Aus dem Zentrum für Operative Medizin
Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. M. Rothmund

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Neoangiogenese in einem *in vitro* und *in vivo* Tumormodell des Phäochromozytoms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Martin Middeke
aus Duisburg

Marburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 8. Februar 2007
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. B. Maisch
Referent:	Prof. Dr. A. Zielke
Korreferent:	Prof. Dr. J. Seitz

1 Einleitung 4
1.1 Das Phäochromozytom 4
1.1.1 Historischer Hintergrund 4
1.1.2 Inzidenz des Phäochromozytoms 4
1.1.3 Pathologie und Histopathologie des Phäochromozytoms 5
1.1.4 Physiologie und Pathophysiologie des Phäochromozytoms 6
1.1.5 Klinisches Bild des Phäochromozytoms 6
1.1.6 Diagnose und Lokalisation des Phäochromozytoms 8
1.1.7 Phäochromozytome bei Kindern und in der Schwangerschaft 10
1.1.8 Therapie des Phäochromozytoms 10
1.2 Funktion und Wertigkeit der Angiogenese 12
1.2.1 Angiogenesefaktoren 12
1.2.2 Merkmale der Tumorangiogenese 14
1.2.3 Therapeutische Ausblicke im Rahmen der Angiogenese 16
1.3 Das Phäochromozytom-Tumormodell auf der Basis von PC12-Zellen 17
1.4 Fragestellung 18
2 Material und Methoden 20
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial 20
2.2 Zur Anwendung gekommene Antikörper und Kits 22
2.3 Zur Anwendung gekommene Geräte 22
2.4 Nachweis des VEGF-Proteins und seiner biologischen Wirksamkeit 23
2.5 Präparate des PC12-Tumormodells 25
2.5.1 Xenotransplantierte PC12-Zellen in der Nacktmaus 25
2.5.1.1 Koinjektion mit Proteinen der extrazellulären Matrix 26
2.5.1.2 Präinkubation und Koinjektion mit NGF 27
2.5.1.3 Bearbeitung und Auswertung der PC12-Tumore 27
2.5.2 Hemmung der Angiogenese durch spezifische anti-VEGF-Antikörper 28
2.6 Humane Tumore 30
2.7 Hämalaun-Eosin Färbung 31
2.8 Immunhistochemie (IHC) 31
2.8.1 Objektträgerbeschichtung 31
2.8.2 Allgemeines zur Immunhistochemie 31
2.8.3 Erhöhung der Antigenpräsenz: Antigen Retrieval (AR) 33
2.8.4 Anti-VEGF-Färbung 34

2.8.5 Digitale Auswertung der anti-VEGF-Färbung ... 35
2.8.6 Immunhistochemische Darstellung von Blutgefäßen ... 35
2.8.6.1 Anti-CD31-Färbung ... 36
2.8.6.2 Anti-CD34-Färbung ... 37
2.8.7 Auswertung der Gefäßmarkierung ... 37
2.9 Messung der VEGF-Sekretion ... 37
2.9.1 Das digitale Bildauswertungssystem Qwin (Leica) ... 38
2.9.2 Programmierung der Bildauswertungssoftware QWin (Leica) ... 39
2.9.3 Aufbau und Ablauf des Programms zur VEGF-Messung ... 39
2.10 Messung der Vaskularisierung der Tumore ... 44
2.10.1 Messung und Berechnung der Gefäßoberflächendichte (VSD) ... 44
2.10.2 Bestimmung der Nekroserate ... 46
2.11 Bestimmung der Mitoserate ... 46
2.12 Statistik ... 47
3 Ergebnisse ... 49
3.1 Nachweis von VEGF und seiner biologischen Aktivität in PC12-Zellen ... 49
3.1.1 Nachweis der VEGF-Sekretion *in vitro* ... 49
3.1.2 Nachweis der biologischen Aktivität des sezernierten VEGF ... 50
3.2 Angiogenesemessung im PC12-Tumormodell ... 51
3.2.1 Angiogenesemessung nach Koinjektion mit EZM-Proteinen ... 53
3.2.2 Angiogenesemessung nach Präinkubation und Koinjektion mit NGF ... 54
3.3 Angiogenesemessung im humanen Phäochromozytom ... 55
3.4 Hemmung der *in vivo* Angiogenese durch anti-VEGF-Antikörper ... 59
4 Diskussion ... 63
4.1 Methodendiskussion ... 63
4.1.1 Nachweis von VEGF und seiner biologischen Aktivität in PC12-Zellen ... 63
4.1.2 Messung der Angiogenese in Tumoren ... 64
4.1.2.1 Messung der Vaskularisierung der Tumore ... 64
4.1.2.2 Messung der VEGF-Sekretion ... 65
4.1.3 Bestimmung der Mitoserate ... 68
4.1.4 Hemmung der *in vivo* Angiogenese durch anti-VEGF-Antikörper ... 68
4.2 Ergebnisdiskussion ... 69
4.2.1 Nachweis von VEGF und seiner biologischen Aktivität in PC12-Zellen ... 69
4.2.2 Angiogenesemessung im Tumormodell ... 69

4.2.2.1 Angiogenesemessung nach Koinjektion mit EZM-Proteinen 69
4.2.2.2 Angiogenesemessung nach Präinkubation und Koinjektion mit NGF 70
4.2.3 Angiogenesemessung in humanen Phäochromozytomen 71
4.2.4 Hemmung der *in vivo* Angiogenese durch anti-VEGF-Antikörper 71
5 Zusammenfassung 73
6 Literaturverzeichnis 75
7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen 89
8 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen 90
9 Anhang 91
9.1 Quellcode des Programms zur digitalen Bildauswertung 91
9.1.1 Programmteil Start.Q5R 91
9.1.2 Programmteil Scan.Q5R 91
9.1.3 Programmteil VEGFmain.Q5R 93
9.1.4 Programmteil VEGF.Q5R 94
9.1.5 Programmteil Gewebe.Q5R 96
9.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer 98
9.3 Danksagung 99
9.4 Ehrenwörtliche Erklärung 100

1 Einleitung

1.1 Das Phäochromozytom

1.1.1 Historischer Hintergrund

Die erste Beschreibung eines Phäochromozytoms stammt wahrscheinlich aus dem Jahre 1886 aus dem autoptischen Bericht einer 18-jährigen Frau mit bilateralen adrenalen Tumoren, die zuvor unter Schwindel, Kopfschmerz mit Erbrechen, Obstipation und Attacken von Nervosität gelitten hatte (Fränkel, 1886). Die klinischen Symptome wurden 1922 erstmals umfassend dargestellt (Labbe et al., 1922).

Die ersten erfolgreichen Resektionen führten 1926 G. Roux in Lausanne, Schweiz, (van Heerden, 1982), und 1927 C.H. Mayo von der Mayo Klinik in Rochester, Minnesota, USA (Mayo, 1927) durch, wobei jedoch die Diagnose erst nach erfolgter Operation gestellt wurde. Der Name „Phäochromozytom“ leitet sich aus dem griechischen *phaios* (düster, dunkel) und *chroma* (Farbe) ab. Diese Bezeichnung resultiert aus der Beobachtung, dass Phäochromozytome, wenn sie mit Dichromaten fixiert werden, eine braune Farbe annehmen (positive chromaffine Reaktion) (Poll, 1905). Die Braunfärbung resultiert aus der Oxidation und Polymerisation der in den sekretorischen Granula gespeicherten Katecholamine.

1.1.2 Inzidenz des Phäochromozytoms

Phäochromozytome sind selten. Sie treten in 0,1% - 1% der Patienten mit Hypertonie auf (Samaan et al., 1987; Streeten et al., 1990). Die Verteilung zwischen den Geschlechtern ist in etwa ausgeglichen, das Erkrankungsmaximum liegt zwischen dem vierten und sechsten Lebensjahrzehnt (Mannelli et al., 1999; Melicow, 1977; Modlin et al., 1979; ReMine et al., 1974; Ross et al., 1989; Sutton et al., 1981). Aus Autopsiestudien ist bekannt, dass viele Phäochromozytome klinisch nicht erkannt werden und der unbehandelte Tumor mit dem Tod des Patienten in Zusammenhang gebracht werden kann (Sutton et al., 1981).

Die Inzidenz der Phäochromozytome beläuft sich in den USA auf 1 bis 2 Fälle pro 100.000 Erwachsene pro Jahr, in anderen Ländern wurden geringere Häufigkeiten beobachtet (Sheps et al., 1990). Ein malignes Phäochromozytom liegt bei 7-15% der Patienten vor, wobei die extraadrenalen Phäochromozytome einen größeren Anteil

(32,1%) maligner Tumore haben (Mannelli et al., 1999; Melicow, 1977; ReMine et al., 1974; Ross et al., 1989; Sutton et al., 1981).

Eine retrospektive Studie in Italien mit klinischen und operativen Daten von 284 Patienten mit Phäochromozytom ergab, dass der Tumor in 89,4% der Fälle intraadrenal, in 8,5 % extraadrenal und in 2,1% sowohl intra- als auch extraadrenal lag. Bilateral in beiden Nebennieren trat der Tumor in 11% der Fälle auf. Dabei war die rechte Seite mit 64,1% der intraadrenal gelegenen Phäochromozytome häufiger betroffen. Extraadrenale Tumore traten häufiger in Patienten auf, die jünger als 20 Jahre waren (17,6%), außerdem war ein größerer Anteil der extraadrenalen Tumore maligne (32,1%) im Vergleich zu den intraadrenal gelegenen (7,2%) (Mannelli et al., 1999).

1.1.3 Pathologie und Histopathologie des Phäochromozytoms

Phäochromozytome sind sekretorisch aktive Neoplasien des Nebennierenmarks und in seltenen Fällen anderer chromaffiner Gewebe des sympathischen Nervengewebes entlang des Grenzstrangs. Diese extraadrenal gelegenen Tumore werden auch Paragangliome genannt. Sie können von der Schädelbasis bis hinunter ins Becken auftreten. Häufige extraadrenale Lokalisationen sind paraaortale Ganglien und die Harnblasenwand (Samaan et al., 1987). Eine weitere bedeutsame Stelle der Entstehung ist eine Ansammlung von paraaortalen, paraganglionären Zellen, die um den Ursprung der Arteria mesenterica inferior gelegen sind, dem sogenannten „Zuckerkandl-Organ“ (Ober, 1983). Sie können sporadisch auftreten oder sind Teil des Syndroms der „Multiplen Endokrinen Neoplasien“ (MEN) oder treten in Assoziation mit anderen hereditären Syndromen bzw. neuroektodermalen Erkrankungen (z.B. Neurofibromatose Recklinghausen, von Hippel-Lindau Syndrom) auf (Samaan et al., 1987).

Phäochromozytome sind aus kleinen runden Zellnestern zusammengesetzt, die von stark vaskularisierten Bindegewebssepten umgeben sind. Die Ausprägung der Vaskularisation unterliegt starken Schwankungen innerhalb eines Tumors, aber auch zwischen Tumoren verschiedener Dignität. Die Zellen können klein und regelmäßig aufgebaut sein, oder einen starken Pleomorphismus aufzeigen (Samaan et al., 1987). Das Zytoplasma variiert von klar bis granuliert. Das Vorhandensein von Nekrosen, zytologischen Atypien, erhöhter Mitoserate oder Einbruch des Tumors in Gefäße deutet nicht auf einen malignen Tumor hin, vielmehr können diese Zeichen auch in benignen Tumoren auftreten, was eine histologische Bestimmung der Dignität unmöglich macht. Die Malignität eines Phäochromozytoms ist allein durch das Auftreten von Metastasen

definiert (Melicow, 1977; Scott, Jr. et al., 1982; Lo et al., 2000; ReMine et al., 1974; Ross et al., 1989; Sutton et al., 1981). Diese treten normalerweise im Knochen, in regionalen Lymphknoten, Leber, Lunge und Gehirn auf (ReMine et al., 1974). Die Tumorgröße variiert von wenigen Gramm bis über 3 kg (Samaan et al., 1987).

1.1.4 Physiologie und Pathophysiologie des Phäochromozytoms

Phäochromozytome sind neuroektodermalen Ursprungs und gehören zum APUD-System (amine precursor uptake and decarboxylation), einem peripheren endokrinen Zellsystem, dessen gemeinsame Merkmale die Aufnahme und Dekarboxylierung von Aminvorstufen und die Speicherung der Amine und Polypeptide in spezifischen Granula sind (Hassoun et al., 1984; Hamilton et al., 1977). Sie sezernieren vor allem Noradrenalin im Überschuss, aber auch Adrenalin und Dopamin. Die Produktion der Katecholamine unterliegt im normalen Nebennierengewebe dem Einfluss der Glukokortikoide der Nebennierenrinde, im Falle eines Tumors ist diese Kontrolle jedoch nicht mehr wirksam, so dass Katecholamine im Überschuss produziert werden (Wurtman et al., 1966; Lehnert, 1998). Diese Überproduktion wird einer Überexpression des Tyrosin-Hydroxylase-Gens zugeschrieben. Tyrosin-Hydroxylase katalysiert die Hydroxylierung von L-Tyrosin, der Vorstufe der Katecholamine, zu L-DOPA, welches weiter zu Noradrenalin und Adrenalin umgebaut wird (Lehnert, 1998).
Die überschießende Produktion vasoaktiver Substanzen ist auch für die Symptome dieser Erkrankung verantwortlich, die unter 1.1.5 näher erläutert werden.
Das Enzym Phenylethanolamin-*N*-methyl-Transferase, welches den Umbau von Noradrenalin zu Adrenalin katalysiert, findet sich vor allem in der Nebenniere und im Zuckerkandl-Organ, weshalb Tumore dieser Regionen relativ mehr Adrenalin sezernieren, extraadrenale Tumore dagegen mehr Noradrenalin produzieren (Walther et al., 1999; Lehnert, 1998).

1.1.5 Klinisches Bild des Phäochromozytoms

Die Trias aus Kopfschmerzen, Herzklopfen und exzessivem Schwitzen wird als die häufigste anamnestisch zu findende Befundkonstellation angegeben (Bravo et al., 1984), wobei die einzelnen Befunde nicht von Dauer sein müssen, sondern auch sporadisch auftreten können. Die Mehrzahl der Patienten wird jedoch zuerst mit einem nicht durch Medikamente beherrschbaren Hypertonus auffällig, sowie mit hypertensiven Krisen, Angstattacken und anfallsartigen Symptomen, die einer

zerebralen Blutung ähneln. (Modlin et al., 1979; Ross et al., 1989). Das Kennzeichen der Phäochromozytome, die Hypertension, wird bei 61-100% der Patienten gefunden, wobei die Verteilung der paroxysmal oder durchgehend hypertensiven Patienten in etwa gleich ist, gewöhnlich aber eine starke Labilität des Blutdrucks besteht (Modlin et al., 1979; ReMine et al., 1974; Ross et al., 1989; Sutton et al., 1981).

Da Phäochromozytome nicht innerviert sind, wird angenommen, dass die Katecholaminausschüttung sekundär durch Veränderungen in der Durchblutung, in Zusammenhang mit Nekrotisierung des Tumors oder bei körperlicher Anstrengung auftritt. Eine hypertensive Krise kann durch eine abdominale Verletzung, körperliche Anstrengung, Operationen, dabei erforderliche Narkosen und sogar im Falle eines Tumors mit Sitz in der Blase durch Miktion verursacht werden (Walther et al., 1999). Das zeitliche Auftreten von hypertensiven Krisen ist unterschiedlich. Bei einigen Patienten tritt es häufiger (mehrmals täglich) auf als bei anderen (im Abstand von Wochen bis Monaten), wobei die Schwere und Dauer der Anfälle mit fortschreitendem Krankheitsverlauf zunimmt (Samaan et al., 1987). Während der Hochdruckkrisen treten u.a. Symptome wie profuses Schwitzen, Palpitationen, und Tachykardie auf (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Häufigkeit klinischer Symptome beim Phäochromozytom

Symptom	**Häufigkeit (%)**
Kopfschmerz	43-80
Angst	15-72
Schwitzen	37-71
Herzklopfen	44-71
Bauchschmerzen	14-62
Pektangina	0-50
Blässe	42-44
Übelkeit	10-42
Dyspnoe	15-39
Tremor	11-38
Gewichtsverlust	7-23
Flushing	4-19
Sehstörungen	11-22

Häufigkeit der Symptome bei 324 Patienten mit Phäochromozytom, übernommen aus Walther *et al.*, 1999

Im Zusammenhang mit hypertonen Krisen können myokardiale Ischämien, Arrhythmien, intrakranielle Blutungen, Blutungen in den Tumor und Nierenversagen auftreten, die auch Erstmanifestation eines Phäochromozytoms sein können (Walther et al., 1999).

Durch die chronische Katecholaminausschüttung kann es zu Anzeichen eines erhöhten Grundumsatzes mit Gewichtsverlust, myokardialer Fibrosierung, Arteriosklerose und ischämischer Enterokolitis kommen. Sympathische Reflexe können abgeschwächt sein, was zu orthostatischer Dysregulation und zu Hypotonie bei Operationen und den dabei notwendigen Narkosen führen kann (Samaan et al., 1987).

Die häufigsten Todesursachen beim Phäochromozytom sind in 75% der Fälle hyper- oder hypotensive Krisen, Herzinfarkte und intrazerebrale Blutungen (Sutton et al., 1981).

Etwa 10% der Phäochromozytome sind maligne, in 11% liegen sie bilateral vor und 8,5% der Tumore liegen extraadrenal (Mannelli et al., 1999). Es lässt sich eine 9:1-Relation für die Lokalisation (intra- / extraadrenal), die Anzahl (mono- / bilateral) und die Dignität (benigne / maligne) aufstellen: „10%-Tumor“ (Manger et al., 1996).

Die Fünfjahres-Überlebensrate der benignen Phäochromozytome beträgt 95%, die der malignen liegt jedoch unter 50% (ReMine et al., 1974) bzw. bei nur 22,7% (Plouin et al., 1997). Verlauf und Prognose hängen demnach entscheidend von der Dignität des Tumors ab. Die Frage nach der Malignität kann jedoch nur beim Vorhandensein von ausgeprägter lokaler Invasion oder systemischer Metastasierung positiv beantwortet werden. Alle anderen Fälle müssen als unklar in ihrer Dignität beurteilt werden, weshalb eine lebenslange Kontrolle der Patienten notwendig ist (van Heerden et al., 1990). So können vollständig resezierte, primär als benigne klassifizierte Tumore noch nach über 20 Jahren ein Rezidiv entwickeln (Mornex et al., 1992).

1.1.6 Diagnose und Lokalisation des Phäochromozytoms

Laborchemisch hat sich die Messung des freien Noradrenalin im angesäuerten 24-Stunden-Urin bei Hypertonikern als sicherstes Kriterium zur Diagnose des Phäochromozytoms erwiesen. Diese Methode bietet eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 98% (Duncan et al., 1988). Aber auch die Vorstufe, das Dopamin, und das Hauptabbauprodukt des (Nor-) Adrenalins, die Vanillinmandelsäure werden vermehrt im Urin ausgeschieden und können gemessen werden, um ein Phäochromozytom zu diagnostizieren (van Heerden et al., 1982; Hanson et al., 1991;

Cheung et al., 1988). Man ist dazu übergegangen, die Ausscheidung im Urin zu messen, weil die Serumkatecholaminspiegel sehr starken Schwankungen unterliegen.

Da Tumore der Nebenniere und des Zuckerkandl-Organs relativ zum Noradrenalin mehr Adrenalin sezernieren als extraadrenale Tumore (siehe 1.1.4), ist bereits aus der Urindiagnostik eine richtungsweisende Lokalisationsdiagnostik möglich.

Clonidin, ein α2-Agonist, supprimiert bei Patienten mit Phäochromozytom nicht die Produktion von Katecholaminen und kann deshalb zur Differentialdiagnose gegenüber der essentiellen Hypertonie eingesetzt werden (Bravo, 1991).

An bildgebenden Verfahren stehen die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT), die MIBG-Szintigraphie und die Sonographie zur Verfügung. Bei geringer Schnittdicke (5 mm) erhält man durch die Computertomographie gut detaillierte Bilder von abdominalen und thorakalen Phäochromozytomen (Neumann et al., 1997; Stewart et al., 1978) bei einer Sensitivität von 98,9% für intraadrenale Phäochromozytome und von 90,9% für extraadrenale. (Mannelli et al., 1999). Die Magnetresonanztomographie besitzt eine ähnlich gute Sensitivität wie die Computertomographie (Maurea et al., 1993). Durch die freie Wählbarkeit der Schnittebenen ist insbesondere die präoperative Beurteilung der anatomischen Verhältnisse möglich (Neumann et al., 1997). Besonders T_2 gewichtete MRT-Aufnahmesequenzen erlauben eine morphologische Charakterisierung des Tumorgewebes (Reinig et al., 1994). Die Sonographie spielt aufgrund ihrer geringen Sensitivität und Spezifität in der Differentialdiagnose nur eine untergeordnete Rolle, sie ist jedoch als Screening Methode und im Follow-Up die Methode der Wahl (Neumann et al., 1997). Die Arteriographie ist kontraindiziert, da sie leicht eine hypertensive Krise auslösen kann (Christenson et al., 1976).

Meta-iodo-benzylguanidin (MIBG) ist ein physiologisches Analogon zu Noradrenalin und wird in neurosekretorischen Granula aufgenommen und gespeichert (Wieland et al., 1981) und reichert sich in Phäochromozytomen an. Wenn es mit ^{123}I oder ^{131}I radioaktiv markiert wird kann es zur Lokalisationsdiagnostik eingesetzt werden (Farahati et al., 1997; Maurea et al., 1993). Diese Methode hat eine Sensitivität von 88,5% (Mannelli et al., 1999) während ihre Spezifität mit 95-100% derjenigen von CT und MRT überlegen ist (van Gils et al., 1991; Velchik et al., 1989).

1.1.7 Phäochromozytome bei Kindern und in der Schwangerschaft

Phäochromozytome bei Kindern sind sehr selten. Sie sind für 1-2% der kindlichen Hypertonien verantwortlich (Wyszynska et al., 1992). Im Gegensatz zu Tumoren beim Erwachsenen (10%) sind etwa 30% extraadrenal gelegen, die malignen Tumore liegen sogar zu 50 % extraadrenal (Coutant et al., 1999).

Phäochromozytome in der Schwangerschaft sind ebenfalls selten, jedoch haben sie unerkannt eine hohe Letalität, da ihre Symptome leicht als Präeklampsie fehlgedeutet werden können. Die Mortalität lag vor 1970 bei 48% für die Mutter und bei über 50% für den Fetus. Durch die Einführung der α-Rezeptoren-Blockade sind die Risiken heute für die Mutter gering, für den Fetus liegen sie bei 15% (Remmel et al., 1999).

Durch Kindsbewegungen, Lagerung der Schwangeren und vaginale Entbindung kann Druck auf den Tumor ausgeübt werden, was zu exzessiver Katecholaminausschüttung führt (Harper et al., 1989). Durch die Katecholamine kommt es zu einer Vasokonstriktion und dadurch zu einer Plazentainsuffizienz mit nachfolgendem Spontanabort oder fetaler Hypoxie (Remmel et al., 1999).

Die Therapie der Wahl ist auch hier die chirurgische Tumorentfernung. Im ersten Trimenon der Schwangerschaft wird bei der Resektion des Tumors trotz vorausgehender medikamentöser Therapie in 80% der Fälle ein Verlust des Kindes beschrieben (Lau et al., 1996). Im zweiten Trimenon sollte nach medikamentöser Blutdruckeinstellung unter Erhaltung der Schwangerschaft die Tumorextirpation erfolgen. Im letzten Trimenon sind auf Grund der Größe des Uterus keine Tumorektomie und Exploration des Abdomens mehr möglich. In diesen Fällen sollte unter α-Rezeptoren-Blockade am festgestellten Geburtstermin im selben Eingriff nach der Sectio caesarea die Tumorentfernung durchgeführt werden (Remmel et al., 1999).

1.1.8 Therapie des Phäochromozytoms

Auch heute noch ist die operative Entfernung des Tumors die Therapie der Wahl (Sheps et al., 1990; Walther et al., 1999){Lehnert, Hahn, et al. 2002 288 /id}. Sie ist kurativ für 90% der Patienten mit benignem und für 50% der Patienten mit malignem Tumor (Sheps et al., 1988). Die chirurgische Therapie war bis zur Einführung der α- und β-Rezeptoren-Blockade zum Unterdrücken von intraoperativen hypertonen Krisen mit einer Mortalität von 24-50% behaftet (Levine et al., 1984; Pullerits et al., 1988). Nach der Einführung dieser Substanzen sank die perioperative Mortalität auf unter 2%.

Die modernen bildgebenden Verfahren zur Diagnose und Lokalisation der Phäochromozytome erübrigen die Notwendigkeit einer kompletten abdominalen intraoperativen Exploration (Orchard et al., 1993). Die ausgereifte Lokalisationsdiagnostik erlaubt es, gezieltere Zugänge als die Laparotomie, wie z.B. die Laparoskopie, zu wählen. Die endoskopische Operation hat gegenüber der offenen Technik den Vorteil, dass bei der Operation weniger Narkotika benötigt werden, der stationäre Aufenthalt verkürzt wird und der Patient schneller zu seinen normalen Aktivitäten zurückkehrt (Guazzoni et al., 1995; Vargas et al., 1997).

Nur bei technisch oder aus onkologischer Sicht inoperablen Fällen, z.B. bei ausgedehnter Metastasierung oder Tumorinvasion in das umliegende Gewebe, wird auf andere Arten der Therapie zurückgegriffen (Mornex et al., 1992), z.B. die Radioablation mit ^{131}I-Meta-iodo-benzylguanidin (MIBG) (Vierhapper et al., 1997). Die Therapie mit MIBG führt zwar in 30-50% der Fälle zu einem Rückgang der Katecholaminausscheidung, jedoch nicht immer zu einer Tumorreduktion. Eine alleinige Senkung der Katecholaminausschüttung führt jedoch nicht zu einer Verbesserung der Rezidivquote oder der Überlebenszeit (Sheps et al., 1988). Darüber hinaus sind Phäochromozytome relativ strahlenresistent, weshalb eine Therapie mit ^{131}I-MIBG (^{131}I-Meta-iodo-benzylguanidin) nur wenig Langzeiterfolge zeigt und eine Bestrahlungstherapie nur Aussicht auf Erfolg hat, wenn mehr als 40 Gray in das Tumorgebiet gebracht werden können (Sheps et al., 1988). Der Erfolg einer Therapie mit ^{131}I-MIBG hängt von der genügenden Aufnahme im Tumor ab, dies ist jedoch nur bei einem Drittel der Patienten der Fall (Krempf et al., 1991). Trotzdem lässt sich in einigen Fällen eine Tumorreduktion um 50% und eine deutliche Abnahme der Katecholaminexkretion erreichen (Krempf et al., 1991; Mornex et al., 1992), .

Auch eine chemotherapeutische Behandlung hat nur wenig Einfluss auf die Krankheitsdauer, obgleich bei 61% der behandelten Patienten eine Tumorregression und bei 74% eine Verringerung der Katecholaminausschüttung nach Gabe von Cyclophosphamid, Vincristin und Dacarbazin zu verzeichnen waren. Diese Therapie hatte jedoch keinen Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten (Averbuch et al., 1988).

1.2 Funktion und Wertigkeit der Angiogenese

Da es sich bei den Phäochromozytomen um stark vaskularisierte Tumore handelt, soll in dieser Arbeit speziell die Funktion und der Stellenwert der Angiogenese in diesen Tumoren untersucht werden.

Neue Blutgefäße werden durch Aussprossung von vorbestehenden Blutgefäßen gebildet. Zu unterscheiden ist dieser, als Angiogenese bezeichnete Vorgang, von der Vaskulogenese, der embryonalen Entstehung von Blutzellinseln durch Differenzierung von Angioblasten und hämatopoietischen Vorläuferzellen (Risau et al., 1995). Die Neubildung von Blutgefäßen beim Erwachsenen geschieht ausschließlich durch Angiogenese, wobei sie beim gesunden Menschen praktisch nicht vorhanden ist (nur 0,01% der Endothelzellen befinden sich zu einem beliebigen Zeitpunkt in der Zellteilung (Hobson et al., 1984)), mit Ausnahme der Vorgänge beim weiblichen Fortpflanzungszyklus (Ovulation, Menstruation, Implantation, Schwangerschaft) (Hanahan et al., 1996).

Die Angiogenese spielt bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine Rolle. Zu diesen gehören u.a. die Wundheilung, die Gefäßneubildung bei Retinopathien und bei der rheumatoiden Arthritis (Hanahan et al., 1996).

Eine entscheidende Rolle spielt die Angiogenese beim Wachstum und der Entstehung von Tumoren und Metastasen (Folkman, 1974).

1.2.1 Angiogenesefaktoren

Viele Wachstumsfaktoren wie etwa basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) wirken als Mitogen auf eine breite Palette von Zelltypen. Im Gegensatz dazu wirkt der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) nur auf Gefäßendothelzellen mitotisch. Eine Auflistung weiterer pro- und antiangiogener Faktoren ist in **Tabelle 2** wiedergegeben. Im Weiteren soll nur auf VEGF als einem der wichtigsten Angiogenesefaktoren eingegangen werden (Ferrara et al., 1996).

Synonyme für den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sind Vascular Permeability Factor (VPF), Vasculotropin (VAS), Vascular Endothelial Cell Proliferating Factor und Mouse Sarcoma 180-derived growth Factor.

VEGF ist ein homodimeres, stark glykolysiertes Protein mit einer Molekularmasse von 45 kDa mit 24 kDa Untereinheiten. Die Untereinheiten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die VEGF-Gene sind auf Chromosom 6p12 lokalisiert (Wei et

al., 1996; Mattei et al., 1996). Tischer und Mitarbeitern konnten zeigen, dass in Kultur gehaltene glatte Muskelzellen von Blutgefäßen VEGF produzieren (Tischer et al., 1991). Sie konnten aus diesen Zellen drei verschiedene Varianten von VEGF mit 121, 165 und 189 Aminosäuren, die durch unterschiedliches Splicing der mRNA entstehen, nachweisen. Heute sind fünf verschiedene Varianten mit 121, 165, 183, 189 und 206 Aminosäuren Länge bekannt, von denen die wichtigsten und am weitesten unter verschiedenen Zelltypen verbreiteten, die beiden löslichen Unterformen VEGF-121 und VEGF-165 sind.

VEGF ist das einzige Mitogen welches spezifisch für Endothelzellen ist. Es induziert Angiogenese und steigert die Durchlässigkeit des Endothels (Neufeld et al., 1994). Seine Expression wird durch Hypoxie gesteigert (Millauer et al., 1994). Die Rezeptoren für VEGF sind VEGFR-1 (auch Flt-1 (fms-like tyrosine kinase 1) genannt) und VEGFR-2 (beim Menschen KDR (Kinase domain region), bei der Maus Flk-1 (Fetal liver kinase 1) genannt) (Mustonen et al., 1995). Homozygote Mutationen der VEGF-Rezeptoren führen zum Fehlen von Vaskulogenese bei 8 Tage alten Mäuseembryos, was zeigt, dass VEGF-Rezeptoren für die Bildung eines normalen Gefäßbettes nötig sind (Shalaby et al., 1995). Ebenso wurde durch Veränderung des VEGF-Gens in Stammzellen von Mäuseembryonen die Produktion von VEGF gehemmt. Embryonen, die sich aus diesen Stammzellen entwickelten, wiesen Defekte in der Vaskulogenese sowie in der Angiogenese auf, welche am 10-12 Tag zum Tode führten (Shalaby et al., 1995).

Nahezu alle bislang untersuchten Tumorzellen sezernieren VEGF *in vitro* und zeigen eine verstärkte VEGF mRNA-Expression. Übersicht: (Ferrara, 1999). Hierzu gehören u.a. Lungen-, Mamma-, Kolon-, Pankreas-, Prostata-, Nieren-, Blasen-, Ovarial-, Endometrium-, Zervix-, gastrointestinale und Schilddrüsenkarzinome, ferner eine Reihe von Sarkomen, Hämangio- und Neuroblastomen sowie Gliome und Astrozytome.

Es konnte gezeigt werden, dass im Gewebe schnell wachsender hochmaligner Tumore der Gehalt an VEGF-mRNA deutlich erhöht ist (Brown et al., 1995a). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass in hypoxischem Gewebe am Rand von Nekrosen der Gehalt an VEGF-mRNA signifikant zunimmt (Plate et al., 1992).

Tabelle 2: Angiogenese fördernde und hemmende Faktoren

Angiogene Faktoren	**Antiangiogene Faktoren**
Vascular endothelial growth factor VEGF	VEGF blockierende Antikörper (VEGF-Rezeptor Antikörper)
Fibroblast growth factor FGF	Angiostatin
Tumor Nekrose Faktor	Endostatin
Transforming growth factor-β	Interferone
Platelet-derived growth factor	Interleukin-1 + 2
Granulocyte colony-stimmulating factor	Thalidomid
Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$	Integrin $\alpha_v\beta_3$-blockierende Peptide
Metalloproteinasen	Metalloproteaseinhibitoren
Platelet-activating factor, substance P	

Beispiele für Substanzen, die eine positive bzw. negative Wirkung auf die Angiogenese haben. Modifiziert nach (Ghadimi et al., 1998).

1.2.2 Merkmale der Tumorangiogenese

Die Entstehung von Metastasen setzt eine Vielzahl von Einzelschritten voraus, die Tumorzellen bewältigen müssen, bevor sie andernorts vom Primärtumor entfernt manifest werden. Als einer der ersten Schritte wird die epitheliale Integrität durch Zelladhäsionsverlust aufgehoben. Die Proteolyse der extrazellulären Matrix sowie eine gesteigerte Lokomotion der malignen Zellen führt letztendlich zur Intravasation und Dissemination. Tumorzellen müssen dann wieder an das Endothel adhärieren und im Metastasierungsorgan das Gefäßsystem verlassen. Die Etablierung dort bedarf neben proteolytischer und adhäsiver Prozesse insbesondere der Neoangiogenese, die das Metastasenwachstum initiiert und aufrechterhält (Ghadimi et al., 1998).

Die Neoangiogenese ist nicht nur für das Wachstum von Metastasen nötig, sondern genauso wichtig bei der Entwicklung des Primärtumors. Nachdem durch tumoröse Transformation eine Zelle begonnen hat sich unkontrolliert zu teilen, hat sich die Entstehung eines Tumors angebahnt. Die Zellen können anfangs durch Diffusion aus dem umliegenden Gewebe ernährt werden. Sobald aber die Größe des neuen Gewebes

ein Volumen von ca. 1 mm^3 überschritten hat, reicht die Diffusion zur Versorgung nicht mehr aus, weil die Diffusionsstrecke zu lang wird (Folkman, 1990). Da die Tumorzellen sich weiter teilen, wächst der Tumor zunächst weiter. Die Zellen, die im Zentrum des Tumors liegen, werden so von der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen immer weiter abgeschnitten, bis sie schließlich absterben (**Abbildung 1a**).

Es resultiert ein Wachstumsstillstand, der je nach Tumorentität unterschiedlich lange dauern kann. In dieser avaskulären Phase verhält der Tumor sich wie ein Carcinoma in situ ohne weitere Größenzunahme und Metastasierungstendenz (Fidler et al., 1994). Die Mechanismen der tumorinduzierten Angiogenese sind unklar. Möglicherweise entsteht durch die intratumorale Hypoxie ein Selektionsdruck, der Tumorzellen mit einem gegen Hypoxie resistenteren Phänotyp einen Überlebensvorteil bietet.

Das *p53* Tumorsuppressor-Gen spielt bei der Steuerung des Zellzyklus und der Apoptose eine wichtige Rolle und ist eines der Gene, die in malignen Zellen am häufigsten mutiert sind. Der Verlust von *p53* scheint die Tumorzellen in die Lage zu versetzen, unter hypoxischen Bedingungen überleben zu können (Graeber et al., 1996) und zu einer stärkeren Produktion von VEGF zu führen (Mukhopadhyay et al., 1995) (**Abbildung 1b**). Die VEGF-Expression führt zu einer vermehrten Einsprossung von Gefäßen in den Tumor und damit zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung. Diese Änderung des Phänotyps des Tumors wird als *„Angiogenic Switch“* bezeichnet (Harris, 1997).

VEGF führt zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und damit zu einem Übertritt von Fibrinogen und Plasminogen, welches die Bildung großer Mengen von Plasmin ermöglicht und die Proteolyse initiiert (**Abbildung 1c**). Mit Proteolyse der extrazellulären Matrix ist ein weiterer Schritt zur Metastasierung eingeleitet (**Abbildung 1d**) (Ghadimi et al., 1998).

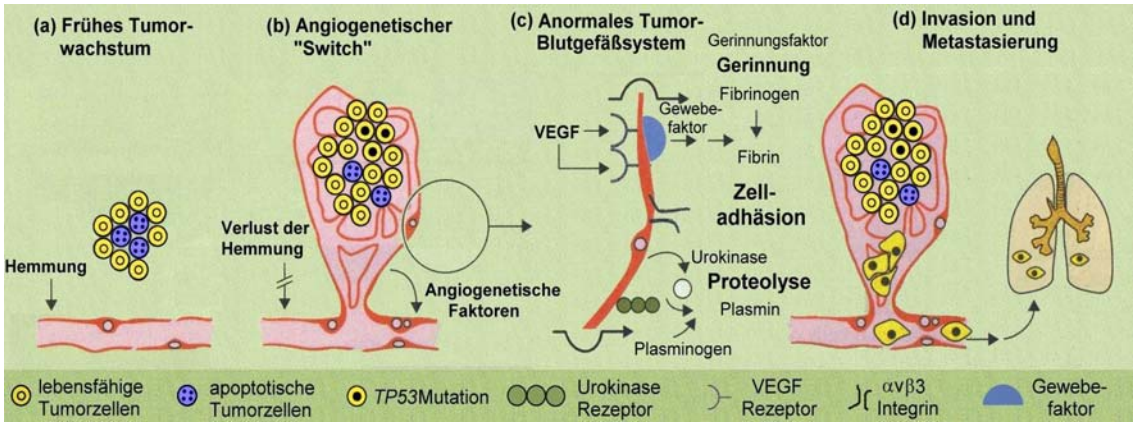

Abbildung 1: Tumor Angiogenese, modifiziert nach Harris 1997

a) Kleiner Tumor, weniger als 1 mm^3 im Durchmesser mit einer hohen Apoptoserate, ohne neue Gefäßversorgung ist kein weiteres Wachstum möglich.
b) Hypoxische Umgebung und genetische Instabilität ermöglichen die Entwicklung von Tumorklonen, welche die p53 Funktion verloren haben. Diese Zellen haben eine geringere apoptotische Rate und produzieren proangiogene Faktoren, die neue Gefäßversorgung induzieren.
c) Die Tumorgefäßversorgung ist unnormal. Undichte Gefäße ermöglichen den Übertritt von Fibrinogen unter Bildung von Fibrinschichten mit vom Tumorendothel gebildetem Gewebefaktor. VEGF Rezeptoren und Urokinase-Rezeptor αvβ3 und αvβ5 sind hoch reguliert. Undichtigkeit für Plasminogen ermöglicht die Bildung großer Mengen von Plasmin und die Proteolyse schreitet fort. Die Endothelzellen weichen auseinander.
d) Diese Prozesse ermöglichen Invasion und Metastasierung und sind ebenso an entfernter Stelle notwendig, um das Wachstum von Metastasen zu ermöglichen.

1.2.3 Therapeutische Ausblicke im Rahmen der Angiogenese

Folkman zeigte 1995 die Wichtigkeit von VEGF und seinen Rezeptoren für das Tumorwachstum, sowie die theoretische Möglichkeit einer Tumortherapie, durch Eingriffe in das System der Angiogenese auf (Folkman, 1995).

Es wurden bereits einige mögliche Ansätze für eine antiangiogene Therapie identifiziert (Teicher, 1995). Zu diesen gehören Inhibitoren der Matrix-Metalloproteasen (Brown et al., 1995b) und Urokinase (Min et al., 1996), Heparin-Analoga, die Heparin-bindende Angiogenesefaktoren inhibieren, sowie Inhibitoren der VEGF-Funktion (siehe **Tabelle 2**). Die zentrale Rolle, die VEGF in der Angiogenese spielt, macht die Hemmung des VEGF zu einem bevorzugten Ziel der Antiangiognese-Forschung (Harris, 1997).

Im Tierexperiment konnte bereits gezeigt werden, dass anti-VEGF-Antikörper nicht nur eine hemmende Wirkung auf das Wachstum des Primärtumors, sondern auch der Bildung von Metastasen haben (Kim et al., 1993; Kondo et al., 1993; Melnyk et al., 1996).

1.3 Das Phäochromozytom-Tumormodell auf der Basis von PC12-Zellen

Das Fehlen kontinuierlicher Phäochromozytomzelllinien macht Untersuchungen zur Wachstumsregulation und Tumorigenese in Phäochromozytomen schwierig. Untersuchungen in humanen Phäochromozytomen in Kultur sind sporadisch. Die wenigen verfügbaren Daten belegen eine große Vielfalt der Morphologie, der Katecholaminproduktion und der Antwort auf Stimuli wie NGF (nerve growth factor) und Steroide. Aspekte des malignen Phänotyps sind bislang gar nicht untersucht worden. Ein Hauptproblem ist die Seltenheit des Tumors und die Nichtverfügbarkeit entsprechenden Studienmaterials humaner Phäochromozytome. Ebenso fehlen etablierte Zelllinien mit unterschiedlichem Charakter *in vitro* wie *in vivo* (Zielke et al., 1998).

Greene und Tischler konnten ein röntgeninduziertes Phäochromozytom der Ratte, welches bis dato als subkutan transplantabler Tumor in der New-England-Deaconess-Hospital-White-Strain-Ratte (NEDH) gehalten wurde, 1975 erfolgreich als permanente Zelllinie etablieren (Greene et al., 1976). Diese Zellkultur wurde extensiv charakterisiert und stellt heute das einzige akzeptierte *in vitro*-Modell eines Phäochromozytoms dar (Greene et al., 1976; Tischler et al., 1983; Tischler et al., 1990; Rukenstein et al., 1991).

Zwischenzeitlich ist eine ausgeprägte Heterogenität der Linie dokumentiert. Diese Heterogenität führt zu morphologisch und funktionell unterschiedlichen Klonen, von denen bislang ca. 20 publiziert sind (Fujita et al., 1989).

Aufgrund ihres hohen Differenzierungsgrades sind die PC12-Zellen ein weithin akzeptiertes Model neuronaler Differenzierung. Durch Stimulieren mit Nervenwachstumsfaktor (NGF) kann eine charakteristische phänotypische Differenzierungsantwort erhalten werden, die durch vorübergehendes Sistieren der Proliferation sowie die Ausbildung exzitabler axonähnlicher Strukturen gekennzeichnet ist (Greene et al., 1976; Tischler et al., 1983; Tischler et al., 1990; Mark et al., 1995).

Als ein Charakteristikum des Ursprungsgewebes produzieren PC12-Zellen Katecholamine. Im Gegensatz zu dem subkutan transplantierten PC12-Primärtumor, sezernieren die PC12 Zellen in Kultur allerdings weniger Adrenalin und Noradrenalin, aber eine um den Faktor 10 höhere Menge an Dopamin (Greene et al., 1976; Tischler et al., 1983; Tischler et al., 1990). In dieser besonderen Sekretionsleistung für Dopamin begründet sich das Interesse zur Verwendung der PC12-Zellen als zerebrale Allotransplantate beim experimentellen Morbus Parkinson (Dehaut et al., 1993; Lindner et al., 1995; Yoshida et al., 1999).

PC12-Zellen haben ihre Fähigkeit zum Wachstum *in vivo* behalten. Im syngenen Wirt, der NEDH-Ratte, werden nach subkutaner Inokulation von 10^6 bis $5x10^7$ PC12-Zellen nach 30 - 40 Tagen lokale Tumore gesehen, die in aller Regel nicht invasiv sind und keine metastatischen Läsionen setzen (Greene et al., 1976). Der ursprünglich in NEDH-Ratten transplantierte Tumor war lokal invasiv, rasch wachsend und tötete die Tiere in 30-60 Tagen. In Sprague-Dawley-Ratten wurde kein lokales Tumorwachstum nach subkutaner Transplantation von PC12 Zellen registriert. Wenige Wochen nach subkutaner Implantation wurden keine vitalen Zellen mehr gefunden (Warren et al., 1972).

Keinen Zweifel gibt es an dem Einfluss der Proteine der extrazellulären Matrix in Bezug auf die Adhäsion und neuronale Differenzierung von humanen und PC12-Phäochromozytomzellen. Laminin, Kollagen IV, Poly-Lysin und - Ornithin sowie zwei- und dreidimensionale Basalmembranpräparationen beeinflussen die Tumorzelladhäsion und induzieren einen differenzierten Phänotyp auch unabhängig von der Zugabe von Wachstumsfaktoren (Schwarz et al., 1990; Tomaselli et al., 1988; Keshmirian et al., 1989).

Seit 1992 ist bekannt, dass VEGF mRNA in PC12-Zellen zu finden ist (Claffey et al., 1992), was die Frage nahe legt, in wie weit die Angiogenese in Tumoren von PC12-Zellen durch VEGF gesteuert wird.

1.4 Fragestellung

Die Suche nach sicheren histopathologischen Unterscheidungskriterien (wie z.B. Invasivität, Mitoserate, Zellmorphologie etc.) zur Dignität der Phäochromozytome, wie sie bei anderen Tumoren bekannt sind, führte bisher nicht zu einem befriedigenden Ergebnis. Auch der Versuch, maligne Phäochromozytome durch Untersuchung wichtiger Onkogene (*p53, ras, myc, mos*), bestimmter Wachstumsfaktoren (EGF, TGFα und –β, IGF/IGFr), Analyse der Ploidie oder zusammenfassender Analyse klinischer und histopathologischer Merkmale zu identifizieren, hat bisher keine klaren Bewertungskriterien geliefert (Yoshimoto et al., 1998).

Die Untersuchung der Angiogenese im Tumorgewebe hat bereits in Tumoren verschiedenen Ursprungs Resultate liefern können, die mit den bekannten Goldstandards zur Klassifizierung der Dignität und Einschätzung der Prognose in Einklang gebracht werden konnten (Blasenkarzinom (Bochner et al., 1995), Mammakarzinom (Weidner et al., 1992), nicht kleinzelliges Lungenkarzinom

(Macchiarini et al., 1992) und Prostatakarzinom (Brawer et al., 1994). Da ein solcher Goldstandard für das Phäochromozytom bisher nicht existiert, diese Tumore aber durch starke Vaskularisation auffallen, ist es besonders interessant, die Methoden der Angiogenesemessung zur Dignitätsbeurteilung auch im Phäochromozytom zu untersuchen.

Aus der Seltenheit der Phäochromozytome resultiert das Fehlen prospektiver Studien zur Therapie, daher ist auch wenig zur Zellbiologie der malignen Phäochromozytome bekannt. Bei anderen Tumoren konnten experimentelle Tumormodelle etabliert werden, mit deren Hilfe deren zell- und molekularbiologisches Verhalten untersucht werden kann (Cahlin et al., 2000; Prevost-Blondel et al., 2000; Sandhu et al., 2000; Seberger et al., 1999; Iinuma et al., 1999; Kaufman et al., 1999; Kocheril et al., 1999; Soo et al., 1999). Ein solches *in vivo- / in vitro*- Modell ist seit kurzem für den malignen Phänotyp des Phäochromozytoms auf Basis von Rattenphäochromozytomzellen (PC12-Zellen) verfügbar (Zielke et al., 1998). Mit diesem Tumormodell ist man nun in der Lage, die Biologie der Phäochromozytome genauer zu untersuchen, ohne den Beschränkungen einer ungenügend großen Patientenzahl zu unterliegen. Im Besonderen stellt sich hier die Frage, ob Unterschiede in der Neoangiogenese maligner und benigner Tumore existieren, ob die Neoangiogenese *in vivo* hemmbar ist und damit eine Therapieoption maligner Phäochromozytome eröffnet werden kann.

Aus dem zuvor gesagten lassen sich folgende Aufgaben und Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet werden, formulieren:

1. Wird von PC12-Zellen einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren für Blutgefäße — VEGF— produziert und sezerniert und ist dieser biologisch aktiv?
2. Lässt sich in einem etablierten Tumormodell eines experimentellen, malignen Phäochromozytoms auf Basis der PC12-Zellen ein Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF, der Angiogenese im Tumor und dem Tumorwachstum darstellen?
3. Sind diese Ergebnisse auch für humane Phäochromozytome repräsentativ, d.h. lässt sich dieser Zusammenhang in gleicher Weise auch im humanen Phäochromozytom darstellen und existieren Unterschiede zwischen benignen und malignen Tumoren?
4. Kann durch spezifische Antikörper gegen den Gefäßwachstumsfaktor VEGF die Neoangiogenese im Phäochromozytom gehemmt und damit das Wachstum der Tumorzellen unterdrückt werden?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

- Aceton (8002, Baker, Holland)
- AEC-Chromogen (3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC-101, SIGMA, Deutschland))
- Antigen Retrieval *AR-10* Solution (HK057-5K, BioGenex, USA)
- Antigen Retrieval *Citra* Solution (HK086-5K, BioGenex, USA)
- Antigen Retrieval *Glyca* Solution (HK167-5K, BioGenex, USA)
- APES (3- Aminopropyltriethoxysilene (A-3648, SIGMA, Deutschland))
- DAB-Chromogen (3,3'Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (S 3000, DAKO, Deutschland))
- Eindeckmedium permanent (Roti Histokitt, 6638.1, Roth, Deutschland)
- Eindeckmedium wässrig (SuperMount, HK079-5K, BioGenex, USA)
- Eosin Y alkoholisch (HT110-1-32, SIGMA, Deutschland)
- Esel-Normalserum (cs-2044, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Essigsäure (7332.1, Roth, Deutschland)
- Ethanol (32205, Riedel-de Haën, Deutschland)
- Formaldehyd 37% (4979.1, Roth, Deutschland)
- Hämalaun nach Mayer (1.09249, Merck, Deutschland)
- humanes rekombinantes VEGF (hrVEGF, V7259, SIGMA, Deutschland)
- Matrigel (Collaborative Research, USA)
- Nervenwachstumsfaktor (7S-NGF (N0513, SIGMA, Deutschland))
- Paraffin (Roti-Plast, 6642, Roth, Deutschland)
- PBS (Phosphate buffered Saline (OSGS 45, Behring, Deutschland))
- Picrinsäure (31,928-7, SIGMA, Deutschland)
- Streptavidin (Streptavidin-HRP, 554066, PharMingen, Deutschland)
- Wasserstoffperoxyd (H_2O_2 (1.07209, Merck, Deutschland))
- Xylol (8080, Baker, Holland)
- Ziegen-Normalserum (X 0907, DAKO, Deutschland)

- Citratpuffer:
  2,1 g Citronensäure-Monohydrat (1.00242, Merck, Deutschland)
  in 1 Liter Aqua dest. lösen
  mit 2M Natronlauge (NaOH (1.09137, Merck, Deutschland)) einstellen auf pH 6,0

- Standardmedium für PC12-Zellen:

RPMI 1640	85%
hitzeinaktiviertes equines Serum	10%
fetales bovines Serum	5%
Glutamin	1 mM/ml
Penicillin	50 IU/ml
Streptomycin	50 µg/ml

- Serumfreies Medium für PC12-Zellen (N3-Medium) (Bottenstein et al., 1979):

Basismedium	DME (h21) / Ham's F12	1/1 (v/v)
Additive	Insulin	20 µg/ml
	Progesteron	2 nM/ml
	Selenium	3 nM/ml
	humanes Transferrin	50 µg/ml
	Putrescin	50 µM/ml

- Zytokin- und serumfreies Medium für PC12-Zellen (N2E-Medium): (El Badry et al., 1989)

Basismedium	DME (h21) / Ham's F12	1/1 (v/v)
	Natriumbicarbonat	1,2 mg/ml
	HEPES	15 mM/ml
	L-Glutamin	1 mM/ml
Additive	humanes Transferrin	10 µg/ml
	Selenium	30 nM/ml
	Progesteron	20 nM/ml
	Putrescin	100 µM/ml

- Additive zum Basismedium für HUVEC-Zellen:

ECGS/H	0,4%
FCS	2%
EGF	0,1 ng/ml
bFGF	1 ng/ml
Hydrocortison	1 µg/ml
Amphotericin B	50 ng/ml
Gentamicin	50 µg/ml

- TRIS-HCl-Puffer 0,05M, pH 7,6:
  6,1 g TRIS-Base (Trishydroxymethylaminomethan (4855.2, Roth, Deutschland))
  in 50 ml Aqua dest. lösen
  37 ml 1N Salzsäure (HCl, 1.09057, Merck, Deutschland) hinzufügen
  ad 1 Liter Aqua dest. auffüllen
- Trypsinlösung 0,1%:
  0,2 g Trypsin (T-7409, SIGMA, Deutschland)
  0,2 g $CaCl_2$ (Calciumchlorid-Dihydrat, 2388, Merck, Deutschland)
  in 200 ml TRIS-HCl-Puffer 0,05M auflösen
  pH-Wert mit 0,1 N Natronlauge (NaOH (1.09137, Merck, Deutschland)) auf 7,8 einstellen

2.2 Zur Anwendung gekommene Antikörper und Kits

- Anti-VEGF A20 (sc-152 (Kaninchen), Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Sekundärantikörper dazu (Link und Label, anti-Rabbit Ready-to-use Detection System for Animal Tissues, GP000-5R, BioGenex, USA)
- Anti-CD31 PECAM-1/MEC 13.3 (01951A (Ratte), PharMingen, Deutschland)
- Sekundärantikörper dazu (Ziege anti-Ratte, 12112D, PharMingen, Deutschland)
- Anti-CD31 PECAM-1/M-20 (cs-1506 (Ziege), Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Anti-CD34 C-18 (cs-7045 (Ziege), Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Anti-VE-cadherin C-19 (cs-6458 (Ziege), Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Sekundärantikörper dazu (Esel anti-Ziege, sc-2042, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Anti-VEGF mAB 4.6.1. (Genentech, USA)
- VEGF-Enzym-Immunoassay (CYT132 VEGF EIA Kit, Chemicon, USA)

2.3 Zur Anwendung gekommene Geräte

- Coplin Gefäße zum Kochen (H548.1, Roth, Deutschland)
- Deckgläser (H875.1 / 1871.1, Roth, Deutschland)
- Diverse Glasgefäße und Messzylinder
- Einbettgerät (Reichert Histo Stat, Reichert-Jung, Deutschland)
- ElisaMultiscan (Titertek, Finnland)
- Färbetröge mit Einsatz (H554.1 / 552.1, Roth, Deutschland)
- Feuchte Kammern (Eigenbau) für die Antikörper-Inkubation über Nacht

- Gewebekulturflaschen (658170, Greiner, Deutschland)
- Mikroskop (DMLB, Leica, Deutschland)
- Mikrotom (1515, Leitz, Deutschland)
- PC mit Auswertungssoftware (Q500MC, Leica, Deutschland)
- Objektträger (02 1102, Menzel-Gläser, Deutschland)
- Präparatekästen (K335.1, Roth, Deutschland)
- Wasserbad (TFB45, Medite, Deutschland)

2.4 Nachweis des VEGF-Proteins und seiner biologischen Wirksamkeit

VEGF-Sekretion zur Gefäßneubildung wird in vielen Tumormodellen gefunden. Um zu prüfen, ob im PC12-Tumormodell ebenfalls VEGF sezerniert wird und dieses biologisch aktiv ist, wurde das Medium, in welchem PC12-Zellen kultiviert wurden, untersucht.

Jeweils $1x10^6$ vitale PC12-Zellen wurden in 24-er Mikrotiterplatten eingesät und nach Anheften über 24 Stunden im normalen Wachstumsmedium der Mediumüberstand über 48 Stunden konditioniert. Der Überstand wurde anschließend asserviert, bei 10.000 g für 2 Minuten zentrifugiert, um Zelldetritus und ungelöste Mediumbestandteile aus dem Überstand zu entfernen und bei –20°C bis zur Analyse gelagert.

Für den Nachweis des in das Medium sezernierten VEGF wurde ein kompetetives Bindungsassay (CYT132 VEGF EIA Kit) genutzt. Mit diesem Assay können freies, an Plasmaeiweiße gebundenes, natürliches VEGF sowie seine rekombinanten Formen nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde zellfreies PC12-Medium benutzt.

Der Aufbau des Assays entspricht dem eines kompetitiven Sandwich-EIA, bei dem das im Untersuchungsmaterial vorhandene VEGF mit rekombinantem, biotinyliertem VEGF um Bindungsstellen auf der Testplatte konkurriert.

Jeweils 100 µl der Testmedien wurden in Kammern einer mit dem Sekundärantikörper beschichteten 96-er Mikrotiterplatte gegeben, 25 µl des rekonstituierten VEGF Antikörpers zugegeben und für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe des biotinylierten VEGF Konjugats wurden die Platten erneut für 30 bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 mal in einer Pufferlösung gewaschen. Nach Zugabe von jeweils 50 µl einer Lösung von mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Streptavidin für weitere 30 Minuten, folgte nach erneutem Waschen, 5 mal mit Pufferlösung, die Farbreaktion. Nach 15 Minuten wurde die optische Dichte bei 492 nm mit einem ElisaMultiscan gemessen. Nach gleichem Schema wurden die

Standardwerte für bekannte VEGF-Konzentrationen ermittelt. Die Berechnung der VEGF-Konzentration wurde mittels 4-Parameter logistischer Regression nach Eingabe der Standardwerte in eine Tabellenkalkulation (MS-Excel) durchgeführt.

Um zu kontrollieren, ob das von den PC12-Zellen produzierte und sezernierte VEGF biologisch aktiv ist, wurde die Veränderung der Proliferation von humanen Endothelzellen der Umbilikalvene (HUVEC), die mit dem Mediumüberstand der PC12-Zellen inkubiert wurden, untersucht (Wang et al., 1997)
Die HUVEC Zellen, das Wachstumsmedium und die für die definierten, serumarmen Medien nötigen Substanzen wurden von PromoCell Bioscience Alive GmbH, Deutschland, bezogen. XTT (Natruim3‘-[1-(phenylaminokarbonyl)-3,4-Tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-Nitrobenzensulfonsäurehydrat) zur dynamischen Zellquantitation wurde von Boehringer Mannheim bezogen.

Zum Konditionieren des Mediums wurden $20x10^6$ vitale PC12-Zellen in mit Poly-Ornithin vorbehandelten Gewebekulturflaschen eingesät und nach 24-stündigem Anheften auf frisches serumfreies N2E Medium gewechselt. Nach einer Konditionierung von 36 Stunden wurde der Mediumüberstand abpipettiert und nach Zentrifugation bei 3500 RPM über 10 Minuten zur Entfernung aller nicht gelösten Mediumbestandteile und des Zelldetritus bei –80°C gelagert. Die Proben wurden 1:2 konzentriert. Hierzu wurden 2 ml Mediumüberstand in sterilen Zentrifugenröhrchen in einer Evaporationszentrifuge (Speed-Vac) bei Raumtemperatur über 90 Minuten 2-fach konzentriert, gegen 0,9% NaCl für 24 Stunden dialysiert, steril filtriert und bei –80°C zwischengelagert. In gleicher Weise wurden aus zellfreien Kulturen gewonnene Mediumkontrollen nach einer Inkubationszeit von 36 Stunden verarbeitet.
Vitale, nicht gepoolte HUVEC Zellen wurden unter Standardkulturbedingungen in einem serumarmen Wachstumsmedium gehalten.

Für die Proliferationsassays zum Nachweis der stimulierenden Wirkung des im konzentrierten konditionierten Medium der PC12-Zellen enthaltenen VEGF, wurde das o.g. Wachstumsmedium eingesetzt, wobei ECGS/H (endothelial cell growth supplement/H), welches das für die Proliferation der HUVEC Zellen essentielle VEGF enthält, weggelassen wurde.

1-2x10^4 vitale HUVEC Zellen wurden in Kammern einer 96-er Mikrotiterplatte eingesät und zunächst für 48-72 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert, bis die Zellen eine Konfluenz von ca. 50% erreicht hatten. Anschließend wurden alle Kammern mit PBS gewaschen und das konzentrierte, konditionierte PC12-Medium dem nun VEGF-freien Wachstumsmedium der HUVEC Zellen zugegeben.
In 6 bis 12-stündigen Abständen wurde die Zellzahl mit dem XTT-Assay bestimmt. Das XTT-Assay erlaubt die dynamische Bestimmung der Zellzahl über die Zeit. Als Vergleichs- und Kontrollmedien wurden konzentriertes, über 36-72 Stunden zellfrei inkubiertes serumfreies N2E Medium und HUVEC Standardmedium, sowie HUVEC Medium ohne den Zusatz von ECGS/H eingesetzt.
Um die Spezifität der beobachteten Wirkungen zu überprüfen, wurde den Testmedien in einigen Experimenten polyklonaler anti-VEGF Antikörper (A20) und hrVEGF in einer Endkonzentration von 1-10 µg/ml zugesetzt.

2.5 Präparate des PC12-Tumormodells

2.5.1 Xenotransplantierte PC12-Zellen in der Nacktmaus

Mit Hilfe eines etablierten Tumormodells auf Basis der PC12-Zellen (Zielke et al., 1998) sollte die Auswirkung verschiedener Wachstumsbedingungen auf das Tumorwachstum und die Fähigkeit der Tumore zur Gefäßneubildung untersucht werden. Hierzu wurde auf folgende Tumore aus vorgenannter Arbeit zurückgegriffen:

1. PC12-Zellen mit einzelnen Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix präinkubiert und subkutan koinjiziert,
2. in Matrigel immobilisierte PC12-Zellen zusammen mit NGF koinjiziert.

Die aus den vorgenannten *in vivo* Experimenten gewonnenen, in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Tumore wurden im Rahmen dieser Arbeit unter anderem auf ihre VEGF-Expression und Gefäßversorgung untersucht.

Die Tumore waren in 4 bis 8 Wochen alten, weiblichen, pathogenfreien, kongenital dysthymischen, heterozygoten NCR-Nu Mäusen mit einem BALBc Hintergrund von Simonsen Laboratories, USA, gezüchtet worden.

2.5.1.1 Koinjektion mit Proteinen der extrazellulären Matrix

Um den Einfluss der extrazellulären Matrixproteine auf das *in vivo* Wachstum der Phäochromozytomzellen zu untersuchen, waren Untersuchungen mit PC12-Zellen durchgeführt worden, die zunächst für 72 Stunden auf den jeweiligen Matrixproteinen inkubiert worden waren und nach Ablösen aus den Kulturträgern mit denselben Proteinen resuspendiert wurden. Die auf den jeweiligen Matrixproteinen präinkubierten Zellen wurden in der zur Injektion vorgesehenen Proteinsuspension für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter konstanter Agitation auf einem Gyratorschüttler nachinkubiert um eine vollständige und gleichmäßige Durchmischung der Zellen mit den EZM-Proteinen zu erhalten. Anschließend wurden jeweils fünf Tiere pro Testsubstanz mit $3x10^6$ vitalen PC12-Zellen in 200 µl Matrigel (3 mg/ml), Kollagen I und IV, Fibronektin (jeweils 100 µg/ml) und Laminin (50 µg/ml) inokuliert. Als Vergleichsgruppen wurden je 5 Tiere mit unter Standardbedingungen gehaltenen PC12-Zellen, sowie tumorfreie Tiere mitgeführt (siehe **Tabelle 3**). Alle drei Tage wurden die Tiere auf ein sichtbares Tumorwachstum inspiziert, die Tumorgröße vermessen, das Gewicht der Tiere bestimmt und ihr allgemeiner Zustand beurteilt. Sofern Tumore gesichtet wurden, wurden diese seriell in drei Dimensionen mit kalibrierten Mikrometern vermessen und die Tumorvolumina errechnet.

Tabelle 3: Proteine der extrazellulären Matrix

Versuchsgruppe	EZM-Protein	Konzentration
Ctrl	Kontrolle	/
Ma	Matrigel	3 mg/ml
Co1	Kollagen I	100 µl/ml
Co4	Kollagen IV	100 µl/ml
Fn	Fibronektin	100 µl/ml
La	Laminin	50 µl/ml

Auflistung der in diesen Experimenten verwandten Proteine der extrazellulären Matrix (EZM), deren Konzentration und die Bezeichnung der zugehörigen Versuchsgruppe.

2.5.1.2 Präinkubation und Koinjektion mit NGF

Berichten folgend, nach denen in Matrigel inkorporiertes NGF eine stärkere und länger anhaltende Differenzierungsantwort von PC12-Zellen in vitro verursacht (Keshmirian et al., 1989), sollte mit dieser Untersuchungsreihe geprüft werden, ob die Wachstumskinetik der in Matrigel immobilisierten, xenotransplantierten PC12-Zellen durch die Koinjektion von in das Matrigel inkorporiertem NGF in vivo verändert wird. Die Hypothese war, dass das proliferative Potential der Zellen durch eine anhaltende morphologische Differenzierung wegen des im Matrigel enthaltenen NGF beeinträchtigt würde, wodurch die Tumorgröße mit steigender NGF-Konzentration abnehmen und sich die Tumorverdopplungszeiten verlängern sollten. Hierzu waren über 72 Stunden mit NGF in den jeweilig zur Koinjektion geplanten Endkonzentrationen präinkubierte PC12-Zellen in einer Konzentration von $3x10^6$ vitalen Zellen in 200 µl Matrigel (3 mg/ml) mit einer NGF-Konzentration von l, 10 und 100 ng/ml xenotransplantiert (jeweils 10 Tiere pro NGF-Konzentration) worden. Als Kontrollgruppen war der gleiche Versuchsansatz parallel mit in Matrigel koinjizierten PC12-Zellen und ohne Zusatz injizierten PC12-Zellen durchgeführt worden, so dass der Versuch aus 5 Gruppen bestand: mit Matrigel, ohne Matrigel, NGF 1 ng, NGF 10 ng und NGF 100 ng.

2.5.1.3 Bearbeitung und Auswertung der PC12-Tumore

Ausgewertet wurden in den unter 2.5.1 beschriebenen *in vivo* Versuchen:

- Tumordimensionen und -volumina: Seriell gemessen mit kalibrierten Mikrometern in drei Abmessungen (Länge, Breite und Höhe) im jeweiligen mittleren Tumoranteil. Die Volumina wurden mit einer der beiden folgenden Formeln berechnet:

- **Gleichung 1:** Volumenberechnung, NIH-Methode:

$$\frac{Länge * Breite^2}{2}$$ (Wang et al., 1991)

- **Gleichung 2:** Volumenberechnung, John Hopkins School of Medicine Methode:

(Länge*Breite*Höhe)*0.5236 (Isaacs et al., 1981).

- Tumorvolumenverdopplungszeit: Die individuellen Tumorverdopplungszeiten wurden als gepaarte serielle Variablen (Tage nach der Inokulation (X) und korrespondierendes Tumorvolumen (Y) an jedem Messzeitpunkt als multiple konjugate Variablenpaare in eine Matrix eingetragen. Durch eine Standardregressionsanalyse wurde ein 2-Parameter Modell erhalten, das den Verlauf des Tumorvolumens über die Zeit beschrieb. Für 2-tägige Beobachtungsintervalle wurde die allgemeine **Gleichung 3**

$$d2 = \frac{\log(2) * (d_{n+2} - d_n)}{\log(vol_{n+2} / vol_n)} \text{ formuliert.}$$

Für Untersuchungen, in denen über längere Zeitintervalle kumulierte Beobachtungszeiten berücksichtigt und die kumulierte Volumenverdopplungszeit errechnet wurden, wurde die folgende **Gleichung 4** (Anfangstag der Beobachtungsperiode: d0) genutzt.

- **Gleichung 4:** Anzahl der kumulierten Tage

$$(dcum) = \frac{\log(2) * (d_{cum})}{\log(vol_{dcum} / vol_{d0})}$$

- Tumorfeuchtgewichte: Definiert als Feuchtgewicht der am Ende der Beobachtungsperiode exzidierten Tumore und / oder Metastasen.

Die exzidierten Präparate waren für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen in einer 10%-igen Formalin-Lösung fixiert, anschließend in der Alkoholserie dehydriert, über Nacht in Xylol gegeben und in Paraffin eingebettet worden. Nach Anfertigung serieller 3 µm dicker Schnitte wurden die Präparate mittels der unter 2.8 erläuterten immunhistochemischen Methoden aufgearbeitet und nach ihrer VEGF-Expression, ihrer Gefäßversorgung und ihrer Mitoserate ausgewertet.

2.5.2 Hemmung der Angiogenese durch spezifische anti-VEGF-Antikörper

In der immunhistochemischen Aufarbeitung der Präparate des vorbeschriebenen PC12-Tumormodells zeigte sich bereits, dass PC12-Zellen in der Lage sind, VEGF zu sezernieren und Gefäßneubildung zu induzieren. Aufbauend darauf wurde eine weitere *in vivo* Versuchsreihe durchgeführt, in der getestet werden sollte, ob die Gefäßneubildung durch spezifische Antikörper gegen VEGF gehemmt werden kann. Zu diesem Zweck wurde das Verhalten von PC12-Zellen unter einer systemischen Behandlung mit einem monoklonalen anti-VEGF 165 Antikörper (VEGF mAB 4.6.1.)

und einer lokalen Applikation von koinjiziertem polyklonalem anti-VEGF Antikörper (VEGF pAB A20) im sogenannten „Mouse Angiogenesis Assay“ untersucht.
Das Assay wurde in Anlehnung an die von Passaniti und Mitarbeiter und Senger und Mitarbeiter beschriebene Methode des kapillaren Einsprossungsassays in zwei Versuchsserien durchgeführt (Passaniti et al., 1992; Senger et al., 1997). In Matrigel immobilisierte PC12-Zellen wurden subkutan in die Flanke weiblicher NMRI nu/+ (BALBc) Mäuse implantiert. Die Tierversuche wurden durch die örtliche Ethikkommission geprüft, bewilligt und im Verlauf überwacht.
Im ersten Versuchsaufbau wurde ein polyklonaler anti-VEGF Antikörper (A20) zusammen mit den Zellen in das Matrigel inkorporiert und koinjiziert. Im zweiten Versuchsprotokoll wurde unmittelbar ab der Implantation der Zellen eine Gruppe der Tiere systemisch durch eine intraperitoneale Injektion des monoklonalen anti-VEGF 165 mAB 4.6.1. behandelt. In beiden Versuchen wurden nach einer *in vivo* Wachstumsphase von 8 Tagen die Tumore und die ohne Zellen injizierten Matrigel-Kontrollimplantate zusammen mit der Haut exzidiert.

Gruppen von je sechs Nacktmäusen erhielten jeweils rechts und links der Mittellinie in die Flanke subkutane Injektionen von 250 µl Matrigel (Endkonzentration 1 mg/ml). Kurz nach der Injektion war konstant eine Verfestigung der Matrigelimplantate erkennbar, die über die Zeit erhalten blieb. In die jeweils rechten Implantate wurden Xenotransplantate von je $3x10^6$ (Protokoll 1) bzw. $10x10^6$ (Protokoll 2) vitalen PC12-Zellen, die in Matrigel resuspendiert worden waren, koinjiziert.

- Protokoll 1: Im ersten Versuchsprotokoll wurde polyklonaler anti-VEGF-Antikörper (A20) in das Matrigel in einer Konzentration von 30 µg/ml inkorporiert: 10 µg/ml pro $1x10^6$ vitale Zellen.
- Protokoll 2: Unmittelbar beginnend vor der Xenotransplantation der PC12-Zellen erhielten die Versuchstiere in Gruppen von jeweils sechs Tieren entweder 200µl PBS (Vergleichsgruppe) oder 100 µg anti-VEGF mAB 4.6.1., gelöst in 200 µl PBS (Testgruppe) über intraperitoneale Injektionen. Die Injektionen wurden in dreitägigen Abständen wiederholt.

Jeweils 8 Tage nach der Implantation wurden die Tiere durch zervikale Dislokation euthanasiert und die Implantate zusammen mit einem großzügigen Hautrand exzidiert. Die auf Korkplättchen ausgespannten Präparate wurden in einer Formalin-Picrinsäure-

Lösung (5% Picrinsäure, 10% Formaldehyd, 2% Essigsäure) für 4 Stunden fixiert, anschließend in der Alkoholserie dehydriert, über Nacht in Xylol gegeben und in Paraffin eingebettet. Die Fixierung in Picrinsäure-Lösung wurde gewählt, weil die zuvor durchgeführte Fixierung in reinem Formalin insbesondere den Nachweis antigener Strukturen bei der Gefäßdarstellung beeinträchtigte. Nach seriellem Schneiden der Präparate in 10 µm Schritten bis zum erreichen der Implantat / Wirtsgrenze, wurden 3 µm Serien geschnitten und mittels der unter 2.8 erläuterten immunhistochemischen Methoden aufgearbeitet und nach ihrer VEGF-Expression, ihrer Gefäßversorgung und ihrer Mitoserate ausgewertet.

2.6 Humane Tumore

Um der Frage nachzugehen, ob die Ergebnisse, die zuvor durch Untersuchungen mit PC12-Phäochromozytomzellen gewonnen wurden, auf humane Phäochromozytome übertragbar sind, wurde eine explorative Untersuchung an formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten humanen Tumoren durchgeführt.

In Zusammenarbeit mit der Chirurgischen Universitätsklinik Münster wurde nach Sichtung der Operationsdaten von ca. 75.000 Patienten aus den Jahren 1979-1999 eine Datenbank mit allen in diesem Zeitraum operierten Nebennierentumoren und retroperitoneal gelegenen Tumoren erstellt. Nach Abgleich der Operationsdaten mit den Berichten der Pathologie, wurden die Fälle identifiziert, bei denen es sich um Phäochromozytome handelte. In einem weiteren Durchgang, bei dem zusätzlich die klinischen Verlaufsdaten der Patienten ausgewertet wurden, wurden alle sicher malignen, weil metastasierenden, Tumore identifiziert. Die Zahl der hiernach zur Verfügung stehenden Paraffinpräparate beschränkte sich leider auf 5, da Präparate aus Operationen lediglich nach 1987 verfügbar waren. Zusätzlich zu den 5 Präparaten maligner Phäochromozytome wurden 5 Präparate ausgewählt, die einen intermediären Charakter zeigten. Diese Tumore zeichneten sich dadurch aus, dass sie nicht metastasiert hatten, von dem Pathologen jedoch eine unklare Dignität aufgrund übermäßig stark ausgeprägter lokaler Infiltration oder massiver Infiltration der Kapsel und / oder der Gefäße hervorgehoben wurde. Diesen 10 Tumoren wurden 9 nach ihrem klinischen Verlauf benigne Tumore, nach Alter und Geschlecht adaptiert, gegenübergestellt.

In diesen Präparaten wurden die gleichen Untersuchungen zur Angiogenese durchgeführt, wie bei den PC12-Tumoren. Sie wurden mit Antikörpern gegen VEGF,

CD31 und CD34 gefärbt und jeweils 20 HPF pro Präparat mit den unter 2.8.7 und 2.10 aufgeführten Methoden ausgewertet. Dabei wurden sie verblindet ausgewertet, d.h. die Gruppenzugehörigkeit war zum Zeitpunkt der Untersuchung unbekannt und wurde erst nach Abschluss aller Messungen offengelegt.

2.7 Hämalaun-Eosin Färbung

Als Standardfärbung zur histologischen Beurteilung der Gewebeschnitte wurde die Hämalaun-Eosin (HE) Färbung angewandt. Mit Hilfe dieser Färbung werden unter anderem Zellkerne und Knorpel durch Hämalaun blau, Erythrozyten, Zytoplasma und Kollagenfasern durch Eosin rot gefärbt.
Die HE-Färbung wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt:
Entparaffinieren der Präparate für 4 x 5 min in Xylol, rehydrieren für je 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 85%, 70% Ethanol) und 5 min Aqua dest. Dann Färben für 5 min in Hämalaun 1:5 mit Aqua dest. verdünnt mit anschließendem Bläuen für 10 min in fließendem lauwarmem Wasser. Danach für 1 min Färben in Eosin, 2 x Spülen in Aqua dest., dehydrieren in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 min 70%, 2 min 85%, 2 x 5 min 100% Ethanol), 4 x 2 min in Xylol klären und abschließend eindecken mit Roti Histokitt.

2.8 Immunhistochemie (IHC)

2.8.1 Objektträgerbeschichtung

Für die Immunhistochemie wurden beschichtete Objektträger (OT) benutzt. Die Beschichtung wurde mit Apes (3-Aminopropyltriethoxysilane) durchgeführt. Zuerst wurden die OT für fünf Minuten in Aceton gewaschen, dann für fünf Minuten in einer 3%-igen Apes-Acetonlösung (6 ml Apes in 200 ml Aceton) behandelt, zweimal in Aqua dest. gespült und über Nacht getrocknet. Diese Beschichtung erhöht die Haftung der Schnitte am OT, was besonders beim Antigen Retrieval wichtig ist.

2.8.2 Allgemeines zur Immunhistochemie

In der Immunhistochemie nutzt man die spezifische Reaktion von Antikörpern mit ihrem Antigen im zu untersuchenden Gewebe und anschliessender Farbreaktion eines an den Antikörper gekoppelten Enzyms, welches mit einem entsprechenden Substrat

eine Farbreaktion vermittelt. Es lassen sich hierbei prinzipiell zwei Methoden unterscheiden: eine direkte und eine indirekte (Boenisch, 1996a).

Bei der direkten Methode reagiert ein enzymmarkierter Antikörper mit dem Gewebeantigen. In einem zweiten Schritt reagiert das Enzym mit einem spezifischen Substrat, welches eine Färbung des Gewebes hervorruft. Diese Methode ist schnell durchführbar, da nur eine Antikörper-Inkubation durchgeführt wird und kaum unspezifische Reaktionen auftreten. Es lässt sich jedoch keine Signalverstärkung erreichen, da pro Gewebeantigen nur ein Antikörper und damit nur ein Enzymmolekül bindet.

Bei der indirekten Methode wird zunächst ein unkonjugierter Antikörper (Primärantikörper) eingesetzt. Im zweiten Schritt bindet an diesen ein enzymmarkierter Sekundärantikörper (Link), der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist. Hiernach erfolgt die Substrat-Chromogenreaktion zur Färbung. Bei dieser Methode können IgG-Moleküle an die verschiedenen Epitope des Primärantikörpers binden und somit kann eine höhere Enzymkonzentration an dem Ort des gesuchten Antigens erreicht werden (Boenisch, 1996a).

In dieser Arbeit wurde die „markierte Avidin-Biotintechnik“ (labeled avidin-biotin technique, LAB) benutzt. Hierbei ist der Sekundärantikörper mit dem Vitamin Biotin konjugiert, welches eine hohe Affinität zu Avidin bzw. Streptavidin hat. An Streptavidin ist das Enzym Peroxidase gekoppelt. Peroxidase bewirkt mit den Substraten AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) und DAB (3,3’Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) eine Farbreaktion, die dann z.B. lichtmikroskopisch ausgewertet werden kann.

Endogene Peroxidase, die bereits im Gewebe vorhanden ist, wird durch Zugabe von Wasserstoffperoxyd irreversibel blockiert, bevor die Substrat-Chromogen-Reaktion durchgeführt wird.

Um nicht durch Antigen-Antikörper Reaktion vermittelte, d.h. unspezifische, durch hydrophobe Anziehungskräfte zwischen Kollagen- bzw. Bindegewebselementen im Gewebe und Antikörpern hervorgerufene Anlagerung von Antikörpern zu verhindern, wird das Gewebe vor dem Auftragen des Primärantikörpers mit einer neutralen Proteinlösung inkubiert. Hierfür wird im Allgemeinen Normalserum aus der Tierspezies benutzt, aus der auch der Sekundärantikörper stammt (Boenisch, 1996b).

2.8.3 Erhöhung der Antigenpräsenz: Antigen Retrieval (AR)

Formaldehyd wurde erstmals 1893 von Ferdinand Blum als ein Gewebefixativ entdeckt (Fox et al., 1985). Als Fixativ wird Formalin in Form einer 10%-igen Lösung (3,7-4% Formaldehyd) aus konzentriertem Formalin (37-40%-ige Lösung von Formaldehyd) hergestellt. Formalin hat gegenüber anderen Fixierlösungen, wie etwa Alkohol, den Vorteil, dass die Morphologie der Präparate sehr gut erhalten bleibt.

Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Präparate weisen eine Quervernetzung ihrer Proteine auf. Diese Quervernetzungen beruhen auf einer chemischen Reaktion zwischen Formalin und den Seitenketten verschiedener Aminosäuren der Proteine (Fraenkel-Conrat et al., 1947). Dadurch ist die Antigenstruktur der Proteine verändert und spezifische Antikörper können unter Umständen nicht mehr binden, die Antigene sind maskiert. Um die Vernetzung der Aminosäureseitenketten aufzulösen, bedient man sich des so genannten *„Antigen Retrieval*“. Hierzu zählen zum einen Wärmeeinwirkung wie das Kochen der Präparate in einer geeigneten Flüssigkeit oder auch die Behandlung in einem Dampfdruckgefäß (Shi et al., 1997). Zum anderen werden chemische Methoden zur Auflösung von Quervernetzungen z.B. die Andauung mit Trypsin oder Pepsin genutzt.

Diese Methoden müssen streng nach Protokoll durchgeführt werden, da eine unterschiedliche Behandlung verschiedener Präparate zu unterschiedlichen Resultaten in der IHC-Färbung führt. Sie müssen so optimiert werden, dass ein maximales AR erreicht wird, ohne unspezifische Reaktionen, die zu verstärkter Hintergrundfärbung führen würden, zu ermöglichen.

Für das Antigen Retrieval (AR) wurden Citratpuffer, TRIS-HCl-Puffer und drei kommerziell erhältliche AR-Lösungen (BioGenex) getestet.

Jede AR-Lösung wurde bei 60°C und 100°C, mit verschieden langen Einwirkzeiten und unterschiedlichen Antikörperverdünnungen getestet. Der Primärantikörper wurde in vier, der Sekundärantikörper in zwei verschiedenen Verdünnungen getestet. Zusätzlich wurde bei jeder Färbung eine Negativkontrolle mitgeführt, bei welcher der Primärantikörper durch Normalserum ersetzt wurde. Nachdem das beste AR-Protokoll gefunden war, wurden Primär- und Sekundärantikörper erneut in verschiedenen Verdünnungen getestet, bis die optimale Kombination gefunden war.

Da immer das Produkt der einzelnen Faktoren, die auf ein Präparat einwirken entscheidend ist für die Qualität und Stärke des AR (Shi et al., 1997), wurde die zeitliche Einwirkung auf 18 - 36 Stunden (je nach Antikörper) verlängert, dafür aber die

Temperatur auf 60°C gesenkt. Diese Temperatursenkung hatte gegenüber dem Kochen in der Mikrowelle den entscheidenden Vorteil, dass die Präparate nicht so leicht vom Objektträger abgelöst wurden, was wiederum einen positiven Einfluss auf das Färbeergebnis hatte. Behandelt wurde mit Citratpuffer bei pH 6,0 im Wärmeschrank, jeweils zehn Präparate zusammen in 250 ml Flüssigkeit. Die Pufferlösung wurde vor jedem Gebrauch frisch hergestellt.

2.8.4 Anti-VEGF-Färbung

Die Charakteristik und Funktion von VEGF ist bereits in Abschnitt 1.2 erläutert worden. Durch die kommerzielle Verfügbarkeit von Antikörpern gegen VEGF ist es möglich, in histologischen Präparaten durch immunhistochemische Markierung des Proteins seine Verteilung zu bestimmen und die sezernierte Menge abzuschätzen.
Ratten-VEGF und Rinder-VEGF sind um eine Aminosäure kürzer als die humane Variante und zeigen zu dieser eine Übereinstimmung von 73% in ihrer Aminosäuresequenz (UniGene Resources).
Der in dieser Arbeit verwendete polyklonale VEGF-Antikörper markiert die 165, 189 und 121 Aminosäuren langen Varianten des VEGF. Seine Reaktivität in Rattengewebe wurde bereits ausführlich dokumentiert (Yi et al., 1998).
Es wurden 3 µm dicke Schnitte von jedem Präparat frisch angefertigt, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und dann das Paraffin auf den Objektträgern für 30 Minuten bei 60°C angeschmolzen. Entparaffiniert wurden die Schnitte in Xylol, 4 x 5 Minuten. Rehydriert wurde das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe, 100%, 100%, 85%, 70% für jeweils 5 Minuten. Um die durch die Fixierung in Formalin maskierten Antigene zu demaskieren, wurden die Schnitte für 18 Stunden in Citratpuffer im Wärmeschrank bei 60°C behandelt.
Nach Abkühlen für etwa 15 Minuten wurde am nächsten Tag die endogene Peroxidaseaktivität mit 3% H_2O_2 (30%-iges H_2O_2 verdünnt mit Methanol) für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Unspezifische Proteinbindungsstellen im Gewebe wurden durch Inkubation mit 1:10 mit PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung) verdünntem Ziegen-Normalserum für dreißig Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt. Dann erfolgte die Inkubation mit dem 1:75 mit PBS verdünnten Primärantikörper (anti-VEGF, sc-152, Santa Cruz Biotechnology) über Nacht (18 Stunden) bei 4°C. Es wurde 3 x 2 Minuten in PBS gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper (*Link-Antikörper*) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen in

PBS, 3 x 2 Minuten, wurde Peroxidase-konjugiertes Streptavidin (*Label*) für 20 Minuten bei Raumtemperatur appliziert. Dann wurde wieder in PBS gewaschen und DAB-Chromogen für 10 Minuten zugegeben. Nach Spülen mit Aqua dest. wurde in Hämalaun nach Mayer, verdünnt 1:5 mit Aqua dest. für 10 Sekunden gegengefärbt, in fließendem warmem Wasser für 10 Minuten gebläut, in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 85%, 100%, 100%) und 4 x in Xylol für je 5 Minuten entwässert, geklärt und dann permanent eingedeckt mit Roti Histokitt.

2.8.5 Digitale Auswertung der anti-VEGF-Färbung

Ziel der digital unterstützten Auswertung in der Immunhistochemie war es, unabhängig von der individuellen Beurteilung des Untersuchers zu sein und möglichst objektive Messergebnisse zu erhalten, sowie eine quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung zu ermöglichen. Aus diesem Grund sollte ein computergestütztes System etabliert werden, basierend auf dem vorhandenen System Q500MC (Leica), welches es erlaubt, reproduzierbare Werte auch bei unterschiedlichen Untersuchern zu erhalten.
Es sind drei Methoden der quantitativen Messung an immunhistochemisch gefärbten Präparaten denkbar:

1. Zählung der immunhistochemisch gefärbten Zellen,
2. Messung der immunhistochemisch gefärbten Flächen,
3. Messung der optischen Dichte immunhistochemisch gefärbter Flächen.

In dieser Arbeit wurde die Fläche der immunhistochemisch gefärbten Areale in μm^2 gemessen und als Prozentwert der Gesamttumorfläche ausgedrückt (Fontanini et al., 1999).

2.8.6 Immunhistochemische Darstellung von Blutgefäßen

Für die Darstellung von Blutgefäßen in der Immunhistochemie wird ein Agens benötigt, welches spezifisch an Strukturen der Gefäßendothelzellen bindet. Diese Strukturen sollten ausschließlich, bzw. hauptsächlich auf Gefäßendothelzellen vorhanden sein, um unerwünschte Färbungen zu vermeiden. Bereits seit längerer Zeit werden Antikörper gegen den von Willebrand Faktor (vWF) benutzt, um Gefäßendothelien zu markieren (Burgdorf et al., 1981). *Ulex europaeus* I Lektin, ein Pflanzenprotein, welches eine Affinität zu Fucosyl-Zuckerresten besitzt, wird ebenfalls seit mehr als zehn Jahren

benutzt, um Gefäße zu markieren. *Ulex europaeus* besitzt eine größere Sensitivität als vWF, aber eine geringere Spezifität (Leader et al., 1986).

Neuere Forschungen haben zur Entwicklung von Antikörpern gegen eine andere Gruppe von Antigenen geführt: Cell adhesion molecules (CAMs). Bei diesen handelt es sich um Proteine der Zelloberfläche, welche in den Zell-Zell-Kontakt, bzw. in den Kontakt zwischen Zellen und Extrazellulärmatrix (EZM) involviert sind. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1, auch CD31 oder endoCAM genannt, ist eines dieser Moleküle, welches zur Immunglobulin Superfamilie (IgSF) der CAMs gehört. Es ist ein transmembran gelegenes Glykoprotein, zu dessen Hauptaufgabe nach heutigem Kenntnisstand die Bindung mit anderen CD31-Molekülen, also der Zell-Zell-Kontakt gehört (Sun et al., 1996). Zu den bekannten Zellen, welche CD31 exprimieren, gehören unter anderem Endothelzellen (Baldwin et al., 1994), Basophile, Neutrophile, Plättchen und Monozyten. CD31 ist an der Leukozytenextravasion und der Blutgefäßentwicklung beteiligt. CD31 ist bereits auf sehr unreifen Endothelzellen vorhanden (Baldwin et al., 1994) und ist deshalb auch ein sehr guter Marker für die Gefäßneubildung in Tumoren (Vecchi et al., 1994). CD34, ein Antigen von myeloiden Vorläuferzellen, ist ebenfalls auf Endothelzellen präsent. Es ist jedoch auf fast allen Endothelien (auch auf Lymphgefäßen) nachweisbar. Im direkten Vergleich zwischen CD31, CD34 und vWF stellte sich heraus, dass vWF zwar in fast allen Gefäßen in nicht malignem Gewebe vorhanden war, bei einigen Tumoren, vor allem beim Angiosarkom, aber nicht anwesend war, während CD31 und CD34 eine höhere Penetranz auch im tumorösen Gewebe zeigten (Miettinen et al., 1994). Deshalb sollte die Gefäßmarkierung mit Antikörpern gegen CD31/34 durchgeführt werden.

2.8.6.1 Anti-CD31-Färbung

Die Gewinnung, Entparaffinierung und Rehydrierung der Präparate, sowie die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgte nach dem gleichen Schema, wie bei der anti-VEGF-Färbung. Es war kein Antigen Retrieval nötig. Unspezifische Proteinbindungsstellen im Gewebe wurden durch Inkubation mit 1:10 mit PBS verdünntem Esel-Normalserum für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt. Dann erfolgte die Inkubation mit dem 1:300 mit PBS verdünnten Primärantikörper (anti-CD31) über Nacht (18 Stunden) bei 4°C. Es wurde 3 x 2 Minuten in PBS gewaschen und dann mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (anti-Ziege, verdünnt 1:300), für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS, 3 x 2

Minuten, wurde Peroxidase-konjugiertes Streptavidin (verdünnt 1:100) für 30 Minuten bei Raumtemperatur appliziert. Dann wurde wieder in PBS gewaschen und DAB-Chromogen für 10 Minuten zugegeben. Nach Spülen mit Aqua dest. wurde in Hämalaun nach Mayer, 1:5 mit Aqua dest. verdünnt, für 10 Sekunden gegengefärbt, in fließendem warmem Wasser für 10 Minuten gebläut, in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 85%, 100%, 100%) für jeweils 5 Minuten entwässert, 4 x in Xylol für je 5 Minuten geklärt und dann permanent eingedeckt mit Roti Histokitt.

2.8.6.2 Anti-CD34-Färbung

Die anti-CD34-Färbung wurde analog zur anti-CD31-Färbung durchgeführt. Im Unterschied zu dieser wurde jedoch zum Antigen Retrieval mit Citratpuffer, 60°C für 18 Stunden vorbehandelt.

2.8.7 Auswertung der Gefäßmarkierung

Ziel der Auswertung der Gefäßmarkierung ist es, ein Maß für die Gefäßdichte im Tumorgewebe zu finden. Es sind bereits verschiedene Möglichkeiten publiziert worden:

1. Zählung der Gefäße (Weidner et al., 1991),
2. Messung der gefärbten Gefäßfläche pro Messfeld (Kohlberger et al., 1996),
3. Abschätzung der Gefäßoberfläche pro Gewebevolumen (Barth et al., 1996).

Gewählt wurde die Methode nach Barth und Mitarbeitern, um ein möglichst objektives Maß für die Gefäßdichte zu erhalten. Diese Methode ist in Kapitel 2.10 näher erläutert.

2.9 Messung der VEGF-Sekretion

Die VEGF-Expression wurde als prozentualer Anteil der Zellen, die VEGF exprimieren, an der Gesamtzahl der Tumorzellen ermittelt (Fox et al., 1985).
Dabei wurde die Fläche der Zellen, die durch den VEGF-Antikörper markiert waren, sowie die Gesamttumorfläche gemessen, siehe **Abbildung 3**. Der prozentuale Anteil der VEGF-Expression errechnete sich dann gemäß **Gleichung 5**:

Gleichung 5: Berechnung der VEGF-Expression

$$VEGF[\%] = \frac{VEGF - Fläche[\mu m^2]}{Gesamttumorfläche[\mu m^2]} x100$$

Die Flächenmessung der durch VEGF-Antikörper markierten Tumorzellen wurde mittels eines Computersystems durchgeführt. Hierbei handelte es sich um das System Q500MC von Leica, bestehend aus einem PC mit Intel 80486 Prozessor mit 66 MHz Taktfrequenz, mit dem Betriebssystem Windows 3.1 von Microsoft, auf dem die Software Qwin von Leica installiert war. Zum Einlesen der Bilder von dem Mikroskop DMLB von Leica in den Computer diente ein Farb-Videokamerakopf der Firma JVC mit Einzel-CCD-Komplementärfarbensystem und einer maximalen Auflösung von 752 x 582 Bildpunkten.

2.9.1 Das digitale Bildauswertungssystem Qwin (Leica)

Bei der Software Qwin handelt es sich um ein Computerprogramm zur digitalen Bilderfassung, Bearbeitung und Auswertung. Es bietet die Möglichkeit, Bilder von einer Videokamera in verschiedenen Bildgrößen und Farbkodierungen einzulesen. Außerdem kann eine automatische Ausleuchtungskorrektur vorgenommen werden, die bei ungleichmäßig ausgeleuchteten Objekten dazu führt, dass das zu bearbeitende Bild nach dem Einlesen eine gleichmäßige Ausleuchtung aufweist. Die so erhaltenen Bilder können von Hand nachbearbeitet werden, d. h., es können Teile gelöscht oder bestimmte Flächen nachträglich eingefügt werden. Bei Farbbildern lässt sich zudem die Farbkodierung ändern, was die Detektion verbessern kann, zusätzlich lässt sich die Farberscheinung (LUT, Lookup Table) ändern, um einen stärkeren Farbkontrast zu erhalten.

Hauptfunktion des Programms aber ist das Erkennen bestimmter Farben und Farbverläufe, deren Markierung und anschließende Auswertung.

Die erkannten Farben entsprechen, je nach Einstellung, bestimmten Strukturen in dem zu untersuchenden Präparat. So kann etwa die Farberkennung auf dunkelbraun eingestellt werden, womit alle DAB-gefärbten Areale und damit z.B. die VEGF produzierenden Zellen erkannt werden.

Die erkannten Farbareale werden als binäres Bild (zweifarbig, bzw. markiert / nicht markiert) im Speicher des Computers abgelegt. Mit ihnen können nachfolgend verschiedene Messungen durchgeführt werden. Es kann die Fläche der Markierung ermittelt werden, oder die Anzahl der markierten Teilflächen und deren Größe, deren Durchmesser in verschiedenen Ebenen etc. Da das System für verschiedene Mikroskopeinstellungen (Vergrößerungen) geeicht werden kann, sind Messungen in absoluten Einheiten (mm oder µm) möglich.

2.9.2 Programmierung der Bildauswertungssoftware QWin (Leica)

Die Software QWin lässt sich in fast allen ihren Funktionen mit einer eigenen Makrosprache (Quips) programmieren, so dass häufig wiederkehrende Abläufe automatisiert werden können. Teil dieser Arbeit war es, eine Routine zu entwickeln, mit der schnell und reproduzierbar immunhistochemisch mit anti-VEGF-Antikörper und DAB gefärbte Präparate ausgewertet werden können und die Ergebnisse zur weiteren statistischen Verarbeitung automatisch in Form einer Excel-Tabelle gespeichert werden.

2.9.3 Aufbau und Ablauf des Programms zur VEGF-Messung

In **Abbildung 2** ist das Ablaufdiagramm wiedergegeben, welches entwickelt und in Quips realisiert wurde. Der eigentliche Programmcode mit seinen einzelnen Teilen ist im Anhang mit eingefügten Erläuterungen vollständig wiedergegeben.
Das Programm gliedert sich in zwei Teile, erstens das Einscannen und Abspeichern der einzelnen Bilder eines Präparates und zweitens deren Auswertung. Beim Einscannen wird die Größe festgelegt, mit der die Bilder abgespeichert werden. Außerdem wird vom Benutzer eine Nummer abgefragt, die dem zu scannenden Präparat eindeutig zuzuordnen ist. Im weiteren Ablauf wird diese Nummer automatisch erhöht, so dass mehrere aufeinanderfolgende Präparate eingescannt werden können. Es können beliebig viele Einzelbilder aufgenommen werden, die mit einem eindeutigen Dateinamen versehen und abgespeichert werden. Wenn alle Einzelbilder eines Präparates eingescannt sind, wird die Anzahl der Bilder an Excel übermittelt und in einer Datentabelle unter dem Namen „DATENXXX.xls“ abgespeichert, wobei XXX für die Nummer des Präparates steht.

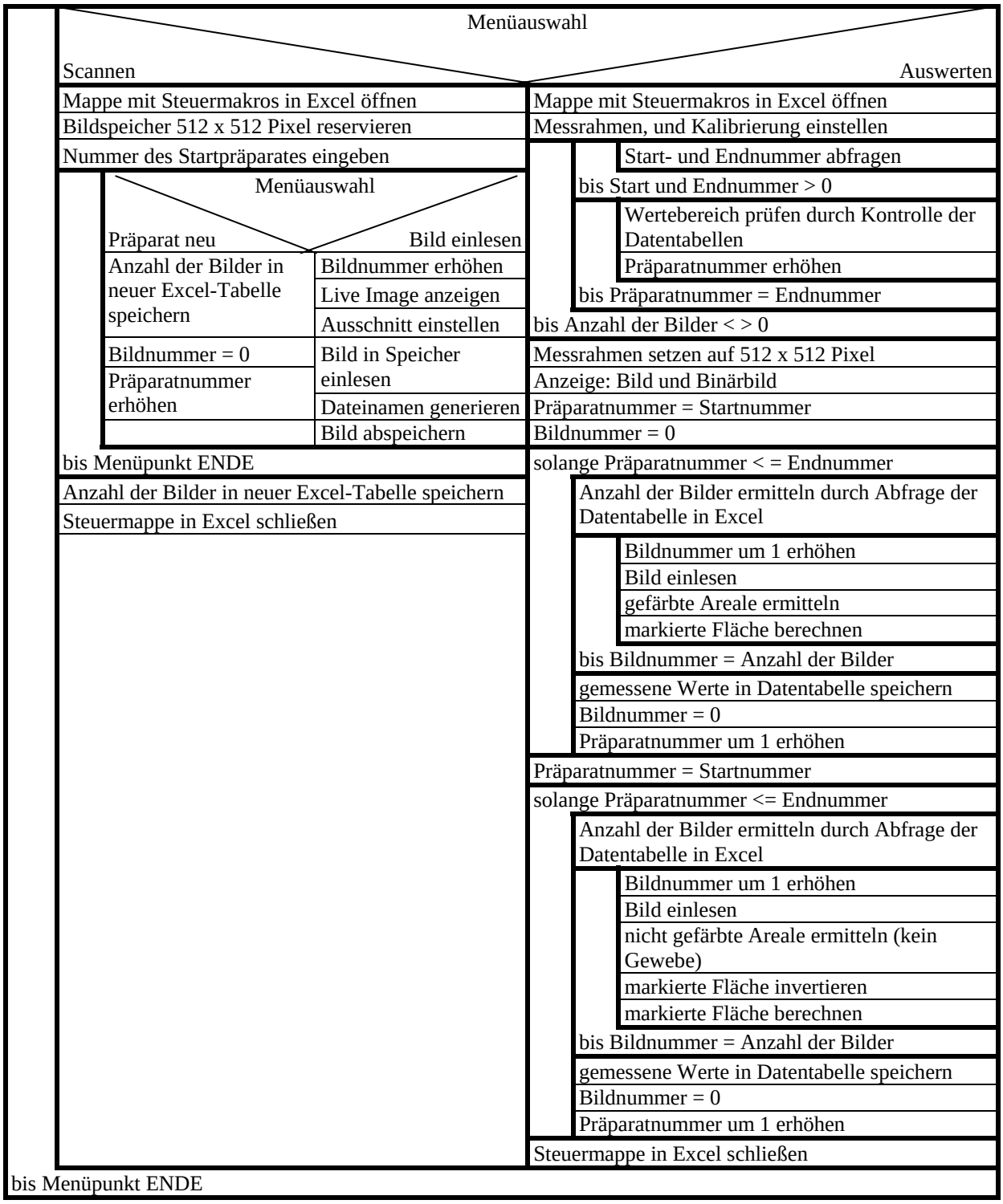

Abbildung 2: Ablaufdiagramm VEGF-Auswertungsprogramm

Im oben dargestellten Ablaufdiagramm zur Planung und Umsetzung der computergestützten VEGF-Auswertung ist die Zweiteilung des Programms zu erkennen. Im ersten Teildurchlauf sollen Ausschnitte der zu untersuchenden Präparate in den Speicher des Computers eingelesen und zur weiteren Auswertung abgespeichert werden. Erst im zweiten Teil sollen die abgespeicherten Bilder in mehreren Schritten ausgewertet werden. Dadurch ist sichergestellt, dass auch bei Unterbrechung der Messung, z.B. über Nacht, später mit den gleichen Bildausschnitten weiter gearbeitet werden kann.

Nach Kalibrierung des Systems auf die beim Scannen gewählte Vergrößerung, werden zum Auswerten der Bilder zuerst die Nummern des ersten und des letzten auszuwertenden Präparates vom Benutzer abgefragt. Durch Abfrage der den Präparaten zugeordneten Excel-Tabellen wird die Anzahl der zum jeweiligen Präparat gehörigen Einzelbilder ermittelt. Ist bei einem Präparat die Anzahl der Bilder Null, wurde dieses Präparat noch nicht eingescannt und die Präparatnummern werden erneut abgefragt. Sind alle Präparate, die in dem eingegebenen Wertebereich liegen eingescannt, wird die Auswerteroutine für VEGF gestartet. Das zum Präparat gehörige Datenblatt wird in Excel geöffnet, die Anzahl der zugehörigen Bilder aus der Tabelle abgefragt und das erste Bild in den Speicher geladen und angezeigt. Der Benutzer wählt nun den „Threshold“, d.h. den Farbbereich aus, der alle relevanten Braunwerte umfasst. Wenn die Einstellungen korrekt sind, wird vom Programm der markierte Teil des Bildes ermittelt, dessen Fläche errechnet und das nächste Bild geladen und zur Markierung der relevanten Bildanteile angezeigt. Nach Auswertung des letzten Bildes eines Präparates werden die gemessenen Werte an Excel übertragen, das Datenblatt abgespeichert und das erste Bild des nächsten Präparates zur Auswertung geladen.

Dieser Ablauf wiederholt sich, bis das letzte Bild des letzten Präparates ausgewertet ist. Dann wird das Programm zur Ermittlung der Tumorfläche gestartet. Dieses wird benötigt, weil nicht immer der gesamte Bildausschnitt von Tumorgewebe ausgefüllt ist und somit die im ersten Programmabschnitt als VEGF markierte und gemessene Fläche nicht direkt als prozentualer Anteil der Bildfläche berechnet werden kann. Die Fläche des Tumorgewebes kann z.B. kleiner als der Bildausschnitt sein, wenn ein Areal am Rande des Tumors ausgewählt wurde, oder, wie in dieser Arbeit, zwischen den Tumorzellen viel Matrigel liegt, oder das Gewebe Risse vom Schneiden aufweist.

Die Ermittlung der Tumorfläche erfolgt indirekt über die Markierung des ungefärbten Hintergrundes und nachfolgender Invertierung dieser Markierung. Diese Prozedur wird erneut für jedes Einzelbild eines jeden Präparates durchgeführt, wobei die ermittelten Ergebnisse wieder in der zum Präparat gehörigen Excel Datei in einer neuen Tabelle gespeichert werden, bis das letzte Bild des letzten Präparates ausgewertet ist.

Die Aufteilung in einzelne Programme resultierte aus der Eigenart von Quips, dass im Programmablauf keine gemessenen Werte aus dem Speicher entfernt werden können, so dass bei der Messung eines neuen Präparates zusätzlich zu den neu gemessenen Werten die alten ebenfalls gespeichert werden. Wenn das Programm sich aber selber beendet

und neu aufruft, wird der Speicher gelöscht und die neuen Werte können an Excel übertragen werden.

In **Abbildung 3** sind die einzelnen Stadien der VEGF-Detektion und Auswertung am Beispiel zweier benachbarter Bildausschnitte dargestellt. In **Abbildung 3a** sieht man einen Ausschnitt aus einem humanen Phäochromozytom bei 400-facher Vergrößerung mit einem großen Gefäß im Zentrum, in **Abbildung 3b** einen Ausschnitt aus dem gleichen Präparat, etwa 100µm vom ersten Bildausschnitt entfernt. Wie bereits in **Abbildung 3c** und **d**, den Binärbildern nach Detektion der braun markierten Areale sichtbar, ist die VEGF-Konzentration in unmittelbarer Nachbarschaft eines Gefäßes geringer als in einem größeren Abstand zu dem Gefäß. Die Messung der Binärbilder ergab für **Abbildung 3c** eine Fläche von 4623,61 μm^2 bzw. 17,19%, für **Abbildung 3d** von 5827,90 μm^2 bzw. 21,67% (bei 26896μm^2 Gesamtfläche des Bildes). In **Abbildung 3e/f** und **g/h** ist die Markierung des Hintergrundes bzw. deren Invertierung und damit die Fläche des Gesamtgewebes dargestellt. Werden die oben genannten Messwerte mit der tatsächlichen Gewebefläche korrigiert, so ergeben sich für **Abbildung 3a** 17,64% und 21,85% für **Abbildung 3b**.

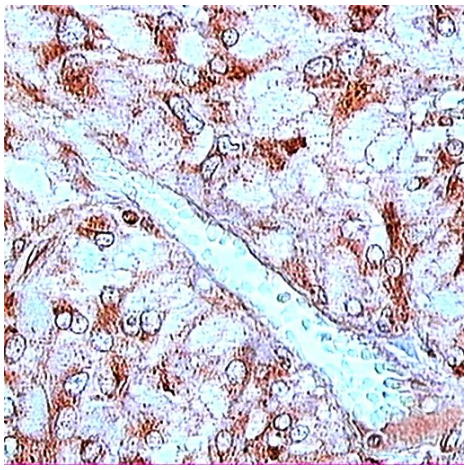

Abbildung 3a

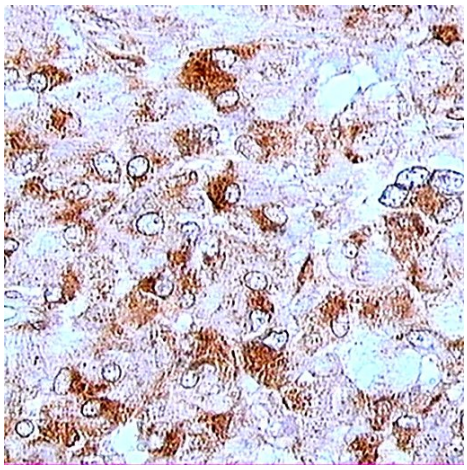

Abbildung 3b

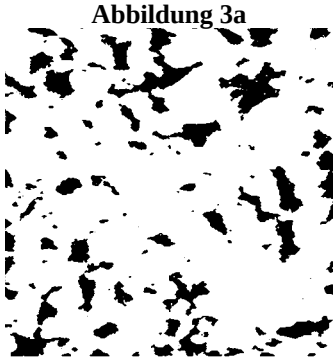

Abbildung 3c

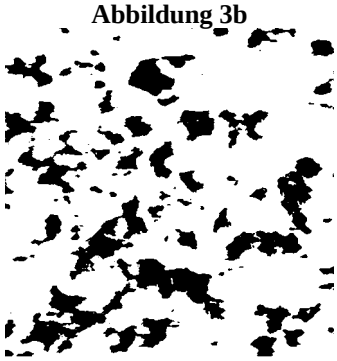

Abbildung 3d

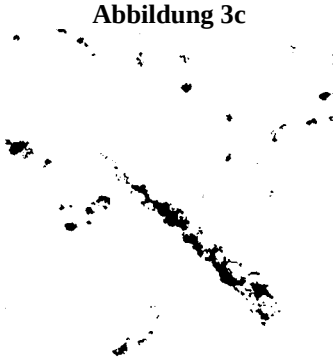

Abbildung 3e

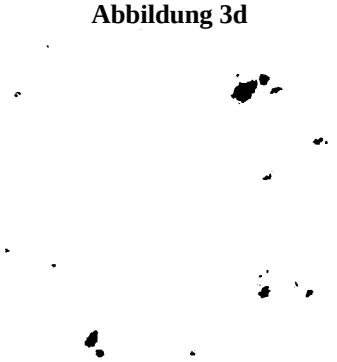

Abbildung 3f

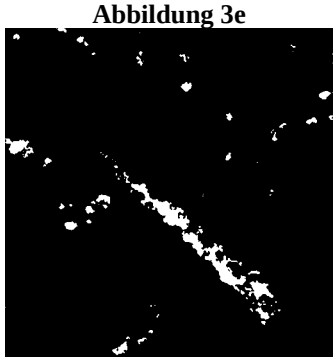

Abbildung 3g

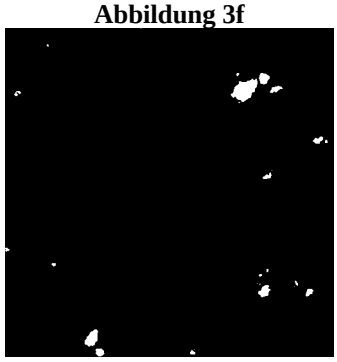

Abbildung 3h

Abbildung 3: Stadien der VEGF-Detektion und Auswertung.

Abbildung 3a und b zeigen die Originalbilder, wie sie nach dem Einscannen auf dem Monitor des Bildverarbeitungssystems erscheinen. Abbildung 3c und d zeigen die Binärbilder, welche die detektierten, mit anti-VEGF markierten Zellen darstellen, Abbildung 3e und f zeigen die Hintergrundmarkierung, deren Invertierung, dargestellt in Abbildung 3g und h, die Fläche des Gewebes markiert.

2.10 Messung der Vaskularisierung der Tumore

2.10.1 Messung und Berechnung der Gefäßoberflächendichte (VSD)

Die Gefäßoberflächendichte ist ein Parameter zur Bestimmung des Grades der Vaskularisierung in solidem Gewebe (Barth et al., 1996). Zur Bestimmung der Gefäßoberflächendichte (VSD, vascular surface density) wurden die Gefäße mit dem anti-CD31- bzw. anti-CD34-Antikörper markiert und mittels DAB-Chromogen sichtbar gemacht. Es wurden je Präparat zehn bis zwölf Bildausschnitte im Maus Angiogenese Assay und zwanzig Bildausschnitte in humanen Phäochromozytomen ausgewertet. Bei 400-facher Mikroskopvergrößerung und einer Vergrößerung von 0,63 zur Videokamera (resultierende Vergrößerung 252-fach) wurden mit Hilfe des Computers Bildausschnitte von 512 x 512 Pixel Größe eingescannt, was einer Kantenlänge von 160 µm und einer Fläche von 0,0256 mm^2 entsprach. Es wurde ein im Computer generiertes Gitter überblendet und die Kreuzungspunkte zwischen dem Gitter und den Gefäßwänden (I_n) am Monitor gezählt. Zusätzlich wurden die Schnittpunkte des Gitters gezählt, die über Tumorgewebe zu liegen kamen (I_{STR}), siehe **Abbildung 4**.

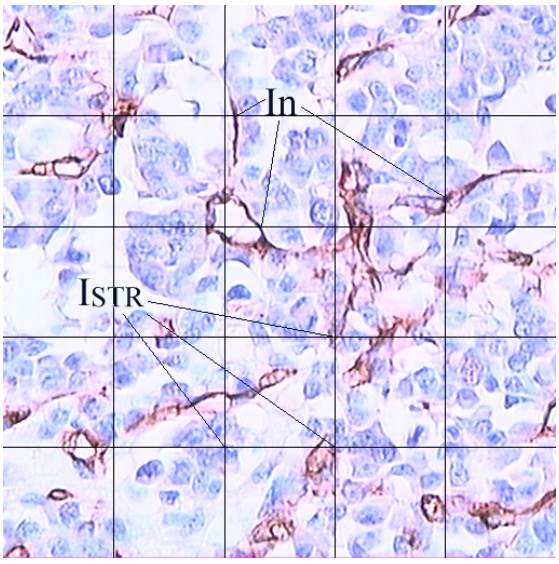

Abbildung 4: Bestimmung der Gefäßoberflächendichte VSD

I_n: Anzahl der Schnittpunkte zwischen Gefäßwänden und Gitterlinien

I_{STR}: Anzahl der Gitterkreuzungspunkte, die über Tumorgewebe zu liegen kommen

Die Anzahl der Gitterlinien ließ sich einstellen von 3 x 3 bis 8 x 8, wobei die Auswahl des Gitters sich nach der Anzahl der Gefäße richtete, so dass bei hoher Gefäßdichte nicht zu viele Schnittpunkte gezählt werden mussten. Vergleichende Messungen im gleichen Bildausschnitt mit unterschiedlichen Gittern ergaben gleiche Werte für die VSD. Beim Maus Angiogenese Assay I und II wurde ein Gitter von 3x3 Linien gewählt, bei den humanen Phäochromozytomen ein 5x5 Linien messendes Gitter.

Der Anteil an Tumorgewebe im Präparat $V_{V(STR)}$ lässt sich durch die Anzahl der Gitterkreuzungspunkte, die über Tumorgewebe zu liegen kommen I_{STR}, abschätzen. Der relative Anteil an Tumorgewebe wurde nach **Gleichung 6** berechnet, wobei $\mathbf{K_n}$ die Gesamtzahl der Gitterkreuzungspunkte ist (bei 5 Gitterlinien: $K_n = 25$).

Gleichung 6: Tumorgewebeanteil ($V_{V(STR)}$)

$$V_{V(STR)} = \frac{I_{STR}}{K_n} \ [\%]$$

Als nächstes wurde die VSD im Messfeld (VSD_{mf}) nach **Gleichung 7** berechnet, wobei $\sum I_n$ die Summe der Kreuzungspunkte zwischen Gefäßen und Gitterlinien und $\mathbf{L_R}$ die Gesamtlänge der Testlinien ist (Anzahl der Testlinien x Länge der Testlinien; bei 5 x 5 Linien und einer Testlinienlänge von 160µm: 2 x 5 x 160µm = 1600µm).

Gleichung 7: VSD_{mf} im Messfeld

$$VSD_{mf} = \frac{\sum I_n * 2}{L_R}$$

Die Dimension der VSD ist $\frac{1}{\mu m}$, was gleichbedeutend ist mit Gefäßoberfläche pro Tumorvolumen [$\frac{1}{\mu m} = \frac{\mu m^2}{\mu m^3}$]. Da bei einigen Präparaten ein wechselnd großer Anteil an Matrigel vorhanden war, der nicht vaskularisiert war, wurde die VSD im Tumorgewebe aus **Gleichung 6** und **Gleichung 7** berechnet. Es ergibt sich für die VSD:

Gleichung 8: VSD

$$VSD = \frac{\sum I_n * 2}{L_R * V_{V(STR)}}$$

2.10.2 Bestimmung der Nekroserate

Da bei den Präparaten der EZM-Serie (vgl. 2.5.1.1) keine ausreichende Gefäßfärbung erreicht werden konnte, wurde der Anteil an nekrotischem Gewebe am Gesamttumorgewebe zur Abschätzung der Gefäßfunktion zu Hilfe genommen (Belletti et al., 1999). Die Nekroseratemessung wurde mit einem, dem VEGF-Programm entsprechenden Programm durchgeführt, bei dem lediglich die Bildgröße, die Vergrößerung und damit die Kalibrierung, die Bildnamen und die Namen der Excel Datenblätter anders gewählt wurden. Die Messung erfolgte an HE gefärbten Präparaten, bei denen die nekrotischen Gewebeanteile leuchtend rot und die vitalen Zellen blau gefärbt zur Darstellung kamen. Nach dem Einscannen des gesamten Tumorgewebes bei einer zehnfachen Vergrößerung und gleichzeitigem Löschen der nicht relevanten Bildanteile (Bindegewebe, Muskel, Fett), wurde ebenfalls interaktiv durch den Benutzer die nekrotische Fläche markiert und in einem zweiten Durchlauf der Hintergrund markiert und invertiert, die jeweilige Fläche berechnet und die Ergebnisse in ein Excel Datenblatt eingefügt und zur statistischen Auswertung abgespeichert.

2.11 Bestimmung der Mitoserate

Zur Abschätzung der proliferativen Potenz der PC12-Zellen wurde die Mitoserate pro HPF (High Power Field, 400-fache Vergrößerung) bestimmt.
Die Bestimmung der Mitoserate wurde an HE-gefärbte Präparate durchgeführt. Bei einer 400-fachen Vergrößerung und einem Durchmesser von 0,5 mm hatte jedes Gesichtsfeld eine Größe von 0,1963 mm^2. Es wurden nur eindeutige Mitosen gezählt, bei denen das Chromatin stark kondensiert war. In **Abbildung 5** sind beispielhaft fünf Mitosen zu erkennen.

Ausgezählt wurden fünfzehn Gesichtsfelder für jedes Präparat, die zufällig über das vitale Gewebe verteilt wurden.

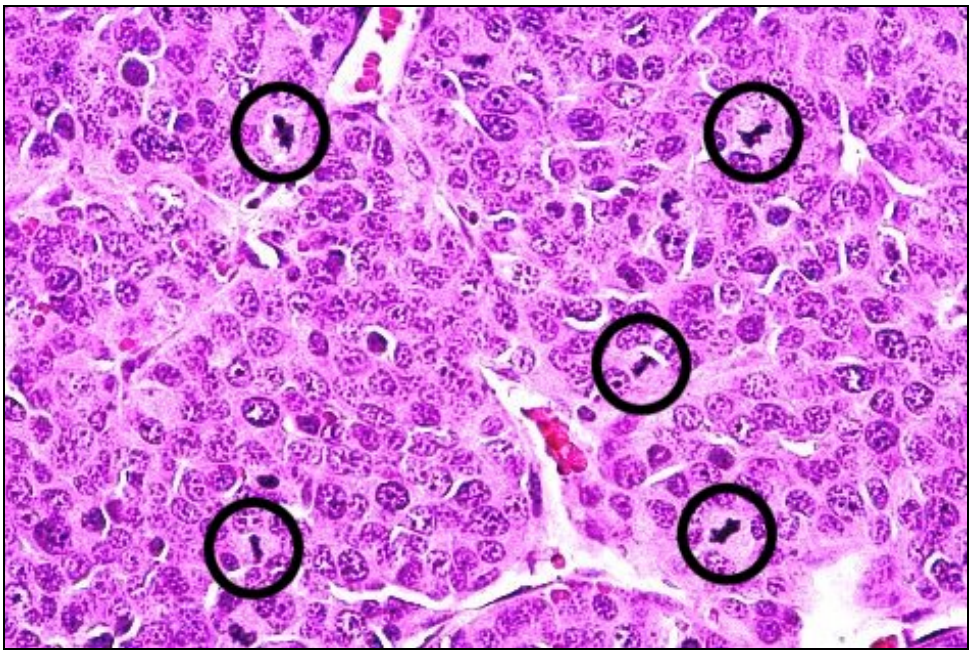

Abbildung 5: Mitosezählung im HPF (High Power Field, 400x)

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einem HPF. Markiert sind als Beispiel fünf eindeutige Mitosen. Nur solche eindeutigen Mitosen wurden in der Mitosezählung gewertet.

2.12 Statistik

Statistische Berechnungen wurden, nach Eingabe der Rohwerte, mit dem Statistikprogramm SPSS 10.0.5 durchgeführt.

Beim Nachweis des VEGF-Proteins wurden die Werte für konditioniertes Medium mit den Werten für zellfreies Medium mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Im HUVEC-Proliferationsassay wurden die Messwerte der Testmedien zunächst mit denjenigen der zugehörigen Kontrollproben verglichen und so die unspezifische Proliferation der HUVEC-Zellen überprüft. Die Messwerte wurden durch Subtraktion der unspezifischen von der durch die Testmedien induzierten Veränderung der Proliferation korrigiert und anschließend direkt mit der proliferativen Aktivität im Basismedium verglichen.
Die Überprüfung der Unterschiede auf Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Zur Prüfung der Unterschiede auf Signifikanz innerhalb der EZM- und NGF-Versuche wurde der Kruskal-Wallis-Test für den Vergleich der Tumorgrößen, Tumorgewichte, der Verdopplungszeiten der Tumorvolumina, der Mitoserate, der VEGF-Expression und der Nekroserate herangezogen. Wurden signifikante Unterschiede innerhalb eines Versuches gefunden, so wurde eine Einzelgruppenanalyse mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Die Werte der VEGF-Expression und der Mitoserate wurden jeweils in 10 – 15 HPF ermittelt und daraus der Mittelwert ± Standardabweichung errechnet.
Die Werte der Nekroserate beziehen sich auf die Gesamtschnittfläche des Tumors.
Korrelationsuntersuchungen wurden mit der bivariaten Korrelation nach Pearson durchgeführt.

Die Differenzen der Parameter der behandelten (Testgruppen) und unbehandelten (Vergleichsgruppen) Tiere beim Maus Angiogenese Assay wurden, nach globaler Testung auf Unterschiedlichkeit mittels Kruskal-Wallis-Test, durch den Mann-Whitney-U-Tests geprüft. Korrelationsuntersuchungen wurden mit der bivariaten Korrelation nach Pearson durchgeführt.

Bei allen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $p<0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von VEGF und seiner biologischen Aktivität in PC12-Zellen

3.1.1 Nachweis der VEGF-Sekretion *in vitro*

Der Nachweis, dass PC12-Zellen VEGF produzieren und sezernieren, wurde durch Untersuchung des konditionierten Wachstumsmediums der PC12-Zellen im Vergleich zu zellfrei inkubiertem Medium erbracht. Untersucht wurden Standardmedium (FGM), serumfreies Medium (N2) und serumarmes Medium (N3+1% FCS).

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde der Mediumüberstand gewonnen, bei 10.000 g für 2 Minuten zentrifugiert, um Zelldetritus und ungelöste Mediumbestandteile aus dem Überstand zu entfernen und mit Hilfe des unter 2.4 beschriebenen kompetitiven Bindungsassays untersucht.

Es resultierte ein signifikanter Unterschied im VEGF-Gehalt der Medien zwischen zellfrei und durch PC12-Zellen konditioniertes Medium ($^{*}p<0,05$). Aus den Ergebnissen ist zusätzlich ersichtlich, dass ein hoher Serumanteil im Medium (FGM) für die Sekretion von VEGF förderlich ist gegenüber serumarmem oder –freiem Medium ($^{\dagger}p<0,05$).

Die Ergebnisse der VEGF-Messung sind in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Tabelle 4: Bestimmung des gesamt-VEGF

Medium	**zellfrei**	**durch PC12-Zellen konditioniertes Medium**
FGM	3,8±2,4	11,78±2,3*†
N2	0,20±0,3	3,01±1,5*
N3+1% FCS	0,725±0,3	3,97±2,5*

Über 48 Stunden konditioniertes Medium von $1x10^{6}$ PC12-Zellen; Werte von gesamt-VEGF in pg/ml ± Standardabweichung. Der Unterschied zwischen konditioniertem und zellfreiem Medium ist für alle getesteten Median signifikant (*$p<0,05$). Ein hoher Serumanteil führt im konditionierten Medium zu signifikant höherer VEGF-Sekretion ($^{\dagger}p<0,05$).

3.1.2 Nachweis der biologischen Aktivität des sezernierten VEGF

Zum Nachweis der biologischen Aktivität des von PC12-Zellen sezernierten VEGF wurde die Proliferation humaner vaskulärer Endothelzellen (HUVEC Zellen) in ihrem Standardmedium und nach Zugabe von konditioniertem Medium der PC12-Zellen untersucht.

HUVEC-Zellen sind in ihrer Proliferation VEGF-abhängig. Sie proliferieren in ihrem Standardmedium, welches VEGF enthält besser, als in solchen Medien, die kein VEGF enthalten. Die Messung der Proliferation der HUVEC Zellen wurde nach 36 Stunden Inkubation im jeweiligen Medium durchgeführt. Die im Einzelnen getesteten Bedingungen sind **Tabelle 5** zu entnehmen.

Zum einen wurde HUVEC-Standardmedium, zum anderen durch PC12-Zellen konditioniertes, 2-fach konzentriertes N2 Medium eingesetzt. Polyklonaler VEGF-AK (A20), sowie humanes rekombinantes VEGF wurden vor der Durchführung des HUVEC-Proliferationsassays zu den jeweiligen Medien hinzugegeben. Die Endkonzentrationen betrugen jeweils 10 µg/ml.

Tabelle 5: Proliferation der HUVEC Zellen im XTT-Assay

Kondition	**optische Dichte nach 36 Stunden**	**Unterschied gegenüber Standardbedingungen**
HUVEC Stdm	329,3±20,9[#]	100%[#]
HUVEC Stdm + AK	175,5±82,5*	53%*
HUVEC Stdm + VEGF	860,7±137,6*	261%*
HUVEC Stdm kein ECGS	252,8±14,6*	77%*
PC12-Medium	871±27,3[#]	264%[#]
PC12-Medium + AK	407±22,8*	124%*
PC12-Medium + VEGF	1118,5±66*	339%*

Optische Dichte im XTT-Assay zur Messung der Proliferation der HUVEC Zellen.
AK, VEGF: Zugabe von jeweils 10 µg/ml anti-VEGF bzw. hrVEGF; Stdm = Standardmedium der HUVEC Zellen; ECGS = VEGF enthaltender Mediumzusatz für HUVEC Zellen; PC12-Medium: durch PC12-Zellen über 36 Stunden konditioniertes Medium, * $p<0,05$ gegenüber Kontrolle; [#] $p<0,05$ zwischen Kontrollen

Die Ergebnisse der Messung der optischen Dichte der HUVEC-Zellen im XTT-Assay nach Zugabe des VEGF-neutralisierenden Antikörpers A20 zeigen, dass die Proliferation der HUVEC Zellen durch anti-VEGF signifikant gedrosselt wird und nach Zugabe von VEGF gesteigert wird. Mit der eingesetzten Dosis von 10 µg/ml Antikörper wurde eine 50%-ige Reduktion des Wachstums erreicht. Durch Zugabe von VEGF kann die Zellproliferation noch weiter gesteigert werden (>200% des Ausgangswertes). Das Wachstum der HUVEC-Zellen kann also durch anti-VEGF-Antikörper gebremst und durch VEGF gesteigert werden.

Die optische Dichte der HUVEC-Zellen, die durch PC12-Zellen konditioniertes Medium stimuliert worden waren, glich der optischen Dichte der HUVEC Zellen nach Zugabe von 10 µg/ml hrVEGF zu ihrem Standardmedium. Das heißt, das konditionierte Medium der PC12-Zellen stimulierte das Wachstum der HUVEC-Zellen in dem gleichen Maß, wie die Zugabe von VEGF. Dieser Effekt ließ sich durch anti-VEGF-Antikörper drosseln und durch zusätzliche Gabe von VEGF sogar noch weiter steigern. Die Dynamik des XTT-Assays blieb also auch nach Zugabe von PC12 konditioniertem Medium erhalten.

Hieraus kann geschlossen werden, dass das von PC12-Zellen sezernierte VEGF biologisch aktiv ist.

3.2 Angiogenesemessung im PC12-Tumormodell

Bei der Vivisektion der Tiere war bereits zu erkennen gewesen, dass die Tumore von einem teils dichten Geflecht irregulärer Gefäße umgeben waren, in welchem zum Teil Tumorthromben zu finden waren (**Abbildung 6**). Zudem erschienen die Tumore sehr blutreich. Weiterführende Untersuchungen zur Angiogenese erschienen daher sehr erfolgversprechend.

Nachdem das Antigen Retrieval Protokoll optimiert war, zeigten alle Präparate eine deutliche Anfärbung für VEGF, ebenso die Positivkontrollen (**Abbildung 7**). Die Negativkontrollen, die bei jeder Färbung mitgeführt wurden, zeigten keine Anfärbung. Da sich nicht in allen Präparaten eine ausreichende Gefäßfärbung mit anti-CD31 und anti-CD34 erreichen ließ, wurde die Gefäßfunktion unter Zuhilfenahme der Nekroserate bestimmt. Zusätzlich zu den Parametern der Angiogenese wurde die Mitoserate zur Abschätzung der proliferativen Potenz der PC12-Zellen unter Einfluss der EZM-Proteine und NGF bestimmt. Außerdem wurden die zuvor *in vivo* gemessenen Wachstumsparameter der Tumore, Tumorendvolumen und

Tumorvolumenverdopplungszeit, mit den hier gemessenen Parametern in Zusammenhang gebracht.

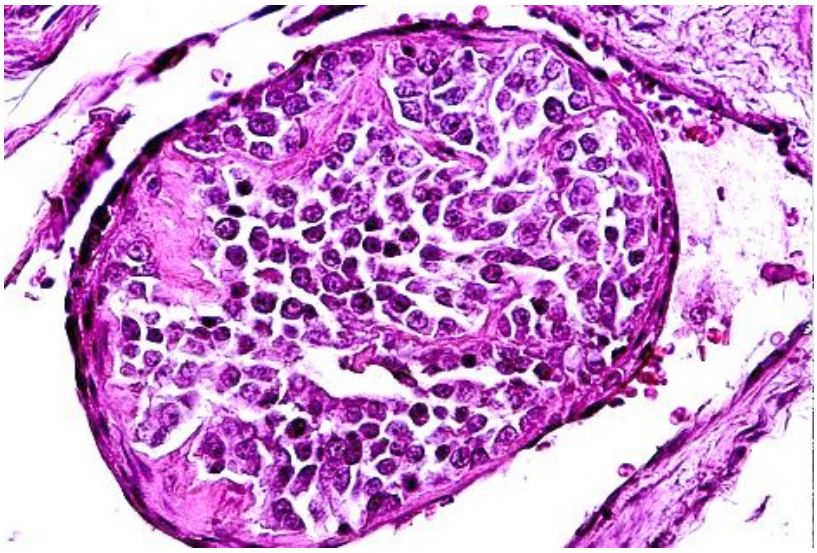

Abbildung 6: Tumorzellthrombus eines PC12-Xenotransplantates

Tumorthrombus in einer Vene in unmittelbarer Nähe eines der hier bearbeiteten Tumore.

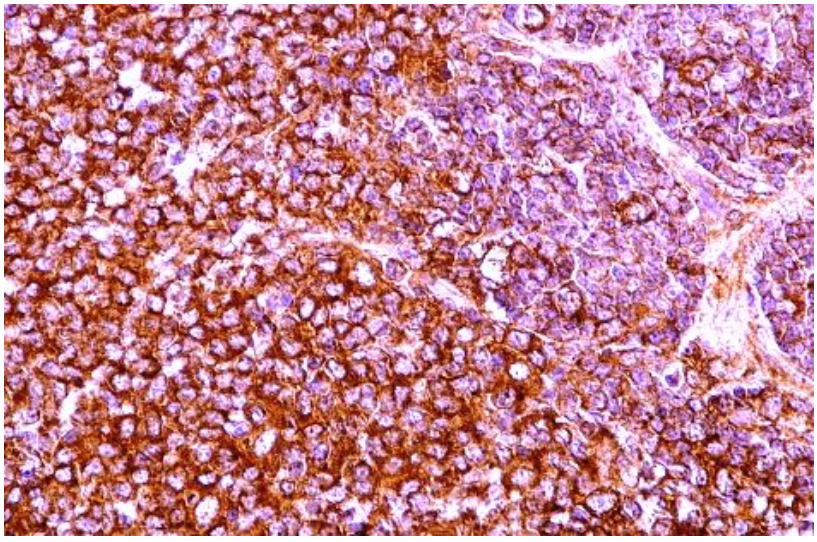

Abbildung 7: Anti-VEGF-Färbung einer Milz

Präparate von der Milz können als Positivkontrollen für die anti-VEGF-Färbung herangezogen werden. In diesem Präparat sieht man eine deutliche Anfärbung (DAB-Braun). Auffallend ist, dass im rechten oberen Quadranten des Bildes, in dem ein Gefäß zu erkennen ist, wohl als Reaktion auf die bessere Durchblutung, eine schwächere VEGF-Expression und damit eine viel schwächere Anfärbung zu erkennen ist.

3.2.1 Angiogenesemessung nach Koinjektion mit EZM-Proteinen

Die Messung der VEGF-Expression in Tumoren der mit Proteinen der Extrazellulärmatrix koinjizierten PC12-Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen EZM-Proteinen. Auch die Untersuchung der Nekroserate zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen EZM-Proteinen.
Unterschiede zeigten sich jedoch beim Vergleich der Tumorendvolumina nach 45 Tagen Wachstum. Bei mit Matrigel präinkubierten und koinjizierten PC12 Zellen resultierten signifikant größere Tumore, was sich in einer signifikant verkürzten Tumorvolumenverdopplungszeit ausdrückte. Kollagen I hingegen führte zu einem signifikant niedrigeren Tumorendvolumen, welches seinen Niederschlag in einer - nicht signifikanten – Verlängerung der Tumorverdopplungszeit fand. (**Tabelle 6**)

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse bei Koinjektion mit EZM-Proteinen

Kondition	Tumorvolumen [cm^3]	TVDt [Tage]	Mitoserate pro HPF	Nekroserate [%]	VEGF-Expression [%]
CTRL (PC12)	1258±422	5,16	3,40±0,47	42,63±14,6	30,91±6,5
+Matrigel	1910±248*	4,83*	1,97±0,26*	35,74±16,9	24,85±4,3
+Kollagen I	914,5±252*	5,45	0,89±0,31*	46,61±7,8	28,11±7,4
+Kollagen IV	1182±271	5,22	1,53±0,48*	34,92±18	26,9±3,6
+Fibronektin	989,5±605	5,38	2,96±0,13	37,84±7,4	22,17±2
+Laminin	1413±707	5,07	1,78±0,24*	45,9±15,8	26,93±8,2

Tumorendvolumina nach 45 Tagen, Tumorvolumenverdopplungszeit TVDt, Mitoserate pro HPF, Nekroserate und VEGF-Expression der mit Proteinen der Extrazellulärmatrix (EZM) koinjizierten PC12-Zellen. (*p<0,05 gegen CTRL)

Die Beurteilung der Mitoserate zeigte deutliche, z.T. signifikante Unterschiede, wobei sie bei PC12-Zellen, die ohne Zusatz von EZM-Proteinen gewachsen waren und bei Koinjektion mit Fibronektin am größten war. Die geringste Mitoserate war bei Koinjektion mit Kollagen I und IV zu finden (**Tabelle 6**, **Abbildung 8**).

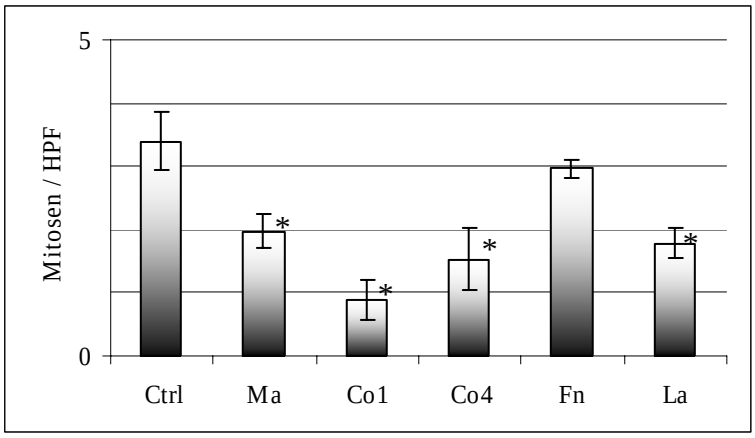

Abbildung 8: Mitosen pro HPF bei Koinjektion mit EZM-Proteinen*

* p<0,05 gegen Kontrolle (Ctrl)

3.2.2 Angiogenesemessung nach Präinkubation und Koinjektion mit NGF

Bereits im Verlauf der *in vivo* Versuche hatte sich gezeigt, dass die unterschiedliche Vorbehandlung und Koinjektion mit verschiedenen NGF-Konzentrationen zu einem unterschiedlichen Tumorwachstum geführt hatte. Schneller wachsende Tumore wurden generell bei höheren Dosen von NGF gefunden.

Die anschließend durchgeführten Untersuchungen erbrachten mit dieser Beobachtung übereinstimmende Ergebnisse (**Tabelle 7**). Mit NGF vorbehandelte und koinjizierte PC12-Zellen hatten eine signifikant niedrigere Nekroserate als die Kontrolltumore. Hierbei zeigte sich eine Dosisabhängigkeit: höhere Dosen NGF führten zu niedrigerer Nekroserate. Diese Korrelation (-0,506) ist jedoch nicht signifikant (p=0,112).

Bei Betrachtung der Mitoseraten ist ebenfalls eine Dosisabhängigkeit zu erkennen: mehr NGF führt zu mehr Mitosen. Auch wenn lediglich NGF 1 Tumore sich signifikant von den Kontrolltumoren unterscheiden, so besteht zwischen der Dosis von NGF und der Mitoserate eine starke Korrelation (0,691), welche auf dem Niveau von 0,05 signifikant ist (p=0,019).

Die VEGF-Expression war in den mit Matrigel gewachsenen Tumoren mit 28% der vitalen Zellen am höchsten. Hierbei zeigt sich eher tendenziell eine Dosis-Abhängigkeit zu NGF. Diese ist aber statistisch nicht nachweisbar. Signifikante Unterschiede zeigen sich lediglich bei NGF 1 und NGF 100 Tumoren im Vergleich zu Tumoren, welche mit Matrigel gewachsen waren.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der NGF-Tumore

Kondition	Tumorvolumen [cm^3]	TVDt [Tage]	Mitoserate pro HPF	Nekroserate [%]	VEGF-Expression [%]
ohne Matrigel	982±548	3,83	1,03±0,25	60,25±8,3	19,04±7,1
mit Matrigel	1063±669	3,41	1,32±0,40	49,55±14,4	28,13±2,5
+NGF 1ng	958±336	3,87	0,52±0,07*†	30,91±8,2†	13,86±3,2*
+NGF 10ng	996±680	3,46	1,10±0,27	27,61±10,4†	20,33±11,3
+NGF 100ng	854±621	3,60	1,50±0,37	16,21±12,3*†	21,17±0,7*

Tumorendvolumina nach 27 Tagen, Tumorvolumenverdopplungszeit TVDt, Mitoserate pro HPF, Nekroserate und VEGF-Expression der mit NGF vorbehandelten und koinjizierten PC12-Zellen. (*$p<0,05$ im Vergleich zu Tumoren mit Matrigel, †$p<0.05$ im Vergleich zu Tumoren ohne Matrigel)

3.3 Angiogenesemessung im humanen Phäochromozytom

Nachdem in den experimentellen Tumoren zum Teil deutliche Unterschiede in der Angiogenese gefunden wurden, stellte sich die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf humane Phäochromozytome.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden die unter 2.6 ausgewählten Präparate nach immunhistochemischer Anfärbung mit anti-VEGF und anti-CD34 Antikörpern mit den zuvor beschriebenen Methoden der digitalen Bildauswertung untersucht. Aufgrund der ausgeprägten Heterogenität der Tumore in Bezug auf die Zellmorphologie und die Gefäßverteilung, siehe **Abbildung 9**, wurden für jedes Präparat 20 HPF, die zufällig über das Tumorgewebe verteilt wurden, ausgewertet. Die Ergebnisse sind in **Abbildung** 10 und **Tabelle 8** dargestellt.

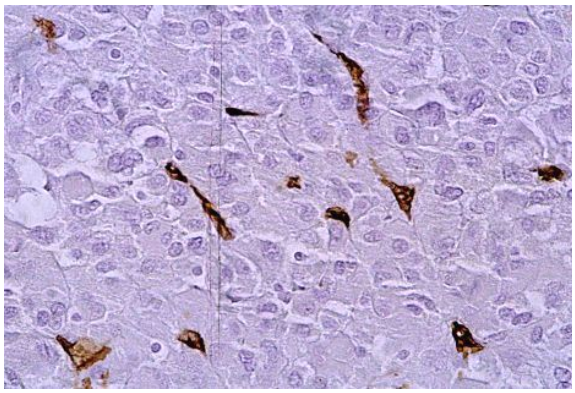

Abbildung 9a

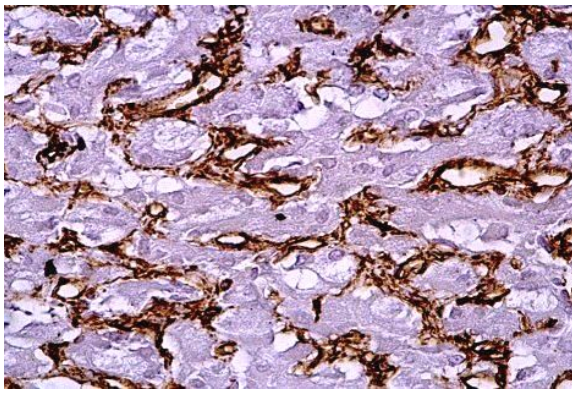

Abbildung 9b

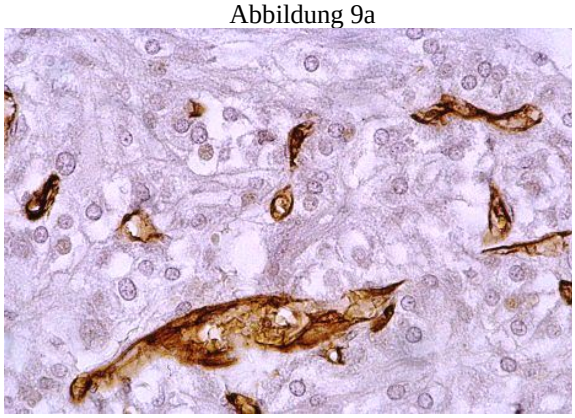

Abbildung 9c

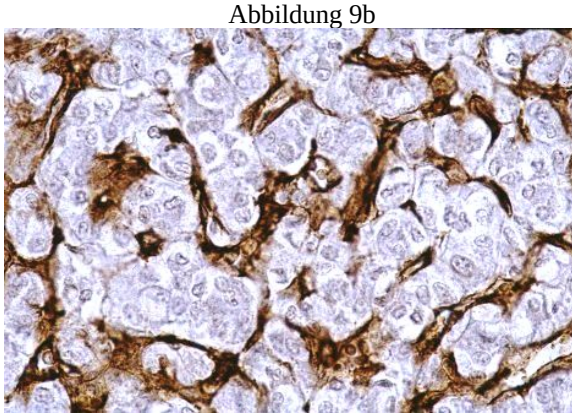

Abbildung 9d

Abbildung 9: Gefäßzeichnung in benignen und malignen HPCC

In Abbildung 9a ist ein „cold spot“ eines benignen humanen Phäochromozytoms (HPCC) bei 400-facher Vergrößerung dargestellt. Abbildung 9b zeigt einen „hot spot“ eines benignen HPCC, in Abbildung 9c und d sind die entsprechenden Bezirke eines malignen HPCC dargestellt.
Aus diesen Abbildungen ist kein eindeutiger Unterschied zwischen benignen und malignen Tumoren ersichtlich. Daraus resultiert die Notwendigkeit, möglichst viele Ausschnitte aus einem Präparat in die Bewertung einzubeziehen, um einen großen Querschnitt über den gesamten Tumor zu erhalten.

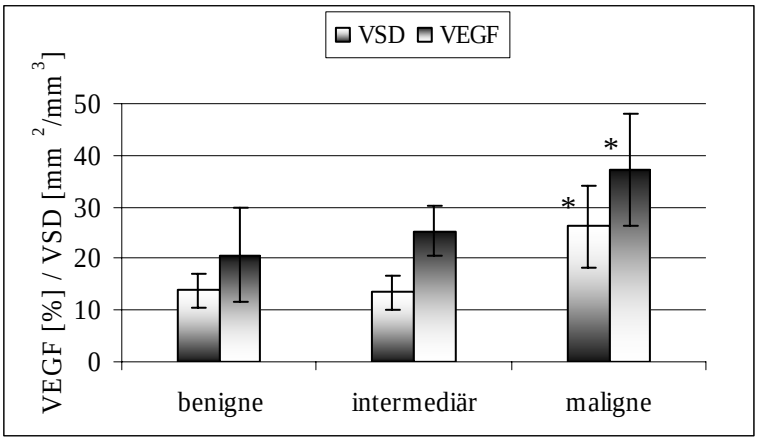

Abbildung 10: VEGF-Expression und VSD in humanen Phäochromozytomen

Dargestellt ist der prozentuale Anteil VEGF positiver Zellen am Gesamttumorvolumen, sowie die VSD in humanen Phäochromozytomen. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (0,516) für VEGF und VSD ist auf dem Niveau von 0,05 (p=0,024) signifikant. Der Unterschied zwischen benignen bzw. intermediären und malignen Tumoren ist für beide Parameter signifikant (*p<0,05).

Alle Präparate zeigten eine deutliche Anfärbung für VEGF, bei nicht gefärbten Negativkontrollen. Es waren keine Unterschiede in der Intensität der Färbung zwischen verschiedenen Präparaten erkennbar, was auf eine gleichmäßige Färbequalität hinweist. Die Expression des VEGF, gemessen als prozentualer Flächenanteil der Zellen die VEGF exprimieren an der Gesamttumorfläche, zeigte im Vergleich der benignen Gruppe mit der intermediären Gruppe nur geringe Unterschiede (20,69±9,01% in benignen, 25,35±4,76% in intermediären), wohl aber signifikante Unterschiede im Vergleich zur malignen Gruppe (37,11±10,92%; $p<0,05$), vergleiche **Tabelle 8**.

Tabelle 8: VEGF-Expression und VSD in humanen Phäochromozytomen

		VEGF [%]				**VSD [mm^2/mm^3]**			
Merkmal	**Anzahl**	**mittel**	**std**	**min**	**max**	**mittel**	**std**	**min**	**max**
benigne	9	20,69*	9,56	8,28	35,70	13,50*	3,51	10,41	20,63
intermed.	5	25,35	5,32	18,61	33,10	13,41*	3,73	8,96	19,09
maligne	5	37,11	12,20	17,90	51,10	26,22	9,56	14,28	35,50

Ergebnisse der VEGF und VSD Messungen in humanen Phäochromozytomen, unterteilt in drei Gruppen: benigne, intermediäre und maligne Tumore. mittel: Mittelwert, std: Standardabweichung, min: Minimum, max: Maximum. (*$p<0,05$)

In der anti-CD34-Färbung zeigten alle Präparate eine gute und gleichmäßige Anfärbung der Gefäße ohne Hintergrundfärbung. Die Präparate wurden nach der zuvor beschriebenen VSD-Methode ausgewertet. In der Übersicht fiel bereits eine starke Heterogenität der Gefäßdichte und -verteilung innerhalb eines einzelnen Präparates auf. Regionen geringer Gefäßdichte (cold spots) wechselten sich mit Bezirken hoher Gefäßdichte (hot spots) ab.

Bei retrospektiver Untersuchung der Präparate, nach Offenlegung der Zugehörigkeit der Präparate zu den einzelnen Gruppen, zeigte sich, dass die heterogene Verteilung der Gefäßdichte in allen Präparaten vorhanden war, jedoch war nur bei einem Präparat der benignen Gruppe eine VSD zu messen, die innerhalb der Standardabweichung um den Mittelwert der malignen Gruppe lag.

Die VSD benigner und intermediärer Tumore unterschied sich nicht (13,50±3,30 mm^2/mm^3 gegenüber 13,41±3,34 mm^2/mm^3). Die Gruppe der malignen Phäochromozytome zeigte jedoch gegenüber der Gruppe der benignen Tumore eine doppelt so große VSD (26,22±8 mm^2/mm^3, $p<0,05$).

Für die VEGF-Expression zeigte sich eine größere Heterogenität innerhalb der jeweiligen Gruppen. So lagen zwei benigne Präparate innerhalb der Standardabweichung um den Mittelwert der malignen Gruppe und ein malignes Präparat lag in der VEGF-Expression sogar unterhalb des Mittelwertes der benignen Gruppe.

Obwohl die Unterschiede der Angiogenese zwischen malignen und benignen bzw. intermediären Tumoren hoch signifikant sind, kann kein „Schwellenwert“ angegeben werden, ab dem mit Sicherheit gesagt werden kann, ob ein Tumor maligne oder benigne ist. Verdeutlicht an der Summe der Ergebnisse für VSD und VEGF-Expression ergibt sich zwar eine Rangfolge der Tumore, anhand derer die benignen sicher identifiziert werden können, auch wenn einer der Parameter im Wertebereich der Ergebnisse der malignen Tumore liegt, jedoch liegt ein maligner Tumor (grau markiert) mit beiden Parametern deutlich im Wertebereich der benignen Tumore (**Tabelle 9**).

Tabelle 9: Ergebnisse eigener Untersuchungen in humanen PCC

Gruppe	VSD [mm^2/mm^3]	VEGF [%]	VSD + VEGF
1	10,47	15,40	25,87
2	8,96	18,61	27,57
1	11,43	16,73	28,16
1	15,28	13,39	28,67
1	20,63	8,28	28,91
3	14,28	17,90	32,18
1	16,32	15,87	32,19
1	12,06	20,23	32,29
2	12,38	22,95	35,33
2	14,47	25,31	39,78
1	14,58	25,43	40,01
2	12,16	33,10	45,26
1	10,30	35,14	45,44
2	19,09	26,77	45,86
1	10,41	35,70	46,11
3	20,06	39,64	59,7
3	33,29	35,22	68,51
3	35,50	41,71	77,21
3	27,97	51,10	79,07

Gruppe 1 benigne, Gruppe 2 intermediäre, Gruppe 3 maligne Phäochromozytome.

Auch bei Nutzung beider gemessenen Parameter der Angiogenese, VSD und VEGF, ist keine eindeutige Unterscheidung zwischen benignen und malignen Phäochromozytomen möglich. Grau unterlegt sind die malignen HPCC, die Tabelle ist sortiert nach der aufsteigenden Summe aus VSD und VEGF.

3.4 Hemmung der *in vivo* Angiogenese durch anti-VEGF-Antikörper

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Angiogenese im Phäochromozytommodell auf Basis der PC12-Zellen VEGF-abhängig ist und ähnliche Resultate im humanen Phäochromozytom zu finden sind, war die Frage zu beantworten, ob die Angiogenese, und damit das Tumorwachstum, im PC12-Tumormodell durch spezifische Antikörper gegen VEGF gehemmt werden kann.
Hierzu wurde das kapillare Einsprossungs-Assay von Senger und Mitarbeitern benutzt. Bei diesem Assay werden die inokulierten Zellen durch Matrigel immobilisiert.
Die Tumorzell- / Matrigeldepots wurden nach 8 Tagen explantiert, fixiert und immunhistochemisch aufgearbeitet. Die bei der Fixierung benutzte Formalin-Picrinsäure-Lösung zeigte gute Auswirkungen auf die Antigenbeschaffenheit, so dass bei der Färbung der Gefäße mit anti-CD31-Antikörper keine Probleme auftraten.
Nach der Gefäßfärbung wurde die Gefäßoberflächendichte (VSD) mittels der Methode von Barth und Mitarbeitern bestimmt, siehe 2.10.
Wie bei der Auswertung der humanen Tumore wurde auch hier verblindet ausgewertet, d.h. erst nachdem alle Untersuchungen abgeschlossen waren, wurde die Zugehörigkeit eines Präparates zu einer bestimmten Gruppe offengelegt.

Die Ergebnisse des ersten Maus Angiogenese Assays mit zu den PC12-Zellen koinjiziertem polyklonalem anti-VEGF-Antikörper zeigten in der Gruppe der behandelten Tiere eine signifikante Reduktion der VEGF-Expression, der Gefäßdichte, sowie der Mitoserate (vgl. **Abbildung 11** und **Tabelle 10**).
Im zweiten Maus Angiogenese Assay wurden bereits unmittelbar vor subkutaner Applikation der in Matrigel immobilisierten PC12-Zellen die Versuchstiere mit einer intraperitonealen Injektion von 100 µg anti-VEGF mAB 4.6.1 behandelt. Alle drei Tage wurde diese Therapie wiederholt und der Versuch nach 8 Tagen terminiert.
Die Größen der gewonnenen Tumore unterschieden sich bereits signifikant von einander (behandelt 108±12,65 gegenüber unbehandelt 175,6±32,8 mm, $p<0,01$). Aber auch die mikroskopischen Untersuchungen zeigten signifikante Unterschiede, außer für VEGF (vgl. **Abbildung 11, Abbildung 12** und **Tabelle 10)**.

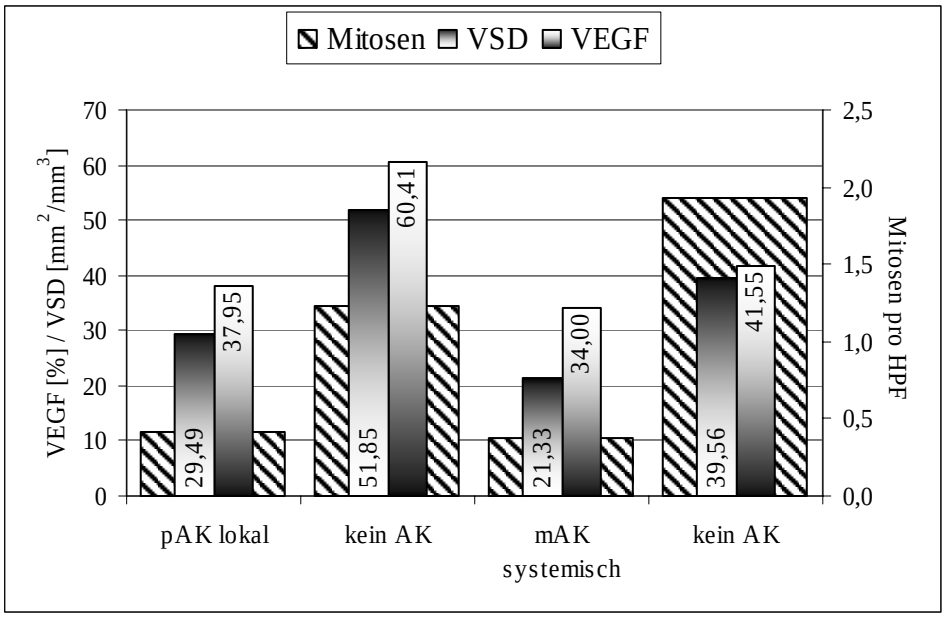

Abbildung 11: VEGF, VSD und Mitoserate der Maus Angiogenese Assays

Dargestellt ist der Zusammenhang zwischen VEGF-Expression, Gefäßoberflächendichte und Mitoserate in den Maus Angiogenese Assays mit und ohne Gabe von anti-VEGF-Antikörpern. pAK: polyklonaler Antikörper, lokal appliziert; mAK: monoklonaler Antikörper, systemisch appliziert.

Tabelle 10: VEGF, VSD und Mitoserate der Maus Angiogenese Assays

Kondition	**VEGF [%]**	**VSD [mm^2/mm^3]**	**Mitoserate**
kein AK	60,41±7,84	51,85±3,73	1,23±0,63
pAK lokal	37,95±9,18*	29,49±4,93*	0,41±0,40*
kein AK	41,55±6,88	39,56±9,71	1,93±0,58
mAK systemisch	34,00±10,17	21,33±5,74*	0,37±0,15*
Matrigel ohne mAK	0	6,90±9,70	0
Matrigel mit mAK	0	7,23±7,53	0

Zusammenfassung der im Maus Angiogenese Assay gemessenen Werte ± Standardabweichung.
Der Unterschied zwischen systemisch behandelten und unbehandelten Tumoren ist für die VEGF-Expression nicht signifikant, alle anderen Kombinationen sind signifikant (*$p<0,05$).

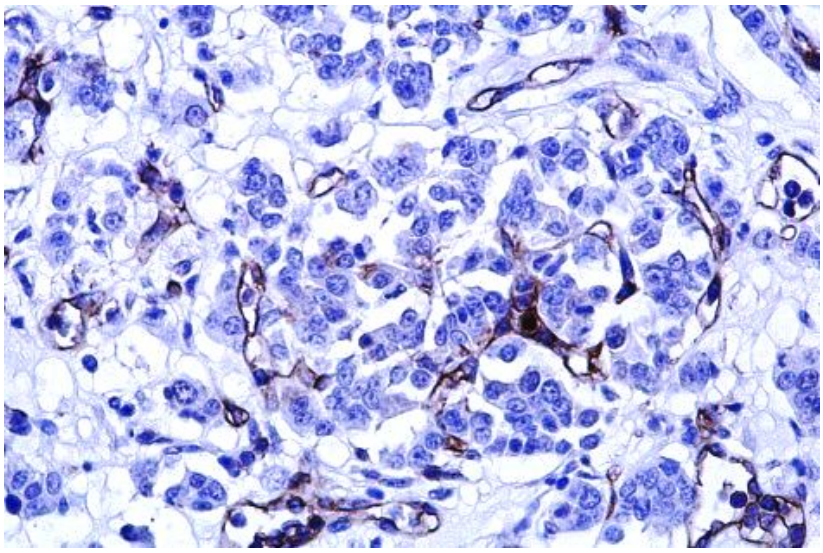

Abbildung 12a

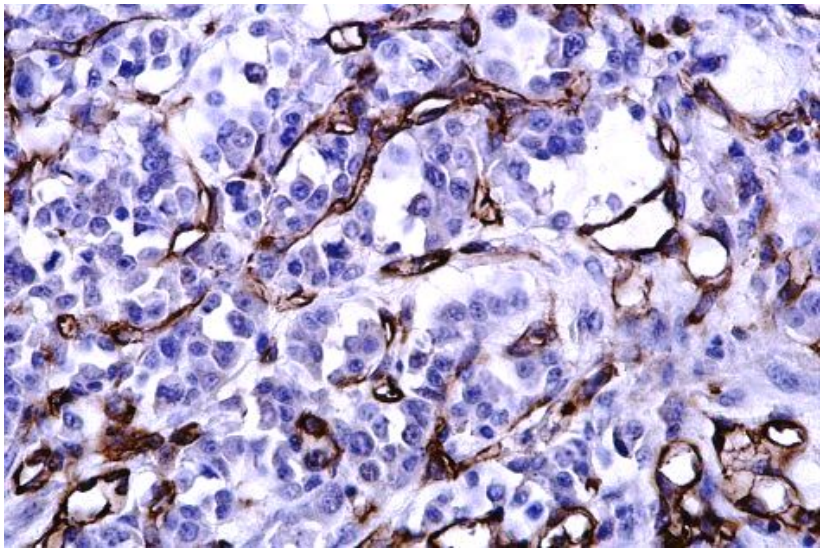

Abbildung 12b

Abbildung 12: PC12-Tumor mit und ohne Behandlung mit anti-VEGF-mAK

Abbildung 12a zeigt die Gefäßfärbung eines systemisch mit anti-VEGF mAK 4.6.1 behandelten Tumors, Abbildung 12b die Gefäßfärbung eines unbehandelten Tumors. Imponierend ist die unterschiedliche Vaskularisierung beider Tumore.

Die Untersuchung der Matrigelimplantate ohne PC12-Zellen zeigte keine Expression von VEGF und aufgrund fehlender Tumorzellen keine Mitoserate. Jedoch wurden vereinzelt einsprossende Gefäße gefunden (siehe **Abbildung 13**), deren Dichte ebenfalls gemessen wurde, sich aber in beiden Gruppen nicht unterschied (vgl. **Tabelle 10**).

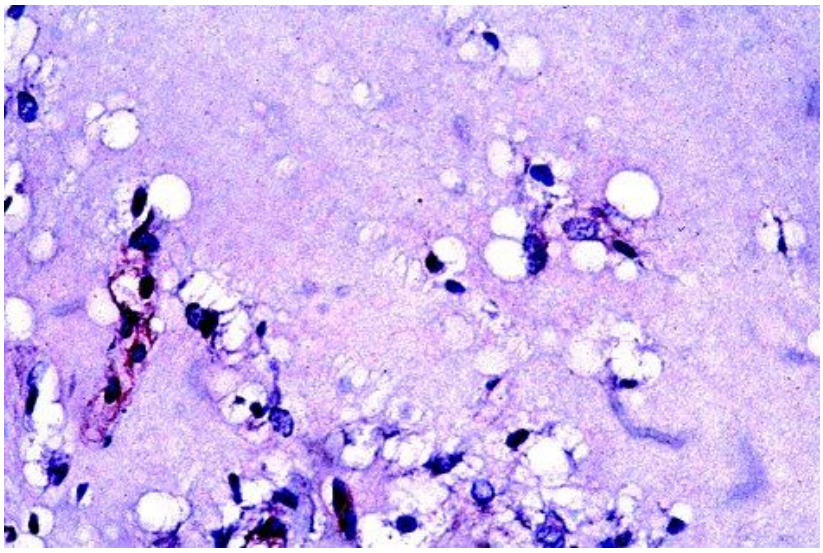

Abbildung 13: Ausschnitt eines Matrigelimplantats ohne PC12-Zellen

Die Abbildung zeigt ein Matrigelimplantat ohne Koinjektion von PC12-Zellen mit einem einsprossenden Gefäß.

Es ließ sich in beiden Versuchen, sowohl mit lokal appliziertem anti-VEGF-Antikörper, als auch mit systemischer Gabe eine signifikante Hemmung der tumorzellinduzierten Angiogenese nachweisen.

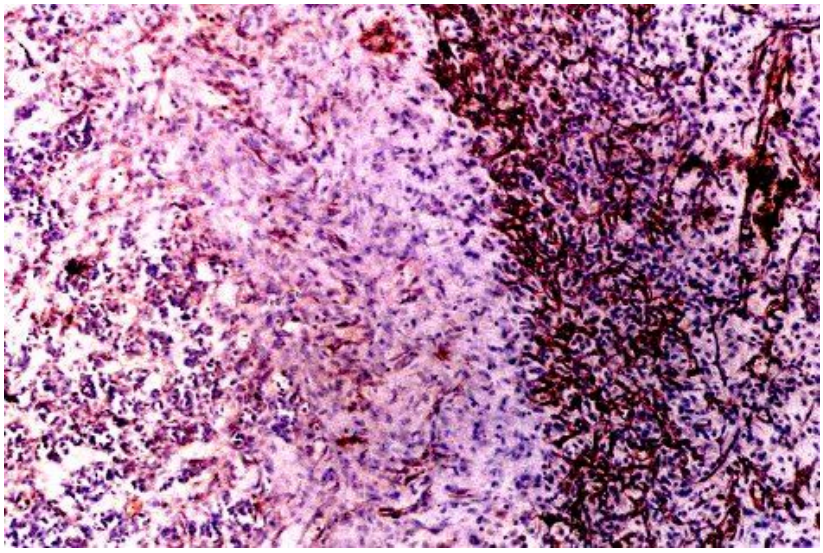

Abbildung 14: Invasionsfront am Rand eines PC12-Implantates

Auf der rechten Bildseite ist ein dichtes Geflecht von Blutgefäßen zu erkennen. In der Mitte des Bildes liegt die Implantat-Wirt-Grenze, die zum großen Teil aus Matrigel und Bindegewebe besteht und im linken Bilddrittel ist ein Teil des Tumors zu erkennen. Die VSD wurde immer im Tumorinneren gemessen, auch wenn, wie in diesem Beispiel, die Gefäßdichte außerhalb des Tumors größer war.

4 Diskussion

4.1 Methodendiskussion

Die PC12-Zelllinie ist ein etabliertes und akzeptiertes Modell des murinen Phäochromozytoms (Tischler et al., 1990). Die Arbeiten von Zielke und Mitarbeitern (1998) hatten gezeigt, dass die PC12-Zelllinie, eine ursprünglich klonale Zelllinie eines Phäochromozytoms der New-England-Deaconess-White-Strain-Ratte (Greene et al., 1976), geeignet ist, die Basis eines Tumormodells *in vivo* wie *in vitro* zu bilden. In genannter Arbeit war es zudem gelungen, maligne, in bestimmte Regionen metastasierende Varianten der PC12-Zellen zu selektionieren.
Die *in vitro* Versuche in einer Zellkultur haben den Vorteil gegenüber *in vivo* Versuchen, dass sie leicht standardisierbar und reproduzierbar sind. Ausschnitte aus Regulationsmechanismen können studiert werden, ohne den störenden (weil regulativen) Einfluss eines Gesamtorganismus zu berücksichtigen. Daraus resultiert jedoch die Frage, inwieweit Ergebnisse aus der Zellkultur direkt in den Organismus übertragen werden können. Die Zellkultur ist als Tumormodell ein geeignetes Mittel, um schnell, einfach und standardisierbar Untersuchungen zur Biologie eines bestimmten Tumors durchführen zu können.

4.1.1 Nachweis von VEGF und seiner biologischen Aktivität in PC12-Zellen

Zum Nachweis, dass PC12-Zellen VEGF sezernieren, wurde das VEGF EIA von R&D Systems, USA genutzt, welches bereits seit langem von anderen Gruppen zum Nachweis von VEGF genutzt wird (Folkman et al., 1987; Nielsen et al., 1999; Nauck et al., 1997). Sein Aufbau entspricht dem eines kompetitiven Sandwich-EIA, bei dem das im Testmaterial vorhandene VEGF mit extern zugesetztem enzymmarkiertem VEGF um eine definierte Anzahl von Bindungsstellen im Messfeld konkurriert. Nach Anfärben des enzymmarkiertem VEGF kann durch densitometrische Messung des Farbstoffes auf die Konzentration des VEGF in der Probe zurückgeschlossen werden.

Der Nachweis der biologischen Aktivität des sezernierten VEGF wurde bisher nur in wenigen Untersuchungen geführt, ist aber nach aktueller Literaturmeinung prinzipiell zu fordern. Zum Nachweis der VEGF-Aktivität eignen sich humane Endothelzellen der Umbilikalvene (HUVEC), da sie in ihrer Proliferation von VEGF abhängig sind (Wang et al., 1997).

4.1.2 Messung der Angiogenese in Tumoren

4.1.2.1 Messung der Vaskularisierung der Tumore

Die durch Tumorzellen induzierte Angiogenese kann durch verschiedene Verfahren untersucht werden. Indirekt lässt sich auf die Gefäßversorgung eines Tumors durch Bestimmung seiner Nekrosefraktion schließen (Belletti et al., 1999). Diese Methode ist nicht nur als Screeningmethode, sondern auch als relevanter Endpunkt etabliert.
Direkte Messungen der Angiogenese basieren dagegen auf der Darstellung der Gefäße durch immunhistochemische Verfahren. Bereits seit längerer Zeit werden Antikörper gegen den von Willebrand Faktor (vWF) benutzt, um Gefäßendothelien zu markieren (Burgdorf et al., 1981). Im direkten Vergleich zwischen CD31, CD34 und vWF stellte sich jedoch heraus, dass vWF zwar in fast allen Gefäßen in nicht malignem Gewebe nachweisbar war, bei einigen Tumoren, vor allem beim Angiosarkom, aber nicht zu finden war, während CD31 und CD34 eine höhere Penetranz auch im tumorösen Gewebe zeigten (Miettinen et al., 1994). CD31 ist ein Protein der Zelloberfläche, welches den Zell-Zell-Kontakt, bzw. den Kontakt zwischen Zellen und Extrazellulärmatrix (EZM) vermittelt (Sun et al., 1996). CD31 ist bereits auf sehr unreifen Endothelzellen vorhanden (Baldwin et al., 1994) und ist deshalb ein sehr guter Marker für Gefäßendothelien in Tumoren (Vecchi et al., 1994; Marmé, 2001). CD34, ein Antigen von myeloiden Vorläuferzellen, ist ebenfalls auf Endothelzellen präsent. Es ist jedoch auf fast allen Endothelien (auch Lymphgefäßen) nachweisbar.

Die Bestimmung der Gefäßdichte kann auf verschiedenen Verfahren basieren:

1. Zählung der Gefäße (Weidner et al., 1991),
2. Messung der gefärbten Gefäßfläche pro Messfeld (Kohlberger et al., 1996),
3. Abschätzung der Gefäßoberfläche pro Gewebevolumen (Barth et al., 1996).

Weidner und Mitarbeiter haben die Anzahl der Gefäße in sogenannten „Hot Spots“ gemessen, die vor der Zählung bei niedriger Vergrößerung ausgewählt wurden. Gezählt wurde bei 200x und 400x Vergrößerung jede mit DAB braun gefärbte Endothelzelle oder Endothelzellanhäufung, die eindeutig von benachbarten Gefäßen, Tumorzellen und anderen Bindegewebeanteilen abgrenzbar war, als ein einzelnes, zählbares Mikrogefäß. Gefäßlumen waren nicht zwingend nachzuweisen, um eine Struktur als Gefäß zu identifizieren.

Kohlberger und Mitarbeiter benutzten zur Messung der Gefäßdichte ein digitales Bildverarbeitungssystem, mit welchem sie den prozentualen Anteil der gefärbten Fläche von Gefäßzellen an der Gesamtfläche des Tumors ermittelten. Auch hier wurde die „Hot Spot“-Methode angewandt.

Da nicht alle Gefäßanschnitte die gleiche Form und Größe haben und damit eine unterschiedlich große Fläche auf einem Bildausschnitt bedecken, liefern die beiden genannten Methoden unterschiedliche Werte für die Gefäßdichte. Bei der Methode von Kohlberger und Mitarbeitern wird die Varianz der Endotheldicke nicht berücksichtigt bei der Bestimmung der Gefäßdichte, was bei dickerwandigen oder stärker gefärbten Gefäßen zu erhöhten Werten führt.

Die hier gewählte Methode der Auswertung der Gefäßdichte (VSD) hat gegenüber der Zählung einzelner Gefäße den Vorteil, dass der Untersucher unabhängig von der exakten Definition des Aussehens eines Gefäßes in der immunhistochemischen Färbung ist. Of ist, besonders in Gefäßkonvoluten, die Differenzierung einzelner Gefäße eine eher subjektive Auffassung des Untersuchers, so dass die Messergebnisse zwischen verschiedenen Untersuchern z.T. erheblich variieren können. Zudem wird die Größe der Gefäße bei der Zählung nicht berücksichtigt.

Die Technik der VSD-Bestimmung ist speziell in heterogenen Geweben den anderen Methoden überlegen und reduziert unsystematische Fehler (Barth et al., 1996). Die Konstanz der Methode ist hoch (Standardfehler <10%) mit hoher interindividueller Reproduzierbarkeit (r=0,88).

4.1.2.2 Messung der VEGF-Sekretion

Einer der wichtigsten Angiogenesefaktoren ist VEGF (Ferrara et al., 1996). Seine Funktion ist mittlerweile sehr gut untersucht. Es ist das einzige Mitogen, welches spezifisch für Endothelzellen ist. Es induziert Angiogenese und steigert die Durchlässigkeit des Endothels (Neufeld et al., 1994). Seine Expression wird durch Hypoxie gesteigert (Millauer et al., 1994). Nahezu alle bislang untersuchten Tumorzellen sezernieren VEGF *in vitro* und zeigen eine verstärkte VEGF mRNA Expression. Da bereits gezeigt wurde, dass PC12-Zellen VEGF *in vitro* sezernieren, sollte die VEGF-Expression *in vivo* ebenfalls bestimmt und mit der Gefäßdichte in Zusammenhang gebracht werden.

Der Nachweis von VEGF wurde mit einem polyklonalen Antikörper durchgeführt, dessen Reaktivität und Spezifität für Ratten-VEGF bereits nachgewiesen wurde (Yi et al., 1998).

Die Auswertung der VEGF-Expression wurde digital unterstützt durchgeführt. Ziel der digital unterstützten Auswertung ist es, unabhängig von der individuellen Beurteilung des Untersuchers zu sein und möglichst objektive Messergebnisse zu erhalten, sowie eine quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung zu ermöglichen.

Es sind drei Methoden der quantitativen Messung an immunhistochemisch gefärbten Präparaten denkbar:

1. Zählung der immunhistochemisch gefärbten Zellen,
2. Messung der immunhistochemisch gefärbten Flächen,
3. Messung der optischen Dichte immunhistochemisch gefärbter Flächen.

Die Angabe der Messwerte in 2. kann in beliebigen Einheiten erfolgen (Prozent gefärbter Fläche, absolute Fläche [μm^2] etc.) (Fritz et al., 1995).

In dieser Arbeit wurde die Fläche der immunhistochemisch gefärbten Areale in μm^2 gemessen und als Prozentwert der Gesamttumorfläche ausgedrückt (Fontanini et al., 1999). Diese Methode zur Messung der VEGF-Expression liefert nur relative Werte, da nicht die tatsächlich exprimierte Menge an VEGF gemessen wird.

Als eine Alternative könnte die Korrelation zwischen der Messung der Färbeintensität (optische Dichte) und der Expression von VEGF dienen (Punkt 3 der quantitativen Messmethoden). Es gibt jedoch noch keine Möglichkeit, densitometrische Messungen an histologischen Gewebeschnitten zu eichen.

Fritz und Koautoren haben hierzu eine Übersicht erstellt, die Vor- und Nachteile, theoretische Möglichkeiten und bereits umgesetzte Möglichkeiten dieser Methode beschreibt (Fritz et al., 1995). Bei dieser Technik sind aber mehrere Fehlerquellen möglich (True, 1988). Vor allem ist es nur bedingt möglich, in der Immunhistochemie bei aufeinander folgenden Schnitten des selben Präparates und gleichbleibender Färbemethode immer die gleiche Färbeintensität zu erhalten, auch wenn immer die selbe Antigenmenge vorliegt. Dies hängt mit mehreren Gegebenheiten zusammen. Bereits bei der Gewinnung von Schnitten treten Unterschiede durch verschiedene Schnittdicken auf. Dickere Schnitte sind aber allein durch ihr größeres Volumen stärker gefärbt.

Auch das Antigen Retrieval kann unterschiedliche Auswirkungen auf die Qualität der Färbung haben. Nur bei optimiertem Protokoll und strikter Einhaltung desselben kann

in zwei verschiedenen Versuchsreihen eine annähernd gleiche Antigendemaskierung erreicht werden. Auch hier kann das Problem der unterschiedlichen Gewebedicke eine Rolle spielen, denn dickeres Gewebe mit seinem größeren Volumen benötigt unter Umständen ein stärkeres AR. Zusätzlich ist die Art und Dauer der Fixierung von Bedeutung, denn durch sie werden die Antigene unterschiedlich stark maskiert.

Die Wahl des Antikörpers und seiner Spezifität ist ebenfalls von größter Wichtigkeit für gleichbleibend gute Färberesultate. So können zwischen verschiedenen Chargen Unterschiede in der Antikörperqualität und Konzentration vorliegen. Weiterhin spielt die gleichbleibende Qualität der Waschschritte zwischen den Färbeschritten eine wichtige Rolle. Bereits unterschiedlich langes Waschen bzw. uneinheitlich häufiges bzw. starkes Bewegen der Präparate in der Waschflüssigkeit führt zu nicht gleichen Resultaten. Ähnliche Probleme bieten alle verwendeten Chemikalien und Lösungen.

Die nächste große Gruppe von Fehlermöglichkeiten liegt in der digitalen Aufarbeitung der Präparate. Bei der Digitalisierung mit Hilfe einer Kamera entstehen Varianzen bei der Ausleuchtung der Bildausschnitte. Kameras reagieren bei wechselnden Lichtverhältnissen nicht linear. Aus diesem Grund muss vor Einsatz eines digitalen Bildauswertungssystems zur quantitativen Immunhistochemie getestet werden, in welchen Helligkeitsgrenzen die Kamera lineare Ausgangswerte in Bezug zur Beleuchtung des Objekts liefert (Mize et al., 1988). Außerdem haben viele Kameras eine automatische Helligkeitsanpassung und einen automatischen Weißabgleich, was zu Farbunterschieden bei ungleich ausgeleuchteten Bildausschnitten führt (Inoue, 1986; Kirk, 1987). Ebenso können Schwankungen der Stromversorgung der Lichtquelle zu Unterschieden in der Beleuchtung führen (Mize et al., 1988), weshalb eine Konstantstromquelle zur Versorgung der Mikroskopbeleuchtung eingesetzt werden sollte.

Um einige der oben genannten Probleme zu umgehen, wurde eine interaktive, computergestützte Auswertung gewählt. Bei der interaktiven Messung wurde die Entscheidung über die Richtigkeit der Auswahl der gefärbten Areale an den Untersucher übergeben. Erst die Messung der individuellen Auswahl wurde durch den Computer durchgeführt. Hierin lag zwar das Problem der subjektiven Beurteilung durch den Untersucher, da aber vor der Versuchsdurchführung festgelegt wurde, dass *alle* braun (durch DAB) gefärbten Areale zu messen sind, die Untersuchungen nur von einer Person durchgeführt wurden und bei der Untersuchung nicht bekannt war, um welches Präparat es sich handelte, wurden die Fehler weitestgehend minimiert. Die eindeutige

Zuordnung zwischen Präparaten und Ergebnissen erfolgte erst nach Abschluss der Messungen.

Eine mögliche Methode, absolute Messwerte in immunhistochemischen Präparaten zu ermitteln, ist das von Roth und Mitarbeitern vorgestellte „cellular ELISA“ (CELISA) (Roth et al., 1997). Bei dieser Methode handelt es sich um eine Abwandlung des Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), bei dem Enzymsubstrate benutzt werden, die ein lösliches Reaktionsprodukt liefern, welches quantitativ photometrisch ausgewertet werden kann. Die Abwandlung besteht darin, dass die Methoden des ELISA mit denen der klassischen Immunhistochemie kombiniert werden. So wird zum einen das Antigen durch Anlagerung des Antikörpers lokalisiert und anschließend mittels einer durch das an den Antikörper gebundene Enzym vermittelte Farbreaktion sichtbar gemacht. Zum anderen wird die Enzymaktivität genutzt, um ein lösliches Farbprodukt zu gewinnen, welches photometrisch gemessen werden kann.

4.1.3 Bestimmung der Mitoserate

Zusätzlich zu den oben genannten Untersuchungen wurde die Bestimmung der Mitoserate in den Tumoren zur Einschätzung der Proliferationsaktivität eingesetzt. Diese Methode hat z.B. bei Non-Hodgkin-Lymphomen einen hohen Stellenwert, da bereits durch diese einfache Untersuchung Gruppen mit signifikant unterschiedlichen Überlebenszeiten charakterisiert werden können (Donhuijsen, 1987).

4.1.4 Hemmung der *in vivo* Angiogenese durch anti-VEGF-Antikörper

Der Gedanke, das Tumorwachstum durch neutralisierende Antikörper gegen VEGF zu unterdrücken ist nicht neu. Kim und Mitarbeiter haben diese Strategie zum erstenmal 1993 erfolgreich an drei unterschiedlichen Tumorzelllinien erprobt (Kim et al., 1993).

Die derzeit umfassenste Arbeit zu subkutan xenotransplantierten humanen Tumorzellen in der Nacktmaus untersuchte die Hemmung des Tumorwachstums von 27 humanen Tumorzelllinien, darunter Kolon-, Lungen-, Brust- und Pankreaskarzinome. In 25 dieser Zelllinien wurde eine signifikante Hemmung des Wachstums durch anti-VEGF-Antikörper beobachtet (Asano et al., 1999). Zusätzlich zu den Auswirkungen auf den Primärtumor wird auch eine Verminderung der Metastasenhäufigkeit beobachtet (Kamiya et al., 1999; Kanai et al., 1998; Melnyk et al., 1999). Erste Therapiestudien mit anti-VEGF-Antikörpern befinden sich in der klinischen Phase (Gordon et al., 2001; Chen et al., 2001). Die Messung des VEGF im Serum ist als Verlaufsparameter

geeignet und hat prognostische Relevanz (Toi et al., 1996; Gasparini, 2000; Maeda et al., 1996).
Die Ergebnisse der genannten Arbeiten werfen die Frage auf, ob auch die Tumore im Phäochromozytom-Tiermodell auf der Basis von PC12-Zellen mittels Antikörpern gegen VEGF therapiert werden können.

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Nachweis von VEGF und seiner biologischen Aktivität in PC12-Zellen

Die eigenen Untersuchungen mit konditioniertem Medium von PC12-Zellen haben gezeigt, dass PC12-Zellen in der Lage sind, VEGF zu produzieren und in ihr Medium zu sezernieren. Zusätzlich wurde der Nachweis geführt, dass das sezernierte VEGF auch biologisch aktiv ist. Dieser Nachweis wurde mit dem anerkannten Verfahren des HUVEC-Proliferations-Assays geführt (Wang et al., 1997). Wenn dem Standard-Wachstumsmedium für HUVEC-Zellen Antikörper gegen VEGF zugegeben werden, lässt sich die Proliferation der HUVEC-Zellen hemmen. Durch Zugabe von rekombinantem VEGF dagegen lässt sich die Proliferation gegenüber dem Ausgangswert noch steigern. Es liegt also ein dynamisches System vor, welches allein durch den Gehalt an VEGF im Medium gesteuert werden kann. Die gleiche Dynamik wurde gesehen, wenn durch PC12-Zellen konditioniertes Medium statt dem Wachstumssupplement für HUVEC-Zellen eingesetzt wurde. Wieder zeigte sich die gleiche Dynamik im Wachstum der HUVEC-Zellen. Hierdurch gelingt der Beweis, dass das von PC12-Zellen sezernierte VEGF biologisch aktiv ist.
Dieser Nachweis wird in der Literatur nur selten geführt, ist aber Voraussetzung dafür, zu postulieren, dass Veränderungen in der Gefäßdichte und dem Tumorwachstum tatsächlich auf das von untersuchten Zellen sezernierte VEGF zurückzuführen sind.

4.2.2 Angiogenesemessung im Tumormodell

4.2.2.1 Angiogenesemessung nach Koinjektion mit EZM-Proteinen

1992 ist es erstmalig gelungen, VEGF-mRNA in PC12-Zellen nachzuweisen (Claffey et al., 1992). Eine andere Gruppe fand bei Untersuchungen zum neuronalen NO-Stoffwechsel heraus, dass PC12-Zellen nach Stimulation mit VEGF keine VEGF-Rezeptor vermittelte Antwort zeigten, wohl aber selber die Möglichkeit zur VEGF-Produktion besitzen (Sheehy et al., 1997).

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass PC12-Zellen VEGF *in vitro* sezernieren und erstmalig der Nachweis geführt wurde, dass dieses biologisch aktiv ist, wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen VEGF-Expression und Angiogenese *in vivo* besteht und eine Einwirkung verschiedener Proteine der Extrazellulärmatrix (EZM) auf dieses System besteht.

Kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Nekrosefraktion der Tumore (als indirekter Parameter zur Bestimmung der Gefäßfunktion geeignet) und der VEGF-Expression zu den koinjizierten Bestandteilen der EZM konnte gefunden werden. Es zeigte sich aber, dass Tumore mit einem größeren Endvolumen eine etwas niedrigere Nekrosefraktion besaßen, als Tumore mit einem kleineren Endvolumen. Daraus lässt sich ableiten, dass Tumore mit einer besseren Gefäßversorgung und damit geringeren Nekrosefraktion ein stärkeres Wachstum zeigen. Das ist dadurch erklärbar, dass die Produktion von VEGF durch Hypoxie im Gewebe stimuliert wird (Millauer et al., 1994). Mit Matrigel koinjizierte Zellen brachten die größten Tumore mit einer der geringsten Nekroseraten hervor. Die Tumorvolumenverdopplungszeit dieser Tumore war signifikant kürzer, als die der Kontrolltumore. Bei Betrachtung der Mitoserate fällt auf, dass sich signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe finden lassen, je nachdem, welches EZM-Protein koinjiziert wurde. So scheint Kollagen die Mitoserate eher zu hemmen.

Es lässt sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Proteinen der Extrazellulärmatrix und den Parametern der Angiogenese und der Zellproliferation finden.

4.2.2.2 Angiogenesemessung nach Präinkubation und Koinjektion mit NGF

Bezüglich der Vorbehandlung und Koinjektion der PC12-Zellen mit NGF kann gesagt werden, dass höhere Dosen von koinjiziertem NGF das Wachstum der in Matrigel immobilisierten Zellen stärker stimulieren als niedrigere. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung fand sich auch eine höhere Mitoserate, niedrigere Nekrosefraktion und höhere VEGF-Expression in den Tumoren mit der höheren NGF-Dosis. Der stimulierende Effekt von NGF auf das Wachstum bzw. Überleben von xenotransplantiertem chromaffinem Gewebe ist in Ratten bereits mehrfach gezeigt worden (Chalmers et al., 1995; Cunningham et al., 1994; Strömberg et al., 1985). Auch führte die räumlich getrennte Implantation eines NGF-Depots zur Proliferation und auf die NGF-Quelle gerichtetem Wachstum (Chalmers et al., 1995). In der vorliegenden

Arbeit fand sich damit erstmalig ein Hinweis auf eine mögliche Mitogenität von NGF auf PC12-Zellen *in vivo.*

4.2.3 Angiogenesemessung in humanen Phäochromozytomen

Bereits 1996 haben Liu und Mitarbeiter Untersuchungen zur Gefäßdichte in humanen Phäochromozytomen an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Präparaten durchgeführt (Liu et al., 1996).
Diese Ergebnisse konnten in der hier vorliegenden Arbeit im Prinzip bestätigt werden und sogar um einen Parameter, die VEGF-Expression erweitert werden. Jedoch fand sich, im Unterschied zur vorgenannten Arbeit, für die Gruppe der intermediären Tumore, die ebenso wie von Liu, anhand einer ausgeprägten Kapsel- und / oder Gefäßinvasion identifiziert wurden, eine der benignen Gruppe entsprechende Angiogenese.
Untersuchungen zum Wachstum von Phäochromozytomen haben gezeigt, dass maligne Tumore eine stärkere Wachstumsaktivität haben als benigne (Clarke et al., 1998). Anhand eines Antikörpers gegen das nukleäre Antigen Ki-67 (MIB-1) konnten signifikante Unterschiede in der Aktivität benigner und maligner Phäochromozytome nachgewiesen werden (Nagura et al., 1999). Es bleibt zu untersuchen, ob eine Bestimmung der hier gemessenen Werte für VSD und VEGF zusammen mit Ergebnissen einer Ki-67-Bestimmung eine sichere Unterscheidung hinsichtlich der Dignität erlaubt.

4.2.4 Hemmung der *in vivo* Angiogenese durch anti-VEGF-Antikörper

Die hier gefundenen Ergebnisse zur Hemmung des Tumorwachstums von PC12-Zellen *in vivo* legen die Möglichkeit einer anti-Tumortherapie mittels anti-VEGF-Antikörpern nahe. So ist es gelungen, durch lokale, aber auch durch systemische Applikation der Antikörper, das Tumorwachstum und die Gefäßdichte, sowie die VEGF-Expression signifikant zu vermindern. Die Unterdrückung der VEGF-Expression lässt sich durch die Anwendung der anti-VEGF-Antikörper erklären, das verminderte Wachstum, sowie die geringere Gefäßdichte lassen sich jedoch logisch nur als Resultat der fehlenden mitogenen Aktivität des VEGF auf die Blutgefäßendothelien erklären.
Da die Versuche nur zur Überprüfung einer möglichen Reduktion von VEGF durch spezifische Antikörper konzipiert waren, liegen keine Daten über eine länger dauernde Behandlung vor. In weiteren Versuchen muss deshalb geprüft werden, ob bei einer

länger dauernden Therapie das Tumorwachstum auch auf lange Sicht unterdrückt werden kann, ob es sogar zu einer Tumorregression kommen kann und ob die hier gefundenen Resultate auch auf humane Phäochromozytome übertragbar sind.

Erste Phase I und II Studien wurden bereits mit monoklonalen anti-VEGF-Antikörpern durchgeführt, mit zum Teil vielversprechenden Resultaten (Gordon et al., 2001; Margolin et al., 2001; Chen et al., 2001).

Da die Antikörpertherapie im Maus-Modell sehr gute Resultate gezeigt hat, ist zu hoffen, dass auch beim Menschen – in Analogie zu den bereits laufenden klinischen Studien – diese Form der Tumortherapie beim Phäochromozytom erfolgreich sein wird.

5 Zusammenfassung

Phäochromozytome sind seltene, regelhaft stark vaskularisierte Neoplasien des Nebennierenmarks, welche in etwa 10% maligne sind. Aufgrund ihrer Seltenheit ist wenig über ihre Tumorbiologie bekannt. Eine besondere Problematik besteht in der Abgrenzung der malignen Erkrankung, die bislang lediglich durch den Zustand der bereits eingetretenen Metastasierung charakterisierbar ist. In diesen Fällen sind die Therapiemöglichkeiten extrem begrenzt, so dass ein dringender Bedarf an neuen Therapien besteht.

Angiogenese ist ein essentieller Prozess im Rahmen der Tumorprogression und der Metastasierung. Der stärkste Promotor der Angiogenese ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). In jüngerer Zeit finden sich in der Literatur viele Beispiele für den Einsatz von Inhibitoren der Angiogenese als anti-Tumortherapie, bei denen u.a. auch neutralisierende Antikörper gegen VEGF eingesetzt wurden.

Vor diesem Hintergrund untersuchte die vorliegende Arbeit in experimentellen Phäochromozytomen (PC12-Zellen) und Operationspräparaten eindeutig charakterisierter humaner Tumore VEGF-Expression und Ausmaß der Angiogenese in Abhängigkeit von der Dignität. Mit der Frage der Umsetzbarkeit neuer Therapien wurde in vitro (PC12-Zellen) untersucht, ob eine durch Tumorzellen induzierte und über VEGF vermittelte Angiogenese nachgewiesen werden kann und schließlich im experimentellen Modell in vivo die Wirkung neutralisierender Antikörper gegen VEGF als anti-Tumorstrategie in vivo überprüft.

- Es konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass PC12-Zellen in vitro den pro-angiogentischen Faktor VEGF quantitativ produzieren und sezernieren. Dessen biologische Aktivität wurde durch die Proliferationsantwort humaner Endothelzellen (HUVEC) belegt. Diese Antwort konnte durch neutralisierende anti-VEGF-Antikörper unterbunden werden.
- In experimentellen PC12-Tumoren korrelierte das Ausmaß der Tumorvaskularisierung mit der Nekroserate und der VEGF-Expression, so dass unterstellt werden konnte, dass PC12-Zellen in vivo die Bildung neuer Blutgefäße durch VEGF initiierten.
- In humanen Phäochromozytomen wurde die VEGF-vermittelte angiogenetische Kaskade nachvollzogen. Zudem konnten signifikante Unterschiede bzgl. VEGF-

Expression und Gefäßdichte zw. benignen und malignen Tumoren belegt werden.

– Die Therapie experimenteller PC-12 Tumore mit neutralisierenden VEGF-Antikörpern ergab signifikant geringere VEGF-Expression, Mikrogefäßdichte, Mitoserate respektive Tumorvolumina bei behandelten vgl. zu unbehandelten Tumoren.

Nach diesen Ergebnissen eröffnet sich erstmalig die Perspektive einer adjuvanten, anti-angiogenen Therapie nicht resektabler oder metastasierter, maligner Phäochromozytome mittels neutralisierender Antikörper gegen den Gefäßwachstumsfaktor VEGF. Die prinzipielle Effektivität solcher innovativer Therapien wurde in anderen Tumorsystemen (u.a. Kolonkarzinom und Mammakarzinom) bereits klinisch dokumentiert.

6 Literaturverzeichnis

Asano M., Yukita A., und Suzuki H. (1999) Wide spectrum of antitumor activity of a neutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor. *Jpn J Cancer Res* **90:**93-100.

Averbuch S.D., Steakley C.S., Young R.C., Gelmann E.P., Goldstein D.S., Stull R., und Keiser H.R. (1988) Malignant pheochromocytoma: effective treatment with a combination of cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine. *Ann.Intern.Med* **109:**267-273.

Baldwin H.S., Shen H.M., Yan H.C., DeLisser H.M., Chung A., Mickanin C., Trask T., Kirschbaum N.E., Newman P.J., und Albelda S.M. (1994) Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development* **120:**2539-2553.

Barth P.J., Weingärtner K., Köhler H.H., und Bittinger A. (1996) Assessment of the vascularization in prostatic carcinoma: a morphometric investigation. *Hum.Pathol* **27:**1306-1310.

Belletti B., Ferraro P., Arra C., Baldassarre G., Bruni P., Staibano S., De Rosa G., Salvatore G., Fusco A., Persico M.G., und Viglietto G. (1999) Modulation of in vivo growth of thyroid tumor-derived cell lines by sense and antisense vascular endothelial growth factor gene. *Oncogene* **18:**4860-4869.

Bochner B.H., Cote R.J., Weidner N., Groshen S., Chen S.C., Skinner D.G., und Nichols P.W. (1995) Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst* **87:**1603-1612.

Boenisch T. (1996a) Färbemethoden. in *Handbuch II immunhistochemischer Färbemethoden.* Carpinteria, Kalifornien, USA: DAKO Corporation, S. 22-27.

Boenisch T. (1996b) Hintergrundaktivität. in *Handbuch II immunhistochemischer Färbemethoden.* Carpinteria, Kalifornien, USA: DAKO Corporation, S. 30-33.

Bottenstein J.E. und Sato G.H. (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76:**514-517.

Bravo E.L. (1991) Diagnosis of pheochromocytoma. Reflections on a controversy. *Hypertension* **17:**742-744.

Bravo E.L. und Gifford R.W., Jr. (1984) Current concepts. Pheochromocytoma: diagnosis, localization and management. *N.Engl.J Med* **311:**1298-1303.

Brawer M.K., Deering R.E., Brown M., Preston S.D., und Bigler S.A. (1994) Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma. The role of neovascularity. *Cancer* **73:**678-687.

Brown L.F., Berse B., Jackman R.W., Tognazzi K., Guidi A.J., Dvorak H.F., Senger D.R., Connolly J.L., und Schnitt S.J. (1995a) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum.Pathol* **26:**86-91.

Brown P.D. und Giavazzi R. (1995b) Matrix metalloproteinase inhibition: a review of anti-tumour activity. *Ann.Oncol* **6:**967-974.

Burgdorf W.H., Mukai K., und Rosai J. (1981) Immunohistochemical identification of factor VIII-related antigen in endothelial cells of cutaneous lesions of alleged vascular nature. *Am J Clin Pathol* **75:**167-171.

Cahlin C., Gelin J., Delbro D., Lonnroth C., Doi C., und Lundholm K. (2000) Effect of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibitors on tumor growth in mouse tumor models with and without cancer cachexia related to prostanoids. *Cancer Res* **60:**1742-1749.

Chalmers G.R., Fisher L.J., Niijima K., Patterson P.H., und Gage F.H. (1995) Adrenal chromaffin cells transdifferentiate in response to basic fibroblast growth factor and show directed outgrowth to a nerve growth factor source in vivo. *Exp Neurol.* **133:**32-42.

Chen H.X., Gore-Langton R.E., und Cheson B.D. (2001) Clinical trials referral resource: Current clinical trials of the anti- VEGF monoclonal antibody bevacizumab. *Oncology (Huntington NY)* **15:**1017, 1020, 1023-1017, 1020, 1026.

Cheung P.S., Thompson N.W., Dmuchowski C.F., und Sisson J.C. (1988) Spectrum of pheochromocytoma in the 131I-MIBG era. *World J Surg* **12:**546-551.

Christenson R., Smith C.W., und Burko H. (1976) Arteriographic manifestations of pheochromocytoma. *Am J Roentgenol.* **126:**567-575.

Claffey K.P., Wilkison W.O., und Spiegelman B.M. (1992) Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem* **267:**16317-16322.

Clarke M.R., Weyant R.J., Watson C.G., und Carty S.E. (1998) Prognostic markers in pheochromocytoma. *Hum.Pathol* **29:**522-526.

Coutant R., Pein F., Adamsbaum C., Oberlin O., Dubousset J., Guinebretiere J.M., Teinturier C., und Bougneres P.F. (1999) Prognosis of children with malignant pheochromocytoma. Report of 2 cases and review of the literature. *Horm.Res* **52:**145-149.

Cunningham L.A., Short M.P., Breakefield X.O., und Bohn M.C. (1994) Nerve growth factor released by transgenic astrocytes enhances the function of adrenal chromaffin cell grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* **658:**219-231.

Dehaut F., Montero-Menei C., Alhayek G., und Pouplard-Barthelaix A. (1993) Differential behaviour of PC12 cells grafted into rat hippocampus and striatum. *Neuroscience Letters* **153:**41-44.

Donhuijsen K. (1987) Mitoses in non-Hodgkin's lymphomas. Frequency and prognostic relevance. *Pathol Res Pract.* **182:**352-357.

Duncan M.W., Compton P., Lazarus L., und Smythe G.A. (1988) Measurement of norepinephrine and 3,4-dihydroxyphenylglycol in urine and plasma for the diagnosis of pheochromocytoma. *N.Engl.J Med* **319:**136-142.

El Badry O.M., Romanus J.A., Helman L.J., Cooper M.J., Rechler M.M., und Israel M.A. (1989) Autonomous growth of a human neuroblastoma cell line is mediated by insulin-like growth factor II. *J.Clin.Invest* **84:**829-839.

Farahati J. und Reiners C. (1997) Nuklearmedizinische Diagnostik des Phäochromozytoms. *Zentralbl.Chir* **122:**443-446.

Ferrara N. (1999) Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol.Med* **77:**527-543.

Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O'Shea K.S., Powell-Braxton L., Hillan K.J., und Moore M.W. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380:**439-442.

Fidler I.J. und Ellis L.M. (1994) The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* **79:**185-188.

Folkman J. (1974) Tumor angiogensis: role in regulation of tumor growth. *Symp.Soc.Dev.Biol* **30:**43-52.

Folkman J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* **82:**4-6.

Folkman J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat.Med* **1:**27-31.

Folkman J. und Klagsbrun M. (1987) Angiogenic factors. *Science* **235:**442-447.

Fontanini G., Calcinai A., Boldrini L., Lucchi M., Mussi A., Angeletti C.A., Cagno C., Tognetti M.A., und Basolo F. (1999) Modulation of neoangiogenesis in bronchial preneoplastic lesions. *Oncol Rep.* **6:**813-817.

Fox C.H., Johnson F.B., Whiting J., und Roller P.P. (1985) Formaldehyde fixation. *J Histochem.Cytochem.* **33:**845-853.

Fraenkel-Conrat H., Brandon B.A., und Olcott H.S. (1947) The reaction of formaldehyde with proteins. IV. Participation of indole groups. Gramicidin. *J Biol Chem* **168:**99-118.

Fränkel F. (1886) Ein Fall von doppelseitigem, völlig latent verlaufenen Nebennierentumor und gleichzeitiger Nephritis mit Veränderungen am Circulationsapparat und Retinitis. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* **103:**244-263.

Fritz P., Wu X., Tuczek H., Multhaupt H., und Schwarzmann P. (1995) Quantitation in immunohistochemistry. A research method or a diagnostic tool in surgical pathology? *Pathologica* **87:**300-309.

Fujita K., Lazarovici P., und Guroff G. (1989) Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. *Environmental Health Perspectives* **80:**127-142.

Gasparini G. (2000) Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* **5 Suppl 1:**37-44.

Ghadimi B.M. und Schlag P.M. (1998) Tumormetastasierung. Molekulare Grundlagen und therapeutische Optionen. *Chirurg* **69:**1315-1322.

Gordon M.S., Margolin K., Talpaz M., Sledge G.W., Jr., Holmgren E., Benjamin R., Stalter S., Shak S., und Adelman D. (2001) Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* **19:**843-850.

Graeber T.G., Osmanian C., Jacks T., Housman D.E., Koch C.J., Lowe S.W., und Giaccia A.J. (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* **379:**88-91.

Greene L.A. und Tischler A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73:**2424-2428.

Guazzoni G., Montorsi F., Bocciardi A., Da Pozzo L., Rigatti P., Lanzi R., und Pontiroli A. (1995) Transperitoneal laparoscopic versus open adrenalectomy for benign hyperfunctioning adrenal tumors: a comparative study. *J Urol* **153:**1597-1600.

Hamilton B.P., Cheikh I.E., und Rivera L.E. (1977) Attempted treatment of inoperable pheochromocytoma with streptozocin. *Arch Intern.Med* **137:**762-765.

Hanahan D. und Folkman J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86:**353-364.

Hanson M.W., Feldman J.M., Beam C.A., Leight G.S., und Coleman R.E. (1991) Iodine 131-labeled metaiodobenzylguanidine scintigraphy and biochemical analyses in suspected pheochromocytoma. *Arch Intern.Med* **151:**1397-1402.

Harper M.A., Murnaghan G.A., Kennedy L., Hadden D.R., und Atkinson A.B. (1989) Phaeochromocytoma in pregnancy. Five cases and a review of the literature. *Br.J Obstet.Gynaecol.* **96:**594-606.

Harris A.L. (1997) Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet* **349 Suppl 2:**SII13-SII15.

Hassoun J., Monges G., Giraud P., Henry J.F., Charpin C., Payan H., und Toga M. (1984) Immunohistochemical study of pheochromocytomas. An investigation of methionine-enkephalin, vasoactive intestinal peptide, somatostatin, corticotropin, beta-endorphin, and calcitonin in 16 tumors. *Am J Pathol* **114:**56-63.

Hobson B. und Denekamp J. (1984) Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br.J Cancer* **49:**405-413.

Iinuma S., Schomacker K.T., Wagnieres G., Rajadhyaksha M., Bamberg M., Momma T., und Hasan T. (1999) In vivo fluence rate and fractionation effects on tumor response and photobleaching: photodynamic therapy with two photosensitizers in an orthotopic rat tumor model. *Cancer Res* **59:**6164-6170.

Inoue S. (1986) *Video Microscopy,* Plenum Press, New York, London.

Isaacs J.T. und Coffey D.S. (1981) Adaptation versus selection as the mechanism responsible for the relapse of prostatic cancer to androgen ablation therapy as studied in the Dunning R-3327-H adenocarcinoma. *Cancer Res* **41:**5070-5075.

Kamiya K., Konno H., Tanaka T., Baba M., Matsumoto K., Sakaguchi T., Yukita A., Asano M., Suzuki H., Arai T., und Nakamura S. (1999) Antitumor effect on human gastric cancer and induction of apoptosis by vascular endothelial growth factor neutralizing antibody. *Jpn J Cancer Res* **90:**794-800.

Kanai T., Konno H., Tanaka T., Baba M., Matsumoto K., Nakamura S., Yukita A., Asano M., Suzuki H., und Baba S. (1998) Anti-tumor and anti-metastatic effects of human-vascular-endothelial-growth-factor-neutralizing antibody on human colon

and gastric carcinoma xenotransplanted orthotopically into nude mice. *Int J Cancer* **77:**933-936.

Kaufman H.L., Rao J.B., Irivine K.R., Bronte V., Rosenberg S.A., und Restifo N.P. (1999) Interleukin-10 enhances the therapeutic effectiveness of a recombinant poxvirus-based vaccine in an experimental murine tumor model. *J Immunother*. **22:**489-496.

Keshmirian J., Bray G., und Carbonetto S. (1989) The extracellular matrix modulates the response of PC12 cells to nerve growth factor: cell aggregation versus neurite outgrowth on 3-dimensional laminin substrata. *J Neurocytol.* **18:**491-504.

Kim K.J., Li B., Winer J., Armanini M., Gillett N., Phillips H.S., und Ferrara N. (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362:**841-844.

Kirk C.P. (1987) Aberation effects in an optical measuring microscope. *Applied Optics* **26:**3417-3424.

Kocheril S.V., Grignon D.J., Wang C.Y., Maughan R.L., Montecillo E.J., Talati B., Tekyi-Mensah S., Pontes J., und Hillman G.G. (1999) Responsiveness of human prostate carcinoma bone tumors to interleukin-2 therapy in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Detection and Prevention* **23:**408-416.

Kohlberger P.D., Obermair A., Sliutz G., Heinzl H., Koelbl H., Breitenecker G., Gitsch G., und Kainz C. (1996) Quantitative immunohistochemistry of factor VIII-related antigen in breast carcinoma: a comparison of computer-assisted image analysis with established counting methods. *Am J Clin Pathol* **105:**705-710.

Kondo S., Asano M., und Suzuki H. (1993) Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **194:**1234-1241.

Krempf M., Lumbroso J., Mornex R., Brendel A.J., Wemeau J.L., Delisle M.J., Aubert B., Carpentier P., Fleury-Goyon M.C., und Gibold C. (1991) Use of m-iodobenzylguanidine in the treatment of malignant pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* **72:**455-461.

Labbe M., Tinel J., und Doumer A. (1922) Crises solaires et hypertension paroxystique en rapport avec une tumeur surrenale. *Bull et mem Hop de Paris* **46:**982-990.

Lau P., Permezel M., Dawson P., Chester S., Collier N., und Forbes I. (1996) Phaeochromocytoma in pregnancy. *Aust.N.Z.J Obstet.Gynaecol.* **36:**472-476.

Leader M., Collins M., Patel J., und Henry K. (1986) Staining for factor VIII related antigen and Ulex europaeus agglutinin I (UEA-I) in 230 tumours. An assessment of their specificity for angiosarcoma and Kaposi's sarcoma. *Histopathology* **10:**1153-1162.

Lehnert H. (1998) Regulation of catecholamine synthesizing enzyme gene expression in human pheochromocytoma. *Eur J Endocrinol* **138:**363-367.

Levine S.N. und McDonald J.C. (1984) The evaluation and management of pheochromocytomas. *Adv.Surg* **17:**281-313.

Lindner M.D., Winn S.R., Baetge E.E., Hammang J.P., Gentile F.T., Doherty E., McDermott P.E., Frydel B., Ullman M.D., und Schallert T. (1995) Implantation of encapsulated catecholamine and GDNF-producing cells in rats with unilateral dopamine depletions and parkinsonian symptoms. *Exp Neurol.* **132:**62-76.

Liu Q., Djuricin G., Staren E.D., Gattuso P., Gould V.E., Shen J., Saclarides T., Rubin D.B., und Prinz R.A. (1996) Tumor angiogenesis in pheochromocytomas and paragangliomas. *Surgery* **120:**938-942.

Lo C.Y., Lam K.Y., Wat M.S., und Lam K.S. (2000) Adrenal pheochromocytoma remains a frequently overlooked diagnosis. *American Journal of Surgery* **179:**212-215.

Macchiarini P., Fontanini G., Hardin M.J., Squartini F., und Angeletti C.A. (1992) Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* **340:**145-146.

Maeda K., Chung Y.S., Ogawa Y., Takatsuka S., Kang S.M., Ogawa M., Sawada T., und Sowa M. (1996) Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* **77:**858-863.

Manger W.M. und Gifford R.W., Jr. (1996) Diagnosis. in *Clinical and Experimental Pheochromocytoma.* Cambridge, Massachusetts: Blackwell Science.

Mannelli M., Ianni L., Cilotti A., und Conti A. (1999) Pheochromocytoma in Italy: a multicentric retrospective study. *Eur J Endocrinol* **141:**619-624.

Margolin K., Gordon M.S., Holmgren E., Gaudreault J., Novotny W., Fyfe G., Adelman D., Stalter S., und Breed J. (2001) Phase Ib trial of intravenous recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor in combination with chemotherapy in patients with advanced cancer: pharmacologic and long-term safety data. *J Clin Oncol* **19:**851-856.

Mark M.D., Liu Y., Wong S.T., Hinds T.R., und Storm D.R. (1995) Stimulation of neurite outgrowth in PC12 cells by EGF and KCl depolarization: a Ca(2+)-independent phenomenon. *J Cell Biol* **130:**701-710.

Marmé D. (2001) Tumorangiogenese: Neue Ansätze zur Krebstherapie. *Onkologie* **24 Suppl 1:**1-5.

Mattei M.G., Borg J.P., Rosnet O., Marme D., und Birnbaum D. (1996) Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively. *Genomics* **32:**168-169.

Maurea S., Cuocolo A., Reynolds J.C., Tumeh S.S., Begley M.G., Linehan W.M., Norton J.A., Walther M.M., Keiser H.R., und Neumann R.D. (1993) Iodine-131-metaiodobenzylguanidine scintigraphy in preoperative and postoperative evaluation of paragangliomas: comparison with CT and MRI. *J Nucl.Med* **34:**173-179.

Mayo C.H. (1927) Paroxysmal hypertension with tumor of retroperitoneal nerve. *JAMA* **89:**1047.

Melicow M.M. (1977) One hundred cases of pheochromocytoma (107 tumors) at the Columbia-Presbyterian Medical Center, 1926-1976: a clinicopathological analysis. *Cancer* **40:**1987-2004.

Melnyk O., Shuman M.A., und Kim K.J. (1996) Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth. *Cancer Res* **56:**921-924.

Melnyk O., Zimmerman M., Kim K.J., und Shuman M. (1999) Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody inhibits further growth of established prostate cancer and metastases in a pre-clinical model. *J Urol* **161:**960-963.

Miettinen M., Lindenmayer A.E., und Chaubal A. (1994) Endothelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody. *Mod.Pathol* **7:**82-90.

Millauer B., Shawver L.K., Plate K.H., Risau W., und Ullrich A. (1994) Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* **367:**576-579.

Min H.Y., Doyle L.V., Vitt C.R., Zandonella C.L., Stratton-Thomas J.R., Shuman M.A., und Rosenberg S. (1996) Urokinase receptor antagonists inhibit angiogenesis and primary tumor growth in syngeneic mice. *Cancer Res* **56:**2428-2433.

Mize R.R., Holdefer R.N., und Nabors L.B. (1988) Quantitative immunocytochemistry using an image analyzer. I. Hardware evaluation, image processing, and data analysis. *J Neurosci.Methods* **26:** 1-23.

Modlin I.M., Farndon J.R., Shepherd A., Johnston I.D., Kennedy T.L., Montgomery D.A., und Welbourn R.B. (1979) Phaeochromocytomas in 72 patients: clinical and diagnostic features, treatment and long term results. *Br.J Surg* **66:**456-465.

Mornex R., Badet C., und Peyrin L. (1992) Malignant pheochromocytoma: a series of 14 cases observed between 1966 and 1990. *J Endocrinol Invest* **15:**643-649.

Mukhopadhyay D., Tsiokas L., und Sukhatme V.P. (1995) Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* **55:**6161-6165.

Mustonen T. und Alitalo K. (1995) Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* **129:**895-898.

Nagura S., Katoh R., Kawaoi A., Kobayashi M., Obara T., und Omata K. (1999) Immunohistochemical estimations of growth activity to predict biological behavior of pheochromocytomas. *Mod.Pathol* **12:**1107-1111.

Nauck M., Roth M., Tamm M., Eickelberg O., Wieland H., Stulz P., und Perruchoud A.P. (1997) Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor is downregulated by corticosteroids. *Am J Respir.Cell Mol.Biol* **16:**398-406.

Neufeld G., Tessler S., Gitay-Goren H., Cohen T., und Levi B.Z. (1994) Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog.Growth Factor Res* **5:**89-97.

Neumann K. und Langer R. (1997) Bildgebende Verfahren zur Diagnostik des Phäochromozytoms. *Zentralbl.Chir* **122:**438-442.

Nielsen H.J., Werther K., Mynster T., und Brunner N. (1999) Soluble vascular endothelial growth factor in various blood transfusion components. *Transfusion* **39:**1078-1083.

Ober W.B. (1983) Emil Zuckerkandl and his delightful little organ. *Pathol Annu.* **18 Pt 1:**103-119.

Orchard T., Grant C.S., van Heerden J.A., und Weaver A. (1993) Pheochromocytoma--continuing evolution of surgical therapy. *Surgery* **114:**1153-1158.

Passaniti A., Taylor R.M., Pili R., Guo Y., Long P.V., Haney J.A., Pauly R.R., Grant D.S., und Martin G.R. (1992) A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* **67:**519-528.

Plate K.H., Breier G., Weich H.A., und Risau W. (1992) Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* **359:**845-848.

Plouin P.F., Chatellier G., Fofol I., und Corvol P. (1997) Tumor recurrence and hypertension persistence after successful pheochromocytoma operation. *Hypertension* **29:**1133-1139.

Poll H. (1905) Die vergleichende Entwicklung der Nebennierensysteme. in Hertwig,O.: *Handbuch der Entwicklungsgeschichte des Menschen und der Wirbeltiere.* Jena: Gustav Fischer; vol. 3, S. 443.

Prevost-Blondel A., Roth E., Rosenthal F.M., und Pircher H. (2000) Crucial role of TNF-alpha in CD8 T cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells in vivo. *J Immunol* **164:**3645-3651.

Pullerits J., Ein S., und Balfe J.W. (1988) Anaesthesia for phaeochromocytoma. *Can J Anaesth.* **35:**526-534.

Reinig J.W., Stutley J.E., Leonhardt C.M., Spicer K.M., Margolis M., und Caldwell C.B. (1994) Differentiation of adrenal masses with MR imaging: comparison of techniques. *Radiology* **192:**41-46.

ReMine W.H., Chong G.C., van Heerden J.A., Sheps S.G., und Harrison E.G., Jr. (1974) Current management of pheochromocytoma. *Ann.Surg* **179:**740-748.

Remmel E., Oertli D., Holzgreve W., Hosli I., Staub J.J., und Harder F. (1999) Ein malignes Phäochromocytom in der 17. Schwangerschaftswoche. *Chirurg* **70:**1053-1057.

Risau W. und Flamme I. (1995) Vasculogenesis. *Annu.Rev Cell Dev.Biol* **11:**73-91.

Ross E.J. und Griffith D.N. (1989) The clinical presentation of phaeochromocytoma. *Q.J Med* **71:**485-496.

Roth K.A., Brenner J.W., Selznick L.A., Gokden M., und Lorenz R.G. (1997) Enzyme-based antigen localization and quantitation in cell and tissue samples (Midwestern assay). *J Histochem.Cytochem.* **45:**1629-1641.

Rukenstein A., Rydel R.E., und Greene L.A. (1991) Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by transla. *J Neurosci.* **11:**2552-2563.

Samaan N.A. und Hickey R.C. (1987) Pheochromocytoma. *Semin.Oncol* **14:**297-305.

Sandhu J.K., Privora H.F., Wenckebach G., und Birnboim H.C. (2000) Neutrophils, nitric oxide synthase, and mutations in the mutatect murine tumor model. *Am J Pathol* **156:**509-518.

Schwarz M.A., Mitchell M., und Emerson D.L. (1990) Reconstituted basement membrane enhances neurite outgrowth in PC12 cells induced by nerve growth factor. *Cell Growth and Differentiation* **1:** 313-318.

Scott H.W., Jr., Reynolds V., Green N., Page D., Oates J.A., Robertson D., und Roberts S. (1982) Clinical experience with malignant pheochromocytomas. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* **154:** 801-818.

Seberger P.J., Scholar E.M., Kelsey L., Chaney W.G., und Talmadge J.E. (1999) N-linked oligosaccharides and metastatic propensity in in vivo selected mouse mammary adenocarcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* **17:**437-444.

Senger D.R., Claffey K.P., Benes J.E., Perruzzi C.A., Sergiou A.P., und Detmar M. (1997) Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94:**13612-13617.

Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gertsenstein M., Wu X.F., Breitman M.L., und Schuh A.C. (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376:**62-66.

Sheehy A.M., Phung Y.T., Riemer R.K., und Black S.M. (1997) Growth factor induction of nitric oxide synthase in rat pheochromocytoma cells. *Brain Res Mol.Brain Res* **52:**71-77.

Sheps S.G., Jiang N.S., und Klee G.G. (1988) Diagnostic evaluation of pheochromocytoma. *Endocrinol Metab Clin North Am* **17:**397-414.

Sheps S.G., Jiang N.S., Klee G.G., und van Heerden J.A. (1990) Recent developments in the diagnosis and treatment of pheochromocytoma. *Mayo Clin Proc* **65:**88-95.

Shi S.R., Cote R.J., und Taylor C.R. (1997) Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem.Cytochem.* **45:**327-343.

Soo H.W., Lundeen K.A., Kohrumel J.R., Pham N.L., Brostoff S.W., Bartholomew R.M., und Carlo D.J. (1999) Tumor cell surface expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor elicits antitumor immunity and protects from tumor challenge in the P815 mouse mastocytoma tumor model. *J Immunol* **162:**7343-7349.

Stewart B.H., Bravo E.L., Haaga J., Meaney T.F., und Tarazi R. (1978) Localization of pheochromocytoma by computed tomography. *N.Engl.J Med* **299:**460-461.

Streeten D.H., Anderson G.H., Jr., und Wagner S. (1990) Effect of age on response of secondary hypertension to specific treatment. *Am J Hypertens.* **3:**360-365.

Strömberg I., Herrera-Marschitz M., Ungerstedt U., Ebendal T., und Olson L. (1985) Chronic implants of chromaffin tissue into the dopamine-denervated striatum. Effects of NGF on graft survival, fiber growth and rotational behavior. *Exp Brain Res* **60:**335-349.

Sun Q.H., DeLisser H.M., Zukowski M.M., Paddock C., Albelda S.M., und Newman P.J. (1996) Individually distinct Ig homology domains in PECAM-1 regulate homophilic binding and modulate receptor affinity. *J Biol Chem* **271:**11090-11098.

Sutton M.G., Sheps S.G., und Lie J.T. (1981) Prevalence of clinically unsuspected pheochromocytoma. Review of a 50-year autopsy series. *Mayo Clin Proc* **56:**354-360.

Teicher B.A. (1995) Angiogenesis and cancer metastases: therapeutic approaches. *Crit Rev Oncol Hematol.* **20:**9-39.

Tischer E., Mitchell R., Hartman T., Silva M., Gospodarowicz D., Fiddes J.C., und Abraham J.A. (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* **266:**11947-11954.

Tischler A.S., Perlman R.L., Morse G.M., und Sheard B.E. (1983) Glucocorticoids increase catecholamine synthesis and storage in PC12 pheochromocytoma cell cultures. *J Neurochem.* **40:**364-370.

Tischler A.S., Ruzicka L.A., und Perlman R.L. (1990) Mimicry and inhibition of nerve growth factor effects: interactions of staurosporine, forskolin, and K252a in PC12 cells and normal rat chromaffin cells in vitro. *J Neurochem.* **55:**1159-1165.

Toi M., Kondo S., Suzuki H., Yamamoto Y., Inada K., Imazawa T., Taniguchi T., und Tominaga T. (1996) Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer* **77:**1101-1106.

Tomaselli K.J., Damsky C.H., und Reichardt L.F. (1988) Purification and characterization of mammalian integrins expressed by a rat neuronal cell line (PC12): evidence that they function as alpha/beta heterodimeric receptors for laminin and type IV collagen. *J Cell Biol* **107:**1241-1252.

True L.D. (1988) Quantitative immunohistochemistry: a new tool for surgical pathology? *Am J Clin Pathol* **90:**324-325.

UniGene Resources, National Center for Biotechnology Information, **http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/index.html**

van Gils A.P., Falke T.H., van Erkel A.R., Arndt J.W., Sandler M.P., van der Mey A.G., und Hoogma R.P. (1991) MR imaging and MIBG scintigraphy of pheochromocytomas and extraadrenal functioning paragangliomas. *Radiographics* **11:**37-57.

van Heerden J.A. (1982) First encounter with pheochromocytoma. *Am J Surg* **144:**277-279.

van Heerden J.A., Roland C.F., Carney J.A., Sheps S.G., und Grant C.S. (1990) Long-term evaluation following resection of apparently benign pheochromocytoma(s)/paraganglioma(s). *World J Surg* **14:**325-329.

van Heerden J.A., Sheps S.G., Hamberger B., Sheedy P.F., Poston J.G., und ReMine W.H. (1982) Pheochromocytoma: current status and changing trends. *Surgery* **91:**367-373.

Vargas H.I., Kavoussi L.R., Bartlett D.L., Wagner J.R., Venzon D.J., Fraker D.L., Alexander H.R., Linehan W.M., und Walther M.M. (1997) Laparoscopic adrenalectomy: a new standard of care. *Urology* **49:**673-678.

Vecchi A., Garlanda C., Lampugnani M.G., Resnati M., Matteucci C., Stoppacciaro A., Schnurch H., Risau W., Ruco L., und Mantovani A. (1994) Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol* **63:**247-254.

Velchik M.G., Alavi A., Kressel H.Y., und Engelman K. (1989) Localization of pheochromocytoma: MIGB, CT, and MRI correlation. *J Nucl.Med* **30:**328-336.

Vierhapper H. und Raber W. (1997) Die therapeutischen Möglichkeiten bei metastasiertem Phäochromozytom. *Zentralbl.Chir* **122:**494-497.

Walther M.M., Keiser H.R., und Linehan W.M. (1999) Pheochromocytoma: evaluation, diagnosis, and treatment. *World J Urol* **17:**35-39.

Wang D.S., Miura M., Demura H., und Sato K. (1997) Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinology* **138:**2953-2962.

Wang M. und Stearns M.E. (1991) Isolation and characterization of PC-3 human prostatic tumor sublines which preferentially metastasize to select organs in S.C.I.D. mice. *Differentiation* **48:**115-125.

Warren S. und Chute R.N. (1972) Pheochromocytoma. *Cancer* **29:**327-331.

Wei M.H., Popescu N.C., Lerman M.I., Merrill M.J., und Zimonjic D.B. (1996) Localization of the human vascular endothelial growth factor gene, VEGF, at chromosome 6p12. *Human Genetics* **97:**794-797.

Weidner N., Folkman J., Pozza F., Bevilacqua P., Allred E.N., Moore D.H., Meli S., und Gasparini G. (1992) Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **84:**1875-1887.

Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., und Folkman J. (1991) Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N.Engl.J Med* **324:**1-8.

Wieland D.M., Brown L.E., Tobes M.C., Rogers W.L., Marsh D.D., Mangner T.J., Swanson D.P., und Beierwaltes W.H. (1981) Imaging the primate adrenal medulla with and meta-iodobenzylguanidine: concise communication. *J Nucl.Med* **22:**358-364.

Wurtman R.J. und Axelrod J. (1966) Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. *J Biol Chem* **241:**2301-2305.

Wyszynska T., Cichocka E., Wieteska-Klimczak A., Jobs K., und Januszewicz P. (1992) A single pediatric center experience with 1025 children with hypertension. *Acta Paediatr* **81:**244-246.

Yi X., Mai L.C., Uyama M., und Yew D.T. (1998) Time-course expression of vascular endothelial growth factor as related to the development of the retinochoroidal vasculature in rats. *Exp Brain Res* **118:**155-160.

Yoshida H., Fujita S., Nishida M., und Iizuka T. (1999) Angiogenesis in the human temporomandibular joint studied by immunohistochemistry for CD34 antigen. *J Oral Pathol Med* **28:**289-292.

Yoshimoto T., Naruse M., Zeng Z., Nishikawa T., Kasajima T., Toma H., Yamamori S., Matsumoto H., Tanabe A., Naruse K., und Demura H. (1998) The relatively high frequency of p53 gene mutations in multiple and malignant phaeochromocytomas. *J Endocrinol* **159:**247-255.

Zielke A., Bresalier R.S., Siperstein A.E., Clark O.H., Rothmund M., und Duh Q.Y. (1998) A unique allogenic model of metastatic pheochromocytoma: PC12 rat pheochromocytoma xenografts to nude mice and establishment of metastases-derived PC12 variants. *Clin Exp Metastasis* **16:**341-352.

7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Tumor Angiogenese, modifiziert nach Harris 1997 16
Abbildung 2: Ablaufdiagramm VEGF-Auswertungsprogramm 40
Abbildung 3: Stadien der VEGF-Detektion und Auswertung. 43
Abbildung 4: Bestimmung der Gefäßoberflächendichte VSD 44
Abbildung 5: Mitosezählung im HPF (High Power Field, 400x) 47
Abbildung 6: Tumorzellthrombus eines PC12-Xenotransplantates 52
Abbildung 7:Anti-VEGF-Färbung einer Milz 52
Abbildung 8: Mitosen pro HPF bei Koinjektion mit EZM-Proteinen 54
Abbildung 9: Gefäßzeichnung in benignen und malignen HPCC 56
Abbildung 10: VEGF-Expression und VSD in humanen Phäochromozytomen 56
Abbildung 11: VEGF, VSD und Mitoserate der Maus Angiogenese Assays 60
Abbildung 12: PC12-Tumor mit und ohne Behandlung mit anti-VEGF-mAK 61
Abbildung 13: Ausschnitt eines Matrigelimplantats ohne PC12-Zellen 62
Abbildung 14: Invasionsfront am Rand eines PC12-Implantates 62

Tabelle 1: Häufigkeit klinischer Symptome beim Phäochromozytom 7
Tabelle 2: Angiogenese fördernde und hemmende Faktoren 14
Tabelle 3: Proteine der extrazellulären Matrix 26
Tabelle 4: Bestimmung des gesamt-VEGF 49
Tabelle 5: Proliferation der HUVEC Zellen im XTT-Assay 50
Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse bei Koinjektion mit EZM-Proteinen 53
Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der NGF-Tumore 55
Tabelle 8: VEGF-Expression und VSD in humanen Phäochromozytomen 57
Tabelle 9: Ergebnisse eigener Untersuchungen in humanen PCC 58
Tabelle 10: VEGF, VSD und Mitoserate der Maus Angiogenese Assays 60

8 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

APES ..... 3- Aminopropyltriethoxysilene
AR ..... Antigen Retrieval
CAM ..... cell adhesion molecule
CT ..... Computertomographie
DAB ..... 3,3'Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
EZM ..... Extrazellulärmatrix
Flk-1 ..... Fetal liver kinase 1
Flt-1 ..... fms-like tyrosine kinase
HPCC ..... humanes Phäochromozytom
HPF ..... high power field (400-fache Vergrößerung)
Ig ..... Immunglobulin
IgSF ..... Immunglobulin Superfamilie
IHC ..... Immunhistochemie
KDR ..... Kinase domain region
MIBG ..... Meta-iodo-benzylguanidin
MRT ..... Magnetresonanztomographie
NVES (microvessel number) ..... Zahl der Gefäße
NVES-MAX (maximum microvessel number) ..... maximale Zahl der Gefäße
OT ..... Objektträger
VSD (vascular surface density) ..... Gefäßoberflächendichte

9 Anhang

9.1 Quellcode des Programms zur digitalen Bildauswertung

9.1.1 Programmteil Start.Q5R

```
Repeat
    Gosub MENUE
    If (BUTTON=1)
        Chain (C:\VEGF\PROGRAMM\SCAN.Q5R)
    Endif
    If (BUTTON=2)
        DDE Initiate ("Excel","System" on channel #1, row char "z", column char "S")
        DDE Execute ("[open("C:\vegf\daten\Steuerng.xls",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
        DDE Terminate (channel #1)
        Chain (C:\VEGF\PROGRAMM\VEGFMAIN.Q5R)
    Endif
Until (BUTTON=10)

Subroutine MENUE
    Define Button (#1, "Scannen")
    Define Button (#2, "Auswerten")
    Define Button (#10, "Ende")
    Pause (Buttons, "VEGF")
Return
```

9.1.2 Programmteil Scan.Q5R

```
DDE Initiate ("Excel","System" on channel #1, row char "z", column char "S")
DDE Execute ("[open("C:\vegf\daten\Steuerng.xls",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
DDE Terminate (channel #1)
Gosub INITIALISIEREN
erste Präparatnummer einlesen
Gosub STARTPREP
Repeat
    Gosub MENUE
    If (BUTTON=1)
        Gosub SCANNEN
    Endif
    If (BUTTON=2)
        Anzahl der Bilder in einer neuen Excel-Tabelle speichern
        Gosub DATENSPEICHERN
        BILD = 0
        PREP = PREP+1
        BUTTON = 1
    Endif
Until (BUTTON=10)
Anzahl der Bilder in einer neuen Excel-Tabelle speichern
Gosub DATENSPEICHERN
DDE Initiate ("Excel","System" on channel #1, row char "z", column char "S")
```

```
DDE Execute ("[close("C:\vegf\daten\Steuerng.xls",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
DDE Terminate (channel #1)
Chain (C:\VEGF\PROGRAMM\START.Q5R)

Subroutine INITIALISIEREN
    Configure (Image Store 512 x 512, Grey Images 26, Binaries 16, Shading, Colour)
    Measure frame (x 0, y 0, Width 512, Height 512)
    Display (Colour0 (on), frames (on,on), planes (off,off,off,off,off,off), lut 0, x 0, y 0, z 1)
    BILD = 0
    BUTTON = 1
Return

Subroutine STARTPREP
    Repeat
        PauseText ("erste Präparatenummer eingeben")
        Input (PREP)
    Until (PREP<>0)
Return

Subroutine MENUE
    Define Button (#1, "neues Bild")
    Define Button (#2, "neues Präparat")
    Define Button (#10, "Ende")
    Pause (Buttons, "zu scannen:")
Return

Subroutine SCANNEN
    BILD = BILD+1
    Live image (into Colour0)
    PauseText ("Bildausschnitt einstellen und RETURN drücken")
    Pause (No dialog)
    Bild speichern
    Acquire (into Colour0)
    ACQOUTPUT = COLOUR0
    ACQFILE$ = "C:\VEGF\bilder\"+STR$(PREP)+"V"+STR$(BILD)+".BMP"
    Write image (from ACQOUTPUT into file ACQFILE$, type BMP)
Return

Subroutine DATENSPEICHERN
    Steuerkanal zu Excel öffnen
    DDE Initiate ("Excel","System" on channel #1, row char "z", column char "S")
    DDE Initiate ("Excel","Dateiname" on channel #2, row char "z", column char "S")
    Daten.xls" öffnen und aktivieren
    DDE Send ("Daten.xls" to channel #2, item name "z1s2")
    DDE Execute ("[run("Steuerng.xls!Öffnen",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
    Kanal zu "Daten.xls" öffnen
    DDE Initiate ("Excel", "Dateiname" on channel #3, row char "z", column char "S")
    Bildname übertragen
    BILDNAME$ = "Daten"+STR$(PREP)+".xls"
    DDE Send (BILDNAME$ to channel #3, item name "z1s2")
    Anzahl der Bilder übertragen
    DDE Send (BILD, 0 digits after '.' to channel #3, item name "z3s2")
```

```
    DDE Terminate (channel #3)
    DatenXX.xls" speichern und schließen
    DDE Execute ("[run("Steuerng.xls!SpeichernUnter",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
    DDE Execute ("[run("Steuerng.xls!Schliessen",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
    Kanal zu Excel schließen
    DDE Terminate (channel #1)
    DDE Terminate (channel #2)
Return
```

9.1.3 Programmteil VEGFmain.Q5R

```
Select Lens (Transmitted, 1.6x, mag changer 0,63x)
Configure (Image Store 512 x 512, Grey Images 27, Binaries 16, Shading, Colour)
Measure frame (x 0, y 0, Width 512, Height 512)
Display (Colour0 (on), frames (on,on), planes (on,off,off,off,off,off), lut 0, x 0, y 0, z 1)
Repeat
    Wertebereich abfragen
    Gosub NUMMER1
    Gosub NUMMER2
    Wertebereich prüfen
    Gosub WERTEBEREICH
Until (ANZ<>0)
Parameter speichern
PNUMMER = PNUMMER1
Gosub SAVEPARAMS
Programm zur VEGF-Messung starten
Chain (C:\VEGF\PROGRAMM\VEGF.Q5R)

Subroutine NUMMER1
    Repeat
        PauseText ("erste Präparatenummer eingeben")
        Input (PNUMMER1)
    Until (PNUMMER1>0)
Return

Subroutine NUMMER2
    Repeat
        PauseText ("letzte Präparatenummer eingeben")
        Input (PNUMMER2)
    Until (PNUMMER2>=PNUMMER1)
Return

Subroutine WERTEBEREICH
    Kanal zur Steuermappe in Excel öffnen
    DDE Initiate ("Excel", "System" on channel #1, row char "z", column char "S")
    DDE Initiate ("Excel", "Dateiname" on channel #2, row char "z", column char "S")
    prüfen, ob Präparat eingescannt ist
    For (PNUMMER = PNUMMER1 to PNUMMER2, step 1)
        Gosub ANZAHL
        If (ANZ=0)
            Setup Output Window ("Routine Output", Move to x 48, y 224, w 480, h 64)
            TEXT$ = "Präparat "+STR$(PNUMMER)+" ist noch nicht eingescannt, neuen Wertebereich eingeben!"
```

```
            Display (TEXT$, no tab follows)
            PauseText ("Präparat noch nicht eingescannt, neuen Wertebereich eingeben!")
            Pause (No dialog)
            Setup Output Window ("Routine Output", Close)
            PNUMMER = PNUMMER2
        Else
            DDE Execute ("[run("Steuerng.xls!Schliessen",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
        Endif
    Next (PNUMMER)
    Steuerverbindung zu Excel beenden
    DDE Terminate (channel #1)
    DDE Terminate (channel #2)
Return

Subroutine ANZAHL
    DATEINAME$ = "Daten"+STR$(PNUMMER)+".xls"
    DDE Send (DATEINAME$ to channel #2, item name "z1s2")
    DDE Execute ("[run("Steuerng.xls!Öffnen",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
    DDE Initiate ("Excel", "Dateiname" on channel #6, row char "z", column char "S")
    DDE Read (ANZ, from channel #6, item name "z3s2", timeout period 10 sec)
    DDE Terminate (channel #6)
Return

Subroutine SAVEPARAMS
    Open File (C:\VEGF\DATEN\PARAMETR.Q5D, channel #7)
    File (PNUMMER, channel #7, 0 digits after '.')
    File (PNUMMER1, channel #7, 0 digits after '.')
    File (PNUMMER2, channel #7, 0 digits after '.')
    Close File (channel #7)
Return
```

9.1.4 Programmteil VEGF.Q5R

```
Configure (Image Store 512 x 512, Grey Images 27, Binaries 16, Shading, Colour)
Measure frame (x 0,  y 0,  Width 512,  Height 512)
Display (Colour0 (on), frames (on,on), planes (on,off,off,off,off,off), lut 0, x 0, y 0, z 1)
Parameter einlesen
Gosub LOADPARAMS
If (PNUMMER <= PNUMMER2)
    Bilder einlesen und nach VEGF bearbeiten
    Anzahl der Einzelbilder ermitteln
    DDE Initiate ("Excel", "System" on channel #1, row char "z", column char "S")
    DDE Initiate ("Excel", "Dateiname" on channel #2, row char "z", column char "S")
    Gosub ANZAHL
    ACQOUTPUT = 0
    FIELDS = ANZ
    For (FIELD = 1 to FIELDS, step 1)
        ACQFILE$ = "C:\VEGF\BILDER\"+STR$(PNUMMER)+"v"+STR$(FIELD)+".BMP"
        Acquire (into Colour0)
        Read image (from file ACQFILE$ into ACQOUTPUT, type BMP)
        Gosub DETEKTVEGF
    Next (FIELD)
```

```
    Gosub DDEINI
    DDE Send Field Results (channel #3, item name "z1s1:z100s100")
    Gosub DDEEND
    DDE Execute ("[run("Steuerng.xls!speichern",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
    DDE Execute ("[run("Steuerng.xls!Schliessen",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
    Steuerverbindung zu Excel beenden
    DDE Terminate (channel #1)
    DDE Terminate (channel #2)
    Parameter speichern
    PNUMMER = PNUMMER+1
    Gosub SAVEPARAMS
    Chain (C:\VEGF\PROGRAMM\VEGF.Q5R)
Else
PNUMMER = PNUMMER1
Parameter speichern
Gosub SAVEPARAMS
Programm zur Ermittlung der Gewebegröße starten
Chain (C:\VEGF\PROGRAMM\GEWEBE.Q5R)
Endif

Subroutine LOADPARAMS
    Open File (C:\VEGF\DATEN\PARAMETR.Q5D, channel #1)
    File Read (PNUMMER, channel #1)
    File Read (PNUMMER1, channel #1)
    File Read (PNUMMER2, channel #1)
    Close File (channel #1)
Return

Subroutine ANZAHL
    DATEINAME$ = "Daten"+STR$(PNUMMER)+".xls"
    DDE Send (DATEINAME$ to channel #2, item name "z1s2")
    DDE Execute ("[run("Steuerng.xls!Öffnen",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
    DDE Initiate ("Excel", "Dateiname" on channel #6, row char "z", column char "S")
    DDE Read (ANZ, from channel #6, item name "z3s2", timeout period 10 sec)
    DDE Terminate (channel #6)
Return

Subroutine DETEKTVEGF
    VEGF messen als Fläche
    Colour Detect [Pause] (YUV: 154-241, 105-136, 130-159, from Colour0 into Binary0)
    Measure field (plane Binary0)
    Selected parameters: Area, Area Fract, Area%
Return

Subroutine DDEINI
    DDE Initiate ("Excel", "Fläche" on channel #3, row char "z", column char "S")
    DDE Initiate ("Excel", "Dateiname" on channel #6, row char "z", column char "S")
Return

Subroutine DDEEND
    DDE Terminate (channel #3)
    DDE Terminate (channel #6)
```

```
Return

Subroutine SAVEPARAMS
    Open File (C:\VEGF\DATEN\PARAMETR.Q5D, channel #7)
    File (PNUMMER, channel #7, 0 digits after '.')
    File (PNUMMER1, channel #7, 0 digits after '.')
    File (PNUMMER2, channel #7, 0 digits after '.')
    Close File ( channel #7)
Return
```

9.1.5 Programmteil Gewebe.Q5R

```
Measure frame (x 0, y 0, Width 512, Height 512)
Parameter einlesen
Gosub LOADPARAMS
If (PNUMMER <= PNUMMER2)
    Steuerverbindung zu Excel öffnen
    DDE Initiate ("Excel", "System" on channel #1, row char "z", column char "S")
    DDE Initiate ("Excel", "Dateiname" on channel #2, row char "z", column char "S")
    Anzahl der Einzelbilder ermitteln
    Gosub ANZAHL
    ACQOUTPUT = 0
    FIELDS = ANZ
    Bilder einlesen Gewebe detektieren
    For (FIELD = 1 to FIELDS, step 1)
        ACQFILE$ = "C:\VEGF\BILDER\"+STR$(PNUMMER)+"v"+STR$(FIELD)+".BMP"
        Acquire (into Colour0)
        Read image (from file ACQFILE$ into ACQOUTPUT, type BMP)
        Gosub DETEKTGEWEBE
    Next (FIELD)
    Resultate speichern
    Gosub DDEINI
    DDE Send Field Results (channel #4, item name "z1s1:z100s100")
    Gosub DDEEND
    DDE Execute ("[run("Steuerng.xls!speichern",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
    DDE Execute ("[run("Steuerng.xls!Schliessen",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
    Steuerverbindung zu Excel beenden
    DDE Terminate (channel #1)
    DDE Terminate (channel #2)
    Parameter speichern
    PNUMMER = PNUMMER+1
    Gosub SAVEPARAMS
    Chain (C:\VEGF\PROGRAMM\GEWEBE.Q5R)
Else
    PNUMMER = 1
    Parameter speichern
    Gosub SAVEPARAMS
    DDE Initiate ("Excel","System" on channel #1, row char "z", column char "S")
    DDE Execute ("[close("C:\vegf\daten\Steuerng.xls",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
    DDE Terminate (channel #1)
    Startprogramm aufrufen
    Chain (C:\VEGF\PROGRAMM\START.Q5R)
```

```
Endif

Subroutine LOADPARAMS
    Open File (C:\VEGF\DATEN\PARAMETR.Q5D, channel #1)
    File Read (PNUMMER, channel #1)
    File Read (PNUMMER1, channel #1)
    File Read (PNUMMER2, channel #1)
    Close File (channel #1)
Return

Subroutine ANZAHL
    DATEINAME$ = "Daten"+STR$(PNUMMER)+".xls"
    DDE Send (DATEINAME$ to channel #2, item name "z1s2")
    DDE Execute ("[run("Steuerng.xls!Öffnen",false)]" on channel #1, timeout period 10 sec)
    DDE Initiate ("Excel", "Dateiname" on channel #6, row char "z", column char "S")
    DDE Read (ANZ, from channel #6, item name "z3s2", timeout period 10 sec)
    DDE Terminate (channel #6)
Return

Subroutine DETEKTGEWEBE
    Hintergrund markieren
    Colour Detect [Pause] (YUV: 216-255, 124-146, 104-125, from Colour0 into Binary0)
    Hintergrund invertieren ergibt Gewebe
    Binary Logical (copy Binary0, inverted to Binary0)
    Gewebe als Fläche messen
    Measure field (plane Binary0)
    Selected parameters: Area, Area Fract, Area%
Return

Subroutine DDEINI
    DDE Initiate ("Excel", "Gewebe" on channel #4, row char "z", column char "S")
    DDE Initiate ("Excel", "Dateiname" on channel #6, row char "z", column char "S")
Return

Subroutine DDEEND
    DDE Terminate (channel #4)
    DDE Terminate (channel #6)
Return

Subroutine SAVEPARAMS
    Open File (C:\VEGF\DATEN\PARAMETR.Q5D, channel #7)
    File (PNUMMER, channel #7, 0 digits after '.')
    File (PNUMMER1, channel #7, 0 digits after '.')
    File (PNUMMER2, channel #7, 0 digits after '.')
    Close File (channel #7)
Return
```

9.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Amon, Arnold, Aumüller, Basler, Bauer, Baum, Effendy, Engel, Engenhardt-Cabilic, Eschenbach, Feuser, Fuhrmann, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Gröne, Habermehl, Happle, Havemann, Huffmann, Josef, Kern, Kleinsasser, Klein, Klenk, Klose, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lange, Lennartz, Leppek, Lorenz, Maisch, Meyer-Breiting, Mennel, Oertel, Pfab, Pohlen, Remschmidt, Renze, Riedmiller, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schmitz-Moormann, Schulz, Schüffel, Seifart, Seitz, Seyberth, Thomas, Unsicker, Vohlend, Voigt, von Wichert, Zimmermann

9.3 Danksagung

Mein Dank richtet sich in erster Linie an Herrn Prof. Dr. med. M. Rothmund, Direktor der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Philipps-Universität Marburg, für die Überlassung des Themas.

Ebenso danke ich meinem Betreuer, Prof. Zielke, für die Überlassung einiger Präparate aus seinen eigenen Versuchen, seine Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und seine Hilfe beim strukturieren und überarbeiten dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die meine tage- und nächtelange Arbeit im Labor und zu Hause mit großem Verständnis und Interesse begleitet hat.

Für die erste Einarbeitung in immunhistochemische Methoden bin ich der früheren Mitarbeiterin im Labor, Frau Schlosser, sehr verbunden. Später im Verlauf meiner Labortätigkeit stand mir Frau Bonorden stets mit Rat und Tat hilfreich zur Seite, wenn es darum ging, neue Präparate zu fixieren und in Paraffin einzubetten.

Speziell danken möchte ich dem Chefarzt der Chirurgischen Universitätsklinik Münster, Herrn Professor Senninger und seinem Mitarbeiter, Dr. Colombo-Benkmann, für die Überlassung der humanen Präparate und die uneingeschränkte Unterstützung bei der Durchsicht der Operationsbücher.
In diesem Zusammenhang möchte ich die Hilfe meiner Schwester hervorheben, die mir an vielen langen Tagen bei der Durchsicht der OP-Bücher geholfen hat.

Für die Unterstützung bei der Färbung der humanen Präparate bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Barth, leitender Oberarzt der Pathologie, und seiner Mitarbeiterin Frau Koch.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Frau Dr. Wild, die unermüdlich die verschiedenen Versionen dieser Arbeit gegengelesen hat, und in schwierigen Zeiten, es immer wieder verstanden hat, durch stete Motivation zum Gelingen beizutragen.

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Neoangiogenese in einem *in vitro* und *in vivo* Tumormodell
des Phäochromozytoms“

in der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie an der Philipps-Universität Marburg unter der geschäftsführenden Leitung von Herrn Prof. Dr. med. M. Rothmund ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

M. Middeke, S. Hoffmann, I. Hassan, A. Wunderlich, L.C. Hofbauer und A. Zielke: In vitro and in vivo angiogenesis in PC12 pheochromocytoma cells is mediated by vascular endothelial growth factor.
Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2002 Nov;110:386-92

A. Zielke, M. Middeke, S. Hoffmann, M. Colombo-Benkmann. P. Barth, I. Hassan, A. Wunderlich, L.C. Hofbauer und Q.-Y. Duh: VEGF mediated angiogenesis in human pheochromocytomas is associated with malignant phenotype and is inhibited by neutralizing anti-VEGF antibodies in xenografts of PC12 pheochromocytomas to nude mice.
Surgery. 2002 Dec;132:1056-63

Marburg, den 8. Februar 2007