L; Collen, D; Risau, W; Nagy, A (1996): Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380(6573): 435–439
- Carmeliet, P; Jain, RK (2000): Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801): 249–257
- Caunt, M; Mak, J; Liang, WC; Stawicki, S; Pan, Q; Tong, RK; Kowalski, J; Ho, C; Reslan, HB; Ross, J; Berry, L; Kasman, I; Zlot, C; Cheng, Z; Le Couter, J; Filvaroff, EH; Plowman, G; Peale, F; French, D; Carano, R; Koch, AW; Wu, Y; Watts, RJ; Tessier-Lavigne, M; Bagri, A (2008): Blocking Neuropilin-2 Function Inhibits Tumor Cell Metastasis. *Cancer Cell* 13(4): 331–342
- Chen, H; Sottile, J; O'Rourken, KM; Dixit, VM; Mosher, DF (1994): Properties of Recombinant Mouse Thrombospondin 2 Expressed in Spodoptera Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 269(51): 32226–32232
- Chen, J; Yao, D; Zhao, S; He, C; Ding, N; Li, L; Long, F (2014): MiR-1246 promotes SiHa cervical cancer cell proliferation, invasion, and migration through suppression of its target gene thrombospondin 2. *Arch Gynecol Obstet* 290 (4): 725-732. DOI: 10.1007/s00404-014-3260-2

- Cichowski, K; Shih, TS; Schmitt, E; Santiago, S; Reilly, K; McLaughlin, ME; Bronson, RT; Jacks, T (1999): Mouse Models of Tumor Development in Neurofibromatosis Type 1. *Science* 286(5447): 2172–2176
- Danhier, F; Le Breton, A; Pr eat, V (2012): RGD-Based Strategies To Target Alpha(v) Beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. *Mol. Pharmaceutics* 9(11): 2961–2973
- Daston, MM; Scrable, H; Nordlund, M; Sturbaum, AK; Nissen, LM; Ratner, N (1992): The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron* 8(3): 415–428
- DeClue, JE; Papageorge, AG; Fletcher, JA; Diehl, SR; Ratner, N; Vass, WC; Lowy, DR (1992): Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell* 69(2): 265–273
- Desgrosellier, JS; Barnes, LA; Shields, DJ; Huang, M; Lau, SK; Pr evost, N; Tarin, D; Shattil, SJ; Cheresch, DA (2009): An integrin $\alpha\beta3$ -c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nat Med* 15(10): 1163–1169. doi: 10.1038/nm.2009. Epub 2009 Sep 6
- Dhanabal, M; Ramchandran, R; Waterman, MJF; Lu, H; Knebelmann, B; Segal, M; Sukhatme, VP (1999): Endostatin Induces Endothelial Cell Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 274(17): 11721–11726. DOI: 10.1074/jbc.274.17.11721.
- Dkhissi, F; Lu, H; Soria, C; Opolon, P; Griscelli, F; Liu, H; Khattar, P; Mishal, Z; Perricaudet, M; Li, H (2003): Endostatin Exhibits a Direct Antitumor Effect in Addition to Its Antiangiogenic Activity in Colon Cancer Cells. *Human Gene Therapy* 14(10): 997–1008
- Ducatman, BS; Scheithauer BW; Piepgra DG; Reiman, HM.; Ilstrup, DM (1986): Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases. *Cancer*. 57(10): 2006–2021
- Dumont, DJ, Jussila, L; Taipale, J; Lymboussaki, A; Mustonen, T; Pajusola, K; Breitman, M; Alitalo, K (1998): Cardiovascular Failure in Mouse Embryos Deficient in VEGF Receptor-3. *Science* 282(5390): 946–949
- Ebos, JML; Kerbel, RS (2011): Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol* 8 (4): 210–221. DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.21.
- Eikesdal, HP; Sugimoto, H; Birrane, G; Maeshima, Y; Cooke, VG; Kieran, M; Kalluri, R (2008): Identification of amino acids essential for the antiangiogenic activity of tumstatin and its use in combination antitumor activity. *PNAS* 105(39): 15040–15045
- Eliceiri, BP (2002): Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin $\alpha\beta5$ in vascular endothelial growth factor signaling. *The Journal of Cell Biology* 157(1): 149–160

- Ellis, LM (2006): The role of neuropilins in cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 5(5): 1099–1107
- Eskens, FA; Dumez, H; Hoekstra, R; Perschl, A; Brindley, C; Böttcher, S; Wynendaele, W; Drevs, J; Verweij, J; van Oosterom, AT (2003): Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ in patients with advanced solid tumours. *European Journal of Cancer* 39(7): 917–926
- Evans, DG; Howard, E; Giblin, C; Clancy, T; Spencer, H; Huson, SM; Lalloo, F (2010): Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: Estimates from a UK family genetic register service. *Am. J. Med. Genet.* 152A(2): 327–332
- Evans, DG; Baser, ME; McGaughran, J; Sharif, S; Howard, E; Moran, A (2002): Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet* 39(5): 311–314
- Favier, B; Alam, A; Barron, P; Bonnin, J; Laboudie, P; Fons, P; Mandron, M; Herault, JP; Neufeld, G; Savi, P; Herbert, JM; Bono, F (2006): Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* 108(4): 1243–1250
- Ferner, RE; Gutmann, DH (2002): International Consensus Statement on Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors in Neurofibromatosis 1. *Cancer Research* 62(5): 1573–1577
- Ferrara, N; Davis-Smyth, T (1997): The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews* 18(1): 4–25
- Folkman, J (1995): Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine* 1(1): 27–31
- Friedlander, M; Brooks, PC; Shaffer, RW; Kincaid, CM; Varner, JA; Cheresch, DA (1995): Definition of Two Angiogenic Pathways by Distinct αv Integrins. *Science* 270(5241): 1500–1502
- Futamura, M; Kamino, H; Miyamoto, Y; Kitamura, N; Nakamura, Y; Ohnishi, S; Masuda, Y; Arawaka, H (2007): Possible Role of Semaphorin 3F, a Candidate Tumor Suppressor Gene at 3p21.3, in p53-Regulated Tumor Angiogenesis Suppression. *Cancer Research* 67(4): 1451–1460
- Gacche, RN; Meshram, RJ (2014): Angiogenic factors as potential drug target: Efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1846 (1): 161–179. DOI: 10.1016/j.bbcan.2014.05.002.
- Gagnon, ML; Bielenberg, DR; Gechtman, Z; Miao, HQ; Takashima, S; Soker, S; Klagsbrun, M (2000): Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *PNAS* 97(6): 2573–2578
- Gesundheit, B; Parkin, P; Greenberg, M; Baruchel, S; Senger, C; Kapelushnik, J; Smith C; Klement, GL (2010): The Role of Angiogenesis in the Transformation of Plexiform Neurofibroma into Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor. *Journal of Neurosurgery* 112(5): 1000–1006

- nant Peripheral Nerve Sheath Tumors in Children With Neurofibromatosis Type 1. *J Pediatr Hematol Oncol* 32(7): 548–553
- Goto, T; Ishikawa, H; Matsumoto, K; Nishimura, D; Kusaba, M; Taura, N; Shibata, H; Miyaaki, H; Ichikawa, T; Hamasaki, K; Nakao, K; Maeshima, Y; Eguchi, K. (2008): Tum-1, a tumstatin fragment, gene delivery into hepatocellular carcinoma suppresses tumor growth through inhibiting angiogenesis. *International Journal of Oncology* 33(1): 33–40
- Hagel, C; Zils, U; Peiper, M; Kluwe, L; Gotthard, S; Friedrich, RE; Zurakowski, D; Deimling, A; Mautner, VF (2007): Histopathology and clinical outcome of NF1-associated vs. sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *J Neurooncol* 82(2): 187–192
- Haiko, P; Makinen, T; Keskitalo, S; Taipale, J; Karkkainen, MJ; Baldwin, ME; Stacker, SA; Achen, MG; Alitalo, K (2008): Deletion of Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGF-C) and VEGF-D Is Not Equivalent to VEGF Receptor 3 Deletion in Mouse Embryos. *Molecular and Cellular Biology* 28 (15): 4843–4850. DOI: 10.1128/MCB.02214-07.
- Hamano, Y; Zeisberg, M; Sugimoto, H; Lively, JC.; Maeshima, Y; Yang, C; Hynes, RO; Werb, Z; Sudhakar, A; Kalluri, R (2003): Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV $\alpha 3$ chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via $\alpha V\beta 3$ integrin. *Cancer Cell* 3(6): 589–601
- Han, J; Ohno, N; Pasco, S; Monboisse, JC; Borel, JP; Kefalides, NA (1997): A Cell Binding Domain from the 3 Chain of Type IV Collagen Inhibits Proliferation of Melanoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* 272(33): 20395–20401
- Hein, M; Graver, S (2013): Tumor cell response to bevacizumab single agent therapy in vitro. *Cancer Cell International* 13 (1): 94. DOI: 10.1186/1475-2867-13-94.
- Hirose T, Scheithauer BW, Sano T (1998): Perineurial malignant Peripheral nerve sheath tumor (MPNST). A Clinicopathological and ultrastructural study of seven cases. *Am J Surg Pathol.* 22(11): 1368–1378
- Hoeben, A; Landuyt, B; Highley, MS; Wildiers, H; Van Oosterom, AT; De Bruijn, EA (2004): Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological Reviews* 56(4): 549–580
- Hood, JD (2003): Differential v integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis. *The Journal of Cell Biology* 162(5): 933–943
- Huang, X; Griffiths, M; Wu, J; Farese, RV. (2000): Normal Development, Wound Healing, and Adenovirus Susceptibility in b5-Deficient Mice. *Molecular And Cellular Biology* 20 (3): 755–759

- Huson, SM; Compston, DAS; Harper, PS (1989): A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. II Guidelines for genetic counselling. *Journal of Medical Genetics*. 26(11): 712–721
- Hynes, RO (2002)a: Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 110(6): 673–687
- Hynes, RO (2002)b: A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nature Medicine* 9(8): 918–921
- Johannessen, CM; Reczek, EE; James, MF; Brems, H; Legius, E; Cichowski, K (2005): The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *PNAS*. 102(24): 8573–8578.
- Jones, JL; Walker, RA (1999): Integrins: a role as cell signalling molecules. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 52(4): 208–213
- Josoko, J; Gwozdz, B; Jedrzejowska-Szypulka, H; Hendryk, S (2000): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* 6(5): 1047–1052
- Kahn, J.; Gillespie, A.; Tsokos, M.; Ondos, J.; Dombi, E.; Camphausen, K. et al. (2014): Radiation Therapy in Management of Sporadic and Neurofibromatosis Type 1-Associated Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. In: *Front. Oncol.* 4. DOI: 10.3389/fonc.2014.00324
- Kärpänen, T; Heckman, CA; Keskitalo, S; Jeltsch, M; Ollila, H; Neufeld, G; Tamagnone, L; Alitalo, K (2006): Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *The FASEB Journal* 20(9): 1462–1472
- Kalluri, R; Zeisberg, M (2006): Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6 (5): 392–401. DOI: 10.1038/nrc1877.
- Karkkainen, MJ; Haiko, P; Sainio, K; Partanen, J; Taipale, J; Petrova, TV; Jeltsch, M; Jackson, DG; Talikka, M; Rauvala, H; Betsholtz, C; Alitalo, K (2004): Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nature Immunology* 5(1): 74–80
- Kehrer-Sawatzki H, Mautner VF (2009): Klinik und Genetik der Neurofibromatose Typ 1. *Medizinische Genetik* (4): 519–531
- Kim, S; Bakre, M; Yin, H; Varner, JA (2002): Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A. *J. Clin. Invest.* 110(7): 933–941
- Kim, S; Bell, K; Mousa, SA; Varner, JA (2000)a: Regulation of Angiogenesis in Vivo by Ligation of Integrin $\alpha 5 \beta 1$ with the Central Cell-Binding Domain of Fibronectin. *American Journal of Pathology* 156(4): 1345–1362

- Kim, S; Harris, M; Varner, JA (2000)b: Regulation of Integrin α 3-mediated Endothelial Cell Migration and Angiogenesis by Integrin α 5 β 1 and Protein Kinase A. *Journal of Biological Chemistry* 275(43): 33920–33928
- Kim, YM; Hwang, S; Kim, YM; Pyun, BJ; Kim, TY; Lee, ST; Gho, YS; Kwon, YG (2002): Endostatin Blocks Vascular Endothelial Growth Factor-mediated Signaling via Direct Interaction with KDR/Flk-1. *Journal of Biological Chemistry* 277(31): 27872–27879. DOI: 10.1074/jbc.M202771200
- Kindblom LG; Ahlden M; Meis-Kindblom JM; Stenman, G (1995): Immunohistochemical and molecular analysis of p53, MDM2, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 in benign and malignant peripheral nerve sheath tumours. *Virchows Arch* 427(1): 19–26
- Klemke, RL; Yebra, M; Bayna, EM; Cheresch, DA (1994): Receptor Tyrosine Kinase Signaling Required for Integrin α v β 5-directed Cell Motility but Not Adhesion on Vitronectin. *The Journal of Cell Biology* 127(3): 859–866
- Kluwe, L; Friedrich, R; Mautner, VF (1999): Loss of NF1 allele in schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma. *Genes Chromosomes Cancer* 24(3): 283–285
- Koch, M; Hussein, F; Woeste, A; Gründker, C; Frontzek, K; Emons, G; Hawighorst, T (2011): CD36-mediated activation of endothelial cell apoptosis by an N-terminal recombinant fragment of thrombospondin-2 inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 128(2): 337–346. DOI: 10.1007/s10549-010-1085-7
- Koch, S; Claesson-Welsh, L (2012): Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(7): a006502
- Kolberg, M; Holand, M; Agesen, TH; Brekke, HR; Liestol, K; Hall, KS; Mertens, F; Picci, P; Smeland, S; Lothe, RA (2013): Survival meta-analyses for >1800 malignant peripheral nerve sheath tumor patients with and without neurofibromatosis type 1. *Neuro-Oncology* 15(2): 135–147
- Kourea, HP; Orlow, I; Scheithauer, BW; Cordon-Cardo, C; Woodruff, JM (1999a): Deletions of the INK4A Gene Occur in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors but not in Neurofibromas. *American Journal of Pathology* 155(6): 1855–1860
- Kourea, HP; Cordon-Cardo, C; Dudas, M; Leung, D; Woodruff, JM (1999b): Expression of p27kip and Other Cell Cycle Regulators in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors and Neurofibromas. *The American Journal of Pathology* 155(6): 1885–1891
- Kyriakides, TR; Zhu, YH; Smith, LT; Bain, SD; Yang, Z; Lin, MT; Danielson, KG; Iozzo, RV; Lamarca, M; McKinney, CE; Ginns, EI; Bornstein, P (1998): Mice That Lack Thrombospondin 2 Display Connective Tissue Abnormalities That Are Associated with Disordered Collagen Fibrillogenesis,

- an Increased Vascular Density, and a Bleeding Diathesis. *The Journal of Cell Biology* 140(2): 419–430
- Lammert, M; Friedman, JM; Kluwe, L; Mautner, VF (2005): Prevalence of Neurofibromatosis 1 in German Children at Elementary School Enrollment. *Arch Dermatol.* 141(1): 71–74
- Le, LQ; Parada, LF (2007): Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPS. *Oncogene* 26(32): 4609–4616
- Ledbetter, DH; Rich, DC; O'Connell, P; Leppert, M; Careyt, JC (1989): Precise Localization of NFI to 17q1 1.2 by Balanced Translocation. *Am. J. Hum. Genet.* 44(1): 20–24
- Legius E, Marchuk DA, Collins FS, Glover TW (1993): Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis. *Nat Genet* 3(2): 122–126
- Li, X; Kumar, A; Zhang, F; Lee, C; Tang, Z (2012): Complicated life, complicated VEGF-B. *Trends in Molecular Medicine* 18(2): 119–127
- Loges, S; Schmidt, T; Carmeliet, P (2010): Mechanisms of Resistance to Anti-Angiogenic Therapy and Development of Third-Generation Anti-Angiogenic Drug Candidates. *Genes & Cancer* 1 (1): 12–25. DOI: 10.1177/1947601909356574.
- Lohela, M; Saaristo, A; Veikkola, T; Alitalo, K (2003): Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb Haemost* 90(2): 167–184
- Lothe RA, Slettan A, Saeter G, Brøgger A, Børresen A-L, Nesland JM (1995): Alterations at chromosome 17 loci in peripheral nerve sheath tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 54(1): 65–73
- Lüllmann-Rauch, R (2009): *Taschenlehrbuch Histologie*. 3. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- MacDonald, TJ; Taga, T; Shimada, H; Tabrizi, P; Zlokovic, BV; Cheresch, DA; Laug, WE (2001): Preferential Susceptibility of Brain Tumors to the Antiangiogenic Effects of an av Integrin Antagonist. *Neurosurgery* 48(1): 151–157
- MacLauchlan, S; Skokos, EA; Agah, A; Zeng, J; Tian, W; Davidson, JM; Bornstein, P; Kyriakides, TR (2008): Enhanced Angiogenesis and Reduced Contraction in Thrombospondin-2-null Wounds Is Associated With Increased Levels of Matrix Metalloproteinases-2 and -9, and Soluble VEGF. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 57(4): 301–313. DOI: 10.1369/jhc.2008.952689
- Maeshima, Y; Colorado, PC; Torre, A; Holthaus, KA; Grunkemeyer, JA; Ericksen, MB; Hopfer, H; Xiao, Y; Stillman, IE; Kalluri, R (2000): Distinct Antitumor Properties of a Type IV Collagen Domain Derived from Basement Membrane. *Journal of Biological Chemistry* 275(28): 21340–21348

- Maeshima, Y; Manfredi, M; Reimer, C; Holthaus, KA; Hopfer, H; Chandamuri, BR; Kharbanda, S; Kalluri, R (2001): Identification of the Anti-angiogenic Site within Vascular Basement Membrane-derived Tumstatin. *Journal of Biological Chemistry* 276(18): 15240–15248. DOI: 10.1074/jbc.M007764200
- Maeshima, Y; Sudhakar, A; Lively, JC; Ueki, K; Kharbanda, S; Kahn, CR; Sonenberg, N; Hynes, RO; Kalluri, R (2002): Tumstatin, an Endothelial Cell-Specific Inhibitor of Protein Synthesis. *Science* 295 (5552): 140–143. DOI: 10.1126/science.1065298.
- Mahabeleshwar, GH; Feng, W; Phillips, DR; Byzova, TV (2006): Integrin signaling is critical for pathological angiogenesis. *Journal of Experimental Medicine* 203(11): 2495–2507
- Martin, GA; Viskochil, D; Bollag, G; McCabe, PC; Crosier, WJ; Haubruck, H; Conroy, L; Clark, R; O'Connell, P; Cawthon, RM; Innis, MA; McCormick, F (1990): The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 63(4): 843–849
- Mas-Moruno, C; Beck, JG; Doedens, L; Frank, AO; Marinelli, L; Cosconati, S; Novellino, E; Kessler, H (2011): Increasing $\alpha\beta 3$ Selectivity of the Anti-Angiogenic Drug Cilengitide by N-Methylation. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (40): 9496–9500. DOI: 10.1002/anie.201102971.
- Mashour, GA; Ratner, N; Khan, GA; Wang, HL; Martuza, RL; Kurtz, A (2001): The angiogenic factor midkine is aberrantly expressed in NF1-deficient Schwann cells and is a mitogen for neurofibroma-derived cells. *Oncogene* 20(1): 97–105
- Mautner, VF; Friedrich, RE; Deimling, A von; Hagel, C; Korf, B; Knöfel, MT; Wenzel, R; Fünsterer, C (2003): Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis type 1: MRI supports the diagnosis of malignant plexiform neurofibroma. *Neuroradiology.* 45(9): 618–625
- Mautner, VF; Hartmann, M; Kluwe, L; Friedrich, RE; Fünsterer, C (2006): MRI growth patterns of plexiform neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1. *Neuroradiology* 48(3): 160-165
- Mautner, VF; Asuagbor, FA; Dombi, E; Fünsterer, C; Kluwe, L; Wenzel, R; Widemann, BC; Friedmann, JM (2008): Assessment of benign tumor burden by whole-body MRI in patients with neurofibromatosis 1. *Neuro-Oncology.* 10(4): 593–598
- McColl, BK; Baldwin, ME; Roufail, S; Freeman, C; Moritz, RL; Simpson, RJ; Alitalo, K; Stacker, SA; Achen, MG. (2003): Plasmin Activates the Lymphangiogenic Growth Factors VEGF-C and VEGF-D. *J. Exp. Med.* 198(7): 863–868
- Mechtersheimer, G; Otano-Joos, M; Ohl, S; Benner, A; Lehnert, T; Willeke, F; Möller, P; Otto, HF; Lichter, P; Joos, S (1999): Analysis of chromosomal imbalances in sporadic and NF1-associated peripheral nerve sheath tumors by comparative genomic hybridization. *Genes, Chromosomes & Cancer* 25(4): 362–369

- Meng, H; Zhang, X; Hankenson, KD; Wang, MM (2009): Thrombospondin 2 Potentiates Notch3/Jagged1 Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 284 (12): 7866–7874. DOI: 10.1074/jbc.M803650200.
- Menon, AG; Anderson, KM; Riccardi, VM; Chung, RY; Whaley, JM; Yandell, DW; Farmer, GE; Freimann, RN; Lee, JK; Li, FP; Barker, DF; Ledbetter, DH; Kleider, A; Martuza, RL; Gusella, JF; Seizinger, BR (1990): Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(14): 5435–5439
- Meyer dos Santos, S; Kuczka, K; Picard-Willems, B; Nelson, K; Klinkhardt, U; Harder, S (2014): The integrin antagonist, cilengitide, is a weak inhibitor of α IIb β 3 mediated platelet activation and inhibits platelet adhesion under flow. *Platelets* 26 (1): 59–66. DOI: 10.3109/09537104.2013.870332.
- Mitjans, F; Meyer, T; Fittschen, C; Goodman, S; Jonczyk, A; Marshall, JF; Reyes, G; Piulats, J (2000): In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of [alpha]v integrins. *Int J Cancer* 87(5): 716–723
- Mrugala, MM; Batchelor, TT; Plotkin, SR (2005): Peripheral and cranial nerve sheath tumors. *Current Opinion in Neurology* 18 (5): 604–610
- Nabors, LB; Mikkelsen, T; Hegi, ME; Ye, X; Batchelor, T; Lesser, G; Peereboom, D; Rosenfeld, MR; Olsen, J; Brem, S; Fisher, JD; Grossman, SA (2012): A Safety Run-in and Randomized Phase II Study of Cilengitide Combined with Chemoradiation for Newly Diagnosed Glioblastoma (NABTT 0306). *Cancer* 118 (22): 5601–5607. DOI: 10.1002/cncr.27585.
- Nakamura, M; Oida, Y; Abe, Y; Yamazaki, H; Mukai, M; Matsuyama, M; Chijiwa, T; Matsumoto, H; Ueyama, Y (2008): Thrombospondin-2 inhibits tumor cell invasion through the modulation of MMP-9 and uPA in pancreatic cancer cells. *Molecular Medicine Reports* 1(3): 423–427
- Nasarre, P; Constantin, B; Rouhaud, L; Harnois, T; Raymond, G; Drabkin, H; Bourmeyster, N; Roche, J (2002): Semaphorin SEMA3F and VEGF Have Opposing Effects on Cell Attachment and Spreading. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 5 (1): 83–92
- Neurofibromatosis. Conference Statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference (1988) *Arch Neurol.* 45(5): 575–578
- Nielsen, GP; Stemmer-Rachamimov, AO; Ino, Y; Møller, MB; Rosenberg, AE; Louis, DN (1999): Malignant Transformation of Neurofibromas in Neurofibromatosis 1 Is Associated with CDKN2A/p16 Inactivation. *The American Journal of Pathology* 155(6): 1879–1884
- Nisato, RE; Tille, JC; Jonczyk, A; Goodman, SL; Pepper, MS (2003): α v β 3 and α v β 5 integrin antagonists inhibit angiogenesis in vitro. *Angiogenesis* 6(2): 105–119

- Nyberg, P; Heikkila, P; Sorsa, T; Luostarinen, J; Heljasvaara, R; Stenman, UH; Pihlajaniemi, T; Salo, T (2003): Endostatin Inhibits Human Tongue Carcinoma Cell Invasion and Intravasation and Blocks the Activation of Matrix Metalloprotease-2, -9, and -13. *Journal of Biological Chemistry* 278(25): 22404–22411. DOI: 10.1074/jbc.M210325200
- Ogawa, S; Oku, A; Sawano, A; Yamaguchi, S; Yazaki, Y; Shibuya, M (1998): A Novel Type of Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), Preferentially Utilizes KDR/Flk-1 Receptor and Carries a Potent Mitotic Activity without Heparin-binding Domain. *The Journal of Biological Chemistry* 273(47): 31273–31282
- O'Reilly, MS; Boehm, T; Shing, Y; Fukai, N; Vasios, G; Lane, WS; Flynn, E; Birkhead, JR; Olsen, BR; Folkman, J (1997): Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* 88(2): 277–285
- Oliveira-Ferrer, L; Hauschild, J; Fiedler, W; Bokemeyer, C; Nippgen, J; Celik, I; Schuch, G (2008): Cilengitide induces cellular detachment and apoptosis in endothelial and glioma cells mediated by inhibition of FAK/src/AKT pathway. *J Exp Clin Cancer Res* 27(1): 86. DOI: 10.1186/1756-9966-27-86
- Oliveira-Ferrer, L; Wellbrock, J; Bartsch, U; Murga Penas, EM; Hauschild, J; Klokow, M; Bokemeyer, C; Fiedler, W; Schuch, G (2013): Combination therapy targeting integrins reduces glioblastoma tumor growth through antiangiogenic and direct antitumor activity and leads to activation of the proliferative prolactin pathway. *Molecular Cancer* 12(1): 144. DOI: 10.1186/1476-4598-12-144.
- Olsson, AK; Dimberg, A; Kreuger, J; Claesson-Welsh, L; (2006): VEGF receptor signalling — in control of vascular function. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 7(5): 359–371
- Otrock, ZK; Makarem, JA; Shamseddine, AI (2007): Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 38(3): 258–268
- Partanen, TA; Paavonen, K (2001): Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microscopy Research and Technique* 55(2): 108–121
- Pasterkamp, RJ (2012): Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Nat Rev Neurosci* 13(9): 605–618
- Perry, A; Roth, KA; Banerjee, R; Fuller, CE; Gutmann, DH (2001): NF1 Deletions in S-100 Protein-Positive and Negative Cells of Sporadic and Neurofibromatosis 1 (NF1)-Associated Plexiform Neurofibromas and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *American Journal of Pathology* 159(1): 57–61

- Rak, J; Mitsuhashi, Y; Bayko, L; Filmus, J; Shirasawa, S; Sasazuki, T; Kerbel, RS (1995): Mutant ras Oncogenes Upregulate VEGF/VEGF Expression: Implications for Induction and Inhibition of Tumor Angiogenesis. *Cancer Research* 55(20): 4575–4580
- Rasmussen, SA; Overman, J; Thomson, SAM; Colman, SD; Abernathy, CR; Trimpert, RE; Viridi, G; Roux, K; Bauer, M; Rojiani, AM; Maria, BL; Muir, D; Wallace, MR (2000): Chromosome 17 loss-of-heterozygosity studies in benign and malignant tumors in neurofibromatosis type 1. *Genes, Chromosomes & Cancer* 28(4): 425–431
- Reardon, DA; Fink, KL; Mikkelsen, T; Cloughesy, TF; O'Neill, A; Plotkin, S; Glantz, M; Ravin, P; Raizer, JJ; Rich, KM; Schiff, D; Shapiro, WR; Burdette-Radoux, S; Dropcho, EJ; Wittemer, SM; Nippgen, J; Picard, M; Nabors, LB (2008): Randomized Phase II Study of Cilengitide, an Integrin-Targeting Arginine-Glycine-Aspartic Acid Peptide, in Recurrent Glioblastoma Multiforme. *Journal of Clinical Oncology* 26(34): 5610–5617. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.7510.
- Remmele, W; Stegner, HE (1987): Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 8(3): 138-140
- Riccardi, VM (2007): The genetic predisposition to and histogenesis of neurofibromas and neurofibrosarcomas in neurofibromatosis type 1. *Neurosurg Focus* 22(6):E3
- Ricono, JM; Huang, M; Barnes, LA; Lau, SK; Weis, SM; Schlaepfer, DD; Hanj, SK; Cheresch, DA (2009): Specific Cross-talk between Epidermal Growth Factor Receptor and Integrin $\alpha 5$ Promotes Carcinoma Cell Invasion and Metastasis. *Cancer Research* 69(4): 1383–1391. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3612
- Risau, W (1997): Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386(6626): 671–674
- Risau, W; Flamme, I (1995): Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 73–91
- Roskoski, R (2008): VEGF receptor protein-tyrosine kinases: Structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 375(3): 287-291
- Rubin, JB; Gutmann, DH (2005): Neurofibromatosis type 1 — a model for nervous system tumour formation? *Nature Reviews. Cancer.* 5(7): 557–564
- Saarela, J; Rehn, M; Oikarinen, A; Autio-Harmainen, H; Pihlajaniemi, T (1998): The Short and Long Forms of Type XVIII Collagen Show Clear Tissue Specificities in Their Expression and Location in Basement Membrane Zones in Humans. *American Journal of Pathology* 153(2): 611-626
- Schaffner, F; Ray, A; Dontenwill, M (2013): Integrin $\alpha 5 \beta 1$, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors. *Cancers* 5(1): 27–47. DOI: 10.3390/cancers5010027

Schmidt, EF; Togashi, H; Strittmatter, SM (2003): Semaphorins and their Receptors in Vertebrates and Invertebrates. In Dennis, EA; Bradshaw, RA *Handbook of Cell Signaling Volume 2*. 1st ed., Academic Press. San Diego, 877–881

Schmidt, H; Taubert, H; Meye, A; Würzl, P; Bache, M; Bartel, F; Holzhausen, HJ; Hinze, R (2000): Gains in chromosomes 7, 8q, 15q and 17q are characteristic changes in malignant but not in benign peripheral nerve sheath tumors from patients with Recklinghausen's disease. *Cancer Letters* 155(2): 181–190

Schuch, G; Machluf, M; Bartsch, G; Nomi, M; Richard, H; Atala, A; Soker, S (2002): In vivo administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its antagonist, soluble neuropilin-1, predicts a role of VEGF in the progression of acute myeloid leukemia in vivo. *Blood* 100(13): 4622–4628. DOI: 10.1182/blood.V100.13.4622.

Serra, E; Puig, S; Otero, D; Gaona, A; Kruyer, H; Ars, E; Estivill, X; Lazaro, C (1997): Confirmation of a Double-Hit Model for the NF1 Gene in Benign Neurofibromas. *Am J Hum Genet* 61(3): 512–519

Shahan, TA; Ohno, N; Pasco, S; Borel, JP; Monboisse, JC; Kefalides, NA (1999): Inhibition of Tumor Cell Proliferation by Type IV Collagen Requires Increased levels of cAMP. *Connect Tissue Res* 40(3): 221–232

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. *Natur* 376(6535): 62–66

Sheppard, D (2004): Roles of α v integrins in vascular biology and pulmonary pathology. *Current Opinion in Cell Biology* 16(5): 552–557

Shimizu, A; Mammoto, A; Italiano, JE; Pravda, E; Dudley, AC; Ingber, DE; Klagsbrun, M (2008): ABL2/ARG Tyrosine Kinase Mediates SEMA3F-induced RhoA Inactivation and Cytoskeleton Collapse in Human Glioma Cells. *Journal of Biological Chemistry* 283(40): 27230–27238. DOI: 10.1074/jbc.M804520200.

Short, SM; Derrien, A; Narsimhan, RP; Lawler, J; Ingber, DE; Zetter, BR (2005): Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by α 1 integrins. *The Journal of Cell Biology* 168(4): 643–653. DOI: 10.1083/jcb.200407060

Spurlock, G; Knight, SJL; Thomas, N; Kiehl, T-R; Guha, A; Upadhyaya, M (2010): Molecular evolution of a neurofibroma to malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) in an NF1 patient: correlation between histopathological, clinical and molecular findings. *J Cancer Res Clin Oncol* 136(12): 1869-1880. DOI: 10.1007/s00432-010-0846-3.

- Streit, M; Riccardi, L; Velasco, P; Brown, LF; Hawighorst, T; Bornstein, P; Detmar, M (1999): Thrombospondin-2: A potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *PNAS* 96(26): 14888–14893
- Stucky, C-CH.; Johnson, KN; Gray, RJ; Pockaj, BA; Ocal, IT; Rose, PS; Wasif, N (2012): Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors (MPNST): The Mayo Clinic Experience. *Ann Surg Oncol* 19(3): 878–885
- Stupp, R; Hegi, ME; Neyns, B; Goldbrunner, R; Schlegel, U; Clement, PMJ, et al. (2010): Phase I/IIa Study of Cilengitide and Temozolomide With Concomitant Radiotherapy Followed by Cilengitide and Temozolomide Maintenance Therapy in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology* 28(16): 2712–2718. DOI: 10.1200/JCO.2009.26.6650.
- Stupp, R; Hegi, ME; Gorlia, T; Erridge, SC; Perry, J; Hong, Y-K; et al. (2014): Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 15(10): 1100–1108. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70379-1.
- Su, JL; Yang, PC; Shih, JY; Yang, CY; Wei, LH; Hsieh, CY; Chou, CH; Jeng, YM; Wang, MY; Chang, KJ; Hung, MC; Kuo, ML (2006): The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell* 9(3): 209–223
- Sudhakar, A; Sugimoto, H; Yang, C; Lively, J; Zeisberg, M; Kalluri, R (2003): Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins. *PNAS* 100(8): 4766–4771
- Sund, M; Hamano, Y; Sugimoto, H; Sudhakar, A; Soubasakos, M; Yerramall, U; Benjamin, LE; Lawler, J; Kieran, M; Shah, A; Kalluri, R (2005): Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. *PNAS* 102(8): 2934–2939
- Taga, T; Suzuki, A; Gonzalez-Gomez, I; Gilles, FH; Stins, M; Shimada, H; Barsky, L; Weinberg, KI; Laug, WE (2002): αv -Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *Int. J. Cancer* 98(5): 690–697
- Takahashi, H; Shibuya, M (2005): The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science* 109(3): 227–241
- Takahashi, S (2011): Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), VEGF Receptors and Their Inhibitors for Antiangiogenic Tumor Therapy. *Biol. Pharm. Bull.* 34(12): 1785–1788
- Tammela, T; Zarkada, G; Wallgard, E; Murtomaki, A; Suchting, S; Wirzenius, M; et al. (2008): Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 454(7204): 656–660. DOI: 10.1038/nature07083.

- Thijssen, VLJL; Poirier, F; Baum, LG; Griffioen, AW (2007): Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy. *Blood* 110(8): 2819–2827
- Thomas, SL; De Vries, GH (2007): Angiogenic Expression Profiling of Normal and Neurofibromindeficient Human Schwann Cells. *Neurochem Res* 32(7): 1129–1141
- Tsai, M-J; Chang, W-A; Huang, M-S; Kuo, P-L (2014): Tumor Microenvironment: A New Treatment Target for Cancer. *ISRN biochemistry* 2014: 351959. DOI: 10.1155/2014/351959.
- Tucker, T; Wolkenstein, P; Revuz, J; Zeller, J; Friedman, JM (2005): Association between benign and malignant peripheral nerve sheath tumors in NF1. *Neurology* 65(2): 205–211
- Tvorogov, D; Anisimov, A; Zheng, W; Leppänen, V-M; Tammela, T; Laurinavicius, S; et al. (2010): Effective Suppression of Vascular Network Formation by Combination of Antibodies Blocking VEGFR Ligand Binding and Receptor Dimerization. *Cancer Cell* 18(6): 630–640. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.11.001
- Upadhyaya, M; Kluwe, L; Spurlock, G; Monem, B; Majounie, E; Mantripragada, K; Ruggieri, M; Chuzhanova, N; Evans, DG; Ferner, R; Thomas, N; Guha, A; Mautner, VF (2008): Germline and somatic NF1 gene mutation spectrum in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs). *Hum. Mutat.* 29(1): 74-82
- Vermorken, JB; Peyrade, F; Krauss, J; Mesía, R; Remenar, E; Gauler, TC; et al. (2013): Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). In: *Annals of Oncology* 25 (3), S. 682–688. DOI: 10.1093/annonc/mdu003.
- Videira, PA; Piteira, AR; Cabral, MG; Martins, C; Correia, M; Severino, P et al. (2011): Effects of Bevacizumab on Autocrine VEGF Stimulation in Bladder Cancer Cell Lines. *Urol Int* 86(1): 95–101. DOI/10.1159/000321905.
- Viskochil, D; Buchberg, AM; Xu, G; Cawthon, RM; Stevens, J; Wolff, RK; Culver, M; Carey, JC; Copeland, NG; Jenkins, NA; White, R; O'Connell, P (1990): Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 62(1): 187–192
- Viskochil, D (2002) Review Article: Genetics of Neurofibromatosis 1 and the NF1 Gene. *Journal of Child Neurology.* 17(8): 562–570
- Vogel, KS; Klesse, LJ; Velasco-Miguel, S; Meyers, K; Rushing, EJ; Parada, LF (1999): Mouse Tumor Model for Neurofibromatosis Type 1. *Science* 286(5447): 2176–2179
- Weis, SM; Cheresh, DA (2011): v Integrins in Angiogenesis and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1(1): a006478. DOI: 10.1101/cshperspect.a006478

- Weiss, B; Bollag, G; Shannon, K (1999): Hyperactive Ras as a therapeutic target in neurofibromatosis type 1. *American Journal Of Medical Genetics* 89(1): 14–22
- Weiss, SW, Goldblum, JR (2007): *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*. 5th Revised Edition: Mosby.
- Wilder, RL (2002): Integrin alpha V beta 3 as a target for treatment of rheumatoid arthritis and related rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 61(Suppl II): ii96-ii99
- Wong, H-K; Shimizu, A; Kirkpatrick, ND; Garkavtsev, I; Chan, AW; Di Tomaso, E et al. (2012): Merlin/NF2 Regulates Angiogenesis in Schwannomas through a Rac1/Semaphorin 3F-Dependent Mechanism. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 14(2): 84–94. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3306254/>.
- Wong, WW; Hirose, T; Scheithauer, BW; Schild, SE; Gunderson, LL (1998): Malignant peripheral nerve sheath tumor: analysis of treatment outcome. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 42(2): 351–360
- Woodruff, JM (1999): Pathology of tumors of the peripheral nerve sheath in type 1 neurofibromatosis. *American Journal Of Medical Genetics*. 89(1): 23–30
- Wu, F; Zhou, Q; Yang, J; Duan, G; Ou, J-J; Zhang, R et al. (2011): Endogenous Axon Guiding Chemorepulsant Semaphorin-3F Inhibits the Growth and Metastasis of Colorectal Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 17(9): 2702–2711. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0839.
- Xiang, RH; Davalos, AR; Hensel, CH; Zhou, XJ; Tse, C; Naylor, SL (2002): Semaphorin 3F Gene from Human 3p21.3 Suppresses Tumor Formation in Nude Mice. *Cancer Research* 62(9): 2637–2643
- Xiang, RH; Hensel, CH; Garcia, DK; Carlson, HC; Kok, K; Daly, MC; Kerkbacher, K; van den Berg, A; Veldhuis, P; Buys, CH; Naylor, SL (1996): Isolation of the Human Semaphorin III/F Gene (SEMA3F) at Chromosome 3p21, a Region Deleted in Lung Cancer. *Genomics* 32(1): 39–48
- Xu, G; O'Connell, P; Viskochil, D; Cawthon, R; Robertson, M; Culver, M.; Dunn, D; Stevens, J; Gesteland, R; White, R; Weiss, R (1990): The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 62(3): 599–608.
- Xu, Y; Li Yuan, L; Mak, J; Pardanaud, L; Caunt, M; Kasman, I; Larrivée, B (2011): Neuropilin-2 mediates VEGF-C–induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *J. Cell Biol.* 188(1): 115–130
- Yang, JT; Rayburn, H; Hynes, RO (1993): Embryonic mesodermal defects in $\alpha 5$ integrin-deficient mice. *Development* 119(4): 1093–1105
- Yuan, L; Moyon, D; Pardanaud, L; Bréant, C; Karkkainen, MJ; Alitalo, K; Eichmann, A (2002): Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 129 (20): 4797-4806

Zhang, K; Chen, JF (2012): The regulation of integrin function by divalent cations. *Celladhesion* 6(1): 20–29

Zhang, X; Lawler, J (2007): Thrombospondin-based antiangiogenic therapy. *Microvascular Research* 74(2-3): 90–99. DOI: 10.1016/j.mvr.2007.04.007

Zou, C; Smith, KD; Liu, J; Lahat, G; Myers, S; Wang, WL; Zhang, W; McCutcheon, IE; Slopis, JM; Lazar, AJ; Pollock, RE; Lev, D (2009) Clinical, Pathological, and Molecular Variables Predictive of Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor Outcome. *Ann Surg* 8(5): 1157-68

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne die Gelegenheit nutzen, den Menschen zu danken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dr. Leticia Oliveira-Ferrer, die mich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen und mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotionsarbeit anzufertigen. Ich möchte mich herzlich für die freundliche und vertrauensvolle Zusammenarbeit und vor allem für ihre Unterstützung und Hilfestellung bedanken, auf die ich während der gesamten Zeit meiner Promotion stets zählen konnte.

An dieser Stelle möchte ich auch ganz besonders Herrn Prof. Dr. Viktor-Felix Mautner danken. Durch die Kooperation mit ihm wurde diese Promotionsarbeit erst ermöglicht. Durch seine Unterstützung und fachliche Kompetenz hat er maßgeblich zum Gelingen der Promotion beigetragen.

Ebenfalls herzlich danken möchte ich auch Herrn Priv.-Doz. Dr. Gunther Schuch, durch dessen Ideen und Engagement das Projekt um meine Promotionsarbeit erst entstanden ist.

Auch Herrn Prof. Dr. Christian Hagel möchte ich für seine Hilfsbereitschaft, seine Unterstützung und v.a. für die Bereitstellung der Gewebeprobe danken.

Desweiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Labors danken, die mir in fachlichen wie praktischen Fragen immer geduldig und kompetent weitergeholfen haben. Die Zusammenarbeit mit Ihnen habe ich stets sehr geschätzt. An dieser Stelle möchte ich besonders meine Kommilitonin und liebe Freundin Anna Lena Görtz hervorheben, die mich nicht nur durch mein ganzes Studium begleitet hat, sondern mit der ich auch die Zeit im Labor geteilt habe und deren Freundschaft mir damals wie heute viel bedeutet.

Auch möchte ich meiner sehr guten Freundin Patrizia Seyfert danken. Gerade in der Schreibphase hat sie mich immer wieder motivieren können, auch nach der Arbeit und am Wochenende an dieser Arbeit weiterzuarbeiten.

Ganz besonders danken möchte ich auch meinen Eltern, die mir das Medizinstudium erst ermöglicht haben und die mich mit ihrer Liebe mein ganzes Leben unterstützten. Ich möchte ihnen dafür danken, dass sie immer an mich glauben. Auch meinem Bruder Arne möchte ich ganz herzlich für seine Unterstützung danken, dafür, dass er mir immer mit Rat und Anregung zur Seite steht. Und nicht zuletzt möchte ich Nils danken, der mit seiner Liebe und unendlich viel Geduld immer für mich da ist. Ohne seine Hilfe würde ich vermutlich noch immer an irgendwelchen Formatierungen sitzen.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: