Aus dem Institut für Anatomie I Zentrum für Experimentelle Medizin Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Ehem. Direktor: Professor Dr. med. A. F. Holstein Direktorin: Professor Dr. med. G. Rune

Strukturelle Stabilisierung der Tumorblutgefäße und ihre Auswirkung beim Tumorwachstum am Beispiel vom Rhabdomyosarkom der Ratte

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Sema Sandra Sevinc aus Herford Hamburg 2006 Meinen Eltern und Helin Vian

In Liebe

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 23.02.2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. S. Ergün

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. W. Fiedler

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

<u>Inhaltsverzeichnis</u>

1	ZUSAMMENFASSUNG5	
2	EINLEITUNG7	
	2.1 Angiogenese72.2 Die Bedeutung der Angiogenese für das Tumorwachstum.82.3 Regulation der Angiogenese.82.4 Strukturelle Gefäßstabilisierung.92.5 Angiogene Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren.112.5.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).112.5.2 Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2).152.5.2.1 Der FGF-2-Rezeptor162.5.3 Angiopoietine172.5.4 Angiopoietin-Rezeptor Tie-2 (Tyrosine Kinase with Immunoglobulin and Epidermal Growth Factor Homology Domain).18	
	2.5.5 α·β ₃ -Integrin202.5.6 Laminin202.5.7 Endostatin212.5.8 Vascular Endothelial Cadherin222.6 Arbeitshypothese und Zielsetzung24	
3	MATERIAL UND METHODEN25	
	3.1 Das Tumormodell253.2 Tumorwirtssystem263.3 Tumorimplantation273.4 Tumorvolumenbestimmung293.5 Aufarbeitung von Gewebe293.6 Materialien und ihre Aufarbeitung313.7 Immunhistochemie: Methodik und Antikörper35	
4	ERGEBNISSE	
	 4.1 Histologie und Organisation des Rhabdomyosarkoms	
	4.7 Integration von perivaskulären Zellen (Perizyten oder glatten Muskelzellen) in die Wand der Tumorgefäße anhand des Nachweises von alpha-Smooth-Muscle-Actin (α-SMA)	

5	DISKUSSION	56
	5.1 In der Tumorumgebung des Rhabdomyosarkoms zeigt das Gefäßbe eine normale Hierarchie	ett 56
	5.2 Die Tumorrandzone weist stark vernetzte und strukturell instabile Blutgefäße auf	58
	5.3 Blutgeralse der intermediaren Tumorzone weisen eine neterogene Organisation auf 5.4 Die Stabilisierung der Tumorgefäße resultiert in ausgedebaten	60
	nekrotischen Gewebearealen im Tumorzentrum	62
6	LITERATURVERZEICHNIS	66
7	DANKSAGUNG	78
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	79
9	LEBENSLAUF	81
1() EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	82

1 Zusammenfassung

Tumorangiogenese beschreibt den Prozess der de novo Gefäßentstehung beim Tumorwachstum. Ohne Gefäßwachstum können Tumore eine Größe von wenigen Millimetern nicht überschreiten. Daher kommt es beim Tumorwachstum zu Gefäßveränderungen entsprechend der Tumorentität, der Wachstumsgeschwindigkeit und der Malignität. Wie die einzelnen Veränderungen strukturell aussehen und in welcher Relation dies zum Tumorwachstum steht und welche Faktoren hierbei eine Rolle spielen war bis zur Entstehung dieser Arbeit noch unzureichend bekannt. Zur genaueren Untersuchung der morphologischen Prozesse der Gefäßentstehung, -reifung und schließlich der regression in verschiedenen Tumorwachstumsphasen wurde hier das Rhabdomyosarkommodell der Ratte genommen, welches im Institut für Strahlenbiologie und Biophysik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Zywietz bereits etabliert war. Die entnommenen soliden Tumore wurden morphologisch mittels der Lichtmikroskopie, der Semidünnschnitte und der Elektronenmikroskopie, sowie der Immunhistochemie für Angiogenesefaktoren wie Angiopoietin-1 und -2 sowie deren Rezeptor Tie-2, für Adhäsionsmoleküle wie Integrin, für Basalmembranproteine wie Laminin und zur Darstellung peri-endothelialer Zellen für alpha-Smooth-Muscle-Actin, näher untersucht. Dabei zeigte sich, dass zur Beurteilung und unterschiedlichen Charakterisierung der strukturellen Gefäß-Wachstumsphasen eine zonale Einteilung des Tumors in vier verschiedene Tumorzonen (Tumorzentrum, Intermediärzone, Tumorrand und Tumorumgebung) sinnvoll war. Die Untersuchungen ergaben, dass es

im Tumorzentrum zu einer Stabilisierung der Tumorgefäße kommt, indem die inter-endothelialen Kontaktzonen stabilisiert und periendotheliale Zellen in die Basalmembran der Gefäßwand mehr oder weniger regulär integriert werden. Dabei geht die Gefäß-Permeabilität zurück, kleinere und unreife Gefäße werden regressiv und folglich kommt es zu einer Abnahme der Gefäßdichte. Bei zu schnellem Tumorwachstum kommt es zu Tumorzellnekrosen im Tumorzentrum. In der Tumorumgebung des Rhabdomyosarkoms zeigt das Gefäßbett eine normale Hierarchie. Die Tumorrandzone weist vernetzte und strukturell instabile Blutgefäße auf. Im Gegensatz hierzu weist die Intermediärzone eine heterogene Organisation auf, bestehend aus teilweise stabilisierten und teils noch instabilen Blutgefäßen.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass es auch beim Tumorwachstum zu einer partiellen Stabilisierung der Tumorgefäße kommt und dies offensichtlich mit einer Nekrose des Tumorgewebes einhergeht. Folglich könnte dieser Prozess im Rahmen der anti-angiogenetischen Tumortherapie von Bedeutung sein, indem durch therapeutische Beschleunigung der Gefäßwandstabilisierung der Tumor zum Aushungern gezwungen wird.

2 Einleitung

2.1 Angiogenese

Angiogenese wird beschrieben als Neubildung von Blutgefäßen aus bereits existierenden Gefäßen. Sie ist zu unterscheiden von der Vaskulogenese (Wagner et al., 1994), die als *de novo* Entstehung eines primären Gefäßplexus während der Embryogenese definiert ist (Folkman, 1991). Hierbei differenzieren sich die Endothelzellen aus mulitpotenten, mesenchymalen Vorläuferzellen, die auch Angioblasten genannt werden. Nach neuesten Erkenntnissen können auch postnatal zirkulierende hämatopoetische Vorläuferzellen zur Gefäßneubildung führen. Dies wird als postnatale Vaskulogenese bezeichnet (Gehling et al., 2000; Rafii et al., 2002; Asahara et al., 2004). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass endotheliale Vorläuferzellen auch in der Wand der Blutgefäße residieren, die in die Aussprossung neuer Blutgefäße involviert sind (Zengin et al., 2006).

Die Angiogenese findet physiologisch in den weiblichen Reproduktionsorganen (Plazenta, Uterus und Ovar) und bei der Wundheilung statt. Im adulten Organismus sind Blutgefäße weitgehend ruhend ("quiescent") (Hobson et al., 1984; Bischoff, 1995; Hanahan et al., 1996). Bei pathologischen Veränderungen, wie rheumatoider Arthritis, diabetischer Retinopathie, Psoriasis, Tumorwachstum und ihrer Metastasen sind Blutgefäße angiogenetisch aktiv (Folkman, 1995).

2.2 Die Bedeutung der Angiogenese für das Tumorwachstum

Die Bedeutung der Angiogenese für das Wachstum solider Tumoren wurde 1971 von Professor Folkman beschrieben (Folkman, 1971). Der Tumor nimmt eine Sonderrolle in der pathologischen Angiogenese ein, denn wachsende Tumore und ihre Metastasen benötigen permanent neue Blutgefäße, um die Versorgung mit Nahrung, Sauerstoff und vor allem dem Abtransport von toxischen Metaboliten aufrecht zu erhalten (Holmgren et al., 1995). Ist dies nicht gegeben, wird der Tumor nekrotisch und zerfällt. Ohne Blutgefäße kann der Tumor nicht größer als 1-2 mm³ werden und somit auch keinen Schaden anrichten. Ferner ist die Tumorneoangiogenese eine wesentliche Voraussetzung für eine hämatogene Metastasierung des Primärtumors.

2.3 Regulation der Angiogenese

Der Vorgang der Angiogenese besteht aus einer Serie von Einzelschritten, die in einer bestimmten auf einander abgestimmten Reihenfolge ablaufen. Der Prozess der Angiogenese wird durch Destabilisierung der bestehenden, stabilen und ruhenden Gefäße initiiert. Damit neue Kapillaren im Rahmen der Angiogenese aus bestehenden Gefäßen aussprossen können, müssen vor allem die Gefäßwandzellen, bestehend aus Perizyten bei Kapillaren oder glatten Muskelzellen bei größeren Gefäßen, zunächst von der Gefäßwand losgelöst werden (Hanahan, 1997). Nach Lockerung der interzellulären Kontakte bewirken die durch angiogene Reize aktivierten Endothelzellen dann durch Sekretion von Kollagenasen und Matrix-Metalloproteinasen einen lokalen Abbau der Basalmembran der Gefäßwand und der extrazellulären

Matrix (Migantti et al., 1993; Moses, 1997). Die Endothelzellen wandern in den perivaskulären Raum aus, proliferieren und bilden dann Endothelzellsprosse.

Diese Aktivierung der Angiogenese erfolgt im Wesentlichen über den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und seinem Rezeptor VEGFR-2. Durch erhöhte Sekretion von VEGF, zum Beispiel durch Tumorzellen, kommt es zur Auflösung der extrazellulären Matrix sowie zur Proliferation und Migration von Endothelzellen. VEGF ist einer der wirksamsten angiogenen Wachstumsfaktoren.

Weiterhin sind für die Integration der Endothelzellen in die Extrazellulärmatrix und für die inter-endotheliale Adhäsion Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel Integrine und Cadherine, unabdingbar (Gumbiner, 1996; Dejana et al., 1999 und 2000).

Im nächsten Schritt kommt es zur Adhärenz der Endothelzellen untereinander, die sich zu Tubes (Gefäßrohre) formieren und später ein primitives Gefäßnetz bilden. Zur weiteren Gefäßreifung ("vascular maturation") erfolgt die Integration von Perizyten bei kleinen Kapillaren und von glatten Muskelzellen bei größeren Gefäßen. Folglich werden die Gefäße strukturell stabilisiert und in einen Ruhezustand überführt (Bischoff et al., 1995; Ergün et al., 2005).

2.4 Strukturelle Gefäßstabilisierung

Das ausgewachsene Gefäßsystem besteht aus großen Gefäßen, welches sich durch Aufzweigungen in immer kleiner werdende Äste aufteilt und schließlich mit der Erreichung des Zustandes einer Kapillare den

Prozess der Vernetzung terminiert. Ein heranwachsendes Blutgefäß besteht aus einem endothelialem Tube, welches sich später in eine Vene oder in eine Arterie differenziert (Jain, 2003). Neue Erkenntnisse lassen vermuten, dass Endothelzellen bei der Differenzierung bereits determiniert werden, ob sie arteriell oder venös werden (Torres-Vazquez et al., 2003). Kapillaren bestehen aus Endothelzellen, die eine Basalmembran besitzen. Diese Basalmembran umschließt in der Regel auch Perizyten. Je nach Gewebezugehörigkeit (Muskel, Niere, Leber und Hirn) sind die mikrovaskulären Endothelzellschichten kontinuierlich oder nicht kontinuierlich, wobei Letzteres fenestriert oder mit Poren versehen ist. Arteriolen und Venulen besitzen zusätzlich glatte Muskelzellen. Insgesamt sind diese Gefäße in der Zirkumferenz gut organisiert. Glatte Muskelzellen der Gefäßwand sind dicht gepackt und eng mit den Endothelzellen verbunden. Die Wand größerer Gefäße ist in drei Schichten aufgebaut. Sie ist zusammengesetzt aus der Intima, bestehend aus den Endothelzellen, der Media, bestehend aus glatten Muskelzellen, einer Adventitia, bestehend aus Fibroblasten, der Extrazellulärmatrix und einer elastischen Lamina. Die Blut- und Nährstoffversorgung der Intima und Teile der Media erfolgt durch Diffusion über das Gefäßlumen. Die Adventitia und die äußere Zone der Tunica Media werden durch gefäßwandeigene Blutgefäße (Vasa vasorum) versorgt. Das Zellwachstum der Endothelzellen hängt mit seiner Zellstruktur zusammen (Folkman und Haudenschild, 1980). Mechanistische Kräfte und Signalkaskaden aktivieren Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone. Zum Beispiel werden proangiogenetische Faktoren, wie VEGF, in der Extrazellulärmatrix an Hepararan-Sulfate gebunden.

Durch Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen, Heparinasen und Plasmin kommt es zur Reorganisation der Extrazellulärmatrix und schließlich zu einer Freisetzung von VEGF aus der Matrix (Keyt et al., 1996).

2.5 Angiogene Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren

2.5.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF-A (auch nur VEGF genannt) ist ein homodimeres Glykoprotein mit struktureller Homologie zum Platelet-derived Growth Factor (PDGF). Zudem ist VEGF auch in der Lage, die Gefäßpermeabilität zu steigern, weshalb er auch initial als Vascular Permeability Factor (VPF) genannt wurde (Senger et al., 1983; Leung et al., 1989; Ferrara et al., 1989; Gospodarowicz, 1989). VEGF wirkt im adulten Organismus in erster Linie über Permeabilitätsmodulation reifer Endothelzellen in Blutgefäßen ohne endotheliale Proliferationstendenz (Breier et al., 2002). Ebenfalls ist bekannt, dass der permeabilitätssteigernde Effekt von VEGF durch Lockerung der inter-endothelialen Kontakte einerseits und durch Induktion zur Fenestrierung von Venen- und Kapilarendothel andererseits, bedingt ist (Dvorak et al., 1995; Roberts und Palade, 1995; Ergun et al., 1997). VEGF steigert über 50.000-fach stärker die Gefäßpermeabilität als Histamin (Senger et al., 1986 und 1990).

Die VEGF-Familie wurde bereits in mehreren Übersichtsarbeiten beschrieben (Klagsbrun und D'Amore, 1996; Achen und Stacker, 1998; Neufeld et al., 1999; Veikkola und Alitalo, 1999; Ferrara et al., 2003; Tammela et al., 2005). Verschiedene mRNA-Splicevarianten tragen zur

Komplexität dieser Familie bei (Houck et al., 1991; Baldwin et al., 2001).

Es existieren vier VEGF Isoformen mit 121, 165, 189 und 206 Aminosäuren (Tischer et al., 1991). VEGF wird von verschiedenen normalen und entarteten Tumorzellen sezerniert. VEGF wurde später als endothelspezifisches Mitogen und als Angiogenesefaktor charakterisiert (Connolly et al., 1989). Er beeinflusst sowohl die Proliferation als auch die Motilität und somit die Migration der Endothelzellen sowie die endotheliale Tubeformierung (Yoshi-da et al., 1996).

Schon während der Embryonalentwicklung spielt VEGF eine so zentrale Rolle für die Gefäßentwicklung, dass bereits die Ausschaltung eines Allels des VEGF-Gens bei Mäusen zu letalen vaskulären Fehlbildungen führt (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Die wichtigste regulatorische Funktion von VEGF für die Angiogenese beruht auf einer mehrfachen parakrinen Beeinflussung von Endothelzellen (Connolly et al., 1989; Yoshida et al., 1996), während ihre Apoptose gehemmt wird (Watanabe und Dvorak, 1997; Gerber et al., 1998; Gupta et al., 1999). Die Induktion der VEGF-Expression in verschiedensten Zelltypen erfolgt unter hypoxischen Bedingungen. Dies reguliert die Angiogenese dahingehend, dass es zur ausreichenden Versorgung und Sicherstellung aller Gewebe kommt (Detmar et al., 1997; Marti und Risau, 1998). Bei pathologischen Prozessen, wie zum Beispiel Tumoren, kommt es durch schnelles Tumorwachstum zu einer lokalen Hypoxie. Da das für VEGF kodierende Gen zu den unter hypoxischen Bedingungen durch HIF-1 α , -2 α , -3 α (Hypoxia Inducible Factor) hochregulierten Genen (Pugh und Ratcliffe, 2003) gehört, vermutet man eine Ak-

tivierung der Angiogenese mittels Hochregulierung von VEGF durch HIF-1 α (Semenza, 2003). Ebenso wird die Angiogenese während der Wundheilung und im adulten normalen Organismus maßgeblich durch VEGF beeinflusst (Brown et al., 1992; Breier et al., 1992).

Wie oben beschrieben, spielt VEGF eine entscheidende Rolle im Rahmen pathologischer Angiogenese. Die zentrale Bedeutung dieses Faktors wird durch eine erhöhte VEGF-Expression in zahlreichen Tumorzelllinien verdeutlicht (Ferrara und Keyt, 1997).

Endogene angiogenetische und antiangiogenetische Faktoren agieren unter normalen Bedingungen im Gleichgewicht. Wenn diese Balance zugunsten der Aktivatoren verschoben wird, kommt es zum sogenannten "angiogenen switch" (Folkman, 1995; Hanahan und Folkman, 1996) und die Angiogenese wird initiiert.

2.5.1.1 VEGF-Rezeptoren

VEGF entfaltet seine Wirkung durch Interaktion mit den VEGF-Rezeptoren. Diese gehören zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Auf Grund ihrer intrazellulär gelegenen Tyrosinkinase-Domäne werden sie der PDGF-Rezeptor-Familie zugerechnet. In ihrer extrazytoplasmatischen Domäne besitzen sie sieben Immunglobulin-ähnliche Domänen (Neufeld et al., 1999, Veikkola und Alitalo, 1999). Bei Ligandenbindung an die Rezeptoren VEGFR-1 (Fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1) und VEGFR-2 (Kinase-insert Domain Receptor, KDR, beim Menschen und Fetal liver kinase, Flk-1, bei der Maus), kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung der Rezeptoren (Barleon et al., 1997, Shibuya et al., 1999).

Ein weiterer Rezeptor, der insbesondere VEGF-C und –D bindet, ist VEGFR-3 (Flt-4), welcher zur selben Rezeptorfamilie gehört.

Die Annahme, dass die VEGF-Rezeptoren nur von Endothelzellen exprimiert werden, wurde inzwischen durch mehrere Berichte widerlegt (Millauer et al., 1993; Quinn et al., 1993). Folgende, nicht endotheliale Zellen exprimieren mindestens einen oder beide VEGF-Rezeptoren. Hierzu gehören Monozyten, glatte Muskelzellen des Uterus, Stromazellen aus Hämangiomen, hämatopoetische Zellen, Leydigzellen des Hodens, Haarwurzelzellen und auch einige Tumorzellen (Katoh et al., 1995; Barleon et al., 1996; Lachgar et al., 1996; Brown et al., 1997; Ergün et al., 1997; Herold-Mende et al., 1999 a und 1999 b).

Neben der Angiogenese wird auch die Lymphangiogenese maßgeblich durch die Faktoren der VEGF-Familie beeinflusst. Dieser Prozess wird im Wesentlichen mit Hilfe von VEGF-C und -D reguliert (Karkkainen et al., 2002; Stacker et al., 2002).

Es ist bekannt, dass VEGFR-1 und -2 für Differenzierung der Endothelzellen aus den Hämangioblasten (Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995; Asahara und Kavamoto, 2004) und die darauf folgende Formierung endothelialer Gefäßrohre unverzichtbar sind. Diese Erkenntnis ließ sich durch Analysen an VEGF-Rezeptor-Knockout-Mäusen eindeutig belegen. Der VEGFR-2 beeinflusst die angiogenen und mitogenen Effekte an Endothelzellen und unterliegt selber einer Autoregulation. VEGF, VEGF-C und –D führen zu einer Hochregulierung von VEGFR-2 (Shima et al., 1995; Stacker et al., 2001). VEGFR-2-Knockout-Mäuse

versterben am 8. Embryonaltag, da Endothelzellen nicht in genügender Anzahl vorhanden sind. Im Gegensatz hierzu besitzen die VEGFR-1-Knockout-Mäuse zwar eine ausreichende Zahl an Endothelzellen, versterben jedoch zwischen dem 9-10. Embroyonaltag daran, dass ein funktionierender primärer Gefäßplexus nicht zustande kommt (Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995).

2.5.2 Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)

Die Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) sind Heparinbindenden Polypeptide. Durch alternatives Splicing des FGF-2-Gens (Abraham et al., 1986) entstehen neben dem ursprünglich beschriebenen 18 kDa-Polypeptid weitere, N-terminal erweiterte Isoformen von 22, 22,5 und 2 kDa durch Initiierung an CUG-Codons. FGF-2 wird von intakten Zellen auf einem endoplasmatischen Retikulum/Golgiunabhängigen Weg freigesetzt. Es besitzt jedoch keine Sekretions-Signalsequenz (Abraham et al., 1986).

Die Faktoren der FGF-Familie spielen eine potente Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung (Übersichten Folkman und Klagsbrun, 1987; Christofori, 1997; Galzie et al., 1997). So beeinflussen sie die gesamte embryonale Entwicklung, Reparatur und Regeneration von Zellen und Gewebe einerseits und Entwicklung und Progression von mehreren pathologischen Prozessen, auch malignen Ursprungs, andererseits. FGF-2 übt seine Potenz primär auf Zellen mesenchymaler Herkunft aus. Es sind jedoch auch Auswirkungen auf Zellen ektodermalem und endodermalem Ursprungs bekannt. Abhängig von der Zielzelle, dem die Zelle umgebenden Milieu und der darin

befindlichen Agenzien beeinflusst FGF die Migration, die Morphologie, die Differenzierung und Proliferation von Zellen (Baird und Klagsbrun, 1991). *In vivo* wirkt FGF-2 angiogen, beispielsweise im Kaninchen-Kornea-Assay und auf der Chorioallantoismembran bebrüteter Hühnereier (Friedlander et al., 1995).

Die angiogene Wirkung von FGF-2 beruht offenbar zum Teil auf einen indirekten Mechanismus, da FGF-2 die VEGF-Sekretion von Endothelzellen stimuliert (Seghezzi et al., 1998). Antikörper gegen VEGF hemmen sowohl die FGF-2-induzierte Proliferation von Endothelzellen *in vitro* als auch die Angiogenese im Maus-Kornea-Assay *in vivo* (Seghezzi et al., 1998).

2.5.2.1 Der FGF-2-Rezeptor

Als Rezeptoren für FGF-2 fungieren ebenso wie bei VEGF als transmembrane Tyrosinkinaserezeptoren, FGFR-1 und FGFR-2, an die FGF-2 mit hoher Affinität bindet. Zusätzlich kann FGF-2 mit geringer Affinität an Heparansulfat-Proteoglykane binden (Christofori, 1997). Die FGF-Rezeptoren besitzen extrazellulär 2-3 Immunglobulin-ähnliche Domänen mit einer an sauren Aminosäure-reichen Region zwischen der ersten und zweiten Domäne, eine Transmembrandomäne und intrazellulär eine Tyrosinkinasedomäne, die durch ein 14 Aminosäureninsert unterbrochen ist. Durch alternatives Splicing der dritten Immunglobulindomäne entstehen verschiedene Isoformen, deren Ligandenspezifität und Affinität sich unterscheiden (Christofori, 1997).

2.5.3 Angiopoietine

Beide Angiopoietine, Ang1 und Ang2, sind 75 kDa große Proteine, die sezerniert werden und eine gewisse Homologie in ihrer Sequenz aufweisen. Sie binden mit vergleichbarer Affinität an den Tie-2 Rezeptor (Tyrosine Kinase with Immunoglobulin and Epidermal Growth Factor Homology Domain).

Es wurden bisher nur vier Liganden für den Tie-2-Rezeptor identifiziert. Diese sind die Angiopoietine-1 bis -4. Der Ligand für den Tie-1 Rezeptor ist bis heute nicht bekannt (Davis et al., 1996; Davis et al., 1996; Maisonpierre et al., 1997; Valenzuela et al., 1999).

Ang1 aktiviert den Tie-2 Rezeptor durch Phosphorylierung, Ang2 antagonisiert diesen Prozess (Davis et al., 1996). Während der Entwicklung wird Ang1 von mesenchymalen Zellen, die das sich neu entwickelnde Gefäß umgeben, sezerniert (Davis et al., 1996). Diese sind bei Kapillaren Perizyten und bei größeren Gefäßen Myozyten (glatte Muskelzellen).

Durch Aktivierung von Tie-2 werden perivaskuläre Zellen rekrutiert und in die Gefäßwand integriert. Somit werden Gefäße stabilisiert und restrukturiert. Ang1 festigt Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und gewährleistet im erwachsenen Organismus durch konstitutive Aktivierung von Tie-2 den Erhalt der Gefäßwandstabilität (Hanahan, 1997). Ang2 inhibiert folglich diesen Prozess. Es löst bestehende Bindungen zwischen Endothel- und perivaskulären Stützzellen auf und führt zur Auflockerung der Gefäßstruktur. An dieser Stelle entscheidet das Vorhandensein von mitogenen Wachstumsfaktoren, wie VEGF, den weiteren Prozess. Ang2 induziert eine destabilisierende Signalkaskade, die

bei der Aussprossung neuer Blutgefäße und bei der Regression bestehender Gefäße wirksam werden. Hierbei führt die Anwesenheit von weiteren proangiogenetischen Faktoren wie VEGF zur Proliferation und Stabilisierung der Gefäße, die Abwesenheit von VEGF dagegen zur Gefäßregression (Stratmann et al., 1998; Yancopoulos et al., 2000; Koh et al., 2002).

Als Antwort auf die Tie-2-Signalkaskade sezernieren die Endothelzellen PDGF, welches an mesenchymale Zellen bindet und diese zur Zellmigration in Richtung der Endothelzellen anlockt. Sobald der Kontakt zwischen den Endothelzellen und den mesenchymalen Zellen stattgefunden hat, kann Transforming Growth Factor beta (TGF- β) aktiviert werden und die Differenzierung der mesenchymalen Zellen in glatte Muskelzellen oder Perizyten induzieren und die endotheliale Zellproliferation und Matrixdeposition inhibieren. Eine Mangelerscheinung von TGF- β , die durch Scheitern von Zellkontakten zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen zustande kommt, führt zur mangelnden Gefäßvernetzung und Gefäßmalformation, die in Tie-2 und Ang1-Knockout-Mäusen beobachtet wird (Folkman und D'Amore, 1996).

2.5.4 Angiopoietin-Rezeptor Tie-2 (Tyrosine Kinase with Immunoglobulin and Epidermal Growth Factor Homology Domain)

Tie-Rezeptoren sind Tyrosinkinaserezeptoren, dessen extrazelluläre, aminoterminale Region aus einer kompletten und einer inkompletten Immunglobulin-ähnlichen Domäne besteht, die drei EGF-ähnliche und Cystein-reiche Domänen flankieren. Sie werden charakteristischerwei-

se auf Gefäßendothelien exprimiert. Gefunden wurden sie jedoch auch auf hämatopoetischen Stammzellen (Yano et al., 1997). Eine gesteigerte Expression konnte während der Wundheilung, der Neovaskularisation (Korhonen et al., 1992), in metastasierendem Melanom (Kaipainen et al., 1994) und bei arteriovenösen Malformationen (Hatva et al., 1996) usw. nachgewiesen werden.

Es sind bisher zwei verwandte Tie-Rezeptoren bekannt. Tie-1 (früher Tie genannt) und Tie-2 (früher Tek genannt), wobei Letzteres zu 40% Homologie zum Ersteren aufweist (Dumont et al., 1993; Maisonpierre et al., 1993; Schnurch und Risau, 1993).

Die Funktion der Tie-Rezeptoren wurde erst durch Analyse von Knockout Mäusen geklärt. Diese Untersuchung zeigte, dass der Tie-1 Rezeptor wichtig für die Entwicklung von Endothelzellen und für die Morphogenese der Blutgefäße ist. Die Tie-1-Null-Embryos litten unter Atemschwierigkeiten und boten subkutane sowie innere Hämorrhagien und Ödeme. Tie-2-Knockout-Mäuse hingegen starben bereits während der Embryogenese. Diese wiesen eine Malformation des Gefäßnetzwerkes bei normal entwickelten Endothelzellen auf (Dumont et al., 1994; Sato et al., 1995). Tie-2 führt zur Rekrutierung von Stromazellen (Perizyten oder glatte Muskelzellen), die in die Wand neuer Blutgefäße integriert werden. Es erfolgt hierdurch die Stabilisierung der Gefäßstruktur und auch eine Restrukturierung der Blutgefäße im Rahmen der Organogenese (Hanahan, 1997). Folglich könnte die Expression dieses Moleküls auch als Marker der Restabilisierung von Tumorgefäßen benutzt werden.

2.5.5 $\alpha_{\nu}\beta_3$ -Integrin

Integrine gehören zur Famile der heterodimeren transmembranösen Adhäsionsrezeptoren, die die Zell-Extrazellulärmatrix Interaktionen und in einigen Fällen die Zell-Zell-Adhäsion beeinflussen (Hynes, 1992). Mehrere Integrine werden von Endothelzellen expremiert. Sie erlauben das Andocken für eine große Vielfalt von Komponenten aus der Extrazellulärmatrix. Diese beinhalten vor allem Fibronektin, Vitronektin, Laminin, Kollagen-I und -IV, von-Willebrand Faktor und Fibrinogen (Cheng et al., 1989).

Die Meisten aller Studien über Integrine wurden an $_{\alpha\nu\beta3}$ -Integrinen vorgenommen. Am ruhenden, vollkommen entwickelten Gefäßsystem ist dieses Integrin nicht nachweisbar. Jedoch ist er an proliferierenden und wachsenden Endothelzellen durch eine hohe Expressionsrate sehr gut nachzuweisen (Brooks et al., 1994). Die Ligandenbindung erfolgt über eine RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp). Der β_3 -Schwanz des Integrins ist in der Lage 21 verschiedene Proteine zu binden und somit die Zellmobilität, Proliferation, Differenzierung und Apoptose zu regulieren (Zhao et al., 2004).

2.5.6 Laminin

Laminin ist ein Glykoprotein ohne Kollagenanteil, welches in der Basalmembran anzutreffen ist (Aumailley und Smyth, 1998), und ein Heterodimer, bestehend aus drei Untereinheiten (α , β und γ). Insgesamt sind 14 Isoformen bekannt. Sie unterliegen einer differenzierten Verteilung im Gewebe und unterstützen verschiedene Entwicklungsprozesse

(Engvall et al., 1996; Patarroyo et al., 2002; Engbring et al., 2003). Laminin ist essentiell für den Erhalt der Basalmembran. Er trägt zur Verankerung von Zellen an der Basalmembran bei und fördert die Angiogenese. Weiterhin fördert Laminin das Zellwachstum, die Zellproliferation, die Migration und die Differenzierung (Malinda et al., 1999; Engbring et al., 2003). Laminin besitzt die Fähigkeit, an mehrere Rezeptoren zu binden, unter anderem an Integrine, an einen 67 kDa Lamininrezeptor, Heparansulfat und an Dystroglykan.

2.5.7 Endostatin

Endostatin ist ein 20 kDa großes C-terminales Fragment des Kollagen-XVIII, welches erst durch proteolytsiche Spaltung freigesetzt und dann anti-angiogenetisch aktiv wird. Es besitzt eine starke antiangiogentische Potenz und ist ein spezifischer Hemmer der endothelialen Proliferation und Migra-tion. Endostatin ist in der Lage, das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren maßgeblich zu hemmen (O'Reilly et al., 1997). Die Behandlung mit rekombinantem Endostatin an Maustumormodellen zeigte eine Regression der Tumore bis zu 1 mm³ Größe. Die Tumore verweilten unter Endostatintherapie in einer Art Ruhezustand. Nach Unterbrechung der Therapie wuchsen sie wieder zu ihrer originalen Größe an, bis sie dann nach mehreren Zyklen endgültig nicht mehr wuchsen (O'Reilly et al., 1997). Die antiangiogenetische Wirkung wird durch unterschiedliche Mechanismen herbeigeführt. Folgende Mechanismen werden dazu in der Literatur erwähnt: Interaktion von Endostatin und Zink (Boehm et al., 1998), β-Catenin (Dixelius et al., 2003), E-Selektin (Yu et al., 2004) und VEGFR-2 (Kim et al., 2002).

Weiterhin stabilisiert Endostatin die Wand von neu gebildeten Blutgefäßen (Ergün et al., 2001; Schuch et al., 2005) und reduziert dadurch vermutlich die Gefäßpermeabilität und die Angiogenese. An Kollagen-XVIII/Endostatin-defizienten-Mäusen konnte eine erhöhte Permeabilität der Blutgefäße beobachtet werden (Yu et al., 2004). Weiterhin konnte in *in vivo* und *in vitro* Studien gezeigt werden, dass Endostatin die VEGF-induzierten Veränderungen an der Gefäßwand, wie Öffnung inter-endothelialer Kontakte, Degradierung der Basallamina und Desintegration der Perizyten aus der Kapillarwand blockiert und die Blutgefäße in einer normalen Struktur hält (Schuch G, persönliche Mitteilungen). Bisher konnten diese Studien jedoch nicht adäquat beim Menschen durchgeführt werden.

2.5.8 Vascular Endothelial Cadherin

Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin) gehört zur Familie der Cadherine und ist ein Adhäsionsmolekül (Takeichi, 1990), welches erstmals 1991 von Suzuki, Sano und Tanihara identifiziert und geklont wurde (Suzuki et al., 1991). Cadherine sind calciumabhängige Glykoproteine, die vor allem an homophilen Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind und eine große Rolle in der Zelladhäsion und embryonalen Entwicklung spielen (Barth et al., 1997; Vleminckx und Kemler, 1999). Es gibt mittlerweile sechs Subfamilien. VE-Cadherin gehört zur Untergruppe der Typ-II-Cadherine. VE-Cadherin benötigt zur Ausübung seiner Funktion die Verankerung durch intrazelluläre Bindungspartner, die Catenine. Diese wiederum stellen eine Verbindung zum Zytoskelett her (Vleminckx und Kemler, 1999).

Adhäsionsmoleküle dienen im Organismus in erster Linie der Zell-Zellbzw. der Zell-Matrix-Interaktion. Sie haben neben ihrer zelladhäsiven auch signalübertragende Wirkung und nehmen somit Teil an der Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen (Gumbiner, 1996; Dejana et al., 1999 und 2001). VE-Cadherin wird auch Cadherin-5 oder CD144 genannt (Nollet et al., 2000). Es ist ein Molekül mit höchster Spezifität für Endothelzellen, da er nur hier exprimiert wird (Liao et al., 2000). VE-Cadherin erhält die normalen Gefäßstrukturen intakt und beteiligt sich an der Regulation der endothelialen Permeabilität, der Zellmigration und der Angiogenese (Brevario et al., 1995; Corada, 1999; Liao et al., 2000).

Die Hemmung von VE-Cadherin mittels Antikörper führt zur erhöhten Gefäßpermeabilität (Gotsch et al., 1997).

2.6 Arbeitshypothese und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob und inwieweit es zu einer strukturellen Stabilisierung der Tumorgefäße kommt, welche molekulare Mechanismen daran beteiligt sind und in welcher Relation dies zum Tumorwachstum steht.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde nach einem Tumormodell gesucht, welches gut etabliert war und ein schnelles Tumorwachstum sicherstellte. Ebenfalls sollte es die Kriterien hinsichtlich einer zonalen Analyse (Tumorumgebung, Tumorrand und Tumorzentrum) als Vergleichmöglichkeit innerhalb eines Tumors in den verschiedenen Wachstumsphasen erfüllen. Deshalb fiel die Entscheidung auf das Rhabdomyosarkom R1H der Ratte, welches Professor Zywietz im Institut für Strahlenbiologie und Biophysik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf einführte und als Transplantationstumorsystem etablierte.

Die in diesem Tiermodell experimentell erzeugten Tumore wurden entfernt und in die oben genannten Regionen unterteilt. Die Gewebeblöcke aus diesen Regionen wurden nach entsprechender Behandlung zur Herstellung von Semidünnschnitten für die Lichtmikroskopie, ultradünnen Schnitten (80 nm) für elektronenmikroskopische Analysen und von dünnen Paraffinschnitten für immunhistochemische Analysen benutzt. Diese Analysen belegen, dass es vor allem in den zentralen Abschnitten des Tumorgewebes zu einer Stabilisierung der Tumorblutgefäße kommt und dies mit einer Reorganisation des lokalen Gefäßbettes und einer Nekrose des Tumorgewebes einhergeht.

3 Material und Methoden

3.1 Das Tumormodell

Die Untersuchungen wurden am Rhabdomyosarkom R1H der Ratte durchgeführt. Der Primärtumor war in der Kinnbackenmuskulatur einer zuvor mit Röntgenstrahlen bestrahlten Ratte der Linie WAG/Rij im Jahr 1962 entstanden. Aus der daraus entwickelten Zelllinie ging die R1H-Linie (H für Hamburg) hervor (Jung et al., 1981 und 1990). Die Zellzyklusdauer der R1H-Linie beträgt 17.6 Stunden, die Tumorverdoppelungszeit bei einem Ausgangsvolumen von 1.6 \pm 0.2 cm³ 4.0 Tage (Jung et al., 1981).

Die Arbeitsgruppe von Herrn Professor Zywietz etablierte diesen Tumor als Tumorwirtssystem im Institut für Strahlenbiologie und Biophysik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Im Unterschied zur ursprünglichen Zelllinie R1 hat die 1978 entstandene Zelllinie R1H einen 4-fachen DNA-Gehalt gegenüber der Wirtszelle. Histologisch sind die Tumorzellen aufgrund ihres höheren Volumens gut von Wirtszellen zu unterscheiden. Zudem beträgt der Anteil klonogener Zellen etwa 55%. Eine immunogene Reaktion des Tumors auf das Wirtstier konnte ausgeschlossen werden (Zywietz, 1990).

3.2 Tumorwirtssystem

Als Wirtstiere dienten männliche WAG/Rij-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 200 \pm 20 g, die zum Implantationszeitpunkt des Tumors neun Wochen alt waren.

Die Versuchstiere stammten aus der Tierzucht des Instituts für Strahlenbiologie und Biophysik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Sie wurden in Makrolonkäfigen des Typs 3 auf Weichholz-(Altromin) bei künstlichem Licht mit einem Hellgranulat Dunkelrhythmus von jeweils 12 Stunden gehalten. Die Luftfeuchtigkeit betrug 55% und die Raumtemperatur wurde mittels Klimaanlage bei konstanten 23°C ± 2°C gehalten. Diese Art der Lab orratten-Haltung entsprach den Empfehlungen von Baker (Baker et al., 1979).

Die Nahrung der Tiere bestand aus einer pelletierten Haltungsdiät (Altromin 1324) und Wasser ad libitum. Die Genehmigung zur Durchführung der Experimente erfolgte durch die Gesundheitsbehörde der Freien und Hansestadt Hamburg. Grundvoraussetzung war die Einhaltung der Richtlinien für Labortierhaltung sowie dem Tierschutzgesetz von 1987.

3.3 Tumorimplantation

Die Tumorimplantation erfolgte bei neun Wochen alten männlichen WAG/Rij-Ratten. Der Spendertumor wurde einer drei Wochen alten Ratte entnommen. Beide Tiere bekamen für die Narkose eine intramuskuläre Injektion in den Musculus gluteus maximus mit einer Kombination von 6 mg/kg KG Rompun® (Fa. Bayer, Leverkusen) und 50 mg/kg KG Ketavet® (Fa. Parke-Davis, Detroit, USA). Der Gewebewürfel wurde aus der vitalen bindegewebsfreien Randzone mit einer Kantenlänge von etwa 1 mm entnommen und anschließend bis zur Implantation auf einer sterilen, mit physiologischer Kochsalzlösung getränkten Mullplatte verwahrt. Dem Versuchstier wurde nach Desinfektion mit Cutasept® (Fa. Bode, Hamburg, Germany) und elektrischer Rasur das Implantat subkutan in die rechte Flanke gelegt. Der 8 mm lange Schnitt wurde mit einer Metallklammer (Autoclips®, Fa. Clay Adams, USA) verschlossen und mit Nobecutan® (Fa. Bode) besprüht. Nach 9 Tagen wurde die Klammer entfernt. Die R1H-Tumoren (Abb. 1) wachsen nach der Implantation zu einem ellipsoiden, auf seiner muskulären Grundlage verschieblichen, von einer Bindegewebskapsel umschlossenen, soliden Gewebskörper heran (Zywietz, 1990).



Abb. 1: Ratte der Linie WAG/Rij mit einem implantierten Rhabdomyosarkom R1H. Deutlich ist der subkutan liegende Tumor (Inhalt der schwarz gestrichelten Linie), an der rechten äußeren Flanke zu ersehen.



Abb. 2: Entfernte Rhabdomyosarkome In toto entfernte zwei Rhabdomyosarkome mit gut ersichtlicher Gefäßinjektion (Stern) und Gefäßstümpfen (Pfeile).

3.4 Tumorvolumenbestimmung

Das transkutane Ausmessen des Tumorvolumens wird mit einer Schiebelehre berechnet. Hierbei werden die Tumorlänge (L) und zwei Durchmesser (Breite (B) und Höhe (H)) bestimmt.

Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Formel für das Rotationsellipsoid:

$$\pi V T = ----- (1 - 2d) x (b - 2d) x (h - 2d)$$

Diese Tumorvolumenbestimmung wurde bei jedem Tier täglich durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden 10 Tiere ausgewählt.

Die Tumortransplantation erfolgte am 28.10.1997. Die ersten Tumoren wurden am 17.11.1997, also 20 Tage später, entnommen (Abb. 2).

3.5 Aufarbeitung von Gewebe

Nach Entnahme der Tumoren musste umgehend deren Weiterverarbeitung sichergestellt werden. Vorsicht war vor allem beim Zerlegen des Tumors geboten. Es durften keine Druckstellen oder Quetschungen entstehen.

Da die Tumoren jeweils in verschiedenen Wachstumsphasen geerntet wurden, besaßen sie unterschiedliche Volumina. Die Größen reichten von 0.28 cm³ bis 1.92 cm³. Der Tumor wurde mit Hilfe eines Skalpells in zwei Hälften geschnitten (Abb. 3). Eine Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff konserviert, die Andere wie folgt behandelt:

- Ein Stück Gewebe von der Größe 2-5 mm im Durchmesser aus dem Tumorzentrum wurde in Bouin'scher Lösung (s. 2.6) fixiert.

- Ein Stück Gewebe vom Tumorrand/-umgebung wurde in Bouin'scher Lösung (s. 2.6) fixiert.

- Ein Stück Gewebe von der Größe 2-5 mm im Durchmesser aus dem Tumorzentrum wurde in Glutaraldehyd fixiert (s.2.6)

- Ein Stück Gewebe vom Tumorrand/-umgebung wurde in Glutaraldehyd fixiert.



Abb. 3: Querschnitt durch ein Rhabdomyosarkom mit Zentralnekrose Erkennbar ist eine zonale Verteilung mit Unterscheidung des Tumorzentrums (Inhalt der weißen gestrichelten Linie) von der Intermediärzone (Inhalt der schwarzen Linie). Inmitten des Tumorzentrums befindet sich eine Nekrosezone (Stern). Weiterhin ist ein Blutgefäßstumpf erkennbar (weißer Pfeil).

3.6 Materialien und ihre Aufarbeitung

Fixierung der Gewebeproben in Bouin'scher Lösung:

Die entnommenen Tumorproben wurden für 24 Stunden in frisch angesetzter Bouin'scher Lösung bei Raumtemperatur fixiert.

Für 100 ml Bouin'scher Lösung werden benötigt:

-75 ml Pikrinsäure (Merck, Darmstadt)

-15 ml Formaldehyd (37%-ig, Merck)

- 5 ml Eisessig (100%-ig, Riedel de Haen, Seelze)

Paraffineinbettung:

Nach Fixierung in Bouin'scher Lösung wurden die Gewebsstücke einem dreitägigen Dehydratationsverfahren mittels aufsteigender Alkoholreihe unterzogen. Die ersten 48 Stunden wurden die Gewebestücke in 70%-igem Alkohol gelagert. Anschließend erfolgte eine automatische Entwässerung im Paraffinautomaten. Zwei Stunden 80%, eine Stunde 95%, 5 x 1 Stunde 100% Äthanol. Nach 3 x 2 Stunden Methylbenzoat (Merck) wurden die Gewebestücke in flüssigem Paraffin/Histowax (Reichert und Jung, Österreich) für vorerst zwei, dann acht Stunden eingelegt, bevor sie in Paraffinblöcke gegossen wurden.

Objektträgerbeschichtung für die immunhistochemischen Analysen:

Zur besseren Haftung der Schnitte am Objektträger wurden diese mit einer Gelatine-Chromalaun-Mischung beschichtet. Zum Herstellen dieser Lösung wurden folgende Materialien benötigt:

- 500 mg Gelatinepulver (Merck)

- 50 mg Chromalaun (Kaliumchromsulfat, Merck)

- ad 100 ml Aqua dest.

Die Mischung wurde zum Quellen gebracht und unter Rühren auf 50°C erwärmt. Staubfreie Objektträger wurden nach zweimaliger Filtration der Lösung in diese getaucht und dann für 24 Stunden in Trockenkästen bei Raumtemperatur aufgestellt.

Herstellung von Paraffinschnitten:

Das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte an einem Schlittenmikrotom der Firma Zeiss (Jena). Für die Hämalaun-Eosin-Färbung wurden 5 µm dicke Schnitte auf unbeschichtete Objektträger und für die immunhistochemischen Untersuchungen 6 µm dicke Schnitte auf Gelatine-Chromalaun-beschichtete Objektträger angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte bei 40°C über Nacht getrocknet.

Färbung der Paraffinschnitte mit Hämalaun-Eosin:

Zur histologischen Beurteilung und generellen Übersicht wurde von jedem Paraffinblock ein Schnitt mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Beginnend mit der Entparaffinierung, 3 x 5 Minuten Xylolersatzlösung XEM-200 (Fa. Vogel Gießen), folgte die Rehydratation der Schnitte mittels absteigender Alkoholreihe (je 5 Minuten 100%, 95%, 80%, 70% Äthanol) und Aqua dest. Anschließend wurden die Zellkerne mit 0.5 %-iger Mayers Hämalaunlösung (Merck) 5 bis 7 Minuten gefärbt. Weiterhin erfolgte ein kurzes Differenzieren in 1%-iger Essigsäure und Ausspülen des Farbüberschusses mit Leitungswasser sowie das Bläuen der Schnitte (10 Minuten unter fließendem Leitungswasser entwickeln lassen). Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte in einer 0.1%-igen Eosin/Athanol-Lösung (Merck) für 3 -7 Minuten getaucht. Die Differenzierung in 96%-igem Athanol entfernte das überschüssige Eosin. Zum Abschluss erfolgte ein 3 x 5 minütiges Bad mit Xylolersatz-Lösung bevor die Gewebeschnitte mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg) eingedeckt wurden.

Semidünnschnitttechnik:

Gewebeblöcke aus den entfernten Tumoren wurden über Nacht bei +4°C in 5.5 %-igem Glutaraldehyd fixiert. Anschlie ßend wurden sie mit 1%-igem Osmium-Saccharose-Phosphatpuffer für 2 Stunden nachfixiert, in aufsteigender Alkoholreihe (je 15 Minuten in 35%, 50%, 70%, 96%, 3 x 100% Äthanol (Merck) entwässert, in Propylenoxid (2 x 15 Minuten, Serva, Heidelberg) inkubiert und in Epon 812 (Luft, 1961) eingebettet.

Von diesen Blöcken wurden dann 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt und mit Toluidin/Pyronin gefärbt. Dazu wurden die Semidünnschnitte auf die Oberfläche der Toluidin/Pyronin-Lösung (Ito und Winchester, 1963) übertragen und freischwimmend circa 5 Minuten bei 80° C auf einer Heizplatte gefärbt. Anschließend wurde die überschüssige Farbe mit Leitungswasser entfernt und die Schnitte auf Objektträger gebracht. Nach Trocknung der Schnitte wurden diese mit Caedex (Merck) eingedeckt.

Elektronenmikroskopie:

Von den oben beschriebenen Eponblöcken wurden Feinschnitte (80 nm dick) angefertigt und auf Kupfer-Gitternetze gezogen. Danach erfolgte die Kontrastierung durch Bleinitrat. Anschließend wurden die Schnitte mit Hilfe eines Elektronenmikroskops (Phillips, Hamburg) analysiert.

3.7 Immunhistochemie: Methodik und Antikörper

Immunhistochemie mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern:

Alle immunhistochemischen Untersuchungen wurden mit der von Davidoff und Schulze (Davidoff und Schulze, 1990) nach Zaborszky und Leranth (Zaborszky und Leranth, 1985) modifizierten Technik durchgeführt. Die Methoden bestehen aus der Kombination Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) und dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC). Es kamen unterschiedliche Antikörper, monoklonale und polyklonale, zur Anwendung. Im Einzelnen wurden folgende Schritte bei der Immunfärbung durchgeführt: Zur Entparaffinierung wurde das Gewebe 3 x 5 Minuten in Xylolersatz getaucht. Die Rehydrierung erfolgte mittels absteigender Alkoholreihe (je 5 Minuten in 100%, 95%, 80%, 70% Äthanol und Aqua dest.). Anschließend wurde das Gewebe in PBS-Puffer für 15 Minuten gespült. Es folgte eine halbstündige Inkubation der Schnitte mit dem 2%-igem normalen Kaninchenserum für die monoklonalen Antikörper und dem Schweineserum (beide Seren von Sigma; Dako, USA) für die polyklonalen Antikörper. Alle Schnitte wurden mit mindestens 100 – 200 µl von oben genanntem Serum oder Antikörper benetzt.

Nach Entfernen der Seren wurden alle Schnitte, ausgenommen die Negativkontrollen, mit PBS, BSA- und NaN₃-verdünntem Antikörper (Verhältnisse siehe unten) benetzt. Diese wurden dann bei +4°C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Die Negativkontrolle wurde nur mit einem antikörperfreien PBS, BSA- und NaN₃-Gemisch benetzt.
Nach 24 stündiger Inkubation wurden die Antikörper durch 3 x 10 Minuten Waschen mit PBS entfernt. Der verdünnte Sekundärantikörper wurde dann aufgetragen (anti-Maus Immunglobulin G (IgG) für den monoklonalen und anti-Kaninchen oder anti-Ziege IgG für den polyklonalen Antikörper) und für 1 Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 2 x 10 Minuten mit PBS gewaschen und für eine halbe Stunde mit dem PAP-Komplex (Maus-PAP für den monoklonalen und Kaninchen-PAP für den polyklonalen Antikörper) inkubiert. Die Schnitte wurden erneut 2 x 10 Minuten mit PBS gewaschen.

Danach wurde der frisch angesetzte ABC-Komplex für eine halbe Stunde aufgetragen. Die Schnitte wurden dann für 10 Minuten in PBS und für weitere 10 Minuten in PB gewaschen. Daran schloss sich die Entwicklung der Peroxidase-Aktivität durch die Nickel-verstärkte Glukoseoxidase-Technik an. Die Entwicklung der spezifischen Färbung wurde unter mikroskopischer Kontrolle bis maximal 30 min beobachtet und bei ausreichender Intensität gestoppt. Um die Residuen der Peroxidase-Aktivität zu entfernen, wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten mit PBS gespült. In einigen Fällen wurde eine Gegenfärbung mit Kernechtrot durchgeführt. Es erfolgte das Dehydrieren der Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe (je 5 Minuten 70%, 80%, 96%, 2 x 100% Äthanol) an die sich die Inkubation mit 3 x 5 Minuten Xylol-ersatz anschloss. Zum Schluss wurden die Schnitte unter Verwendung von Eukitt mit geeigneten Deckgläsern eingedeckelt.

Verwendete Antikörper:

Tab.	1
------	---

Antikörper	Mono- klonal	Poly- klonal	Verdünnung	Firma
Laminin	Х		1:25	Sigma
Integrin	Х		1:100	Santa Cruz
Angiopoi- etin-1		Х	1:75	Santa Cruz
Angiopoi- etin-2		Х	1:150	Santa Cruz
α-SMA	Х		1:100	Serotec
Tie-2		Х	1:500	Santa Cruz

4 Ergebnisse

4.1 Histologie und Organisation des Rhabdomyosarkoms

Zunächst wurde das Tumorgewebe des Rhabdomyosarkoms anhand lichtmikroskopischer Evaluation an HE-gefärbten Paraffinschnitten studiert. Das Rhabdomyosarkom war makroskopisch ein kapselbegrenzter, solider Tumor mit einer hämorrhagischen, teils herausgelösten Zentralnekrose. Der Tumor wurde von einer Schicht normalen Bindeund Fettgewebes umgeben (Abb. 4 A). In den intakten Tumorbezirken sah man dicht aneinander liegende polymorphe Tumorzellen mit einem sehr geringen interstitiellen Gewebeanteil (Abb. 4 B). Die Tumorzellen waren teilweise spindelförmig und lang gestreckt und wiesen unterschiedliche Kerngrößen auf. Die Rhabdomyoblasten wiesen multiple Nukleolen vor, die prominent wirkten. Verteilt im gesamten Tumorgewebe sah man zahlreiche Mitosefiguren.

An einigen Regionen kamen interstitielle Ödeme zum Vorschein sowie beieinander liegende eingestreute intakte und nekrotische Tumorbezirke (Abb. 4 C und D). In den Tumorzellnekrosen fanden sich multiple Apoptosen, in denen das Zytoplasma nur noch als Umriss wahrzunehmen war, und große Vakuolen sowie aufgehellte Kerne. Weiterhin erkannte man Areale mit Einblutungen.

Die Vaskularisation des Tumors erfolgte durch Arteriolen, die der Kapsel auflagen bzw. sie marginal penetrierten. Von dort aus gingen diese in Richtung Tumorzentrum ab, bis sie sich diffus verzweigten. In den Nekrosenzonen erkannte man nur mitten quer oder längs angeschnittenen Tumorzell-Cluster größere und offensichtlich strukturell stabilisierte Blutgefäße. Kennzeichnend hierfür war, dass in den Nekrosena-

realen des Tumorzentrums Tumorzellen, die in 3-4 Schichten zirkulär um ein relativ stabil erscheinendes Blutgefäß, vital erschienen, während übriges Tumorgewebe nekrotisch war (Abb. D). Für die Untersuchung wurde Rhabdomyosarkomgewebe von 10 Ratten benutzt. Die Tumore wiesen einen Durchmesser von 0.28 cm³ bis 1.92 cm³ in der Größenvariabilität auf.

Um den Aufbau und die Organisation der Blutgefäße in und um das Rhabdomyosarkom in Detail und vergleichend untersuchen zu können, wurde folgende Untergliederung des Tumorgewebes vorgenommen: Tumorumgebung, Tumorrand, Intermediärzone und Tumorzentrum. Als Intermediärzone ist die Übergangszone zwischen Tumorrand und Tumorzentrum definiert.



Abb.4: Histologie des Rhabdomyosarkoms in HE-Färbung. Querschnitt durch eine Tumorumgebung mit Fettgewebe (Blockpfeil) und normalem Bindegewebe (Stern) sowie Anschnitte von kleinen und größeren Gefäßen (Pfeile, Abb. A). Querschnitt durch einen Tumorrand mit kompletter diffuser Infiltration des Gewebes. Es sind keine Nekrosezonen zu erkennen (Abb. B). Diffuse Tumorinfiltration der Intermediärzone mit einer eingebluteten Zone (Blockpfeil) und apoptotischen Zellen sowie einem verzweigtem Blutgefäß (Pfeil, Abb. C). Im Tumorzentrum sind Blutgefäße (Pfeile) inmitten einer noch teilweise vitalen Tumorinsel zu erkennen, die von Nekrosen umgeben werden (Abb. D, Blockpfeil). A-B: 200x; C-D: 450x

4.2 Lichtmikroskopische Evaluation der Tumorgefäße anhand von Semidünnschnitten

Zusätzlich zu den Paraffinschnitten erfolgte eine feinere strukturelle Analyse der Tumorgefäße an Semidünnschnitten von in Epon eingebettetem Tumorgewebe. In der Tumorumgebung befanden sich reichlich Fettzellen, Blutgefäße und normales Bindegewebe ohne Tumorzellanteil (Abb. 5 A).

Im Tumorrand waren Tumorzellen, die meistens polymorph gestaltete Kerne vorwiesen, in Gruppen angeordnet. Erkennbar waren kleine, stark vernetzte, in Zwickeln zwischen den Tumorzellgruppen teilweise erweiterte Blutgefäße, die ebenfalls stark vernetzt waren und die Tumorzellgruppen umgaben (Abb. 5 A und B).

In der Intermediärzone waren Tumorzellen zu erkennen, deren Zytoplasmen teilweise verquollen wirkten. Neben zahlreichen Mitosefiguren dominierten vor allem größere Blutgefäße (Abb. 5 C). In dieser Zone war eine Veränderung der Anordnung der Tumorzellen in Relation zu den Tumorgefäßen zu sehen. Stellenweise wurden nicht die Tumorzellgruppen von einem dichten Gefäßnetz umgeben wie im Tumorrand beschrieben, sondern die Tumorzellen ordneten sich zirkulär um die Blutgefäße, die in ihrem Durchmesser deutlich größer erschienen als die Gefäße des Tumorrandes.

Im Tumorzentrum lagen Inseln von vitalen Tumorzellen inmitten großer nekrotischer Areale. Genauere lichtmikroskpische Analysen ergaben, dass, wie in der Intermediärzone beschrieben, diese vitalen Zellen zirkulär, in 5-7 Schichten, um ein stabil erscheinendes Gefäß gruppiert waren. In der nächsten Umgebung erkannte man im Absterben befindliche Tumorzellen sowie Zellabfall (Abb. 5 D). In Gewebearealen, die relativ weiter entfernt von diesen großen Blutgefäßen lagen, war nur nekrotisches Material erkennbar. Stellenweise waren kleine Gefäßabzweigungen aus den großen Blutgefäße zu sehen, die jedoch kurz nach ihrem Abgang in dem weiteren Verlauf nicht mehr zu verfolgen waren, da sie in den nekrotischen Arealen offensichtlich untergegangen waren.



Abb.5: Semidünnschnitte der Rhabdomyosarkome.

In der Tumorumgebung befinden sich zahlreiche Fettzellen (Stern), Blutgefäße (schwarze Pfeile) und normale Bindegewebszellen (weißer Pfeil, Abb. 5 A). Erkennbar ist weiterhin der Übergang zum Tumorrand (Kreuz, Abb. 5 A und B). Hier befinden sich weiterhin Tumorzellen mit zahlreichen Kernatypien sowie Blutgefäße (Pfeile). Zahlreiche kleine Blutgefäße sind in Zwickeln zwischen den Tumorzellen angeordnet und bei dieser Vergrößerung nicht klar erkennbar. In der Intermediärzone wirken Tumorzellen polymorpher. Ebenfalls erkennt man Blutgefäße (Pfeile). Diese werden durch Tumorzellen zirkulär flankiert (Abb. 5 C). Im Tumorzentrum befinden sich Nekrosezonen (Stern). In einem vitalen Areal befindet sich ein Blutgefäß (weiß gestricheltes Feld mit schwarzem Pfeil), welches unmittelbar von einer zirkulären Schicht, bestehend aus 5-7 Tumorzellreihen, umgeben wird (Abb. 5 D). A:150x; B-D: 850x

4.3 Ultrastrukturelle Analysen der Tumorgefäße beim Rhabdomyosarkom der Ratte

Um die aus den lichtmikroskopischen Analysen gewonnenen Befunde untermauern und verifizieren zu können, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen an ultradünnen Schnitten (80 nm dick) durchgeführt, die vom in Epon eingebetteten Material hergestellt wurden. In der Tumorumgebung zeigten die Blutgefäße des normalen Fett- oder Bindegewebes im Großen und Ganzen eine normale Ultrastruktur. Die großen Blutgefäße wiesen abhängig von ihrer Größe fest in die Gefäßwand integrierte glatte Muskelzellen in mehreren Schichten auf und in der Wand von Kapillaren waren sowohl Basallamina, als auch Perizyten in regulärer Form zu sehen (nicht gezeigt). Dagegen waren die meist kleinen Blutgefäße und Kapillaren des Tumorrandbereiches (Randzone des Tumorgewebes) dadurch gekennzeichnet, dass sie meistens nur aus Endothelzellen bestanden, und keine oder nur eine unvollständig ausgebildete Basallamina mit unzureichender Integration von Perizyten aufwiesen (Abb. 6 A).

In einem geringeren Teil von Kapillaren der Tumormarginalzone war die Basallamina stellenweise als verdichtete Zone um das Endothel erkennbar und die Fortsätze von Perizyten waren partiell in die Basallamina einbezogen (Abb. 6 B). Übereinstimmend mit den oben vorgestellten lichtmikroskopischen Analysen waren zahlreiche Blutgefäße der Intermediärzone und des Tumorzentrums von größerem Durchmesser im Vergleich zu den Blutgefäßen des Tumorrandbereiches. Erstmalig in der Intermediärzone des Tumorgewebes wurden die großen Blutgefäße mit teilweise zwei Schichten glatter Muskulatur in der

Wand gefunden. Auch die meisten Kapillaren der Intermediärzone sowie noch intakte Kapillaren des Tumorzentrums wiesen einen Wandaufbau auf, der dem der normalen Kapillaren ähnlich erschien. Sie zeigten eine mehr oder weniger intakt erscheinende Basallamina mit einer teilweise erkennbaren Gliederung in Lamina densa und Lamina rara. Endothelzellen zeigten eine feste Bindung an die Basallamina, in die in den meisten Fällen auch die Perizyten regulär integriert waren (Abb. 6 C und D).



Abb. 6 A-D: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Rhabdomyosarkoms Abgebildet ist ein Gefäß des Tumorrandes. Es ist wird nur durch eine endotheliale Schicht ausgekleidet. Weiterhin ist eine nicht komplett entwickelte Basallamina ersichtlich (Pfeil, Abb. A). Ein Blutgefäß mit drei Endothelzellen besitzt bereits eine Basallamina. Eine periendotheliale Zelle (PEZ), vermutlich ein Perizyt, ist bereits teilweise in die Wand dieser Kapillare integriert (Abb. B). Ein großes Blutgefäß aus dem Tumorzentrum weist neben Endothelzellen glatte Muskelzellen auf (Abb. C, Sterne).

Dargestellt ist eine fast regulär stabilisierte Kapillare (Abb. D). Sie besitzt interendotheliale Kontakte (weißer Pfeil), eine Basallamina (schwarzer Pfeil) sowie Fortsätze der Perizyten, die fest in die Gefäßwand integriert sind. A, B und D: 6650x; C: 1650x

4.4 Expression von Angiopoietinen und deren Rezeptor Tie-2

Die immunhistochemische Färbung für Ang1 zeigte im normalen Gewebe der Tumorumgebung eine deutlich positive Immunreaktion an kleinen Blutgefäßen. Größere Blutgefäße, Fettzellen und Bindegewebszellen waren hingegen negativ für Ang1 (Abb. 7 A). Auch im Tumorrandbereich wiesen kleine Blutgefäße eine deutliche Immunfärbung für Ang1 auf. Tumorzellen selbst hingegen waren im Wesentlichen negativ für Ang1 (Abb. 7 B). In der Intermediärzone waren überwiegend die Blutgefäße mit größerem Durchmesser positiv für Ang1 (Abb. 7 C, D und E). Im Gegensatz dazu wiesen die Blutgefäße im Tumorzentrum keine positive Reaktion für Ang1 auf (Abb. 7 F).

Ubereinstimmend mit der Immunfärbung für Ang1 waren die Kapillaren des normalen Gewebes in der Tumorumgebung positiv für Ang2. An Fettzellen und Bindegewebszellen war keine positive Immunfärbung für Ang2 nachzuweisen (Abb. 8 A). Im Tumorrand wiesen sowohl kleine als auch wenige größere Gefäße allenfalls eine leichte Immunreaktivität für Ang2 auf (Abb. 8 B). Tumorzellen selbst waren ebenfalls negativ. In der Intermediärzone wies ein Teil der Blutgefäße eine positive Immunreaktion für Ang2 auf (Abb. 8 C). Ähnliche Blutgefäße zeigten vergleichsweise eine noch intensivere Immunfärbung für Ang1 (Abb. 7 E). Im Tumorzentrum waren insbesondere die Blutgefäße in der Nähe von Tumorzellnekrosen stark positiv für Ang2 (Abb. 8 E). Auch Endothelzellen der größeren Blutgefäße mitten der von der Nekrose nicht betroffenen Tumorzellinseln wiesen teilweise eine positive Immunreaktion für Ang2 auf (Abb. 8 F).

Wie bei Ang1 und Ang2 waren Kapillaren und größere Gefäße in der Tumorumgebung positiv für Tie-2, den Tyrosinkinase-Rezeptor für Ang1 und Ang2. Fettzellen und Bindegewebszellen waren hingegen negativ. Es befanden sich keine Tumorzellen in der Tumorumgebung (Abb. 9 A). Auch im Tumorrand waren kleinere und größere Gefäße positiv für Tie-2 (Abb. 9 B und C). In der Intermediärzone waren Blutgefäße und ihre Vernetzungen positiv für Tie-2 (Abb. 9 D). Im Tumorzentrum wiesen vor allem nur größere Blutgefäße eine eindeutige Immunreaktion für Tie-2 auf (Abb. 9 E und F). In entsprechenden Kontrollen, wo die Gewebeschnitte nur dem sekundären Antikörper ausgesetzt waren, war keine spezifische Immunreaktion für Ang1 und Ang2 sowie Tie-2 nachzuweisen (Abb. 9 G).



Abb. 7 A-F: Färbung für Ang1 am Rhabdomyosarkom

In der Tumorumgebung ist eine leichte Ang1-Färbung in kleineren Blutgefäßen und in Kapillaren sichtbar (Pfeile, A). Blutgefäße in der Tumorumgebung sowie im Übergangsbereich zum Tumorrand sind positiv für Ang1 (Abb. B). In der Intermediärzone sind große Blutgefäße ebenfalls positiv für Ang1 (Abb. C, D und E, Blutgefäß in Abb. E durch gestrichelte schwarze Linie hervorgehoben). Bereits in der Intermediärzone kommt es zu einer besonderen Anordnung der Tumorzellen um stabilisierte und Ang1-positive Blutgefäße. Im Tumorzentrum befindet sich inmitten einer Nekrosezone ein Gefäß, welches negativ für Ang1 ist. Die zirkulär angeordneten Tumorzellen erscheinen überwiegend nicht mehr vital (F). A-F: 450x



Abb. 8 A-F: Färbung für Ang2 am Rhabdomyosarkom

In der Tumorumgebung sind mehrere Blutgefäße erkennbar, die negativ für Ang2 sind (A). Auch beim Übergang von Tumorumgebung zum Tumorrand ist keine spezifische Färbung für Ang2 erkennbar (B). In der Intermediärzone ist ein Blutgefäß positiv für Ang2 (Abb. C, gestrichelte schwarze Linie). Es konnten auch größere Gefäße in der Intermediärzone beobachtet werden, die negativ für Ang2 waren (D). Im Tumorzentrum sind entlang der Nekrosestraßen, die von Tumorzellpaketen flankiert werden, positive Blutgefäße für Ang2 erkennbar (E, Pfeile). Im Tumorzentrum inmitten eines Tumornekroseareals existierten Gefäße mit noch vitalen Tumorzellen. Diese Zellen waren teilweise für Ang2 positiv (F, Pfeil). A-F: 450x



Abb. 9 A-F: Färbung für Tie-2 am Rhabdomyosarkom

In der Tumorumgebung sind deutlich positiv für Tie-2 gefärbte glatte Muskelzellen der Blutgefäße erkennbar (Pfeile, Abb. A). Im Tumorrand sind ebenfalls positive Immunreaktionen an Gefäßen erkenntlich (Abb. B und C). Hier sind überwiegend Endothelzellen für Tie-2 positiv. In der Intermediärzone sind Blutgefäße und ihre Vernetzungen positiv für Tie-2 (Abb. D). Im Tumorzentrum weisen Blutgefäße eine eindeutige Immunreaktion für Tie-2 auf. Einzelne, nicht weiter charakterisierte Zellen sind ebenfalls positiv für Tie-2 gefärbt (Abb. E, Blockpfeil). Weiterhin sind noch Silhouetten eines zentral in einem Nekrosegebiet liegenden Blutgefäßes zu beobachten, welches eine noch positive Immunreaktion für Tie-2 vorweist (Abb. F, Pfeil). A-F: 450x



Abb. 9 G: Immunhistochemische Kontrolle Dieser nur dem sekundären Antikörper exponiertem Gewebeschnitt zeigt beispielhaft aus dem Tumorzentrum keine spezi-

fische Färbung. 450 x

4.5 Nachweis des Adhäsionsmoleküls α_Vβ₃-Integrin

In der Tumorumgebung waren alle Blutgefäße für $\alpha_{V}\beta_{3}$ -Integrin negativ (Abb. 10 A und B). Fettzellen und Bindegewebszellen in der Tumorumgebung waren ebenfalls für $\alpha_{v}\beta_{3}$ -Integrin negativ. Im Tumorrand waren Blutgefäße kleineren und größeren Durchmessers sowie ihre Abzweigungen eindeutig positiv für $\alpha_{V}\beta_{3}$ -Integrin. Tumorzellen waren hingegen nicht gefärbt (Abb. 10 A-C). Am Übergang von der Marginal- zur Intermediärzone waren vor allem größere für $\alpha_{v}\beta_{3}$ -Integrin positive Blutgefäße zu erkennen (Abb. 10 D). In einigen Arealen lag ein heterogenes Bild vor. Ein Teil der Blutgefäße war positiv für $\alpha_{V}\beta_{3}$ -Integrin, ein anderer Teil negativ, wobei die negativen Blutgefäße meistens ein relativ großen Durchmesser aufwiesen (Abb. 10 E). Das Tumorzentrum war durch nekrotische Areale geprägt (Abb. 10 F). In diesen Regionen waren größere Blutgefäße, welche inmitten einer intakten Tumorinsel lagen, negativ für $\alpha_{V}\beta_{3}$ -Integrin. In parallel geführten Kontrollen konnten keine spezifischen Immunfärbungen für $\alpha_{V}\beta_{3}$ -Integrin nachgewiesen werden.



Abb. 6 A-F: Färbung für $\alpha_{\nu}\beta_3$ -Integrin am Rhabdomyosarkom In der Tumorumgebung sind Blutgefäße negativ für Integrin (A, B und C, Blockpfeile, jeweils Inhalt der schwarz gestrichelten Linien). Im Übergangsbereich zum Tumorrand sowie inmit-ten des Tumorrandes sind Gefäße positiv für $\alpha_{\nu}\beta_3$ -Integrin (Abb. A, B und C, Pfeile). In der Intermediärzone weisen mittelgroße bis größere Blutgefäße eine positive Immunreaktion für $\alpha_{\nu}\beta_3$ -Integrin auf (Abb. D und E, Pfeile). Vereinzelt lassen sich auch in der Intermediärzone großkalibrige Blutgefäße obne Immunreaktion für $\alpha_{\nu}\beta_3$ -Integrin dartetellon (E. Blockpfeil). großkalibrige Blutgefäße ohne Immunreaktion für $\alpha_{\nu}\beta_3$ -Integrin darstellen (E, Blockpfeil). Im Tumorzentrum waren größere Blutgefäße negativ für $\alpha_{\nu}\beta_3$ -Integrin (Abb. F, Blockpfeil). Diese Gefäße wurden von mehreren Tumorzellschichten zirkulär umgeben. A-F: 450x

4.6 Zonale Lokalisation von Laminin in Tumorgefäßen

In der Tumorumgebung waren große Blutgefäße negativ für Laminin. Kleinkalibrige Blutgefäße wiesen eine leichte Immunreaktion für Laminin auf. Fettzellen und Bindegewebszellen waren hingegen negativ (Abb. 11 A und B). Im Tumorrand waren Blutgefäße unterschiedlicher Größe positiv für Laminin (Abb. 11 B und C). Tumorzellen waren hingegen negativ. In der Intermediärzone waren überwiegend mittelkalibrige sowie wenige große Blutgefäße für Laminin positiv. Auch kleinere Aussprossungen von solchen Blutgefäßen wiesen eine positive Immunreaktion für Laminin auf (Abb. 11 C und D). Im Tumorzentrum fielen in der Übersicht kaum positiv markierte Blutgefäße für Laminin auf. In der höheren Vergrößerung erkannte man am Rande der apoptotischen Tumorzellen Laminin-positive Blutgefäße (Abb. 11 E und F). Selbst in nekrotischen Arealen waren die Reststrukturen der Blutgefäße, die eigentlich am Untergang begriffen waren, positiv für Laminin (Abb. 11 F). Keine spezifische Immunreaktion wurde in allen Kontrollen, die nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurden, gefunden.



Abb. 11 A-F: Färbung für Laminin am Rhabdomyosarkom

In der Tumorumgebung sind großkalibrige Blutgefäße negativ für Laminin (A, Blockpfeile). Kleine Blutgefäße sind jedoch positiv für Laminin (Pfeil). Im Tumorrand sind kleinere und größere Blutgefäße positiv für Laminin (B, C und D, Pfeile). Auch Aussprossungen von solchen Blutgefäßen weisen eine positive Immunreaktion für Laminin auf (D, Stern). Im Tumorzentrum sind Gefäße inmitten einer teilweise vital erscheinenden Tumorzellinsel positiv (E, Pfeil). Positiv sind auch Gefäße, die in einer völlig nekrotischen Tumorzellumgebung liegen (F, Pfeile). A-F: 450x

4.7 Integration von perivaskulären Zellen (Perizyten oder glatten Muskelzellen) in die Wand der Tumorgefäße anhand des Nachweises von alpha-Smooth-Muscle-Actin (α-SMA)

Um die Integration der peri-endothelialen Zellen in die Wand der Tumorgefäße genau untersuchen zu können, wurde die Immunfärbung für das glattmuskuläre Aktin (α -SMA) durchgeführt. In der Tumorumgebung waren größere und kleinere Blutgefäße jeweils gleich intensiv für α -SMA gefärbt. Fett- und Bindegewebszellen hingegen wiesen keine Färbung auf (Abb. 12 A). Besonders die Blutgefäße der Intermediärzone wiesen eine starke Immunreaktion für α -SMA auf (Abb. 12 B und C). Auffällig war weiterhin die Existenz einzelner Zellen im Stroma, die für α -SMA positiv waren (Abb. 12 B). Kleinere Kapillaren und Blutgefäße, die vermutlich keine Perizyten bzw. keine glatten Muskelzellen in ihrer Wand besaßen, ließen sich nicht durch die α -SMA-Färbung identifizieren.

Im Tumorzentrum waren wenige α-SMA-positive Blutgefäße mittleren Kalibers nachzuweisen. Diese befanden sich überwiegend in zentralen Nekrosenzonen und wurden von zirkulär angeordneten Tumorzellen umgeben. Die glatten Muskelzellen größerer Blutgefäße wiesen zu dem bereits eine leichte Abrundung ihrer Zellen auf (Abb. 12 D, E und F). In parallel zu diesen Analysen geführten Kontrollschnitten war keine positive Immunreaktion für α-SMA nachzuweisen (Abb. 12 G).



Abb. 12 A-F: Färbung für alpha Smooth-Muscle-Actin am Rhabdomyosarkom In der Tumorumgebung und im Tumorrand sind zahlreiche positive kleine und größere Gefäße sichtbar (A, Pfeile). Die Intermediärzone ist durch kleine und größere Blutgefäße, die für α -SMA positiv sind, durchsetzt (Abb. B und C). Einzelne Zellen im Stroma waren positiv für α -SMA (Abb. B, Blockpfeile). Im Tumorzentrum sind intakte Tumorinseln zu erkennen (Abb. D, E und F). Inmitten dieser Tumorinseln befinden sich α -SMA positive Blutgefäße. A-B: 200x; C-D: 350x; E-F: 450x



Abb. 12 G: Immunhistochemische Kontrolle

Dieser nur dem sekundären Antikörper exponiertem Gewebeschnitt zeigt beispielhaft aus dem Tumorzentrum keine spezifische Färbung. 450 x

5 Diskussion

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen erstmalig, dass entgegen der bisherigen Annahmen auch im Tumorgewebe Blutgefäße eine partielle Restabilisierung bzw. Reifung ihrer Wandstruktur erfahren. Dieser Prozess weist jedoch innerhalb des Tumors eine Gewebezonenabhängigkeit auf. Eine diesbezügliche Evaluierung zeigt, dass eine Untergliederung des Tumorgewebes in die Zonen, wie Tumorumgebung: keine Tumorzellinvasion, Tumorrand: der Randbereich oder die Marginalzone des Tumorgewebes, Intermediärzone: Übergang zwischen Tumorrand und Tumorzentrum, und schließlich Tumorzentrum sinnvoll war. Die strukturell stabilisierten Blutgefäße sind insbesondere in dem zentralen. mit Nekrosen durchsetzten Tumorgewebe und in den paranekrotischen Arealen zu finden. Parallel dazu kommt es offensichtlich zum Remodelling des Gefäßbettes in diesen Tumorzonen, bei der die nichtstabilisierten Blutgefäße sukzessive zurückgebildet werden, so dass im Vergleich zum Tumorrand im Tumorzentrum die Gefäßdichte abnimmt. Das Remodelling der Blutgefäße im Zentrum und in der Intermediärzone des Tumors ist assoziiert damit, dass 4-7 Tumorzellschichten zirkulär um diese stabilen Blutgefäße angeordnet und ausreichend versorgt sind. Diese Tumorzellen sind vital und können somit die zentral stattfindende Nekrose überleben.

5.1 In der Tumorumgebung des Rhabdomyosarkoms zeigt das Gefäßbett eine normale Hierarchie

In zahlreichen bisherigen Publikationen ist berichtet worden, dass Blutgefäße des Tumorgewebes chaotisch organisiert sind (Jain, 2005) und

keine Hierarchie in Form von großen, mittelgroßen und kleinen Blutgefäße aufweisen (Jain, 2003). Diese chaotische Organisation steht in einem engen Zusammenhang mit dem strukturellen Reifezustand der Gefäße (Jain, 2003). Die hier vorgelegten Befunde belegen am Beispiel eines experimentellen Rhabdomyosarkoms der Ratte eine Heterogenetität der Gefäßorganisation im Tumorgewebe, die ein zonales Muster aufweist. Die Tumorumgebung stellt in diesem Zusammenhang die Region dar, wohin die Tumorzell-Cluster bei weiterem Wachstum hinein invadieren und somit auch Zugriff auf bereits dort existierende Blutgefäße haben werden. Auf der anderen Seite stehen insbesondere die Blutgefäße der engen Tumorumgebung unter dem Einfluss vasoaktiver und angiogenetischer Faktoren, die von Tumorzellen gebildet und sezerniert werden. Sie wirken parakrin an den Blutgefäße und aktivieren sie zur Angiogenese. Sowohl die immunhistochemischen als auch die hier durchgeführten ultrastrukturellen Analysen der Blutgefäße dieser Region zeigen zumindest in diesem Tumormodell, dass die Blutgefäße der Tumorumgebung im wesentlichen eine der Organisation des normalen Gefäßsystem ähnlichen Organisation aufweisen, die eine klare Hierarchie erkenn lässt. Nur in den Gewebebereichen direkt am Tumorrand ist ein Teil der Blutgefäße strukturell destabilisiert, was darauf hin deutet, dass eine angiogenetische Aktivierung der Gefäße in diesen Arealen bereits in Gang gesetzt ist.

Die hier vorgelegten Befunde stimmen mit den Befunden überein, die bei Leydigzell-Tumoren des menschlichen Hodens erhoben wurden (Kilic et al., 1999). Hier konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Expression des angiogenetischen Faktors, VEGF und seiner Rezepto-

ren in den Tumorrandarealen stark erhöht war. Es wurde postuliert, dass VEGF parakrin an den benachbarten bereits existierenden Gefäßen wirksam wird und zu der Destabilisierung der Blutgefäße führt. Der Fokus dieser Arbeit lag eher darauf, nachzuweisen, inwiefern die neugebildeten Tumorgefäße wieder eine strukturelle Restabilisierung erfahren, wenn ja, in welchem Umfang und mit welchen Konsequenzen für das Tumorgewebe.

Diese Befunde sind insoweit von funktioneller Bedeutung für Tumorwachstum und Metastasierung, dass erstens die Initiierung der angiogenetischen Vaskularisierung der invasiv wachsenden Tumorzellstränge in den genannten Gewebearealen erfolgt, und zweitens über diese Gefäße einerseits Blutzufuhr zum Tumorgefäßbett stattfindet, andererseits diese Gefäße auch für eine effiziente Zufuhr von therapeutisch applizierten Substanzen, wie Chemotherapeutika von enormer Bedeutung sind.

5.2 Die Tumorrandzone weist stark vernetzte und strukturell instabile Blutgefäße auf

Im Gegensatz zu der Tumorumgebung besteht das Blutgefäßbett in den Randzonen des Rhabdomyosarkoms der Ratte im Wesentlichen aus den instabilen Blutgefäßen. Das bisher in der Literatur berichtete Chaos bei der Organisation der Tumorgefäße (Jain, 2003 und 2005) trifft am stärksten für diese Tumorzone zu. Insbesondere die Existenz der Blutkapillaren ohne eine feste Integration von Perizyten und ohne eine normal strukturierte Basallamina, wie die elektronenmikroskopi-

schen Aufnahmen hier belegen, ist ein deutlicher Hinweis auf den unreifen Aufbau dieser Gefäße. Diese Interpretation wird auch durch die hier präsentierten Befunde untermauert, dass zwar in dieser Tumorzone einzelne Zellen, die für glattmuskuläres Aktin positiv sind, vorkommen, die aber keine besondere Assoziation zu der Wand der Tumorgefäße aufweisen. Diese strukturellen Defizite bilden vermutlich die Ursache dafür, dass in dieser Zone kaum eine Gefäßhierarchie in Form von Makro- und Mikrogefäßen erkennbar ist.

Da in elektronenmikroskopischen Analysen der überwiegende Teil der Kapillaren dieser Tumorregion kaum inter-endotheliale Kontakte aufweist, ist eine pathologisch gesteigerte Durchlässigkeit der endothelialen Barriere und somit eine erhöhte Gefäßpermeabilität anzunehmen. Obwohl wenige neuere Publikationen belegen, dass beide Vorgänge, nämlich pathologisch gesteigerte Gefäßpermeabilität und der Grad der angiogenetischen Aktivität nicht unbedingt miteinander verknüpft sein müssen (Gratton et al., 2003), geht eine pathologische Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit in den meisten Fällen, so auch in der Tumorvaskularisierung, mit der Initiierung der Angiogenese einher (Issbrucker et al., 2003). In der vorgelegten Arbeit wurde zwar die Gefäßpermeabilität nicht untersucht, jedoch weist die besonders starke Immunfärbung für $\alpha_{v}\beta_{3}$ -Integrin in den Blutgefäßen der Tumorrandzone darauf hin, dass in dieser Tumorregion eine hohe angiogenetische Aktivität vorliegt. Es ist durch zahlreiche Publikationen belegt, dass $\alpha_{v}\beta_{3}$ -Integrin hauptsächlich in der Wand neuformierter Blutgefäße in nennenswerter Menge nachweisbar ist (Brooks et al., 1994). Auch die hohe Gefäß-

dichte und die starke Vernetzung der Blutgefäße in dieser Zone unterstützt diese Interpretation. Interessanterweise umschließen die stark vernetzten Blutgefäße Tumorzell-Cluster, die meistens aus zwei bis drei Zellreihen gebildet werden. Tumorzellen haben somit eine sehr enge und direkte Beziehung zu den Endothelzellen dieser unreifen Blutgefäße.

5.3 Blutgefäße der intermediären Tumorzone weisen eine heterogene Organisation auf

Die Intermediärzone befindet sich innerhalb des jeweiligen Tumorknotens zwischen der Randzone und dem Tumorzentrum. In dieser Zone ist ein heterogenes Muster des Gefäßbildes erkennbar, bestehend aus Blutgefäßen mit einem deutlich größeren Durchmesser im Vergleich zu den Blutgefäßen der Tumorrandzone und auch aus Blutgefäßen, die noch unreif erscheinen. Die in Endothelzellen der großen Blutgefäße in dieser Zone nachweisbare starke Immunfärbung für Ang1 spricht dafür, dass diese Gefäße eine gewisse strukturelle Stabilisierung erfahren haben oder teilweise schon stabilisiert sind. Passend dazu sind die hier vorgelegten Befunde hinsichtlich der engen Anbindung der Zellen, die für glattmuskuläres Aktin stark positiv sind und somit wahrscheinlich glatte Muskelzellen oder Perizyten darstellen, die in die Wand der großen Gefäße integriert sind. Schließlich bestätigen die elektronenmikroskopischen Befunde, dass die Blutgefäße dieser Zone strukturell relativ stabilisiert sind. Im Gegensatz zu den Blutgefäßen der Tumorrandzone sind die großen Blutgefäße der Intermediärzone negativ für Ang2. Dies ist ein Hinweis darauf, dass solche Blutgefäße parallel zu der struktu-

rellen Stabilisierung eine Umwandlung von einem angiogenetisch aktiven zu einem eher ruhenden ("quiescent") Phänotyp vollziehen.

Die Heterogenität der Tumorgefäße ist in der Literatur beschrieben (Jain, 2003 und 2005), allerdings ist bisher über eine zonale Zuordnung nicht berichtet worden. Auch die funktionelle Bedeutung dieses Gefäßmusters für das Tumorgewebe ist bisher nicht ausreichend berücksichtigt worden. Kürzlich wurde berichtet, dass die Stabilisierung der Tumorgefäße mit einer Veränderung der hämodynamischen Perfusionsverhältnisse einher gehen könnte, was dazu führt, dass bestimmte Tumorareale um solche stabilisierte Gefäße nicht mehr ausreichend durchblutet werden können (Ergün et al., 2006). Die hier vorgelegten Befunde unterstützen diese Annahme insoweit, dass auch bei diesem Rhabdomyosarkommodell der Ratte die Stabilisierung der Tumorgefäße damit einhergeht, dass Tumorzellen mehr und mehr sich ringförmig um solche stabilisierte Blutgefäße organisieren und insgesamt die Gefäßdichte im Vergleich zum Tumorrandbereich abnimmt. Insgesamt ergibt sich somit aus der Tumor-Blutgefäß-Interaktion ein Organisationsmuster, bei dem nicht die Tumorzellgruppen von einem dichten Netz von Blutgefäßen umschlossen sind, wie in der Randzone, sondern Tumorzellen stärker um das stabilisierte Blutgefäße organisiert sind. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die in dieser Tumorzone beginnende teilweise Stabilisierung der Blutgefäße den ersten Schritt einer hierarchischen Gefäßordnung einleitet und dies offensichtlich mit einer Umstrukturierung des Tumorgewebes einhergeht. Auch wenn dieser Prozess bei weitem nicht den Zustand einer Gefäßhierarchie eines

normalen Blutgefäßbettes erreicht, so scheinen die dadurch ausgelösten Effekte hinsichtlich des Tumorwachstums und der Metastasierung von Bedeutung zu sein.

5.4 Die Stabilisierung der Tumorgefäße resultiert in ausgedehnten nekrotischen Gewebearealen im Tumorzentrum

Der Zusammenhang zwischen der vaskulären Stabilisierung und dem Tumorgewebe wird am deutlichsten im Tumorzentrum sichtbar. Die in dieser Arbeit vorgelegten morphologischen und immunhistochemischen Analysen hier belegen, dass nur die Tumorzellgruppen, die zirkulär um ein stabilisiertes Blutgefäß organisiert sind, überleben, während die restlichen Tumorareale dieser Zone durch extensive Nekrosen gekennzeichnet sind. Die zentrale Tumornekrose ist ein allgemein bekanntes Phänomen und wird bisher darauf zurückgeführt, dass in dieser Zone der interstitielle Druck durch Ansammlung der Flüssigkeit erhöht sei und das letztendlich zum Untergang des Tumorgewebes führe (Jain, 2005; Heldin et al., 2004). Die hier vorgelegten Befunde sprechen dafür, dass dieser Erklärungsansatz vermutlich nur teilweise zutrifft. Damit kann man z.B. nicht erklären, wieso trotz der zentralen Nekrose die in drei bis vier Zellreihen um ein stabilisiertes Blutgefäß organisierte Tumorzellen überleben. Das weist darauf hin, dass die Nekrose in erste Linie nicht durch die Druckverhältnisse bedingt ist, sondern vermutlich durch Veränderung der Perfusionsverhältnisse. Die Grundlage für diese Veränderung wird durch die teilweise Stabilisierung der Tumorgefäße geliefert, die offensichtlich mit einer zeitlichen Verzögerung in Relation zum Tumorwachstum in Gang kommt. Aus

den hier vorgelegten Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass erst in zentralen und intermediären Zonen des Tumorknotens der Prozess der vaskulären Stabilisierung greift.

Die strukturelle Stabilisierung der Gefäßwand ist aus mehreren Parametern lesbar. Erstens sind die peri-endothelialen Zellen in den großen Gefäßen besser in die Gefäßwand integriert. Die hier vorgelegten immunhistochemischen Befunde bezüglich der Lokalisation des glattmuskulären Aktins zeigen eine feste Bindung der glatten Muskelzellen in die Wand der Blutgefäße im Tumorzentrum, die interessanterweise einen größeren Durchmesser aufweisen als die Blutgefäße im Tumorrandbereich. Zweitens werden diese Befunde durch elektronenmikroskopische Ergebnisse bestätigt, die ebenfalls eine mehr oder weniger reguläre ultrastrukturelle Integration glatter Muskelzellen in die Gefäßwand ergeben. Drittens sind die großen Blutgefäße des Tumorzentrums negativ für α_v ß₃-Integrin, ein Hinweis darauf, dass diese Gefäße angiogenetisch nicht mehr aktiv sind.

Des Weiteren zeigen die Immunfärbungsergebnisse für Laminin interessanterweise, dass selbst in nekrotischen Arealen die Basalmembran der Blutgefäße, deren Lumina eindeutig erkennbar sind, teilweise noch erhalten ist. Eine endotheliale Auskleidung besitzen diese Blutgefäße in der Regel nicht mehr und um solche Gefäßstrukturen gibt es auch keine Tumorzellen mehr. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die stabilisierten Blutgefäße im Zuge der Nekroseentwicklung schließlich auch und möglicherweise als letzte Strukturen untergehen. Diese Be-

funde unterstützen die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass die vermutlich durch die vaskuläre Stabilisierung ausgelösten hämodynamischen Veränderungen entscheidend zu der Entwicklung der Tumornekrose beitragen und daher die stabilisierten Gefäße selbst erst nach Untergang des Tumorgewebes zusammenbrechen. Übereinstimmend damit steht die hier berichtete Beobachtung, dass im Rahmen der vaskulären Stabilisierung die Tumorgefäße, die als Abzweigung aus den stabilisierten Gefäßen entspringen und deren Perfusion vermutlich den Bedarf des von diesen Gefäßen versorgten Tumorgewebes nicht mehr entspricht, als erstes gemeinsam mit dem sie umgebenden Tumorgewebe nekrotisch werden.

Zusammenfassend kann aus den hier vorgelegten Befunden geschlussfolgert werden, dass in bestimmten Arealen oder Zonen des Tumorgewebes, z.B. das Tumorzentrum und die benachbarte Intermediärzone, eine strukturelle Stabilisierung der Blutgefäße erfolgt, wenn auch nicht in dem Ausmaß der normalen Gefäße. Mit diesem Prozess kommt es offensichtlich zu einer Reorganisierung des Tumorgefäßbettes in diesen Zonen, die in einer Reduktion der Gefäßdichte resultiert. Die Ursache für die geringere Gefäßdichte im Vergleich zum Tumorrand liegt vermutlich darin, dass die strukturell instabilen Blutgefäße zunehmend von der Perfusion abgeschnitten werden. Die von diesen instabilen Blutgefäßen versorgten Areale des Tumorgewebes werden nekrotisch, so dass nur die um die stabilisierten Gefäße organisierten Tumorzellen überleben. Damit zeigt die vorgelegte Arbeit, dass die Stabilisierung der Tumorgefäße offensichtlich nicht das Tumorwachs-

tum fördert sondern hemmt. Diese Erkenntnis ist insofern von klinischer Bedeutung, dass die therapeutische Manipulation im Sinne einer Beschleunigung dieses Prozesses im Rahmen anti-angiogenetischer Tumortherapie eingesetzt werden könnte.

6 Literaturverzeichnis

Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J, Gospodarowicz D & Fiddes JC (1986). Human basic fibroblast growth factor: Nucleotide sequence and genomic organization. EMBO J. 5:2523-2528

Achen MG and Stacker SA (1998). The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. Int J Exp Pathol 79:255-65

Asahara T and Kavamoto A (2004). Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. Am J Physiol Cell Physiol 287:C572-79

Aumailley M and Smyth N (1998). The role of laminins in basement membrane function. J Anat 193:1-21

Baird A, Klagsbrun M (1991). The fibroblast growth factor family. Cancer Cells 3:239-243

Baker HJ, Lindsay JR, Weisbroth SH (1979). The laboratory rat. Academic Press, New York: Vol 1 and 2

Balabanov R, Dore-Duffy P (1998). Role of the CNS microvascular pericyte in the brain-blood barrier. J Neurosci Res 53:637-44

Baldwi ME, Roufail S, Halford MM, Alitalo K, Stacker SA and Achen MG (2001). Multiple forms of mouse vascular endothelial growth factor-D are generated by RNA splicing and proteolysis. J Biol Chem 276:44307-14

Baluk P, Hashizume H, Mc Donald DM (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. Curr Opin Genet Dev 15:102-11

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. Blood 87:3336-43

Barleon B, Siemeister G, Martiny-Baron G, Weindel K, Herzog C, Marme D (1997). Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. Cancer Res 57:5421-5

Barth AIM, Näthke IS, Nelson WJ (1997). Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signalling pathways. Curr Opin Cell Biol 9:683-90

Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D Keshet E (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. J Clin Invest 103:159-65 Bischoff, J (1995). Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis, Trends in Cell Biol. 5: 69-73

Boehm T, O'Reilly MS, Keough K, Shiloach J shabpiro R and Folkman J (1998). Zinc- binding of endostatin is essential for its antiangiogenic activity. Biochem Biophys Res Commun 252:190-94

Bouïs D, Kusumanto Y, Meijer C, Mulder NH, Hospers GAP (2006). A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. Pharm Res 53:89-103

Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W (1992). Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. Development 114: 521-532

Breier G, Heidenreich R, Gaumann A, Groot M, Licht A, Nicolaus A, Schmitz J, Reichmann E, Plate KH, Vajkoczy P (2002). Regulators of angiogenesis as targets for anti-angiogenic tumor therapy. Ann Hematol 81:71-72

Breviario F, Caveda L, Corada M, Martin-Padura I, Navarro P, Golay J, Introna M, Gulino D, Lampungnani MG, Dejana E (1995). Functional properties of human vascular endothelial Cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific Cadherin. Arteriosler Thromb Vasc Biol 15:1229-39

Brooks PC, Clark RA and Cheresh DA (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. Science 264:569-71

Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF & Van De Water L (1992). Expression of vascular permeability factor (/vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. J. Exp. Med. 176: 1375-1379

Brown LF, Detmar M, Tognazzi K, Abu-Jawdeh G, Iruela-Arispe ML (1997). Uterine smooth muscle cells express functional receptors (flt-1 and KDR) for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. Lab Invest 76:245-55

Carmeliet P, Ferreira V. Brier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gerstenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W & Nagy A (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature 380: 435-439

Carmeliet P (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med 6:389-95

Cheng YF and Kramer RH (1989). Human microvascular endothelial cells express integrin-related complexes that mediate adhesion to the extracellular matrix. J Cell Physiol 139:275-86

Christofori G. The role of fibroblast growth factors in tumor progression and angiogenesis. In: R. Bicknell C.E. Lewis, N. Ferrara (Hrsg.) (1997): Tumour angiogenesis, S. 201-237. Oxford University Press, Oxford

Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM & Feder J (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. J Clin Invest 84:1470-1478.

Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampungnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Dejana E (1999). VE-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 96:9815-20

Davidoff M and Schulze W (1990). Combination of the peroxidase antiperoxidase (PAP)-and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)techniques: an amplification alternative in immunocytochemical staining. Histochemistry 93:531-36

Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC and Yancopoulos GD (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning [see comments], Cell 87:1161-9

Davis GE, Bayless KJ, Mavila A (2002). Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices. Anat Rec 268:22-75

Davis GE, Bayless KJ (2003). An Integrin and Rho GTPase-dependent pinocytic vacuole mechanism controls capillary lumen formation in collagen and fibrin matrices. Microciruclation 10:27-44

Davis GE and Senger DR (2005). Endothelial Extracellular Matrix: Biosynthesis, Remodelling, and Functions During Vascular Morphogenesis and Neovessel Stabilization. Circ Res 97:1093-1107

Dejana E, Bazzoni G and Lampugnani MG (1999). Vascular endothelial (VE)-cadherin: only intercellular glue? Exp Cell REs 252:13-9

Dejana E, Spagnuolo R and Bazzoni G (2001). Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. Thromb Haemost 86:308-15

Detmar M, Brown LF, Berse B, Jackman RW, Elicker BM, Dvorak HF & Claffey KP (1997). Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. J. Invest. Dermatol. 108:263-268

Dixelius J, Cross MJ, Matsumoto T and Claesson-Welsh L (2003). Endostatin action and intracellular signalling: beta-catenin as a potential target? Cancer Lett 196:1-12 Dumont DJ, Gradwohl GJ, Fong G-H, Auerbach R Breitman ML (1993). The endothelial-specific receptor tyrosine kinase, Tek, is a member of a new subfamily of receptors. Oncogene :1293-1301

Dumont DJ, Gradwohl G, fong GH, Puri MC, Gerstenstein M, Auerbach A, Breitman ML (1994). Dominant negative and targeted null mutation in the endothelial receptor tyrosine kinase, Tek, reveals a critical role in vasculogenesis of the embryo. Genes Dev 8:1897-1909

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M and Dvorak AM (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol 146:1029-39

Dvorak HF (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. J Clin Oncol 20:468-80

Engbring JA and Kleinman HK (2003). The basement membrane matrix in malignancy. J Pathol 200:465-70

Engvall E and Wewer UM (1996). Domains of laminin, J Cell Biochem 61:493-501

Ergun S, Empen W and Fiedler W (1997). VEGF modulate the capillaries of the human epididymis. Adv exp Med Biol 424:189-90

Ergun S, Kilic N, Fiedler W, Mukhopadhyay AK (1997). Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. Mol Cell Endocrinol 131:9-20

Ergun S, Tilki D, Oliveira-Ferrer L, Schuch G, Kilic N (2006). Significance of vascular stabilization for tumor growth and metastasis. Cancer Letters 238:180-7

Ferrara N, Henzel WJ (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 161:851-8

Ferrara N, carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ & Moore MW (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted disruption of the VEGF gene. Nature 380: 439-442

Ferrara N & Keyt B (1997). Vascular endothelial growth factor: Basic biology and clinical implications. EXS: 79: 209-232

Ferrara N, Gerber HP and LeCouter J (2003). The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 9:669-76

Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J Exp Med 133:275-88

Folkman J and Haudenschild C (1980). Angiogenesis *in vitro*. Nature 288:551-556

Folkmann J & Klagsbrun M (1987). Angiogenic factors. Science 235:442-447

Folkman J (1991). Biologic Therapy of Cancer. J.B. Lippincott Co., Philadelphia pp. 743-753

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

Folkman J and D'Amore PA (1996). Blood vessel formation: what is its molecular basis? Cell 87:115-5

Folkman J (1997). Angiogenesis and angiogenesis inhibition: An overview. In: Regulation of Angiogenesis, S. 1-8. Edited by Goldberg ID and Rosen EM. Birkhäuser Verlag

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M and Breitman ML (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. Nature 376:66-70

Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA & Cheresh DA (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct α_v integrins. Science 270: 1500-1502

Gabbiani G, Kocher O, Bloom WS, Vandekerckhove J, Weber K (1984). Actin expression in smooth muscle cells of rat aortic intimal thickening, human atheromatous plaque, and cultured rat aortic media. J Clin Invest 73:148-52

Galzie z, Kinsella AR, Smith JA (1997). Fibroblast growth factors and their receptors. Biochem Cell Biol 75:669-685

Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hosfeld DK, Fiedler W (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. Blood 95:3106-12

Gerber HP, Dixit V & Ferrara N (1998). Vascular endothelial growth factor induces expression oft the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. J. Biol. Chem. 273: 13313-13316

Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J (1989). Isolation and characterization of vascular endothelial cell mitogen produced by pituitaryderived folliculo stellate cells. Proc Natl Acad Sci USA 86:7311-5

Gotsch U, Borges E, Bosse R, Boggemeyer E, Simon M, Mossmann H and Vestweber D (1997). VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. J Cell Sci 110(Pt %):583-8 Gumbiner BM (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell 84:345-57

Gupta K, Kshirsagar S, Li W. Gui L, Ramakrishnan S, Gupta P, Law PY & Hebbel RP (1999). VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signalling. Exp. Cell Res. 247: 495- 504

Gratton JP, Lin MI, Yu J, Weiss ED, Jiang ZL, Fairchild TA, Iwakiri Y, Groszmann R, Claffey KP, Cheng YC, Sessa WC (2003). Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice. Cancer Cell 4:31-9

Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM (2005). Expression and Function of Laminins in the Embryonic and Mature Vasculature. Physiol Rev 85:979-1000

Hanahan D, Folkman J (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86:353-64

Hanahan D (1997). Signalling vascular morphogenesis and maintenance. Science 277:48-50

Hanahan D (1998). A flanking attack on cancer [news], Nat Med 4:13-4

Hansen-Algenstaedt N, Joscheck C, Schaefer C, Lamszus K, wolfram L, Biermann t, Algenstaedt P, Brockmann MA, Heintz C, Fiedler W, Ruther W (2005). Long-term observation reveals time-course-dependent characteristics of tumour vascularisation. Eur J Cancer 41:1073-85

Hatva E, Jaaskelainen J, Hirvonen H, Alitalo K and Haltia M (1996). Tie endothelial cell-specific receptor tyrosine kinase is upregulated in the vasculature of arteriovenous malformations. J Neuropathol Exp Neurol 55:1124-33

Heldin CH, Rubin K, Pietras, Ostman A (2004). High interstitial fluid pressure – an obstacle in cancer therapy. Nat Rev Cancer 4:806-13

Herold-Mende C, Steiner HH, Andl T, Riede D, buttler A, Reisser C, fusenig NE, Mueller MM (1999a). Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. Lab Invest 79:1573-82

Herold-Mende C, Andl T, Laemmler F, Reisser C, Mueller MM (1999b). Cell carcinoma of the head and neck. HNO 47:706-11

Hobson B, Denekamp J (1984). Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. Br J Cancer 49:405-13

Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nat Med 1:149-53
Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B and Leung DW (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. Mol Endocrinol 5:1806-14

Hynes RO (1992). Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. Cell 69:11-25

Issbrucker K, Marti HH, Hippenstiel S, Springmann G, Voswinckel R, Gaumann A, Breier G, Drexler HC, Suttorp N, Clauss M (2003). P38 MAP kinase - a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. FASEB J 17:262-4

Jain RK (2003). Molecular regulation of vessel maturation. Nature medicine 6:685-691

Jain RK (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. Science 307:58-62

Jain RK (2005). Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts. Oncology 19:7-16

Jung H, Beck H, Brammer I, Zywietz F (1981). Depopulation and repopulation oft the R1H rhabdomyosarcoma of the rat after x-irradiation. Europ J cancer 17:375-86

Jung H, Krüger JH, Brammer I, Zywietz F, Beck-Bornholdt HP (1990). Cell population kinetics of the rhabdomyosarcoma R1H of the rat after single doses of x-rays. Int J Radiat Oncol Biol Phys 57:567-89

Kaipainen A, Vlaykova T, Hatva E, Bohling T, Jekunen A, Pyrhonen S and Alitalo K (1994). Enhanced expression oft the tie receptor tyrosine kinase messenger RNA in the vascular endothelium of metastatic melanomas. Cancer Res 54:6571-7

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M. Rauvala H, Betsholtz C and Alitalo K (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. Nat Immunol 5:74-80

Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y (1995). Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. Cancer Res 55:5687-92

Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N (1996): The carboxyl terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. J Biol Chem 271:7788-95

Kilic N, Fiedler W, Holstein AF, Ergün S (1997). Expression of VEGF and ist receptors and capillary density in Leydig cell tumors of the human testis. Adv Exp Med Biol 424:181-2

Kilic N, Lauke H, Fiedler W, Pottek T, Kilic E, Freeman MR, Ergun S (1999). Angiogenic switch and vascular stability in human Leydig cell tumours. Angiogenesis 3:231-40

Klagsbrun M and D'Amore PA (1996). Vascular endothelial growth factor and its receptors. Cytokine Growth Factor Rev 7:259-70

Koh GY, Kim I, Kwak HJ, Yun M, Leem JC. Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiopoietin. Exp Mol Med 34:1-11

Korhonen J, Partanen J, Armstron E, Vaahtokari A, Elenius K, Jalkanen M, Alitalo K (2002). Enhanced expression of the tie receptor tyrosine kinase in endothelial cells during neovascularization. Blood 80:2548-55

Lachgar S, Charveron M, Gall Y, Bonafe JL (1999). Inihibitory effects of retinoids on vascular endothelial growth factor production by cultured human skin keratinocytes. Dermatology 199:25-7

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic Mitogen. Science 246:1306-9

Liao F, Li Y, O'Connor W, Zanetta L, Bassi R, Santiago A, Overholser J, Hooper A, Dejana E, Hicklin J, Bohen P (2000). Monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin is a potent inhibitor of angiogenesis, tumor growth, and metastasis. Cancer Res 60:6805-10

Maisonpierre PC, Goldfarb M, Yancopoulos GD, Gao G (1993). Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family. Oncogene 8:1631-1637

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1997). Angiopoeietin-2: a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. Science 2:55-60

Malinda KM, Kumizu M, Chung M, Delgado M, Kuratomi Y, Yamada (1999). Identification of laminin α 1 and β 1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. Fed Am Soc Exp Bio J 13:53-62

Marti HH & Risau W (1998). Systemic hypoxia changes the organspecific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 15809-15814

McDonald DM, Baluk P (2002). Significance of blood vessel leakiness in cancer. Cancer Res 62:5381-85

Mignatti P, Rifkin DB (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. Physiol Rev 73:161-95

Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W and Ullrich A (1993). High affinity VEGF binding a development expression suggests Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. Cell 72:835-46

Moses MA (1997). The regulation of neovascularization of matrix mettalloproteinases and their inhibitors. Stem cells 15:180-9

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S and Poltorak Z (1999). Vacular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J 13:169-75

Nollet F, Kools P, Van Roy F (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. J Mol Biol 299:551-72

Nomi M et al., 2005. Endostatin reduces vascular leakage by promoting vascular integrity. Submitted

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR and Folkman J (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell 88:277-85

Patarroyo M, Tryggvascon K and Virtanen I (2002). Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. Semin Cancer Biol 12:197-207

Pugh CW and Ratcliffe PJ (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: a role of the HIF system. Nat Med 9:766-84

Quinn TP, Peters KG, De VC, Ferrara N and Williams LT (1993). Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. Proc Natl Acad Sci USA 90:7533-37

Rafii S, Lyden D, Beneztra R, Hattori K, Heissig B (2002). Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? Nat Rev Cancer 2:826-35

Roberts WG and Palade GE (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. J Cell Sci 108 (Pt6):2369-2379

Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. Nature 376:62-66

Schnurch H, Risau W (1993). Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. Development 119:957-968

Schuch G, Oliveira-Ferrer L, Loges S, Laack E, Bokemeyer C, Hossfeld DK, Fiedler W, Ergün S (2005). Antiangiogenic treatment with endostatin inhibits progression of AML in vivo. Leukemia 19:1312-7

Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris a, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P (1998). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. J Cell Biol 141:1659-73

Semenza GL (2003). Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. Annu. Rev. Med. 54:17-28

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS & Dvorak HF (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 219: 983-985

Senger DR, Perruzzi CA, Feder J and Dvorak HF (1986). A highly conseved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. Cancer Res 46:5629-32

Senger DR, Connolly DT, Van de WL, Feder J and Dvorak HF (1990). Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumorsecreted vascular permeability factor. Cancer Res 50:1774-78

Shalaby F. Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML and Schuh AC (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature 376:62-66

Shibuya M (1999). Angiogenesis vascular endothelial growth factor and its receptors. Hum Cell 12:17-24

Shima DT, Deutsch U and D'Amore PA (1995). Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. FEBS Lett 370:203-08

Stacker SA, Caesar C. Bladwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H and Achen MG (2001). VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. Nat Med 7:186-91

Stacker SA, Baldwin ME and Achen MG (2002). The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. FASEB J 16:922-34

Stratmann A, Risau W. Plate KH (1998). Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and agiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. Am J Pathol 153:1459-66

Suzuki S, Sano K and Tanihara H (1991). Diversity of the Cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. Cell Regul 2:261-70 Takeichi M (1990). Caherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. Annu Rev Biochem 59:237-52

Tammela T, Enholm B Alitalo K and Paavonen K (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. Cardiovasc Res 65:550-63

Tischer E, Mitchell R, Harman T, Silva M, Gospodarowicz D, fiddes JC, Abraham JA (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. J Biol Chem 266:11947-54

Torres-Vazquez J, Kamei M, Weinstein BM (2003). Molecular distinction between arteries and veins. Cell Tissue Res 314:43-59

Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, Mc Clain J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Huang T, Papadopoulos N, Maisonpierre PC, Davis S, Yancopoulos GD (1999). Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. Proc Natl Acad Sci U S A 96:1904-9

Veikkola T and Alitalo K (1999). VEGFs, receptors and angiogenesis. Semin Cancer Biol 9:211-20

Vleminckx K and Kemler R (1999). Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signalling. Bioessays 21:211-20

Wagner EF, Risau W (1994). Oncogenes in the study of endothelial cell growth and differentiation. Semin Cancer Biol 5:137-45

Watanabe Y & Dvorak HF (1997). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor inhibits anchorage-disruption-induced apoptosis in microvessel endothelial cells by inducing scaffold formation. Exp. Cell Res. 233: 340-349

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature 407:242-8

Yano M, Iwama A, Nishio H, Suda J, Takada G and Suda T (1997). Expression and function of murine receptor tyrosine kinases, TIE and TEK, in hematopoietic stem cells. Blood 89:4317-26

Yoshida A, Apte B, Zetter BR (1996). Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. Growth factors 13:57-64

Yu Y, Moulton KS Khan MK, Vineberg S, Boye E, Davis VM, O'Donnell PE Bischoff J and Milstone DS(2004). E-selectin is required for the antiangiogenic activity of endostatin. Proc Natl Acad Sci USA 101:8005-10

Zaborszky L and Leranth C (1985). Simultaneous ultrastructural demonstration of retrogradely transported horseradish peroxidase and choline acetyltransferase immunoreactivity. Histochemistry 82:529-37

Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichenspurner H, Kilic N, Ergün S (2006). Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. Development 133:1543-51

Zhao R, Pathak AS and Stouffer GA (2004). β_{3-} Integrin cytoplasmic binding proteins. Arch Immunol Ther Exp 52:348-55

Zywietz F (1990). Vascular and cellular damage in a murine tumor during fractionated treatment with radiation and hyperthermia. Strahlenther On-kol 166:493-501

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Süleyman Ergün danke ich ganz besonders für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas, seine hervorragende Betreuung und seine kritischen Anregungen sowie für sein Engagement am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. A.F. Holstein und Frau Prof. Dr. med. G.M. Rune danke ich dafür, dass ich die wissenschaftlichen Experimente im Rahmen dieser Dissertation in den Laboratorien des Anatomischen Institutes im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchführen durfte.

Herrn Prof. Dr. med. F. Zywietz, Abteilung Strahlenphysik danke ich insbesondere für die Überlassung der Rhabdomyosarkomgewebe, die mir diese Dissertation erst ermöglicht hat.

Ganz herzlich danke ich den medizinisch-technischen Assistentinnen des Anatomischen Institutes, Frau M. Köhler, Frau A. Salewski, Frau M. Böge und Frau K. Miethe, für ihre hervorragenden technischen Hilfestellungen.

Insbesondere möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken, ohne die ich diesen Weg nie eingeschlagen hätte. Ebenfalls bei meiner lieben Tochter, ohne deren Verzicht auf gemeinsame Stunden, diese Arbeit nicht hätte intensiver angegangen werden können.

Letztlich möchte ich mich bei Herrn R. Barone für die große Hilfe beim Layout bedanken und bei Frau Dr. med. N. Kilic für die kritischen Diskussionen.

8 Abkürzungsverzeichnis

α-SMA	alpha-Smooth-Muscle-Actin
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
Ang1 und 2	Angiopoietin-1/-2
BSA	Bovine Serum Albumine
CD34	Cluster of Differentiation 34
EZ	Endothelzellen
EZM	Extrazellulärmatrix
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
Flk-1	Fetal Liver Kinase-1
Flt-1, -4	Fms-like Tyrosine kinase-1, -4
HE	Hämatoxylin/Eosin
ΗΙΕ-1α, -2 α, -3 α	Hypoxia Inducible Factor-1 alpha, -2 alpha, -3 alpha
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilo Dalton
KDR	Kinase-insert Domain Receptor
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NaN ₃	Nickelsulfat
PAP	Peroxidase Anti-Peroxidase
PB	Phosphate-Buffer
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PIGF	Placenta-like Growth Factor
PDGF	Platelet-derived Growth Factor

RNA	Ribonucleic Acid
SMC	Smooth Muscle Cell
Tie-2	Tyrosine Kinase with Immunoglobulin and Epidermal Growth Factor Homology Do- main
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Sevinc, geb. Bas
Vorname:	Sema Sandra
Anschrift:	Haakestraße 10, 21075 Hamburg
Geburtsdatum/-ort:	12. Juli 1974, Herford
Familienstand:	verheiratet, eine Tochter, geb. 28.09.2002

Schulbildung

1980 – 1990	Grund- und Realschule Stengelestraße, Hamburg
1990 – 1993	Lohmühlen-Gymnasium, Hamburg
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

04/1994	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg
08/1996	Ärztliche Vorprüfung
08/1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

04/2001 - 08/2002	Neurologie, Prof. Dr. C. Weiller
	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
8/2002 - 12/2002	Innere Medizin, Prof. Dr. K.H. Kuck, Prof. Dr. Begemann
	Allgemeines Krankenhaus St. Georg, Hamburg
1/2002 - 03/2002	Chirurgie, Prof. Dr. Imig und Dres. Krauß u. Madée
	Allgemeines Krankenhaus Harburg, Hamburg

Studienbegleitende Tätigkeiten

- 1994-1995 Referentin im Allgemeinen Studierenden-Ausschuss für Hochschulpolitik, Universität Hamburg
- 1998-1999 Forschungsaufenthalt an der Harvard Medical School in Boston/USA
- 1999-2000 Studentische Hilfskraft im Haarforschungslabor der Hautklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bei Herrn Prof. Dr. R. Paus

Ärztliche Tätigkeit

Seit November 2003 Assistenzärztin in Weiterbildung zur Internistin im Krankenhaus Mariahilf, Abteilung für Innere Medizin, Hamburg

10Eidesstattliche Versicherung

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

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

Hamburg, den 21.08.2006

Unterschrift:....