

Aus der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen

Abteilung Neurologie

Mit Schwerpunkt neurovaskuläre Erkrankungen

**TGF- β vermittelte Modulation humaner mikrovaskulärer
Perizyten in der Gliom-assoziierten Destruktion der
Blut-Hirn-Schranke**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Schumacher, Leonie**

2022

Aus der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen

Abteilung Neurologie

Mit Schwerpunkt neurovaskuläre Erkrankungen

**TGF- β vermittelte Modulation humaner mikrovaskulärer
Perizyten in der Gliom-assoziierten Destruktion der
Blut-Hirn-Schranke**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Schumacher, Leonie**

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professorin Dr. U. Naumann
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. A. Wizenmann

Tag der Disputation: 28.01.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Glioblastom	1
1.1.1 Epidemiologie	2
1.1.2 Diagnose und Klinik	2
1.1.3 Therapie.....	3
1.2 Das Zytokin Transforming growth factor β (TGF-β)	5
1.2.1 TGF- β im Glioblastom	6
1.3 Die Bluthirnschranke	8
1.3.1 Funktion der Bluthirnschranke.....	8
1.3.2 Aufbau der Bluthirnschranke	8
1.3.2.1 Endothelzellen	8
1.3.2.2 Interzellularkontakte.....	9
1.3.2.3 Neurovaskuläre Einheit.....	10
1.4 Blutgefäße im Glioblastom	12
1.4.1 Mechanismen der Neovaskularisierung	12
1.4.2 Intratumorale Perizyten	14
1.4.3 Die Bluthirnschranke im Glioblastom.....	15
1.5 Die Epithelial-Mesenchymale Transition	16
1.5.1 EMT-Prozesse im Glioblastom	17
1.6 Tumormetabolismus	18
1.7 Fragestellung	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Chemikalien	22
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.4 Medien und Lösungen	23
2.1.5 Kits	24
2.1.6 Antikörper	24
2.1.7 Zelllinien.....	24
2.1.8 Viren	25
2.1.9 Software.....	25
2.2 Allgemeine Methoden	25
2.2.1 Kultivierung von Zellen	25
2.2.2 Passage und Konservierung von Zellen.....	27
2.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Zelldichte	27
2.2.4 Gewinnung von Gliomzell-Überständen (G-SN)	27
2.2.5 Elektronenmikroskopie	28
2.2.6 Virusinfektion	28
2.3 Spezielle Methoden	29

2.3.1	Präparation primärer mikrovaskulärer Endothelzellen des Schweines	29
2.3.2	Immunhistochemie.....	31
2.3.3	Das in vitro BHS-Modell	32
2.3.4	Kultivierungsbedingungen im BHS-Modell	33
2.3.5	Evaluation der BHS-Integrität	35
2.3.6	Messungen des Zellmetabolismus mit dem Seahorse XF96 Analyzer	35
2.3.6.1	Seahorse XF Real-Time ATP-Rate Assay.....	39
2.3.6.2	Seahorse XF Cell Mito Stress Test.....	41
2.4	Statistik	43
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Etablierung des in vitro BHS-Modells.....	45
3.1.1	Präparation und Charakterisierung primärer mikrovaskulärer Endothelzellen des Hausschweins	45
3.1.2	Charakterisierung primärer humaner Astrozyten	46
3.1.3	Integrität der in vitro BHS unter basalen Bedingungen	47
3.2	Der Einfluss modulierender Faktoren auf die Integrität der BHS <i>in vitro</i>	48
3.2.1	TGF- β	48
3.2.2	SLUG-Expression	52
3.2.3	Gliomzell-konditioniertes Medium.....	52
3.3	Der Einfluss modulierender Faktoren auf die metabolische Aktivität von Perizyten.....	54
3.3.1	TGF- β	54
3.3.1.1	Gesamt-ATP Produktionsrate	54
3.3.1.2	Verhältnis der ATP-Produktionswege	55
3.3.1.3	ECAR	56
3.3.1.4	Veränderungen der mitochondrialen Leistung.....	57
3.3.2	SLUG-Expression	59
3.3.3	Gliomzell-konditioniertes Medium (G-SN)	59
3.3.3.1	Gesamt-ATP Produktionsrate und Verhältnis der Produktionswege.....	60
3.3.3.2	Veränderungen der mitochondrialen Leistung.....	62
4	Diskussion	65
4.1	Perizyten steigern die BHS-Integrität.....	65
4.1.1	Kokultivierung mit Astrozyten erhöht die Integrität der BHS	66
4.1.2	TGF- β vermindert die Integrität der BHS.....	67
4.1.3	Gliomzell-sezernierte Faktoren vermindern die Integrität der BHS	69
4.2	Limitationen des in-vitro Modells.....	70
4.3	TGF-β und Gliomzell-Überstände modulieren metabolische Prozesse in Perizyten	72
4.3.1	TGF- β steigert die ATP-Produktion in Perizyten	72
4.3.1.1	Funktionelle Bedeutung der gesteigerten ATP-Produktion in Perizyten	74
4.3.2	Vergleich zwischen TGF- β und Gliomzell-Überstand.....	75
4.3.3	Gliomzell-Überstand ändert den mitochondrialen Stoffwechsel in HBVP	76
4.3.3.1	In HBVP wird die respiratorische Reservekapazität durch Gliomzell-Überstand reduziert	76
4.3.3.2	In HBVP wird das „Protonen Leak“ durch Gliomzell-Überstände reduziert....	78
4.4	Klinische Relevanz für zukünftige Therapieansätze	80
5	Zusammenfassung	83

6	Summary.....	85
7	Literaturverzeichnis:.....	86
8	Erklärung zum Eigenanteil	97
9	Danksagung.....	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Workflow zur Erstellung des <i>in vitro</i> BHS-Modells _____	34
Abbildung 2: Workflow der Seahorse Assays _____	38
Abbildung 3: Sauerstoffverbrauch _____	43
Abbildung 4: ZO-1 Färbung _____	46
Abbildung 5: GFAP Färbung _____	47
Abbildung 6: Einfluss von HBVP auf die BHS-Integrität _____	48
Abbildung 7: Einfluss von TGF- β auf die BHS-Integrität <i>in vitro</i> _____	49
Abbildung 8: Konzentrationsabhängigkeit der TGF- β Wirkung auf die BHS <i>in vitro</i> _____	50
Abbildung 9: Spezifität der TGF- β Wirkung im <i>in vitro</i> BHS-Modell _____	50
Abbildung 10: Gefrierbruch-Elektronenmikroskopische Darstellung von TJ in PBMVEC im <i>in vitro</i> BHS-Modell _____	51
Abbildung 11: Einfluss der perizytären SLUG Expression auf die BHS-Integrität <i>in vitro</i> _____	52
Abbildung 12: Einfluss von Astrozyten und Gliomzellen auf die BHS-Integrität <i>in vitro</i> _____	53
Abbildung 13: TGF- β vermittelter Einfluss von Gliomzellen auf die BHS-Integrität <i>in vitro</i> _____	54
Abbildung 14: TGF- β vermittelte Änderung der Gesamt-ATP Produktion in HBVP _____	55
Abbildung 15: TGF- β vermittelte Änderungen des ATP-Rate-Index in HBVP _____	56
Abbildung 16: TGF- β -vermittelte Änderung der extrazellulären Ansäuerung (ECAR) _____	57
Abbildung 17: OCR-Verlauf während des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests _____	58
Abbildung 18: Änderung der Gesamt-ATP Produktion in SLUG-überexprimierenden HBVP _____	59
Abbildung 19: TGF- β bzw. Gliom-Überstand (G-SN)-vermittelte Änderung der Gesamt-ATP Produktion in HBVP _____	60
Abbildung 20: TGF- β bzw. Gliom-Überstand (G-SN)-vermittelte Änderung der extrazellulären Ansäuerung (ECAR) in HBVP _____	61
Abbildung 21: TGF- β bzw. Gliom-Überstand (G-SN)-vermittelte Änderung des ATP-Rate-Index in HBVP _____	61
Abbildung 22 : TGF- β bzw. Gliom-Überstand (G-SN)- vermittelte Änderungen der basalen Respiration in HBVP _____	62
Abbildung 23: TGF- β bzw. Gliom-Überstand (G-SN)- vermittelte Änderungen der maximalen Respiration in HBVP _____	63
Abbildung 24: TGF- β bzw. Gliom-Überstand (G-SN)-vermittelte Änderungen der respiratorischen Reservekapazität (SRC) in HBVP _____	63
Abbildung 25: TGF- β bzw. Gliom-Überstand (G-SN)-vermittelte Änderungen des „Protonen Leak“ in HBVP _____	64
Abbildung 26: Modell des Einflusses von Gliomzellen auf Perizyten via TGF- β _____	80

Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgemeinschaft
AJ	Adhering junction
Ang	Angiopoietin
ATP	Adenosine triphosphate
BHS	Bluthirnschranke
BMVEC	Brain microvascular endothelial cells
BSA	Bovine serum albumin
CAF	Cancer associated fibroblast
CT	Computed tomography
CXCR4	CXC-motiv-chemokinreceptor 4
DAPI	4,6 Diamidin-2-phenylindol
ddH₂O	Bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
ECAR	Extracellular acidification rate
ECM	Extracellular matrix
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EM	Endothelial cells medium
EMT	Epithelial-Mesenchymal transition
FCCP	Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FCS	Fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
FN	Fibronectin
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green fluorescent protein
GJ	Gap junction
GLUT 1	Glucose transporter 1
G-SN	Gliomacell supernatant
GSC	Glioma stem cell
HBVP	Human brain vascular pericytes
HIF	Hypoxia-inducible factor
HRP	Horseradish peroxidase
IDH	Isocitrate dehydrogenase
IFU	Infectious unit
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MMP	Matrix metalloproteinase
MOI	Multiplicity of infection

MRT	Magnetic resonance tomography
NG-2	Neuron-glia-2
NHA	Normal human astrocytes
NVU	Neurovascular unit
OCR	Oxygen consumption rate
OS	Overall survival
OxPhos	Oxidative phosphorylation
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBMVEC	Porcine brain microvascular endothelial cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PER	Proton efflux rate
PFA	Paraformaldehyd
PFS	Progression-free survival
PGS	Pericytes growth supplement
PI3K	Phosphoinositid-3 kinase
PKC	Proteinkinase-C
PLL	Poly-L Lysin
RFU	Relative fluorescence unit
rh	recombinant
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SEM	Standard error of the mean
SN	Supernatant, Überstand
SRC	Spare respiratory capacity
TBS	Tris-buffered Sialine
TEER	Transendothelial electrical resistance
TGF-β	Transforming growth factor- β
Tie	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains
TJ	Tight junction
TMZ	Temozolomide
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zonula Occludens
α-SMA	Alpha-smooth muscle actin

1 Einleitung

1.1 Das Glioblastom

Gliome stellen eine heterogene Gruppe primärer Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) dar, die insgesamt ca. 80% aller malignen hirneigenen Tumoren ausmacht (Kruchko et al., 2018). Einzelne Entitäten können mit Hilfe von Diagnosekriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) näher klassifiziert werden, wobei seit 2016 für die Zuordnung zu einem bestimmten Gliomsubtyp neben histologischen Befunden auch molekulare Marker berücksichtigt werden. Die Neuerung soll eine höhere diagnostische Genauigkeit, verbunden mit einer besseren Prognoseabschätzung, ermöglichen sowie zur gezielteren Therapieauswahl beitragen (Louis et al., 2016).

Mit einem Anteil von 57% bilden die hochmalignen Glioblastome (glioblastoma multiforme, GBM) die größte und gleichzeitig die bösartigste Subgruppe der Gliome (Kruchko et al., 2018). In der WHO Klassifikation von 2016 wird anhand von Mutationen im Isozitat-Dehydrogenase-Gen (IDH-Gen) eine weitere Unterteilung vorgenommen. Man unterscheidet GBM mit dem IDH-Wildtyp, die 90 % aller GBM ausmachen, und GBM mit Mutationen im IDH1 oder IDH2-Gen. Dabei gilt die IDH-Mutation zum einen als diagnostischer Marker für sekundäre GBM, welche aus geringgradig malignen Gliomen entstehen, und außerdem als prognostischer Marker, da IDH-Mutationen bei GBM-Patienten mit einem signifikant längeren Gesamtüberleben assoziiert sind (Louis et al., 2016). Neben der Bestimmung der Tumorentität wird jedem hirneigenen Tumor ein von der WHO definierter Malignitätsgrad (I - IV) zugeordnet. Als Grundlage dienen die histopathologischen Kriterien Zelldichte, Differenzierungsstatus, mitotische Aktivität und Kernpleomorphie sowie das Ausmaß an Gefäßproliferaten und Gewebnekrose (Weerakkody, 2016). GBM werden wegen des aggressiven biologischen Verhaltens stets dem höchsten WHO Malignitätsgrad IV zugeordnet. Zentrale Eigenschaft des GBM sind sein schnelles und diffus infiltratives Wachstum, eine extrem hohe Therapieresistenz, hochgradige

Immunsuppression (Nduom et al., 2015) sowie eine immense, unstrukturierte Tumor-Vaskularisierung (Das und Marsden, 2013).

1.1.1 *Epidemiologie*

In Europa weist das GBM eine Inzidenz von 6 pro 100 000 Einwohner mit einem Verhältnis von 6:4 zwischen Männern und Frauen auf (Hofer et al., 2019). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren, wobei Patienten an einem sekundären GBM im Durchschnitt deutlich früher erkranken (Davis, 2016). Das mittlere Überleben liegt, bei maximalen therapeutischen Interventionen, momentan bei etwa 2 Jahren (Stupp et al., 2017).

1.1.2 *Diagnose und Klinik*

Die initialen Symptome von Betroffenen sind abhängig von der Lokalisation und Größe des Tumors, weshalb Patienten sich oft mit unspezifischen Beschwerden wie Kopfschmerzen, fokale neurologischen Ausfällen oder Krampfanfällen präsentieren (Raghunathan et al., 2015). Der erste diagnostische Schritt ist meist eine Bildgebung mittels Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT). Bildmorphologisch zeigen sich unregelmäßige Raumforderungen mit Kontrastmittelanreicherung im MRT sowie mit zentral nekrotischen Arealen und Einblutungen. Zudem fallen häufig massive Umgebungsödeme auf (Raghunathan et al., 2015). Zusätzlich zum radiologischen Befund muss die Diagnose GBM immer mit einer Gewebeprobe, welche meist im Rahmen der operativen Tumorresektion gewonnen und anschließend histologisch und molekular untersucht wird, gesichert werden. Zu den von Urbańska et al. (2014) in ihrem Review zusammengestellten histologischen GBM-Charakteristika zählen die ausgeprägte Neovaskularisierung des Tumors mit Bildung morphologisch atypischer Gefäße, nekrotische Areale und palisadenartig aufgereihte Gliomzellen (Pseudopalisaden), außerdem eine hohe mitotische Aktivität, massive Kernpleomorphie sowie Hyperchromasie. Mutationen finden sich in sekundären GBM oft im Signalweg des Tumorsuppressors p53 oder im IDH1 oder -2 Gen. Primäre GBM zeigen hingegen häufig einen kompletten Verlust des langen

Armes des Chromosom 10 (Loss of Heterozygosity LOH10q) oder genetische Alterationen im Epidermal Growth Factor Receptor-Gen (EGFR-Gen) und im Phosphatase and Tensin homolog-Gen (PTEN-Gen) (Davis, 2016).

1.1.3 *Therapie*

Das aktuelle Therapieregime für neu diagnostizierte GBM ist multimodal mit einer chirurgischen Resektion als Grundlage. Hierbei wird eine möglichst vollständige Entfernung des Tumors angestrebt, was durch das invasive Tumorstadium und die Lage in funktionell bedeutenden Gehirnregionen erschwert wird und meist nicht durchführbar ist. Der Erfolg der chirurgischen Therapie ist eingeschränkt, da generell infiltrativ in das gesunde Hirngewebe migrierte Gliomzellen zurückbleiben und später zum Rezidiv führen (Davis, 2016). Postoperativ folgt eine kombinierte Radiochemotherapie. Diese hat sich seit 2005 nach einer großen Studie von Stupp et al. (2005), die 573 Patienten einschloss, etabliert und erfolgt seither nach dem sogenannten Stupp-Protokoll. Standardsubstanz für die Chemotherapie ist das alkylierende Zytostatikum Temozolomid (Temodal, TMZ), das Blut-Hirn-Schranke (BHS)-gängig ist. Die Bestrahlung wird meist als fraktionierte Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 60 Gy durchgeführt (Stupp et al., 2005). 2015 haben tumor-treating fields (TTF) die Zulassung für die initiale Tumorthherapie durch die US-amerikanische Zulassungsbehörde (Food and Drug Administration, FDA) erhalten. Die erzeugten schwachen elektrischen Felder induzieren Apoptose oder hemmen die Proliferation in Tumorzellen (Davis, 2016).

Trotz maximaler therapeutischer Intervention erleiden über 70% der Patienten innerhalb eines Jahres ein Rezidiv (Stupp et al., 2005). Das Therapieversagen wird in erster Linie auf invasiv wachsende Tumorzellen, die enorme intratumorale Heterogenität sowie therapieresistente Gliomzellen mit Stammzelleigenschaften (glioma stem cells, GSC) zurückgeführt (Sattiraju und Mintz, 2019). Zum Therapieversagen kann es zudem durch zu geringe Wirkstoffspiegel am Wirkort kommen, da ein ausreichender Medikamententransport durch die im ZNS vorhandene BHS und durch die malformierten Tumorblutgefäße

Einleitung

erschwert wird (Noch et al., 2018). Mit einer medikamentösen Therapie, die im Rezidiv meist aus Nitrosoharnstoffen wie Lomustin oder einer erneuten TMZ-Therapie besteht, wird lediglich bei 20% der Patienten ein 6 monatiges progressionsfreies Überleben (PFS) erreicht (Weller et al., 2017). Die infauste Prognose und das schlechte Therapieansprechen zeigen auf, dass andere Therapieansätze erforderlich sind, wobei ein Ziel aktueller Forschungen die Normalisierung der desorganisierten Blutgefäße ist (Martin et al., 2019). Unter anderem wurde der monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin), gerichtet gegen den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), in der Therapie von GBM-Patienten getestet. Diese Therapie verhindert die Bindung von Gliomsezerniertem VEGF an seinen Rezeptor auf Endothelzellen und verringert derart angiogene Stimuli. Einige Studien sprechen dafür, dass durch die Bevacizumab-Therapie für einen bestimmten Zeitraum eine Normalisierung der Gefäßstrukturen sowie eine gleichmäßigere Blutversorgung mit Verringerung der progressionsfördernden Hypoxie erzielt werden (Yang et al., 2018, Tamura et al., 2016). Es wird vermutet, dass dadurch eine wirksamere Chemotherapie (Martin et al., 2019) und eine erhöhte Effektivität der Bestrahlung ermöglicht werden (Scaringi et al., 2013). Dass die vaskuläre Normalisierung unter antiangiogener Therapie auch eine Reduktion des Umgebungsödems bewirkt, zeigten Batchelor et al. (2007) in einer klinischen Studie. Der Effekt einer Bevacizumab-Therapie ist allerdings nur vorübergehend, so dass es in der Regel nach wenigen Monaten zum Tumorprogress kommt (Li et al., 2017). Der Therapieresistenz liegen alternative angiogene Mechanismen, welche im Tumor aktiviert werden, sowie ein vermehrt infiltratives Wachstums zugrunde (Lucio-Eterovic et al., 2009, Lu and Bergers, 2013, Falchetti et al., 2019, Rubenstein et al., 2000). Gliomzellen zeigen dieses invasive Verhalten zum einen, um hypoxischen Bedingungen im Tumorgewebe, wie sie durch längere anti-angiogene Therapie verursacht werden, zu entkommen. Zum anderen gibt es Anhaltspunkte für Hypoxie-unabhängige, direkt VEGF-vermittelte autokrine Signalwege in Tumorzellen, deren medikamentöse Blockade Invasion stimuliert (Lucio-Eterovic et al., 2009, Lu and Bergers, 2013). Die Ergebnisse mehrerer klinischer Studien, in denen Bevacizumab oder ein anderer antiangiogener

Wirkstoff fast immer in Kombination mit einem erprobten Zytostatikum zum Einsatz kam, ergaben, dass durch Avastin zwar eine Verlängerung des PFS, nicht aber des Gesamtüberlebens (OS) von GBM-Patienten erreicht wird (Khasraw et al., 2014). Weitere aktuelle Forschungsansätze fokussieren darauf, alternative, VEGF-unabhängige angiogene Signalwege zu identifizieren (Scholz et al., 2016, Kochar et al., 2018). Dabei lag die Funktion von Endothelzellen in der Neoangiogenese bislang im Fokus. Aktuell wird beabsichtigt, ein besseres Verständnis für die Rolle der Perizyten an der Entstehung dysfunktionaler Tumorgefäße zu erhalten, um neue therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren (Sattiraju and Mintz, 2019).

1.2 Das Zytokin Transforming growth factor β (TGF- β)

TGF- β ist ein multifunktionales Zytokin, das in die Regulation von Zellproliferation und Differenzierung involviert ist, indirekt aber auch die Beschaffenheit der Extrazellulärmatrix (ECM) modifiziert. TGF- β übernimmt in vielen physiologischen Prozessen wie der Embryogenese, der Stammzellendifferenzierung, der Wundheilung und der Immunmodulation wichtige Funktionen. Darüber hinaus kommt TGF- β im Rahmen pathologischer Vorgänge, insbesondere bei Entzündungen, Fibrosierungsprozessen und der Krebsentstehung, eine entscheidende Rolle zu (Massagué, 2012).

Der TGF- β Subgruppe werden drei Isoformen (TGF β -1, -2 und -3) zugeordnet, welche Sequenzhomologien von 60-80% aufweisen (Patil et al., 2011). TGF- β wird nach intrazellulären proteolytischen Modifikationen vorwiegend in latenter Form sezerniert. Im sogenannten small latent TGF- β complex (SLC) wird die aktive Bindungsstelle durch das nicht-kovalent gebundene latency-associated protein (LAP) verdeckt, wodurch Interaktionen mit den Rezeptoren zunächst verhindert werden. Meistens bindet zusätzlich ein latent TGF- β binding protein (LTBP) an den SLC, wodurch sich der sogenannte large latent TGF- β complex (LCC) formt. Dadurch, dass LTBP in der ECM eingebettet ist, wird TGF- β im Gewebe verankert (Horiguchi et al., 2012). Die Verfügbarkeit von aktivem TGF- β hängt entscheidend von TGF- β -Aktivatoren ab, die im Interstitium

gebundenes, latentes TGF- β aktivieren. Zu diesen Aktivatoren gehören reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Proteasen, im GBM häufig Furin, Integrin-vermittelte Signalwege sowie mechanischer Stress (Horiguchi et al., 2012; Leitlein et al., 2001). In aktivem Zustand bindet TGF- β an den TGF- β Rezeptorkomplex, der aus zwei Untereinheiten des Typs 1 (TGF- β R1) und zwei Untereinheiten des Typs 2 (TGF- β R2) besteht. Die Aktivierung des TGF- β -Signalwegs erfolgt über Bindung von TGF- β an TGF- β R2, eine Serin-Threonin-Kinase, welche daraufhin TGF- β R1 phosphoryliert (Han et al., 2015). Zur weiteren Signalübermittlung werden SMAD 2 und 3 phosphoryliert, die im Komplex mit SMAD 4 in den Zellkern wandern und dort die Expression TGF- β -responsiver Zielgene regulieren. In diesen Prozess sind weitere Kofaktoren einbezogen, die die TGF- β -Wirkung situationsabhängig modulieren (Massagué, 2012). Neben diesem kanonischen Weg kann TGF- β Zellfunktionen auch über diverse nicht-kanonische Signalwege und über Interaktionen mit Mitogen-aktivierten Kinasen (MAPK) und dem PI3K/AKT Signalweg steuern (Massagué, 2012).

TGF- β Effekte sind extrem pleiotrop. Dabei bestimmen Zelltyp, das Mikromilieu, die Komposition der Liganden- oder der Rezeptorsubtypen auf der Zielzelle, die Präsenz oder Abwesenheit transkriptioneller Kofaktoren, aber auch die Aktivierung kanonischer und/oder nicht-kanonischer Signalwege letztendlich die Effekte von TGF- β in den Zielzellen (Massagué, 2012).

1.2.1 ***TGF- β im Glioblastom***

In nicht-neoplastischem Gewebe, speziell in Astrozyten, wirkt TGF- β in erster Linie proliferationshemmend (Platten et al., 2001). In Zellen des prämaligen Stadiums induziert TGF- β meist Apoptose, wirkt also ebenfalls überwiegend tumorsuppressiv (Han et al., 2015), wohingegen in Gliomzellen die proliferationshemmende Wirkung oft aufgehoben ist. Die Aktivierung des TGF- β Signalweges geht im GBM einher mit erhöhter Expression des Proliferationsmarkers Ki67 (Bruna et al., 2007), zudem moduliert TGF- β die Zusammensetzung des Tumorstromas. TGF- β begünstigt die Migration und Invasion von Tumorzellen unter anderem durch Aktivierung von Matrix Metalloproteasen (MMPs), welche

Einleitung

die ECM destruieren und somit invasives Wachstum erleichtern (Wick et al., 2001). Eine weitere, pro-tumorigene Eigenschaft von TGF- β ist seine immunsuppressive Wirkung. TGF- β induziert u.a. Apoptose in T- und NK-Zellen, ermöglicht die Differenzierung naiver T-Zellen hin zu immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und bewirkt das Shedding von NKG2D-Liganden auf Gliomzellen, was die Bindung an den NKG2D-Rezeptor auf natürlichen Killer (NK)-Zellen und somit ein Killing der Gliomzellen durch NK-Zellen verhindert (Wick et al., 2006; Nduom et al., 2015). In Makrophagen bewirkt TGF- β die Differenzierung hin zu tumorfördernden M2-Makrophagen (Zhang et al., 2016). Weiterhin wirkt TGF- β pro-angiogen (Yang et al., 2013; Dieterich et al., 2012) und erhält die Stammzeleigenschaften in GSC (Penuelas et al., 2009).

Überexpression sowohl von TGF- β 1 und - β 2 als auch der TGF- β -Rezeptoren wird in den meisten GBM, vor allem im Bereich proliferierender Gefäße, in Nekrosezonen sowie an der invasiven Tumorfront beobachtet (Yamada et al., 1995; Frei et al., 2015; Roy et al., 2018). Die Menge an Phospho-SMAD 2 als Marker für die Aktivierung des TGF- β -Signalweges in Gliompräparaten korrelierte dabei mit dem WHO-Malignitätsgrad sowie negativ mit dem PFS und OS (Platten et al., 2001; Bruna et al., 2007). Kjellman et al. (2000) beschrieben ebenfalls, dass die Überexpression von TGF- β im Tumormilieu mit der Malignität korrelierte. Allerdings fanden sie anstelle vermehrter SMAD-Aktivität verminderte SMAD-Level, was auf stärker aktivierte nicht-kanonische Wege im Tumor hindeutet. Roy et al. (2018) ermittelten, dass nur hohe TGF- β 1-Konzentrationen in neudiagnostizierten GBM mit einem signifikant kürzeren OS korrelierten. Klinische Studien, deren Ziel die Hemmung des TGF- β Signalwegs in Gliomen war, wurden in den vergangenen Jahren durchgeführt. Eine Phase IIb Studie mit einem intratumoral applizierten, TGF- β 2-spezifischen Antisense-Oligonukleotid (Traberdesen) zeigte im anaplastischen Astrozytom (WHO III), nicht jedoch im GBM, einen Trend hinsichtlich eines verbesserten 2-Jahres-Überlebens im Vergleich zur Standardchemotherapie (Bogdahn et al., 2011). Der Einsatz des TGF- β R1-Inhibitors Galunisertib bewirkte in einer Phase II Studie bei Patienten mit rezidivierten GBM keine Verbesserung des OS (Brandes et al., 2016).

1.3 Die Bluthirnschranke

1.3.1 *Funktion der Bluthirnschranke*

Die BHS, eine selektive Barriere zwischen dem Blut und dem Kompartiment des ZNS, ist eine besondere Eigenschaft kleiner ZNS-Gefäße (Blanchette und Daneman, 2015). Diese Schranke dient dazu, den Austausch von Ionen, Molekülen und Zellen exakt zu regulieren, wobei eine ausreichende Versorgung des Gehirns mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten gewährleistet wird. Außerdem wird das ZNS so vor neurotoxischen Substanzen geschützt und die Homöostase im neuronalen Gewebe auch bei systemischen Veränderungen aufrechterhalten (Helms et al., 2016). Der Transport vieler systemisch verabreichter Medikamente wird von einer intakten BHS restringiert, so dass nur ca. 2% der Medikamente im ZNS therapeutisch wirksame Spiegel erreichen, was die Therapie von ZNS-Erkrankungen erschwert (Cardoso et al., 2010).

1.3.2 *Aufbau der Bluthirnschranke*

1.3.2.1 *Endothelzellen*

Die anatomische Grundlage der BHS wird von den Endothelzellen der kleinen ZNS-Gefäße (Brain microvascular endothelial cells, BMVEC) durch Ausbildung von *tight junctions* (TJ), dichten Interzellularkontakten zwischen benachbarten Endothelzellen, gebildet (Serlin et al., 2015). Diese Spezialisierung der BMVEC bewirkt, dass die Dichte der Gehirnkapillaren bis zu 50-100mal höher ist als diejenige peripherer Blutgefäße (Cardoso et al., 2010). BMVEC weisen keine Fenestrierungen und im Vergleich zu peripheren Endothelzellen sehr wenige Pinozytosevesikel auf (De Boer und Gaillard, 2006), wodurch die transzelluläre Permeabilität für nicht membrangängige, hydrophile Stoffe gering ist. Der Stofftransport über den parazellulären Weg ist durch dichte Interzellularkontakte ebenfalls streng restringiert. Damit das ZNS dennoch mit nicht membrangängigen Stoffen aus dem Blut versorgt werden kann, exprimieren BMVEC spezielle Rezeptoren und Transporter. In der Gefäßwand befinden sich beispielsweise GLUT-1 Transporter für den Glukosetransport und L-System Carrier für neutrale

Aminosäuren (Abbott, 2002). Lipophile Stoffe können die physikalische Barriere der Endothelzellschicht auf Grund ihrer Membrangängigkeit häufig überwinden. Um einen nicht regulierten Übertritt von Stoffen in das ZNS zu verhindern, verfügen BMVEC über eine große Anzahl an Adenosintriphosphat-(ATP)-abhängigen Effluxpumpen für den Rücktransport membrangängiger Substanzen. Die Liganden, zu denen auch viele Medikamente zählen, werden gegen ihren Konzentrationsgradienten zurück auf die extrazelluläre Blutseite befördert (Oberoi et al., 2016). Da BMVEC viele körpereigene und körperfremde Stoffe, wie z.B. Medikamente, vor dem Eintritt ins ZNS enzymatisch um- oder abbauen, trägt die sogenannte metabolische Barriere ebenso zum Schutz vor neurotoxischen Substanzen bei (Deli et al., 2005).

1.3.2.2 Interzellularkontakte

Den größten Beitrag zum hohen parazellulären Widerstand der BHS leisten TJ. Diese Proteinkomplexe sorgen als Interzellularkontakte zwischen Endothelzellen sowohl für die Zell-Zell-Adhäsion als auch für die Restriktion des parazellulären Stofftransportes und bewirken als Diffusionshindernisse zwischen der apikalen und basolateralen Membrankomponente einen polaren Aufbau der Endothelzellen. TJ sind zudem in die Steuerung von Zellproliferation und Differenzierung involviert, da sie an der Zellmembran bidirektional Signale weiterleiten (Terry et al., 2010; Cardoso et al., 2010). Am molekularen Aufbau der TJ sind diverse Transmembran- und Intrazellular-Proteine verschiedener Proteinfamilien beteiligt. Strukturell essenziell für die Barriere sind vor allem Claudine. Diese integralen Membranproteine binden an Claudine benachbarter Endothelzellen und bilden Dimere, wodurch sie den Zellzwischenraum abdichten und parazelluläre Diffusion verhindern (Zhao et al., 2018). Das Verteilungsmuster der Claudin-Subtypen, die gewebespezifisch exprimiert werden, hat Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften der TJ in unterschiedlichen Geweben. Mit einer regelhaften Ausbildung der BHS werden besonders Claudin 1 und 5 assoziiert (Cardoso et al., 2010).

Transmembranäre Occludine und *junctional adhesion molecules* (JAMs) übernehmen hauptsächlich regulatorische Funktionen. Sie wirken nicht selbst als Diffusionsbarrieren, sind aber wichtig für die Funktionalität der TJ (Persidsky et al., 2006). In TJ der kleinen ZNS-Gefäße ist die Menge an Occludinen, die hier mit der Dichtheit der BHS korreliert, im Vergleich zu peripheren Blutgefäßen deutlich höher (Cardoso et al., 2010). Essentiell für die Verankerung dieser Transmembranproteine im intrazellulären Aktin-Zytoskelett sind zytosplasmatische Bausteine der TJ. Dazu zählen das Protein Zonula occludens 1 (ZO-1), das in jeder TJ zu finden ist, sowie weitere ZO-Proteine wie *cingulin*, AF-6 und 7H6. Diese Proteine können viele intrazelluläre Signalmoleküle rekrutieren und binden, wodurch sie eine wichtige Rolle bei der Signalübermittlung einnehmen, mit der die Zelle auf extrazelluläre Reize reagiert (Cardoso et al., 2010).

1.3.2.3 Neurovaskuläre Einheit

Die BHS ist keine starre Struktur, sondern Teil eines dynamischen und vielfältig regulierten Gefüges, dessen Eigenschaften durch ZNS-eigene und systemische Einflussfaktoren bestimmt werden (Cardoso et al., 2010). Dieses System aus verschiedenen Zellen und Bausteinen der ECM wird in seiner Gesamtheit als Neurovaskuläre Einheit (NVU) bezeichnet (Blanchette und Daneman, 2015). Eine zelluläre NVU-Komponente sind **Perizyten**, multifunktionelle Zellen, die sich ubiquitär in Kapillaren, präkapillären Arteriolen und postkapillären Venolen in engem Kontakt zu den Endothelzellen befinden (Sweeney et al., 2016). Die Identifikation von Perizyten anhand von Markerproteinen ist problematisch, da Perizyten diverse Funktionen innehaben, demnach unterschiedlichste Expressionsmuster ausweisen und es somit kein allgemeines Markerprotein für alle Perizytenklassen gibt. α -smooth muscle actin (α -SMA), Desmin, Neural/Glial antigen (NG-2), der Platelete-derived growth factor –Rezeptor (PDGF-R), der Regulator of G-Protein signaling 5 (RGS-5) und weitere Proteine gelten in der Fachliteratur derzeit als Perizytenmarker. Diese werden von Perizyten abhängig vom jeweiligen Gewebe und Differenzierungsstatus, daher nicht ubiquitär und zeitlich konstant, exprimiert (Gerhardt und Betsholtz, 2003). Die oben

genannten Markerproteine sind nicht exklusiv Perizyten-spezifisch, was eine Abgrenzung von Perizyten zu anderen perivaskulären Zellen erschwert (Li, 2018). Die höchste Perizyten-dichte findet sich in ZNS-Gefäßen, in denen das Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen bei 1:3 bis 1:1 liegt. Die große Anzahl an Perizyten ist vermutlich von Bedeutung für die Induktion der Schrankeigenschaften in BMVEC (Blanchette und Daneman, 2015). Parallel zu ihrer Funktion bei der Bildung und Aufrechterhaltung der BHS sind Perizyten essenziell, um eine korrekte Reifung neu gebildeter Gefäße zu gewährleisten (Gerhardt und Betsholtz, 2003). Die Signalübermittlung zwischen Perizyten und Endothelzellen ist bidirektional und erfolgt in direktem Zellkontakt über TJ, *adherens junctions* (AJ) und *gap junctions* (GJ), sowie parakrin über sezernierte Faktoren (Gerhardt und Betsholtz, 2003). Dabei basiert die Rekrutierung von Perizyten zu immature Gefäße hauptsächlich auf dem PDGF/PDGF-R Signalweg. Von Perizyten sezerniertes TGF- β verringert die Permeabilität der Endothelzellschicht maßgeblich, wohingegen von Perizyten sezerniertes VEGF eine erhöhte Gefäßwandpermeabilität bewirkt, in den Endothelzellen als anti-apoptotisches Signal wirkt und Angiogenese stimuliert (Dohgu et al., 2005). Anti-apoptotisch wirkt in Endothelzellen ebenfalls das von Perizyten gebildete Angiopoietin-1 (Ang-1), welches an den Tie-Rezeptor auf Endothelzellen bindet (Sweeney et al., 2016). Perizyten spielen darüber hinaus eine Rolle in der Immunmodulation (Guerra et al., 2018), besitzen Stammzeleigenschaften und können in verschiedene neuronale und mesenchymale Zellen differenzieren (Dore-Duffy et al., 2006).

Ein weiterer Bestandteil der NVU sind **Astrozyten**, die mit ihren Endfüßen bis zu 99% der abluminalen Blutgefäßoberfläche ummanteln (Helms et al., 2016) und hauptsächlich über lösliche Faktoren mit den Endothelzellen kommunizieren (Cardoso et al., 2010). Astrozyten sind bedeutend für die kontinuierliche Aufrechterhaltung der BHS und können durch kurzfristige Modulationen auch schnelle Anpassungen der BHS an Milieuveränderungen im ZNS gewährleisten. Weiterhin sind Astrozyten entscheidend beteiligt an der Regulation des neuronalen Milieus im ZNS, da sie die extrazellulären Ionenkonzentrationen konstant halten und Neurotransmitter abbauen.

Ein weiterer zentraler Baustein der NVU ist **die Basalmembran**, die Endothelzellen abluminal anliegt und auch die Perizyten bedeckt. Sie setzt sich zusammen aus den Strukturproteinen Kollagen und Elastin, Signalmolekülen und Proteoglykanen, die vermutlich sowohl von den Endothelzellen als auch von Perizyten und Astrozyten sezerniert werden (Carvey et al., 2009; Cardoso et al., 2010). Die Verankerung der Endothelzellen in der Basalmembran sowie eine stetige Signalübermittlung zwischen Endothelzellen und der ECM ist Voraussetzung für eine intakte BHS, da der Kontaktverlust in einem Funktionsverlust der TJs resultiert. Aktive MMPs degradieren extrazelluläre Proteine und zerstören dadurch die Basalmembran (Carvey et al., 2009).

1.4 Blutgefäße im Glioblastom

1.4.1 *Mechanismen der Neovaskularisierung*

Ein Merkmal aller GBM ist eine ausgeprägte und meist abnormale Vaskularisierung, zu der es durch die Aktivierung unterschiedlicher proangiogener Mechanismen im Tumormilieu kommt (Jain et al., 2007). Die Gefäßneubildung wird im Tumor stimuliert, um während der schnellen Progression eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zu gewährleisten. In Tierversuchen wurde Neovaskularisierung allerdings erst etwa drei Wochen nach Tumorzellimplantation beobachtet, in der Zeitspanne zuvor sicherte sich der schnell wachsende Tumor seine Blutversorgung über die *Kooption* präexistenter Gefäße. Dabei lagern sich maligne Zellen in Zellnestern an bestehende Gefäße an (Zagzag et al., 2000). Caspani et al. (2014) zeigten, dass Tumorzellen während der Kooption Membranausstülpungen, sogenannte Flektopodien, ausbildeten und über diese mit Gefäßwandzellen in Verbindung traten. Gefäßwandzellen kooptierter Gefäße exprimieren den Wachstumsfaktor Ang-2, der an den Tie 2 Rezeptor auf Endothelzellen bindet und dort zu einer gesteigerten Apoptoserate führt. Im Verlauf kommt es dadurch zur Gefäßdestabilisierung (Hardee und Zagzag, 2012). Zagzag et al. (2000) beobachteten, dass durch diesen Zusammenbruch präexistenter Gefäße im Tumor hypoxische und letztendlich sogar nekrotische Areale entstehen. Hypoxie wiederum stimuliert

Einleitung

Angiogenese, das Aussprossen neuer Gefäßäste, durch Steigerung der Proliferation aber auch durch Erhöhung der Motilität von Endothelzellen. Angiogenese wird insbesondere durch das Zytokin VEGF aktiviert, das von den meisten GBM, insbesondere bei Hypoxie, überexprimiert wird und proliferationsfördernd, anti-apoptotisch und permeabilitätssteigernd auf Endothelzellen wirkt (Jain et al., 2007; Fukumura et al., 2001). Starker Einfluss von TGF- β , welches VEGF-Expression beeinflusst, verstärkt die Angiogenese-induzierende Wirkung der Tumorzellen (Yang et al., 2013). In angiogene Prozesse involviert ist auch der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor (CXCR) 4, der über Bindung des *stromal cell-derived factors-1* (SDF-1 α) aktiviert wird. CXCR4 wird unter hypoxischen Bedingungen sowie unter dem Einfluss von VEGF in GBM-Zellen und intratumoralen Gefäßwandzellen hochreguliert (Zagzag et al., 2006). In einem Feedback-Loop kann über CXCR4 Aktivierung wiederum der VEGF Signalweg stimuliert werden (Liang et al., 2007). Unter den neu geformten Tumorblutgefäßen gibt es regelhaft ausgereifte und funktionelle Kapillaren vom „klassischen Typ“, andererseits zeigen sich im Tumorgewebe viele unregelmäßig geformte Gefäße, die glomeruläre Gefäßknäuel oder girlandenartige Formationen bilden und in ihrer Funktion insuffizient sind. Birner et al. (2003) postulierten, dass weniger das Maß an Neovaskularisation im Gesamten als vielmehr das Überwiegen dysfunktionaler Gefäße prognoserelevant sei. In einem von der Angiogenese distinkten Prozess, der Vaskulogenese, migrieren aus dem Knochenmark stammende Endothelzell-Vorläufer ins Tumoreal und formieren dort neue Gefäße (Hardee und Zagzag, 2012). Die Rekrutierung erfolgt chemotaktisch insbesondere durch SDF-1 α , VEGF und Ang-2 (Hardee und Zagzag, 2012). In einigen Tumorentitäten, so auch im GBM, können gefäßähnliche Strukturen, welche oft mit Erythrozyten angefüllt sind, auch von Tumorzellen selbst gebildet werden (*vascular mimikry*). Yue und Chen (2005) detektierten in zwei von 15 untersuchten GBM-Proben Strukturen des *vascular mimikry*, die teils aus Tumor- und teils aus Endothelzellen bestanden. Es wird postuliert, dass die Transdifferenzierung von GSC zu Endothelzellen ebenfalls zur Neovaskularisierung beiträgt. Ricci-Vitiani et al. (2010) zeigten, dass GSCs *in vivo* und *in vitro* zu Endothelzellen transdifferenzierten. Wang et al. (2010) fanden eine

Population maligner Zellen, die sowohl tumorale Stammzellmarker als auch endotheliale Progenitormarker exprimierten und identifizierten eine Subgruppe endothelialer Zellen, welche dieselben Mutationen aufwiesen wie die malignen Zellen. Trotz teils überschießender Gefäßneubildung nimmt die Gefäßdichte im GBM, bedingt durch das schnelle Tumorwachstum, im Verlauf der Tumorprogression ab (Hendriksen et al., 2009). Deshalb und weil ein geregelter Blutfluss durch die vorhandenen neugebildeten Gefäße unstrukturiert und somit insuffizient ist, kommt es zur Entstehung hypoxischer und letztendlich nekrotischer Areale im Tumor. Neben der Angiogeneseinduktion bewirkt Hypoxie eine gesteigerte Motilität von Gliomzellen. Diese migrieren weg von hypoxischen Arealen und invadieren in das umgebende normoxische Hirnparenchym (Gilkes et al., 2014). Zudem wird, durch die gestörte Gefäßstruktur im Tumoraerial, ein suffizienter Medikamententransport nur in den Tumorrandbereich, nicht aber ins Zentrum, ermöglicht (Stylianopoulos et al., 2018).

1.4.2 *Intratumorale Perizyten*

Für die Maturation neu formierter Gefäße sind Perizyten, welche über von Endothelzellen sezerniertes PDGF chemotaktisch rekrutiert werden, essenziell (Gerhardt und Betsholtz, 2003). Die Ummantelung der Gefäße durch Perizyten ist in Tumoren oft beeinträchtigt. Elektronenmikroskopisch wurden im Tumoraerial zwar gefäßassoziierte Perizyten detektiert, ihre räumliche Anordnung war jedoch abnormal, wobei viele Perizyten auf der luminalen Gefäßwandseite lokalisiert oder von den Endothelzellen durch eine verdickte Basalmembran getrennt waren (Fischmann, 2004; Mustafa et al., 2013). Svensson et al. (2015) beschrieben, dass tumorassoziierte Perizyten im GBM sowie darüber hinaus bis in die tumorfreie Hemisphäre oft in aktiviertem Status vorlagen. Diese aktivierten Perizyten migrierten vermehrt. Da aktivierte Perizyten umliegender Gehirnareale in die Tumorregion rekrutiert wurden, postulierten Svensson et al. (2015), dass hirneigene Perizyten einen Großteil der intratumoralen Perizyten ausmachen. Alternativ können vermutlich auch Perizyten-Vorläuferzellen, sowohl aus dem Knochenmark (Du et al., 2008) als auch aus anderen Regionen des Körpers (Li, 2018), in das Tumorgewebe einwandern. Demgegenüber

beschrieben Cheng et al. (2013), die die Transdifferenzierung von GSC zu Perizyten untersuchten, neoplastische Zellen als Hauptquelle für intratumorale Perizyten beschrieben. Als weitere mögliche Quelle für aktivierte Perizyten im GBM wurde die Endothelial-perizytäre Transition (EPT) beschrieben. Unter TGF- β Einfluss transdifferenzierten präexistente Endothelzellen möglicherweise in aktivierte Perizyten (Piera-Velazquez et al., 2011). Eine erhöhte Proliferationsrate bereits vorhandener Perizyten könnte ebenso als Quelle für intratumorale Perizyten fungieren und eine Ursache für deren Aktivierung sein. Die Datenlage über die Herkunft und den Mechanismus der Aktivierung intratumoraler Perizyten ist bis heute uneinheitlich, ebenso die Informationen über die Rolle von Perizyten im Rahmen der Tumorinitiation und Progression. Tumore mit geringerer Perizytenzahl waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant kleiner und die Angiogenese in diesen Tumoren war weniger ausgeprägt (Li, 2018). Im Einklang hiermit zeigten Valdor et al. (2017), dass Perizyten das Tumorstadium *in vivo* stimulierten, wobei hier die immunsuppressive Wirkung als Hauptgrund genannt wurde. Zhou et al. (2017) fanden in humanen GBM-Gewebeproben keine direkte Korrelation zwischen Perizytenzahl und dem OS der Patienten. Allerdings korrelierte die intratumorale Perizytenzahl negativ mit dem OS derjenigen GBM-Patienten, die eine Chemotherapie erhielten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Perizyten-Fehlfunktionen eine effektive Tumorthherapie erschweren.

1.4.3 **Die Bluthirnschranke im Glioblastom**

Nahezu alle GBM weisen sowohl Bereiche mit intakter BHS als auch weite Areale mit destrukturierter Schrankenfunktion auf (Oberoi et al., 2016). Trotz deutlich erhöhter Permeabilität besitzen viele GBM-Gefäße, im Vergleich zu Blutgefäßen peripherer Tumoren, noch gewisse Schrankenfunktionen (Jain et al., 2007). Speziell Blutgefäße der invasiven, randständigen Tumoreareale verfügen häufig über eine funktionsfähige Gefäßwand, weshalb der suffiziente Transport von Tumorthapeutika zu den invasiv wachsenden malignen Zellen durch die intakte BHS erschwert wird (Wang et al., 2019; Oberoi et al., 2016). Ein bildmorphologisches Korrelat für den Zusammenbruch der BHS in zentraleren

Tumorbereichen ist die starke Kontrastmittelanreicherung im Tumorgewebe (Oberoi et al., 2016). Durch den Integritätsverlust der Gefäßwand treten große Flüssigkeitsmengen in den Extravasalraum aus und der interstitielle Gewebedruck im Tumor steigt, was zu Flüssigkeitsverschiebungen in das umgebende Gewebe führt. Die entstehenden Ödeme stellen ein schwerwiegendes klinisches Problem dar, da durch die raumfordernde Wirkung gesundes Gehirngewebe verdrängt und neurologische Ausfallsymptome hervorgerufen werden können (Jain et al., 2007). Außerdem fördern die großen Flüssigkeitsbewegungen das invasive Wachsen von Tumorzellen und Metastasierung (Cornelison et al., 2018). Dem Zusammenbruch der BHS in den Tumorgefäßen liegen unter anderem molekulare Veränderungen in Endothelzellen zu Grunde, die die Bildung funktionsfähiger TJs stören (Wolburg et al., 2003; Liebner et al., 2000; Ishihara et al., 2008; Wolburg et al., 2012). Neben der gestörten parazellulären Diffusionsbarriere durch defekte TJs fanden Shivers et al. (1984) transzelluläre Poren aus Transzytosevesikeln, die für eine erhöhte Permeation des Tracers Horseradish peroxidase (HRP) ins Tumorgewebe verantwortlich gemacht wurden.

1.5 Die Epithelial-Mesenchymale Transition

Ursprünglich wurde die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) als ein Vorgang bezeichnet, bei dem während der Embryonalentwicklung Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften übergehen. Dabei verlieren Epithelzellen ihre ursprünglichen Eigenschaften wie z.B. ihre Polarität, bestehende Zellkontakte werden aufgelöst, die Zellen beginnen zu migrieren, passieren die Basalmembran und sind derart in der Lage, in umliegende Gewebe einzuwandern. Im Zielgebiet können diese Zellen dann erneut in Epithelzellen, aber auch in andere Zelltypen differenzieren. Mittlerweile ist bekannt, dass der EMT auch in pathogenen Prozessen eine wichtige Rolle zukommt, wobei abhängig vom Kontext drei EMT-Klassen unterschieden werden (Kalluri und Weinberg, 2009). Die EMT des Typs 1 ist essenziell in der Embryonalentwicklung, während der EMT Typ 2 bei Heilungsprozessen beschrieben wurde (Kalluri und Weinberg, 2009). Viele maligne Zellen epithelialer Herkunft, aber

auch Tumoren nicht-epithelialer Herkunft, bilden während der Progression einen zunehmend mesenchymalen Phänotyp aus. Die Krebs-assoziierte Form der EMT wird als EMT Typ 3 bezeichnet. Die Aktivierung des EMT-Programms führt zu Veränderungen im biologisch-funktionellen Verhalten maligner Zellen. Am Beispiel von Mamma-Karzinomen wurde gezeigt, dass diese Zellen Basis der Metastasierung sind, da Zellen nach abgelaufener EMT ein invasives Verhalten zeigen (Waldmeier et al., 2012). Des Weiteren wurde beschrieben, dass EMT-Prozesse zur Ausbildung und Aufrechterhaltung von Stammzelleigenschaften in Tumorzellen (Mani et al., 2008) und zur Entwicklung von Therapieresistenzen beitragen (Iser et al. (2017)). An der Initiierung von EMT-Prozessen sind, je nach Typ und Kontext, diverse Aktivierungsfaktoren beteiligt. TGF- β ist ein solcher Faktor, der sowohl über den SMAD-abhängigen kanonischen Weg (Mahabir et al., 2013) als auch über nicht-kanonische Signalkaskaden das EMT-Programm aktivieren kann (Waldmeier et al., 2012). Hypoxie ist ein weiterer Induktor der EMT, einerseits indirekt über Hochregulation von TGF- β , andererseits via HIF1 α , welches als Transkriptionsfaktor die Expression EMT-assoziiierter Transkriptionsfaktoren, wie z.B. die transkriptionellen Repressoren der SNAI-Gruppe (SNAI1/Snail und SNAI2/SLUG) sowie TWIST-1, TWIST-2 und ZEB-1 und -2, induziert (Zhang et al., 2015; Sánchez-Tilló et al., 2012).

1.5.1 ***EMT-Prozesse im Glioblastom***

Aufgrund des invasiven Charakters des GBM wurde vermutet, dass EMT-ähnliche Prozesse auch in diesem Tumor nicht-epithelialen Ursprungs stattfinden. Die Forschergruppe um Mahabir et al. (2013) prägte in diesem Zusammenhang den Begriff der glial-mesenchymalen Transition (GMT). Im GBM-Gewebe zeigte sich eine erhöhte mRNA-Expression von SNAI1 (Goos, 2015), SNAI2 (Yang et al., 2010; Goos, 2015) und TWIST (Elias et al., 2005), wobei nur Elias et al. (2005) konkret Gliomzellen als Hauptquelle der EMT-assoziierten Proteine ausmachten. Joseph et al. (2014) identifizierten TGF- β als Induktor einer ZEB-1-abhängigen mesenchymalen Differenzierung von GBM-Zellen. Elias et al. (2005) fanden, dass die Expression der EMT-Faktoren mit dem Malignitätsgrad dieser Tumore korreliert. Diverse Studien zeigten, dass

eine erhöhte Expression von EMT-Proteinen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu gesteigerter Tumorzellmotilität führte (Han et al., 2011; Yang et al., 2010; Mikheeva et al., 2010). In einem kollaborativen Projekt mit dem Neurologischen Institut, Edinger Institut der Universität Frankfurt/ Main Frankfurt identifizierte unser Labor 2018 intratumorale perivaskuläre Zellen als Hauptquelle erhöhter EMT-Protein-Expression, wohingegen Gliomzellen selbst keine oder eine nur eine geringgradige Expression von EMT-Faktoren aufwiesen (Mader et al., 2018). Bislang unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass zumindest *in vitro* die Expression von SLUG und TWIST in humanen, primären, mikrovaskulären Hirn-Perizyten (HBVP) durch TGF- β hochreguliert wurde, die Zellen dadurch motiler wurden und ihre Morphologie drastisch änderten. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss EMT-ähnlicher Prozesse in HBVP auf die BHS-Integrität sowie auf metabolische Prozesse untersucht.

1.6 Tumormetabolismus

Für die Produktion von ATP, der Hauptenergiequelle einer Zelle, kommen zwei wichtige Wege in Frage: Zum einen die Glykolyse, bei der ein Glukosemolekül über mehrere enzymatische Schritte zu zwei Pyruvatmolekülen abgebaut wird. Dieser Prozess liefert über Substratkettenphosphorylierung netto zwei ATP pro Glukosemolekül. Zum anderen die oxidative Phosphorylierung (OxPhos) in den Mitochondrien, die pro Glukosemolekül 32 ATP liefert. Hierbei wird durch Substratoxidierung in den Komplexen I bis IV der Atmungskette Energie gewonnen, um Protonen aus dem Mitochondrieninnenraum in den Intermembranraum zu pumpen, wodurch ein elektrochemisches Potential über der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut wird. Im Komplex V, der ATP-Synthase, wird die Energie der zurückfließenden Protonen genutzt, um ADP zum höherenergetischen ATP zu phosphorylieren.

Änderungen der metabolischen Aktivität sind eines mehrerer Tumorcharakteristika (Hanahan und Weinberg (2011)). Während die meisten nicht-neoplastischen Zellen einen Großteil ihres Energiebedarfs über den mitochondrialen Weg der OxPhos decken, nutzen Tumorzellen hauptsächlich die aerobe Glykolyse zur Energiegewinnung (Warburg-Effekt) (Potter et al., 2016). Die Effizienz der

Einleitung

ATP-Synthese und somit Energiegewinnung via Glykolyse ist sehr viel geringer, jedoch ist die Glykolyse für Tumorzellen dennoch vorteilhaft, da glykolytische Zwischenprodukte für viele anabole Stoffwechselwege im Rahmen der Zellteilung benötigt werden (Lunt und Vander Heiden, 2011). Glykolytisch erzeugtes ATP steht Zellen schnell zur Verfügung, wodurch eine sofortige Anpassung an ein sich veränderndes Mikromilieu im Tumor möglich ist (Epstein et al., 2017). Im Gegensatz zur exklusiv mitochondrialen OxPhos findet Glykolyse auch im Zytoplasma kleiner Zellausläufer statt, wo sie Energie für migratorische Prozesse direkt am Ort der Zellmotilität liefert (De Bock et al., 2013). Die glykolytische Aktivität von Tumorzellen korrelierte positiv mit dem Maß an Migration (Yizhak et al., 2014; Shiraishi et al., 2015).

Auch in Stromazellen kommt es durch einen veränderten pH-Wert, hohe Laktatkonzentrationen, Hypoxie und von Tumorzellen sezernierte Botenstoffe zu Modulationen im Stoffwechsel (Ocaña et al., 2019). Dabei gehen Stromazellen oft eine metabolische Symbiose mit Tumorzellen ein und unterstützen auf diesem Weg die Tumorprogression (Wolpaw und Dang, 2018). In intratumoralen Endothelzellen wurde eine höhere glykolytische Aktivität beobachtet als in Endothelzellen des umgebenden Normalgewebes. Die Glykolyserate war insbesondere in den schnell migrierenden „*tip cells*“ an der Spitze neu gebildeter Gefäßaussprossungen erhöht (Fitzgerald et al., 2018). Glykolyseinhibition in Endothelzellen verhinderte die Ausbildung von Zellausläufern, welche für die Migration und folglich für die Angiogenese essenziell sind (De Bock et al., 2013). Hemmung der Glykolyse in intratumoralen Endothelzellen verbesserte die Reifung neu gebildeter Blutgefäße und folglich die Perfusion (Cantelmo et al., 2016). In tumorassoziierte Fibroblasten (CAF) erhöhte tumor-sezerniertes TGF- β die Glykolyseraten und steigerte Mitophagie, Autophagie sowie oxidativen Stress (Guido et al., 2012). Inwieweit der Metabolismus intratumoraler Perizyten verändert ist, ist bislang kaum erforscht.

Einen Anhaltspunkt dafür, dass auch der perizytäre Metabolismus Einfluss auf die Gefäßstrukturen haben könnte, liefern Untersuchungen zur pulmonalen arteriellen Hypertonie. Bei diesem Krankheitsbild wurde eine verringerte mitochondriale Energiegewinnung und erhöhte Glykolyse in Perizyten beobachtet,

gefolgt von fehlerhaften Endothelzell-Perizyten-Interaktionen und letztendlich der Bildung abnormer Gefäßstrukturen (Yuan et al., 2016). Mitochondriale Dysfunktionen, Mitochondrienfragmentierung und starker oxidativer Stress spielen auch bei dem Gefäßverlust im Rahmen einer diabetischen Retinopathie eine Rolle (Trudeau et al., 2011; Shah et al., 2013).

1.7 Fragestellung

Die ausgeprägte Neovaskularisierung ist ein wichtiges Merkmal des GBM, das zu dessen maligner Progression beiträgt. Durch die irreguläre Struktur und die extrem durchlässige Gefäßwand sind viele Tumorblutgefäße dysfunktional und ein geregelter Blutfluss ist meist nicht möglich (Jain et al., 2007). Trotz Gefäßproliferation kommt es daher zu hypoxischen Tumorarealen und mangelndem Medikamententransport, was wegen der progressionsfördernden Wirkung verhindert werden muss (Hendriksen et al., 2009; Stylianopoulos et al., 2018). Da in einigen Arbeiten gezeigt wurde, dass die für eine dichte BHS essenziellen Perizyten im GBM Veränderungen aufweisen (Fischmann, 2004; Mustafa et al., 2013), kann vermutet werden, dass Perizyten-Dysfunktionen an der abnormen Vaskularisierung und dem Integritätsverlust der intratumoralen BHS ursächlich beteiligt sind. Möglicherweise sind die Perizyten-Dysfunktionen bedingt durch die starke Expression der EMT-Faktoren SLUG und SNAI, welche von tumorassoziierten Perizyten im GBM, nicht aber von Perizyten in gesundem Gewebe exprimiert werden (Mader et al., 2018). *In vitro* werden die EMT-Faktoren durch TGF- β in humanen Perizyten des Gehirns (HBVP) hochreguliert. In dieser Arbeit wird daher postuliert, dass Gliomzellen, via TGF- β -Sekretion und EMT-Induktion, Perizyten-Funktionen modulieren und so den Integritätsverlust der BHS in tumorassoziierten Gefäßen induzieren. Um den Einfluss von Gliomzellen, TGF- β sowie des EMT-Proteins SLUG auf die BHS zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein *in vitro* BHS-Modell, bestehend aus microvaskulären Hirnendothelzellen des Schweines (PBMVEC) und HBVP, eingesetzt. Veränderungen in der Integrität der BHS wurden mittels Messung der transendothelialen elektrischen Resistenz (TEER) ermittelt.

Einleitung

In einzelnen Arbeitsschritten sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Moduliert TGF- β in HBVP deren Funktionen und hat damit Einfluss auf die BHS-Integrität?
- Inwieweit sind mögliche TGF- β Effekte in HBVP SLUG vermittelt?
- Modulieren Gliomzell-sezernierte Faktoren in HBVP deren Funktion und haben damit Einfluss auf die BHS-Integrität ?

Eine bereits bekannte funktionelle Auswirkung der TGF- β vermittelten SLUG-Überexpression in Perizyten ist deren gesteigerte migratorische Aktivität. Durch erschwerte Endothelzell-Perizyten-Interaktion könnte diese instabile Gefäßwände mitbedingen. Da Migration häufig mit gesteigerter glykolytischer Energiegewinnung verbunden ist (Fitzgerald et al., 2018; Yizhak et al., 2014), wird in dieser Arbeit postuliert, dass TGF- β via SLUG-Expression in HBVP deren glykolytische Aktivität steigert und auf diese Weise Perizytenmigration begünstigt. Da in der Literatur beschrieben ist, dass Perizyten-Dysfunktionen in der diabetischen Retinopathie und der pulmonalen arteriellen Hypertonie teilweise auf Mitochondrienschädigung zurückzuführen sind (Trudeau et al., 2011; Yuan et al., 2016), wird zudem die mitochondriale Leistung der HBVP unter dem Einfluss von TGF- β und Gliomzell-Überständen evaluiert. Um die metabolische Aktivität lebender Perizyten unter basalen Bedingungen sowie nach Stressinduktion zu messen, wird in dieser Arbeit die Seahorse Technologie verwendet.

Folgende Aufgabenstellungen sollen dabei bearbeitet werden:

- Bewirkt TGF- β in HBVP Änderungen der metabolische Aktivität und sind diese Änderungen SLUG vermittelt?
- Bewirkt die Kultivierung von HBVP in Gliom-konditioniertem Medium Änderungen in der metabolischen Aktivität dieser Zellen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Name	Bezugsquelle
0% CO ₂ -Inkubator	BINDER, Tuttlingen, Deutschland
40 ml Homogenisator, Glas	Schott, Mainz, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	SANYO, München, Deutschland
EVOM-G	WPI, Sarasota, USA
Feinwaage	KERN und SOHN, Balingen-Frommern, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan 2	ZEISS, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop	NIKON, Düsseldorf, Deutschland
Multimode Reader, Tri Star LB 942	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
pH-Meter	Schott, Mainz, Deutschland
Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzer	Agilent, Santa Clara, USA
Sterilwerkbank HERAsafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
STX2	WPI, Sarasota, USA,
Tischzentrifuge, Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge, Multifuge 3 S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Name	Bezugsquelle
4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Antimycin A	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Bovine serum albumine, BSA	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Cacodylat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Calciumchlorid CaCl ₂	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, FCCP	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Collagenase 2	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Collagenase/Dispase	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
D-Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid, DMSO	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNase 1	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Fibronectin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Glutaraldehyd	Bezogen vom pathologischen Institut der Universität Tübingen, Abt. Elektronenmikroskopie
Hepes	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid KCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kollagen 1	VWR, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid MgCl₂	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid, NaCl	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Oligomycin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Puromycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Pyruvat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Rekombinantes TGF-β1	Pepro Tech, Rocky Hill NJ, USA
Rekombinantes TGF-β2	Pepro Tech, Rocky Hill NJ, USA
Rotenon	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Sodium Bicarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sodium Heparin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Sodium Pyruvat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Triton-X-100	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Bezugsquelle
Seahorse XFe96 cell culture microplate	Agilent, Santa Clara, USA
Seahorse XFe96 sensor cartridge	Agilent, Santa Clara, USA
Sterilfilter 0,4 µm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ThinCerts, PET-Membran, 1µm Poren	Greiner BioOne, Kremsmünster, Österreich

2.1.4 Medien und Lösungen

Name	Bezugsquelle
Astrozytenmedium, AGM bullet kit	Lonza, Basel, Deutschland
DMEM F12	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), high glucose	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's PBS (phosphate buffered saline)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
EBM-2	Lonza, Basel, Deutschland

Material und Methoden

Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	Kavi Devraj, Neurologisches Institut, Edinger Institut, Universität Frankfurt/Main
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific Sigma Aldrich, St. Louis, USA
MCDB-131 Medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin / Streptomycin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Pericytes Growth Supplement (PGS)	ScienCell, Carlsbad, USA
Perizytenmedium PM	ScienCell, Carlsbad, USA
Seahorse Calibrant	Agilent, Santa Clara, USA
Seahorse XF Basismedium, DMEM basiert	Agilent, Santa Clara, USA
Seahorse XF DMEM Medium, pH7,4, without phenolred	Agilent, Santa Clara, USA

2.1.5 Kits

Name	Bezugsquelle
DAB staining kit	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

2.1.6 Antikörper

Nummer	Beschreibung	Bezugsquelle
61-7300	Rabbit polyclonal Anti ZO-1	Invitrogen (Zur Verfügung gestellt vom pathologischen Institut der Universität Tübingen, Abteilung Elektronenmikroskopie)
C19G7	Rabbit Anti SLUG	Cell signaling, Danvers, USA
MA5-23795	TGF-β 1,2,3 monoclonal (1D11)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Sc-2357	Mouse polyclonal anti rabbit HRP	Santa Cruz, Dallas, USA
sc-6170	Goat polyclonal Anti GFAP	Santa Cruz, Dallas, USA

2.1.7 Zelllinien

Name	Typ	Bezugsquelle
HBVP	Humane zerebrale Perizyten	ScienCell, Carlsbad, USA
HCMEC/D3	Immortalisierte Endothelzelllinie	Cornell University, Ithaca, USA
LN-308	humane Glioblastomzelllinie	N. de Tribolet, Lousanne, Schweiz
LN-319	humane Glioblastomzelllinie	M.Hegi, Lousanne, Schweiz
LNT-229	humane Glioblastomzelllinie	N. de Tribolet, Lousanne, Schweiz

Material und Methoden

NHA	humane Astrozyten	Lonza, Walkersville, USA
PBMVEC	Primäre mikrovaskuläre Gehirnendothelzellen vom Schwein	Eigene Herstellung
SV-GA	Immortalisierte humane Astrozyten	Walter Atwood, Brown University, USA
T98G	humane Glioblastomzelllinie	N. de Tribolet, Lousanne, Schweiz

2.1.8 *Viren*

Virus	Präparationsdatum	IFU/μl	Bezugsquelle
Ad-CMV-EGFP	10/2013	$3,3 * 10^7$	Eigene Herstellung
Ad-CMV-SLUG-EGFP	12/2010	$3,7 * 10^6$	Eigene Herstellung

2.1.9 *Software*

Produkt	Funktion	Anbieter
Edraw (Testversion)	Graphikprogramm	Wondershare Technology Co, Shenzhen, China
Excel	Datenverarbeitung	Microsoft
GraphPad Prism 5	Statistik- und Graphiksoftware	GraphPad Software
Seahorse Wave Desktop Software	Seahorse Datenauswertung	Agilent, Santa Clara, USA
SPSS	Statistiksoftware	IBM, New York, USA
yEd-Graph Editor	Graphikprogramm	yWorks GmbH, Tübingen, Deutschland

2.2 Allgemeine Methoden

2.2.1 *Kultivierung von Zellen*

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ gesättigter Atmosphäre kultiviert. Jegliche Arbeiten an den Zellkulturen wurden so keimarm wie möglich unter der Sterilbank durchgeführt.

Alle **Gliomzelllinien** wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM), supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) kultiviert.

Primäre porcine Endothelzellen (PBMVEC) wurden für die Versuchsdurchführung in Passage 1 verwendet, um eine Dedifferenzierung weitestgehend zu vermeiden. PBMVEC wurden in Fibronectin (FN; $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$) gecoateten Zellkulturflaschen kultiviert. Hierzu wurde eine FN-Stammlösung von $0,5\text{mg}/\text{ml}$ in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) erstellt, steril filtriert und in PBS entsprechend verdünnt. Das Coating erfolgte für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur (RT), anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen. Endothelzellen wurden in komplettiertem Endothelzellmedium (EM; MCDB-131, 20% FCS, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ endothelial cell growth supplement (ECGS), 1% P/S, 2mM L-Glutamin, 0,01% Heparin, 0,01 g/l Na-Bicarbonat) kultiviert. Um während Behandlungsperioden den Einfluss von im FCS enthaltenen Wachstumsfaktoren zu vermeiden, wurden PBMVEC während Behandlungen in serumfreiem Medium (ohne FCS/ Heparin/ Bicarbonat) kultiviert.

Zur Supplementierung wurden dem serumfreien Medium 1% pericyte growth supplements (PGS) zugegeben. PGS (ScienCell, USA) enthält nach Herstellerangaben Apo-Transferrin, Insulin, Epidermal growth factor (EGF), Fibroblast growth factor (FGF), Insulin-like growth factor (IGF-1) und Hydrocortison.

Perizyten (human brain vascular pericytes, HBVP) wurden für Versuche bis zur Passage 8 verwendet. HBVP wurden auf Poly-L Lysin (PLL; $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in PBS) gecoateten Oberflächen kultiviert. Das Coating erfolgte bei RT für mindestens eine Stunde. Bevor die Zellen ausgesät wurden, wurde die Oberfläche zweimal mit PBS gewaschen. HBVP wurden in Perizyten-Vollmedium kultiviert (PM; 2% FCS; 1% PGS, 1% P/S). Für eine Kultivierung unter Serumentzug wurden zum Medium nur PGS und P/S zugegeben.

Immortalisierte **Astrozyten (SV-GA)** wurden in DMEM (10% FCS, 1% P/S) und isolierte **primäre humane Astrozyten (NHA)** in Astrozytenmedium (DMEM/HamsF12, 2 % FCS, 1% P/S, 25 mM HEPES) kultiviert.

2.2.2 **Passage und Konservierung von Zellen**

Das Passagieren der Zellen definiert ein Ausdünnen einer Kultur. Das Ablösen der konfluenten Zellen erfolgt durch Waschen mit PBS und anschließende Zugabe von Trypsin-EDTA für 2-3 min bei RT. Um adhärente Zellen mechanisch zu lösen, wurden die Kulturflaschen kräftig gegen die Handfläche geklopft. Die losgelösten Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen, verdünnt, erneut ausgesät und weiterkultiviert.

Um Zellen einzufrieren, wurden sie in gleicher Weise abgelöst und in neuem Medium, supplementiert mit 5-10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), aufgenommen, im McFrosty langsam auf -80°C abgekühlt und anschließend bei -145°C gelagert.

2.2.3 **Bestimmung der Zellzahl und Zelldichte**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zunächst abgelöst, in Medium aufgenommen und in eine Neubauer-Zählkammer überführt.

Für die Beurteilung der Zelldichte in adhärennten Kulturen wurden diese mit Kristallviolett gefärbt. Hierzu wurde das Medium abgezogen, Kristallviolett für 5 min bei RT zu den Zellen gegeben und im Anschluss zweimal mit Wasser gespült. Angefärbte Zellen konnten danach unter dem Mikroskop gezählt werden oder die Farbintensität wurde photometrisch bestimmt, indem der Farbstoff in Ethanol (EtOH)-Zitrat (0,1 M Na-Citrat) gelöst und die Absorption bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen wurde.

2.2.4 **Gewinnung von Gliomzell-Überständen (G-SN)**

Für die Gewinnung von G-SN wurden je 800 000 Gliomzellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät und für 12-24 Stunden kultiviert. Danach wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in jedes Well 1,5 ml serumfreies Medium pipettiert, wobei die Wahl des serumfreien Mediums von der Zellart abhing, welche im Folgenden mit den Überständen behandelt

wurde. Nach 48h wurde der SN vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und von residualen Zellfragmenten durch Zentrifugation (5 min, 3500 rpm) befreit.

2.2.5 **Elektronenmikroskopie**

Zur strukturellen Betrachtung der TJ wurden in Zusammenarbeit mit dem elektronenmikroskopischen Labor der Pathologie (PD Dr. Petra Fallier-Becker) am Universitätsklinikum Tübingen Gefrierbruchanalysen der PBMVEC vorgenommen.

Die Endothelzellen wurden mit Trypsin und durch leichtes Kratzen mit einer 1 ml Pipettenspitze von den Membraninserts gelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 100µl DMEM mit auf die Inserts gegeben, die Zellsuspension einige Male auf- und abpipettiert und in ein 2ml Eppendorf überführt. Die Inserts wurden ein weiteres Mal mit 100 µl Medium gespült. Die Zellen wurden bei RT (5 min, 4000 rpm) zentrifugiert, der SN verworfen und das Pellet in Glutaraldehyd über Nacht bei 4° C fixiert. Anschließend zentrifugierte man erneut (RT, 5 min, 400 rpm), verwarf den SN und nahm das Zellpellet in Cacodylatpuffer (50 mM Cacodylat pH 7,2) auf. Die bei der Gefrierbruchanalyse gewonnenen Bilder wurden rein qualitativ beurteilt, wobei für die Beurteilung der Komplexität insbesondere die Anzahl an Verzweigungen innerhalb der von den TJ gebildeten Stränge relevant war (Wolburg et al., 1994).

2.2.6 **Virusinfektion**

Alle Arbeiten mit Adenoviren und virusinfizierten Zellen erfolgten unter S2-Bedingungen.

Um SLUG in HBVP zu exprimieren, wurden die Zellen mit dem Virus Ad-CMV-SLUG-EGFP infiziert, das neben SLUG auch für das Reporterogen *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) kodiert. Als Kontrolle wurden Infektionen mit dem Virus Ad-CMV-EGFP durchgeführt. Für die Infektion wurden 800 000 HBVP in 6-Well Platten ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Die Infektion erfolgte mit 30 MOI (multiplicity of infection) des Virus. Die HBVP wurden für

mindestens fünf Stunden im virushaltigen, serumfreien Medium kultiviert, bevor dieses abgezogen und die Zellen mehrmals mit Medium gewaschen wurden, um residuales Virus zu entfernen. Anschließend wurden infizierte Zellen in entsprechendem Wachstumsmedium kultiviert.

2.3 Spezielle Methoden

2.3.1 **Präparation primärer mikrovaskulärer Endothelzellen des Schweines**

Als anatomische Leitstruktur der BHS sind Endothelzellen die Grundlage für *in vitro* BHS-Modelle. Immortalisierte Endothellinien sind häufig schlecht differenziert und zeigen gering ausgeprägte Interzellularkontakte. Deshalb ermöglicht die Verwendung primärer BMVEC eine bessere Rekonstruktion der *in vivo* Verhältnisse (Cardoso et al., 2010). BMVEC des Schweins (*Sus scrofa domesticus*, PBMVEC= porcine brain microvascular endothelial cells) stellen ein geeignetes *in vitro* Modell für Messung der BHS-Integrität dar, da sich Gefäßeigenschaften von Mensch und Schwein in wichtigen Punkten ähnlich sind und in mehreren Studien gezeigt wurde, dass mit der Kultur von PBMVEC sehr dichte Barrieren mit hohem transendothelialelem elektrischem Widerstand (TEER) erreicht werden. Insbesondere zeichnen sich PBMVEC durch gut ausgebildete TJs aus (Deli et al., 2005; Helms et al., 2016; Thomsen et al., 2015).

Primäre PBMVEC für das *in vitro* BHS-Modell wurden aus Schweinegehirnen isoliert, welche von Herrn PD Dr. Martin Schenk (Universitätsklinikum Tübingen, AG Experimentelle Chirurgie) zur Verfügung gestellt wurden. Das zur Endothelzellisolierung verwendete Protokoll stellte Prof. Kavi Devraj (Neurologisches Institut, Edinger Institut, Universität Frankfurt/Main) zur Verfügung.

Im Operationssaal der experimentellen Chirurgie des UKT wurde die Schädelkalotte des Schweines mit einer flexiblen Säge eröffnet und das freiliegende Gehirn ventral am Tractus olfactorius und kaudal am Hirnstamm durchtrennt. Danach konnte das Gehirn aus dem knöchernen Schädel entnommen werden, wobei die Dura mater *in situ* belassen wurde. Das Gehirn wurde direkt in eine

Material und Methoden

sterile Schale mit Puffer A (in PBS: 153 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1,7 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 15 mM HEPES, 0,01 g/ml BSA, pH 7,4) überführt, auf Eis gelagert und ins Labor transportiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilbank. Zur Dekontamination wurde das Gehirn für 10 min in einer 5%igen P/S-Puffer A Lösung inkubiert, bevor das Cerebellum abgetrennt und das Gehirn in seine beiden Hemisphären geteilt wurde. Jede Hemisphäre wurde in etwas Puffer A in eine Petrischale gegeben und weiterhin auf Eis gelagert. Mit einer stumpfen Pinzette erfolgte die Präparation und Abtragung der Meningen, um eine Verunreinigung mit Fibroblasten zu vermeiden. Anschließend wurde jede Hemisphäre nochmals gedrittelt, das Gewebe mit einem Skalpell grob zerkleinert, in sechs 50ml Falcon-Röhrchen überführt und pro Falcon-Röhrchen ca. 20 ml Puffer A zugegeben. Das Gehirngewebe wurde anschließend durch je zwei Auf-/Abbewegungen mit dem „loose“ und danach mit dem „tight“ Pistill im Glashomogenisator homogenisiert, zentrifugiert (5 min, 4°C, 400g) und der SN verworfen. Zu dem Gewebepellet (ca. 15 ml) gab man im Verhältnis 2:1:1 Puffer A und Kollagenase 2 (0,75% in Puffer A). Nach kräftigem Schütteln wurde das Homogenat für eine Stunde bei 37°C unter ständigem Schwenken inkubiert, erneut zentrifugiert (5 min, 400g), der SN verworfen, das Zellpellet (ca. 15 ml/ Falcon-Tube) in 35 ml sterilem BSA (25 %, in PBS) aufgenommen, durch Schütteln gut vermischt und zentrifugiert (30 min, 4°C, 2000g). Die obere fett-haltige Schicht und die darunterliegende BSA-Zone wurden mit einer Vakuumpumpe abgezogen, die Zellpellets in je 4 ml Enzymlösung (1 mg/ml Kollagenase/Dispase, 1 µg/ml DNase I in Puffer A) aufgenommen und vereint. Unter Einwirkung der Enzyme wurde das Gewebe bei 37°C unter leichtem Schütteln für 15 min inkubiert, anschließend zentrifugiert (5 min, 400g) und das Pellet in 4 ml EM resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zusammen mit 10 ml EM pro Flasche in vier 75 cm² Kollagen-gecoatete Kulturflaschen verteilt. Nach 4 bis 14 Stunden erfolgte ein Medienwechsel und die Zugabe von Puromycin (5 µg/ml). Puromycin führt zur Abtötung der meisten residualen Nicht-Endothelzellen, wohingegen Endothelzellen durch Hochregulation von P-Glykoprotein-Effluxpumpen gegen diesen toxischen Effekt geschützt sind. So wird eine Verunreinigung der Kultur mit anderen Zelltypen minimiert (Nakagawa et al., 2009).

Nach 48 h erfolgte ein weiterer Medienwechsel mit Entfernung des Puromycin. Nachdem die Endothelzellen am vierten Tag *in vitro* zu 3/4 konfluent gewachsen waren, wurden sie in FCS / 10% DMSO aufgenommen und eingefroren.

2.3.2 **Immunhistochemie**

Um die Reinheit der PBMVEC Präparation qualitativ zu überprüfen, wurde eine immunhistochemische Färbung für das TJ-assoziierte Protein ZO-1 durchgeführt, welches in Endothelzellen, nicht aber in Perizyten oder neuronalen Zellen exprimiert wird, wobei die Expressionsstärke mit Konfluenz der Zellen steigt (Li und Poznansky, 1990). Zusätzlich erfolgte die Färbung für den Astrozytenmarker *glial fibrillar acidic protein* (GFAP), um den Kontaminierungsgrad der Präparation mit Astrozyten zu evaluieren. Mit der GFAP-Färbung wurde außerdem die Reinheit der im Labor isolierten NHA evaluiert.

Hierzu wurden PBMVEC (50 000 Zellen/ Well) auf PLL-gecoateten Deckgläsern ausgesät. Zur Fixierung wurde das Medium abgezogen, die Zellen zweimal mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) gewaschen und mit Paraformaldehyd (PFA, 4%) fixiert (10 min., RT), gefolgt von drei TBS-Waschschritten. Die Membran-Permeabilisierung erfolgte mit TBS/Triton-X100 (0,1%) für 20 min bei RT. Nach erneutem Waschen mit TBS wurden die Zellen für 10 min in H₂O₂ (1% in TBS) inkubiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde für zwei Stunden mit einer 1%igen BSA-Lösung geblockt, bevor der primäre Antikörper (61-7300 Anti-ZO-1 oder sc-6170 Anti-GFAP; 1:50) in 1% BSA/TBS zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS wurde der sekundäre Antikörper (für die ZO-1-Färbung sc-2357; 1:50) zugegeben, für 1 h bei RT inkubiert und erneut gewaschen. Für ZO-1 erfolgte anschließend die Färbung mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma DAB-Kit) nach Angaben des Herstellers. Die Reaktion wurde durch Waschen mit ddH₂O gestoppt. Für die Isotypkontrolle wurden alle Schritte wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch anstelle des Primärantikörpers ein polyklonaler Rabbit IgG Antikörper verwendet. Die

Detektion von GFAP erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mittels Fotodokumentation am Zeiss Imager.Z1 Mikroskop unter Verwendung der ZEN2 Software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.3.3 *Das in vitro BHS-Modell*

Um eine schnelle Dedifferenzierung der schrankenbildenden BMVEC im *in vitro* BHS-Modell zu verhindern, werden Kokulturen mit weiteren Zellarten der NVU verwendet. Es sind Kokulturen mit Astrozyten und mit Perizyten etabliert (Deli et al., 2005; Cardoso et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden Kokulturen aus PBMVEC und HBVP etabliert, da vor allem Interaktionen von Endothelzellen und Perizyten untersucht werden sollten.

Für die Endothelzell-Perizyten-Kokulturen wurden PLL-gecoatete semipermeable Membraninserts (0,33 cm², Porengröße 1 µm) verwendet (Czupalla et al., 2014). Diese Porengröße verhindert zwar die Durchwanderung von Zellen, jedoch nicht den direkten Kontakt der Zellen über Zellfortsätze. Für das Coating der abluminalen Seite wurden die Inserts umgekehrt in 12-Well Platten gestellt und 70 µl der PLL-Lösung wurden als Tropfen auf die Insertmembran pipettiert. Um den Flüssigkeitskontakt zum Deckel zu vermeiden und ein Austrocknen der PLL-Lösung zu verhindern, wurde der Deckel um 180° gedreht und lose auf die 12-Well Platte gesetzt. Die PLL-Lösung wurde nach einstündiger Inkubation vorsichtig mit einer Pipette abgezogen, die Inserts umgedreht und in korrekter Orientierung in 24-Well Platten gehängt, welche mit 500 µl PBS befüllt waren. Die luminalen Seite wurde anschließend mit einem Tropfen (150 µl) FN gecoatet.

Die Erstellung der Kokulturen und die technische Handhabung der Inserts erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Czupalla et al. (2014). Wie in Abbildung 1 dargestellt, wurden an Tag 0 zuerst HBVP auf der abluminalen Seite der Inserts ausgesät, die umgekehrt in PBS gefüllten 12-Well Platten standen. Pro Insert wurden 3300 Perizyten in 70 µl EM als Tropfen auf die Membran gegeben. Um das Anwachsen zu gewährleisten, wurden die Perizytenkulturen für 12-24 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert, bevor der Mediumtropfen vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und die Inserts in korrekter Orientierung

in 24-Well Platten gestellt wurden, welche mit 950 µl EM befüllt waren. In das obere Kompartiment wurden zum Ausgleich des hydrostatischen Druckes 250 µl EM gegeben. Anschließend wurden Endothelzellen auf der Membranoberseite ausgesät (Tag 1), wobei pro Insert 35 000 PBMVEC in 250 µl EM ins obere Kompartiment gegeben wurden (Czupalla et al., 2014). An Tag 3 erfolgte ein Medienwechsel. Hierzu wurden neue Wells einer 24-Well Platte mit 950 µl EM befüllt und die Inserts vorsichtig überführt. Aus dem oberen Kompartiment wurden 230 µl der 250 µl abgezogen und durch frisches EM ersetzt. Die Dichtheit der Endothelzellschicht wurde ab Tag 4 mittels TEER-Messung evaluiert.

2.3.4 **Kultivierungsbedingungen im BHS-Modell**

Nach Ausbildung einer dichten Schranke erfolgte an Tag 5 im Anschluss an eine TEER-Messung die Behandlung der Perizyten mit rekombinantem, humanem TGF-β bzw. mit G-SN. Um den Einfluss exogener Wachstumsfaktoren auszuschließen, wurden die Zellen während der Behandlung in serumfreiem EM kultiviert. Für die Kultivierung in TGF-β haltigem Medium wurden je 5 ng/ml TGF-β 1 und 2 zum Medium des unteren Kompartiments addiert. Wenn im Verlauf der Arbeit von TGF-β Behandlung gesprochen wird, erfolgte die Kultivierung in der Regel in Anwesenheit gleicher Konzentrationen an TGF-β1 und 2.

Für die Kultivierung in Gliomzell-konditioniertem Medium wurden Triplekulturen etabliert, bestehend aus PBMVEC, HBVP und Gliomzellen. Als Kontrolle erfolgt die Kokultivierung mit Astrozyten (immortalisierte SV-GA Zellen bzw. primäre NHA). Dazu setzte man die Inserts an Tag 5 in Wells um, in welchen bereits für 24h 200 000 adhärente Gliomzellen bzw. Astrozyten in Vollmedium wuchsen. Als Kontrollen wurden Inserts in serumfreiem Medium kultiviert.

Direkt vor, sowie 24 bzw. 48 Stunden nach Behandlungsbeginn erfolgte die Bestimmung der Schrankenintegrität mittels TEER-Messung.

Das BHS-Modell wurde auch mit adenoviral infizierten HBVP erstellt (Abbildung 1). Die Infektion erfolgte wie in 2.2.6 beschrieben mit 30 MOI Ad-CMV-SLUG-EGFP bzw. Ad-CMV-EGFP. Infizierte Perizyten wurden mit

Material und Methoden

Accutase abgelöst und in Medium aufgenommen, der weitere Verlauf des Experiments erfolgte wie oben beschrieben.

Generell wurden in jedem unabhängig durchgeführten Versuch 2-3 Replikate unter identischen Kultivierungsbedingungen erstellt.

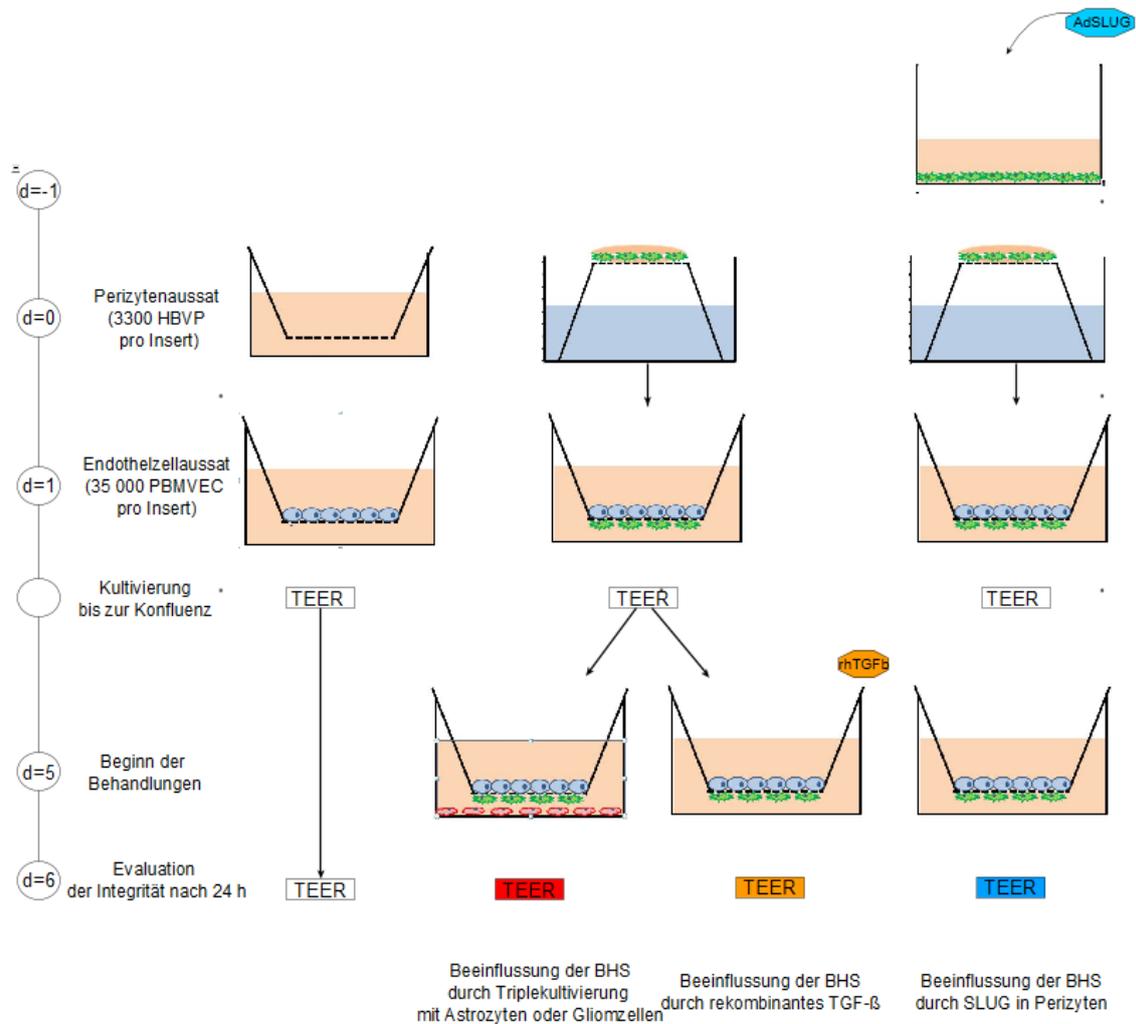


Abbildung 1: Workflow zur Erstellung des *in vitro* BHS-Modells

Arbeitsschritte, die für die Erstellung der verschiedenen Varianten des verwendeten BHS-Modells nötig sind. In der ersten Spalte ist das Modell der BHS dargestellt, welches ausschließlich aus Endothelzellen (PBMVEC) gebildet wird. Im Vergleich dazu zeigen die weiteren Spalten Modelle, in denen Perizyten (HBVP) an der BHS-Ausbildung beteiligt sind. Die Kultivierungsbedingungen werden dabei durch Triplekulturen, TGF-β oder adenoviral-induzierte SLUG-Expression variiert. Die Dichte der BHS wird jeweils mittels TEER-Messung ermittelt.



2.3.5 **Evaluation der BHS-Integrität**

Zwischen der Ionen-Permeabilität einer Zellschicht und dem transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER) besteht eine direkte Korrelation (Nanoanalytics, 2018), weshalb die Dichtheit der BHS *in vitro* mittels TEER-Messung quantifiziert werden kann. Da der Widerstand der Zellmembranen im Vergleich zum parazellulären Widerstand extrem hoch ist und Ionen daher fast ausschließlich über interzelluläre Lücken fließen, gibt der TEER-Wert annäherungsweise den parazellulären Ionen-Widerstand an (Elbrecht et al., 2016). Deshalb lässt sich insbesondere die Ausprägung dichter Interzellularkontakte durch TEER-Messungen gut evaluieren, wobei hohe TEER-Werte eine geringe parazelluläre Permeabilität bedeuten (Cardoso et al., 2010). Da TEER-Werte mehrmals während einer Versuchsreihe gemessen werden können, ist eine Verlaufsbeobachtung möglich.

Die TEER-Bestimmung erfolgte mit einem EVOM-G Gerät und der STX2-Elektrode (Srinivasan et al., 2015). Vor jeder Messreihe wurden die Elektroden zur Desinfektion in 70 % EtOH geschwenkt und für 30 sec. in EM getaucht. Für die Messung wurden die STX2 Elektroden so positioniert, dass sich je eine Elektrode im oberen und unteren Kompartiment befanden, wobei darauf geachtet wurde, dass die Elektroden immer orthogonal zur Insertmembran positioniert waren. Der Widerstand für jedes Membraninsert wurde 3 x in Folge gemessen und der Mittelwert errechnet. Um den genauen Widerstand der Endothelzellschicht zu erhalten, wurde der Leerwiderstand eines gecoateten Inserts subtrahiert (Backgroundmessung). Die Widerstandswerte wurden mit der Fläche der Insertmembran multipliziert, wofür folgende Formel angewendet wurde (Srinivasan et al., 2015):

$$TEER (\Omega * cm^2) = R (\Omega) * A (cm^2)$$

2.3.6 **Messungen des Zellmetabolismus mit dem Seahorse XF96 Analyzer**

Mit dem Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzer lässt sich die metabolische Aktivität lebender Zellen in Echtzeit bestimmen. Dazu werden sowohl die Sauerstoff-Verbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate, OCR) der Zellen als

auch die extrazelluläre Ansäuerung (Extracellular Acidification Rate, ECAR) des Mediums erfasst. Zusätzlich zur Messung der ECAR, welche stark abhängig von den Puffereigenschaften des Systems ist, kann bei bekanntem Pufferfaktor (BF) die quantitative Protonen-Extrusionsrate (PER) errechnet werden. BF beschreibt die Menge an H^+ , welche für die Veränderung um einen pH Punkt im entsprechenden System nötig ist. Er setzt sich zusammen aus der Pufferkapazität des Mediums und der aller anderer System-Bestandteile. Die PER lässt sich über folgende Gleichung errechnen:

$$\begin{aligned}
 PER \left(pmol \frac{H^+}{min} \right) \\
 = ECAR \left(\frac{mpH}{min} \right) \times BF \left(\frac{mmol * pH}{L} \right) \times Geometric Volume (\mu L) \\
 \times K_{vol},
 \end{aligned}$$

wobei K_{vol} für einen empirischen Faktor steht, welcher die Protonenproduktion des Messsystems berücksichtigt (Romero, 2018).

Der OCR-Wert wird insbesondere durch mitochondriale, oxidative Aktivität beeinflusst, ebenso können extra-mitochondriale, sauerstoffverbrauchende Enzyme zur OCR beitragen (Divakaruni et al., 2014). H^+ Ionen, welche zur Ansäuerung des Mediums führen und derart ECAR-Wert beeinflussen, entstehen sowohl während der Glykolyse als auch während der OxPhos. 1M Glucose wird während der Glykolyse in 2 M Laktat und 2 M H^+ umgewandelt, die ins Medium abgegeben werden. Die Rate beträgt hier $1H^+/ATP$. Im Rahmen der mitochondrialen Energiegewinnung entsteht im Zitratzyklus CO_2 , welches zu Kohlensäure hydriert wird und anschließend in Bicarbonat und Protonen dissoziiert. Hierbei entstehen pro gebildetem ATP nur ca. 0,18 H^+ . Eine vermehrt glykolytische ATP-Gewinnung führt somit zu erhöhten ECAR-Werten (Divakaruni et al., 2014).

Für die Beurteilung von metabolischen Leistungen der Zelle werden in den Seahorse Assays mitochondriale Inhibitoren eingesetzt, die gezielt einzelne Stoffwechselfunktionen hemmen. Oligomycin ist ein Inhibitor des Komplexes V (ATP-Synthase) der Atmungskette. Die mitochondriale ATP-Gewinnung wird durch Oligomycin blockiert, wohingegen die oxidativ aktiven Komplexe I bis IV

Material und Methoden

der Atmungskette weiterhin aktiv sind. Nach Oligomycin-Zugabe besteht nur noch der OCR-Anteil, welcher unabhängig von der ATP-Synthese anfällt. Dieser Anteil der OCR wird benötigt, um das „Protonen Leak“ auszugleichen. Als „Protonen Leak“ bezeichnet man den ständigen Rückfluss von Protonen entlang des elektrochemischen Gradienten aus dem Intermembranraum über die undichte innere Mitochondrienmembran in das Mitochondrieninnere. Dieser Protonenfluss verringert den elektrochemischen Gradienten über die innere Mitochondrienmembran, welcher essenziell für die ATP-Gewinnung durch oxidative Phosphorylierung ist und daher aufrechterhalten muss.

Nach Oligomycin wird der Entkoppler Carbonyl-Cyanide-4-Trifluoro-methoxyphenylhydrazon (FCCP) zugegeben, der die Substratphosphorylierung und die oxidative Aktivität der Komplexe 1-4 maximal steigert. Da die Funktion der ATP-Synthase in diesem Zustand von den oxidativen Prozessen und dem Elektronentransport entkoppelt ist, kommt es nicht zur ATP-Produktion (Divakaruni et al., 2014).

Die mitochondrialen Inhibitoren Rotenon und Antimycin A blockieren durch Hemmung der Komplexe I und III die gesamte oxidative mitochondriale Aktivität. Durch Erhebung der verbleibenden OCR lässt sich der nicht-mitochondriale Anteil am Sauerstoffverbrauch bestimmen (Divakaruni et al., 2014).

Material und Methoden

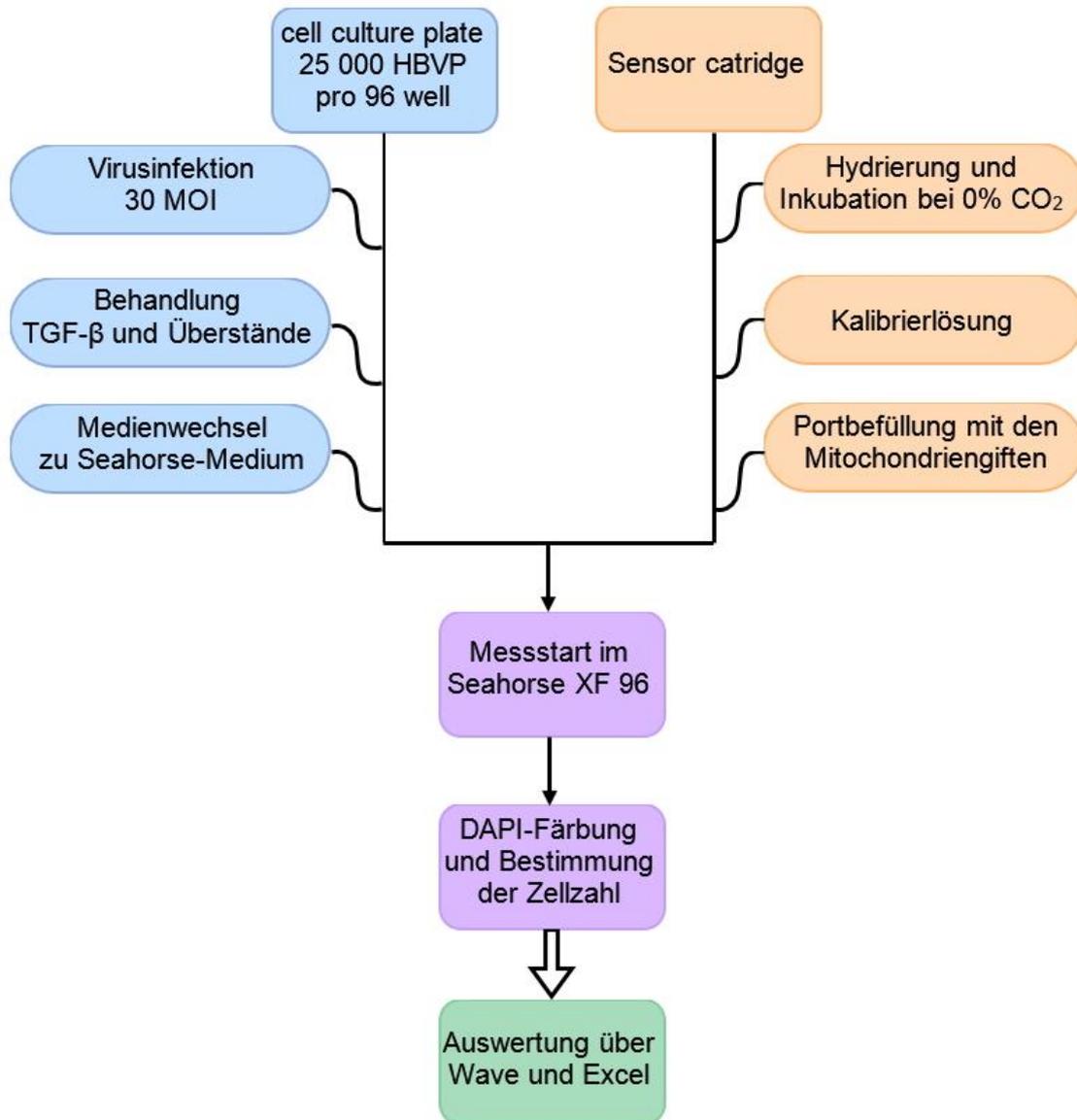


Abbildung 2: Workflow der Seahorse Assays

Abgebildet sind die einzelnen Arbeitsschritte in Vorbereitung auf einen Seahorse Assay in korrekter zeitlicher Reihenfolge. Perizyten (HBVP) werden in den Zellkulturplatten kultiviert und entsprechend behandelt (Gliomzell-Überstände, TGF- β , Ad-CMV-SLUG-EGFPESLUG). Die Messplatte wird, bevor sie auf die Kulturplatte aufgesetzt wird hydriert, kalibriert und mit den entsprechenden Mitochondriengiften befüllt.

2.3.6.1 Seahorse XF Real-Time ATP-Rate Assay

Für die Durchführung des Seahorse XF Real Time ATP-Rate Assays wurde eine Seahorse XF96 Zellkultur-Mikroplatte mit PLL gecoatet und 15 000 HBVP/Well in 200 µl Medium ausgesät und für 48 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte in 6 Replikaten die Kultivierung unter folgenden Behandlungen:

- TGF-β1 und -β2 (1 bzw. 5 ng/ml)
- G-SN: LNT-229, LN-308, LN-319 und T98G
- BSA (1 bzw. 5 ng/ml)
- Präinfizierte HBVP: 30 MOI Ad-CMV-SLUG-EGFP bzw. Ad-CMV-EGFP wie oben beschrieben

Nach 16 h erfolgte ein Mediumwechsel zu supplementiertem, phenolrotfreiem Medium (Seahorse XF DMEM, 10 mM D-Glucose, 1 mM Pyruvat, 2 mM L-Glutamin, pH 7,4) (Agilent-Technologies, 2018). Das verwendete Medium hat eine Pufferkapazität von 2,33 mM/pH. Messungen erfolgten nach dem Protokoll von Dr. Julia Fitzgerald, Hertie-Institut Tübingen, und den Durchführungsbestimmungen des Herstellers (Agilent-Technologies, 2018), jedoch mit geänderten Mitochondrien-Inhibitor-Konzentrationen. Für den stressarmen Medienwechsel wurden in drei Zyklen je 150 µl Medium ausgetauscht, während je 50 µl im Well belassen wurden. Beim dritten Auffüllen wurden nur 130 µl zugegeben (Endvolumen 180 µl/Well) und die Zellkulturplatte für eine Stunde bei 37°C bei 0% CO₂ inkubiert. Die für den Assay verwendete Seahorse XF *sensor cartridge* wurde am Tag vor der Messung hydriert (200 µl ddH₂O/Well) und über Nacht bei 37°C, 0% CO₂ gelagert. Vor Beginn des Assays wurde das Wasser gegen 200 µl des *seahorse calibrant* getauscht und die Platte erneut in den Inkubator gestellt. Die Ports der *seahorse XF sensor cartridges*, über welche im Laufe des Assays Wirkstoffe in die Wells injiziert werden, wurden für den ATP-Rate Assay folgendermaßen beladen:

Port	Substanz	Menge/Volumen
Port A	16 µM Oligomycin in supplementierten Seahorse DMEM Medium	20 µl je Port
Port B	8µM Rotenon und 0,5 µM Antimycin A in supplementierte Seahorse DMEM Medium	22 µl je Port

Nach Adaptation der Seahorse XF *sensor cartridges* auf die Seahorse XF96 Zellkultur Mikroplatten wurden diese in den Seahorse XF96 Analyzer eingeführt woraufhin die Injektionen und Messungen automatisiert erfolgten. Anschließend wurde das Medium abgezogen, die Zellen in PBS gewaschen und fixiert (4% PFA, 10 min, RT). Zur Normalisierung der Messwerte wurde die Zelldichte mittels Kernfärbung mit 4,6 Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und anschließender Fluoreszenzmessung bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 5min mit Triton-X-100 (0,2% in PBS) permeabilisiert. Nach Zugabe von DAPI (2 µg/ml) wurde die Platte im Dunkeln gelagert (4 min, RT), 3x mit PBS gewaschen und die Fluoreszenz im Plate-Reader gemessen (Exzitation $\lambda=359$ nm, Emission $\lambda=461$ nm) (Chazotte, 2011). Die Auswertung sowie Normalisierung erfolgte zunächst mit der Seahorse Desktop Software „Wave“ von Agilent und anschließend mit dem „XF Real-Time ATP-Rate Assay Report Generator“. Weitere Berechnungen erfolgten mit Excel.

Die glykolytische ATP-Rate wurde dabei über folgenden Algorithmus bestimmt:

$$glycoATP \text{ Production Rate } \left(\frac{pmol \text{ ATP}}{min} \right) = glycoPER \left(pmol \frac{H^+}{min} \right)$$

Wobei:

- $glycoPER \left(pmol \text{ H}^+ \right) = PER \left(pmol \text{ H}^+ \right) - mitoPER \left(pmol \frac{H^+}{min} \right)$
- $PER \left(pmol \frac{H^+}{min} \right) = ECAR \left(\frac{mpH}{min} \right) BF \left(mmol \frac{H^+}{min} \right) \times Vol \left(XF \text{ microchamber } \right) (\mu l) \times Kvol$
- $mitoPER \left(pmol \frac{H^+}{min} \right) = mitoOCR \left(pmol \frac{O_2}{min} \right) * CCF \left(pmol \frac{H^+}{pmol \text{ O}_2} \right)$

- $$\begin{aligned} \bullet \text{ mitoOCR} & \left(\text{pmol} \frac{\text{O}_2}{\text{min}} \right) \\ & = \text{OCR basal} \left(\frac{\text{pmol O}_2}{\text{min}} \right) - \text{OCR (Rot/AA)} \left(\frac{\text{pmol O}_2}{\text{min}} \right) \end{aligned}$$

BF setzt sich zusammen aus der Pufferkapazität des Mediums (2,33, s.o.) sowie den aktuellen Assay Bedingungen. Der CO_2 Contribution Factor (CCF) für die verwendeten XF96 Platten ist 0,61, Kvol = 1,6 (Romero, 2018).

Die Berechnung der mitochondrialen ATP-Rate erfolgt mit Hilfe der Gleichung:

$$\begin{aligned} \text{mitoATP Production Rate} & \left(\text{pmol} \frac{\text{ATP}}{\text{min}} \right) \\ & = \text{OCR}_{\text{ATP}} \left(\text{pmol} \frac{\text{O}_2}{\text{min}} \right) * 2 \left(\frac{\text{pmol O}}{\text{pmol O}_2} \right) * \frac{P}{O} \left(\text{p} \frac{\text{mol ATP}}{\text{pmol O}} \right) \end{aligned}$$

Wobei

- $$\text{OCR}_{\text{ATP}} \left(\frac{\text{pmol O}_2}{\text{min}} \right) = \text{OCR} \left(\frac{\text{pmol O}_2}{\text{min}} \right) - \text{OCR}_{\text{Oligo}} \left(\frac{\text{pmol O}_2}{\text{min}} \right)$$
- $$P/O = 2,75$$

(Romero, 2018)

Da das Messniveau der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Messungen auf Grund der Messmethode stark schwankt und für die Auswertung insbesondere die durch Behandlung bedingten Veränderungen relevant sind, wurden die Werte für unbehandelte HBVP jeweils als Referenz gesetzt und alle Änderungen prozentual angegeben.

2.3.6.2 Seahorse XF Cell Mito Stress Test

Wie bei der Durchführung des Seahorse XF Real-Time ATP-Rate Assays wurde nach Herstellerangaben (Agilent-Technologies, 2019) verfahren, wobei in Bezug auf die Medienzusammensetzung sowie die injizierten

Material und Methoden

Mitochondrien-Inhibitoren mit Hilfe von Frau Dr. Julia Fitzgerald, Hertie-Institut Tübingen, individuelle Anpassungen vorgenommen wurden. Kultivierungen und Vorbereitungen erfolgten analog zu 2.3.6.1, lediglich das verwendete Medium sowie injizierte Mitochondrien-Inhibitoren variierten. Der Assay erfolgte in supplementiertem Seahorse XF Base Medium (25 mM D-Glucose; 2,5 mM Pyruvat; 2 mM L-Glutamin, pH 7,4) bei 37°C.

Die Ports wurden wie folgt beladen:

Port	Substanz	Menge/ Volumen
Port A	8µM Oligomycin in supplementiertem SH-XF Base Medium	20 µl je Port
Port B	28 µM FCCP in supplementiertem SH-XF Base Medium)	22 µl je Port
Port C	40 µM Antimycin A und 8 µM Rotenon in supplementiertem SH-XF Base Medium	24 µl je Port

Auswertungen und Normalisierungen erfolgten analog zu 2.3.6.1. Als relevante metabolische Parameter wurden basale ECAR-Werte erhoben, welche insbesondere Auskunft über die glykolytische Aktivität geben. Aus den erhobenen OCR-Verläufen wurden die basale Respiration, die respiratorische Reservekapazität (Spare Respiratory Capacity, SRC) sowie das „Protonen Leak“ als Aktivitätsparameter der Mitochondrien berechnet. Durch die komplette Inhibition der Atmungskettenaktivität nach Zugabe von Antimycin A/Rotenon erhält man den Anteil der OCR, welcher auf rein extra-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch entfällt. Dieser Wert wurde für die Berechnung der mitochondrialen Aktivitätsparameter jeweils vom erhaltenen OCR-Wert abgezogen. Die basale Respiration (in Abbildung 3 als blaue Säule dargestellt) erhält man somit durch Subtraktion des extra-mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs vom anfänglichen OCR-Wert. Das „Protonen Leak“ stellt den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch nach Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin dar. Als respiratorische Reservekapazität wird die Steigerungsfähigkeit der anfänglichen OCR zur maximalen Respiration bezeichnet.

Auch in diesem Assay wurden durch Behandlung bedingte prozentuale Änderungen vom Ausgangswert berechnet.

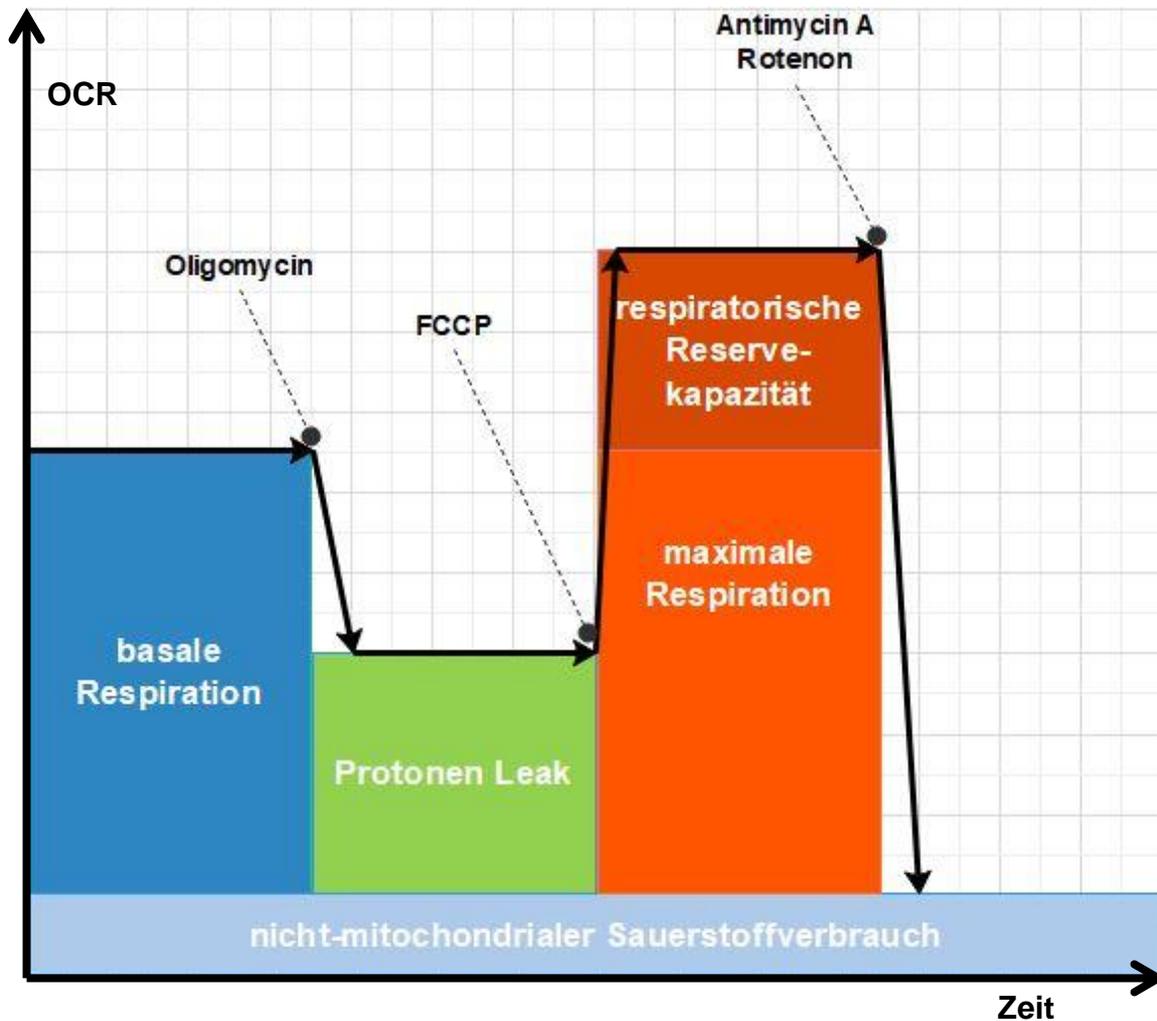


Abbildung 3: Sauerstoffverbrauch

Die Abbildung stellt schematisch den Verlauf des Sauerstoffverbrauches (OCR) während des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests dar. Nach Erhebung des anfänglichen OCR-Werts wird Komplex V der Atmungskette durch Oligomycinzugabe gehemmt, was zum Abfall der OCR führt. Nach der Injektion des Entkopplers FCCP ist die OCR maximal gesteigert. Die Zugabe der Mitochondrien-Inhibitoren Antimycin A und Rotenon hemmt die gesamte mitochondriale Aktivität. Gezeigt sind mitochondriale Kenngrößen, die sich aus den einzelnen Aktivitätszuständen ermitteln lassen.

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Excel und GraphPad Prism. Wenn nicht anders erwähnt, sind der arithmetische Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) gezeigt. „n“ gibt Auskunft über die Anzahl der unabhängig durchgeführten Experimente. Biologische Replikate je technischer

Material und Methoden

Wiederholung variieren zwischen 2 für die meisten TEER-Analysen und 6 für Metabolismus-Experimente. Da basale Werte in metabolischen Messreihen stark variierten, wurden Werte für unbehandelte HBVP (Kontrollen) als Referenz gewählt und prozentuale Änderungen berechnet. Dadurch gehen Informationen über absolute Messgrößen verloren, doch die durch Behandlung bedingten Veränderungen werden ersichtlich. Obwohl bei einer Stichprobengröße von $n=3$ bzw. 4 nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann und somit im Normalfall keine parametrischen Testverfahren angewandt werden dürfen, wurde die Signifikanztestung der ermittelten Unterschiede jeweils mittels t-Test für ungepaarte Stichproben oder mittels ANOVA, gefolgt vom Bonferroni Post-hoc Test, bei mehr als zwei zu vergleichenden Stichproben durchgeführt (Thanabalasundaram et al., 2011; Anfuso et al., 2014; Takahashi et al., 2014).

Signifikanzprüfungen für Metabolismus-Messungen erfolgten mittels „one sample“ t-Test, wobei stets geprüft wurde, ob der Stichprobenmittelwert signifikant verschieden zu 0% Änderung ist. Signifikanzniveaus sind $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) und $p<0,005$ (***). Parallel zur Berechnung des Signifikanzniveaus wurden die Ergebnisse insbesondere auf qualitativer Ebene ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des *in vitro* BHS-Modells

3.1.1 *Präparation und Charakterisierung primärer mikrovaskulärer Endothelzellen des Hausschweins*

Für das *in vitro* BHS-Modell wurden primäre mikrovaskuläre Endothelzellen des Hausschweins (PBMVEC) verwendet. Diese wurden in drei unabhängigen Präparationen mit Ausbeuten von 15,2, 14,7 bzw. 11,4 x 10⁶ PBMVEC isoliert. Zur Verifizierung des endothelialen Phänotyps der isolierten Zellen diente die immunhistochemische Färbung des TJ-assoziierten Proteins ZO-1. Abbildung 4 A zeigt exemplarisch die membranständige ZO-1 Färbung (PBMVEC Präparation 1). Immortalisierte humane Endothelzellen (hCMEC/D3, Positivkontrolle; B) wiesen eine vergleichbar starke ZO-1-Färbung auf, wohingegen in Gliomzellen (LN 308, Negativkontrolle; C) kein ZO-1 nachweisbar war. Es kann somit angenommen werden, dass es sich bei den isolierten PBMVEC um Endothelzellen mit einer Reinheit von > 95% handelt.

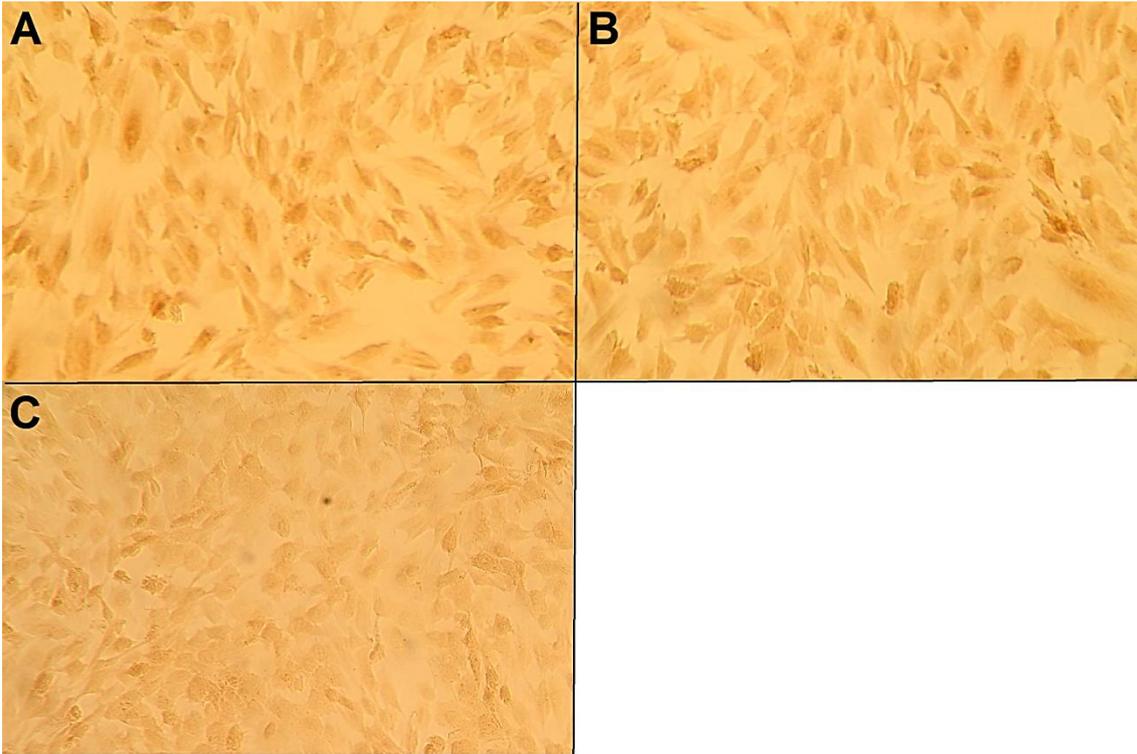


Abbildung 4: ZO-1 Färbung

In mikrovaskulären Endothelzellen des Schweinegehirns (PBMVEC) wurde immunhistochemisch das TJ-assoziierte Protein ZO-1 nachgewiesen (A). Als Positivkontrolle wurden humane immortalisierte Endothelzellen (hCMEC/D3, B), als Negativkontrolle Gliomzellen (LN-308, C) gefärbt.

3.1.2 **Charakterisierung primärer humaner Astrozyten**

Der astrozytäre Ursprung der aus humanem Gewebe isolierten Astrozyten (normal human astrocytes, NHA) wurde mittels immunhistochemischer Färbung des glial fibrillary acidic protein (GFAP) überprüft. Abbildung 5 zeigt stark gefärbte SV-GA Zellen (immortalisierte astrozytäre Zelllinie, Positivkontrolle, A) sowie GFAP negative PBMVEC (Negativkontrolle; C). In der NHA-Kultur (B) waren ca. 25% der Zellen in unterschiedlichem Ausmaß GFAP positiv. Das deutet darauf hin, dass es sich bei den isolierten Zellen nur teilweise um Astrozyten handelte und eine relevante Verunreinigung der Kultur mit Zellen nicht-astrozytären Ursprungs vorlag.

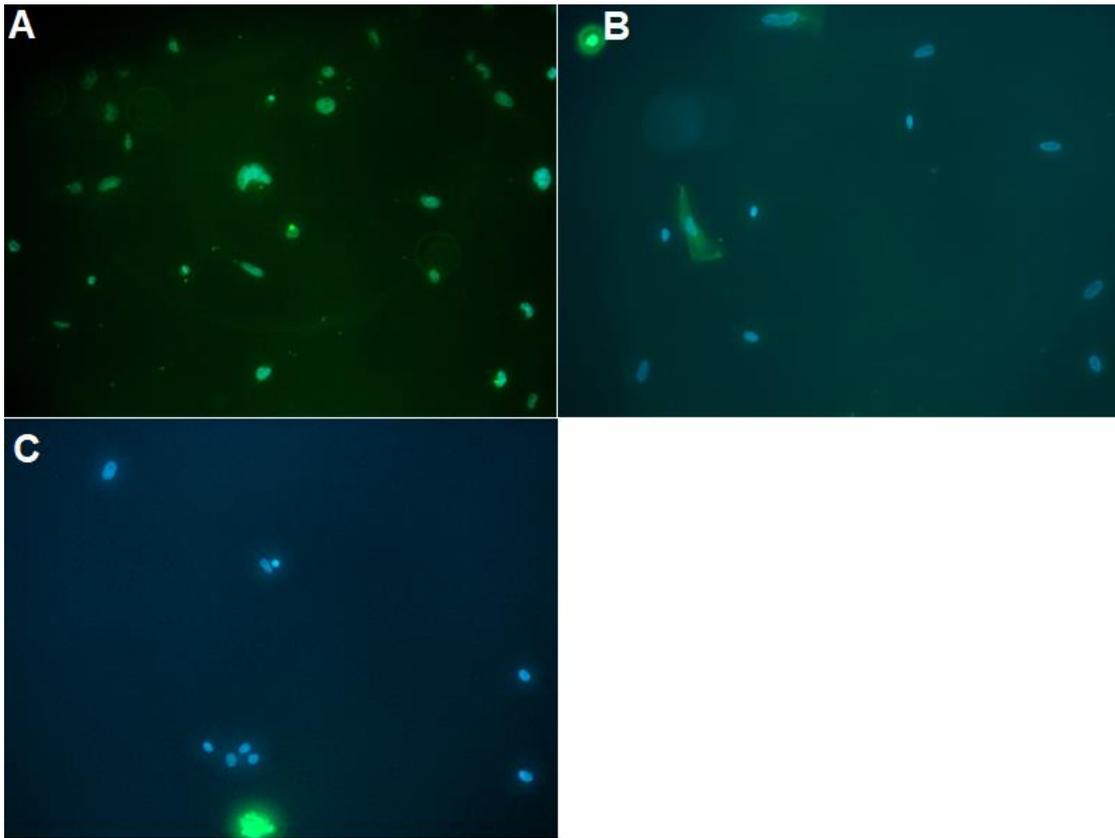


Abbildung 5: GFAP Färbung

GFAP-Färbung (grün) sowie Kernfärbung (blau) in immortalisierten SV-GA Zellen (A), in primären humanen Astrozyten (NHA; B) und mikrovaskulären Endothelzellen des Schweinehirns (PBMVEC; C).

3.1.3 *Integrität der in vitro BHS unter basalen Bedingungen*

In der NVU stehen Perizyten in direktem Kontakt zu Endothelzellen und sind essenziell für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der BHS. Diese anatomisch-physiologischen Bedingungen wurden im BHS-Modell durch die Kokultivierung von HBVP und PBMVEC simuliert. Dazu wurden auf die Membranes inserts abluminal HBVP und luminal PBMVEC ausgesät und an Tag 5 nach Aussaat die BHS-Integrität mittels TEER-Messung ermittelt. In PBMVEC-Monokulturen lagen die TEER-Werte bei $87,31 \pm 4,546 \Omega \cdot \text{cm}^2$, in HBVP-Monokulturen hingegen war keinerlei Schrankenwirkung erkennbar ($<10 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Kokulturen von HBVP und PBMVEC zeigten im Vergleich zu

Ergebnisse

PBMVEC-Monokulturen eine signifikante Steigerung des elektrischen Widerstandes ($188,8 \pm 8,583 \Omega \cdot \text{cm}^2$), ein Zeichen einer intakten BHS (Abbildung 6).

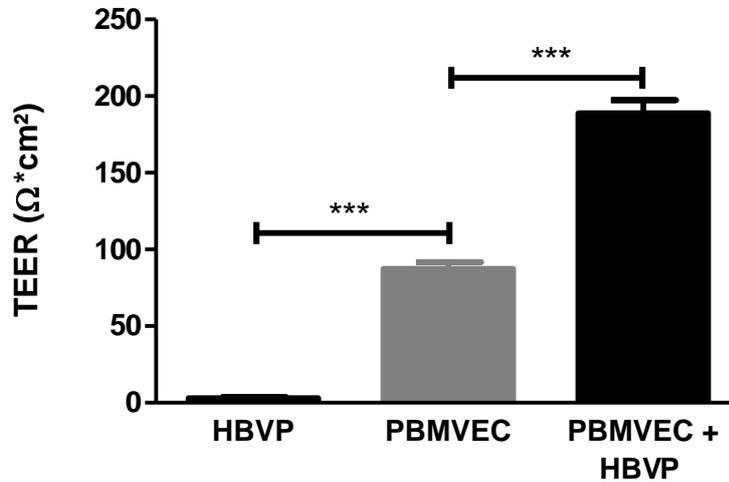


Abbildung 6: Einfluss von HBVP auf die BHS-Integrität

Auf semipermeablen Membraninserts wuchsen luminal Endothelzellen (PBMVEC) und abluminal Perizyten (HBVP), entweder in Mono- oder als Kokulturen. Gezeigt sind TEER-Werte nach einer Kultivierungszeit von 5 Tagen ($n=3$, SEM, ANOVA, $***=p<0,005$).

3.2 Der Einfluss modulierender Faktoren auf die Integrität der BHS *in vitro*

3.2.1 TGF- β

TGF- β wird von den meisten GBM in teils hohen Konzentrationen sezerniert (Roy et al., 2018). In HBVP induziert TGF- β *in vitro* die Expression des EMT-Proteins SLUG sowie morphologische und funktionelle Änderungen (unveröffentlichte Daten der AG Naumann). In der vorliegenden Untersuchung wurde ermittelt, ob TGF- β Perizyten-Funktionen mit Auswirkung auf die BHS-Integrität moduliert.

Hierzu wurden HBVP in den BHS-Modellen, nach der Ausbildung einer integen BHS an Tag 5, mit TGF- β (10 ng/ml) behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle, serumfreies Medium). Nachdem vor Behandlungsbeginn die BHS-Integrität gemessen wurde, erfolgte nach 24 Stunden eine erneute Messung.

Ergebnisse

Die Kontrolle zeigte einen leichten Anstieg der BHS-Integrität, wohingegen nach der TGF- β Behandlung ein deutlicher Abfall erkennbar war. Abbildung 7 stellt die TEER-Werte nach 24-stündiger Behandlung dar. Im Vergleich zur Kontrolle (199,2 +/- 19,41 $\Omega \cdot \text{cm}$) war die BHS-Integrität nach TGF- β Behandlung signifikant vermindert (133,9 +/- 17,56 $\Omega \cdot \text{cm}$).

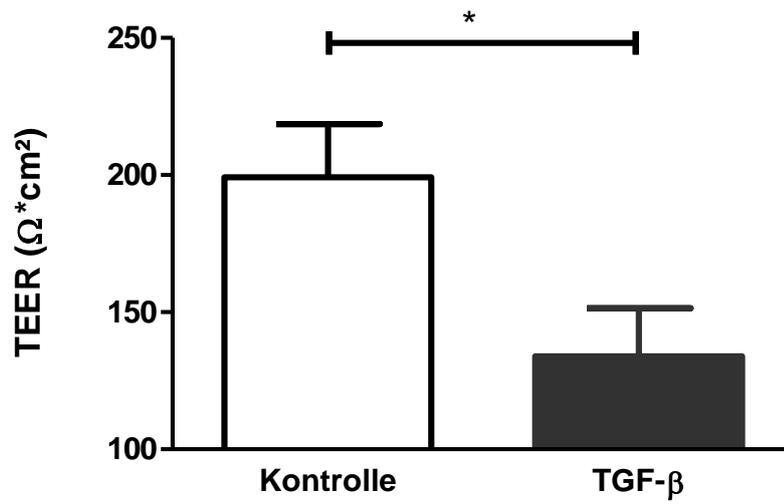


Abbildung 7: Einfluss von TGF- β auf die BHS-Integrität *in vitro*

Auf semipermeablen Membraninserts wuchsen Endothelzellen (PBMVEC) und Perizyten (HBVP) bis zur Ausbildung einer integen BHS (Tag 5), danach erfolgte die Zugabe von TGF- β 1/2 (je 5 ng/ml) in das basale Kulturmedium. Aufgetragen sind TEER-Werte 24 h nach Behandlungsbeginn (n=4, SEM, t-Test, * = p<0,05).

Dass dieser Effekt TGF- β spezifisch ist, wurde durch die Zugabe des pan-TGF- β spezifischen, neutralisierenden Antikörpers 1D11 nachgewiesen. Die Zugabe von 1D11 konnte den TGF- β -vermittelten Integritätsverlust fast komplett revertieren, während die Isotyp-Kontrolle keinen Einfluss zeigte (Abbildung 8). Als weitere Kontrolle für die TGF- β -Spezifität wurde BSA in analogen Konzentrationen zum basalen Kulturmedium zugegeben. Im Gegensatz zur TGF- β Behandlung bewirkte die Addition von BSA keine Änderungen der BHS-Integrität (Abbildung 9). Beide Versuche wurden mit steigenden TGF- β Konzentrationen durchgeführt, wobei sich eine Konzentrationsabhängigkeit der TGF- β Wirkung auf die BHS zeigte.

Ergebnisse

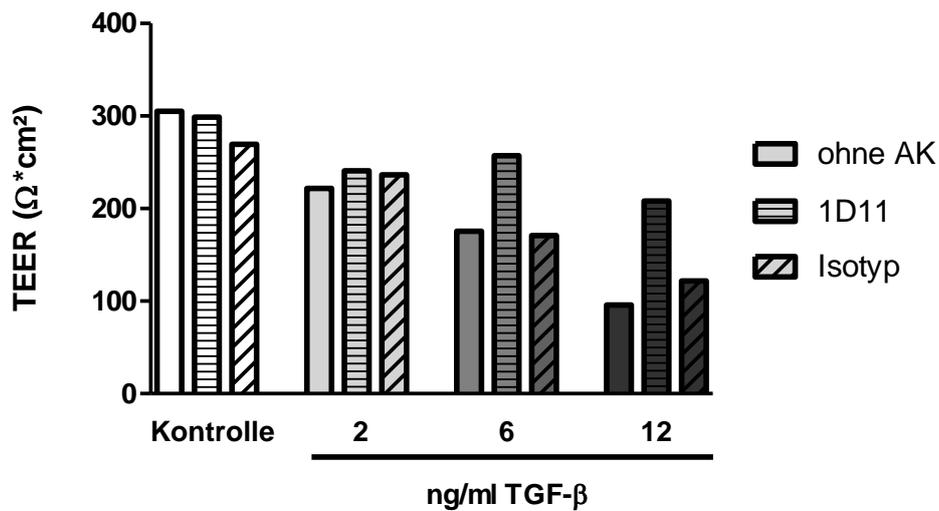


Abbildung 8: Konzentrationsabhängigkeit der TGF-β Wirkung auf die BHS *in vitro*

Auf semipermeablen Membraninserts wuchsen PBMVEC und HBVP bis zur Ausbildung einer integren BHS (Tag 5). Anschließend erfolgte die Zugabe von TGF-β1/2 in An- bzw. Abwesenheit des pan-TGF-β spezifischen neutralisierenden Antikörpers 1D11 bzw. der Isotyp-Kontrolle. Die TEER-Messung erfolgte 24 h nach Behandlungsbeginn (n=1).

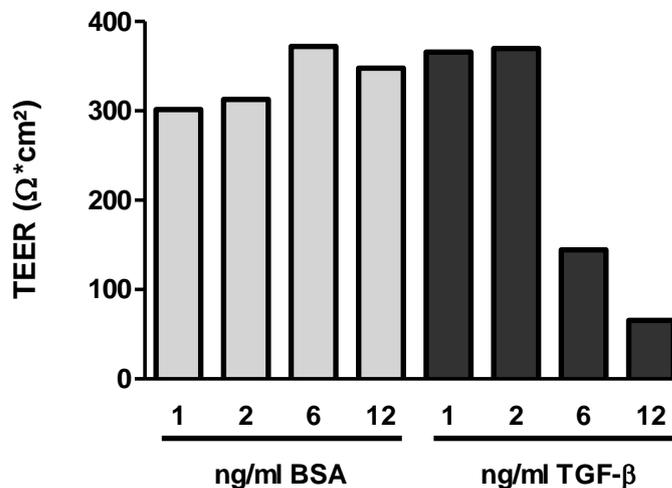


Abbildung 9: Spezifität der TGF-β Wirkung im *in vitro* BHS-Modell

Auf semipermeablen Membraninserts wuchsen PBMVEC und HBVP bis zur Ausbildung einer integren BHS (Tag 5). Anschließend erfolgte die Zugabe von TGF-β oder äquivalenten Mengen an BSA. Dargestellt sind die TEER-Werte 24 h nach Behandlung (n=1).

Ergebnisse

Mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie wurden die von PBMVEC ausgebildeten TJs qualitativ beurteilt. In allen betrachteten Proben waren TJ in erster Linie mit der exoplasmatischen Seite der Zellmembran assoziiert, wo sie sich als Mulden darstellten. Die von TJ gebildeten Stränge wiesen wenige Verzweigungen auf. Nach TGF- β Behandlung (Abbildung 10, C und D) war die Anzahl an TJ und deren Verzweigungen zudem deutlich reduziert.

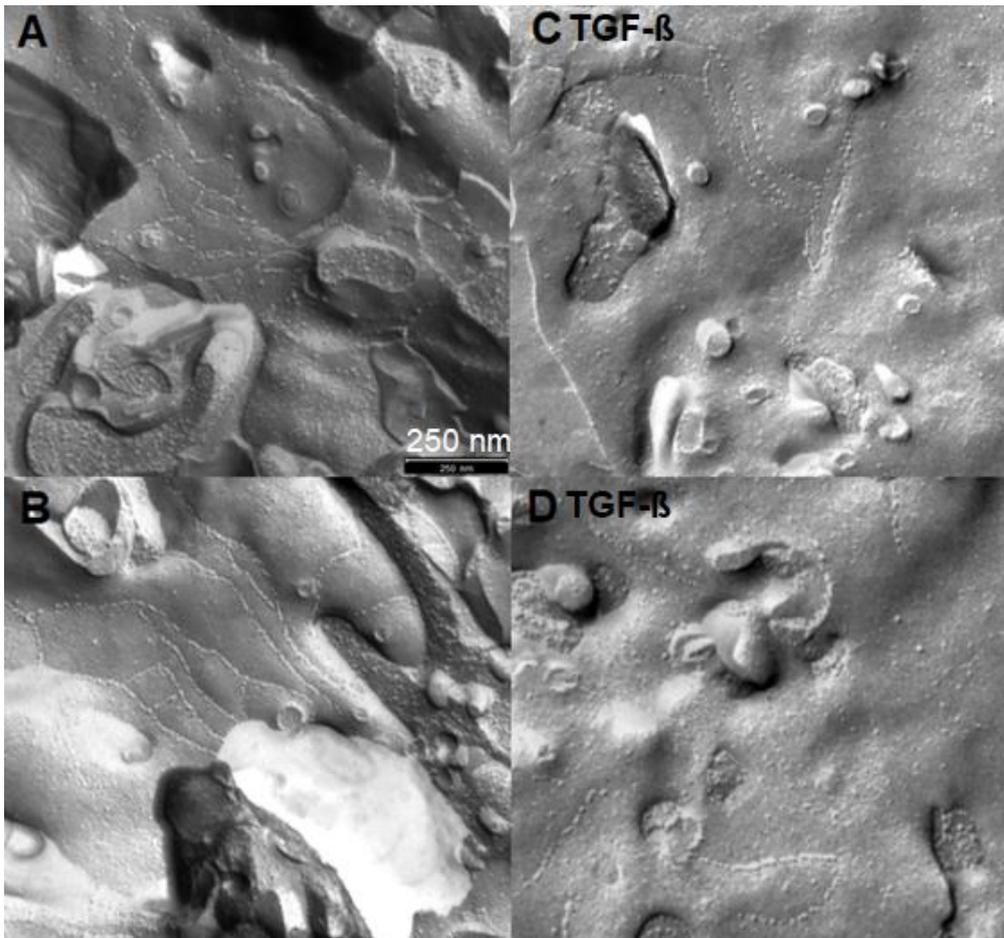


Abbildung 10: Gefrierbruch-Elektronenmikroskopische Darstellung von TJ in PBMVEC im *in vitro* BHS-Modell

Auf semipermeablen Membraninserts wuchsen PBMVEC und HBVP bis zur Ausbildung einer integren BHS (Tag 5). Anschließend erfolgte die Zugabe von TGF- β in das untere Kompartiment. 24 h später wurden PBMVEC geerntet und für die Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie aufgearbeitet. A, B: Kontrolle; C, D: TGF- β 1/2 (10 ng/ml). Gefrierbruchpräparate und elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit der freundlichen Unterstützung von PD Dr. Petra Fellier-Becker (Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Tübingen) erstellt.

3.2.2 *SLUG-Expression*

In perizytären Zellen der Gefäßproliferate angiogener Gliome, nicht aber in Perizyten normaler Gefäße, wird das EMT Protein SLUG exprimiert (Mader et al., 2018). Um zu ermitteln, ob die TGF- β bedingte Reduktion der BHS-Integrität *in vitro* durch perizytäre Expression von SLUG vermittelt wird, wurde SLUG in HBVP mittels adenoviraler Infektion (30 MOI Ad-CMV-SLUG-EGFP) vor Aussaat im *in vitro* BHS-Modell hochreguliert. Als Kontrolle dienten mit Ad-CMV-EGFP infizierte HBVP. Im Gegensatz zur TGF- β Behandlung war nach Hochregulation von SLUG in HBVP keine Reduktion der BHS-Integrität erkennbar (Abbildung 11).

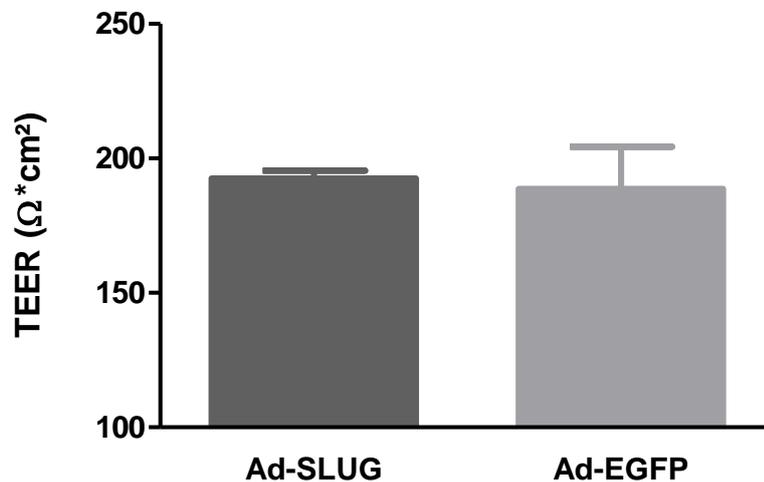


Abbildung 11: Einfluss der perizytären SLUG Expression auf die BHS-Integrität *in vitro*

Auf Membraninserts wurden PBMVEC und Ad-CMV-EGFP- bzw. Ad-CMV-SLUG-EGFP-infizierte HBVP ausgesät (30 MOI, 5 h Präinfektion). Abgebildet sind TEER-Werte, gemessen an Kulturtag 6 (n=3, SEM).

3.2.3 *Gliomzell-konditioniertes Medium*

Neben TGF- β sezernieren Gliomzellen weitere Faktoren mit potentielltem Einfluss auf HBVP und die BHS-Integrität. Um deren Einfluss zu ermitteln, wurden HBVP in Triplekulturen mit T98G Zellen in Gliomzell-konditioniertem Medium kultiviert. Analog dazu wurde der Einfluss nicht-neoplastischer Astrozyten (Triplekulturen mit SV-GA Zellen oder NHA) auf die BHS-Integrität ermittelt. Abbildung 12 zeigt, dass nach 24-stündiger Kokultivierung mit Gliomzellen die

Ergebnisse

BHS-Integrität im Vergleich zur Kontrolle statistisch nicht signifikant vermindert war ($p=0,12$), wohingegen die Integrität nach Kokultivierung mit SV-GA Zellen tendenziell verbessert war ($p=0,22$). Die Reduktion der BHS-Integrität bei Anwesenheit von T98G-Gliomzellen in Triple-Kulturen im Vergleich zu SV-GA-Zellen war hingegen signifikant. Die Kokultivierung mit NHA beeinflusste die BHS-Integrität nicht.

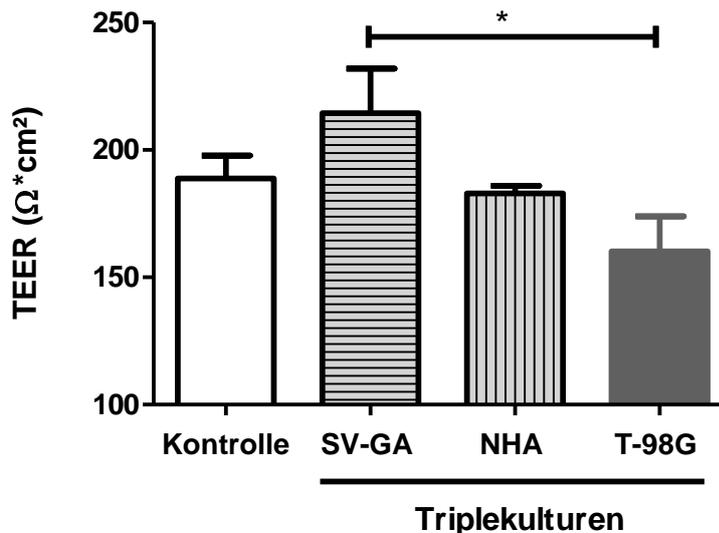


Abbildung 12: Einfluss von Astrozyten und Gliomzellen auf die BHS-Integrität *in vitro*

Auf Membraninserts wuchsen PBMVEC und HBVP bis zur Ausbildung einer integen BHS (Tag 5). Anschließend erfolgte die Kokultivierung mit Astrozyten (SV-GA Zellen und NHA) oder T98G GBM-Zellen. Abgebildet sind TEER-Werte, gemessen 24 h nach Behandlungsbeginn. (n= 3-8, SEM, ANOVA, *= $p<0,05$)

Der pan-TGF- β spezifische, neutralisierende Antikörper 1D11 wurde eingesetzt, um die TGF- β Aktivität zu hemmen und somit den TGF- β vermittelten Effekt in G-SN zu ermitteln. In Abbildung 13 ist dargestellt, dass die durch Kokultivierung mit T98G Zellen bedingte Integritätsminderung der BHS nach Neutralisierung der TGF- β -Aktivität durch den Antikörper 1D11 vollständig aufgehoben wurde, nicht aber durch Addition des Isotyp-Kontroll-Antikörpers.

Ergebnisse

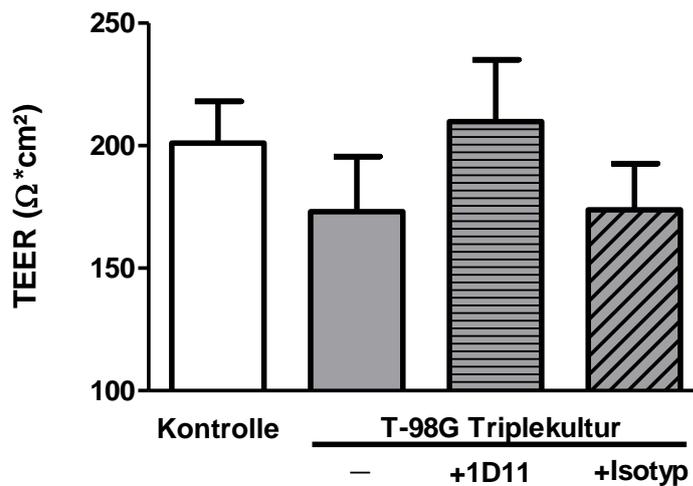


Abbildung 13: TGF- β vermittelter Einfluss von Gliomzellen auf die BHS-Integrität *in vitro*

Auf Membraninserts wuchsen PBMVEC und HBVP bis zur Ausbildung einer integren BHS (Tag 5). Anschließend erfolgte die Kokultivierung mit T98G GBM-Zellen in An- oder Abwesenheit des pan-TGF- β spezifischen neutralisierenden Antikörpers 1D11 bzw. des Isotyp-Kontroll-Antikörpers. Gezeigt sind TEER-Werte nach 24 stündiger Behandlung (n=3, SEM).

3.3 Der Einfluss modulierender Faktoren auf die metabolische Aktivität von Perizyten

3.3.1 TGF- β

Vorausgehende Untersuchungen deuteten darauf hin, dass HBVP *in vitro* durch TGF- β aktiviert werden, zudem steigerte TGF- β die migratorische Aktivität dieser Zellen (unveröffentlichte Daten der AG Naumann). Erhöhte Migrationsaktivität geht häufig mit metabolischen Änderungen, insbesondere einer gesteigerten glykolytischen Aktivität einher (Padhi et al., 2020; Shiraishi et al., 2015). Unter Verwendung der Seahorse Technologie wurde in dieser Arbeit untersucht, ob TGF- β metabolische Änderungen in HBVP induziert.

3.3.1.1 Gesamt-ATP Produktionsrate

Die intrazelluläre Konzentration des Hauptenergieträgers ATP wird möglichst konstant gehalten, weshalb Zellen auf einen höheren Energieverbrauch mit vermehrter ATP-Produktion reagieren. Die Gesamt-ATP Produktionsrate in

Ergebnisse

HBVP, die mittels Seahorse XF Real-Time ATP-Rate Assay gemessen wird, ist damit ein guter Indikator für den aktuellen Energiebedarf und -umsatz einer Zelle (Romero, 2018). In Abbildung 14 sind die durch TGF- β -Behandlung (2 ng/ml und 10 ng/ml) bedingten Änderungen der ATP-Produktion in HBVP dargestellt. TGF- β steigerte die ATP-Produktion. TGF- β in einer Konzentration von 2 ng/ml induzierte einen signifikanten Anstieg der ATP-Produktionsrate um 40% (+/- 1,22, p=0,0008) im Vergleich zur Kontrolle, während der Anstieg nach Addition von 10 ng/ml TGF- β (28% +/- 8,5, p=0,08) statistisch nicht signifikant war.

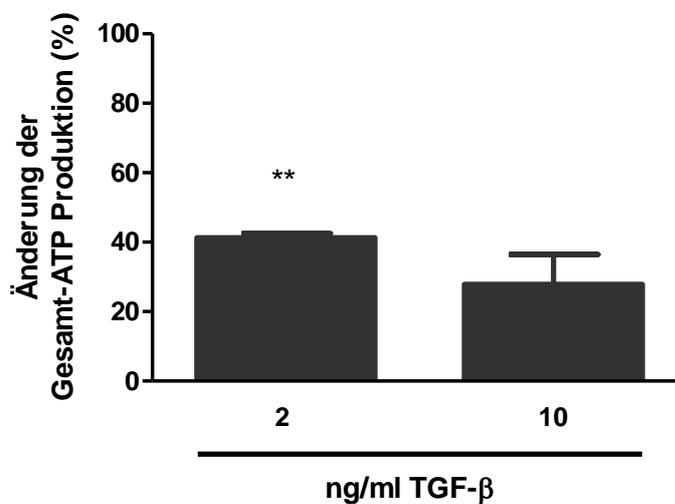


Abbildung 14: TGF- β vermittelte Änderung der Gesamt-ATP Produktion in HBVP

HBVP wurden für 16 Stunden mit TGF- β behandelt, bevor die Gesamt-ATP Produktionsrate mittels Seahorse XF Real Time ATP-Rate Assay bestimmt wurde. Dargestellt sind die durch TGF- β hervorgerufenen prozentualen Änderungen der ATP-Produktion im Vergleich zur Kontrolle (n= 3, SEM, one-sample-t-Test, **= p<0,01).

3.3.1.2 Verhältnis der ATP-Produktionswege

Die beiden wesentlichen ATP-Produktionswege sind die mitochondriale oxidative Phosphorylierung (OxPhos) und die Glykolyse. Der im Seahorse XF Real-Time ATP-Rate Assay bestimmte ATP-Rate-Index (mitoATP/glykoATP) beschreibt das Verhältnis der beiden Stoffwechselwege. Unabhängig von der vorangegangenen Behandlung war der ATP-Rate-Index in HBVP stets >1. Dies bedeutet, dass mehr ATP durch OxPhos als durch Glykolyse erzeugt wurde

Ergebnisse

(Abbildung 15). TGF- β erniedrigte den ATP-Rate-Index in HBVP tendenziell, was auf eine vermehrt glykolytische Energiegewinnung hindeutet.

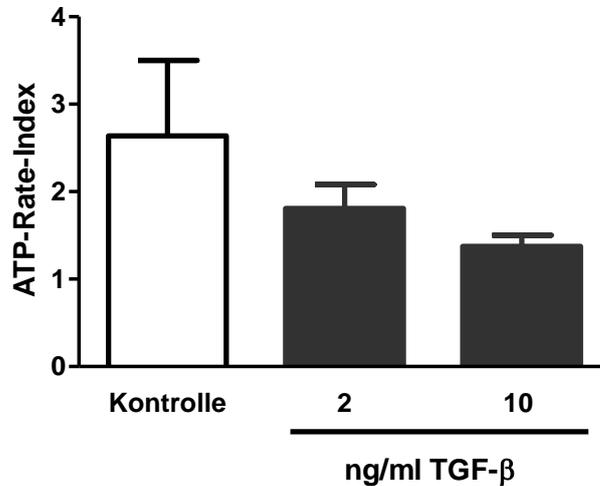


Abbildung 15: TGF- β vermittelte Änderungen des ATP-Rate-Index in HBVP

HBVP wurden für 16 Stunden mit TGF- β behandelt. Im Seahorse XF Real Time ATP-Rate Assay wurden die ATP-Menge, generiert durch Glykolyse oder OxPhos getrennt ermittelt. Der ATP-Rate-Index zeigt den Quotienten von mitoATP/glykoATP (n=3, SEM).

3.3.1.3 ECAR

In Ergänzung zum Seahorse XF Real-Time ATP-Rate Assay wurde der Seahorse XF Cell Mito Stress Test durchgeführt. Ein Messparameter dieses Assays ist die extrazelluläre Ansäuerungsrate (ECAR). Da zur Ansäuerung des Mediums insbesondere H⁺-Ionen beitragen, die während der Glykolyse gebildet werden, liefert ECAR Hinweise auf die glykolytische Aktivität (Divakaruni et al., 2014).

Vor der Zugabe von Mitochondrien-Inhibitoren wurde die ECAR in unbehandelten und in TGF- β (2 bzw. 10 ng/ml) bzw. G-SN (LNT-229, LN-308, LN-319, T98G)-behandelten HBVP gemessen. In Abbildung 16 ist erkennbar, dass TGF- β vermehrt, jedoch nicht signifikant, extrazelluläre Ansäuerung induzierte.

Ergebnisse

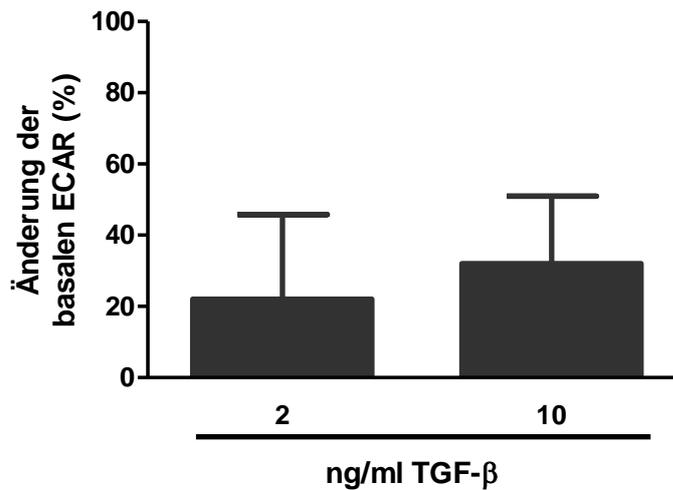


Abbildung 16: TGF- β -vermittelte Änderung der extrazellulären Ansäuerung (ECAR)

HBVP wurden für 16 Stunden mit TGF- β behandelt, bevor mittels des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests die basale ECAR bestimmt wurde. Dargestellt sind prozentuale Änderungen im Vergleich zur Kontrolle (n=4, SEM).

3.3.1.4 Veränderungen der mitochondrialen Leistung

Während im Seahorse XF Real-Time ATP-Rate Assay lediglich die mitochondrial produzierte ATP-Menge ermittelt wurde, ermöglichten Messgrößen des Seahorse XF Cell Mito Stress Test detailliertere Aussagen über Mitochondrienfunktionen.

Abbildung 17 zeigt beispielhaft den Verlauf des Sauerstoffverbrauchs (OCR) während eines Seahorse XF Cell Mito Stress Tests. Nach Oligomycin-Zugabe kam es, bedingt durch die Hemmung der ATP-Synthase, zu einem Abfall der OCR, nach Injektion des Entkopplers FCCP zu einem deutlichen Anstieg. Antimycin A und Rotenon bewirkten durch vollständige Hemmung der Atmungskette eine starke OCR-Erniedrigung. Qualitativ gleicht der gemessene OCR-Verlauf in HBVP dem in Abbildung 3 dargestellten theoretischen Verlauf.

Ergebnisse

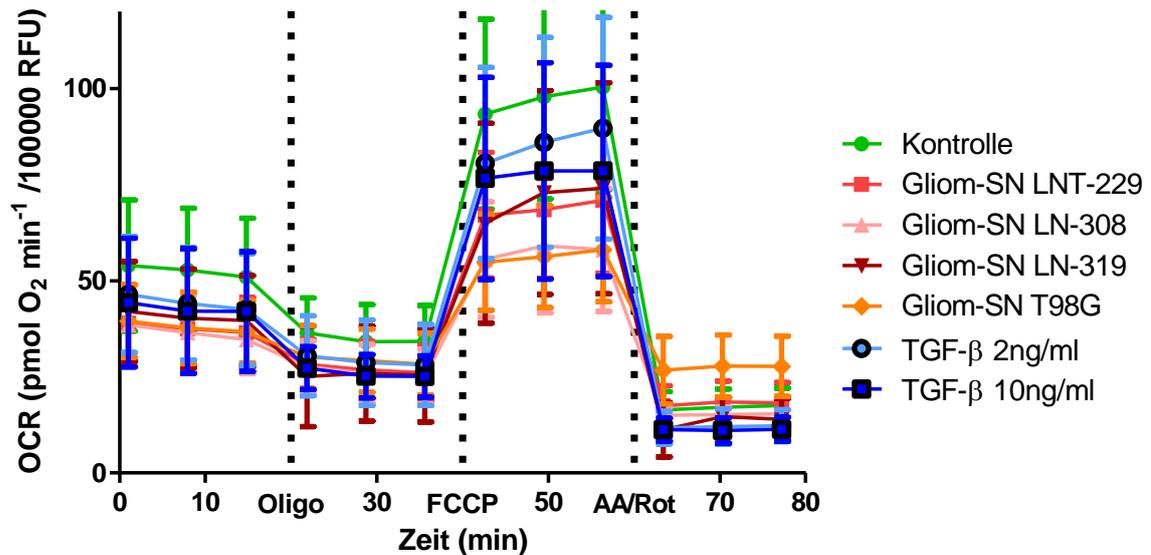


Abbildung 17: OCR-Verlauf während des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests

HBVP wurden für 16 Stunden in Anwesenheit von TGF- β bzw. Gliom-SN kultiviert. Für den Cell Mito Stress Test wurden sequenziell verschiedene mitochondriale Modulatoren (Oligomycin, FCCP und Antimycin A/ Rotenon) zu dem Medium hinzugefügt. In dem Diagramm ist beispielhaft der Sauerstoffverbrauch (OCR) dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen hier Unterschiede zwischen den 6 Replikaten eines einzelnen Experimentes. Die erhobenen OCR-Daten wurden normalisiert auf die Zellzahl, ermittelt durch Messung des DAPI-Fluoreszenzsignals (RFU).

Zur Beurteilung der Mitochondrien-Aktivität wurden die basale Respiration, die maximal erreichbare Respiration nach Stimulation der Atmungskette mit dem Entkoppler FCCP, die respiratorische Reservekapazität (SRC) sowie das „Protonen Leak“ herangezogen (vgl. Abbildung 3). Nach TGF- β Behandlung (2 ng/ml oder 10 ng/ml) waren keine wesentlichen Änderungen dieser mitochondrialen Aktivitätsparameter erkennbar. Es zeigten sich lediglich minimale und nicht signifikante Minderungen der respiratorischen Leistungen, sowohl basal als auch maximal und in der respiratorischen Reservekapazität. Da sich nach Kultivierung in G-SN signifikante Änderungen ergaben, die im Weiteren beschrieben und diskutiert werden, folgt die graphische Darstellung der Daten im entsprechenden Kapitel (Abbildung 22 bis Abbildung 25).

3.3.2 *SLUG-Expression*

Um zu untersuchen, ob die TGF- β bedingte Steigerung der ATP Produktion in HBVP durch die TGF- β vermittelte Expression von SLUG in diesen Zellen bedingt ist, wurde der Energieumsatz in SLUG-exprimierenden HBVP nach adenoviraler Infektion der Zellen mit 30 MOI Ad-CMV-SLUG-EGFP (Kontrolle: 30 MOI Ad-CMV-EGFP) gemessen. Die adenovirale Infektion per se (Ad-CMV-SLUG-EGFP und Ad-CMV-EGFP) bewirkte eine deutliche Steigerung der ATP-Produktion. Erhöhte SLUG-Level hingegen veränderten weder die Gesamt-ATP Produktionsrate (Abbildung 18) noch das Verhältnis zwischen oxidativ und glykolytisch erzeugtem ATP (ATP-Rate-Index Kontrolle: 2,64 +/- 0,86; ATP-Rate-Index Ad-CMV-SLUG-EGFP= 0,83 +/- 0,28; ATP-Rate-Index Ad-CMV-EGFP = 0,93 +/- 0,3477).

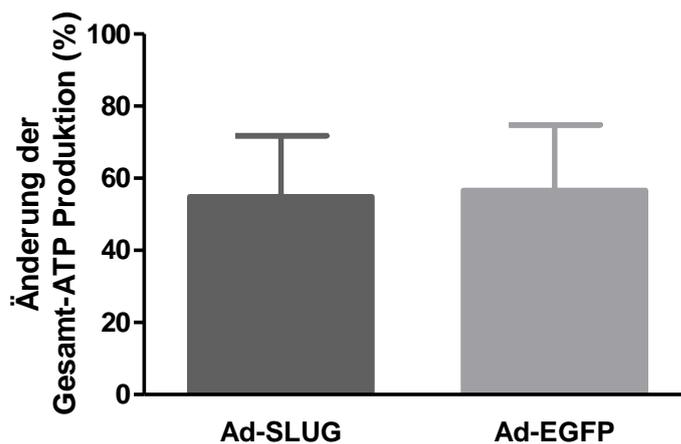


Abbildung 18: Änderung der Gesamt-ATP Produktion in SLUG-überexprimierenden HBVP

Mittels Seahorse XF Real Time ATP-Rate Assay wurde in Ad-CMV-SLUG-EGFP bzw. Ad-CMV-EGFP (30 MOI) infizierten HBVP die Gesamt-ATP Produktionsrate ermittelt. Dargestellt sind prozentualen Änderungen im Vergleich zu nicht infizierten HBVP (n=3, SEM).

3.3.3 *Gliomzell-konditioniertes Medium (G-SN)*

Neben TGF- β sezernieren Gliomzellen diverse weitere Faktoren mit potentielltem Einfluss auf den Metabolismus von HBVP. Durch Messung metabolischer Änderungen nach Kultivierung der Perizyten in G-SN lässt sich dieser Einfluss *in vitro* bestimmen.

3.3.3.1 Gesamt-ATP Produktionsrate und Verhältnis der Produktionswege

Während TGF- β die Gesamt-ATP Produktion signifikant erhöhte sowie die glykolytische Aktivität und ECAR steigerte, wurden die Gesamt-ATP Produktion und ECAR durch G-SN geringfügig und nicht signifikant reduziert (Abbildung 19, Abbildung 20). Änderungen des ATP-Rate-Index nach Behandlung von HBVP mit G-SN waren hoch variabel, die Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls nicht signifikant (Abbildung 21).

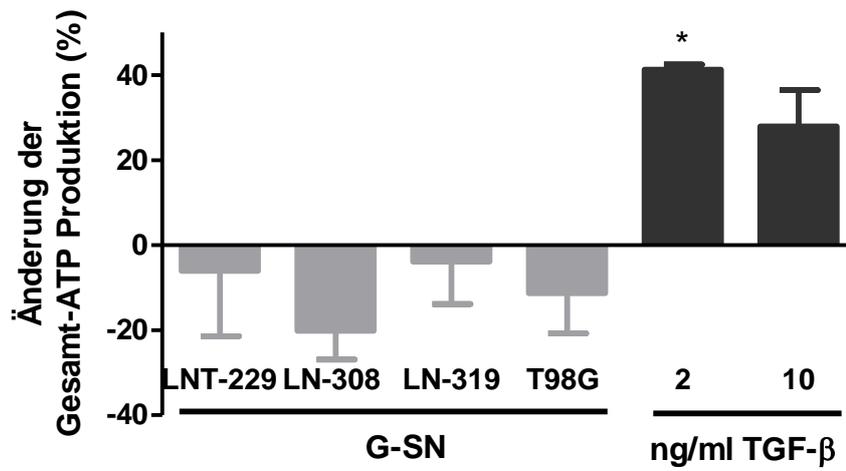


Abbildung 19: TGF- β bzw. Gliom-Überstand (G-SN)-vermittelte Änderung der Gesamt-ATP Produktion in HBVP

HBVP wurden für 16 Stunden in An- oder Abwesenheit von TGF- β oder G-SN kultiviert, anschließend wurde mittels Seahorse XF Real Time ATP-Rate Assay die Gesamt-ATP Produktion bestimmt. Dargestellt sind prozentuale Änderungen im Vergleich zur Kontrolle. Die für TGF- β gezeigten Werte entsprechen den in Abb. 14 bereits gezeigten Werten (n= 3, SEM, one-sample-t-Test, * = p<0,05).

Ergebnisse

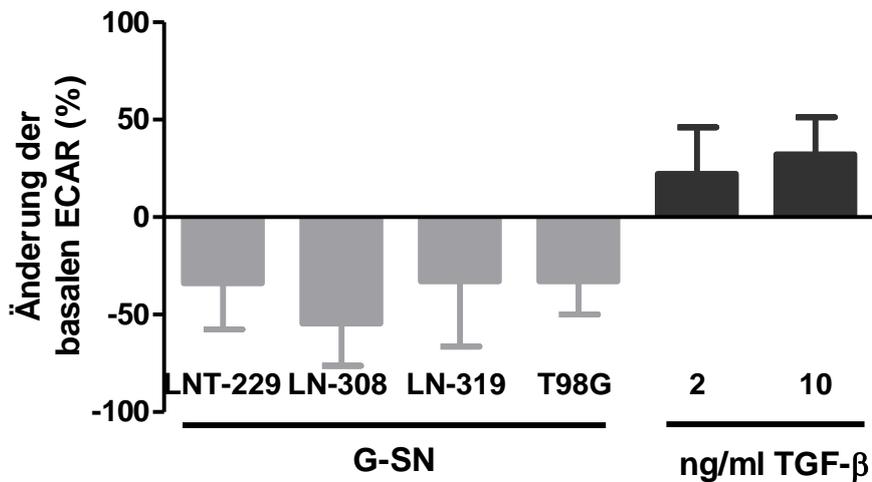


Abbildung 20: TGF-β bzw. Gliom-Überstand (G-SN)-vermittelte Änderung der extrazellulären Ansäuerung (ECAR) in HBVP

HBVP wurden für 16 Stunden in An- oder Abwesenheit von TGF-β oder G-SN kultiviert, anschließend wurde mittels des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests die basale ECAR bestimmt. Dargestellt sind prozentuale Änderungen im Vergleich zur Kontrolle. Die für TGF-β gezeigten Werte entsprechen den in Abb. 14 bereits gezeigten Werten (n=4, SEM).

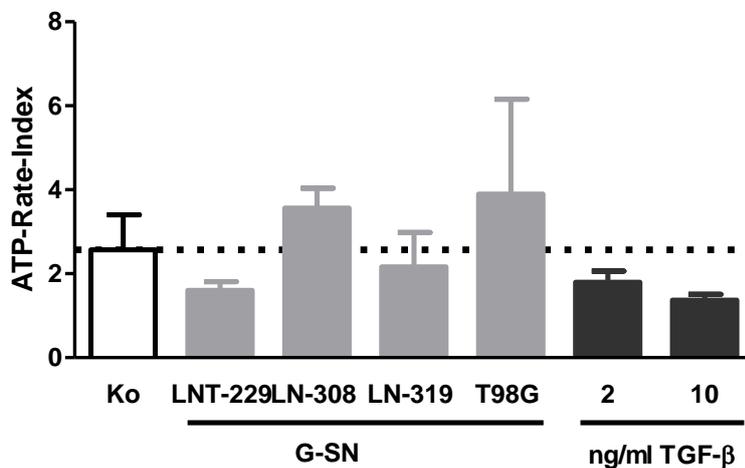


Abbildung 21: TGF-β bzw. Gliom-Überstand (G-SN)-vermittelte Änderung des ATP-Rate-Index in HBVP

HBVP wurden für 16 Stunden in An- oder Abwesenheit von TGF-β oder G-SN kultiviert, anschließend wurde mittels Seahorse XF Real Time ATP-Rate Assay der ATP-Rate-Index als Quotient des mitoATP/glykoATP bestimmt. Die gestrichelte Linie zeigt den ATP-Rate-Index der Kontrolle, der bei 2,57 liegt. Die für TGF-β gezeigten Werte entsprechen den in Abb. 15 gezeigten Werten (n=3, SEM).

3.3.3.2 Veränderungen der mitochondrialen Leistung

Während TGF- β in HBVP die Respirationsleistung und das „Protonen Leak“ nicht beeinflusste, war die **basale Respiration** nach Kultivierung von HBVP in G-SN um 11% (+/- 19; LN-319, n.s.) bis zu 59% (+/- 12; T98G, p=0,019) im Vergleich zur Kontrolle vermindert (Abbildung 22). Die **maximale Respiration** war ebenfalls reduziert (Abbildung 23). Dies bedingte eine verminderte **respiratorische Reservekapazität (SRC)**, die als Maß für die Anpassungsfähigkeit einer Zelle an einen sich ändernden Energiebedarf gilt (Divakaruni et al., 2014). Wie in Abbildung 24 dargestellt, war die SRC nach Kultivierung der Zellen in G-SN von LNT-229, LN-308 und T98G, nicht jedoch in G-SN von LN-319-Zellen signifikant vermindert. Die Behandlung der Zellen mit G-SN reduzierte zudem das mitochondriale „**Protonen Leak**“, signifikant jedoch nur nach der Kultivierung von HBVP in G-SN von T98G Zellen (- 87% +/- 18, p=0,0025), (Abbildung 25).

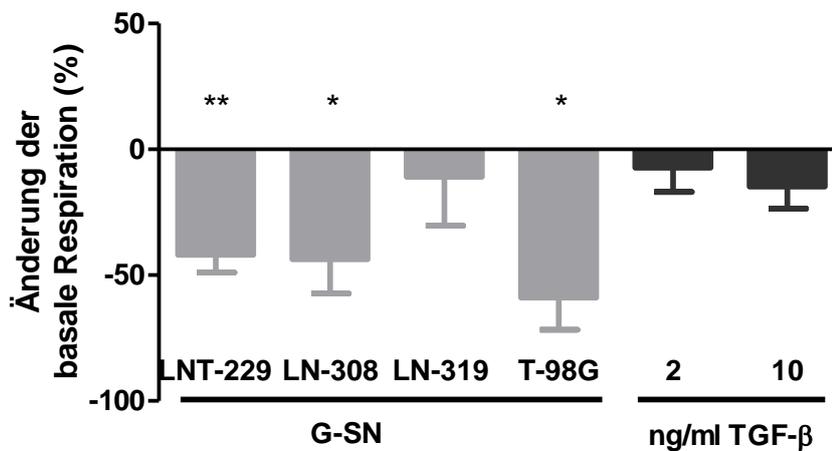


Abbildung 22 : TGF- β bzw. Gliom-Überstand (G-SN)- vermittelte Änderungen der basalen Respiration in HBVP

HBVP wurden für 16 Stunden in An- oder Abwesenheit von TGF- β oder G-SN kultiviert, anschließend wurde mittels des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests der basale Sauerstoffverbrauch bestimmt. Durch Subtraktion des extra-mitochondrial verbrauchten Sauerstoffanteils erhält man die basalen Respirationswerte. Aufgetragen sind prozentuale Änderungen der basalen Respiration im Vergleich zur Kontrolle (n=4, SEM, one-sample t-test, *=p<0,05, **p<0,01).

Ergebnisse

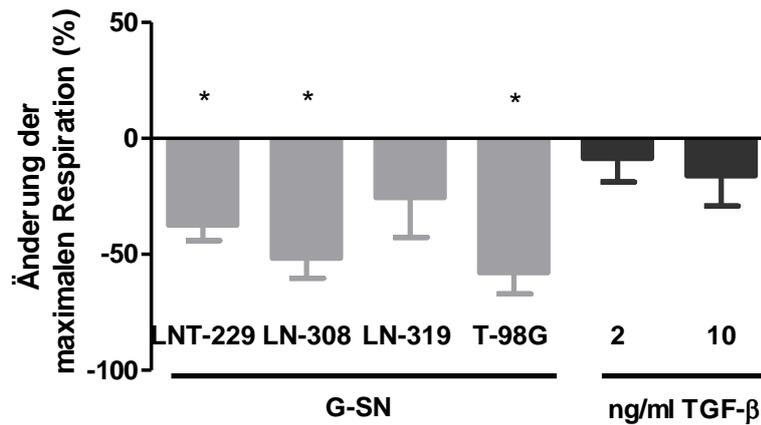


Abbildung 23: TGF-β bzw. Gliom-Überstand (G-SN)-vermittelte Änderungen der maximalen Respiration in HBVP

HBVP wurden für 16 Stunden in An- oder Abwesenheit von TGF-β oder G-SN kultiviert, anschließend wurde mittels des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests nach Stimulation mit FCCP der maximale Sauerstoffverbrauch bestimmt. Durch Subtraktion des extra-mitochondrial verbrauchten Sauerstoffs erhält man die maximale Respirationsleistung. Im Diagramm sind prozentuale Änderungen im Vergleich zur Kontrolle aufgetragen. n=4, SEM, one-sample t-test, *p<0,05, **p<0,01.

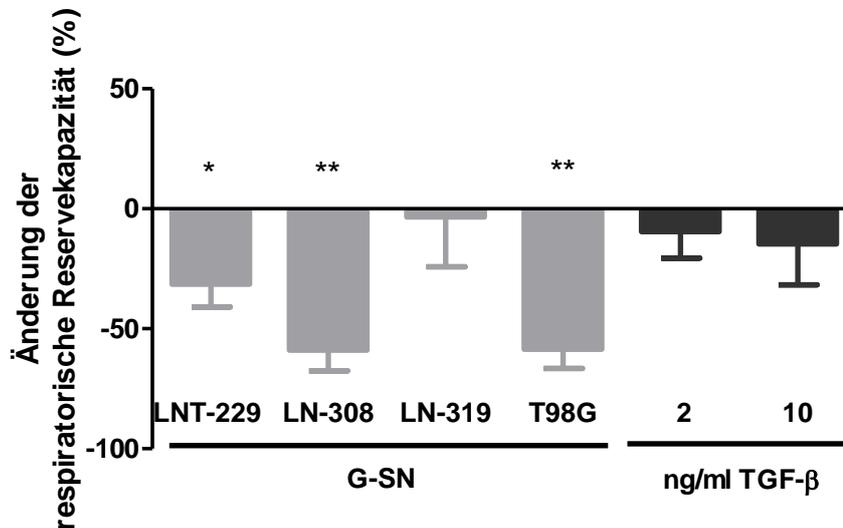


Abbildung 24: TGF-β bzw. Gliom-Überstand (G-SN)-vermittelte Änderungen der respiratorischen Reservekapazität (SRC) in HBVP

HBVP wurden für 16 Stunden in An- oder Abwesenheit von TGF-β oder G-SN kultiviert, anschließend wurde mittels des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests die SRC ermittelt. Diese beschreibt die Steigerungsfähigkeit der basalen zur maximalen Respiration. Im Diagramm sind prozentuale Änderungen im Vergleich zur Kontrolle dargestellt (n=4, SEM, one-sample t-test; *p<0,05, **p<0,01).

Ergebnisse

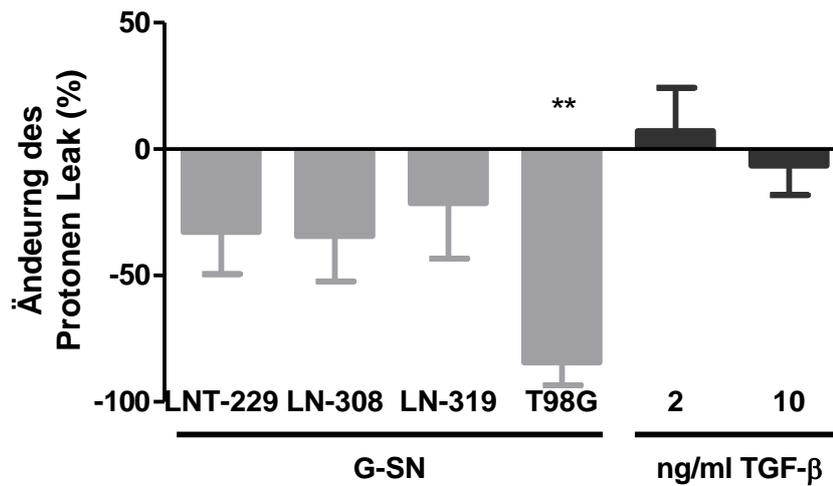


Abbildung 25: TGF-β bzw. Gliom-Überstand (G-SN)-vermittelte Änderungen des „Protonen Leak“ in HBVP

HBVP wurden für 16 Stunden in An- oder Abwesenheit von TGF-β oder G-SN kultiviert, anschließend wurde mittels des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests das „Protonen Leak“ bestimmt. Im Diagramm sind Änderungen im Vergleich zur Kontrolle aufgetragen (n=4, Fehlerbalken: SEM, **p<0,01, one-sample t-test)

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und in welchem Grad Gliomzellen via TGF- β Sekretion Perizyten-Funktionen modulieren und derart indirekt zum Integritätsverlust der BHS im GBM beitragen.

Die ausgeprägte und teils dysfunktionale Tumervaskularisierung ist ein wichtiger progressionsfördernder Faktor im GBM (Das und Marsden, 2013). In der zu Beginn der Arbeit formulierten Hypothese wurde postuliert, dass Perizyten-Dysfunktionen ursächlich an der Bildung der im Tumor vorherrschenden irregulären Gefäßstrukturen beteiligt sind. Möglicherweise moduliert von Gliomzellen sezerniertes TGF- β wichtige Perizyten-Funktionen derart, dass eine integrale BHS nicht aufrechterhalten werden kann.

4.1 Perizyten steigern die BHS-Integrität

Der Vergleich der in dieser Arbeit verwendeten BHS-Modelle (Mono-/ Doppel-/ Triple-Kulturen) zeigte, dass Perizyten essenziell für die Ausbildung einer intakten BHS sind. Während PBMVEC-Monokulturen eine sehr durchlässige Schranke bildeten, war die Integrität der Endothelzellbarriere in PBMVEC/HBVP-Kokulturen signifikant erhöht (Abbildung 6). Unsere Daten sind somit konform zu Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine Integritätssteigerung der *in vitro* BHS durch Kokultivierung von Endothelzellen mit Perizyten zeigten (Dohgu et al., 2005; Hayashi et al., 2004; Nakagawa et al., 2007). Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde in Perizyten-defizienten Mäusen ein Zusammenbruch der BHS sowie der gesamten Zirkulation im ZNS beobachtet (Nikolakopoulou et al., 2019). Weiterhin führte in Mäusen ein Mangel an Perizyten zur Bildung abnormer Blutgefäße mit fehlstrukturierten TJ (Hellström et al., 2001).

In weiteren Versuchsreihen wurden die Kultivierungsbedingungen der HBVP im verwendeten *in vitro* Modell variiert, was Änderungen der BHS-Integrität mit sich brachte. Während die BHS-Integrität durch Triple-Kultivierung mit Astrozyten verbessert wurde, sank sie nach Zugabe von TGF- β sowie unter dem Einfluss von Gliomzell-konditioniertem Medium (Abbildung 7, Abbildung 12). Die

genannten Modulatoren befanden sich jeweils im unteren Kompartiment der Kokulturen. Da die Zugabe an Tag 5, nach Ausbildung einer dichten BHS, erfolgte, konnte davon ausgegangen werden, dass die Diffusion der Faktoren über die semipermeable Membran und die zelluläre Barriere gering war. Dies bedeutete, dass TGF- β und andere von Gliomzellen sezernierte Faktoren fast ausschließlich Effekte auf abluminal wachsende HBVP hatten, wohingegen der direkte Einfluss auf die auf der Membranoberseite wachsenden Endothelzellen gering war und in dieser Studie nicht berücksichtigt wurde. Die beobachteten Änderungen der BHS-Integrität sind daher vermutlich vornehmlich auf veränderte HBVP-Eigenschaften und sekundär modifizierte Endothelzell-Perizyten-Interaktionen zurückzuführen.

4.1.1 **Kokultivierung mit Astrozyten erhöht die Integrität der BHS**

Im gesunden Gehirngewebe regulieren Astrozyten die Homöostase innerhalb der vaskulären Nische und haben großen Einfluss auf die Beschaffenheit der BHS (Cardoso et al., 2010). Durch direkten Einfluss der Astrozyten auf Endothelzellen der BHS kommt es *in vitro* zu einer verbesserten Schrankenbildung, unter anderem durch gesteigerte Expression TJ-assoziiierter Proteine in Endothelzellen (Abbott, 2002; Rubin et al., 1991; Sobue et al., 1999). Neben Endothelzellen beeinflussen Astrozyten auch Perizyten, wobei in einem *in vivo* Mausmodell gezeigt wurde, dass astrozytäres Laminin die Differenzierung von Perizyten beeinflusste und die perizytäre Expression von PDGFR, α -SMA und SM-22 α reduzierte. Ein adenoviral vermittelter Laminin-Knockdown in Astrozyten führte hingegen zum Integritätsverlust der BHS (Yao et al., 2014).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Triple-Kulturen von Endothelzellen und Perizyten mit immortalisierten Astrozyten (SV-GA Zellen) die BHS-Integrität steigerten (Abbildung 12). Da Laminin ein membranständiges Protein ist, im verwendeten Modell jedoch kein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen HBVP und SV-GA Zellen bestand, kann die Perizytenmodulation in diesem Modell vermutlich nicht auf einen Laminin-vermittelten Mechanismus zurückgeführt werden. Unsere Ergebnisse deuten stattdessen darauf hin, dass auch von Astrozyten

sezernierte Faktoren Perizyten funktionell modulieren und somit Einfluss auf die BHS-Integrität nehmen.

Anders als für SV-GA Zellen gezeigt, beeinflusste die Kokultivierung mit primären humanen Astrozyten (NHA) die BHS-Integrität nicht. Die Abweichungen könnten durch folgende Gegebenheiten bedingt sein: Zum einen proliferieren NHA deutlich langsamer als SV-GA Zellen und sind metabolisch weitaus inaktiver. Dies bedeutet, dass am Ende der Kultivierungszeit bei NHA-Kokultivierung weit weniger Zellen und folglich weniger von diesen Zellen sezernierte Faktoren im Medium vorhanden waren, als bei Kokultivierung mit SV-GA-Zellen. Außerdem exprimierten nur etwa 25% der Zellen der in dieser Studie verwendeten NHA-Zellkulturen das astrozytäre Markerprotein GFAP, es handelt sich demnach nicht um reine Astrozyten, sondern es lag eine Verunreinigung mit anderen Zellen vor. Das nicht vergleichbare Niveau des astrozytären Einflusses könnte die fehlenden Effekte der NHA-Zellen auf die BHS erklären.

Weiterhin könnten durch Langzeitkultur und Immortalisierung hervorgerufene Änderungen der Genexpression (Rocchio et al., 2019) in SV-GA-Zellen die Wirkunterschiede von NHA- und SV-GA Kokulturen bedingen. Zudem wurden immortalisierte Astrozyten von Price et al. (1999) als differenziert aber unreif beschrieben, wohingegen es sich bei den aus humanem Hirngewebe isolierten Astrozyten vermutlich um reife Zellen handelte. Auch diese Tatsache könnte die Differenzen der BHS-stabilisierenden Effekte der verwendeten Astrozyten erklären.

4.1.2 ***TGF- β vermindert die Integrität der BHS***

TGF- β wird von den meisten GBM in hohen Konzentrationen sezerniert (Roy et al., 2018) und vermittelt multiple Effekte sowohl auf Tumor- als auch auf Stromazellen. In HBVP modulierte TGF- β unter anderem deren Morphologie und steigerte Zellmotilität und Proliferation (unveröffentlichte Daten der AG Naumann). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass TGF- β eine signifikante Abnahme der BHS-Integrität induzierte (Abbildung 7). Die Spezifität der beobachteten TGF- β Wirkung wurde dadurch belegt, dass einerseits die

Diskussion

Zugabe eines unspezifischen Proteins (BSA) diesen Effekt nicht hervorrief, andererseits dadurch, dass die Zugabe des TGF- β -neutralisierenden Antikörpers 1D11 zum Medium bzw. zum Gliom-SN den TGF- β -induzierten Effekt nahezu komplett aufhob (Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 13).

Die Darstellung der TJs in Endothelzellen mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie ermöglichte eine qualitative Beurteilung der BHS (Abbildung 10). TJs waren insgesamt auf niedrigem Niveau ausgeprägt und formten kaum Verzweigungen, was auf eine geringe Komplexität hindeutet (Wolburg et al., 1994). Eine Erklärung hierfür ist die generelle Abnahme der TJ-Komplexität als Phänomen der *in vitro* Kultivierung von Endothelzellen (Wolburg et al., 1994). Nach TGF- β Behandlung war die TJ-Komplexität in PBMVEC weiter vermindert. Diese Beobachtung passt zur gemessenen Integritätsminderung. Die Tatsache, dass TGF- β eine Integritäts-Reduktion einer zuvor intakten BHS bewirkte, lässt darauf schließen, dass bereits bestehende Zell-Kontakte zwischen Endothelzellen abgebaut wurden. Von der Permeabilitätsstörung wären demnach nicht nur neu formierte Tumorblutgefäße, sondern auch bereits bestehende Gefäße betroffen. Ursache der TJ-Degradation könnten posttranslationale Modifikationen TJ-assoziiierter Proteine oder die Proteolyse dieser Proteine, z.B. durch MMPs, sein (Shigetomi und Ikenouchi, 2017; Rempe et al., 2016).

Obwohl TGF- β als bekannter EMT-Induktor die Expression von SLUG auch in HBVP induzierte, wurde die Integrität der *in vitro* BHS durch adenoviral induzierte Überexpression von SLUG nicht beeinträchtigt (Abbildung 11). SLUG ist demnach nicht der „downstream“ Signalgeber der TGF- β -vermittelten Reduktion der BHS-Integrität. Dennoch könnte der Integritätsverlust durch EMT-ähnliche Prozesse in HBVP bedingt sein. Andere EMT-Proteine, beispielsweise TWIST, welches neben SLUG ebenfalls in intratumoralen Perizyten des GBM nachgewiesen wurde, könnten die TGF- β Effekte vermitteln (Mader et al., 2018). Dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Andere Studien nennen mögliche Mechanismen, die den TGF- β vermittelten BHS-Integritätsverlust bedingen könnten. Perizyten sezernierten nach Kultivie-

zung in Anwesenheit von TGF- β vermehrt VEGF, MMP-2 und MMP-9 (Thanabalasundaram et al., 2011), wobei die gesteigerte MMP-Sekretion vermutlich durch Aktivierung der p38 MAPK erfolgte (Takahashi et al., 2014). Rustenhoven et al. (2016) zeigten, dass TGF- β *in vitro* in Perizyten diverse proinflammatorische Proteine wie MMP-2, COX-2 und NOX4 hochreguliert. MMPs wiederum degradieren in der NVU sowohl Basalmembran-Komponenten als auch TJ-assoziierte Proteine (Yang et al., 2007; Rempe et al., 2016), was in Folge zum Integritätsverlust der BHS führen könnte. Weiterhin wirken VEGF- sowie COX-2-abhängig produzierte Prostaglandine permeabilitätssteigernd auf Endothelzellen (Wang et al., 1996).

4.1.3 ***Gliomzell-sezernierte Faktoren vermindern die Integrität der BHS***

In Triple-Kulturen aus PBMVEC, HBVP und T98G Gliomzellen, bei denen HBVP in Gliomzell-konditioniertem Medium kultiviert wurden, zeigte sich ebenfalls eine leichte Reduktion der BHS-Integrität (Abbildung 13). Dieser Effekt wurde durch Zugabe des pan-TGF- β neutralisierenden Antikörpers 1D11 nahezu vollständig aufgehoben (Abbildung 8). Das bestätigte, dass der Integritätsverlust hauptsächlich über TGF- β vermittelt wurde, schließt jedoch nicht vollständig aus, dass, neben TGF- β , noch weitere von Gliomzellen sezernierte Faktoren oder ein direkter Kontakt von Gliomzellen und Perizyten Einfluss auf die BHS nehmen.

Während der Tumorinitiation und Progression modulieren zunehmend Gliomzellen die NVU, der Einfluss von Astrozyten hingegen wird reduziert, da Astrozyten von Tumorzellen verdrängt werden (Watkins et al., 2014). Kokulturen mit astrozytär differenzierten SV-GA-Zellen förderten die BHS-Integrität, wohingegen Kokulturen mit T98G Gliomzellen diese im Vergleich signifikant verminderten (Abbildung 12). Da es sich bei beiden Zelllinien um immortalisierte, ähnlich schnell proliferierende Zellen handelt, kann ausgeschlossen werden, dass der beobachtete BHS-Integritätsverlust bei Kokultivierung mit Gliomzellen durch Differenzen in der Anzahl der kokultivierten Zellen bedingt ist. Hingegen deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass im Tumor ein Wechsel von

physiologischen astrozytären Stimuli zu Gliomzeleinflüssen stattfindet und die damit steigende TGF- β Konzentration Perizyten-Funktionen moduliert, was letztlich zum Integritätsverlust der BHS beiträgt.

4.2 Limitationen des *in-vitro* Modells

Die *in vitro* erhobenen Daten lassen jedoch nur begrenzt eine Translation auf Verhältnisse zu, wie sie *in vivo* im Tumoreal und in der NVU vorliegen.

Während im *in vitro* BHS-Modell der Einfluss von TGF- β oder weiterer Gliomzell-sezernierter Faktoren auf HBVP begrenzt werden kann, haben diese Faktoren im Tumormilieu in der NVU auch Einfluss auf andere Zellpopulationen. Der Einfluss von TGF- β auf Endothelzellen wurde in der Arbeit von Ishihara et al. (2008) gezeigt, die Untersuchungen an einem Endothelzell-Monolayer-BHS-Modell durchführten. Sowohl die Kokultivierung der Endothelzellen mit Gliomzellen als auch die Zugabe von Gliomzell-konditioniertem Medium reduzierte die Integrität der BHS. Dieser Effekt konnte durch Neutralisierung der TGF- β Aktivität verringert werden (Ishihara et al., 2008). Dies legt nahe, dass im Tumormilieu die Wirkung von TGF- β nicht auf Perizyten beschränkt ist, sondern zumindest auch Endothelzellen durch TGF- β in ihrer Funktion moduliert werden. In Endothelzellen führte TGF- β zu einer verringerten Expression des TJ-Proteins Claudin-1 (Ishihara et al., 2008). In der endothelialen Zelllinie bEND förderte TGF- β die Expression von MMP-9 und reduzierte parallel die Expression des TJ-Proteins Claudin-5 (Mcmillin et al., 2015). Schneider et al. (2004) zeigten in *in vitro* Experimenten übereinstimmend, dass von Tumorzellen sezernierte Faktoren die Dichtigkeit einer Endothelzellschicht senkten. Dabei fiel der Tumorzell-induzierte Integritätsverlust bei niedrigmalignen Gliomen geringer aus als im hochmalignen GBM. In der vorliegenden Studie wurden Einflüsse von Gliomzellen und TGF- β auf Endothelzellen jedoch nicht untersucht und können aufgrund des verwendeten Versuchsaufbaus vermutlich vernachlässigt werden. Dies bedeutet jedoch, dass der in unserem Modell beobachtete, TGF- β vermittelte Integritätsverlust der BHS *in vivo* deutlich stärker sein könnte, da TGF- β bzw. weitere Gliomzell-sezernierte Faktoren dort Einfluss sowohl auf Perizyten und Endothelzellen als auch weitere Zellarten nehmen.

Außerdem könnte im Tumormilieu *in vivo* die Degradation der ECM, z.B. durch MMPs zum Integritätsverlust der BHS beitragen (Rempe et al., 2016), da Gliomzellen, insbesondere in Anwesenheit von TGF- β , erhöhte Level aktivierter MMPs aufweisen (Hur et al., 2000; Rooprai et al., 2000).

In vivo könnte eine gesteigerte Motilität von Perizyten ebenfalls zum Verlust der BHS-Integrität beitragen. Vorarbeiten durch Mitglieder der AG Naumann zeigten, dass TGF- β *in vitro* durch Hochregulation des EMT-Proteins SLUG die migratorische Aktivität von HBVP steigerte. Analog dazu belegten *in vivo* Studien, dass intratumorale Perizyten einen aktivierten und sehr motilen Phänotyp aufwiesen (Svensson et al., 2015). Auch eine Untersuchung an Perizyten, isoliert aus Neuroblastomen und Ependymomen, ergab für die tumorassoziierten Perizyten eine höhere migratorische Aktivität im Vergleich zu Perizyten aus gesundem Gewebe (Ribeiro et al., 2017). Eine gesteigerte Perizytenmigration führte bei der diabetischen Retinopathie zum Verlust der Perizyten und folglich zur Ausbildung abnormer Blutgefäße (Pfister et al., 2008). Eine gesteigerte Migration wurde auch bei inflammatorisch bedingten Schäden der BHS als Ursache für den Verlust von Perizyten und der BHS-Integrität diskutiert (Takata et al., 2011). Möglicherweise ist auch im GBM, durch gesteigerte Migration von Perizyten, eine suffiziente Interaktion zwischen Endothelzellen und Perizyten nicht möglich, was zum Integritätsverlust der BHS beitragen könnte. Darüber hinaus fungieren Perizyten bei der Ausbildung neuer Gefäße vermutlich als Leitstruktur für Endothelzellen (Ribatti et al., 2011; Gerhardt und Betsholtz, 2003) oder formieren eigene Gefäße (Ozerdem und Stallcup, 2003). Schnell migrierende Perizyten könnten möglicherweise keine stabile Leitstruktur-Funktion mehr ausüben und somit die chaotische Struktur Gliom-assoziiierter Gefäße erklären.

Ein weiterer Mechanismus, der in den *in vitro* Modellen nicht berücksichtigt wurde, *in vivo* aber zum Tragen kommt, ist der Gliomzell-Einfluss durch direkte Zell-Zell-Kontakte. So nehmen Tumorzellen bei der Gefäßkooption Einfluss auf Zellen der NVU (Caspani et al., 2014).

4.3 TGF- β und Gliomzell-Überstände modulieren metabolische Prozesse in Perizyten

4.3.1 TGF- β steigert die ATP-Produktion in Perizyten

Änderungen der Zellmotilität sind oft mit Änderungen im Metabolismus von Tumorzellen verknüpft. Gliomzellen, die vermehrt aerobe Glykolyse zur Energiegewinnung nutzen, sowie Gliomzellen unter hypoxischen Bedingungen zeigen ebenso wie Gliomzellen in Anwesenheit von TGF- β eine erhöhte Migrationskapazität (Ilina et al., 2017; Velásquez et al., 2019; Merzak et al., 1994). Daher stellte sich die Frage, ob Gliomzellen, speziell durch Sekretion von TGF- β , den Stoffwechsel und energiegewinnende Prozesse auch in Perizyten beeinflussen, in denen bereits eine TGF- β induzierte Steigerung der Zellmotilität gezeigt wurde (unveröffentlichte Daten der AG Naumann). Wir konnten zeigen, dass TGF- β *in vitro* die Gesamt-ATP Produktion in HBVP steigerte. Für hohe TGF- β Konzentrationen (10 ng/ml) zeichnete sich zudem ein tendenziell erniedrigter ATP-Rate-Index (mitoATP/glykoATP) ab. Dies deutet auf eine vermehrte Aktivierung glykolytischer Prozesse hin (Abbildung 14, Abbildung 15). Die nach TGF- β Behandlung tendenziell erhöhte ECAR spricht ebenfalls für eine stärkere Protonen-Anhäufung bei erhöhter Glykolyseaktivität (Abbildung 16).

Im Vergleich mit anderen Studien, welche TGF- β als metabolischen Modulator an unterschiedlichen Geweben untersuchten, ergeben sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch Abweichungen zu unseren Ergebnissen: In Zellen des hepatozellulären Karzinoms wurde durch TGF- β die oxidative Leistung vermindert, was bei unbeeinflusster glykolytischer Aktivität entgegen unserer Ergebnisse insgesamt zu einer verminderten ATP-Produktion führte (Soukupova et al., 2017). Casalena et al. (2012) konkludierten in ihrem Review, dass TGF- β die mitochondriale ATP-Produktion verringerte. Jiang et al. (2014) beobachteten hingegen, übereinstimmend mit unseren Daten, eine TGF- β bedingte Steigerung der ATP-Produktion in einer Zelllinie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, dort war jedoch die oxidative Energiegewinnung verstärkt (Jiang et al., 2014). Analog zu unseren Daten induzierte TGF- β in primären mesenchymalen Zellen mit gesteigerter glykolytischer Aktivität einhergehende Warburg-ähnliche Effekte. Ursache hierfür war vermutlich die Stabilisierung von HIF-1 α und die

HIF-abhängige Expression von LDH-A oder GLUT-1 (Young et al., 2014). Zusammenfassend kann daher postuliert werden, dass TGF- β in die Steuerung metabolischer Aktivität involviert ist, jedoch sind diese Effekte kontextabhängig und sehr pleiotrop. In HBVP beobachteten wir eine Steigerung der glykolytischen Energiegewinnung.

Metabolische Änderungen können auch durch Aktivierung EMT-ähnlicher Prozesse bedingt sein, wobei diese Effekte ebenfalls pleiotrop sind (Sciacovelli und Frezza, 2017). Mesenchymale Tumorzellen wiesen im Vergleich zu Tumorzellen mit epitheliale Phänotyp höhere Glykolyseraten auf (Shiraishi et al., 2015). Der Glukosetransporter GLUT-3, welcher TGF- β -abhängig in verschiedenen Tumorzellen hochreguliert wird, ist ein Zielgen des EMT-Proteins ZEB-1 (Masin et al., 2014; Hua et al., 2019). Die von Jiang et al. (2014) beobachtete, TGF- β -bedingte Steigerung oxidativer Energiegewinnung wurde durch Überexpression des EMT-Proteins SNAIL induziert. Entgegen dieser Beobachtungen hatte die erhöhte Expression von SLUG, zumindest in HBVP, keinen Einfluss auf deren Energiegewinnung (Abbildung 18). Diese Beobachtung widerlegt die Hypothese, dass TGF- β die Energieproduktion in HBVP über Hochregulation der SLUG/SNAI2 Expression steigert, schließt jedoch nicht aus, dass andere EMT-Proteine, so z.B. SNAIL/SNAI1 oder TWIST, diese Prozesse in HBVP steuern.

Es wäre jedoch ebenfalls denkbar, dass TGF- β in HBVP zunächst den Zellmetabolismus moduliert und diese Änderungen dann sekundär EMT-ähnliche Prozesse induzieren, wodurch SLUG hochreguliert und die Zellen zur Migration angeregt werden. In der Literatur wurde, zumindest in Tumorzellen, die Induktion von EMT durch primäre Expressionsänderung metabolischer Enzyme bereits beschrieben (Morandi et al., 2017; Sciacovelli und Frezza, 2017). Beispielsweise führte die Überexpression des glykolytischen Enzyms Glucose-6-Phosphat-Isomerase in neoplastischen und nicht-neoplastischen Mammaepithelzellen, via Aktivierung von NF κ B, zur erhöhten Expression der EMT-Proteine ZEB1 und 2 (Ahmad et al., 2011). Die Reduktion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in Kolonkarzinom-Zellen resultierte, neben niedrigeren Glykolyseraten, auch in einer Reduktion der SNAIL Expression und Blockade von EMT-Prozessen (Liu et al., 2017).

4.3.1.1 Funktionelle Bedeutung der gesteigerten ATP-Produktion in Perizyten

Die TGF- β -vermittelte Erhöhung der produzierten ATP-Menge könnte für energieverbrauchende Prozesse während der gesteigerten Migration von Perizyten, wie sie nach Behandlung mit TGF- β beobachtet wurde, benötigt werden. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass es sich bei dem vermehrt produzierten ATP insbesondere um ATP handelt, das mittels Glykolyse generiert wurde. Glykolyse findet im Vergleich zur OxPhos auch im Zytosol kleiner Zellausläufer statt und ermöglicht daher die Energiebereitstellung in den Zellfortsätzen, in denen ein erhöhter Energiebedarf während migratorischer Prozesse besteht (De Bock et al., 2013). Glykolyseaktivität geht in Tumorzellen (Yizhak et al., 2014; Shiraishi et al., 2015), Myozyten (Padhi et al., 2020) und Endothelzellen (Fitzgerald et al., 2018) mit größerer Zellmotilität einher. In glattmuskulären Gefäßwandzellen konnte die durch PDGF-Behandlung gesteigerte Migration durch Hemmung glykolytischer Enzyme unterbunden werden. Dies deutet darauf hin, dass Glykolyse für Zellbewegung essenziell ist (Heiss et al., 2016). Hemmung der Glykolyse speziell in tumor-assoziierten Perizyten verringerte deren Aktivitätsniveau, reduzierte sowohl Migration als auch Proliferation und verbesserte die Adhärenz an Endothelzellen (Cantelmo et al., 2016). Man könnte also postulieren, dass die gesteigerte ATP-Produktion in Zusammenhang mit der Zellmotilität der HBVP steht. Möglicherweise steigert Gliom-sezerniertes TGF- β im Tumormilieu zunächst die Glykolyseaktivität in HBVP. In Folge werden EMT-Prozesse eingeleitet und Perizyten dadurch migratorisch „hyperaktiv“, was möglicherweise die Homöostase zwischen Endothelzellen und Perizyten während neoangiogener Prozesse stört. Dies könnte in Folge zu einer undichten Gefäßwand neu gebildeter Gefäße führen und derart den Verlust einer integren BHS im Tumor mitbedingen (Abbildung 26). Um die hier vermuteten Zusammenhänge zu überprüfen bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. Durch die TGF- β -vermittelte, gesteigerte Energieproduktion entstehen vermehrt Metabolite, die von Perizyten ins Stroma abgegeben werden. Der Hauptmetabolit, der bei anaerober Glykolyse entsteht, ist Laktat. Oft besteht eine Korrelation zwischen produzierter Laktatmenge und der Erhöhung der ECAR

(Divakaruni et al., 2014). Die durch TGF- β -induzierten, tendenziell erhöhten ECAR-Werte in HBVP könnten somit auf erhöhte Laktatkonzentrationen hindeuten (Abbildung 16). Für Laktat sind proangiogene Wirkungen auf Endothelzellen beschrieben (Uebelhoer und Iruela-Arispe, 2016). Weiterhin wären autokrine Laktateffekt denkbar. Yamanishi et al. (2006) beschrieben, dass es unter hypoxischen Bedingungen, welche im Tumor vorliegen, zu einer Laktat-vermittelten Relaxation von Perizyten und damit zur Vasodilatation kam. Das könnte, zumindest partiell, die Dilatation von Tumorblutgefäßen erklären.

4.3.2 **Vergleich zwischen TGF- β und Gliomzell-Überstand**

Metabolische Änderungen in HBVP nach Kultivierung in Gliomzell-Überstand (G-SN) waren bei allen verwendeten GBM-Zellen ähnlich, wichen jedoch stark von den Änderungen nach Kultivierung in Anwesenheit von TGF- β ab (Abbildung 19 bis Abbildung 25). G-SN bewirkte, im Gegensatz zu TGF- β , keine Steigerung der ATP-Produktion, sondern einen, wenn auch nicht signifikanten, Abfall (Abbildung 19). Stattdessen kam es nach Kultivierung in G-SN zu signifikanten Änderungen mitochondrialer Aktivitätsparameter wie einer Erhöhung der respiratorischen Reservekapazität und des „Protonen Leaks“, die in Anwesenheit von TGF- β allenfalls marginal zu beobachten waren. In G-SN sind neben TGF- β diverse weitere, Gliom-sezernierte Faktoren präsent, die bedingen könnten, dass die Kultivierung in TGF- β haltigen G-SN die metabolische Aktivität in HBVP in anderer Weise beeinflusst, als die alleinige Zugabe von TGF- β zum Kulturmedium. Zusätzliche Faktoren beeinflussen möglicherweise TGF- β -vermittelte Effekte oder heben diese sogar auf. Interaktionen könnten dabei auf mehreren Ebenen erfolgen: (i) GBM-sezernierte Faktoren könnten eigenständig TGF- β -konträre Wirkungen vermitteln, (ii) Interaktionen könnten die Rezeptorbindung von TGF- β beeinflussen, (iii) durch Gliom-sezernierte Faktoren könnten nicht-kanonische, SMAD-unabhängige TGF- β -Signalwege moduliert werden (Massagué, 2012), da deren Aktivierungsstatus zusätzlich durch andere Rezeptoren wie PDGFR, EGFR oder den *Insulin-like growth factor Rezeptor* (IGFR) beeinflusst wird (Guo und Wang, 2009), (iv) weitere in G-SN vorhandene Faktoren könnten, durch vermehrten Abbau oder verstärkte Expression bestimmter

Kofaktoren, TGF- β Effekte modifizieren, indem die Expression verschiedener TGF- β Zielgene gefördert oder verhindert wird. In welchem Ausmaß solche Interaktionen *in vivo* stattfinden, und wie relevant die beschriebenen TGF- β Wirkungen sind, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilen.

4.3.3 Gliomzell-Überstand ändert den mitochondrialen Stoffwechsel in HBVP

Änderungen der ATP Produktionsrate oder ECAR bilden in erster Linie kurzfristige Anpassungen der Energieproduktion an sich ändernde Anforderungen ab. Eine Zunahme der ATP-Produktionsrate war nach Kultivierung von HBVP in TGF- β haltigem Medium, nicht aber in G-SN erkennbar (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu spiegeln Änderungen der maximalen respiratorischen Kapazität und des „Protonen-Leaks“ längerfristige Adaptionen durch veränderte Auf- und Abbauraten metabolischer Enzyme wider (Mookerjee et al., 2016). G-SN bewirkten in HBVP eine deutliche Reduktion der basalen und maximalen Respiration, der respiratorischen Reservekapazität sowie des „Protonen-Leaks“, wohingegen die Kultivierung in TGF- β haltigem Medium keine Änderungen induzierte (Abbildung 22 bis Abbildung 25).

4.3.3.1 In HBVP wird die respiratorische Reservekapazität durch Gliomzell-Überstand reduziert

Die respiratorische Reservekapazität (SRC) wird definiert als die Differenz zwischen der basalen Respiration und der maximalen Respiration nach Stimulationen mit Ionophoren wie FCCP (Divakaruni et al., 2014). Die verminderte SRC der HBVP nach Kultivierung in G-SN (Abbildung 24) ist dabei vermutlich auf eine signifikant erniedrigte maximale Respirationsleistung (Abbildung 23) zurückzuführen. Respiration und oxidative Leistungen der Atmungskette sind nach FCCP-Zugabe von der Funktion der ATP-Synthase entkoppelt. Deshalb kann mit den SRC-Daten keine Aussage über oxidativ erzeugtes ATP, sondern lediglich über die oxidative Leistung der Atmungskette via Komplex I-IV gemacht werden.

Diskussion

Die maximale respiratorische Leistung wird vor allem durch Substratangebot und Transport sowie durch die Mitochondrienzahl beeinflusst (Divakaruni et al., 2014). Da die Zellen unabhängig von der vorhergehenden Behandlung vor Messbeginn alle im selben Messmedium aufgenommen wurden, können Unterschiede im Substratangebot als Ursache für eine verringerte SRC ausgeschlossen werden. Unterschiede im Vorhandensein von Membrantransportern, die den Substrattransport in Mitochondrien regulieren, stellen hingegen eine mögliche Erklärung für eine verminderte maximale Respirationsleistung dar. Eine geringere Anzahl funktionsfähiger Mitochondrien könnte die erniedrigte SRC ebenfalls erklären, wobei die Mitochondrienanzahl beispielsweise durch Mitophagie reduziert werden kann. Mitophagie wurde in CAF nach TGF- β Behandlung beobachtet (Guido et al., 2012). Gegen eine TGF- β -vermittelte Mitophagie in HBVP spricht die Tatsache, dass die SRC in HBVP bei Kultivierung in Anwesenheit von TGF- β nahezu unverändert war. Dennoch ist es denkbar, dass TGF- β in HBVP, im Zusammenspiel mit anderen im Überstand vorhandenen Faktoren, ähnliche Änderungen wie in CAF bewirkte und Mitophagie induzierte.

In Bezug auf die funktionelle Bedeutung der SRC postulierten Nickens et al. (2013), dass Zellen mit höherer SRC Apoptose-resistenter sind. Pflieger et al. (2015) zeigten, dass eine Erhöhung der SRC Muskelzellen resistenter gegen Zelltodsignale nach Substratdeprivation machte. Das könnte bedeuten, dass HBVP unter dem Einfluss von Gliomzellen weniger Apoptose-resistent sind. Eine erhöhte Apoptoserate intratumoraler Perizyten könnte die im Tumor herrschende irreguläre Angiogenese und in Folge den Verlust einer intakten BHS im Tumorareal erklären.

Pluripotente Zellen und embryonale Stammzellen weisen niedrige SRC-Werte auf (Yan et al., 2017). Dies stützt die Hypothese, dass Perizyten im Tumormilieu vermehrt stammzellähnliche Eigenschaften annehmen. Perizyten der Hirngefäße besitzen die Fähigkeit, in verschiedene Zellarten zu differenzieren und Stammzell-assoziierte Oberflächenmarker zu exprimieren (Dore-Duffy et al., 2006; Santos et al., 2019; Ribeiro und Okamoto, 2015). Gliom-assoziierte Perizyten im Speziellen exprimierten den Stammzellmarker CD90, wobei die Expressionsstärke mit dem Malignitätsgrad des Tumors korrelierte

(Ochs et al., 2013). Da stammzellassoziierte Eigenschaften unter anderem durch EMT-ähnliche Prozesse hervorgerufen werden (Tang et al., 2016), könnte ein Zusammenhang des (De)differenzierungsstatus dieser Zellen mit der erhöhten SLUG-Expression bestehen, die für Perizyten in Proliferaten GBM-assoziiierter Gefäße beschrieben wurde (Mader et al., 2018). Falls die SRC-Minderung der in G-SN-kultivierten HBVP in diesen Zellen stammzellähnliche Eigenschaften induziert, könnte dies zur Tumorprogression beitragen. Jedoch sind umfangreiche weitere Untersuchungen notwendig, um diese Hypothesen zu be- oder widerlegen.

4.3.3.2 In HBVP wird das „Protonen Leak“ durch Gliomzell-Überstände reduziert

Unabhängig von der mitochondrialen ATP-Produktion wird ein Teil der oxidativen Leistung aufgewendet, um das „Protonen-Leak“ auszugleichen und so den elektrochemischen Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran als Triebkraft für die ATP-Synthese aufrecht zu erhalten. Kultivierung von HBVP in G-SN führte, signifikant allerdings nur für SN von T98G-Zellen, zu einer Verminderung des „Protonen-Leaks“ (Abbildung 25). Die Höhe des „Protonen-Leaks“ ist in erster Linie von der Dichtheit der inneren Mitochondrienmembran sowie von dem bestehenden elektrochemischen Gradienten abhängig (Divakaruni et al., 2014). Änderungen des „Protonen-Leaks“ beeinflussen die Kopplungseffizienz zwischen Substratoxygenierung in den Komplexen I bis IV der Atmungskette und der ATP-Produktion im Komplex V, wobei ein niedriges Protonen-Leak mit einer hohen Kopplungseffizienz einhergeht (Divakaruni und Brand, 2011). Der physiologische Nutzen des „Protonen-Leaks“ liegt in der Minimierung anfallender reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) (Divakaruni und Brand, 2011).

Das erniedrigte „Protonen-Leak“ in HBVP bei Kultivierung in G-SN verstärkt vermutlich die mitochondriale ROS-Produktion, dies kann zu oxidativem Stress und Schädigung der Perizyten führen. Gesteigerte mitochondriale ROS-Produktion kann in einer Schädigung und dem Verlust von Perizyten resultieren

Diskussion

(Shah et al., 2013). Parallel können ROS Auto- und Mitophagie induzieren, dies könnte, wie oben diskutiert, in Folge eine Reduktion der SRC bewirken (Weinberg et al., 2019). Weiterhin sind ROS wichtige Regulatoren der Homöostase und beeinflussen intrazelluläre Signalkaskaden. Mitochondriale ROS stabilisieren den Transkriptionsfaktor HIF, wodurch angiogene Signale verstärkt werden (Weinberg et al., 2019). Das verminderte „Protonen-Leak“ in HBVP könnte somit via erhöhtem oxidativem Stress, der in Perizytenschädigung und HIF-Stabilisierung resultiert, zur Bildung dysfunktionaler Blutgefäße beitragen und pro-tumorigen wirken.

Arbeiten, die metabolische Prozesse in intratumoralen Perizyten beschreiben, sind nach unserem Wissen in der Fachliteratur leider nicht vorhanden, somit konnte in der vorliegenden Studie auf nur wenig Wissen zurückgegriffen werden. Die in dieser Studie erhobenen Daten liefern erste Ansätze wie Gliomzellen, via Modulation von Perizyten-Funktionen, Einfluss auf tumor-assoziierte neoangiogene Prozesse und die intratumorale Gefäßstruktur nehmen (Abbildung 26). Jedoch bedürfen alle hier diskutierten Überlegungen weiterer intensiver Forschungsarbeit, um die aufgestellten Hypothesen zu be- oder widerlegen.

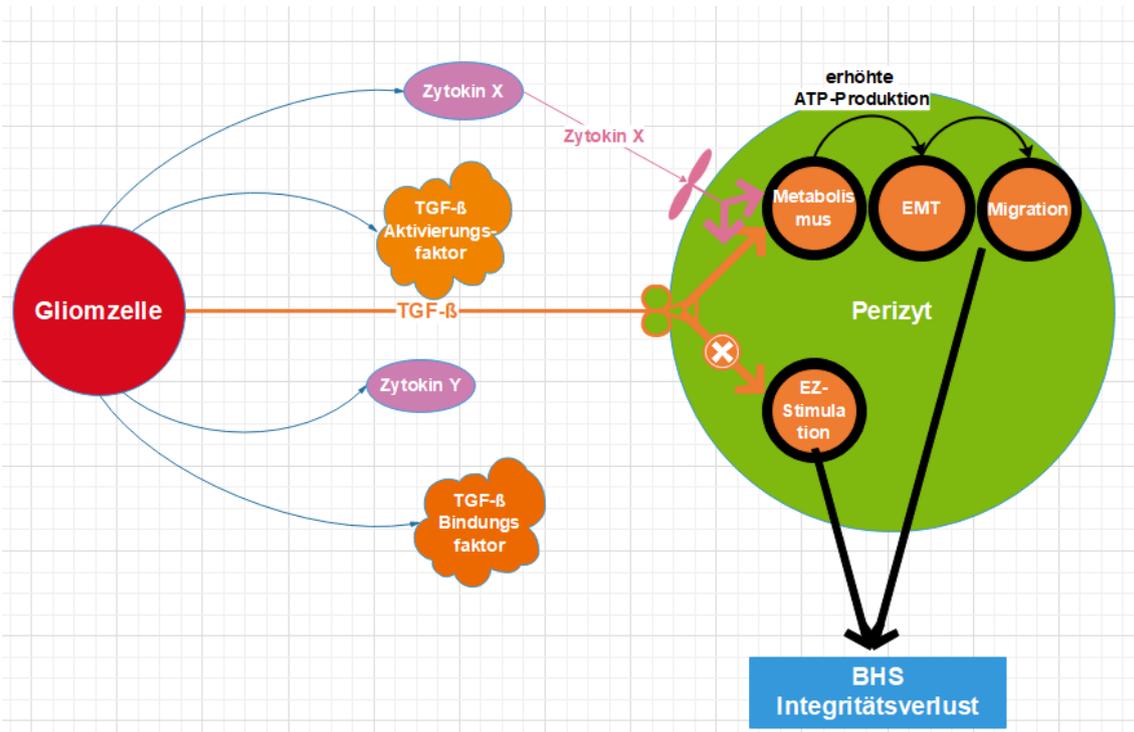


Abbildung 26: Modell des Einflusses von Gliomzellen auf Perizyten via TGF- β

Die Abbildung stellt schematisch ein Modell zum Einfluss von Gliomzellen auf intratumorale Perizyten dar. TGF- β wird von Gliom-Zellen in hohen Konzentrationen sezerniert. Die TGF- β Wirkung wird maßgeblich durch weitere GBM-sezernierte Faktoren beeinflusst. TGF- β moduliert Perizyten-Funktionen und hemmt so die Interaktion von Endothelzellen (EZ) und Perizyten sowie folglich die Ausbildung von TJ in den Endothelzellen. Weiterhin erhöht TGF- β in HBVP die ATP-Produktionsrate. Möglicherweise bewirken diese metabolischen Änderungen in Folge EMT-ähnliche Prozesse, einhergehend mit vermehrter Motilität von Perizyten. Schnelle Migration könnte wiederum die Endothelzell-Perizyten-Interaktion negativ beeinflussen und somit zum Integritätsverlust der BHS im Tumor führen. Neben diesen direkten TGF- β Effekten bewirkten Gliomzellen weitere metabolische Veränderungen. Diese sind möglicherweise auf alternative TGF- β Signalwege oder Aktivierung TGF- β -unabhängiger Zytokin-Signalwege zurückzuführen.

4.4 Klinische Relevanz für zukünftige Therapieansätze

Trotz der genannten Limitationen geben die vorliegenden *in vitro* Ergebnisse erste Anhalte dafür, dass Funktionsstörungen tumorassoziierter Perizyten zum Integritätsverlust der intratumoralen BHS beitragen. Ähnlich wie für Diabetes mellitus beschrieben, könnten im GBM perizytäre Defekte der primäre Grund für dysfunktionale Gefäße und die defekte BHS sein (Gerhardt und Betsholtz, 2003). Perizyten-Funktionsstörungen wurden auch als Ursache für die

Gefäßveränderungen bei Multipler Sklerose, Alzheimer, Traumata und Schlaganfällen diskutiert (Cheng et al., 2018). Perizyten gelten daher für viele neurologische Erkrankungen ebenso wie für diverse Tumorerkrankungen als potentieller therapeutischer Angriffspunkt für neue anti-angiogene Therapiekonzepte (Meng et al., 2014; Rybinski et al., 2015).

Bezogen auf Tumorerkrankungen wurden bereits anti-angiogene Therapieansätze verfolgt. Dabei wurde insbesondere durch Blockierung des VEGF-Signalweges versucht, Neoangiogenese im Tumor zu verhindern, um durch Sauerstoff- und Nährstoffdeprivation das Tumorstadium zu verringern. Ein häufiges Problem und limitierender Faktor waren große hypoxische Areale, die pro-tumorigen und invasionsfördernd wirkten, weshalb mittlerweile die Normalisierung dysfunktionaler Tumorblutgefäße angestrebt wird (Martin et al., 2019). Dieser Ansatz könnte gewährleisten, dass der in Tumorgefäßen gestörte Transport von Sauerstoff und Nährstoffen, aber auch von Tumortherapeutika, verbessert werden könnte und somit BHS-gängige Therapeutika besser in das Tumoraerial transportiert werden würden. Dass der Ansatz einer Gefäßnormalisierung in der Behandlung solider Tumoren ein vielversprechendes Therapiekonzept ist, zeigten aktuelle Studien (Park et al., 2016; Mathivet et al., 2017). Perizyten wurden bereits in mehreren, insbesondere präklinischen Modellen verschiedener Tumorentitäten, als therapeutische Zielstruktur evaluiert, wobei Perizyten-Funktionen sowohl stimuliert als auch gehemmt wurden (Meng et al., 2014). Inwieweit Perizyten im GBM therapeutisch beeinflusst werden können und als Zielzellen im Rahmen der Gefäßnormalisierung dienen, werden zukünftige Forschungsarbeiten zeigen.

Da die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass TGF- β Perizyten-Funktionen und deren Metabolismus moduliert und zum Integritätsverlust der BHS beiträgt, ist es denkbar, dass eine Blockade von TGF- β assoziierten Signalwegen in intratumoralen Perizyten Dysfunktionen entgegenwirkt und zur Gefäßnormalisierung beitragen könnte. Sowohl in präklinischen als auch in klinischen Studien kamen bereits TGF- β neutralisierende Therapien zum Einsatz, welche neben Perizyten auch Gliom- und weitere Stromazellen beeinflussen. Im GBM wurden der

Diskussion

Tyrosin-Kinase Inhibitor Galunisertib (Holmgaard et al., 2018; Yingling et al., 2017; Brandes et al., 2016) sowie die Antikörper Trastuzumab (Bogdahn et al., 2011; Wick und Weller, 2011) und Fresolimumab (Akhurst, 2017) getestet. Keiner der Wirkstoffe zeigte im GBM zufriedenstellende Wirkung.

5 Zusammenfassung

Das Glioblastom ist der bösartigste Hirntumor des Erwachsenen, dessen ausgeprägte und oft dysfunktionale Vaskularisierung ein wichtiger progressionsfördernder Faktor ist. Wir vermuten, dass Gliom-induzierte Perizyten-Dysfunktionen zur gestörten Gefäßarchitektur und dem Integritätsverlust der intratumoralen BHS beitragen.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von TGF- β und Gliomzell-Überständen (G-SN) auf Perizyten und die Integrität der BHS untersucht. An einem *in vitro* BHS-Modell aus primären mikrovaskulären Endothelzellen des Schweinegehirns (PBMVEC) und humanen zerebralen Perizyten (HBVP) zeigten wir, dass Gliomzellen via TGF- β Sekretion die BHS-Integrität negativ beeinflussten, vermutlich nicht nur durch die bereits beschriebene Modulation von Endothelzellen, sondern insbesondere durch Modulation von Perizyten-Funktionen und deren Metabolismus.

Mit der Seahorse Technologie durchgeführte Messungen der metabolischen Aktivität zeigten, dass TGF- β die ATP-Produktion in Perizyten, insbesondere mittels Glykolyse, steigerte. Möglicherweise besteht dabei ein Zusammenhang zur TGF- β bedingten Steigerung der Perizytenmotilität. Untersuchungen hierzu waren jedoch nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Im Gegensatz zu TGF- β steigerten G-SN die ATP-Produktion in Perizyten nicht. Stattdessen waren nach Kultivierung in G-SN nicht aber nach Kultivierung in TGF- β haltigem Medium die respiratorische Reservekapazität und das mitochondriale „Protonen-Leak“ vermindert, was möglicherweise zu vermehrt progressionsfördernden Perizyten-Eigenschaften führt. Wir vermuten, dass Interaktionen mit weiteren Gliomzell-sezernierten Faktoren aus dem Überstand die TGF- β Wirkung modulieren.

Weder die TGF- β vermittelte Reduktion der BHS-Integrität noch die Steigerung der ATP-Produktion wurden „downstream“ über das EMT-Protein SLUG vermittelt, welches in intratumoralen Perizyten TGF- β vermittelt überexprimiert wird.

Um zu klären, ob Perizyten-Funktionen auch *in vivo* relevant durch Gliom-sezerniertes TGF- β moduliert werden, bedarf es weiterer Forschung, die

Zusammenfassung

evaluieren sollte, ob Perizyten als Zielstrukturen für Gefäß-normalisierende Therapieansätze geeignet sind.

6 Summary

Glioblastoma is the most malignant brain tumor in adults and the pronounced and often dysfunctional vascularization is an important factor promoting progression. We suspect that glioma-induced pericyte dysfunctions contribute to the impaired vascular architecture and the loss of integrity of the intratumoral BBB.

In this work the effects of TGF- β and glioma cell supernatants (G-SN) on pericytes and the integrity of the BBB were examined. Using an in vitro BBB model consisting of primary porcine brain microvascular endothelial cells (PBMVEC) and human cerebral pericytes (HBVP), we showed that glioma cells negatively influenced the BBB integrity via TGF- β secretion, presumably not only due to the modulation of endothelial cells already described, but especially by modulating pericyte functions and their metabolism.

Metabolic activity measurements performed using Seahorse technology showed that TGF- β increased ATP production in pericytes, particularly by glycolysis. There may be a connection to the TGF- β -related increase in pericyte motility. However, studies on this were not part of the present work. In contrast to TGF- β , G-SN did not increase ATP production in pericytes. Instead, after cultivation in G-SN, but not after cultivation in medium containing TGF- β , the respiratory reserve capacity and the mitochondrial proton leak were reduced. This possibly leads to increased progression-promoting pericyte properties. We suspect that interactions with other glioma cell-secreted factors from the supernatant modulate the TGF- β effect.

Neither the TGF- β mediated reduction in BBB integrity nor the increase in ATP production were mediated “downstream” by the EMT protein SLUG, which is overexpressed tumor associated pericytes.

In order to clarify whether glioma-secreted TGF- β also relevantly modulates pericyte functions in vivo, further research is required, which should evaluate whether pericytes are suitable as target structures for vascular-normalizing therapeutic approaches.

7 Literaturverzeichnis

- Abbott 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat*, 200, 629-38.
- Agilent-Technologies 2018. Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay Kit User Guide.
- Agilent-Technologies 2019. Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit User Guide.
- Ahmad, Aboukameel, Kong, et al. 2011. Phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor mediates epithelial-mesenchymal transition regulated by miR-200 in breast cancer cells. *Cancer Res*, 71, 3400-9.
- Anfuso, Motta, Giurdanella, et al. 2014. Endothelial PKCalpha-MAPK/ERK-phospholipase A2 pathway activation as a response of glioma in a triple culture model. A new role for pericytes? *Biochimie*, 99, 77-87.
- Birner, Piribauer, Fischer, et al. 2003. Vascular patterns in glioblastoma influence clinical outcome and associate with variable expression of angiogenic proteins: evidence for distinct angiogenic subtypes. *Brain Pathol*, 13, 133-43.
- Blanchette, Daneman 2015. Formation and maintenance of the BBB. *Mech Dev*, 138 Pt 1, 8-16.
- Bogdahn, Hau, Stockhammer, et al. 2011. Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF- β 2 inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study. *Neuro Oncol*, 13, 132-142.
- Brandes, Carpentier, Kesari, et al. 2016. A Phase II randomized study of galunisertib monotherapy or galunisertib plus lomustine compared with lomustine monotherapy in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol*, 18, 1146-1156.
- Bruna, Darken, Rojo, et al. 2007. High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell*, 11, 147-60.
- Cantelmo, Conradi, Brajic, et al. 2016. Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer Cell*, 30, 968-985.
- Cardoso, Brites, Brito 2010. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev*, 64, 328-63.
- Carvey, Hendey, Monahan 2009. The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. *J Neurochem*, 111, 291-314.
- Casalena, Daehn, Bottinger 2012. Transforming growth factor-beta, bioenergetics, and mitochondria in renal disease. *Semin Nephrol*, 32, 295-303.
- Caspani, Crossley, Redondo-Garcia, Martinez 2014. Glioblastoma: A Pathogenic Crosstalk between Tumor Cells and Pericytes. *PLoS One*, 9, e101402.
- Chazotte 2011. Labeling Nuclear DNA Using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011, pdb.prot5556.
- Cheng, Huang, Zhou, et al. 2013. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*, 153, 139-52.

- Cheng, Korte, Nortley, et al. 2018. Targeting pericytes for therapeutic approaches to neurological disorders. *Acta Neuropathol*, 136, 507-523.
- Cornelison, Brennan, Kingsmore, Munson 2018. Convective forces increase CXCR4-dependent glioblastoma cell invasion in GL261 murine model. *Sci Rep*, 8, 17057.
- Czupalla, Liebner, Devraj 2014. In vitro models of the blood-brain barrier. *Methods Mol Biol*, 1135, 415-37.
- Das, Marsden 2013. Angiogenesis in glioblastoma. *The New England journal of medicine*, 369, 1561-1563.
- Davis 2016. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs*, 20, S2-S8.
- De Bock, Georgiadou, Schoors, et al. 2013. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell*, 154, 651-63.
- De Boer, Gaillard 2006. Blood–brain barrier dysfunction and recovery. *J Neural Transm*, 113, 455-462.
- Deli, Abraham, Kataoka, Niwa 2005. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*, 25, 59-127.
- Dieterich, Mellberg, Langenkamp, et al. 2012. Transcriptional profiling of human glioblastoma vessels indicates a key role of VEGF-A and TGFbeta2 in vascular abnormalization. *J Pathol*, 228, 378-90.
- Divakaruni, Brand 2011. The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak. *Physiology*, 26, 192-205.
- Divakaruni, Paradyse, Ferrick, Murphy, Jastroch 2014. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods Enzymol*, 547, 309-54.
- Dohgu, Takata, Yamauchi, et al. 2005. Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Res*, 1038, 208-15.
- Dore-Duffy, Katychev, Wang, Van Buren 2006. CNS Microvascular Pericytes Exhibit Multipotential Stem Cell Activity. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26, 613-624.
- Du, Lu, Petritsch, et al. 2008. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell*, 13, 206-20.
- Elbrecht, Long, Hickman 2016. Transepithelial/endothelial Electrical Resistance (TEER) theory and applications for microfluidic body-on-a-chip devices. *J Rare Dis Res Treat*. (2016) 1(3): 46-52
- Elias, Tozer, Silber, et al. 2005. TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia*, 7, 824-37.
- Epstein, Gatenby, Brown 2017. The Warburg effect as an adaptation of cancer cells to rapid fluctuations in energy demand. *PLoS One*, 12, e0185085.
- Fischmann. 2004. *Blutgefäße des Glioblastoma multiforme: Elektronenmikroskopische und immunozytochemische Untersuchungen zu Veränderungen der perivaskulären extrazellulären Matrix und der Endothelzellen.*, Medizinische Dissertationsschrift, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

- Fitzgerald, Soro-Arnaiz, De Bock 2018. The Warburg Effect in Endothelial Cells and its Potential as an Anti-angiogenic Target in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6.
- Frei, Gramatzki, Tritschler, et al. 2015. Transforming growth factor-beta pathway activity in glioblastoma. *Oncotarget*, 6, 5963-77.
- Fukumura, Xu, Chen, et al. 2001. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res*, 61, 6020-4.
- Gerhardt, Betsholtz 2003. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res*, 314, 15-23.
- Gilkes, Semenza, Wirtz 2014. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 14, 430.
- Goos. 2015. *The role of Snail and Slug in invasion and cancer stem cell maintenance in glioblastoma multiforme*. Medizinische Dissertationsschrift, Justus-Liebig-Universität Giessen.
- Guerra, Paiva, Sena, et al. 2018. Targeting glioblastoma-derived pericytes improves chemotherapeutic outcome. *Angiogenesis*, 21, 667-675.
- Guido, Whitaker-Menezes, Capparelli, et al. 2012. Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF-beta drives tumor growth: connecting TGF-beta signaling with "Warburg-like" cancer metabolism and L-lactate production. *Cell Cycle*, 11, 3019-35.
- Guo, Wang 2009. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res*, 19, 71-88.
- Han, Alvarez-Breckenridge, Wang, Yu 2015. TGF- β signaling and its targeting for glioma treatment. *Am J Cancer Res*, 5, 945-955.
- Han, Kim, Han, et al. 2011. SNAI1 is Involved in the Proliferation and Migration of Glioblastoma Cells. *Cell Mol Neurobiol*, 31, 489-496.
- Hanahan, Weinberg 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Hardee, Zagzag 2012. Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization. *The American Journal of Pathology*, 181, 1126-1141.
- Hayashi, Nakao, Nakaoke, et al. 2004. Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul Pept*, 123, 77-83.
- Heiss, Schachner, Donati, Grojer, Dirsch 2016. Increased aerobic glycolysis is important for the motility of activated VSMC and inhibited by indirubin-3'-monoxime. *Vascul Pharmacol*, 83, 47-56.
- Hellström, Gerhardt, Kalén, et al. 2001. Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 153, 543-554.
- Helms, Abbott, Burek, et al. 2016. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36, 862-90.
- Hendriksen, Span, Schuurings, et al. 2009. Angiogenesis, hypoxia and VEGF expression during tumour growth in a human xenograft tumour model. *Microvasc Res*, 77, 96-103.
- Hofer, Bullinger, Dierlamm, et al. 2019. *Gliome im Erwachsenenalter* [Online]. onkopedia: Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische

- Onkologie e.V. Available:
<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/impressum> [Accessed 05.06.2019 2019].
- Horiguchi, Ota, Rifkin 2012. Matrix control of transforming growth factor- β function. *J Biochem*, 152, 321-329.
- Hua, Ten Dijke, Kostidis, Giera, Hornsveld 2019. TGF β -induced metabolic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Cell Mol Life Sci*.
- Hur, Park, Park, et al. 2000. Matrix metalloproteinases in human gliomas: activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) may be correlated with membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) expression. *J Korean Med Sci*, 15, 309-14.
- Ilin, Armento, Sanchez, et al. 2017. Effects of soluble CPE on glioma cell migration are associated with mTOR activation and enhanced glucose flux. *Oncotarget*, 8, 67567-67591.
- Iser, Pereira, Lenz, Wink 2017. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process in Glioblastoma: An Updated Systematic Review and In Silico Investigation. *Med Res Rev*, 37, 271-313.
- Ishihara, Kubota, Lindberg, et al. 2008. Endothelial cell barrier impairment induced by glioblastomas and transforming growth factor beta2 involves matrix metalloproteinases and tight junction proteins. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67, 435-48.
- Jain, Di Tomaso, Duda, et al. 2007. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*, 8, 610-22.
- Jiang, Xiao, Sugiura, et al. 2014. Metabolic reprogramming during TGF β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*, 34, 3908.
- Joseph, Conroy, Tomar, et al. 2014. TGF- β is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death & Disease*, 5, e1443.
- Kalluri, Weinberg 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119, 1420-1428.
- Kjellman, Olofsson, Hansson, et al. 2000. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int J Cancer*, 89, 251-8.
- Kruchko, Ostrom, Boscia, et al. 2018. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro Oncol*, 20, iv1-iv86.
- Leitlein, Aulwurm, Waltereit, et al. 2001. Processing of Immunosuppressive Pro-TGF- β 1,2 by Human Glioblastoma Cells Involves Cytoplasmic and Secreted Furin-Like Proteases. *The Journal of Immunology*, 166, 7238-7243.
- Li 2018. The role of a previously unrecognized pericytes progenitor-like cell in glioma expansion and progression. *Dissertationsschrift LMU München*.
- Li, Poznansky 1990. Characterization of the ZO-1 protein in endothelial and other cell lines. *J Cell Sci*, 97 (Pt 2), 231-7.
- Liang, Brooks, Willard, et al. 2007. CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 359, 716-722.

- Liebner, Fischmann, Rascher, et al. 2000. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol*, 100, 323-31.
- Liu, Tang, Huang, et al. 2017. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes cancer growth and metastasis through upregulation of SNAIL expression. *Int J Oncol*, 50, 252-262.
- Louis, Perry, Reifenberger, et al. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 131, 803-20.
- Lunt, Vander Heiden 2011. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 441-64.
- Mader, Blank, Capper, et al. 2018. Pericytes/vessel-associated mural cells (VAMCs) are the major source of key epithelial-mesenchymal transition (EMT) factors SLUG and TWIST in human glioma. *Oncotarget*, 9, 24041-24053.
- Mahabir, Tanino, Elmansuri, et al. 2013. Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma. *Neuro Oncol*, 16, 671-685.
- Mani, Guo, Liao, et al. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133, 704-15.
- Martin, Seano, Jain 2019. Normalizing Function of Tumor Vessels: Progress, Opportunities, and Challenges. *Annu Rev Physiol*, 81, 505-534.
- Masin, Vazquez, Rossi, et al. 2014. GLUT3 is induced during epithelial-mesenchymal transition and promotes tumor cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Cancer Metab*, 2, 11.
- Massagué 2012. TGF β signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 616.
- Mathivet, Bouleti, Van Woensel, et al. 2017. Dynamic stroma reorganization drives blood vessel dysmorphia during glioma growth. *EMBO Mol Med*, 9, 1629-1645.
- Mcmillin, Frampton, Seiwel, et al. 2015. TGF β 1 exacerbates blood-brain barrier permeability in a mouse model of hepatic encephalopathy via upregulation of MMP9 and downregulation of claudin-5. *Lab Invest*, 95, 903-913.
- Meng, Zaorsky, Deng, et al. 2014. Pericytes: a double-edged sword in cancer therapy. *Future Oncology*, 11, 169-179.
- Merzak, Mccrea, Koocheckpour, Pilkington 1994. Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor β 1. *Br J Cancer*, 70, 199-203.
- Mikheeva, Mikheev, Petit, et al. 2010. TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Mol Cancer*, 9, 194.
- Mookerjee, Nicholls, Brand 2016. Determining Maximum Glycolytic Capacity Using Extracellular Flux Measurements. *PLoS One*, 11, e0152016.
- Morandi, Taddei, Chiarugi, Giannoni 2017. Targeting the Metabolic Reprogramming That Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Aggressive Tumors. *Front Oncol*, 7, 40.

- Mustafa, Swagemakers, French, et al. 2013. Structural and expression differences between the vasculature of pilocytic astrocytomas and glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 72, 1171-81.
- Nakagawa, Deli, Kawaguchi, et al. 2009. A new blood–brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*, 54, 253-263.
- Nakagawa, Deli, Nakao, et al. 2007. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol*, 27, 687-94.
- Nanoanalytics 2018. cellZscope Software Manual.
- Nduom, Weller, Heimberger 2015. Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma. *Neuro Oncol*, 17 Suppl 7, vii9-vii14.
- Nickens, Wikstrom, Shirihai, Patierno, Ceryak 2013. A bioenergetic profile of non-transformed fibroblasts uncovers a link between death-resistance and enhanced spare respiratory capacity. *Mitochondrion*, 13, 662-667.
- Nikolakopoulou, Montagne, Kisler, et al. 2019. Pericyte loss leads to circulatory failure and pleiotrophin depletion causing neuron loss. *Nat Neurosci*, 22, 1089-1098.
- Noch, Ramakrishna, Magge 2018. Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance. *World Neurosurg*, 116, 505-517.
- Oberoi, Parrish, Sio, et al. 2016. Strategies to improve delivery of anticancer drugs across the blood-brain barrier to treat glioblastoma. *Neuro Oncol*, 18, 27-36.
- Ochs, Sahm, Opitz, et al. 2013. Immature mesenchymal stem cell-like pericytes as mediators of immunosuppression in human malignant glioma. *J Neuroimmunol*, 265, 106-16.
- Ozerdem, Stallcup 2003. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis*, 6, 241-9.
- Padhi, Thomson, Perry, et al. 2020. Bioenergetics underlying single-cell migration on aligned nanofiber scaffolds. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 318, C476-C485.
- Park, Kim, Han, et al. 2016. Normalization of Tumor Vessels by Tie2 Activation and Ang2 Inhibition Enhances Drug Delivery and Produces a Favorable Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 30, 953-967.
- Patil, Sable, Kothari 2011. An update on transforming growth factor-beta (TGF-beta): sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing. *J Cell Physiol*, 226, 3094-103.
- Penuelas, Anido, Prieto-Sanchez, et al. 2009. TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell*, 15, 315-27.
- Persidsky, Ramirez, Haorah, Kanmogne 2006. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1, 223-36.
- Pfister, Feng, Vom Hagen, et al. 2008. Pericyte migration: a novel mechanism of pericyte loss in experimental diabetic retinopathy. *Diabetes*, 57, 2495-2502.

- Pfleger, He, Abdellatif 2015. Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death & Disease*, 6, e1835.
- Piera-Velazquez, Li, Jimenez 2011. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *The American journal of pathology*, 179, 1074-1080.
- Platten, Wick, Weller 2001. Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc Res Tech*, 52, 401-10.
- Potter, Newport, Morten 2016. The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans*, 44, 1499-1505.
- Price, Burke, Mayne 1999. A novel human astrocyte cell line (A735) with astrocyte-specific neurotransmitter function. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 35, 279-288.
- Raghunathan, Giannini, Clarke, et al. 2015. Case-Based Review: newly diagnosed glioblastoma. *Neuro-Oncology Practice*, 2, 106-121.
- Rempe, Hartz, Bauer 2016. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36, 1481-1507.
- Ribatti, Nico, Crivellato 2011. The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol*, 55, 261-8.
- Ribeiro, Kaid, Silva, Cortez, Okamoto 2017. Inhibition of Lysyl Oxidases Impairs Migration and Angiogenic Properties of Tumor-Associated Pericytes. *Stem Cells Int*, 2017, 4972078.
- Ribeiro, Okamoto 2015. Combined effects of pericytes in the tumor microenvironment. *Stem Cells Int*, 2015, 868475.
- Ricci-Vitiani, Pallini, Biffoni, et al. 2010. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, 468, 824.
- Rocchio, Tapella, Manfredi, et al. 2019. Gene expression, proteome and calcium signaling alterations in immortalized hippocampal astrocytes from an Alzheimer's disease mouse model. *Cell Death Dis*, 10, 24-24.
- Romero 2018. Quantifying Cellular ATP Production Rate Using Agilent Seahorse XF Technology. *Agilent Trusted answers*.
- Rooprai, Rucklidge, Panou, Pilkington 2000. The effects of exogenous growth factors on matrix metalloproteinase secretion by human brain tumour cells. *Br J Cancer*, 82, 52-55.
- Roy, Poirier, Fortin 2018. Differential Expression and Clinical Significance of Transforming Growth Factor-Beta Isoforms in GBM Tumors. *Int J Mol Sci*, 19.
- Rubin, Hall, Porter, et al. 1991. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol*, 115, 1725-1735.
- Rustenhoven, Alderink, Scotter, et al. 2016. TGF-beta1 regulates human brain pericyte inflammatory processes involved in neurovasculature function. *J Neuroinflammation*, 13, 37.
- Rybinski, Imtiyaz, Mittica, et al. 2015. Targeting endosialin/CD248 through antibody-mediated internalization results in impaired pericyte maturation and dysfunctional tumor microvasculature. *Oncotarget*, 6, 25429-40.

- Sánchez-Tilló, Liu, De Barrios, et al. 2012. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell Mol Life Sci*, 69, 3429-3456.
- Santos, Magno, Romano-Silva, Mintz, Birbrair 2019. Pericyte Plasticity in the Brain. *Neurosci Bull*, 35, 551-560.
- Sattiraju, Mintz 2019. Pericytes in Glioblastomas: Multifaceted Role Within Tumor Microenvironments and Potential for Therapeutic Interventions. *Adv Exp Med Biol*, 1147, 65-91.
- Schneider, Ludwig, Tatenhorst, et al. 2004. Glioblastoma cells release factors that disrupt blood-brain barrier features. *Acta Neuropathol*, 107, 272-276.
- Sciacovelli, Frezza 2017. Metabolic reprogramming and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *The FEBS Journal*, 284, 3132-3144.
- Serlin, Shelef, Knyazer, Friedman 2015. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin Cell Dev Biol*, 38, 2-6.
- Shah, Price, Banks, et al. 2013. Pharmacological inhibition of mitochondrial carbonic anhydrases protects mouse cerebral pericytes from high glucose-induced oxidative stress and apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*, 344, 637-45.
- Shigetomi, Ikenouchi 2017. Regulation of the epithelial barrier by post-translational modifications of tight junction membrane proteins. *The Journal of Biochemistry*, 163, 265-272.
- Shiraishi, Verdone, Huang, et al. 2015. Glycolysis is the primary bioenergetic pathway for cell motility and cytoskeletal remodeling in human prostate and breast cancer cells. *Oncotarget*, 6, 130-143.
- Shivers, Edmonds, Del Maestro 1984. Microvascular permeability in induced astrocytomas and peritumor neuropil of rat brain. A high-voltage electron microscope-protein tracer study. *Acta Neuropathol*, 64, 192-202.
- Sobue, Yamamoto, Yoneda, et al. 1999. Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci Res*, 35, 155-164.
- Soukupova, Malfettone, Hyroššová, et al. 2017. Role of the Transforming Growth Factor- β in regulating hepatocellular carcinoma oxidative metabolism. *Sci Rep*, 7, 12486.
- Srinivasan, Kolli, Esch, et al. 2015. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *Journal of Laboratory Automation*, 20, 107-126.
- Stupp, Mason, Van Den Bent, et al. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, 987-96.
- Stupp, Taillibert, Kanner, et al. 2017. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 318, 2306-2316.
- Stylianopoulos, Munn, Jain 2018. Reengineering the Tumor Vasculature: Improving Drug Delivery and Efficacy. *Trends in cancer*, 4, 258-259.
- Svensson, Özen, Genové, Paul, Bengzon 2015. Endogenous Brain Pericytes Are Widely Activated and Contribute to Mouse Glioma Microvasculature. *PLoS One*, 10, e0123553.
- Sweeney, Ayyadurai, Zlokovic 2016. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci*, 19, 771-783.

- Takahashi, Maki, Liang, et al. 2014. p38 MAP kinase mediates transforming-growth factor- β 1-induced upregulation of matrix metalloproteinase-9 but not -2 in human brain pericytes. *Brain Res*, 1593, 1-8.
- Takata, Dohgu, Matsumoto, et al. 2011. Brain pericytes among cells constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis factor- α , releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro. *J Neuroinflammation*, 8, 106.
- Tang, Qi, Tang, et al. 2016. Aberrant JMJD3 Expression Upregulates Slug to Promote Migration, Invasion, and Stem Cell-Like Behaviors in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res*, 76, 6520-6532.
- Terry, Nie, Matter, Balda 2010. Rho signaling and tight junction functions. *Physiology (Bethesda)*, 25, 16-26.
- Thanabalasundaram, Schneidewind, Pieper, Galla 2011. The impact of pericytes on the blood-brain barrier integrity depends critically on the pericyte differentiation stage. *Int J Biochem Cell Biol*, 43, 1284-93.
- Thomsen, Burkhart, Moos 2015. A Triple Culture Model of the Blood-Brain Barrier Using Porcine Brain Endothelial cells, Astrocytes and Pericytes. *PLoS One*, 10, e0134765.
- Trudeau, Molina, Roy 2011. High glucose induces mitochondrial morphology and metabolic changes in retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 8657-64.
- Uebelhoer, Iruela-Arispe 2016. Cross-talk between signaling and metabolism in the vasculature. *Vascul Pharmacol*, 83, 4-9.
- Valdor, Garcia-Bernal, Bueno, et al. 2017. Glioblastoma progression is assisted by induction of immunosuppressive function of pericytes through interaction with tumor cells. *Oncotarget*, 8, 68614-68626.
- Velásquez, Mansouri, Gutiérrez, et al. 2019. Hypoxia Can Induce Migration of Glioblastoma Cells Through a Methylation-Dependent Control of ODZ1 Gene Expression. *Front Oncol*, 9.
- Waldmeier, Meyer-Schaller, Diepenbruck, Christofori 2012. Py2T Murine Breast Cancer Cells, a Versatile Model of TGF β -Induced EMT In Vitro and In Vivo. *PLoS One*, 7, e48651.
- Wang, Chadalavada, Wilshire, et al. 2010. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*, 468, 829.
- Wang, Merrill, Borchardt 1996. Vascular endothelial growth factor affects permeability of brain microvessel endothelial cells in vitro. *Am J Physiol*, 271, C1973-80.
- Wang, Wang, Wang, Chen 2019. A comprehensive review in improving delivery of small-molecule chemotherapeutic agents overcoming the blood-brain/brain tumor barriers for glioblastoma treatment. *Drug Delivery*, 26, 551-565.
- Watkins, Robel, Kimbrough, et al. 2014. Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. *Nature communications*, 5, 4196-4196.
- Weerakkody. 2016. *WHO grading of CNS tumors* [Online]. <https://radiopaedia.org/articles/who-grading-of-cns-tumours>: Radiopedia. [Accessed 02.06.2019 2019].

- Weinberg, Ramnath, Nagrath 2019. Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. *Cancers (Basel)*, 11.
- Weller, Van Den Bent, Tonn, et al. 2017. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol*, 18, e315-e329.
- Wick, Naumann, Weller 2006. Transforming Growth Factor-beta: A Molecular Target for the Future Therapy of Glioblastoma. *Curr Pharm Des*, 12, 341-349.
- Wick, Platten, Weller 2001. Glioma Cell Invasion: Regulation of Metalloproteinase Activity by TGF- β . *J Neurooncol*, 53, 177-185.
- Wolburg, Neuhaus, Kniessel, et al. 1994. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci*, 107 (Pt 5), 1347-57.
- Wolburg, Noell, Fallier-Becker, Mack, Wolburg-Buchholz 2012. The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma. *Mol Aspects Med*, 33, 579-589.
- Wolburg, Wolburg-Buchholz, Kraus, et al. 2003. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol*, 105, 586-92.
- Wolpaw, Dang 2018. Exploiting Metabolic Vulnerabilities of Cancer with Precision and Accuracy. *Trends Cell Biol*, 28, 201-212.
- Yamada, Kato, Yamashita, et al. 1995. Enhanced expression of transforming growth factor- β and its type-I and type-II receptors in human glioblastoma. *Int J Cancer*, 62, 386-392.
- Yamanishi, Katsumura, Kobayashi, Puro 2006. Extracellular lactate as a dynamic vasoactive signal in the rat retinal microvasculature. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 290, H925-H934.
- Yan, Abdelkadhem, Paula, et al. 2017. Mitochondrial Spare Respiratory Capacity Is Negatively Correlated with Nuclear Reprogramming Efficiency. *Stem Cells Dev*, 26, 166-176.
- Yang, Chen, Yu, et al. 2013. TGF-beta1 enhances tumor-induced angiogenesis via JNK pathway and macrophage infiltration in an improved zebrafish embryo/xenograft glioma model. *Int Immunopharmacol*, 15, 191-8.
- Yang, Estrada, Thompson, Liu, Rosenberg 2007. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27, 697-709.
- Yang, Menon, Black, Carroll, Johnson 2010. SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas. *BMC Cancer*, 10, 301.
- Yao, Chen, Norris, Strickland 2014. Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity. *Nature Communications*, 5, 3413.
- Yizhak, Le Devedec, Rogkoti, et al. 2014. A computational study of the Warburg effect identifies metabolic targets inhibiting cancer migration. *Mol Syst Biol*, 10, 744.

- Young, Brown, Maybin, et al. 2014. Transforming Growth Factor- β Induced Warburg-Like Metabolic Reprogramming May Underpin the Development of Peritoneal Endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99, 3450-3459.
- Yuan, Shao, Hennigs, et al. 2016. Increased Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 Expression in Lung Pericytes Is Associated with Reduced Endothelial-Pericyte Interactions and Small Vessel Loss in Pulmonary Arterial Hypertension. *The American Journal of Pathology*, 186, 2500-2514.
- Yue, Chen 2005. Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? *J Histochem Cytochem*, 53, 997-1002.
- Zagzag, Amirnovin, Greco, et al. 2000. Vascular Apoptosis and Involution in Gliomas Precede Neovascularization: A Novel Concept for Glioma Growth and Angiogenesis. *Lab Invest*, 80, 837.
- Zagzag, Lukyanov, Lan, et al. 2006. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest*, 86, 1221-32.
- Zhang, Shi, Peng, et al. 2015. HIF-1 α Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer. *PLoS One*, 10, e0129603.
- Zhang, Wang, Wang, et al. 2016. TGF- β induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget*, 7, 52294-52306.
- Zhao, Krystofiak, Ballesteros, et al. 2018. Multiple claudin-claudin cis interfaces are required for tight junction strand formation and inherent flexibility. *Communications Biology*, 1, 50.
- Zhou, Chen, Shi, et al. 2017. Targeting Glioma Stem Cell-Derived Pericytes Disrupts the Blood-Tumor Barrier and Improves Chemotherapeutic Efficacy. *Cell Stem Cell*, 21, 591-603.e4.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung in Tübingen unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Ulrike Naumann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Ulrike Naumann.

Sämtliche Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt. Lediglich die Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie wurde von Mitarbeiter/Innen des pathologischen Institutes der Universität Tübingen, Abtl. Elektronenmikroskopie durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen beteiligten Personen bedanken, die mich bei der Arbeit an meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Naumann für die kompetente und verständnisvolle Betreuung und hilfreiche Unterstützung. Zudem auch dem gesamten Team der AG Naumann für die gute Zusammenarbeit und den regen Austausch.

Mein Dank gilt zudem Herrn Dr. Kavi Devraj (Neurologisches Institut, Edinger-Institut, Universität Frankfurt/Main), Frau Dr. Julia Fitzgerald (Hertie-Institut Tübingen) und Herrn PD Dr. Martin Schenk (Universitätsklinikum Tübingen) für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente und der Abteilung Elektronenmikroskopie des pathologischen Institutes der Universität Tübingen für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder.

Außerdem möchte ich mich bedanken für die intellektuelle und finanzielle Förderung im Rahmen des IZKF-Promotionskollegs der Universität Tübingen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, Niklas und meinen Freunden Danke sagen, für die zahlreichen Motivationen und Anregungen während der Arbeit an meiner Dissertation.