

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Pathologie
Prof. Dr. med. Guido Sauter

Arbeit unter der Leitung von Dr. E.-C. Burandt, PD Dr. rer. nat. R. SIMON und
Prof. Dr. med. G. SAUTER

Der Verlust der VEGFR-1 Expression ist assoziiert mit aggressivem Tumortyp und verkürztem
Überleben bei Mammakarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von:

Julia Huber
aus Heidelberg

Hamburg 2013

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

27.10.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Prof. Dr. Volkmar Müller

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

PD Dr. Ronald Simon

INHALTSVERZEICHNISS

1. Einleitung	4
1.1. Mammakarzinom	4
1.2. Tumorneoangiogenese	5
1.3. Der Vaso-Endotheliale-Wachstumsfaktor VEGF	6
1.4. Die VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2	6
1.5. Weitere Liganden von VEGFR-1, Plazenta-Growth-Factor (PlGF), VEGF- B und VEGF-C	10
1.6. Vorkommen von VEGFR-1 bei unterschiedlichen Tumorentitäten	12
1.7. VEGFR-1 beim Mammakarzinom	13
1.8. Therapeutische Ansätze	13
2. Material und Methoden	15
2.1. Tissue-Micro-Array	15
2.2. Erstellung des Tissue-Micro-Array	16
2.3. Zusammensetzung des TMA	19
2.4. Immunhistochemie	19
2.5. Auswertung	19
2.6. Statistik	19
3. Ergebnisse	20
3.1. Technische Ergebnisse	20
3.2. Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der VEGFR-1 Immunhistochemie und histologischem Tumortyp, Zellproliferationsgrad und molekularen Markern	20
3.3. Einfluss der VEGFR-1 Expression auf das Überleben der Patientinnen und Ansprechen auf Therapie mit Tamoxifen	22
4. Diskussion	24
5. Zusammenfassung	29
6. Literaturverzeichnis	30
7. Danksagung	37
8. Lebenslauf	38
9. Eidesstattliche Erklärung	39

1. EINLEITUNG

1.1. Mammakarzinom

Brustkrebs ist die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau weltweit. Im Jahr 2008 wurden weltweit 1,38 Millionen Neuerkrankungen diagnostiziert und somit 23% aller Krebsneuerkrankungen, es gab 458.400 brustkrebsbedingte Todesfällen (14% aller Krebstodesfälle weltweit) (Ferlay et al., Jemal et al.).

Laut Zahlen des Robert-Koch-Institutes Hamburg gab es im Jahr 2006 in Deutschland 58.000 Neuerkrankungen bei einem mittleren Erkrankungsalter von 64 Jahren, welches deutlich unter dem Erkrankungsalter anderer Krebserkrankungen liegt. In den westlichen Industrienationen ist die Inzidenz des Mammakarzinoms in den 1980-er und 1990-er Jahren angestiegen, mitbedingt durch den Einsatz der postmenopausalen Hormontherapie, aber auch durch bessere Screenings- und Früherkennungsmöglichkeiten (Mammographiescreening). Die Mortalität ist mit ca. 18.000 Todesfällen pro Jahr seit 1990 weitestgehend konstant (Robert-Koch-Institut).

Die Therapie der Brustkrebserkrankung beruht auf mehreren Säulen: die stadiengerechte operative Behandlung, Radiatio und die medikamentöse adjuvante oder neoadjuvante Chemo,- Hormon,- und Antikörpertherapie.

Mammakarzinome sind eine heterogene Gruppe von Tumoren. Sie unterscheiden sich einerseits durch die verschiedenen histologischen Typen, wichtiger aber noch im biologischen Verhalten. Neben histologischer Beurteilung und Einordnung gemäss der TNM-Klassifikation, gehören die Untersuchung des Tumormaterials auf Östrogen- und Progesteron-, sowie den HER2-Rezeptorstatus absolut zum klinischen Standard. Unter Einbezug von oben genannter Charakteristika, Alter, Menopausenstatus und Gesamtzustand der Patientin sollte für jede Patientin eine an die individuelle Tumorbiologie angepasste Therapie ermöglicht werden.

Die Chemotherapie hat positive Effekte sowohl auf die rezidivfreie, als auch auf die Gesamtüberlebenszeit, bringt aber wie jede aggressive Tumorthherapie ein hohes Mass an Toxizität und Nebenwirkungen mit sich und bedeutet für viele Patientinnen eine grosse Belastung. Durch die heutzutage verbesserten Überlebenschancen und Langzeitverläufe kann Brustkrebs auch als chronische Erkrankung gesehen werden. Bei langen Krankheitsverläufen sehen wir uns zunehmend mit Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika konfrontiert, ebenso im Falle von Rezidiven und Spätmetastasen und es wächst das Bedürfnis nach zusätzlichen, zielgerichteten Therapien, um die Prognose der Brustkrebspatientin weiter zu verbessern.

Die endokrine Therapie ist im Prinzip die erste zielgerichtete Tumorthherapie („targeted therapy“). Sie findet ihre Anwendung bei Patientinnen mit positivem Östrogen- und /oder Progesteronrezeptorstatus.

Ein gewaltiger Schritt nach vorne in der „targeted therapy“ ist mit Trastuzumab erreicht worden. Trastuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des transmembranen Her2 -Wachstumsfaktorrezeptor. Etwa 15-25% aller Mammakarzinome zeigen Amplifikationen im HER2/neu Gen und überexprimieren den Her2/neu Rezeptor (Smith et al., 2007). Eine Überexpression dieses Onkogens ist insgesamt mit einer schlechteren Gesamtprognose assoziiert. Bereits 1998 erfolgte in den USA eine Zulassung des Trastuzumab als Monotherapie sowie in Kombination mit Chemotherapie für das metastasierte Mammakarzinom.

Bevacizumab (Avastin) ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper, der an VEGF, einen Gefässwachstumsfaktor bindet und somit die Aktivierung der VEGF-Rezeptoren verhindert. Zielbereich der Therapie ist hier die Angiogenese und somit die Hemmung von Tumorwachstum und Metastasierung. Diese gezielte Hemmung des Tumorwachstums durch Ansatz an der Tumorangio-genese scheint derzeit vielversprechend und ist Feld intensiver Forschungen.

1.2. Tumorneoangiogenese

Zwei Vorgänge sind essentiell für das „Überleben“ eines Tumors: Wachstum und Metastasierung. Bis zu einer Grösse von 1-2 mm gelingt die Versorgung eines Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen per Diffusion, für weiteres Wachstum ist der Tumor auf das Entstehen neuer Blutgefässe durch Neovaskularisation angewiesen (Carmeliet, 2005).

Ist es einem Tumor gelungen durch Angiogenese neue Gefässe auszubilden und Anschluss an das Blutgefässsystem zu erhalten, bietet ihm dies einen Wachstumsvorteil. In einer Studie an histologischen Schnitten von Mammakarzinomen zeigten Weidner et al. durch die mikroskopische Zählung von Kapillaren und Venolen einen Zusammenhang zwischen Vaskularisierung und dem Auftreten von Metastasen (Weidner et al., 1991). Die Ausprägung von lymphogenen und hämatogenen Metastasen hat grossen Einfluss auf die Prognose einer Krebserkrankung und kann auch als Merkmal der Aggressivität eines Tumors gesehen werden.

Angiogenese, das Wachstum neuer Gefässe ist ein Vorgang der sich physiologischerweise in der Embryonalentwicklung vollzieht. Beim Erwachsenen gibt es nur noch wenige Situationen, in denen wir eine physiologische Angiogenese finden, wie im reproduktiven Zyklus der Frau und bei der Wundheilung. Viele Erkrankungen gehen mit pathologischer Neovaskularisation einher: Rheumatische Erkrankungen, Psoriasis, Proliferative Retinopathie, altersbedingte Maculadegeneration, Präeklampsie und Tumorerkrankungen. Neu gebildete Gefässe in Tumoren unterscheiden sich strukturell von gesunder Gefässarchitektur. Sie sind gekennzeichnet durch eine unterschiedliche Porengrösse und eine erhöhte Gefässpermeabilität. Tumorgefässe sind unregelmässig geformt, teils erweitert und korkenzieherartig gekrümmt und die normale Gefässhierarchie ist aufgehoben. (Carmeliet, 2005).

Tumoren können über einen langen Zeitraum in einem sozusagen schlafenden Zustand oder auch avaskulären Phase sein, bis sie Anschluss an das Blutgefässsystem erhalten und beginnen, in das Blutgefässsystem zu invasieren und zu metastasieren. Diesen Vorgang nennt man den „angiogenen Switch“ (Hanahan and Folkman, 1996). Ist die avaskuläre Phase gekennzeichnet durch ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und -apoptose (Carmeliet, 2005), so muss es für den Übergang zum angiogenen Phänotyp zu einer Veränderung zwischen den aktivierenden und hemmenden Faktoren der Angiogenese kommen (Hanahan and Folkman, 1996).

Inzwischen sind viele positive als auch negative Regulatoren der Angiogenese bekannt: Zu den positiven Faktoren zählt unter anderen der Vaso-Endotheliale-Wachstumsfaktor (VEGF) (Ferrara and Davis-Smyth, 1997). Auslöser für die Angiogenese kann entweder eine Aktivierung der positiven Regulatoren wie VEGF sein, oder eine Inaktivierung von hemmenden Faktoren.

1.3. Der Vaso-Endotheliale-Wachstumsfaktor VEGF

VEGF, der Vaso-Endotheliale-Wachstumsfaktor gehört zu den wichtigsten und am meisten untersuchten Wachstumsfaktoren der Angiogenese und spielt eine Schlüsselrolle sowohl in physiologischer, als auch in pathologischer Angiogenese (Ferrara and Davis-Smyth, 1997).

Das VEGF-Gen besteht aus acht Exons, die durch sieben Introns voneinander getrennt werden und befindet sich auf Chromosom 6p21.3 (Ferrara and Davis-Smyth, 1997). Es sind vier verschiedene Isoformen bekannt, die sich durch die Anzahl ihrer Aminosäuren und in der Fähigkeit Heparin zu binden unterscheiden: VEGF121, VEGF165, VEGF189 und VEGF206. Die häufigste Isoform ist das VEGF165, welches auch VEGF-A genannt wird. Natives VEGF ist ein heparinbindendes homodimeres Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa. Der Verlust der heparinbindenden Domäne führt zu einem deutlichen Verlust der mitogenen Aktivität von VEGF (Ferrara and Davis-Smyth, 1997, Ferrara et al., 2003).

Verschiedene Mechanismen sind in die Regulation der VEGF-Genexpression involviert: Sauerstoffmangel führt zu einer vermehrten Expression der VEGF-mRNA. Mit Grössenzunahme eines Tumors werden jene Zellen, welche sich am weitesten vom Tumorgefässbett entfernt befinden, als

erstes hypoxisch. Beim Glioblastoma multiforme konnte der grösste Anteil an VEGF-m-RNA in den Zellen gezeigt werden, die am nächsten an nekrotischen Arealen lagen.

Wachstumsfaktoren und Cytokine, die von Tumoren exprimiert werden, wie platelet-derived-growth-factor PDGF, fibroblastic-growth-factor FGF, tumor-necrosis factor TNF und Interleukin-6 IL-6 können die VEGF-Genexpression hochregulieren und somit die Tumorangiogenese anregen. Einige Zelllinien exprimieren sowohl VEGF, als auch VEGF-Rezeptoren und zeigen, dass sich VEGF sowohl in autokriner, als auch in parakriner Weise verhalten kann (Ferrara and Davis-Smyth, 1997, Carmeliet, 2005). Aber auch der Verlust von Tumor-Suppressorgenen wie p53, oder die Aktivierung von Onkogenen wie h-Ras, k-RAS oder HER-2 können zu vermehrter VEGF-Expression führen.

Erstmals entdeckt wurde VEGF im Jahr 1983 von Senger et al. (Senger et al., 1983) als ein Faktor, der die Gefässpermeabilität erhöht und wurde somit Vascular-Permeability-Factor (VPF) genannt. In Folge zeigten Studien an VEGF-gendefizienten Mäusen die essentielle Rolle von VEGF in embryonaler Vasculogenese und Angiogenese. Schon der Verlust eines VEGF-Allels führte zum Versterben der Mäuse zwischen embryonalem Tag 11 und Tag 12 (Carmeliet et al., 1996).

VEGF stimuliert Wachstum von Gefässen durch direkte Wirkung auf Endothelzellen und unterstützt die Zellen bei der Formierung von Gefässen. Durch die Erhöhung der Gefässpermeabilität wird es Plasmaproteinen vermehrt ermöglicht, in den Extrazellularraum zu gelangen und dort eine extravasale Matrix zu bilden, die wiederum das Wachsen von Endothelzellen unterstützt. Dieses spielt eine Rolle sowohl bei Wundheilung und Entzündungsprozessen, als auch beim Tumorwachstum.

VEGF stimuliert die Chemotaxis von Monozyten und kann endotheliale Vorläuferzellen und hämatopoietische Stammzellen mobilisieren.

VEGF vermittelt die Sekretion und Aktivierung von Enzymen, die die Auflösung der extrazellulären Matrix unterstützen, wie Plasminogenaktivatoren und die Matrix-Metalloproteinasen und unterstützt auf diesem Weg das Wachstum neuer Tumorgefässe (Carmeliet, 2005, Ferrara and Davis-Smyth, 1997). VEGF reguliert das Wachstum des dominanten Follikels im ovariellen Zyklus der Frau. Erhöhte Werte von VEGF finden sich bei verschiedenen gynäkologischen Erkrankungen wie bei dem PCO-Syndrom und bei der Präeklampsie (Ferrara, 2004). VEGF ist benötigt bei der Angiogenese für das Wachstum von Knorpel. Es hat vasodilatatorische Wirkung mit reflektorischer Tachykardie und Hypotension (Ferrara and Davis-Smyth, 1997, Ferrara et al., 2003).

Ist man sich der Rolle von VEGF in der physiologischen Angiogenese bewusst, lässt es sich leicht verstehen, dass Veränderungen in der VEGF-Expression eine Rolle in verschiedenen pathologischen Situationen spielen können. Die meisten Erkrankungen die mit einer Neovaskularisation verbunden sind, gehen auch mit erhöhten Werten von VEGF einher. Wir finden eine erhöhte VEGF m-RNA in den meisten soliden Tumoren wie Lungenkarzinom, Mammakarzinom, Nieren-, Blasen-, Ovarial- und Endometriumkarzinom, Tumoren des Gastrointestinaltraktes, Hirntumoren und in vielen malignen hämatologischen Erkrankungen. Ebenso bei intraokulären neovaskulären Erkrankungen, bei entzündlichen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, bei Erkrankungen des weiblichen Reproduktionstraktes wie beim Polyzystischen-Ovarialsyndrom, der Endometriose und bei der Präeklampsie (Ferrara, 2004).

Aus dem Verständniss der Rolle, die VEGF in Tumorangiogenese und Tumorwachstum spielt, entstand der therapeutische Ansatz, Tumorwachstum durch Blockade der VEGF-induzierten Angiogenese zu hemmen, worauf in Folge noch näher eingegangen wird.

1.4. Die VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2

VEGF steuert seine biologische Aktivität über zwei transmembrane Tyrosinkinase-Rezeptoren, Flt-1 (VEGFR-1) und Flk-1 (VEGFR-2), welche Anfang der 90-er Jahre zuerst auf Endothelzellen und in Folge auf Monozyten entdeckt wurden (Ferrara, 2004). Shibuya et al. (Shibuya et al., 1990) entdeckten das flt-Gen und konnten seine Expression in verschiedenen Zelllinien, sowie in

Plazentagewebe nachweisen. Das *flt*-Gen ähnelt in seinem Aufbau den Genen der *fms*-Familie, zu denen auch der colony-stimulating-factor 1 (CSF-1) und platelet-derived-growth-factor (PDGF) gehören. 1992 stellten de Vries et al. (de Vries et al., 1992) die Expression der VEGF-Rezeptors-1 auf Endothelzellen fest.

VEGFR-1 ist ein negativer Regulator der Angiogenese in der Embryonalzeit und hat sowohl positive, als auch negative regulatorische Funktionen im erwachsenen Organismus. Die Rezeptoren für VEGFR1 und VEGFR2 ähneln sich in ihrem Aufbau: beide gehören zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Sie setzen sich zusammen aus einer extrazellulären Domäne, bestehend aus sieben Ig-ähnlichen Domänen, einer transmembranen Region, und einer Tyrosinkinase-Sequenz, die von einer Kinaseansatzdomäne unterbrochen ist. Das VEGFR1-Protein besteht aus 1338 Aminosäuren (Shibuya and Claesson-Welsh, 2006).

Liganden der VEGF-Rezeptoren:

VEGFR1 bindet VEGF, PlGF (Plazenta Growth Factor) und VEGF-B, VEGFR-2 bindet VEGF, VEGF-C und VEGF-D (Ferrara et al., 2003). Ein weiteres Mitglied der Familie der VEGF-Rezeptoren ist VEGFR-3 (Flt-4). VEGFR-3 bindet VEGF-C und VEGF-D und findet sich in erster Linie auf Endothelzellen der Lymphgefäße (Shibuya, 2001).

Neuropilin-1 und -2 (NP1 und NP2) sind Corezeptoren für VEGF. Sie spielen eine Rolle bei der Kontrolle des Wachstums von Axonen (Robinson and Stringer, 2001). Werden diese auf Zellen gemeinsam mit VEGFR-2 exprimiert, so verstärkt NP-1 die Bindung von VEGF165 an VEGFR-2 und die VEGFR-2 vermittelte Chemotaxis von VEGF165 (Ferrara, 2004).

Die höchste Bindungsaffinität des VEGF-Rezeptor-1 besteht zu VEGF, gefolgt von PlGF. Die Bindungsstelle für VEGF am VEGFR-1 ist an der zweiten Ig-ähnlichen Domäne, die Bindungsstelle für VEGFR-2 an der 2.- und 3.-Ig-ähnlichen Domäne (Ferrara, 2004, Shibuya, 2001).

Studien an VEGFR-1-gendefizienten Mäusen untersuchten die Rolle von VEGFR-1 in der Embryogenese und zeigten auf, dass VEGFR-1 teils als positiver, teils als negativer Regulator der Angiogenese wirkt. *Flt-1*^{-/-} Mäuse verstarben in utero zwischen Tag 8,5 und 9,5. Endothelzellen entwickelten sich, organisierten sich aber nicht zu Gefäßen (Fong et al., 1995). Diese Beobachtung lässt annehmen, dass die *Flt-1*-vermittelte Signaltransduktion in der Embryonalzeit die Entwicklung der normalen Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Extrazellulärmatrix-Interaktionen mit beeinflusst. Als weiterer Grund für die Gefäßdisorganisation konnte eine exzessive Proliferation von Angioblasten gezeigt werden. Diese Beobachtung lässt schließen, dass VEGFR-1 die Rolle eines negativen Regulators in der Angiogenese spielt (Fong et al., 1999). Im Gegensatz dazu entwickeln Mäuse, die nur die extrazelluläre Domäne und die transmembrane Domäne des VEGFR-1 exprimieren, denen jedoch die Tyrosinkinasedomäne fehlt (TK(-)Mäuse), normale Gefäße, was schließen lässt, dass die Tyrosinkinase in der Embryonalperiode entbehrlich ist, wobei die extrazelluläre Domäne die entscheidende Rolle für die Entwicklung der Gefäßformation spielt (Hiratsuka et al., 1998).

Flk-2-gendefiziente Mäuse (*Flk*^{-/-}) starben in utero zwischen Tag 8,5 und 9,5 als Folge eines frühen Defekts von Endothelzellen und hämatopoietischen

Vorläuferzellen: es entwickelten sich weder „blood-islands“ im Dottersack, noch Blutgefäße. Daraus lässt sich schließen, dass *FLK-1* essentiell ist für die frühe Vaskulogenese (Shalaby et al., 1995).

Soluble-VEGFR-1

Das VEGFR-1-Gen kodiert zwei unterschiedliche Formen des VEGF-Rezeptors-1. Einmal den membranständigen Rezeptor mit der vollständigen Länge, als auch einen kürzeren Rezeptor, der in löslicher Form vorliegt (soluble-VEGFR1, s-VEGFR-1) (Shibuya, 2001). Dieser geht durch

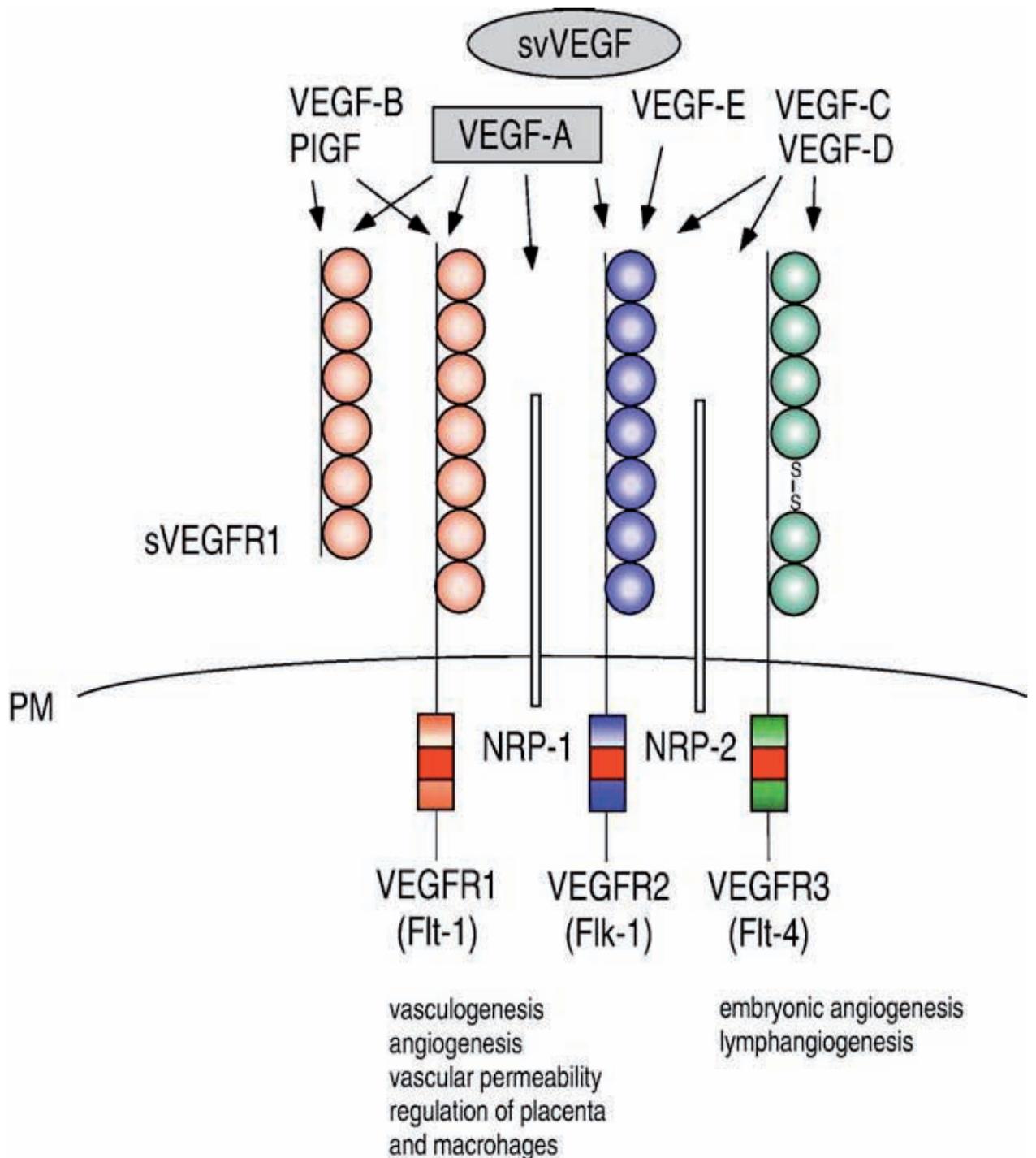


Abbildung 1:
Die VEGF-Rezeptoren, 1-3 und ihre Liganden

Bildnachweis:

Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* (Shibuya and Claesson-Welsh, 2006)

alternatives Spleissen aus der Flt-1-pre-mRNA hervor und kodiert für einen löslichen Rezeptor für VEGF, s-VEGFR-1 (Kendall and Thomas, 1993). Im Gegensatz zu der membranständigen Rezeptorform, fehlt dem s-VEGFR-1 die siebte Ig-ähnliche Domäne, sowie die transmembrane Region und die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne. s-VEGFR-1 bindet VEGF mit hoher Affinität und hindert seine mitogene Aktivität, einmal dadurch, dass es VEGF an der Bindung des membranständigen, signaltransduzierenden Teils hemmt, andererseits durch Bildung nicht signaltransduzierender s-VEGFR-1/ VEGFR-2 Komplexe (Kendall et al., 1996). Somit wirkt s-VEGFR-1 als negativer Antagonist von VEGF (Kendall and Thomas, 1993).

Einen hohen Grad an Expression der löslichen Form des VEGFR-1 (s-VEGFR-1) findet sich in

der Plazenta und es lässt sich vermuten, dass das s-VEGFR1-Protein eine physiologische Funktion während der Schwangerschaft hat, indem es die Höhe des VEGF reguliert (Shibuya, 2001).

i-VEGFR-1

Erst kürzlich entdeckt wurde eine weitere intrazelluläre Form des VEGFR-1, i-VEGFR-1, welches in fünf unterschiedlichen Isoformen vorliegt und aus einer oder mehreren intrazellulären Domänen besteht. An MDA-MD-231 Brustkrebszellen liess sich i-VEGFR-1 nachweisen und steht bei diesen in Zusammenhang mit Aktivierung der Invasion von Tumorzellen (Mezquita et al.).

VEGFR-1-Expression

Die VEGFR-1-Rezeptorexpression findet sich auf Endothelzellen der Gefässe, sowie auf Monozyten und Makrophagen, wo es unter anderem die Migration dieser Zellen steuert (Barleon et al., 1996, Clauss et al., 1996). Desweiteren wurde VEGFR-1 auf denritischen Zellen, Chondro- und Osteoklasten gefunden (Shibuya and Claesson-Welsh, 2006). Die VEGFR-1-Expression wird bei Sauerstoffmangel durch einen von dem hypoxia-inducible-factor (HIF)-abhängigen Mechanismus hochreguliert (Ferrara, 2004, Ferrara et al., 2003).

Signaltransduktion und Bildung von Heterodimeren:

Gemeinsam ist allen VEGF-Rezeptoren, dass sie Signale für Überleben, Proliferation und Migration der Zelle übertragen. Verschiedene molekulare Mechanismen, wie beispielsweise Rezeptorheterodimerization und Interaktionen zwischen verschiedenen Signaltransduktionswegen, ermöglichen eine Zusammenarbeit der verschiedenen VEGFR's. Die Vermittlung der Signaltransduktion durch VEGF findet in erster Linie statt durch ligandeninduzierte Autophosphorylation und durch Bindung an intrazelluläre Signatransduktoren (Shibuya and Claesson-Welsh, 2006).

VEGF enthält unterschiedliche, aber teilweise überlappende Bindungsstellen für VEGFR-1 und VEGFR-2 und durch Interaktion der beiden Moleküle kommt es zu einer Dimerisation der beiden Rezeptoren und in Folge zu einer Signaltransduktion durch Autophosphorylation (Robinson and Stringer, 2001).

PlGF, welcher Ligand ist für Flt-1, kann durch Bindung und Aktivierung von Flt-1 zu intermolekularer Transphosphorylation von Flk-1 führen und somit die über Flk-1 vermittelte, VEGF induzierte Angiogenese verstärken. VEGF/PlGF-Heterodimere führen durch intramolekularen Rezeptor „Cross-talk“ zur Bildung von von Flk-1/Flt-1 Heterodimeren (Autiero et al., 2003b).

s-FLT-1 und Ex-KDR, der extrazellulärer Anteil von KDR können heterodimere Komplexe bilden. Daraus lässt sich schliessen, dass die Signal-Transduktion von VEGF nicht nur über membranständige Rezeptoren weitergeleitet wird, sondern ebenso durch Rezeptor-Heterodimerisation (Kendall et al., 1996). Die Fähigkeit der Rezeptoren, Heterodimere zu bilden, bedeutet aber auch, dass die VEGF-Signaltransduktion durch negative „Mutanten“ des einen oder des anderen Rezeptors gehemmt werden kann. Es wurde gezeigt, dass rekombinantes s-FLT-1 die VEGF abhängige Mitogenese in HUVE cells (human umbilical vein endothel cells) hemmen kann. Da s-FLT-1 VEGF mit einer stärkeren Affinität bindet als KDR, kann s-VEGFR-1 als Inhibitor von VEGF fungieren und durch Bildung von Heterodimeren aus s-VEGFR-1 und VEGFR-2 negativer Inhibitor der Angiogenese sein (Kendall and Thomas, 1993). Desweiteren ist die Vermittlung der Signale von VEGF über die VEGFR's von der Existenz von Corezeptoren wie der Neurolipine beeinflusst (Shibuya and Claesson-Welsh, 2006).

Biologische Aktivitäten von VEGFR1:

Obwohl seit der Entdeckung der VEGFR-1 bereits etliche Jahre vergangen sind, ist man sich der genauen Funktion dieses Rezeptors immer noch nicht einig.

Dies mag daran liegen, dass sich Funktion und biologische Wirkung von VEGFR-1 in verschiedenen Situationen unterschiedlich verhalten.

So zeigt sich VEGFR1 als negativer Regulator der Angiogenese in der Embryonalzeit und hat sowohl positive, als auch negative Funktionen im adulten Organismus.

VEGFR-1 kann über seinen Tyrosinkinaseanteil die Angiogenese positiv beeinflussen, wenn einer der Liganden für VEGFR-1 hoch exprimiert ist. Hiratsuka et al. (Hiratsuka et al., 2001) zeigten dass Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen, welche PlGF-2 exprimieren, schneller in Wild-Typ-Mäusen wachsen als in gendefizienten Mäusen, denen der Tyrosinkinaseanteil fehlt. Wie bereits erwähnt, kann der lösliche Rezeptoranteil als negativer Inhibitor von VEGF fungieren.

Flt-1 hat eine stärkere Bindungsaffinität zu VEGF als Flk, doch bei einer schwächeren Kinaseaktivität; die meisten angiogenen, mitogenen und Permeabilität verstärkenden Signale von VEGF werden über VEGFR-2 vermittelt, welches eine etwa 10 mal stärkere biologische Aktivität besitzt als VEGFR-1 (Shibuya, 2001).

Unterschiedlichste Funktionen des VEGFR-1 sind bereits erkannt, dennoch

besteht hier noch ein weites Feld für weitere Forschungen. VEGFR-1 vermittelt die Migration von Monozyten (Barleon et al., 1996). Man findet das Flt-1-Gen auf Monozyten und Makrophagen: Mäuse, denen die Tyrosinkinase-Domäne fehlt, zeigen keine Migration von Monozyten oder Makrophagen in der Anwesenheit von VEGF, sodass die Tyrosinkinasedomäne wichtiger Bestandteil für die Induktion der Migration von Monozyten und Makrophagen ist. VEGFR-1 kontrolliert das Überleben und die Differenzierung von hämatopoietischen Stammzellen in endotheliale Vorläuferzellen und deren Migration in Bereiche, in denen Neovaskularisation stattfindet (Gerber and Ferrara, 2003). Auch der Einfluss von VEGF auf die Differenzierung von Osteoklasten und Chondroklagen wird über VEGFR-1 vermittelt (Shibuya, 2001). VEGFR-1 erleichtert die Entstehung von Lungenmetastasen über Induktion von Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) in Endothelzellen und Makrophagen. Matrix-Metalloproteinasen sind Proteinase welche die extrazelluläre Matrix auflösen können und bei Entzündungsprozessen, Tumorinvasion und Metastasierung vorkommen (Hiratsuka et al., 2002). Eine Untersuchung von le Couter et al (Le Couter et al., 2003) zeigte, dass die Aktivierung von VEGFR-1 in sinusoidalen Leberendothelzellen zur Freisetzung von Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), Interleukin-6 (IL-6) und anderen hepatotropen Wachstumsfaktoren über einen parakrinen Mechanismus führt. Dies lässt schliessen, dass die Rolle von VEGFR-1 am Gefässendothel der Leber weniger die eines Angiogeneseregulators ist, sondern dass VEGFR-1 protektive Funktionen in Hinsicht auf die Leber hat. Daraus könnten in Zukunft therapeutische Möglichkeiten hervorgehen.

1.5. Weitere Liganden von VEGFR-1, Placenta Growth Factor (PlGF), VEGF-B und VEGF-C

Placenta Growth Factor (PlGF)

1991 wurde PlGF als erster VEGF-ähnlicher Faktor entdeckt (Maglione et al., 1991). Wie VEGF ist es ein dimeres Glycoprotein und ähnelt VEGF in seinem Aufbau, es zeigt eine Übereinstimmung von 53% zu der PDFD-Domäne von VEGF. PlGF findet sich in drei Isoformen unterschiedlicher Aminosäurengrosse, PlGF-1 (PlGF131), PlGF-2 (PlGF152) welches ein heparinbindendes Moleküle ist und PlGF-3 (PlGF203). PlGF-1 und PlGF-2 binden auch die Corezeptoren NRP-1 und NRP-2. Das PlGF-Gen liegt auf Chromosom 14q24.3.

PlGF vermittelt seine angiogenen und proinflammatorischen Signale über VEGFR-1. Dabei verwendet es jedoch unterschiedliche Mechanismen als VEGF, beispielsweise Phosphorylation un-

terschiedlicher Tyrosin“reste“ und Aktivierung unterschiedlicher nachgeordneter Zielgene (Autiero et al., 2003b) PIGF bindet VEGFR-1 mit einer geringeren Affinität als VEGF-A und hat eine schwächere gefäßpermeabilitätsverstärkende Wirkung als VEGF (Persico et al., 1999). Im Gegensatz zu VEGF wird die Expression von PIGF nicht durch Sauerstoffmangel reguliert (Cao et al., 1996b).

Ursprünglich wurde es entdeckt in der Plazenta, wo wir es physiologischerweise im mittleren und letzten Schwangerschaftstrimenon finden und in Folge wurde es ebenso in der Schilddrüse, Lunge, Herz- und Skelettmuskulatur gefunden (Autiero et al., 2003a, Cao, 2009, Persico et al., 1999). Unter pathologischen und „Stresssituationen“ exprimieren einige Zellen PIGF verstärkt: Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur, hämatopoietische Zellen, Neurone und verschiedene Tumorzellen:

Parr et al. zeigten eine Expression des PIGF an Brust-, Blasen-, Prostata- und Kolorektalentumorzellen. Sie zeigten mittels Immunhistochemie eine Expression von PIGF an Mammatumorgewebe, während Mammanormalgewebekontrollen kaum PIGF zeigten. Eine Erhöhung des PIGF war assoziiert mit einer schlechteren Prognose betreffend Lymphknotenbefall, high-grade-Tumoren und rezidivfreies Überleben sowie Gesamtüberleben.

Desweiteren ist eine Hochregulation des PIGF bekannt bei Adenokarzinomen des Magens, Nierenzellkarzinomen, Melanomen, Meningeomen und squamösen Cervixkarzinomen, wogegen Schilddrüsenkarzinomen und Adenokarzinome der Cervix eine Downregulation zeigten (Parr et al., 2005).

Im Verständniss der Rolle von PIGF in der Angiogenese und bei weiteren Funktionen dieses Moleküls gibt es noch offene Fragen. Während VEGF seine Rolle in der Angiogenese sowohl in physiologischen, als auch in pathologischen Situationen spielt, ist die Rolle von PIGF auf pathologische Situationen beschränkt. Zwar lässt sich PIGF in Wildtypmäusen bereits am embryonalen Tag 10,5 nachweisen, PIGF^{-/-}-gendifiziente Mäuse sind jedoch bei termingerechter Geburt gesund und lebensfähig und zeigen nur minimale vaskuläre Defekte, was darauf schliessen lässt, dass PIGF in der Angiogenese keine wichtige Rolle spielt (Carmeliet et al., 2001). Während der embryonalen Entwicklung wird VEGFR-1 hauptsächlich in seiner löslichen Form exprimiert und nur in einem geringen Anteil als membranständiger Rezeptor. Daraus resultiert die Annahme, dass die minimalen Levels des membranständigen VEGFR-1 nicht ausreichen, um die angiogenen Signale des PIGF zu transduzieren (Autiero et al., 2003a).

Unter physiologischen Bedingungen findet sich in den Gefässen des Erwachsenen nur wenig PIGF, unter pathologischen Bedingungen wird die Expression des PIGF hochreguliert. PIGF verstärkt die angiogenen Eigenschaften von VEGF und trägt somit zu der Entstehung von Erkrankungen mit Neoangiogenese bei, u.a. durch verschiedenes Zusammenspiel zwischen den Rezeptoren Flt-2 und Flk-1. Cao et al. zeigten ein natürliches Vorkommen von VEGF/PIGF Heterodimeren in verschiedenen Tumoren. Diese Heterodimere haben 20-50% weniger mitogene Aktivität als VEGF Homodimere, bei stärkeren chemotaktischen Eigenschaften als VEGF-Homodimere (Cao et al., 1996a). VEGF/PIGF Heterodimere induzieren eine vermehrte Bildung von Flt-1/Flk-1-Heterodimeren, welche starke Stimulatoren der Angiogenese sind und in Versuchen an Plau^{-/-}- Mäusen stärkere angiogene Effekte aufzeigten als VEGFR-Homodimere.

Durch Aktivierung von Flt-1 durch PIGF kommt es zum Austausch zwischen Flt-1 und Flk-1 durch Transphosphorylierung und damit zur Verstärkung der angiogenen Signale von VEGF. Somit stimuliert PIGF sowohl den intermolekularen, als auch den intramolekularen Austausch zwischen Flt-1 und Flk-1. PIGF wirkt auf die Gefässneubildung durch Rekrutierung inflammatorischer Zellen, welche die Kollateralbildung unterstützen und mobilisiert vaskuläre und hämatopoietische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. PIGF zieht glatte Gefässmuskelzellen an und verstärkt somit die vorerst fragilen neugebildeten Gefässe. Dabei hat PIGF eine deutlich geringere permeabilitätsverstärkende Rolle als VEGF (Carmeliet et al., 2001).

Betrachtet man den Beitrag, den PIGF zur Angiogenese unter pathologischen Situationen leistet, ohne dabei die physiologische Angiogenese zu involvieren, und bei geringen permeabilitätssteigernden Eigenschaften, so lässt sich erkennen, dass PIGF und sein Rezeptor VEGFR-1 ein attrak-

tives, nebenwirkungsarmes therapeutisches Ziel sind, sowohl bei angiogenen, ischämischen, als auch bei entzündlichen Erkrankungen.

VEGF-B

VEGF-B, ein weiterer Ligand von Flt-1, findet sich auf Gewebe mit hohem metabolischen Umsatz, wie Herz- und Skelettmuskulatur und auf glatten Muskelzellen. Das VEGF-B Gen befindet sich auf Chromosom 11q13. Es existieren zwei Isoformen von VEGF-B, VEGF-B 167 und VEGF-B 186. Im Gegensatz zu VEGF oder PlGF fehlen dem VEGF-B Bindungsstellen für hypoxia regulating Faktoren und die Regulation von VEGF-B ist nicht von Sauerstoff abhängig. Im Gegensatz zu VEGF ist VEGF-B nicht in die Regulation der Angiogenese involviert, VEGF-B-gendefiziente Mäuse sind gesund und lebensfähig (Carmeliet et al., 2001).

Die Rolle von VEGF-B blieb für lange Zeit unklar und viele Versuche, VEGF-B ebenso eine Rolle in der Angiogenese zuzusprechen, führten zu wenig erfolgreichen Ergebnissen. Lediglich für die Herzmuskulatur konnten angiogene Effekte aufgezeigt werden (Li et al., 2009). Eine neuere Hypothese ist, dass VEGF-B weniger die Rolle eines angiogenen, als vielmehr die Rolle eines Überlebensfaktor für unterschiedliche Zellen darstellt, wie Endothelzellen, Herzmuskelzellen, Zellen der glatten Muskulatur, aber auch Neurone (Li et al., 2009). Geht man von den „survival“-Eigenschaften des VEGF-B's aus, so kann man sich für die Zukunft therapeutische Effekte des VEGF-B in vaskulären- und neurodegenerativen Erkrankungen erhoffen.

VEGF-B bindet ausser an Flt-1 auch an den Neurolipin-1 Rezeptor (NRP-1).

VEGF-C, ein weiteres Mitglied der VEGF-Familie vermittelt seine Signale über den Rezeptor VEGFR-3 (Flt-4) und ist in die Lymphangiogenese involviert (Olofsson et al., 1999).

1.6. Vorkommen von VEGFR-1 bei unterschiedlichen Tumorentitäten

VEGFR-1 konnte inzwischen an unterschiedlichen Tumorentitäten aufgezeigt werden: an soliden Tumoren, Hirntumoren und hämatologischen Neoplasien wie unter anderem Lungen- (Seto et al., 2006, Volm et al., 1997), Magen-(Hirashima et al., 2009, Kosaka et al., 2007), Darm- (Okita et al., 2009, Fan et al., 2005), Leber- (Ng et al., 2001) und Pankreaskarzinom (Chung et al., 2006, Wey et al., 2005), Nieren- (Rivet et al., 2008, Ghanem et al., 2003) und Prostatakarzinom (Ferrer et al., 1997), Endometrium- (Fine et al., 2000, Talvensaari-Mattila et al., 2005, Yokoyama et al., 2000) und Ovarialkarzinom (Secord et al., 2007), Schilddrüsenkarzinom (Capp et al., Fenton et al., 2000), Astrozytom (Yao et al., 2001) und Neuroblastom (Langer et al., 2000), Leukämien (Belgore et al., 2001, Diffner et al., 2009), Myelodysplastisches Syndrom (Hu et al., 2004) und Multiples Myelom (Kumar et al., 2003).

Bei einigen Tumorentitäten und -zelllinien finden wir gleichzeitig die Expression von VEGF als auch von seinen Rezeptoren, womit die Annahme sowohl eines parakrinen, als auch eines autokrinen Systems zwischen VEGF den VEGF-Rezeptoren unterstützt wird.

In der Frage, ob die Expression von VEGFR-1 an Tumoren von prognostischer Bedeutung ist, wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt.

Beim Hepatozellulären Karzinom (HCC) zeigte sich die Präsenz von VEGFR-1 in der peritumoralen Umgebung assoziiert mit einem erhöhten Risiko für intrahepatische Satellitenbildung sowie verkürzte rezidivfreie Überlebenszeit (Jia et al., 2009). Beim Lungenkarzinom (NSCLC) zeigt sich VEGFR-1 bei Patienten in Stadium III und IV assoziiert mit schlechterer Überlebenszeit und als unabhängiger Prognosefaktor (Carrillo de Santa Pau et al., 2009). Bei Stadium I NSCLC zeigte sich VEGFR-1 nicht als prognostischer Faktor, jedoch die gleichzeitige Expression von Flt-1 und KDR wurde als unabhängiger Prognosefaktor identifiziert (Seto et al., 2006). Beim Neuroblastom (Ghanem et al., 2003) zeigte sich die Expression von VEGFR-1 in Kombination mit VEGF als Indikator für eine schlechtere Prognose.

Bei anderen Tumorentitäten wie z.B. bei Endometriumkarzinom (Fine et al., 2000, Talvensaari-

Mattila et al., 2005, Yokoyama et al., 2000) und Ovarialkarzinom (Secord et al., 2007) konnte kein prognostischer Wert für VEGFR-1 gesehen werden.

1.7. VEGFR-1 beim Mammakarzinom

VEGFR-1 wird ebenso wie VEGFR-2 und VEGF am Mammakarzinom exprimiert und konnte an verschiedenen Tumoren und Tumorzelllinien festgestellt werden. Ebenso wie bei anderen Tumorentitäten, finden wir auch beim Mammakarzinom die parallele Expression von VEGF und den VEGF-Rezeptoren -1 und -2, so dass auch beim Mammakarzinom von einem parakrinen und autokrinen Mechanismus zwischen VEGF und seinen Rezeptoren ausgegangen werden kann (Speirs and Atkin, 1999, Xie et al., 1999). VEGFR-1 unterstützt Wachstum und Widerstandsfähigkeit von Mammakarzinomzellen durch VEGFR-1 vermittelte intrazelluläre Aktivierung über die Signaltransduktionswege von MAPK und Akt (Wu et al., 2006).

Verschiedene und unterschiedliche Studien haben sich in der Vergangenheit mit der prognostischen Bedeutung von VEGF beim Mammakarzinom beschäftigt und sind im allgemeinen zu dem Schluss gekommen, dass VEGF von prognostischer Bedeutung beim Mammakarzinom ist, sowohl bei nodalpositiven als auch bei nodalnegativen Patientinnen und dass VEGF mit keinem der bekannten Prognoseparameter wie Staging oder Grading korreliert (Gasparini, 2000). Zu der Frage, ob auch die VEGF-Rezeptoren Flk-1 und Flt-1 beim Mammakarzinom einen prädiktiven Wert bezüglich der Prognose haben, liegt bis heute keine eindeutige Antwort vor. Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich der Frage mit unterschiedlichen Fragestellungen und in unterschiedlichen Subgruppen gewidmet und sind zu diskrepanten Ergebnissen gekommen, wobei es zum Einsatz unterschiedlicher Antikörper kam. Dieses hat uns motiviert, uns der Frage der VEGFR-1 Expression an einem Tissue-Micro-Array mit 2197 Mammakarzinomgeweben zu widmen.

Wachstum und Entstehung eines Grossteils der Mammakarzinome ist von Östrogen beeinflusst. Die Feststellung, dass die Anwesenheit von Östrogen in Mammakarzinomzellen die Werte von s-VEGFR-1 mindern kann und somit über vermehrt frei verfügbares VEGF und vermehrte Expression von VEGFR-2 die Angiogenese induzieren kann, führte zu der Annahme, dass Östrogen eine ganz eigene Rolle beim angiogenen Switch beim Mammakarzinom spielt und sowohl proangiogene als auch proliferative Wirkungen hat (Elkin et al., 2004, Garvin et al., 2005). Tamoxifen hingegen zeigte gegenteilige Effekte (Garvin et al., 2005).

Aus dem genaueren Verständnis dieser biologischen Abläufe lassen sich in Zukunft therapeutische Optionen für das Mammakarzinom erhoffen, beispielsweise aus einer noch gezielteren kombinierten anti-angiogenen und antihormonellen Therapie als bislang.

1.8. Therapeutische Ansätze

Mit dem Wissen über die Bedeutung der Angiogenese sowohl in physiologischen, als auch in pathologischen Situationen, lag auf der Forschung an pro- und anti-angiogenen Substanzen- und Therapieansätzen in der letzten Zeit viel Aufmerksamkeit.

VEGF spielt eine Schlüsselrolle in physiologischer und pathologischer Angiogenese und ein Hauptaugenmerk der Recherche lag hierbei auf VEGF-A und seinem Rezeptor VEGFR-2, welcher aufgrund seiner stärkeren Tyrosinkinaseaktivität den grössten Anteil der angiogenen Signale von VEGF-A vermittelt.

Bevacizumab ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper gegen VEGF-A. 2008 wurde Bevacizumab zugelassen in der Behandlung des fortgeschrittenen, metastasierten HER-2-negativen Mammakarzinom in Kombination mit Paclitaxel und Docetaxel. Grundlage für die Zulassung beim Mammakarzinom war eine Phase III-Studie (E2100) an 722 Patientinnen, welche Paclitaxel oder Paclitaxel plus Bevacizumab erhielten. Diese hatte eine Verdoppelung des medianen progressionsfreien Überlebens aufgezeigt, bei gleichbleibendem Gesamtüberleben. Folgestudien (AVADO, RIBBON-1), zeigten zwar verbessertes Ansprechen auf die Therapie und

längeres progressionsfreies Überleben, doch fehlenden Benefit für das Gesamtüberleben (Nielsen et al.). 2011 wurde die Zulassung von Avastin beim metastasierten Mammakarzinom widerrufen (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2011, 10.02.) Bei den teilweise schwerwiegenden Nebenwirkungen von Bevacizumab wie Blutungen allgemein, gastrointestinale Blutungen speziell, thrombembolischen Ereignissen und Hypertonie, ohne Gewinn für Lebensqualität der Patientin und Gesamtüberleben, sieht die FDA keinen Nutzen in der Therapien mit Bevacizumab beim Mammakarzinom (FDA, 2010 Dec. 16).

Verschiedene unterschiedliche Ansätze werden derzeit untersucht, wie man weiter an der Achse VEGF/VEGF-Rezeptoren ansetzen kann, um Tumorwachstum effektiv einzudämmen:

Aflibercept, ein VEGF-trap („VEGF-Fänger“) ist ein lösliches Protein, das aus den beiden extrazellulären Anteilen von VEGFR-1 und VEGFR-2 und dem Fc-Segment von humanem IgG besteht. Aflibercept bindet VEGF und PlGF mit hoher Affinität, konnte jedoch in einer Phase II-Studie an Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs keinen klinischen Gewinn zeigen (Nielsen et al.).

Verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren, sogenannte small molecules sind entwickelt worden, welche verschiedene Tyrosinkinasen hemmen, die in die Angiogenese involviert sind (Pytel D, 2009). Angiozyme (RPI.4610) ist ein anti-VEGFR-1-Ribozym. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle, welche m-RNA-Moleküle hemmen, die für das VEGF-Rezeptorprotein kodieren und somit die Rezeptorfunktion niederregulieren. Angiozyme zeigte in Phase I- und II-Studien eine gute Verträglichkeit. In einer Phase-II-Studie bei 12 Patienten mit unterschiedlichen Krebserkrankungen (kein Mammakarzinom), liess sich Angiozyme ohne schwerwiegende Nebenwirkungen in Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel geben (Kobayashi et al., 2005). Ramucirumab ist ein Antikörper gegen VEGFR-2, der im Gegensatz zu Bevacizumab, welches nur VEGF-A bindet, alle VEGF-Isoformen bindet (Spratlin et al.). Derzeit laufen Phase-I Studien mit Ramucirumab.

IMC-18F1 ist ein spezifischer Antikörper gegen humanes VEGFR-1. In präklinischen Modellen wurde gezeigt, dass IMC-18F1 die intrazelluläre Aktivität von VEGFR-1 über MAPK-vermittelte Signaltransduktion hemmt. Bei in vivo Versuchen an humanen Brustkrebs Xenograften führte die Blockade durch IMC-18F1 zu verminderter Tumorzellproliferation und vermehrter Tumorzellapoptose (Wu et al., 2006). Eine Phase-I Studie ist abgeschlossen (Schwartz et al.). Weitere Ansätze sind in Entwicklung, wie beispielsweise ein anti-VEGFR-1-Peptid, welches gezielt VEGFR-1 bindet, dadurch die Bindung von VEGF hemmt und VEGF-abhängiges Tumorwachstum und Metastasierung, sowie die VEGFR-1 vermittelte Endothelzellmigration und die Bildung von Gefäßen hemmt (Bae et al., 2005).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tissue Micro Array

Viele Gene und Signaltransduktionswege sind an der Entstehung von Krebserkrankungen beteiligt (Kononen J, 1998 Jul). Herkömmliche pathologische Methoden zur Entdeckung von Ansatzpunkten für beispielsweise neue Medikamente sind zeit- und materialintensiv. Das 1998 von Kononen und Kallioniemi (Kononen J, 1998 Jul) entwickelte Tissue-Microarray-Verfahren bietet hier viele Vorteile: mit dieser Methode können kleine zylindrische Gewebeproben (Grösse: Durchmesser 0,6 mm) von bis zu tausend verschiedenen Geweben auf nur einem Objektträger untersucht werden. (Dancau AM, 2010)

Um mit klassischen pathologischen Methoden grössere Gewebekollektive auf beispielsweise neue Marker zu untersuchen, muss jede Probe in mehreren Arbeitsschritten einzeln behandelt werden. Mit der Tissue-Micro-Array-Methode ist es innerhalb kürzester Zeit möglich mit nur einem Arbeitsvorgang hunderte bis tausende Proben zu untersuchen. Dieses ist zeit- und materialsparend. Da alle Proben in dem gleichen Vorgang behandelt werden, bestehen standartisierte Versuchsbedingungen.

Das Tissue-Micro-Array-Verfahren findet Anwendung auf DNA, RNA und Proteinebene. Alle in situ Methoden die in histologischen Studien Anwendung finden, können ohne eine grosse Veränderung der Protokolle an Tissue-Micro-Arrays angewendet werden, wie Immunhistochemie, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisation oder RNA-in-situ-Hybridisation. (Dancau AM, 2010)

Studien konnten belegen, dass die Ergebnisse, welche mit der Tissue-Micro-Array-Methode erhalten werden, sich mit bekannten Ergebnissen aus der Literatur decken. Kononen et al. (Kononen J, 1998 Jul) untersuchten einen Array mit 372 primären Brustkrebsproben mittels FISH auf Amplifikationen der bekannten Onkogene ERBB2, MYC und CCND1 und erzielten Ergebnisse, die sich mit der Literatur deckten. Schraml et al (Schraml et al., 1999) zeigten an einem Multitumorarray mit 397 Spots von 17 verschiedenen Tumorarten mittels FISH Ergebnisse für ERBB2, MYC und CCND1, die sich ebenfalls mit existierenden Daten in der Literatur decken.

Die Frage liegt nahe, ob denn ein 0,6 mm messender Ausschnitt einer Probe repräsentativ für einen ganzen Tumor sein kann (Kallioniemi et al., 2001), denn insbesondere bei sehr heterogenen Tumoren kann ein im Durchmesser 0,6 mm messendes Gewebe nicht den gesamten Tumor repräsentieren. Drei Studien die direkt die Biomarker-Expression an TMA's und regulären Schnitten verglichen, zeigten eine Konkordanz in 90-95 % für die bekannten Biomarker des Mammacarcinoms wie Östrogen- und Progesteron-Rezeptor und HER2-Onkogen (Camp et al., 2000, Gillett et al., 2000). Torhorst et al (Torhorst et al., 2001) konstruierten aus einer Serie von 553 Brustkrebsproben vier verschiedene Arrays mit einer zentral entnommenen und je drei peripheren Proben sowie klassischen Grossschnitte und untersuchten diese auf die bekannten Marker Östrogen-Rezeptor, Progesteron-Rezeptor und p53 und zeigten, dass die kleinen Gewebeproben ausreichend waren, um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, auch um Zusammenhänge zwischen molekularen Veränderungen und klinischen Endpunkten zu erhalten. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der zentral und peripher entnommenen Proben. Dennoch sollte einem immer bewusst sein, dass das Tissue-Micro-Array-Verfahren eine Screening-Methode ist, die nicht dafür geeignet ist im Einzelfall klinische Entscheidungen zu treffen (Gillett et al., 2000) (Kallioniemi et al., 2001).

Studien welche die TMA-Methode nutzen haben inzwischen zur Identifikation von hunderten von Genen geführt, die eine potentielle Rolle in der Krebsentstehung oder bei der Entstehung anderer Krankheiten spielen (Dancau AM, 2010).

2.2 Erstellung des Tissue-Micro-Arrays

Vor der Zusammenstellung des Arrays wird genau definiert, aus welchen Gewebeproben (Tumorgewebe, Normalgewebe) der Array zusammengestellt werden soll.

Entsprechende histologische Schnitte werden aus den Archiven herausgesucht und von einem erfahrenen Pathologen beurteilt. Auf dem hematoxylin-eosin-gefärbten Objektträger werden repräsentative Anteile des Gewebes markiert. Anschließend werden die korrespondierenden Gewebeparaffinblöcke aus den Archiven zu den Objektträgern sortiert (Simon and Sauter, 2002) (Bubendorf et al., 2001).

Ein Datenfile wird erstellt, der folgende patientenbezogene Informationen aus den pathologischen Befunden beinhaltet: Geburtsdatum, Operationsdatum, Grösse der Probe, Lokalisation der Probe, TNM-Stadium und Grading des Primärtumors. Nach Erstellung eines Datenfiles (Punch-File) beginnt das Stanzen des Arrays:

Aus dem repräsentativen Gewebeanteil eines Donor-Gewebeparaffin-Block werden mit einer Hohlneedle zylindrische Gewebestanzungen entnommen (Durchmesser 0,6mm, Höhe 3-4mm) und mittels eines X-Y-Achsen-Präzisionsinstrumentes von Beecher Instruments (Silver Springs, MD/USA) werden die einzelnen Gewebezylinder im Empfängerblock (45 x 20mm) eingebettet (Moch et al., 1999). Der Abstand zwischen den einzelnen Spots beträgt 0,8 mm. Auf diese Weise können in ein 45x25 mm messendes Areal bis zu 1000 Gewebeproben eingebracht werden, meist werden jedoch 400-800 Proben pro Areal angeordnet (Kononen J, 1998 Jul) (Kallioniemi et al., 2001). Es hat sich als sinnvoll erwiesen, die Spots in einer standartisierten Art und Weise anzuordnen (Bubendorf et al., 2001). Der Array wird mit einem Mikrotom in histologische Schnitte mit einer variablen Dicke von 4 – 8 μm geschnitten und mit Hilfe eines adhesive-coated tape sectioning system (Instrumedics, Hackensack, NJ/USA) auf einen Objektträger aufgebracht (Kononen J, 1998 Jul, Schraml et al., 1999). Es folgt das Färben des Arrays.

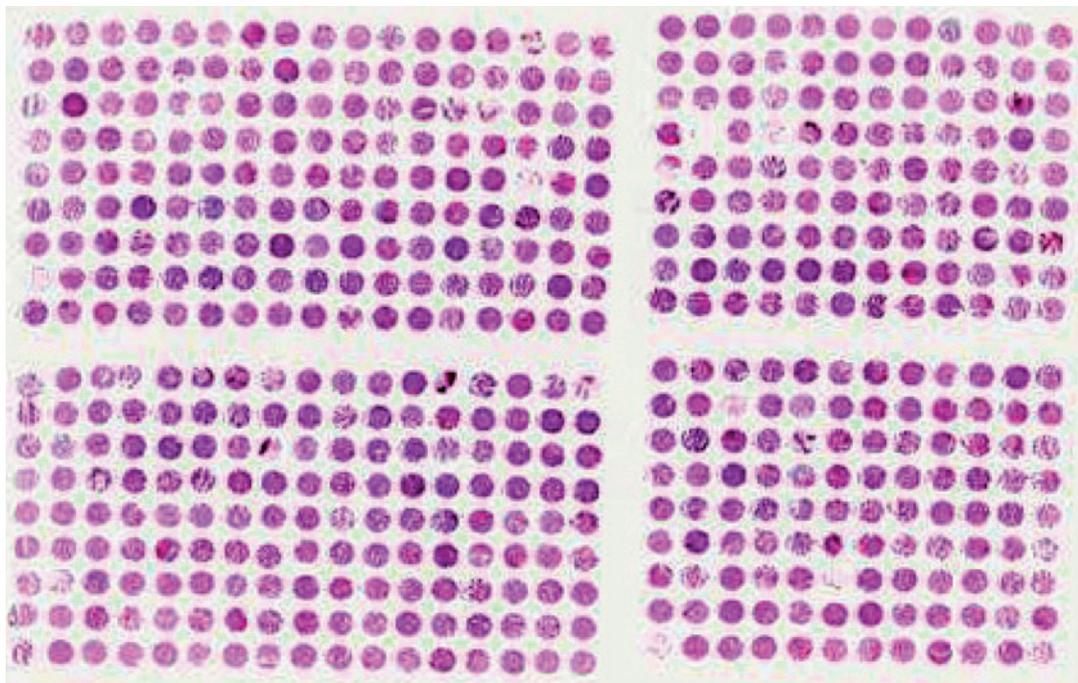


Abbildung 2:

Hämatoxylin-Eosin gefärbter Schnitt eines der sieben Paraffinblöcke, aus dem der gesamte, 2221 Tumoren umfassende Array besteht. Dieser Teilarray enthält 522 Gewebesots. Der Durchmesser eines einzelnen Gewebesots beträgt 0,6mm.

Bildnachweis: Institut für Pathologie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

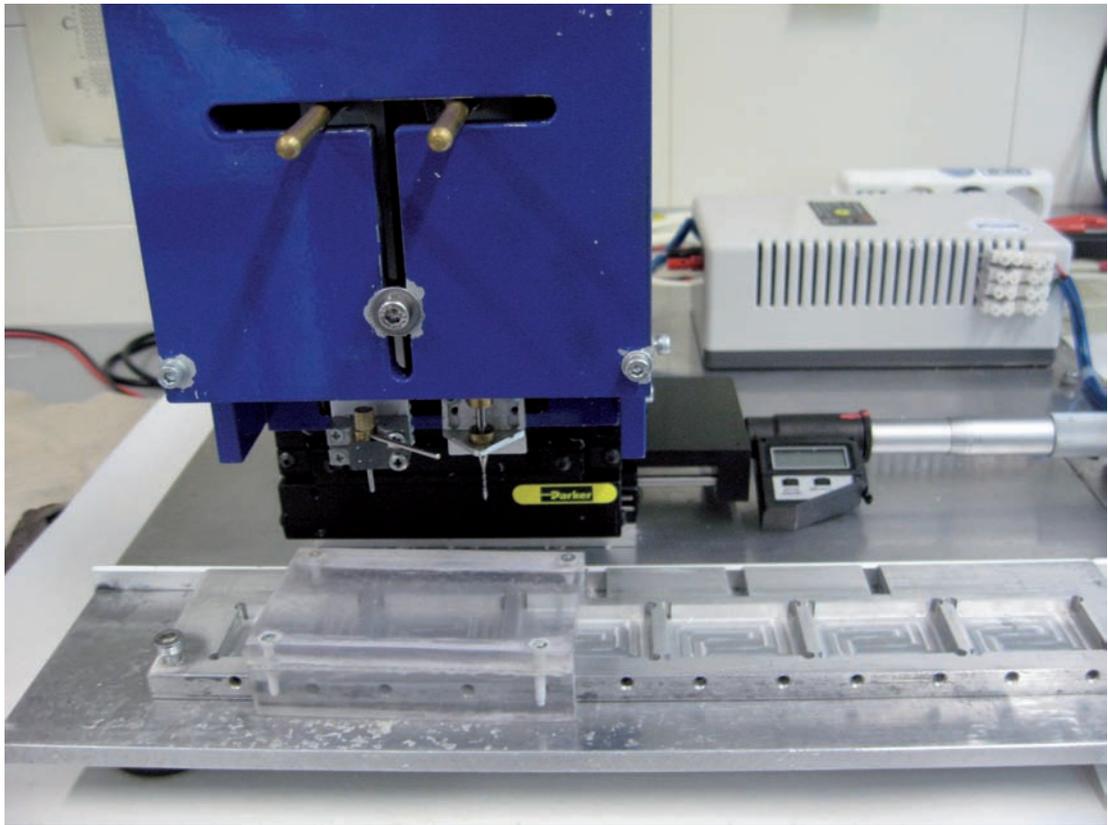


Abbildung 3:
Stanzgerät zur Herstellung des Arrays

Bildnachweis:
eigen

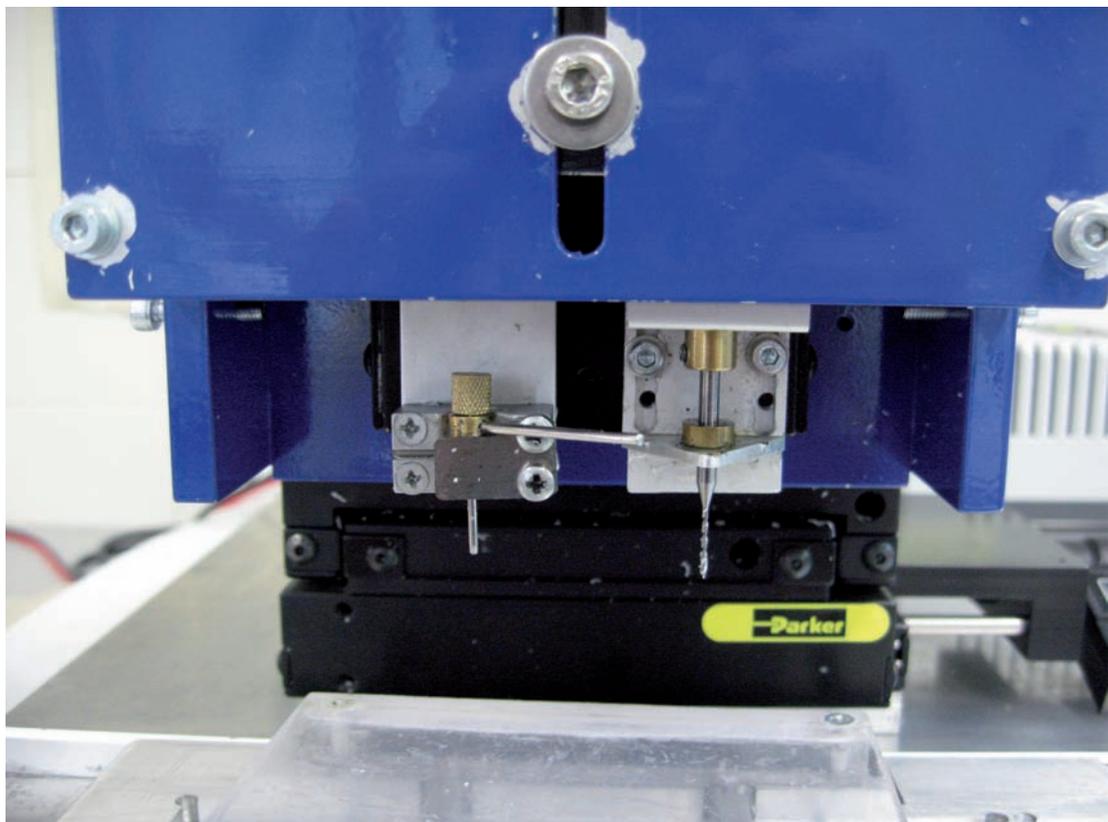


Abbildung 4:
Stanzgerät zur Herstellung des Arrays

Bildnachweis:
eigen

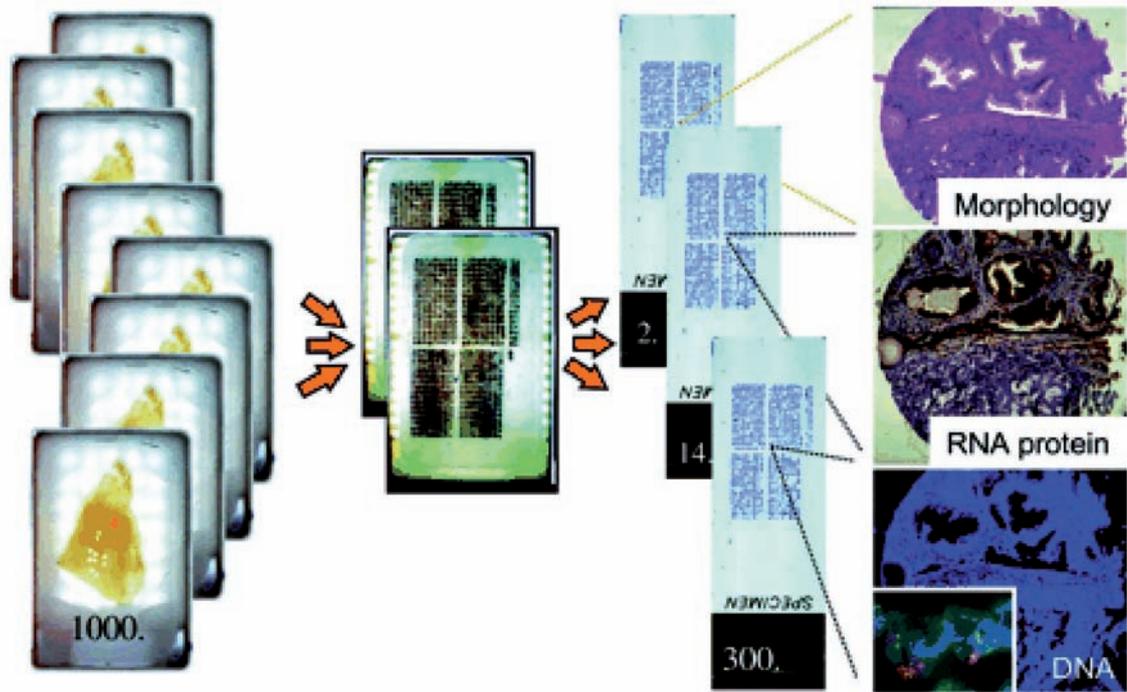


Abbildung 5:
Herstellung des TMA
Bildnachweis:
Kallioniemi et al Human Molecular Genetics 2001 (Kallioniemi et al., 2001)

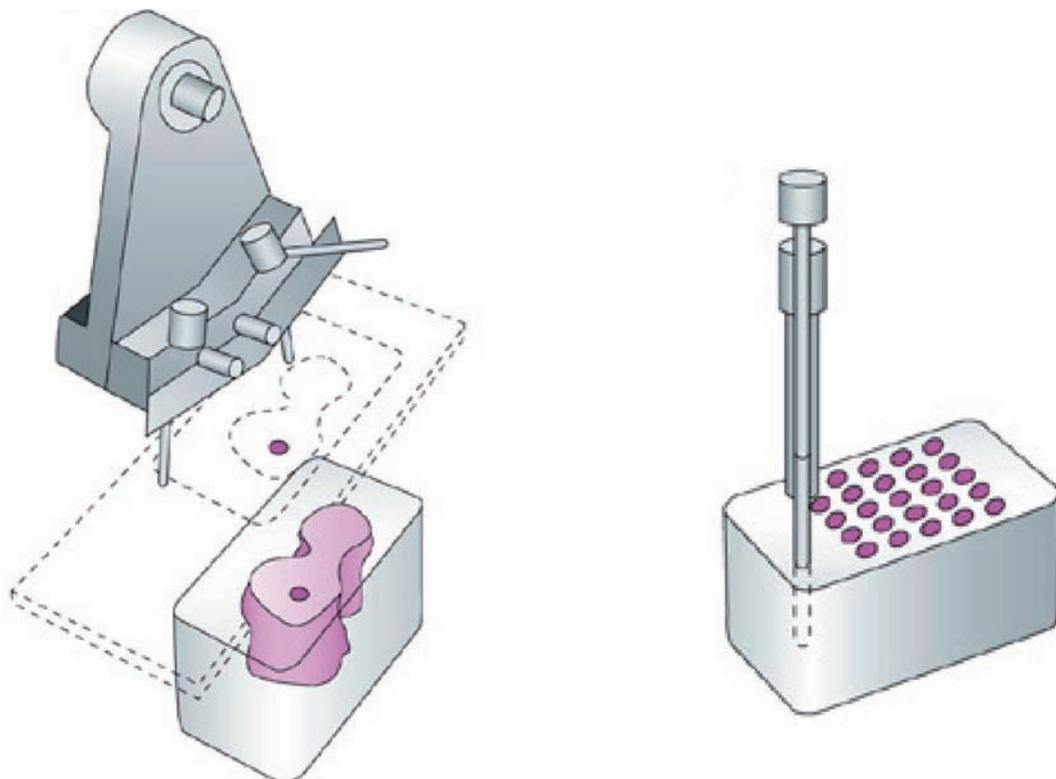


Abbildung 6:
Stanzgerät und seine Funktion,
Bildnachweis:
Sauter et al Nature reviews drug discovery 2003 (Sauter et al., 2003)

2.3. Zusammensetzung des TMA:

Für die Untersuchungen verwendeten wir einen bereits existierenden TMA mit 2197 Brustkrebsproben, zusammengestellt aus Gewebeproben aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Basel, dem Institut für klinische Pathologie in Basel und dem Institut für Pathologie des Stadtklinikums Triemly, Zürich (Ruiz C, 2006). Die Zusammensetzung des Arrays ist der Tabelle 1 zu entnehmen. Das mittlere Lebensalter der Patientinnen war 62 Jahre (26-101 Jahre), Follow-up-Daten über eine mittlere Zeit von 68 Monaten (1-176 Monaten) waren vorhanden. Ebenso existierten bereits weitere Daten molekularer Marker, die an oben beschriebenen Array untersucht wurden, wie Amplifikationen von FISH, HER-2, MYC und CCND1 und immunhistochemische Daten zu Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus und Ki67 (Ruiz C, 2006, Al-Kuraya et al., 2004). Der Nutzung des Arrays sowie der Patientendaten war von der Ethikkommission der Universität Hamburg zugestimmt worden.

2.4. Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Untersuchung wurde der Antikörper „VEGF-Rezeptor-1“ der Firma Abcam (Bestellnr. ab 2350) verwendet.

Die Färbung erfolgte gemäss folgendem Protokoll: Zuerst eine Vorbehandlung im Autoclav über 5 Minuten bei 121° mit Tris-EDTA-Citrat Puffer bei einem pH von 7,8 Peroxidase Block: über 10 Min mit H₂O₂ von DAKO S2023 ready to use, Puffer mit TBST mal über 5 Min. Es folgt die Antikörper-Inkubation: VEGFR-1 AK, Verdünnung 1:450 in Antibody-Diluent von DAKO S' 2022 über 1 Stunde bei 37°, erneuter Puffer mit TBST 2 mal über 5 Min., Inkubation mit EnVision rabbit/mouse (DAKO 5007) über 30 min bei 37°, Puffer mit TBST 2 mal über 5 Min. Färben mit DAB-Chromogen (K5007) über 10 Min bei Raumtemperatur, spülen mit Aqua desr, Anwendung in Haemalaun über 1 Min, Bläuen mit Leitungswasser über 5 Min, dann Fixierung mit aufsteigender Alkoholreihe.

2.5. Auswertung

Die Intensität der Färbung und der Anteil gefärbter Zellen wurden für jeden Tumor ausgewertet. Die Farbeintensität wurde geschätzt und in einen Score aus vier Stufen eingeteilt: 0=keine Farbeintensität, 1+=schwache Färbung, 2+=moderate Färbung, 3+=starke Färbung. Der Anteil gefärbter Zellen wurde ebenfalls in einem Score aus vier Stufen bewertet: 0=keine gefärbten Zellen, 1 ≤25% gefärbte Zellen, 2 ≤50% gefärbte Zellen, 3 ≤75% gefärbte Zellen, 4 >75% gefärbte Zellen. Abschliessend wurden die Ergebnisse der IHC nach folgenden Kriterien eingeteilt: Negativ: keine Färbung, schwach: Intensität 1+ in <70% der Zellen oder Intensität 2+ in <30% der Zellen, moderat: Intensität 1+ in >70% der Zellen oder Intensität 2+ in >30% der Zellen aber <70% der Zellen, stark= Intensität 2+in <70% der Zellen oder Intensität 3+ in >30% der Zellen.

2.6. Statistik

Wir setzten den Pearson's chi-square Test und Students T-Test ein, um den Zusammenhang zwischen den immunhistochemischen Ergebnissen für VEGFR-1 und klinisch pathologischen sowie molekularbiologischen Parametern zu untersuchen. Auswirkungen auf die Überlebenszeit testeten wir mit Kaplan-Meyer-Kurven und log-rank Test. Um unabhängige Prognosefaktoren bezüglich des Gesamtüberlebens festzustellen, wurde ein Cox-Proportional-Hazards-Modell verwendet. Für die Untersuchungen wurde die Software JMP Version 9.0 verwendet.

3. ERGEBNISSE:

3.1. Technische Ergebnisse:

Insgesamt 1567 der 2197 Proben waren auswertbar, 630 Proben (25,8%) lieferten kein auswertbares Ergebnis. Dies lag am Fehlen von Gewebe im Spot, oder am Fehlen entsprechender Tumorzellen im zugehörigen Spot.

3.2. Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der VEGFR-1 Immunohistochemie und histologischem Tumortyp, Zellproliferationsgrad und molekularen Markern.

Wir fanden die immunhistochemische Färbung für VEGFR-1 in der Zellmembran von luminalen Epithelzellen und teilweise auch im Zytoplasma. Der TMA beinhaltete ebenso fünf Proben mit normalem Brustgewebe, diese zeigten alle eine starke Färbung für VEGFR-1. Krebszellen zeigen typischerweise ebenfalls eine starke Anfärbung für VEGFR-1, wenn man diese mit der Färbeintensität von normalem Brustgewebe vergleicht: Wir fanden eine starke Färbeintensität bei 1299 Proben (79,7%), moderate Färbeintensität bei 178 Proben (10,9%), eine schwache Färbeintensität bei 102 Proben (6,2%), keine Färbung bei 51 Proben (3,1%) bei insgesamt 1630 interpretierbaren Krebsgeweben. In Abbildung Nr. 7 sind repräsentative Abbildungen der unterschiedlichen Färbeintensitäten gezeigt.

A: normales Brustgewebe, B-F: Brustkrebsgewebe, B: keine Färbung, C: schwache Färbung, D-E: mässige bis starke Färbung. Abbildung D zeigt eine hauptsächlich cytoplasmatische-, E eine membranöse- und F eine cytoplasmatische und membranöse Färbung

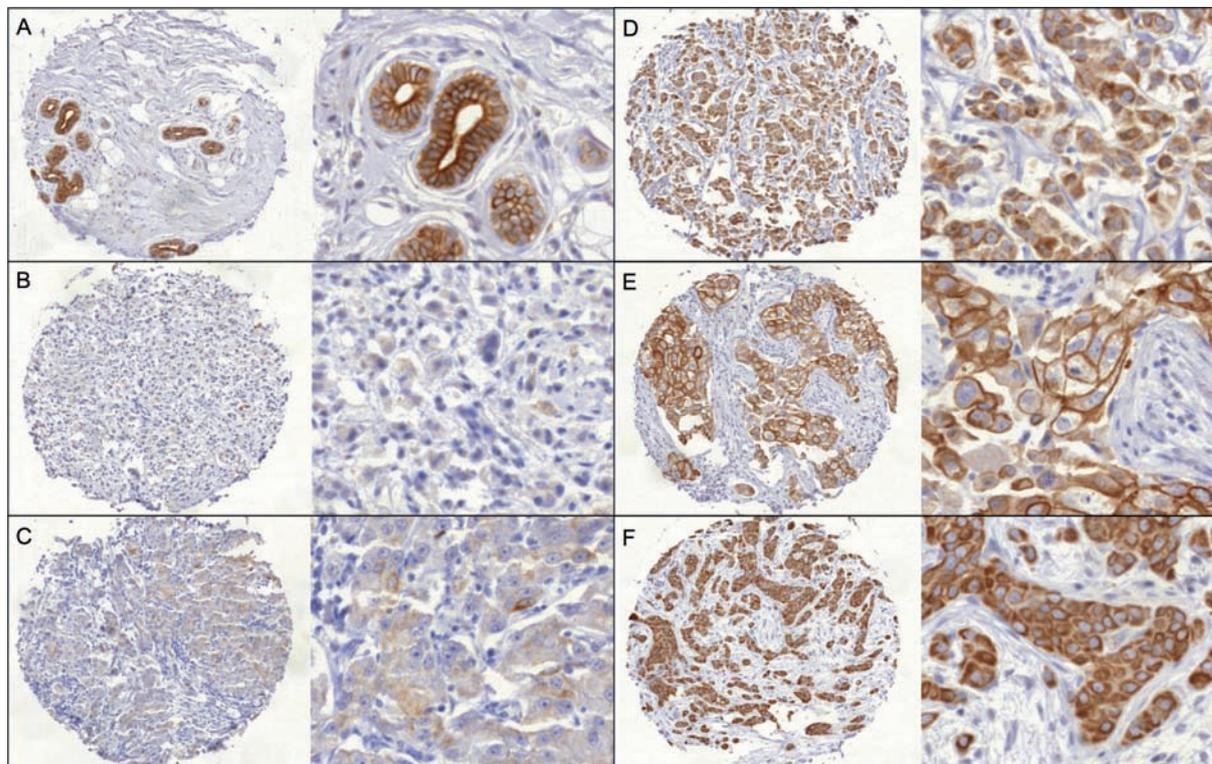


Abbildung 7:

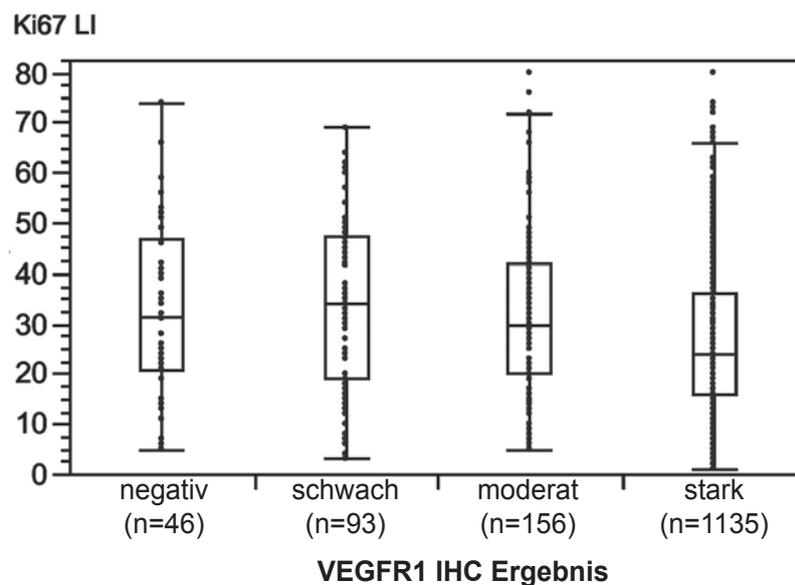
Beispiele der VEGFR-1 Immunhistochemischen Färbung in 10-facher und 40-facher Vergrößerung

Bildnachweis: Institut für Pathologie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Die meisten histologischen Tumortypen zeigten vergleichbare Färbeintensitäten (starke VEGFR-1 Färbung in 70-90%), mit Ausnahme der medullären Tumoren, welche einen signifikant niedrigeren Anteil an stark VEGFR-1 positiven Tumoren zeigten (50%, $p < 0,0001$ im Vergleich zu den duktalem Tumoren). Der Grad der VEGFR-1 Färbung korrelierte invers mit Tumorstadium ($p = 0,0431$) und BRE Grad ($p < 0,0001$), obwohl der Unterschied in Zahlen gemessen klein war. Das Ausmass der Färbung stand in keinem Zusammenhang zum Lymphknotenstatus. Wir griffen auf bereits zuvor an diesem TMA bestimmte immunhistochemische Daten zum Proliferationsindex Ki 67 zurück (Ruiz C, 2006). Wir fanden einen gegenläufigen Zusammenhang zwischen VEGFR-1 Färbung und Proliferationsaktivität: Bei 1135 Krebsproben mit starker VEGFR-1 Färbeintensität stieg der durchschnittliche Ki67LI an von 25,6% auf 33,1% bei 46 Tumoren, die keine VEGFR-1 Färbung aufweisen konnten ($p < 0,0001$), siehe Abbildung Nr. 8.

Abbildung 8:

Zusammenhang zwischen immunhistochemischer Färbung von VEGFR1 und Zellproliferation, gemessen am Ki67 labeling index ($p < 0,0001$).



Desweiteren fand sich eine Zusammenhang zwischen starker VEGFR-1 Färbung und positivem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus (jeweils $p < 0,0001$), ein Zusammenhang mit Amplifikationen von HER2, CCND1 oder MYC konnte nicht gesehen werden. Alle diese Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1:

Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Immunhistochemischen Färbung von VEGFR-1, histologischem Tumortyp, Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus und Amplifikationen von HER2, MYC und CCND1

		VEGFR 1 IHC Ergebnisse						
		Auf dem TMA (n)	Auswertbar (n)	Negativ (%)	Schwach (%)	Moderat (%)	Stark (%)	p-Wert
Alle Tumoren		2197	1630	3,1	6,3	10,9	79,9	
Histologie	No special type	1531	1146	3,1	6,2	11,6	79,1	0,0002**
	Lobuläres Karzinom	311	227	2,2	3,5	6,2	88,1	
	Kribiformes Karzinom	64	48	0,0	6,3	6,3	87,5	
	Medulläres Karzinom	57	38	13,2	21,1	15,8	50	
	Tubuläres Karzinom	56	40	0	2,5	7,5	90	
	Papilläres Karzinom	30	24	4,2	4,2	16,7	75	
	Muzinöses Karzinom	69	46	2,2	10,9	10,9	76,1	
	Andere seltene Typen*	79	61	4,9	8,2	16,4	70,5	
pT Stadium	pT1	804	540	1,5	5,2	10	83,3	0,0431
	pT2	1015	784	3,7	7,1	12,1	77	
	pT3	124	99	7,1	4,0	8,1	80,8	
	pT4	242	198	3,5	6,6	9,6	80,3	
BRE Grad	Grad 1	539	384	2,9	3,4	6,5	87,2	<0,0001
	Grad 2	839	627	1,9	5,6	9,7	82,2	
	Grad 3	646	506	5,1	9,7	14,2	70,9	
Nodalstatus	pN0	936	671	3,4	7,0	12,1	77,5	0,073
	pN1	783	584	2,2	5,8	11	81	
	pN2	121	93	7,5	11,8	10,8	69,9	
ER Statuts	Negativ	474	360	5,3	11,4	13,9	69,4	<0,0001
	Positiv	1544	1196	2,5	4,8	10,2	82,4	
PR Status	Negativ	1265	986	3,4	8,4	12,8	75,4	<0,0001
	Positiv	661	539	2,4	1,9	8	87,8	
HER2 FISH	Keine Amplifikation	1349	1051	3,1	5,8	10,4	80,7	0,0745
	Amplifikation	282	227	0,9	3,5	10,6	85	
CCND 1 FISH	Keine Amplifikation	1429	1129	2,6	5,1	10,9	81,4	0,396
	Amplifikation	358	281	2,1	7,8	10,3	79,7	
MYC FISH	Keine Amplifikation	1425	1146	2,9	5,8	10,5	80,9	0,1374
	Amplifikation	79	66	6,1	6,1	18,2	69,7	

*darin enthalten: Adenoid-Cystisches Karzinom, Apokrines Karzinom, Atypisches medulläres Karzinom, Karzinosarkom, Klarzellkarzinom, Histiozytisches Karzinom, Lipidreiches Karzinom, Lipidreiches- oder Histiozytisches Karzinom, Metaplastisches Karzinom, Neuroendokrines Karzinom, Siegelringzell-karzinom und Kleinzelliges Karzinom
** Medulläres vs Duktale Karzinom (NST)

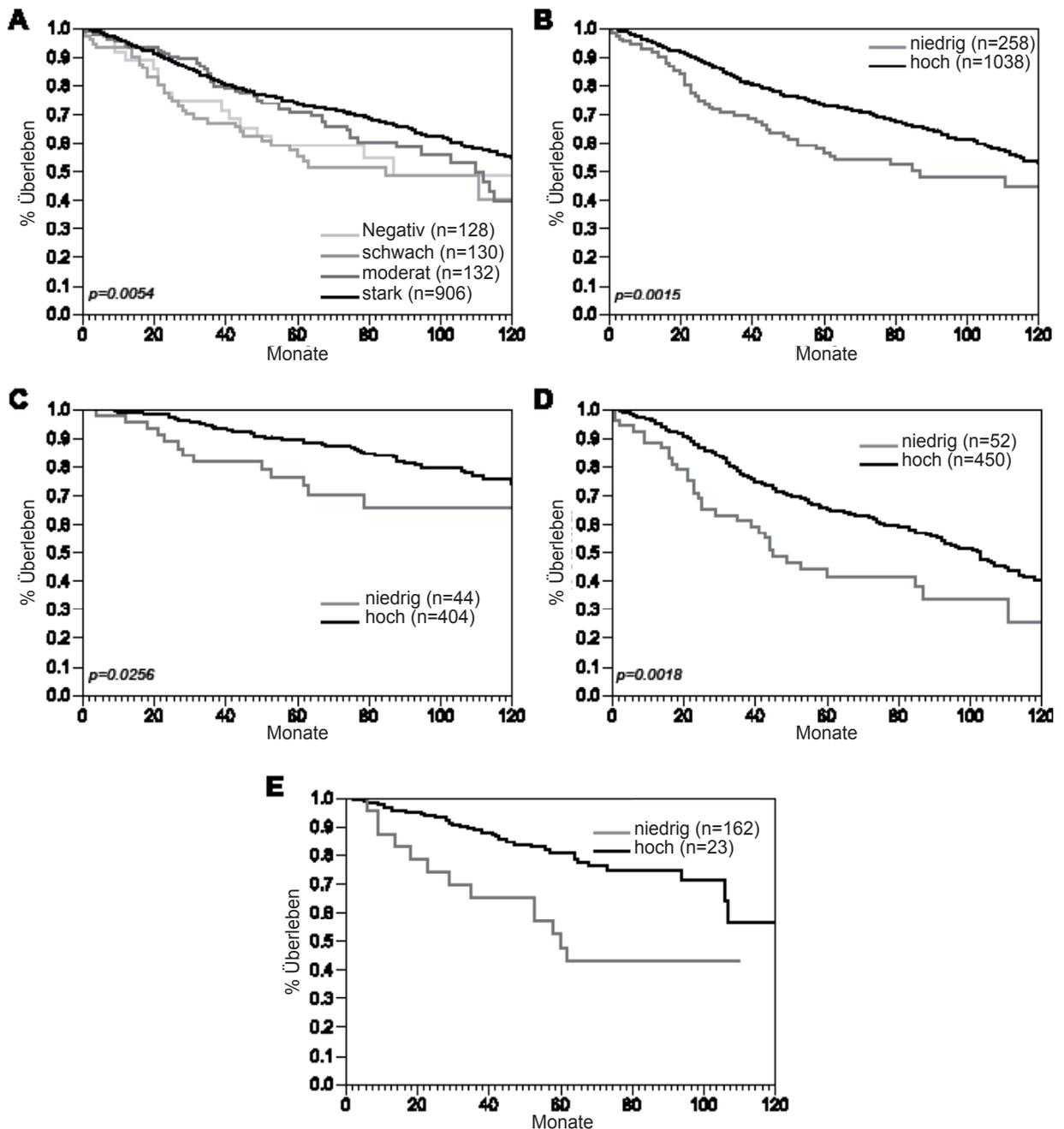
3.3. Einfluss der VEGFR-1 Expression auf das Überleben der Patientinnen und Ansprechen auf Therapie mit Tamoxifen

Um einen Einfluss der unterschiedlichen histologischen Subtypen auf das Überleben auszuschliessen, haben wir uns für die Untersuchung der Prognose anhand Kaplan-Meyer-Überlebenskurven allein auf die grösste Gruppe der Karzinome of non special-type (NST) beschränkt. In dieser Gruppe gab es 1144 Proben mit interpretierbaren und auswertbaren Ergebnissen für VEGFR-1. Da wir feststellten, dass Tumore mit starker und moderater VEGFR-1-Färbung bessere Überlebenskurven zeigten als Tumore mit schwacher und negativer Färbung, (p=0,0054, siehe Abbildung Nr 9A) teilten wir die Tumoren of non special-Type in zwei Untergruppen auf, mit niedriger (negativer und schwacher) und hoher (moderater und starker) VEGFR-1 Expression, um an diesen beiden Subgruppen weitere Überlebensdaten zu untersuchen. Gemäss diesen Berechnungen zeigte sich bei den Tumoren non special type ein besseres Überleben für Tumore mit hoher VEGFR-1 Expression denn mit niedriger VEGR-Expression (p=0,0015, Abbildung 9B). Dies bestätigte sich

auch bei Betrachtung nodalnegativer Tumore of non special type (pN0, $p=0,0256$ Abbildung 9C) und nodalpositiver Tumore of non special type (pN1-2, $p= 0,0018$ Abbildung 9D) Desweiteren betrachteten wir eine kleine Supgruppe von 185 Patientinnen, die eine Therapie mit Tamoxifen erhielten und fanden einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen hoher VEGFR-1 Expression und verlängerter Überlebenszeit ($p=0010$, Abbildung 9E).

Abbildung 9:

Prognostischer Wert der VEGFR-1 Färbung bei A) sämtlichen Tumoren of no special type (NST), unterteilt in vier Gruppen, B) bei sämtlichen Tumoren NST unterschieden zwischen niedriger (negativer und schwacher) und hoher (mittlerer und starker) Färbung, C) in der Untergruppe nodal negativer NST Tumore, D) in der Untergruppe nodal positiver NST Tumore und E) in einer Untergruppe bestehend aus 185 Patientinnen, welche Tamoxifen als alleinige Therapie erhielten



4. DISKUSSION

In dieser Untersuchung konnten wir an einem TMA mit 2197 Mammakarzinomproben die VEGFR-1 Expression für über 1600 Proben darstellen. Hierbei verwendeten wir einen Antikörper, der direkt an den membrangebundenen Anteil des VEGFR-1 Rezeptors bindet.

Verschiedene Forschungsgruppen haben sich bereits zuvor mit der Frage der VEGFR-1 Expression beim Mammakarzinom beschäftigt, unter Verwendung unterschiedlicher Antikörper, in Kombination mit verschiedenen weiteren Markern und verschiedenen Subgruppen und haben diskrepante Ergebnisse erzielt.

Dales et al. (Dales et al., 2004) zeigten ein erhöhtes Risiko für Metastasierung und Lokalrezidiv bei vermehrter VEGFR-1 Expression für nodalnegative Patientinnen, sowie insgesamt ein kürzeres krankheitsfreies Intervall, konnten jedoch keinen Vorhersagewert bzgl. der Gesamtüberlebenszeit feststellen. Ghosh et al. (Ghosh et al., 2008) zeigten an einer TMA-Studie mit 642 primären Brustkrebsproben eine signifikante Assoziation zwischen hohen Werten von VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 und NP-1 Expression und verschlechterter Gesamtüberlebenszeit. Mylona et al. (Mylona et al., 2007) untersuchten immunhistochemisch an 170 Brustkrebsproben die Expressionsmuster von VEGF-A, VEGF-B und VEGFR-1 im Verhältnis zu allseits bekannten klinischen und pathologischen Parametern, sowie zu p53 und c-erbB-2. Bei keinem der untersuchten Marker konnte eine Korrelation zu klinikopathologischen Parametern festgestellt werden, mit Ausnahme von stromaständigem VEGFR-1, das invers korrelierte mit dem Progesteronrezeptorstatus. Für Patienten mit p53-positiven Tumoren war ein positiver VEGFR-1-Status mit verschlechtertem Gesamtüberleben assoziiert. In multivariater Analyse zeigte sich VEGFR-1 als unabhängiger Prognosefaktor für nodalpositive Patienten. Zhukova et al. (Zhukova et al., 2003) untersuchten Tumorproben von Patientinnen, die zuvor eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben auf Flk-1, Flt-1 und VEGF-Expression und kamen zu dem Ergebnis, dass eine Überexpression von Flk-1 mit einer schlechten Prognose assoziiert war, die Überexpression von Flt-1 und VEGF-Status hatte keinen Einfluss auf die Prognose.

Gegenteilig dazu sind Ergebnisse von Schmidt et al. (Schmidt et al., 2008), welche eine Assoziation zwischen VEGF- und VEGFR-1-Expression und negativem Lymphknotenstatus und somit besserer Prognose feststellten.

Bando et al. (Bando et al., 2005) untersuchten das Verhältnis zwischen intratumoralem freien und gesamt VEGF, löslichem VEGFR-1 (s-VEGFR-1), VEGFR-2 und Patientenprognose und zeigten, dass die Werte von Gesamt-VEGF und löslichem VEGF, sowie das Verhältnis von s-VEGFR-1 zu Gesamt-VEGF von prognostischer Bedeutung beim Mammakarzinom sind und in Zusammenhang zum Östrogenrezeptorstatus zu betrachten sind. Hier decken sich ihre Beobachtungen mit einer weiteren Studie, die VEGF, s-VEGFR-1 und das Verhältnis von s-VEGFR-1 zu VEGF (s-VEGFR-1/VEGF-ratio, S/V ratio) als Prognosefaktoren bezeichnet (Toi et al., 2002) Insgesamt beschreiben die Ergebnisse früherer Untersuchungen, dass die Expression von VEGFR-1 beim Mammakarzinom mit einer verschlechterten Prognose assoziiert ist.

Tabelle 2:
Übersicht zu Studien bezüglich VEGFR-1 Expression bei Mammakarzinom

Autor& Journal	Titel	Kollektiv	Anzahl=n	Marker	Methode	VEGFR-1 Antikörper	Ergebnis in Bezug auf die Prognose abhängig von der VEGFR-1 Expression	Anmerkung
Bando H et al British Journal of Cancer 2005	Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer	Primäres Mammakarzinom	n=202	freies VEGF Gesamt- VEGF s-VEGFR-1 VEGFR-2	ELISA		niedriges s-VEGFR-1 und hohes Gesamt-VEGF: assoziiert mit schlechter Prognose (DFS und OS) ratio s-VEGFR1/VEGF:prognostisch relevant (DFS p=0,008, OS p=0,0002) VEGF prognostisch relevant für ER+ Tumoren s-VEGFR-1 prognostisch relevant für ER- Tumoren	
Dales JP et al British Journal of Cancer 2004	Prediction of metastasis risk (11 year follow-up) using VEGF-R1, VEGF-R2, Tie-2/Tek and CD105 expression	Primäres Mammakarzinom	n=905	VEGFR-1 VEGFR-2 Tie-2/Tek CD 105	IHC	VEGF-R1 mouse monoclonal antibodies (Sigma-Aldrich, 38297 St Quentin Fallavier, France)	VEGFR-1-, (p=0,001),CD-105-, Tie2/Tek-Expression, korreliert mit erhöhtem Risiko für Metastasierung bei nodalneg. ErkrankungC VEGFR-1-Expression korreliert mit erhöhtem Risiko für Lokalrezidiv (p=0,01)	
Ghosh S et al Human Pathology 2008	High levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (VEGFR1, VEGFR2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer	Primäres Mammakarzinom	n=642	VEGF VEGFR-1 VEGFR-2 Neuropilin-1	AQUA (Automated image analysis)	Polyklonaler Antikörper anti-VEGFR-1	hohe Werte von VEGF, VEGFR-1 (p=0,0160), VEGFR-2 und Neuropilin sind mit schlechter Prognose assoziiert	
Myiona E et al Gynecologic Oncology 2007	The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and-B and their receptor, VEGFR-1 in invasive breast carcinoma	Primäres Mammakarzinom	n=177	VEGF-A VEGF-B VEGFR-1 p53 c-erbB2	IHC	VEGFR-1 polyclonal antibody (rabbit/C-17, sc: 316) (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA)	VEGFR-1 korreliert invers mit PR-Status Tumor-VEGF-A und Stroma-VEGFR-1 korrelieren positiv mit p53 VEGFR-1-Expression ist unabhängiger Indikator für schlechte Prognose (p=0,037)	meist cytoplasmatische Expression

Autor& Journal	Titel	Kollektiv	Anzahl=n	Marker	Methode	VEGFR-1 Antikörper	Ergebnis in Bezug auf die Prognose abhängig von der VEGFR-1 Expression	Anmerkung
Ning Q et al PLOS one 2013	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Activation promotes Migration and invasion of Breast Cancer Cells through epithelial mesenchymal transition	Primäres Mammakarzinom	n=94	VEGFR-1 E-cadherin N-cadherin Snail	IHC	VEGFR-1 rabbit polyclonal antibody 1:50 Beijings Biosynthesis Biotechnology	VEGFR-1 Expression korreliert mit nodalpositiven Tumoren (p=0,032)	keine VEGFR-1 Expression in Brustnormalgewebe, 60,6% VEGFR-1 Expression in Tumorgewebe zytoplasmatische Expression
Schmidt M et al Anticancer Research 2008	Expression of VEGFR-1 (Flt-1) in Breast Cancer is Associated with VEGF Expression and with Node-negative Tumor Stage	primäres Mammakarzinom 6 Mammakarzinom Zelllinien	n=93	VEGF VEGFR-1	IHC RT-PCR Western blot	Flt-1/VEGFR1 Ab1 (clone RB-T527-R7, ready to use, Labvision, Astmoor, UK)	VEGFR-1-Expression mit VEGF-Expression und nodalnegativen Tumoren assoziiert (p=0,02) VEGFR-1 ist ein Indikator für bessere Prognose	
Toi M et al Int J Cancer 2002	Significance of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/soluble VEGF Receptor 1 Relationship in Breast Cancer	Primäres Mammakarzinom	n=110	VEGF s-VEGFR-1	ELISA Immunoblot		niedriges VEGF, hohes s-VEGFR-1 und eine hohe S/V ratio (Verhältniss s-VEGFR-1 zu VEGF) sind assoziiert mit gutem DFS und OS. Alle drei Werte sind unabhängige Prognosefaktoren	
Zhukova LG Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2002	Expression of Flt-1 and Flk-1 Receptors for Vascular Endothelial Growth Factor on Tumor Cells as a new Prognostic Criterion for Locally Advanced Breast Cancer	lokal fortgeschrittenes Mammakarzinom nach neoadjuvanter Chemotherapie	n=83	VEGF VEGFR-1 VEGFR-2	IHC	Polyclonal antibody S-17 für VEGFR-1, Santa Cruz BiotechNorthern Blot	keine prognostische Signifikanz für VEGF Assoziation von VEGFR-2 mit schlechter Prognose (DFS / OS) Assoziation von VEGFR-1 mit guter Prognose (DFS p= 0,0064/OS p= 0,014)	

Wir haben anhand der grossen Fallzahl von über 1600 auswertbaren Mammakarzinomgeweben festgestellt, dass ein Verlust der VEGFR-1 Expression, oder eine niedrige VEGFR-1 Expression mit Tumorprogression, schneller Tumorzellproliferation und verminderter Gesamtüberlebenszeit einhergehen.

Desweiteren zeigen unsere Ergebnisse, dass eine hohe VEGFR-1 Expression ein typisches Merkmal sowohl von gesundem Mammagewebe, als auch von Mammakarzinomgewebe ist. Sämtliche Mammanormalgewebe (5/5) und 90% der Karzinome, zeigten in unserer Untersuchung eine starke VEGFR-1 Färbung, was annehmen lässt, dass eine starke VEGFR-1 Expression ein physiologischer Zustand ist.

Damit unterstützen unsere Daten die Annahme, dass der VEGFR-1 in seiner vollen Länge ein natürlicher Regulator des VEGFR-2 ist, indem er freies VEGF bindet (Hiratsuka et al., 1998, Shibuya), und decken sich mit den Aussagen früherer Studien, in denen VEGFR-1 als Indikator für eine gute Prognose bei Brustkrebserkrankungen gesehen wurde (Schmidt et al., 2008).

Geht man davon aus, dass VEGFR-2 ein Aktivator des Zellwachstum ist, so kann man die gegenläufigen Eigenschaften von Tumoren mit niedriger VEGFR-1 Expression als Folgen einer nicht regulierten VEGFR-2 Expression sehen, hervorgerufen durch das Fehlen ausreichender Spiegel von VEGFR-1.

Der hohe Anteil von Tumoren mit starker VEGFR-1 Expression in unserer Untersuchung stimmt mit den Ergebnissen von Mylona et al. überein (Mylona et al., 2007), die eine Expression von VEGFR-1 in 100% von 25 Proben normalen Mammagewebes und 90% bei 96 Proben mit invasivem Brustkrebs fanden. In oben beschriebener Studie wurde der gleiche Antikörper verwendet wie in unserer Untersuchung. Gemäss den Angaben des Herstellers entdeckt dieser polyklonale Antikörper (Abcam ab 2350) eine 180kD Protein Sequenz, die nur an dem membrangebundenen Anteil des VEGFR-1 vorhanden ist und weder bei der löslichen Form des Rezeptors, s-VEGFR-1, noch bei phosphoryliertem VEGFR-1. Andere Studien, die andere Antikörper verwendet haben, zeigten unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Anfärbung von gesundem Mammagewebe sowie Mammatumorgewebe, wobei einige sogar das komplette Fehlen der Färbung von Mammanormalgewebe zeigten (Wulfing et al., 2005) und es weit divergierende Ergebnisse bezüglich der Rate an positiv gefärbten Tumorzellen gab, variierend von 16%-91% (Mylona et al., 2007, Schmidt et al., 2008, Wulfing et al., 2005, Paradiso et al., 2005).

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen finden sich in mehreren der Studien eine Assoziation zwischen starker VEGFR-1 Färbung und aggressiven Eigenschaften der Tumore, wie frühes Rezidiv, verminderte Gesamtüberlebenszeit und Metastastierung (Ning et al., Mylona et al., 2007, Dales et al., 2004). Solch unterschiedliche Ergebnisse liegen höchstwahrscheinlich an den unterschiedlichen Antikörpern, die in den Studien verwendet wurden. Die meisten der Studien beschreiben eine cytoplasmatische Färbung (Dales et al., 2004, Mylona et al., 2007, Ning et al.), was eher nicht zu erwarten war, da der VEGFR-1 Rezeptor in seiner vollen Länge ein membrangebundener Rezeptor ist und so zumindest immer ein Mindestanteil an membranöser Färbung zu erwarten ist. Es existiert eine hohe Übereinstimmung zwischen dem membrangebundenen Rezeptor, der in seiner Gesamtlänge vorliegt, der löslichen Form des Rezeptors, s-VEGFR-1, welcher der transmembranöse und der intrazelluläre Part fehlen und den fünf unterschiedlichen Isoformen, z.B. iVEGFR-1, welches kürzlich beschrieben wurde und nur eine intrazelluläre Domäne besitzt (Mezquita et al.). Es ist gut vorstellbar, dass es bei Anwendung einiger Antikörper zu Kreuzreaktionen mit den unterschiedlichen Isoformen kommt. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein, insbesondere da einige Studien zeigten, dass s-VEGFR-1 und iVEGFR-1 gegensätzlichen Einfluss auf Tumorbiologie und Prognose der Patienten haben (Toi et al., 2002, Bando et al., 2005).

Unsere Ergebnisse zeigten, dass niedrige Werte von VEGFR-1 an eine verminderte Positivität von Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus gekoppelt waren. Betrachtet man eine kleine Subgruppe aus östrogenrezeptorpositiven Patientinnen, welche eine Therapie mit dem selektiven Östrogen-

rezeptormodulator Tamoxifen erhielten, so zeigte sich, dass in dieser Subgruppe eine niedrige VEGFR-1 Expression mit einer verkürzten Überlebenszeit assoziiert war. Diese Daten unterstützen weiter die Annahme, dass VEGFR-1 eine Schlüsselfunktion bei der Signaltransduktion von VEGFR-2 besitzt, da mehrere Studien gezeigt hatten, dass die Aktivierung von VEGFR-2 mit hohem Tumorstadium und Grading, Metastasierung und Östrogenrezeptornegativität sowie frühem Rezidiv bei Patientinnen unter Therapie mit Tamoxifen assoziiert ist (Linderholm et al., Ryden et al., 2005, Johansson I, 2012).

Betrachtet man unsere Ergebnisse in diesem Zusammenhang, so kann man annehmen dass VEGFR-1, bzw. VEGFR-1 und VEGFR-2 gemeinsam, Marker sein könnten, um Patientinnen zu erkennen, welche von einer antihormonellen Therapie profitieren können. Damit mag die Bestimmung des VEGFR-1 und -2 Status einer Patientin ein weiterer Schritt in der zielgerichteten Tumorthherapie sein.

2008 erteilte die FDA für Bevacizumab, einen neutralisierenden Antikörper für VEGF, die Zulassung zur Behandlung des fortgeschrittenen und metastasierten Mammacarcinoms. In Folge durchgeführte grosse klinische Phase III Studien (E2100, RIBBON, AVADO) konnten keine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit nachweisen, sodass die Zulassung für Bevacizumab für das Mammakarzinom 2011 zurückgenommen wurde. Der Grund für den ausbleibenden Erfolg der antiangiogenetischen Therapie ist immer noch nicht klar verstanden, zumal der Vorgang der Neoangiogenese beim Tumorwachstum unumstritten ist (Folkman, 1995). Setzt man voraus, dass 90% der Tumoren in unserer Untersuchungen, davon 70-80% mit hohem Grading, fortgeschrittenem Tumorstadium oder im metastasierten Zustand eine starke VEGFR-1 Färbung anzeigten, dann ist es anzunehmen, dass ein Grossteil der Mammakarzinome die Angiogenese über einen VEGF/VEGFR-1 Kreislauf regelt. Es wäre interessant, die Wirkung von VEGF-Inhibitoren an Mammakarzinomproben mit unterschiedlicher VEGFR-1 Expression zu untersuchen. Zumindest theoretisch könnte man spekulieren, dass eine VEGF-Hemmung effektiver sein könnte bei Tumoren, welche niedrige oder keine Level an VEGFR-1 exprimieren, als bei jenen, welche physiologischerweise hohe VEGFR-1-Protein Spiegel besitzen, da ein stark exprimiertes VEGFR-1-Protein wiederum das frei verfügbare und somit hemmbare VEGF reduziert. Somit könnte auch hier das Mass der VEGFR-1 Expression dazu beitragen Patientinnen zu selektieren, welche von einer antiangiogenetischen Therapie besonders profitieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Für Wachstum- und Metastasierung von Tumoren ist die Tumorneoangiogenese unerlässlich. Dieser Vorgang wird kontrolliert von angiogenen Wachstumsfaktoren, die ihre Aktivität über Wachstumsfaktorrezeptoren steuern, wie den VEGFR-1. In dieser Untersuchung verwendeten wir einen Tissue-Micro-Array (TMA) mit über 2000 Mammakarzinomproben und bestehenden Follow-up-Daten. Die Tissue-Micro-Array-Methode ermöglicht die Analyse einer grossen Anzahl von Proben unter standardisierten Bedingungen. Für unsere immunhistochemischen Färbungen verwendeten wir einen Antikörper gegen den membranständigen VEGFR-1 in seiner gesamten Länge. Wir konnten feststellen, dass sich bei 100% (5/5) Mammanormalgeweben und bei einem Grossteil der Tumore eine starke (79,7%) und moderate (10,9%) VEGFR-1 Färbung fanden, bei sämtlichen histologischen Subtypen mit Ausnahme der medullären Karzinome, die deutlich weniger VEGFR-1 positive Tumore aufzeigten. Damit gehen wir davon aus, dass die Expression von VEGFR-1 bei gesundem Mammagewebe und Mammatumorgewebe ein physiologischer Zustand ist. Die VEGFR-1 Expression korrelierte negativ mit Tumorstadium ($p=0,0431$), Tumorgrading ($p<0,0001$) und Zellproliferation gemessen am Ki67 Labeling Index ($p<0001$). Ein Zusammenhang zur lymphatischen Metastasierung wurde nicht festgestellt.

Wir konnten eine kleine, klinisch relevante Gruppe an Mammakarzinompatientinnen charakterisieren, bei denen es zu einer Verminderung oder dem Verlust der Expression des membranständigen VEGFR-1 in gesamter Länge gekommen ist und welche von fortgeschrittenem Tumorstadium, aggressiven Tumoreigenschaften und verkürzter Gesamtüberlebenszeit betroffen sind und nicht optimal von einer antihormonellen Therapie profitieren. Somit sind die Ergebnisse dieser Studie ein weiterer Schritt in der individualisierten Tumortherapie und unterstützen die zurzeit erfolgenden Untersuchungen und Bemühungen, jeder Frau eine individualisierte effektive nebenwirkungsarme Tumortherapie zu ermöglichen, die sich nach den biologischen Eigenschaften ihrer individuellen Tumorerkrankung richtet.

Die Wahl der Eigenschaften der VEGFR-1 Antikörpers mögen einen grossen Einfluss auf die Ergebnisse durch die immunhistochemischen Färbungen haben.

6. LITERATURVERZEICHNISS

- AL-KURAYA, K., SCHRAML, P., TORHORST, J., TAPIA, C., ZAHARIEVA, B., NOVOTNY, H., SPICHTIN, H., MAURER, R., MIRLACHER, M., KOCHLI, O., ZUBER, M., DIETERICH, H., MROSS, F., WILBER, K., SIMON, R. & SAUTER, G. (2004) Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res*, 64, 8534-40.
- ARZNEIMITTELKOMMISSION DER DEUTSCHEN ÄRZTESCHAFT, W. F. D. B. (2011, 10.02.) Die europäische Arzneimittelbehörde EMA und die US-amerikanische FDA schätzen den Nutzen von Avastin (Bevacizumab) in der Brustkrebstherapie unterschiedlich ein. *AkdÄ News*, 2011-153.
- AUTIERO, M., LUTTUN, A., TJWA, M. & CARMELIET, P. (2003a) Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost*, 1, 1356-70.
- AUTIERO, M., WALTENBERGER, J., COMMUNI, D., KRANZ, A., MOONS, L., LAMBRECHTS, D., KROLL, J., PLAISANCE, S., DE MOL, M., BONO, F., KLICHE, S., FELLBRICH, G., BALLMER-HOFER, K., MAGLIONE, D., MAYR-BEYRLE, U., DEWERCHIN, M., DOMBROWSKI, S., STANIMIROVIC, D., VAN HUMMELEN, P., DEHIO, C., HICKLIN, D. J., PER-SICO, G., HERBERT, J. M., SHIBUYA, M., COLLEN, D., CONWAY, E. M. & CARMELIET, P. (2003b) Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med*, 9, 936-43.
- BAE, D. G., KIM, T. D., LI, G., YOON, W. H. & CHAE, C. B. (2005) Anti-flt1 peptide, a vascular endothelial growth factor receptor 1-specific hexapeptide, inhibits tumor growth and metastasis. *Clin Cancer Res*, 11, 2651-61.
- BANDO, H., WEICH, H. A., BROKELMANN, M., HORIGUCHI, S., FUNATA, N., OGAWA, T. & TOI, M. (2005) Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer*, 92, 553-61.
- BARLEON, B., SOZZANI, S., ZHOU, D., WEICH, H. A., 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.
- BELGORE, F. M., LIP, G. Y., BAREFORD, D., WADLEY, M., STONELAKE, P. & BLANN, A. D. (2001) Plasma levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor, Flt-1, in haematological cancers: a comparison with breast cancer. *Am J Hematol*, 66, 59-61.
- BUBENDORF, L., NOCITO, A., MOCH, H. & SAUTER, G. (2001) Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol*, 195, 72-9.
- CAMP, R. L., CHARETTE, L. A. & RIMM, D. L. (2000) Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*, 80, 1943-9.
- CAO, Y. (2009) Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. *Sci Signal*, 2, re1.
- CAO, Y., CHEN, H., ZHOU, L., CHIANG, M. K., ANAND-APTE, B., WEATHERBEE, J. A., WANG, Y., FANG, F., FLANAGAN, J. G. & TSANG, M. L. (1996a) Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*, 271, 3154-62.
- CAO, Y., LINDEN, P., SHIMA, D., BROWNE, F. & FOLKMAN, J. (1996b) In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest*, 98, 2507-11.
- CAPP, C., WAJNER, S. M., SIQUEIRA, D. R., BRASIL, B. A., MEURER, L. & MAIA, A. L. Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2, in medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*, 20, 863-71.
- CARMELIET, P. (2005) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69 Suppl

3, 4-10.

CARMELIET, P., FERREIRA, V., BREIER, G., POLLEFEY, S., KIECKENS, L., GERTSEN-STEIN, M., FAHRIG, M., VANDENHOECK, A., HARPAL, K., EBERHARDT, C., DECLERCQ, C., PAWLING, J., MOONS, L., COLLEN, D., RISAU, W. & NAGY, A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380, 435-9.

CARMELIET, P., MOONS, L., LUTTUN, A., VINCENTI, V., COMPERNOLLE, V., DE MOL, M., WU, Y., BONO, F., DEVY, L., BECK, H., SCHOLZ, D., ACKER, T., DIPALMA, T., DEWERCHIN, M., NOEL, A., STALMANS, I., BARRA, A., BLACHER, S., VANDENDRIESSCHE, T., PONTEN, A., ERIKSSON, U., PLATE, K. H., FOIDART, J. M., SCHAPER, W., CHARNOCK-JONES, D. S., HICKLIN, D. J., HERBERT, J. M., COLLEN, D. & PERSICO, M. G. (2001) Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*, 7, 575-83.

CARRILLO DE SANTA PAU, E., ARIAS, F. C., CASO PELAEZ, E., MUNOZ MOLINA, G. M., SANCHEZ HERNANDEZ, I., MUGURUZA TRUEBA, I., MORENO BALSALOBRE, R., SACRISTAN LOPEZ, S., GOMEZ PINILLOS, A. & DEL VAL TOLEDO LOBO, M. (2009) Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their receptors R1, R2, and R3 in patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 115, 1701-12.

CHUNG, G. G., YOON, H. H., ZERKOWSKI, M. P., GHOSH, S., THOMAS, L., HARIGOPAL, M., CHARETTE, L. A., SALEM, R. R., CAMP, R. L., RIMM, D. L. & BURTNES, B. A. (2006) Vascular endothelial growth factor, FLT-1, and FLK-1 analysis in a pancreatic cancer tissue microarray. *Cancer*, 106, 1677-84.

CLAUSS, M., WEICH, H., BREIER, G., KNIES, U., ROCKL, W., WALTENBERGER, J. & RISAU, W. (1996) The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem*, 271, 17629-34.

DALES, J. P., GARCIA, S., CARPENTIER, S., ANDRAC, L., RAMUZ, O., LAVAUT, M. N., ALLASIA, C., BONNIER, P. & TARANGER-CHARPIN, C. (2004) Prediction of metastasis risk (11 year follow-up) using VEGF-R1, VEGF-R2, Tie-2/Tek and CD105 expression in breast cancer (n=905). *Br J Cancer*, 90, 1216-21.

DANCAU AM, S. R., MIRLACHER M, SAUTER G (2010) Tissue microarrays. *Methods Mol Biol.* , 576, 49-60.

DE VRIES, C., ESCOBEDO, J. A., UENO, H., HOUCK, K., FERRARA, N. & WILLIAMS, L. T. (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 255, 989-91.

DIFNER, E., GAUFFIN, F., ANAGNOSTAKI, L., NORDGREN, A., GUSTAFSSON, B., SANDER, B. & PERSSON, J. L. (2009) Expression of VEGF and VEGF receptors in childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia evaluated by immunohistochemistry. *J Pediatr Hematol Oncol*, 31, 696-701.

ELKIN, M., ORGEL, A. & KLEINMAN, H. K. (2004) An angiogenic switch in breast cancer involves estrogen and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Natl Cancer Inst*, 96, 875-8.

FAN, F., WEY, J. S., MCCARTY, M. F., BELCHEVA, A., LIU, W., BAUER, T. W., SOMCIO, R. J., WU, Y., HOOPER, A., HICKLIN, D. J. & ELLIS, L. M. (2005) Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene*, 24, 2647-53.

FDA (2010 Dec. 16) FDA begins process to remove breast cancer indication from Avastin label. FDA News Release.

FENTON, C., PATEL, A., DINAUER, C., ROBIE, D. K., TUTTLE, R. M. & FRANCIS, G. L. (2000) The expression of vascular endothelial growth factor and the type 1 vascular endothelial growth factor receptor correlate with the size of papillary thyroid carcinoma in children and young adults. *Thyroid*, 10, 349-57.

- FERLAY, J., SHIN, H. R., BRAY, F., FORMAN, D., MATHERS, C. & PARKIN, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127, 2893-917.
- FERRARA, N. (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25, 581-611.
- FERRARA, N. & DAVIS-SMYTH, T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18, 4-25.
- FERRARA, N., GERBER, H. P. & LECOUTER, J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9, 669-76.
- FERRER, F. A., MILLER, L. J., ANDRAWIS, R. I., KURTZMAN, S. H., ALBERTSEN, P. C., LAUDONE, V. P. & KREUTZER, D. L. (1997) Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human prostate cancer: in situ and in vitro expression of VEGF by human prostate cancer cells. *J Urol*, 157, 2329-33.
- FINE, B. A., VALENTE, P. T., FEINSTEIN, G. I. & DEY, T. (2000) VEGF, flt-1, and KDR/flk-1 as prognostic indicators in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 76, 33-9.
- FOLKMAN, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1, 27-31.
- FONG, G. H., ROSSANT, J., GERTSENSTEIN, M. & BREITMAN, M. L. (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376, 66-70.
- FONG, G. H., ZHANG, L., BRYCE, D. M. & PENG, J. (1999) Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development*, 126, 3015-25.
- GARVIN, S., NILSSON, U. W. & DABROSIN, C. (2005) Effects of oestradiol and tamoxifen on VEGF, soluble VEGFR-1, and VEGFR-2 in breast cancer and endothelial cells. *Br J Cancer*, 93, 1005-10.
- GASPARINI, G. (2000) Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist*, 5 Suppl 1, 37-44.
- GERBER, H. P. & FERRARA, N. (2003) The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *J Mol Med*, 81, 20-31.
- GHANEM, M. A., VAN STEENBRUGGE, G. J., SUDARYO, M. K., MATHOERA, R. B., NIJMAN, J. M. & VAN DER KWAST, T. H. (2003) Expression and prognostic relevance of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (FLT-1) in nephroblastoma. *J Clin Pathol*, 56, 107-13.
- GHOSH, S., SULLIVAN, C. A., ZERKOWSKI, M. P., MOLINARO, A. M., RIMM, D. L., CAMP, R. L. & CHUNG, G. G. (2008) High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer. *Hum Pathol*, 39, 1835-43.
- GILLET, C. E., SPRINGALL, R. J., BARNES, D. M. & HANBY, A. M. (2000) Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation study. *J Pathol*, 192, 549-53.
- HANAHA, D. & FOLKMAN, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86, 353-64.
- HIRASHIMA, Y., YAMADA, Y., MATSUBARA, J., TAKAHARI, D., OKITA, N., TAKASHIMA, A., KATO, K., HAMAGUCHI, T., SHIRAO, K., SHIMADA, Y., TANIGUCHI, H. & SHIMODA, T. (2009) Impact of vascular endothelial growth factor receptor 1, 2, and 3 expression on the outcome of patients with gastric cancer. *Cancer Sci*, 100, 310-5.
- HIRATSUKA, S., MARU, Y., OKADA, A., SEIKI, M., NODA, T. & SHIBUYA, M. (2001) Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res*, 61, 1207-13.
- HIRATSUKA, S., MINOWA, O., KUNO, J., NODA, T. & SHIBUYA, M. (1998) Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 9349-54.
- HIRATSUKA, S., NAKAMURA, K., IWAI, S., MURAKAMI, M., ITOH, T., KIJIMA, H., SHIP-

LEY, J. M., SENIOR, R. M. & SHIBUYA, M. (2002) MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell*, 2, 289-300.

HU, Q., DEY, A. L., YANG, Y., SHEN, Y., JILANI, I. B., ESTEY, E. H., KANTARJIAN, H. M., GILES, F. J. & ALBITAR, M. (2004) Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1, and not receptor 2, is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cancer*, 100, 1884-91.

JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E. & FORMAN, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61, 69-90.

JIA, J. B., ZHUANG, P. Y., SUN, H. C., ZHANG, J. B., ZHANG, W., ZHU, X. D., XIONG, Y. Q., XU, H. X. & TANG, Z. Y. (2009) Protein expression profiling of vascular endothelial growth factor and its receptors identifies subclasses of hepatocellular carcinoma and predicts survival. *J Cancer Res Clin Oncol*, 135, 847-54.

JOHANSSON I, A. K., EBBESSON A, GRABAU D, WIGERUP C, HEDENFALK I, RYDEN L (2012) Increased gene copy number of Kit and vegfr2 at 4q12 in primary breast cancer is related to an aggressive phenotype and impaired prognosis. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 51, 375-383.

KALLIONIEMI, O. P., WAGNER, U., KONONEN, J. & SAUTER, G. (2001) Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*, 10, 657-62.

KENDALL, R. L. & THOMAS, K. A. (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10705-9.

KENDALL, R. L., WANG, G. & THOMAS, K. A. (1996) Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun*, 226, 324-8.

KOBAYASHI, H., ECKHARDT, S. G., LOCKRIDGE, J. A., ROTHENBERG, M. L., SANDLER, A. B., O'BRYANT, C. L., COOPER, W., HOLDEN, S. N., AITCHISON, R. D., USMAN, N., WOLIN, M. & BASCHE, M. L. (2005) Safety and pharmacokinetic study of RPI.4610 (ANGIOZYME), an anti-VEGFR-1 ribozyme, in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 56, 329-36.

KONONEN J, B. L., KALLIONIEMI A, BÄRLUND M, SCHRAML P, LEIGHTON S, TORHORST J, MIHATSCH MJ, SAUTER G, KALLIONIEMI OP (1998 Jul) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4, 767-8.

KOSAKA, Y., MIMORI, K., FUKAGAWA, T., ISHIKAWA, K., ETOH, T., KATAI, H., SANO, T., WATANABE, M., SASAKO, M. & MORI, M. (2007) Identification of the high-risk group for metastasis of gastric cancer cases by vascular endothelial growth factor receptor-1 overexpression in peripheral blood. *Br J Cancer*, 96, 1723-8.

KUMAR, S., WITZIG, T. E., TIMM, M., HAUG, J., WELLIK, L., FONSECA, R., GREIPP, P. R. & RAJKUMAR, S. V. (2003) Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells. *Leukemia*, 17, 2025-31.

LANGER, I., VERTONGEN, P., PERRET, J., FONTAINE, J., ATASSI, G. & ROBBERECHT, P. (2000) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in human neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol*, 34, 386-93.

LECOUTER, J., MORITZ, D. R., LI, B., PHILLIPS, G. L., LIANG, X. H., GERBER, H. P., HILLAN, K. J. & FERRARA, N. (2003) Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science*, 299, 890-3.

LI, X., LEE, C., TANG, Z., ZHANG, F., ARJUNAN, P., LI, Y., HOU, X., KUMAR, A. & DONG, L. (2009) VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? *Cell Adh Migr*, 3, 322-7.

LINDERHOLM, B. K., HELLBORG, H., JOHANSSON, U., SKOOG, L. & LEHTIO, J. Vascular endothelial growth factor receptor 2 and downstream p38 mitogen-activated protein kinase are possible candidate markers of intrinsic resistance to adjuvant endocrine treatment in steroid receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 125, 457-65.

MAGLIONE, D., GUERRIERO, V., VIGLIETTO, G., DELLI-BOVI, P. & PERSICO, M. G. (1991) Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 9267-71.

MEZQUITA, B., MEZQUITA, J., PAU, M. & MEZQUITA, C. A novel intracellular isoform of VEGFR-1 activates Src and promotes cell invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Cell Biochem*, 110, 732-42.

MOCH, H., SCHRAML, P., BUBENDORF, L., MIRLACHER, M., KONONEN, J., GASSER, T., MIHATSCH, M. J., KALLIONIEMI, O. P. & SAUTER, G. (1999) High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol*, 154, 981-6.

MYLONA, E., ALEXANDROU, P., GIANNOPOULOU, I., LIAPIS, G., SOFIA, M., KERAMOPOULOS, A. & NAKOPOULOU, L. (2007) The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecol Oncol*, 104, 557-63.

NG, I. O., POON, R. T., LEE, J. M., FAN, S. T., NG, M. & TSO, W. K. (2001) Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 116, 838-45.

NIELSEN, D. L., ANDERSSON, M., ANDERSEN, J. L. & KAMBY, C. Antiangiogenic therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res*, 12, 209.

NING, Q., LIU, C., HOU, L., MENG, M., ZHANG, X., LUO, M., SHAO, S., ZUO, X. & ZHAO, X. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation promotes migration and invasion of breast cancer cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 8, e65217.

OKITA, N. T., YAMADA, Y., TAKAHARI, D., HIRASHIMA, Y., MATSUBARA, J., KATO, K., HAMAGUCHI, T., SHIRAO, K., SHIMADA, Y., TANIGUCHI, H. & SHIMODA, T. (2009) Vascular endothelial growth factor receptor expression as a prognostic marker for survival in colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 39, 595-600.

OLOFSSON, B., JELTSCH, M., ERIKSSON, U. & ALITALO, K. (1999) Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol*, 10, 528-35.

PARADISO, A., MANGIA, A., CHIRIATTI, A., TOMMASI, S., ZITO, A., LATORRE, A., SCHITTULLI, F. & LORUSSO, V. (2005) Biomarkers predictive for clinical efficacy of taxol-based chemotherapy in advanced breast cancer. *Ann Oncol*, 16 Suppl 4, iv14-19.

PARR, C., WATKINS, G., BOULTON, M., CAI, J. & JIANG, W. G. (2005) Placenta growth factor is over-expressed and has prognostic value in human breast cancer. *Eur J Cancer*, 41, 2819-27.

PERSICO, M. G., VINCENTI, V. & DIPALMA, T. (1999) Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol*, 237, 31-40.

PYTEL D, S. T., POPLAWSKI T, FERRIOLA D, MAJSTEREK I (2009) Tyrosine Kinase Blockers: New Hope for Successful Cancer Therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 9, 66-76.

RIVET, J., MOURAH, S., MURATA, H., MOUNIER, N., PISONERO, H., MONGIAT-ARTUS, P., TEILLAC, P., CALVO, F., JANIN, A. & DOSQUET, C. (2008) VEGF and VEGFR-1 are coexpressed by epithelial and stromal cells of renal cell carcinoma. *Cancer*, 112, 433-42.

ROBERT-KOCH-INSTITUT Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2010 Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. .

ROBINSON, C. J. & STRINGER, S. E. (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*, 114, 853-65.

RUIZ C, S. S., AL KURAYA K, SIRAJ A K, MIRLACHER M, SCHRAML P, MAURER R, SPICHTIN H, TORHORST J, POPOVSKA S, SIMON R, SAUTER G (2006) Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *int. J. Cancer*, 118, 2190-2194.

RYDEN, L., JIRSTROM, K., BENDAHL, P. O., FERNO, M., NORDENSKJOLD, B., STAL, O., THORSTENSON, S., JONSSON, P. E. & LANDBERG, G. (2005) Tumor-specific expression of vascular endothelial growth factor receptor 2 but not vascular endothelial growth factor or human epidermal growth factor receptor 2 is associated with impaired response to adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer. *J Clin Oncol*, 23, 4695-704.

SAUTER, G., SIMON, R. & HILLAN, K. (2003) Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 962-72.

SCHMIDT, M., VOELKER, H. U., KAPP, M., DIETL, J. & KAMMERER, U. (2008) Expression of VEGFR-1 (Flt-1) in breast cancer is associated with VEGF expression and with node-negative tumour stage. *Anticancer Res*, 28, 1719-24.

SCHRAML, P., KONONEN, J., BUBENDORF, L., MOCH, H., BISSIG, H., NOCITO, A., MIHATSCH, M. J., KALLIONIEMI, O. P. & SAUTER, G. (1999) Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res*, 5, 1966-75.

SCHWARTZ, J. D., ROWINSKY, E. K., YOUSOUFIAN, H., PYTOWSKI, B. & WU, Y. Vascular endothelial growth factor receptor-1 in human cancer: concise review and rationale for development of IMC-18F1 (Human antibody targeting vascular endothelial growth factor receptor-1). *Cancer*, 116, 1027-32.

SECORD, A. A., DARCY, K. M., HUTSON, A., LEE, P. S., HAVRILESKY, L. J., GRACE, L. A. & BERCHUCK, A. (2007) Co-expression of angiogenic markers and associations with prognosis in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*, 106, 221-32.

SENGER, D. R., GALLI, S. J., DVORAK, A. M., PERRUZZI, C. A., HARVEY, V. S. & DVORAK, H. F. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219, 983-5.

SETO, T., HIGASHIYAMA, M., FUNAI, H., IMAMURA, F., UEMATSU, K., SEKI, N., EGUCHI, K., YAMANAKA, T. & ICHINOSE, Y. (2006) Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 53, 91-6.

SHALABY, F., ROSSANT, J., YAMAGUCHI, T. P., GERTSENSTEIN, M., WU, X. F., BREITMAN, M. L. & SCHUH, A. C. (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376, 62-6.

SHIBUYA, M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem*, 153, 13-9.

SHIBUYA, M. (2001) Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol*, 33, 409-20.

SHIBUYA, M. & CLAESSEON-WELSH, L. (2006) Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res*, 312, 549-60.

SHIBUYA, M., YAMAGUCHI, S., YAMANE, A., IKEDA, T., TOJO, A., MATSUSHIME, H. & SATO, M. (1990) Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, 5, 519-24.

SIMON, R. & SAUTER, G. (2002) Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. *Exp Hematol*, 30, 1365-72.

SMITH, I., PROCTER, M., GELBER, R. D., GUILLAUME, S., FEYEREISLOVA, A., DOWSETT, M., GOLDBIRSH, A., UNTCH, M., MARIANI, G., BASELGA, J., KAUFMANN, M., CAMERON, D., BELL, R., BERGH, J., COLEMAN, R., WARDLEY, A., HARBECK, N., LOPEZ, R. I., MALLMANN, P., GELMON, K., WILCKEN, N., WIST, E., SANCHEZ ROVIRA, P. & PICCART-GEBHART, M. J. (2007) 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*, 369, 29-36.

SPEIRS, V. & ATKIN, S. L. (1999) Production of VEGF and expression of the VEGF receptors Flt-1 and KDR in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from breast tumours. *Br J Cancer*, 80, 898-903.

SPRATLIN, J. L., COHEN, R. B., EADENS, M., GORE, L., CAMIDGE, D. R., DIAB, S., LEONG, S., O'BRYANT, C., CHOW, L. Q., SERKOVA, N. J., MEROPOL, N. J., LEWIS, N. L., CHIOREAN, E. G., FOX, F., YOUSOUFIAN, H., ROWINSKY, E. K. & ECKHARDT, S. G. Phase I pharmacologic and biologic study of ramucirumab (IMC-1121B), a fully human immunoglobulin G1 monoclonal antibody targeting the vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Clin Oncol*, 28, 780-7.

TALVENSAARI-MATTILA, A., SOINI, Y. & SANTALA, M. (2005) VEGF and its receptors (flt-1 and KDR/flk-1) as prognostic indicators in endometrial carcinoma. *Tumour Biol*, 26, 81-7.

TOI, M., BANDO, H., OGAWA, T., MUTA, M., HORNIG, C. & WEICH, H. A. (2002) Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. *Int J Cancer*, 98, 14-8.

TORHORST, J., BUCHER, C., KONONEN, J., HAAS, P., ZUBER, M., KOCHLI, O. R., MROSS, F., DIETERICH, H., MOCH, H., MIHATSCH, M., KALLIONIEMI, O. P. & SAUTER, G. (2001) Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*, 159, 2249-56.

VOLM, M., KOOMAGI, R. & MATTERN, J. (1997) Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int J Cancer*, 74, 64-8.

WEIDNER, N., SEMPLE, J. P., WELCH, W. R. & FOLKMAN, J. (1991) Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*, 324, 1-8.

WEY, J. S., FAN, F., GRAY, M. J., BAUER, T. W., MCCARTY, M. F., SOMCIO, R., LIU, W., EVANS, D. B., WU, Y., HICKLIN, D. J. & ELLIS, L. M. (2005) Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer*, 104, 427-38.

WU, Y., HOOPER, A. T., ZHONG, Z., WITTE, L., BOHLEN, P., RAFII, S. & HICKLIN, D. J. (2006) The vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-1) supports growth and survival of human breast carcinoma. *Int J Cancer*, 119, 1519-29.

WULFING, P., KERSTING, C., BUERGER, H., MATTSSON, B., MESTERS, R., GUSTMANN, C., HINRICHS, B., TIO, J., BOCKER, W. & KIESEL, L. (2005) Expression patterns of angiogenic and lymphangiogenic factors in ductal breast carcinoma in situ. *Br J Cancer*, 92, 1720-8.

XIE, B., TAM, N. N., TSAO, S. W. & WONG, Y. C. (1999) Co-expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (flk-1 and flt-1) in hormone-induced mammary cancer in the Noble rat. *Br J Cancer*, 81, 1335-43.

YAO, Y., KUBOTA, T., SATO, K., KITAI, R., TAKEUCHI, H. & ARISHIMA, H. (2001) Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1 in astrocytic tumours. *Acta Neurochir (Wien)*, 143, 159-66.

YOKOYAMA, Y., SATO, S., FUTAGAMI, M., FUKUSHI, Y., SAKAMOTO, T., UMEMOTO, M. & SAITO, Y. (2000) Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and its receptors in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 77, 413-8.

ZHUKOVA, L. G., ZHUKOV, N. V. & LICHINITSER, M. R. (2003) Expression of Flt-1 and Flk-1 receptors for vascular endothelial growth factor on tumor cells as a new prognostic criterion for locally advanced breast cancer. *Bull Exp Biol Med*, 135, 478-81.

7. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Herr Prof. Dr. Guido Sauter für die Unterstützung bei der Arbeit und dafür, dass er mir bis zur Fertigstellung dieser Arbeit immer wieder ermutigend zur Seite stand.

Bei Herrn Dr. Eike C. Burandt möchte ich mich für die Betreuung und konstruktive Hilfe bedanke ebenso wie bei Herrn PD Dr. rer. nat. Ronald Simon, der mir besonders bei der statistischen Auswertung bei stand. Bei Herrn Dr. Alexander Quaas bedanke ich mich für sein offenes Ohr bei allen praktischen Fragen, sowie auch bei Frau Karin Breitmeyer und Frau Martina Mirlacher. Vielen Dank auch an meine Freundin Dr. Sylvia Giese, ohne Dich hätte die Arbeit nur halb soviel Spass gemacht.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mann Sebastian Dürr für die Unterstützung auf meinem beruflichen Weg und meinen Kindern Lucia, Lotta, Carl, Max, Emma und Conrad für Ihre Geduld. Frau Renate Vitovec und Frau Peggy Binnoit danke ich für die Kinderbetreuung. Frau Barbara Spengelin und Herrn Dr. Gunnar Thies für die Möglichkeit, ihr Büro zu nutzen. Vielen Dank an meine Eltern Frau Dr. Roswita Huber-Schaffrath und Prof. Dr. Wolfgang Huber für die Unterstützung in der Ausbildungszeit.

8. LEBENSLAUF

9. EIDESSTATTLICHE 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 oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

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

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

Unterschrift: