

Aus dem Institut für Hirnforschung
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R. Meyermann

**Immunreaktivität von VEGF und Gravin in humanen
Astrozytomen
unterschiedlichen WHO-Grads**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Frank Benjamin Goepfert
aus Freiburg im Breisgau

2006

Dekan

1. Berichterstatter

2. Berichterstatter

Professor Dr. I. B. Autenrieth

Professor Dr. R. Meyermann

Professor Dr. H. Wolburg

Für Jakez

Abkürzungen

ADMA	Asymmetric dimethylarginine
AKAP	A-kinase anchoring protein
Ang-1	Angiopoietin-1
Ang-2	Angiopoietin-2
AP-1	Activator protein 1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CD	Cluster of differentiation
c-fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene
c-Met	C-Met protooncogene
c-MYB	C-myeloblastosis viral oncogene
c/n-MYC	C/n-myelocytomatosis oncogene
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C reactive protein
Del-1	Developmentally regulated endothelial locus-1
E2a-Pbx1	Oncogene formed by t(1;19) chromosomal translocation
EC	Endothelial cell
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
e-NOS	Endothelial nitric oxide synthase
EPC	Endothelial progenitor cell
flk-1	Fetal liver kinase-1
flt-1	Fibromyalgia syndrome = fms-like tyrosine kinase-1
flt-4	Fibromyalgia syndrome = fms-like tyrosine kinase-4
FGF-1	Fibroblast growth factor-1
FGF-2	Fibroblast growth factor-2
FGF-4	Fibroblast growth factor-4
GBM	Glioblastoma
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein

Gravin	Src-suppressed C Kinase substrate Synonyma: SSeCKS, Akap12, Akap250
HB-EGF	Heparin-binding epidermal growth factor
HE	Hematoxylin & Eosin
HER-1	Human epidermal growth factor receptor-1
HER-2/neu	Human epidermal growth factor receptor-2/neu
HGF	Hepatocyte growth factor (=SF)
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor-1 α
HIV- <i>tat</i>	HIV transactivator protein
HPV-16	Human papilloma virus 16
HRas	Harvey rat sarcoma oncogene
HRGP	Histidine-rich glycoprotein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN- α	Interferon-alpha
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin like growth factor-1
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-3/4/6/8/12	Interleukin-3/4/6/8/12
i-NOS	Inducible nitric oxide synthase
IP-10	Interferon-inducible protein 10
kb	Kilo bases
kDa	Kilo Dalton
KDR	Kinase domain region <i>oder</i> Kinase insert domain receptor
Ki-67 (MIB-1)	Proliferation marker
KRas	Kirsten rat sarcoma oncogene
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
m-RNAs	Messenger ribonuclid acids
MSC	Mesenchymal stem cells
NF-kappaB	Nuclear factor kappa B
NO	Nitric oxide

NOS	Nitric oxide-synthase
Notch	Notch gene
Nrp-1	Neuropilin-1-Rezeptor
Nrp-2	Neuropilin-2-Rezeptor
ODC	Ornithine decarboxylase
P53	Tumor suppressor gene 53 (protein of 53 kDa)
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PD-ECGF	Platelet derived endothelial cell growth factor (=TP)
PDGF	Platelet derived growth factor
PEDF	Pigment epithelium derived factor
PF-4	Platelet factor-4
PIGF	Placental growth factor
PTTG1	Pituitary tumor transforming gene 1
PyMT	Polyomavirus middle-T antigen
Ras	Rat sarcoma protooncogene
SF	Scatter factor
Sp1	Specific protein 1
Src	Src (sarcoma) protooncogene
SRF	Serum response factor
SSeCKS	Src-suppressed C Kinase substrate Synonyma: Gravin, Akap12, Akap250
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TGF- α	Transforming growth factor-alpha
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TIMP-1/2	Tissue inhibitors of metalloproteinases-1/2
TMA	Tissue microarray
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
TP	Thymidine phsosphorylase
TrkB	Tropomyosin-related kinase B
TSP-1	Thrombospondin-1
TSP-2	Thrombospondin-2
v-p3k	Viral gene of phosphatidylinositol 3-kinase

VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-1	Vascular endothelial growth factor-receptor-1 (flt-1)
sVEGFR-1	Soluble vascular endothelial growth factor-receptor-1
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor-receptor-2 (flk-1/KDR)
VEGFR-3	Vascular endothelial growth factor-receptor-3 (flt-4)
VEGI	Vascular endothelial growth inhibitor
VHL	Von Hippel-Lindau gene
VPF	Vascular permeability factor (=VEGF)
vWF	Von Willebrand factor (=factor VIII-related antigen)
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

		Seite
	INHALTSVERZEICHNIS	8
1	EINLEITUNG	10
1.1	Angiogenese	10
1.1.1	Historischer Überblick	10
1.1.2	Angiogenese und Vaskulogenese	10
1.1.3	Allgemeiner Ablauf der Angiogenese	11
1.1.4	Pysiologische und pathophysiologische Aspekte der Angiogenese	12
1.1.5	Die Angiogenese beeinflussende Faktoren	13
1.1.6	VEGF	18
1.1.6.1	VEGF-Rezeptoren	21
1.1.7	Gravin	24
1.2	Astrozytome und ihre Klassifikation	27
1.3	Ziel der Arbeit und Fragestellung	35
2	MATERIAL UND METHODEN	36
2.1	Definition und Auswahl der Gewebeproben	36
2.2	Mikroskopische und histologische Beurteilung	36
2.3	Herstellung der histologischen Präparate	37
2.4	Immunhistochemie	37
2.4.1	Auswahl der Antikörper	37
2.4.1.1	Gravin	38
2.4.1.2	VEGF	38
2.4.2	Vorbehandlung und immunhistochemische Färbung	38
2.5	Lichtmikroskopische Auszählung und Auswertung	39
2.6	Statistische Auswertung	40
2.7	Tissue microarray Methode	40

3	ERGEBNISSE	43
3.1	Allgemeine Ergebnisse	43
3.1.1	Ergebnisse der Auswertung der Zellzahl	43
3.1.2	Ergebnisse der Auswertung der Gefäßzellen	44
3.1.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Vorversuche an konventionellen Gewebeschnitten	45
3.2	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen	46
3.2.1	Gravin	46
3.2.2	VEGF	51
3.2.3	Korrelation der Expressionsraten beider Antikörper	55
4	DISKUSSION	56
4.1	Vor- und Nachteile der TMA-Methode	56
4.2	Probleme der Angiogeneseforschung	57
4.3	Allgemeine Ergebnisse	58
4.3.1	Zellzahl in Astrozytomen und im Normalhirn	58
4.3.2	Gefäßzellzahl und -morphologie in Astrozytomen	59
4.4	Angiogenese in Astrozytomen	62
4.4.1	VEGF-Expression an konventionellen Gewebeschnitte	62
4.4.2	VEGF-Expression in Astrozytomen	62
4.4.3	Gravin-Expression in Astrozytomen	63
4.4.4	Korrelation der Expressionsraten beider Antikörper	65
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	67
5	ZUSAMMENFASSUNG	68
6	LITERATURVERZEICHNIS	70
7	ANHANG	87
7.1	Danksagungen	87
7.2	Lebenslauf	88

1 EINLEITUNG

1.1 Angiogenese

1.1.1 Historischer Überblick

Der Begriff der „Angiogenese“ ist nicht so neu, wie es die aktuellen Konzepte der therapeutischen Modulation der Angiogenese vermuten lassen. Bereits 1787 verwendete der britische Chirurg John Hunter diesen Begriff, um die von ihm beobachtete Entstehung von Gefäßen in Rentiergeweihen zu beschreiben (Hunter, 1787). Im Zusammenhang mit Tumoren wurde „Angiogenese“ zum ersten Mal von Goldman benutzt. Er beschrieb die hohe Gefäßdichte in und um Tumoren (Goldman, 1907). Später bezeichnete Hertig seine Beobachtung von Gefäßneubildung in Plazentagewebe von Affen als Angiogenese (Hertig, 1935). Eine weiterführende Idee und erste Bilder aussprossender Gefäße im Tumor *in vivo* kamen von Ide et al.: sie untersuchten Epitheliome des Kaninchens und vermuteten, dass Tumoren spezifische Stoffe freisetzen, die das Wachstum von Gefäßen fördern (Ide et al., 1939).

Algire et al. konnten schon einige Jahre später aus ihren Untersuchungen an Mäusen ebenso die Schlussfolgerung ziehen, dass Tumorstadium eng mit Gefäßwachstum verbunden ist. Zusätzlich gelang es, die beobachtete Tumorneoangiogenese zu quantifizieren (Algire et al., 1945).

Ein entscheidender Impuls für die heute intensiv betriebene Angiogeneseforschung ging von Judah Folkman aus. Er stellte schon im Jahr 1971 die Hypothese auf, dass erst durch Gefäßneubildung in und um Tumoren deren Wachstum ermöglicht wird (Folkman, 1971).

1.1.2 Angiogenese und Vaskulogenese

Es besteht ein Unterschied zwischen Angiogenese und Vaskulogenese, der in der Literatur gelegentlich vernachlässigt wird. Unter Vaskulogenese versteht man die primäre Ausbildung des Gefäßsystems während der Embryonalzeit, wobei die Zellen der neu gebildeten Gefäße durch Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen entstehen (Risau, 1997).

Als Angiogenese bezeichnet man hingegen den Prozess der Blutgefäßbildung aus bestehenden Kapillaren und Venolen. Dabei wird ein primitives, kapillares Gefäßnetzwerk in ein komplexes, reifes umstrukturiert. Diese Gefäßaussprossung entsteht aus bereits differenzierten Gefäßzellen (Endothelzellen, Perizyten, periendotheliale Zellen).

Erst in den letzten Jahren gab es vermehrt Hinweise darauf, dass der Vorgang der Vaskulogenese, der vor allem in der Embryonalentwicklung von großer Bedeutung ist, auch im ausgereiften Organismus prinzipiell möglich ist. Umgekehrt findet auch der Vorgang der Angiogenese schon in der Embryonalperiode statt (Carmeliet, 2000).

1.1.3 Allgemeiner Ablauf der Angiogenese

Der Prozess der Angiogenese lässt sich in drei Phasen gliedern: die initiale Aktivierung des Endothels, das Aussprossen des Endothels in kapillarähnlichen Strukturen und die Differenzierung der neu entstandenen Gefäße.

Die Aktivierung des Endothels ist mit einer konsekutiven Erhöhung der Gefäßpermeabilität verbunden (Esser et al., 1998). Diese kommt durch Freisetzung von Proteasen aus den Endothelzellen und durch den Abbau der das Gefäß umgebenden Basalmembran zustande. Diese Form der Angiogenese wird auch die „sprossende“ Angiogenese genannt. Man unterscheidet von ihr eine andere Möglichkeit Kapillaren zu bilden, nämlich die „nicht-sprossende Angiogenese“. Bei dieser entstehen im Gefäßlumen Matrixbrücken, welche das Gefäß zerteilen. Die „nicht-sprossende“ Form der Angiogenese wird auch als Intussuszeption bezeichnet (Patan et al., 1996). Bei der „sprossenden Angiogenese“ geht die Phase der Aussprossung mit einer Endothelmigration und –proliferation einher. Dabei werden in Richtung der angiogenen Stimuli solide Stränge aus Endothelzellen geformt, die sich durch Proliferation verlängern und nachträglich ein Lumen bilden, um so den Bluttransport gewährleisten zu können. Die Phase der Differenzierung beinhaltet die Entwicklung einer Wandstruktur, die durch Perizyten und glatte Muskelzellen stabilisiert wird (Ausprunk und Folkman, 1977; Carmeliet, 2000).

1.1.4 Physiologische und pathophysiologische Aspekte der Angiogenese

Das Blutgefäßsystem spielt eine entscheidende Rolle im Gas- und Nahrungsaustausch des menschlichen Körpers. Ohne suffiziente Vaskularisation ist ein ausreichendes Angebot an Sauerstoff und Nährstoffen, wie auch der Abtransport von Stoffwechselprodukten nicht möglich. Diese Störung der Homöostase kann das Absterben des minderversorgten Gewebes bewirken, oder während der Embryonalentwicklung dazu führen, dass Gewebe nicht entsteht (D'Amato et al., 1994). Ein geregelter Ablauf der Angiogenese im Körper ist von größter Wichtigkeit, da sowohl ein Zuwenig als auch ein Zuviel an Gefäßneubildung mit Nachteilen für den Organismus verbunden ist. Werden zu wenig Gefäße gebildet, leidet die Versorgung des angrenzenden Gewebes darunter. Werden zu viele Gefäße gebildet, bewirkt dies einen Verlust der Wanddichte, da die aussprossenden Endothelzellen und Perizyten nicht sofort in der Lage sind, das neu entstehende Gefäß suffizient abzudichten. Die Folgen sind intraparenchymatöse Blutungen und Ödeme (Risau, 1997).

Der Prozess der Gefäßneubildung ist während der Embryonalperiode von eminenter Bedeutung.

Zur Veranschaulichung möglicher Konsequenzen einer unkontrollierten Angiogenesehemmung möchte ich das bekannte Beispiel der Thalidomidembryopathie anführen. Sie führte bei den Betroffenen zu Missbildungen, am häufigsten zu Dymelien der Arme (McBride, 1977). Der genaue Pathomechanismus der Thalidomidembryopathie ist noch nicht geklärt (D'Amato et al., 1994). So ist es beispielsweise weiterhin ungeklärt, warum die Entwicklung, besonders der oberen Extremitäten durch Thalidomid geschädigt werden kann. Bekannt ist heute, dass Thalidomid als Angiogenese-Inhibitor wirkt. Es gibt Hinweise, dass Thalidomid eine verminderte Sekretion von MMP-2, IL-8 und anderen Mediatoren bewirkt, die essentiell für die Proliferation und Migration von Endothelzellen sind (Gelati et al., 2003). Des Weiteren wurde berichtet, dass Thalidomid über den Ceramidstoffwechsel VEGF-Rezeptoren reduzieren kann (Yabu et al., 2005). Thalidomid wird wegen seiner Wirkung als Angiogenese-Inhibitor seit einigen Jahren unter anderem in der Therapie des Multiplen Myeloms eingesetzt (Anderson, 2001; Rajkumar und Witzig, 2000).

Beim ausgewachsenen Individuum ist die Angiogenese physiologischerweise nur in Ausnahmefällen hochreguliert, z.B. wenn ein vermehrtes Blutgefäßwachstum von Nöten ist, wie bei der Wundheilung, oder im Rahmen des weiblichen Reproduktionszyklus, vor allem im Ovar und Uterus (Hyder und Stancel, 1999). Im Normalfall ist die Angiogenese auf ein Minimum an Endothelzellumsatz beschränkt.

Es gibt viele Krankheiten, bei denen die Angiogenese unkontrolliert abläuft. Ein klassisches Beispiel sind maligne Tumoren (Hanahan, 1998; Folkman, 1995). Weitere Krankheiten mit vermehrter Angiogenese sind die diabetische Retinopathie, die Psoriasis, Entzündungen unterschiedlicher Genese (Ferrara und Alitalo, 1999 a), rheumatoide Erkrankungen (Koch, 1998), juvenile Hämangiome (Powell, 1999) u.v.a.. Veröffentlichungen der letzten Jahre legen die Vermutung nahe, dass möglicherweise deutlich mehr Krankheiten pathophysiologisch mit einer Störung der Angiogeneseregulation verknüpft sind, als vorerst angenommen.

Es gibt Bakterien und Viren, die die Angiogenese beeinflussen. Bekannte Beispiele sind Bartonellen und das HI-Virus (Cerimele et al., 2003; Benelli et al., 2003).

1.1.5 Die Angiogenese beeinflussende Faktoren

Der Prozess der Angiogenese wird durch das komplexe Zusammenspiel zahlreicher Faktoren gesteuert. Im „ruhenden Gefäß“ stellt man sich ein Überwiegen der antiangiogenen Faktoren bzw. angiogene und antiangiogene Faktoren im Gleichgewicht vor (Hanahan und Folkman, 1996). Verändert sich dieses Verhältnis zugunsten der angiogenen Stimuli, beginnen neue Blutkapillaren auszusplassen. Diesen Punkt bezeichnet man auch als „angiogenic switch“ (Folkman, 1992; Bergers und Benjamin, 2003; Tanaka et al., 2003). Dabei scheint der angiogene Stimulus nicht nur das Aussprossen der Gefäße zu bewirken, sondern auch die Richtung der aussprossenden Gefäße vorzugeben (Hanahan und Folkman, 1996).

Viele angiogen und antiangiogen wirkende Faktoren sind in den letzten Jahren pharmakologisch getestet worden, doch konnte bisher keine Substanz die

hohen Erwartungen erfüllen, die durch die Grundlagenforschung bezüglich neuer Therapiemöglichkeiten geweckt wurden (Ton und Jayson, 2004).

Tabelle 1 und 2 sollen einen Überblick über einige bekannte oder putative Angiogenesefaktoren geben. Die Tabellen erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Sie dienen viel mehr der besseren Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit in die bisherigen Erkenntnisse über die Angiogenese und sollen die Komplexität der Angiogeneseregulation veranschaulichen. Zu Bedenken ist weiterhin, dass man von vielen Faktoren nicht genau weiß, in welchem Ausmaß sie auf die Angiogenese einwirken. Auch sind Regelkreise der die Angiogenese beeinflussenden Faktoren bisher nur lückenhaft bekannt, und auch das gegenseitige Einwirken der verschiedenen Faktoren aufeinander ist noch größtenteils unverstanden.

Endogene Induktoren der Angiogenese

Induktor	Mechanismus/Kommentar	Literaturstellen
<i>Heparin bindende Wachstumsfaktoren</i>		
VEGF/VPF	↑EC Proliferation, Migration, Differenzierung Hypoxie --> ↑HIF-1 α --> ↑VEGF	52; 180; 233
PIGF	~50% AS-Homologie zu VEGF, ↑EC-Migration	20
FGF-1, FGF-2	↑EC Proliferation, Migration, Differenzierung	20
Pleiotrophin	starker Induktor im GBM?	29; 78; 249
Midkine	↑EC Proliferation	29; 249
HIV- <i>tat</i>	Agonist am VEGFR-2, ↑Integrine in EC	20; 155
PDGF	↑EC Proliferation, Migration, Differenzierung	86
HGF/SF	↑EC Proliferation, Migration, Differenzierung Tyrosinkinase-Rez., ↑im GBM	1; 20 153; 198
HB-EGF/HER-1	bisher vorwiegend in MSC untersucht	124
<i>Nicht Heparin bindende Wachstumsfaktoren</i>		
TGF- α	↑EC Proliferation, Migration, Differenzierung ↑TGF- β --> ↑TGF- α , wirkt v.a. autokrin	20; 105 236
TGF- β	anti- & angiogen, ↓EC-Proliferation	75; 131; 181
EGF/EGFR/HER-1	Tyrosinkinase-Rezeptor ↑EC Proliferation, Migration, Differenzierung	20 202
IGF-I	↑EC Proliferation, Migration, Differenzierung	10; 202
HIF-1 α	↑VEGF	126
Notch	essentiell für ↑HIF1- α	80
Annexin A3	via ↑HIF1- α --> ↑VEGF	177
Endothelin-1	↑VEGF	9

Progranulin		226
Entzündungsmediatoren		
TNF- α	↓EC-Proliferation, ↑VEGF, ↑EC-Differenzierung	54, 105
IL-1 β	IL-1 β <--> COX-2	161; 239
IL-3	↑EC Proliferation, Migration, Differenzierung	39
IL-6	↑VEGF über STAT-3 pathway, ↑IL-6 im GBM	26; 142
IL-8	↑EC Proliferation, Migration	14; 16; 117
Prostaglandin E1/E2	“angiogenic switch“-Regulation ↑EC Differenzierung, ↑VEGF	28; 79; 240
MCP-1	↑↑Angiogenese	127; 217
Enzyme		
PD-ECGF/TP	↑EC Migration	17
COX-2	IL-1 β <--> COX-2	36; 161
Angiogenin	↑EC Migration und Differenzierung	8
Hormone		
Östrogene	↑EC Proliferation, Migration, Differenzierung	204
Proliferin	↑EC Migration	104
Leptin	↑MMP's, ↑EC Proliferation	62, 176
Oligosaccharide		
Hyaluronane	↑EC Proliferation, Migration, Differenzierung	197; 214
Oligosaccharide	↑VEGF	
Ganglioside	angiogen im Maushirntumormodell, Co-Rezeptor für FGF-2	147; 199
Hämatopoietische Faktoren		
Erythropoietin	↑EC Proliferation und Differenzierung	193
G-CSF	↑EC Proliferation, Migration	19
GM-CSF	↑EC Proliferation, Migration	19
Zelladhäsionsmoleküle		
VCAM-1	↑EC Migration	118
E-selectin	↑EC Migration und Differenzierung	118; 166
Onkogene		
KRas, HRas	↑VEGF, ↓TSP-1	47; 189; 77; 190
Src	↑VEGF, ↓TSP-1	159; 160
c-MYB	↓TSP-2	11
n-MYC	↓TSP-1	154; 192
c-MYC	↑VEGF, ↓TSP-1	156; 179
c-Met	Tyrosinkinase-Rez. für HGF/SF	1; 153
HER-2/neu	↑VEGF	182
EGFR	↑VEGF, ↑bFGF, ↑IL-8	182

PyMT	↓TSP-1	207
c-fos	↑VEGF	148; 200
v-p3k	↑VEGF	106
PTTG1	↑VEGF, ↑bFGF	85
E2a-Pbx1	↑Angiogenin-3	63
Bcl-2	↑VEGF	48; 109
Andere		
NO	↑EC Proliferation	105
Ang-1	Tie2-Agonist, Endothelstabilisation	83; 116; 223;229
AP-1	↑AP-1-->↑VEGF-->nicht essentiell für ↑VEGF	14; 133
NF-kappaB	u.a. über Bcl-2 Kaskade u.a. über MCP-1, IL-8	14; 109; 217
Del-1	↓Integrin --> ↑HOX D3	90; 250
Follistatin	v.a. parakrin angiogen + bFGF	123
HPV-16	↑VEGF	132; 143
ODC	↓Endostatin --> ↑EC	7; 165

Tabelle 1: Endogene Induktoren der Angiogenese (modifiziert und erweitert nach Liekens et al., 2001 sowie Kerbel und Folkman, 2002).

Endogene Inhibitoren der Angiogenese

Inhibitor	Mechanismus/Kommentar	Literaturstellen
Proteinfragmente		
Angiostatin (Plasminogen-Fragment)	↓EC Proliferation, ↑EC Apoptose	21; 172
Endostatin (Kollagen XVIII-Fragment)	↓EC Proliferation, ↑EC Apoptose	173
aaAT (Antithrombin 3-Fragment)	↓EC Proliferation, ↑EC Apoptose	174
Prolaktin (16 kDa-Fragment)	↓EC Proliferation ↓FGF-2	221
Lösliche Mediatoren		
TSP-1	↓EC Proliferation, ↑EC Apoptose ↓mRNA-level von Typ I Kollagen	102; 251; 192
TSP-2	↓EC Proliferation, ↑EC Apoptose u.a. über CD 36, HRGP	212
Troponin I	↓EC Proliferation	158
IFN-α	↓EC Proliferation, ↑EC Apoptose ↓FGF-2-induzierte Angiogenese	43
IFN-γ	↓EC Proliferation, ↑IP-10	201
CRP	↓EPC Überleben, Differenzierung, Funktion, ↓NO-Produktion	234; 235

PEDF	↓EC Migration	37
	↓FGF-2-induzierte EC Proliferation	
IP-10	↓EC Proliferation	157
	↓FGF-2- und IL-8-induzierte Migration	
PF-4	↓EC Proliferation	157
	↓FGF-2- und IL-8-induzierte Migration	
IL-12	↑IFN- γ , ↑IP-10	206
IL-4	↓EC Migration	237
VEGI	↓EC Proliferation	248
TIMP-1, -2	↓MMP Aktivität	73
PAI-1	↓PA (uPA/tPA) Aktivität	31; 40; 215
	SSeCKS und PAI-1 Kopplung?	
Retinoinsäure	↓EC Migration, ↓VEGF	42; 112
	Transkriptionsfaktorenmodulation	
Ang-2	↓Blutgefäßreifung & ↓Endothelfunktion	54; 145
	Ang-1/Tie-2 -Antagonist	
	↑MMP's, TNF- α sensitizer für EC	
2-Methoxyoestradiol	↓EC Proliferation und Migration	246
	↑EC Apoptose	
ADMA	Kompetitiver NOS-Antagonismus	32; 122
Alpha1-antitrypsin		95
Kortikosteroide	↓VEGF	162
Gravin/SSeCKS/ Akap250/AKAP12	↓AP --> ↓VEGF	133
Angioarrestin	Angiopietin verwandt	41
TGF- β	angiogen & antiangiogen	75
Andere		
Fibronectin	„Conditio sine qua non“ für viele	245
Vitronectin	antiangiogene Faktoren	245
Tumor Suppressor Gene		
p53	↑TSP-1, ↓VEGF	34; 66; 191; 208
VHL	↓VEGF Synthese	100
trkB	↓VEGF Synthese	152

Tabelle 2: Endogene Inhibitoren der Angiogenese (modifiziert und erweitert nach Liekens et al., 2001 sowie Kerbel und Folkman, 2002).

Nachfolgend sollen die zwei Angiogenesefaktoren, deren Untersuchung im Zentrum dieser Arbeit steht, genauer beschrieben werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich überwiegend mit zwei Faktoren, die in der Regulation der Angiogenese eine Rolle spielen. Zum einen mit dem Faktor Gravin, der antiangiogene Eigenschaften besitzt und einen funktionellen

Antagonismus zum VEGF ausübt (Lee et al, 2003). Zum anderen mit VEGF selbst, der als eines der wichtigsten angiogenen Regulatormoleküle angesehen wird (Ribatti, 2005).

1.1.6 VEGF

Der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) wurde 1983 als ein in Tumoren produzierter Faktor beschrieben, der die Permeabilität von Gefäßen erhöht; deswegen wurde er zunächst als *vascular permeability factor* (VPF) bezeichnet (Senger et al., 1983).

Einige Jahre später gelang es, einen Faktor zu isolieren und sequenzieren, der die Gefäßneubildung positiv beeinflusst, und man benannte ihn entsprechend VEGF. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es sich bei VPF und VEGF um das gleiche Molekül handelt (Leung et al., 1989; Keck et al., 1989).

Seither ist das Wissen von der Wirkungsweise und dem Wirkungsfeld des vascular endothelial growth factors stark angewachsen. Bis heute konnten fünf verschiedene Gene, die für VEGF-Proteine codieren, identifiziert werden. Diese fünf Gene und ihre Genprodukte werden mit den Buchstaben A bis E bezeichnet (VEGF-A bis VEGF-E). Wegen hoher Strukturhomologie wird zusätzlich zu den fünf verschiedenen VEGF-Genprodukten auch der PlGF zu den Proteinen der VEGF-Familie gezählt (Ferrara et al., 2003). VEGF-A ist nach heutigen Erkenntnissen das VEGF-Protein, mit der größten Bedeutung im menschlichen Organismus; es wird deswegen oft nur als VEGF bezeichnet (Fischer et al., 2005). VEGF-A wirkt vor allem auf Endothelzellen von Blutgefäßen, während VEGF-D und VEGF-E überwiegend die Lymphangiogenese beeinflusst (Karkkainen et al., 2002).

Das VEGF-A-Gen des Menschen befindet sich auf Chromosom 6p21.3. Es besteht aus acht Exons, sieben Introns und umfasst 14 kb (Tischer et al., 1991; Houck et al., 1991; Poltorak et al., 1997). VEGF-A ist ein dimeres Glykoprotein von ca. 45 kDa Größe, dessen Monomere über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind.

Von humanem VEGF-A sind sechs verschiedene Splicevarianten bekannt, die nach der Länge ihrer Aminosäureketten bezeichnet werden. So sind von VEGF

derzeit sechs Isoformen bekannt, mit 121, 145, 165, 183, 189 und 206 Aminosäuren (Abbildung 1). Diese, durch alternatives Splicen entstandenen Isoformen haben eine unterschiedliche biologische Bedeutung. In Tumoren z.B., werden vorwiegend die Isotypen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ produziert (Nuefeld et al., 1999; Hicklin und Ellis, 2005).

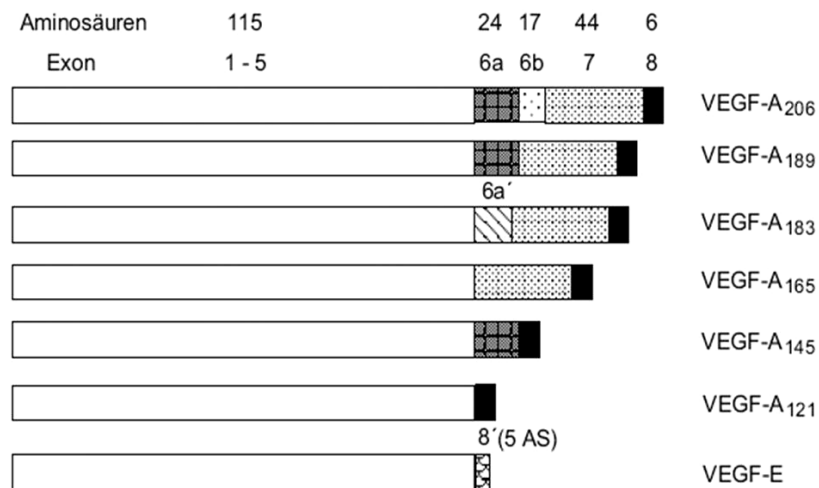


Abb. 1: VEGF-A-Isoformen entstehen durch alternatives Splicen. Der kleinste bekannte Isotyp mit 121 Aminosäuren hat Ähnlichkeiten mit dem VEGF-E-Protein (Röttgen, 1999).

Vielfache und vielfältige Abhängigkeiten von anderen Faktoren und Bedingungen, die auf eine Zelle einwirken können, sind für das Zytokin und Mitogen VEGF beschrieben. Beispielhaft sollen hier einige Einflussmöglichkeiten des VEGF-Moleküls genannt werden. So agiert VEGF, z.B. indirekt über Induktion der e-NOS und i-NOS als Vasodilatator (Hood et al., 1998; Kroll und Waltenberger, 1998).

Ein weiterer wichtiger Stimulus der VEGF-vermittelten Angiogenese sind hypoxische Bedingungen im betroffenen Gewebe. Dies fördert die Expression von spezifischen Transkriptionsfaktoren, wie dem „hypoxia inducible factor-1“, über den wiederum die Expression angiogener Wachstumsfaktoren induziert wird (Forsythe et al., 1996). Die Steigerung der Genexpression von VEGF wird u.a. durch die Bindung von HIF-1 an den Promotor des VEGF-Gens bewirkt (Liu et al., 1995). Später konnte auch ein Einfluss hypoxischer Bedingungen

auf die Stabilität der VEGF-mRNA gezeigt werden (Stein et al., 1995; Damert et al., 1997; Claffey et al., 1998). Zusätzlich fördern eine Vielzahl von Angiogeneseinduktoren auf direktem oder indirektem Weg die VEGF-Gentranskription (siehe Tabelle 1).

In der Vaskulo- und Organogenese spielt VEGF während der Embryonalzeit eine entscheidende Rolle. Es konnte an knock-out-Mäusen gezeigt werden, dass bereits der Verlust eines Allels des für VEGF-A codierenden Gens, eine hohe Letalität der Mäuse zur Folge hatte (Carmeliet et al., 1996).

Außerdem ist VEGF an der Pathogenese von Krankheiten, die mit einer vermehrten oder verminderten Angiogenese einhergehen maßgeblich beteiligt (Folkman, 1995). Eine pathophysiologisch wichtige Rolle spielt VEGF u.a. bei entzündlichen Erkrankungen (Koch, 1998), unter Hypoxie (Isner und Losordo, 1999) oder im Rahmen von neoplastischen Geschehen. In den meisten soliden Tumoren gilt VEGF als maßgeblich beteiligter Faktor an der Gefäßneubildung im Tumor. Diese Gefäßneubildung ist essentiell für die Ausbreitung eines Tumors, sowohl für das Wachstum des Tumors lokal, als auch für dessen Metastasierungsneigung (Folkman, 1992).

Insbesondere Glioblastome gehören zu den Tumoren, deren entartete Zellen regelmäßig VEGF bilden, wobei die Expression durch Hypoxie und den Einfluss von Wachstumsfaktoren oder anderen Zytokinen noch gesteigert wird. Nicht-maligne Gliazellen bilden dagegen im adulten Gehirn unter physiologischen Bedingungen kaum VEGF. Auch sind in mikroskopisch normalem Gewebe, welches Gliomgewebe umgibt, VEGF-Rezeptoren praktisch nicht auf Endothelzellen nachweisbar (Plate et al., 1994).

Lange Zeit nahm man an, dass im ausgereiften Organismus VEGF zwar an physiologischen Formen der Angiogenese als angiogener Faktor beteiligt ist, wie dies beispielsweise im weiblichen Reproduktionszyklus der Fall ist (Ferrara et al., 1998; Ferrara, 1999 b), abgesehen von diesen Ausnahmen jedoch keine bedeutende Rolle spielt. Neuere Arbeiten konnten hingegen zeigen, daß VEGF auch bei ausgewachsenen, gesunden Individuen zahlreiche Funktionen hat (Carmeliet, 2003).

Beispielsweise gibt es Hinweise für eine neuroprotektive Wirkung von VEGF (Storkebaum und Carmeliet, 2004). In diesem Zusammenhang soll eine Erkrankung erwähnt werden, in deren Pathophysiologie die Beteiligung von VEGF diskutiert wird: der Motoneuron-Verlust, der im Verlauf der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) beobachtet wird, könnte unter Umständen auf einer verminderten oder gestörten VEGF-Produktion beruhen (Oosthuysen et al., 2001).

Weiterhin wird dem VEGF eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Kapillaren, die für die Funktion der Langerhans-Inseln im Pankreas von Bedeutung sind, zugeschrieben (Lay et al., 2005; Konstantinova und Lammert, 2004).

1.1.6.1 VEGF-Rezeptoren

Viele verschiedene Zelltypen besitzen an ihrer Oberfläche Rezeptoren für VEGF. Zwar gilt die Endothelzelle als typische Targetzelle für das VEGF-Molekül mit üblicherweise einer großen Anzahl an VEGF-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, doch konnte gezeigt werden, dass VEGF-Rezeptoren nicht nur auf Endothelzellen exprimiert werden, sondern auch an der Zelloberfläche von hämatopoietischen Stammzellen, Monozyten, Neuronen, Osteoblasten, Perizyten, plazentaren Trophoblasten und renalen Mesangiumzellen zu finden sind (Ferrara et al., 2003).

Es gibt chemisch unterschiedliche Rezeptoren, an denen ein VEGF-Molekül binden kann. An dieser Stelle soll auf den VEGFR-1, den VEGFR-2, den VEGFR-3 und die Neuropilinrezeptoren Nrp-1 und Nrp-2 näher eingegangen werden.

Der VEGFR-1 besteht aus sieben extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen, einer einzigen Transmembrandomäne und einer intrazellulären Tyrosinkinase (Shibuya et al., 1990). Dieser Rezeptortyp wird vor allem von Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen, Osteoblasten, Perizyten, plazentaren Trophoblasten, renalen Mesangiumzellen und von einigen hämatopoietischen Stammzellen exprimiert. Der VEGFR-1 bindet mit hoher Affinität VEGF, VEGF-B und PlGF. Er wird, im Gegensatz zum VEGFR-2 und VEGFR-3, überwiegend durch

Hypoxie hochreguliert, und spielt in der Angiogenese eine bedeutende Rolle (Abbildung 2; Gerber et al., 1997).

Außerdem existiert von VEGFR-1 eine lösliche Form (sVEGFR-1), die lediglich aus dem extrazellulären Anteil, den sieben Ig-ähnlichen Domänen, von VEGFR-1 besteht. Dieser lösliche Rezeptortyp ist in der Lage, VEGF zu binden und schwächt somit die Wirkung von VEGF auf die Zielzellen ab. Beispielsweise wird in der Pathophysiologie der Präeklampsie diskutiert, ob erhöhte sVEGFR-1-Spiegel in Verbindung mit verminderten VEGF- und PlGF-Spiegeln und daraus resultierender Endothelzellfunktion der mütterlichen und plazentaren Gefäße, ein molekularpathogenetisches Korrelat dieser Erkrankung darstellen (Levine et al., 2004).

Der VEGFR-2 hat eine dem VEGFR-1 sehr ähnliche Struktur. Er bindet VEGF-A-Isoformen, VEGF-C und VEGF-D. Der VEGFR-2 ist der vorrangige Rezeptor für die Übermittlung des VEGF-Signals auf die Endothelzelle. Er wird von haematopoietischen Stammzellen, Megakaryozyten, neuronalen Zellen, Osteoblasten und duktalem Zellen des Pankreas exprimiert (Matsumoto und Claesson-Welsh, 2001; Ferrara et al., 2003).

Der VEGFR-3 unterscheidet sich hinsichtlich seiner molekularen Struktur von den oben genannten Rezeptoren. Die fünfte extrazelluläre Domäne wird kurz nach der Proteinbiosynthese proteolytisch abgespalten, und somit besteht der extrazelluläre Anteil von VEGFR-3 lediglich aus sechs Ig-ähnlichen Domänen (Pajusola et al., 1994).

VEGFR-3 bindet VEGF-C und VEGF-D (Achen et al., 1998) und wird vorgeburtlich überwiegend auf embryonalen und fetalen Endothelien exprimiert. Beim Erwachsenen findet sich die VEGFR-3-Expression vorwiegend auf lymphatischen Endothelzellen (Kaipainen et al., 1995). Außerdem ist der VEGFR-3 auf Endothelzelloberflächen unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. bei stark vaskularisierten Tumorerkrankungen (Malignes Melanom u.a.), hochreguliert (Tammela et al., 2005). Mutationen im Bereich des VEGFR-3-Gens führen beim Menschen zum hereditären Lymphödem (Irrthum et al., 2000).

Neuropilinrezeptoren sind Rezeptoren für z. B. Semaphorine und andere Moleküle mit Bedeutung in der neuronalen Entwicklung und axonalen Lenkung. Sie binden aber auch VEGF-Moleküle, und sind somit am Prozess der Angiogenese beteiligt. Man unterscheidet zwei verschiedene Rezeptoren: Nrp-1 und Nrp-2. An Nrp-1 bindet VEGF-A, VEGF-B und PlGF; überdies kann er als sogenannter Co-Rezeptor das Signal, das durch das Binden von VEGF an VEGFR-2 zustande kommt, verstärken (Klagsbrun et al., 2002). Des Weiteren soll über den Nrp-1 die Tumorangiogenese *in vivo* hochreguliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass in Huhnembryos Nrp-1 überwiegend in Endothelzellen von Arterien exprimiert wird (Herzog et al., 2001). Weiterhin nimmt man an, dass Nrp-1 in der embryonalen Entwicklung sowohl für die „axonale Lenkung“ als auch für die Gefäßausbildung von größter Wichtigkeit ist (Kawasaki et al., 1999). Eine Übersicht über einige VEGF-Rezeptoren und potentielle Liganden gibt die folgende Abbildung 2.

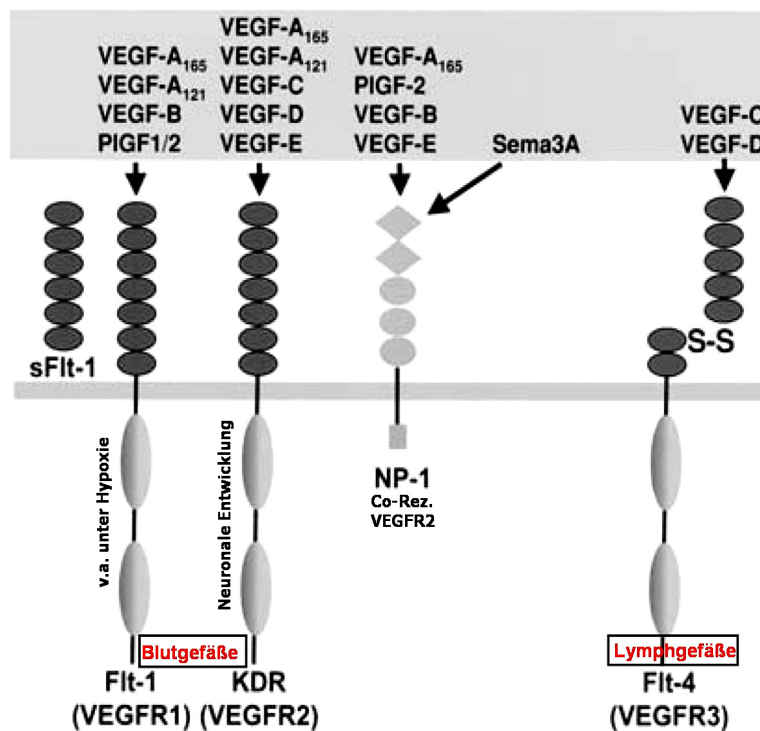


Abb. 2: VEGF-Rezeptoren und potentielle Liganden (erweitert nach Zachary, 2003).

1.1.7 Gravin

Gravin wird auch als AKAP12 bzw. AKAP250 bezeichnet. Es wurde 1992 erstmals als Autoantigen bei Patienten mit Myasthenia gravis beschrieben (Gordon et al. 1992). Das humane Gravin-Gen wird als homologe Form des in Nagetieren bekannten SSeCKS-Gens angesehen (Gelman, 2002). SSeCKS weist große molekularbiologische, und wahrscheinlich auch funktionelle Ähnlichkeit mit dem humanen Molekül Gravin auf, sodass man SSeCKS und Gravin auch als „orthologe“ Proteine bezeichnet (Nauert et al., 1997). Da ein Großteil der Forschung über dieses Gen und das entsprechende Protein an Nagetieren durchgeführt wurde, wird hier vorwiegend von SSeCKS berichtet.

Das SSeCKS-Gen wurde 1995 von Lin et al. als ein neues von Src- und Ras-supprimiertes Gen, namens „322“ beschrieben (Lin et al., 1995). Ein Jahr später konnte das Genprodukt in Nagetieren von der gleichen Arbeitsgruppe isoliert werden; es erhielt den Namen SSeCKS, was für *Src suppressed c kinase substrate* steht (Lin et al, 1996). Bei SSeCKS handelt es sich um ein Protein, bestehend aus etwa 1800 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 290 kDa, je nach Nager (Maus, Ratte etc.) (Kitamura et al., 2002).

Als AKAP12 wird offiziell das Gen bezeichnet, welches sowohl für SSeCKS als auch für Gravin/AKAP250 codiert (Streb und Miano, 2005). Gelegentlich wird AKAP12 jedoch auch als Synonym für seine Genprodukte verwendet. AKAP12 codiert für drei verschiedene m-RNAs, die als AKAP12- α , AKAP12- β und AKAP12- γ bezeichnet werden. Diese drei, zu 95% in ihrer Aminosäuresequenz identischen, Isoformen werden offenbar unabhängig voneinander durch komplexe Promotersysteme reguliert, wobei jeder Isoform eine eigene Promotorregion zugeordnet werden konnte (Streb et al., 2004). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass AKAP12- α durch das single copy gene SRF mitreguliert wird (Streb und Miano, 2005).

Das für Gravin codierende Gen liegt auf Chromosom 6q24-25.2, und somit auf dem selben Chromosom wie das VEGF-A-Gen. Der Genabschnitt 6q24-25.2 zeichnet sich durch eine hohe Deletionsrate, z.B. bei Menschen mit fortgeschrittenem Mamma- oder Ovarialkarzinom aus (Fujii et al. 1996; Theile et al. 1996).

SSeCKS und Gravin sind mehrfach als tumorsuppressives Agens in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben worden (Gelman et al., 2000; Xia et al., 2001; Gelman, 2002; Boulwood et al., 2004). SSeCKS wird nicht nur in Src-transformierten Zellen, sondern auch in Ras-transformierten Zellen weniger stark exprimiert (Lin et al., 2000), was auf die antitumorogene Eigenschaft von SSeCKS hinweist. Außerdem spielt SSeCKS eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus. So wird beispielsweise der Übergang von der G1- in die S-Phase durch hohe SSeCKS-Konzentrationen gehemmt (Lin et al., 2000). SSeCKS ist zudem an der Regulation der Ausbildung zytoskelettaler Elemente beteiligt (Nelson et al., 1999). SSeCKS und Gravin konnten wie VEGF als für neuronale Entwicklung und für zellmigratorische Prozesse relevante Moleküle identifiziert werden (Siegel et al. 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Gravin auch an β_2 -adrenerge Rezeptoren bindet (Tao et al., 2003).

Neuere Veröffentlichungen konnten Hinweise darauf geben, dass SSeCKS an der Ausbildung der Bluthirnschranke beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass SSeCKS an der Regulation der Angiogenese beteiligt ist: über Reduktion des AP-1-Moleküls vermindert SSeCKS die VEGF-Expression und wirkt somit als antiangiogener Faktor (Lee et al., 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass SSeCKS über Ang-1 in der Lage ist, die Bluthirnschranke abzudichten (Abbildung 3; Lee et al., 2003).

Umfassend muss jedoch festgestellt werden, dass, verglichen mit VEGF, über Gravin bzw. SSeCKS wenig bekannt ist.

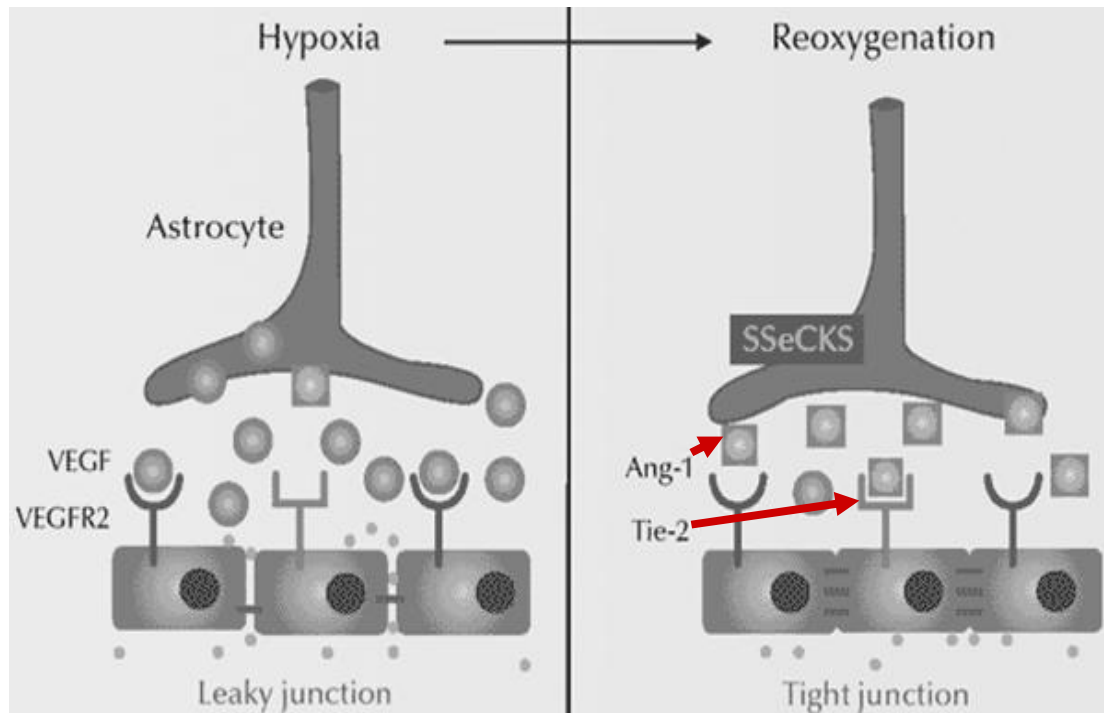


Abb. 3: SSeCKS bewirkt über eine vermehrte Angiopoietin-1 Expression die Stabilisation der Blut-Hirn-Schranke (nach Lee et al., 2003).

1.2. Astrozytome und ihre Klassifikation

Astrozytome gehören zu der histologisch heterogenen Gruppe der Gliome. Als Gliome werden Tumore bezeichnet, die von Gliazellen des ZNS ausgehen. Die Glia ist das Stützgewebe des menschlichen Gehirns und Rückenmarks. Es werden vier verschiedene Gliazelltypen unterschieden: Astrozyten und Oligodendrozyten, die die Makroglia darstellen, Ependymzellen zur Auskleidung der Ventrikel und Mikrogliazellen, welche wahrscheinlich aus Monozyten hervorgehen und in der Immunüberwachung des ZNS eine bedeutende Rolle spielen. Am häufigsten unter den Gliomen sind die Tumore, die vorwiegend aus maligne entarteten Zellen der astrozytären Reihe bestehen: die Astrozytome. Nach der WHO-Klassifikation werden Astrozytome in vier Grade eingeteilt. Während WHO-Grad I und II Tumore eine eher günstige Prognose, mit mittleren Überlebensraten von über zehn bzw. sechs Jahren aufweisen, sind Astrozytome der WHO-Grade III und IV nahezu therapierefraktär, und führen im Falle des Glioblastoms (WHO-Grad IV) durchschnittlich innerhalb von circa einem Jahr zum Tod (Kleihues und Cavanee, 2000; Maldaun et al., 2004).

Im Folgenden möchte ich auf die klinischen und neuropathologischen Charakteristika der einzelnen WHO-Grade eingehen, wobei als Literaturangabe für den gesamten folgenden Abschnitt, sofern keine andere Quelle angegeben ist, das WHO-Buch „Tumours of the Nervous System“ von Kleihues & Cavanee (2000) und das Kapitel „Tumours of the Nervous System“ von Lantos et al. in Greenfield's Neuropathology, seventh edition als Literaturhinweis anzusehen ist.

WHO-Grad I:

Da in dieser Arbeit ausschließlich WHO-Grad I Tumoren vom pilozytischen Typ untersucht wurden, soll an dieser Stelle nur auf diesen Typus eines WHO-Grad I Tumors eingegangen werden.

Das pilozytische Astrozytom ist ein langsam wachsender astrozytärer Tumor, der vorwiegend bei jungen Patientinnen und Patienten auftritt und bevorzugt in Mittellinienstrukturen des Hirns lokalisiert ist. Das pilozytische Astrozytom unterscheidet sich grundsätzlich von den Astrozytomen WHO-Grad II-IV.

Einerseits weist es üblicherweise keine Progressionstendenz bis hin zum sekundären Glioblastom auf, wie es bei WHO-Grad II und III Astrozytomen zu beobachten ist (s. u.). Zum Anderen ist im Gegensatz zu Astrozytomen vom WHO-Grad II-IV in pilozytischen Astrozytomen keine TP53 Mutation (Ohgaki et al., 1993), sondern gelegentlich eine NF-1-Gen Mutation (von Deimling et al., 1993) nachweisbar. Klinisch ist besonders das Optikusgliom, als Sonderform des pilozytischen Astrozytoms, häufig mit der Neurofibromatose Typ I assoziiert.

Ein weiterer Unterschied zu den WHO-Grad II-IV Astrozytomen ist, dass das pilozytische Astrozytom bevorzugt in den ersten zwei Lebensdekaden, mit einem Inzidenzmaximum zwischen dem 8. und 13. Lebensjahr, auftritt und somit ein „Tumor des Kindes“ ist. Die Astrozytome vom WHO-Grad II-IV hingegen, treten vorwiegend im höheren Erwachsenenalter auf, obwohl sie jedoch prinzipiell in jedem Alter auftreten können (s.u.) und somit als Differentialdiagnose auch bei Patienten im Kindesalter bedacht werden müssen. Am häufigsten sind beim pilozytischen Astrozytom Hirnstamm (McGirr et al., 1987), Kleinhirn (Hayostek et al., 1993), Nervus opticus (Hoyt und Baghdassarian, 1969) und seltener das Rückenmark betroffen. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 85%, wobei die Tumorlokalisation die Prognose entscheidend beeinflusst - pilozytische Astrozytome im Hirnstamm haben eine deutlich schlechtere Prognose (5-Jahres-Überlebensrate 5-50%), als Tumore in den anderen, oben genannten Lokalisationen. Pilozytische Astrozytome sind oft scharf vom gesunden Gehirngewebe abgegrenzt. Makroskopisch lässt sich häufig eine mukoide Degeneration des Tumorgewebes beobachten, welche vor allem bei den pilozytischen Astrozytomen des Kleinhirns zu typischer Zystenbildung führt (Ilgren und Stiller, 1987). Mikroskopisch weisen die Tumorzellen vielfach längliche Kerne und ein eosinophiles Zytoplasma mit bipolaren „haarartigen“ (pilos – Haar) Fortsätzen auf. Charakteristischerweise erkennt man im Mikroskop ein biphasisches Muster aus fibrillären Arealen mit Zügen parallel verlaufender Zellen, in Kombination mit aufgelockerten, mikrozystischen Arealen und einem muzinösem Hintergrund. Das Vorkommen von intrazellulären, eosinophilen wurmförmigen (Rosenthal-Fasern; Abbildung

4) und rundlichen ("protein droplets") Strukturen kann beobachtet werden. Die GFAP-Expression kann in den Rosenthal-Fasern besonders stark ausgeprägt sein, sie kann jedoch auch völlig fehlen (Goldman und Corbin, 1991). In pilozytischen Astrozytomen können eine ausgeprägte Kernpleomorphie und vermehrt Gefäßproliferate beobachtet werden (Abbildung 4). Wie in höhergradigen Gliomen wird dies einer vermehrten VEGF-Sekretion der neoplastischen Astrozyten zugeschrieben; jedoch sind diese histologischen Charakteristika ungeklärterweise beim pilozytischen Astrozytom kein Hinweis auf Malignität. Immunhistochemisch lässt sich in pilozytischen Astrozytomen häufig eine kräftige GFAP-Expression nachweisen. Maligne Progression pilozytischer Astrozytome ist sehr selten.

Neuroradiologisch fällt das pilozytische Astrozytom als umschriebene und kontrastmittelaufnehmende Struktur auf. Die Kontrastmittelaufnahme weist auf eine Störung der Blut-Hirnschranke in den entsprechenden Arealen hin und kann als Korrelat der, in der Histologie zu beobachtenden Gefäßproliferate angesehen werden.

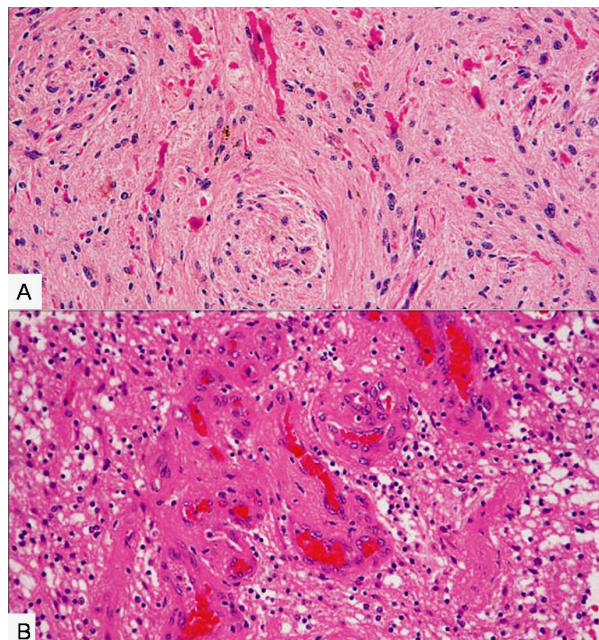


Abb. 4: Pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I mit Rosenthalfasern (A) und Gefäßproliferaten (B); (Ellison und Love, 2004).

WHO-Grad II:

Das diffuse Astrozytom.

Der Inzidenzgipfel des Astrozytoms vom WHO-Grad II liegt zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. Es kann aber prinzipiell, wie auch die Astrozytome Grad III und IV, in jedem Alter auftreten. Die mittlere Überlebensdauer beträgt nach Operation 6-8 Jahre, allerdings mit erheblicher individueller Streuung. Wegen diffuser Infiltration ist eine komplette Resektion in aller Regel nicht möglich. Deswegen rezidivieren fast alle Astrozytome vom WHO-Grad II.

Makroskopisch erscheint das Tumorgewebe diffus aufgetrieben und zäh-elastisch, eventuell zystisch. WHO-Grad II Astrozytome zeichnen sich durch eine breite, diffuse Infiltrationszone aus. Histologisch kann man das am häufigsten vorkommende fibrilläre, das gemistozytäre und das recht seltene protoplasmatische Astrozytom unterscheiden. Allen gemeinsam ist eine nur mäßig hohe Zelldichte bei geringer Kernpleomorphie. Mitosefiguren werden in Astrozytomen WHO-Grad II in der Regel nicht beobachtet. Mikrovaskuläre Proliferate und Nekrosen treten im Gegensatz zu höhergradigen Astrozytomen nicht auf (Abbildung 5). Als Tumor der astrozytären Reihe exprimiert auch das diffuse Astrozytom GFAP.

Im Gegensatz zu pilozytischen Astrozytomen ist eine Progression zu einem höhergradigen Astrozytom bei WHO-Grad II und III Astrozytomen häufig zu beobachten. Molekulargenetisch weisen über 60% aller WHO-Grad II Astrozytome Mutationen im TP53 Gen auf. Diffuse Astrozytome vom gemistozytären Subtyp neigen dazu, früher, als der fibrilläre Subtyp, zu rezidivieren und die oben genannte Progression in Richtung sekundäres Glioblastom zu vollziehen (Schiffer et al., 1988).

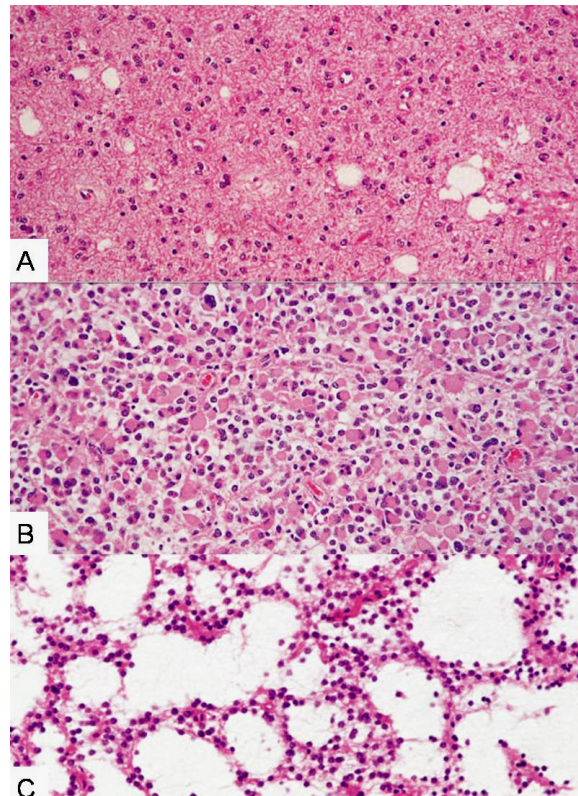


Abb. 5: Diffuses Astrozytom WHO-Grad II, vom fibrillären (A), vom gemistozytären (B) und vom protoplasmatischen Typ (C); (Ellison und Love, 2004).

WHO-Grad III:

Das anaplastische Astrozytom.

Anaplastische Astrozytome vom WHO-Grad III treten am häufigsten zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr auf. Sie liegen damit auch hinsichtlich ihres Inzidenzgipfels zwischen dem diffusen Astrozytom (WHO-Grad II) und dem Glioblastom (WHO-Grad IV). Die mittlere Überlebensrate beträgt etwa 3 Jahre und hängt entscheidend sowohl von der Progression zum Glioblastom, als auch von einer oligodendroglialen Komponente ab, die, wenn vorhanden, eine günstigere Prognose erlaubt.

Makroskopisch zeichnet sich das anaplastische Astrozytom ebenfalls durch eine diffuse Infiltration aus. Mikroskopisch ist die Zelldichte und Kernpleomorphie im Vergleich zum Astrozytom WHO-Grad II jedoch erhöht. Auch zeigen sich im Gegensatz zum diffusen Astrozytom (WHO-Grad II) im histologischen Bild Mitosen und teilweise aufgestellte Endothelien, was als

Beginn, der im Glioblastom zu beobachtenden Gefäßproliferate gedeutet werden kann (Abbildung 6). Nekrosen kommen im anaplastischen Astrozytom WHO-Grad III in der Regel nicht vor. Wenn Nekrosen zu erkennen sind, sind diese jedoch niemals strichförmig, sondern flächig.

Auch anaplastische Astrozytome exprimieren GFAP, jedoch nicht so konstant wie die diffusen Astrozytome. Die Proliferationsrate der anaplastischen Astrozyten, bestimmt mit einem Antikörper gegen Ki-67, zeigt eine Variabilität von 5-10%.

Das anaplastische Astrozytom besitzt eine starke Tendenz sich zum Glioblastom weiterzuentwickeln. Molekulargenetisch weisen über 70% aller anaplastischen WHO-Grad III Astrozytome Mutationen im TP53 Gen auf.

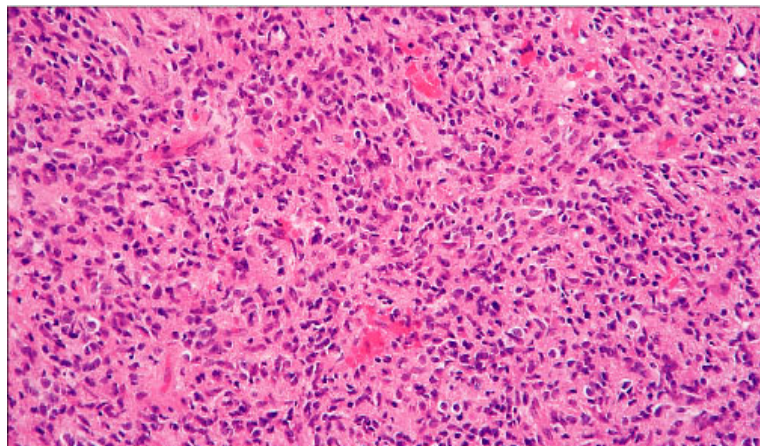


Abb. 6: Anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III mit höherer Zelldichte und ausgeprägterer Zellpleomorphie als WHO-II Astrozytome (Ellison und Love, 2004).

WHO-Grad IV:

Das Glioblastom.

Das Glioblastom (WHO-Grad IV) ist der häufigste und bösartigste Hirntumor. 50-60% aller Astrozytome sind Glioblastome. Das Inzidenzmaximum des Glioblastoms liegt zwischen dem 45. und 70. Lebensjahr. Es kann jedoch prinzipiell in jedem Alter auftreten. Männer sind etwas häufiger betroffen (M:F, 3:2). Mehr als 50% der Patienten sterben innerhalb der ersten 3 Monate nach

Diagnosestellung. Trotz postoperativer Chemo- und Radiotherapie beträgt die 2-Jahres-Überlebensrate 5-12%, die 5-Jahres-Überlebensrate weniger als 3% (Ohgaki und Kleihues, 2005). Glioblastome sind bevorzugt im Marklager des Frontal- und Temporallappens lokalisiert, wobei sie sich häufig schmetterlingsförmig („Schmetterlingsgliom“) über den Balken auf die Gegenseite ausdehnen. In 10% der Patienten zeigt sich ein multizentrisches Wachstum. Das Glioblastom tritt entweder *de novo* auf, oder es ist aus einem niedriggradigeren Astrozytom, im Rahmen der Progression der Grad II und III Tumore (sekundäres Glioblastom) entstanden. Die *de novo*-Form ist die bei weitem häufigere. Makroskopisch sind Glioblastome durch ihre ausgeprägt „bunte Schnittfläche“ gekennzeichnet, was sich in der 1926 von Bailey und Cushing zuerst benutzten Bezeichnung „Glioblastoma multiforme“ widerspiegelt. Das „bunte Bild“ entsteht durch Nekrosen (gelbe Areale) und Tumorblutungen (dunkle Areale). Histologisch erkennt man die Ausprägung charakteristischer Malignitätskriterien: ausgeprägte Kern- und Zellpleomorphie, erhöhte Mitose- und Proliferationsrate, strichförmige Nekrosen mit Palisadenstellung von Tumorzellen im Randbereich, Gefäßproliferate, die sich noch eindrücklicher als im pilozytischen Astrozytom WHO-Grad I, in Form von glomerulusartigen Gefäßknäueln darstellen (Abbildung 7). Diese Tumorgefäße weisen große Schwankungen in Durchmesser und Form auf, sind gelegentlich thrombosiert und von Blutungsresiduen benachbart. Glioblastome exprimieren in der Regel wie andere astrozytäre Tumore GFAP. Der Proliferationsmarker Ki-67/MIB-1 zeigt regional starke Schwankungen mit einem insgesamt hohen Mittelwert von 15-20%.

Patienten mit dem Li-Fraumeni Syndrom (Keimbahnmutationen in TP53) erkranken vermehrt an Glioblastomen. TP53-Mutationen lassen sich häufiger bei sekundären Glioblastomen nachweisen (56%) als bei *de novo*-Glioblastomen (30%) (Ohgaki und Kleihues, 2005). Mutationen in folgenden Genen treten häufig in Glioblastomen auf: CDKN2A, EGFR, TP53, PTEN, CDK4 und RB. Die Verteilung dieser Mutationen spricht für die Existenz von Glioblastom-Untergruppen, die nur molekulargenetisch voneinander abgrenzbar sind.

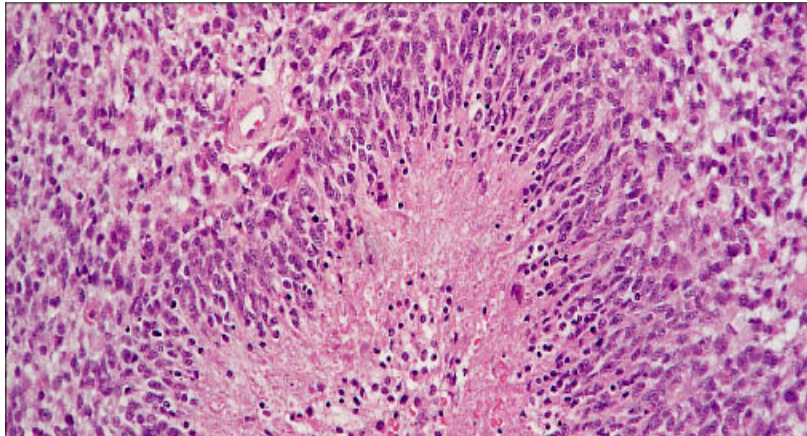


Abb. 7: Glioblastom WHO-Grad IV, strichförmige Nekrose mit Palisadenbildung (Ellison und Love, 2004).

1.3 Ziel der Arbeit und Fragestellung

Angiogenese ist in der Pathophysiologie vieler Erkrankungen von essentieller Bedeutung. Viele Faktoren und Regelkreise sind erforscht, doch fehlt das Verständnis für die Relevanz der untersuchten Angiogenesefaktoren *in vivo*. Deshalb sind Kenntnisse der Expression dieser Faktoren in menschlichem Gewebe genauso unerlässlich, wie das genaue Verständnis des Zusammenspiels der Faktoren, um neue Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Expression von Gravin und VEGF in Astrozytomen aller vier WHO-Grade und in Normalhirn. SSeCKS, das zum humanen Protein Gravin orthologe Protein im Nagetier, ist hinsichtlich seiner Wirkung auf die Angiogenese als Antagonist des VEGF beschrieben worden. Es sollten, mit Hilfe der Tissue microarray Methode, Proteinexpressionsmuster von VEGF bzw. Gravin an Astrozytomen untersucht werden. Gleichzeitig wurde dadurch die Verwendbarkeit der TMA-Methode an Gliomgewebe überprüft.

Astrozytome stellen die häufigsten hirneigenen Tumore dar. Hirntumore sind jedoch, verglichen mit anderen Tumoren, selten. Warum wurden dennoch Hirntumore untersucht? Einerseits spielt die Angiogenese in der Pathophysiologie von Astrozytomen eine zentrale Rolle, und andererseits sind Astrozytome wegen ihrer stark ausgeprägten Vaskularisierung besonders gut geeignet, um Angiogenesefaktoren immunhistochemisch zu untersuchen.

Warum wurden, bei der Fülle von derzeit bekannten Angiogenesefaktoren, gerade die beiden oben erwähnten Faktoren untersucht? Zum Einen war während der Fertigstellung dieser Arbeit noch nichts über die Expression von Gravin in Astrozytomen bekannt. Zum Anderen war die Vermutung von Lee et al., dass SSeCKS die Blut-Hirn-Schranke beeinflusst (Lee et al., 2003), eine gut an Hirnschnitten zu untersuchende Hypothese. Der zweite untersuchte Faktor, VEGF, wurde als funktioneller Antagonist von Gravin hinsichtlich möglicher Korrelationsanalysen ausgewählt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Definition und Auswahl der Gewebeproben

Für die vorliegende Arbeit wurden 194 in Paraffin eingebettete Astrozytengewebeproben aus dem Archiv des Instituts für Hirnforschung der Universität Tübingen ausgewählt.

Darunter befanden sich Proben von 26 pilozytischen Astrozytomen vom WHO-Grad I, 37 diffusen Astrozytomen vom WHO-Grad II (29 vom fibrillären, 5 vom gemistozytären und 3 vom protoplasmatischen Typ), 52 anaplastischen Astrozytomen vom WHO-Grad III und von 79 Glioblastomen, WHO-Grad IV. Des Weiteren wurden unter den 79 Glioblastomen für 25 Proben Infiltrationszonen definiert. Zusätzlich konnte zu 31 der 79 Glioblastomprimärtumoren das Gewebe des Erstrezidivs in diese Studie eingeschlossen werden. In die Gruppe der Glioblastome wurden ausschließlich primäre Glioblastome eingeschlossen; d.h. in dieser Gruppe befinden sich keine Glioblastome, die aus niedriggradigeren Astrozytomen entstanden sind, sogenannte sekundäre Glioblastome. Um die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an pathologischem Gewebe mit denen an physiologischem Hirngewebe vergleichen zu können, wurden 23 Gewebeproben aus einer Normalhirnbank des Instituts für Hirnforschung der Universität Tübingen untersucht. Die Tumorgewebeproben wurden von Patienten, die in den Jahren 1993 bis 2003 in der Abteilung für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Tübingen und in der Abteilung für Neurochirurgie der Asklepios Kliniken Schildautal, Seesen operiert wurden, gewonnen.

Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen hat der Verwendung der Paraffingewebeblöcke für diese Arbeit zugestimmt.

2.2 Mikroskopische und histologische Beurteilung

Alle ausgesuchten Tumore wurden reevaluiert; d.h. sie wurden erneut mikroskopiert und von mindestens zwei Neuropathologen diagnostiziert. Somit wurden nur solche Tumore in diese Studie eingeschlossen, die nach den WHO-Kriterien (Kleihues und Cavane, 2000) eindeutig klassifizierbar waren.

Infiltrationszonen wurden für WHO-Grad IV Tumore anhand von Merkmalen wie Zelldichte (Zellzahl pro Zellfläche: Werte zwischen Normalhirn- und Tumorregion), geringgradige Zellatypie sowie nach weiteren morphologischen Kriterien (normale ZNS-Struktur mit infiltrierenden Tumorzellen) festgelegt.

2.3 Herstellung der histologischen Präparate

Die Gehirne wurden direkt nach der operativen Entnahme mit 4%-igem Formalin in phosphatgepufferter Kochsalzlösung fixiert (pH 7.4). Die entnommenen Proben wurden nach Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 70%, 80%, 96%) zweimal in einem Gemisch aus 100%-igem Alkohol und Chloroform sowie zweimal in unverdünntem Chloroform entwässert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden von den Paraffinblöcken an einem Mikrotom (Microm HM 355 S, Walldorf, Germany) ca. 3µm dicke Schnitte gefertigt und diese auf Objektträger (SuperFrost Plus, Microm International, Walldorf, Deutschland) aufgezogen.

Zur Vorbereitung der Schnitte für immunhistochemische Methoden erfolgte zuerst die Entparaffinierung in Chloroform (3 x 10 min), danach eine Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 70 %; mit destilliertem Wasser; jeweils 5 min).

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Auswahl der Antikörper

Die Antikörper sind jeweils gegen die nachfolgend aufgeführten Epitope gerichtet. Die immunhistochemischen Färbungen für die jeweiligen Antikörper wurden für alle oben erwähnten Tumorgewebe- und für Normalhirnproben durchgeführt. Die Zielmoleküle wurden wegen ihrer funktionell antagonistischen Wirkungsweise in der Regulation der Angiogenese ausgewählt (siehe Einleitung und Diskussion).

2.4.1.1 Gravin

Als Primärantikörper gegen Gravin (AKAP250) wurde ein polyklonaler IgG Antikörper aus der Ziege verwendet (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA; Verdünnung: 1:200).

2.4.1.2 VEGF

Um VEGF darzustellen wurde ein monoklonaler IgG_{2B} Antikörper aus der Maus verwendet (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland; Verdünnung: 1:50). Dieser Antikörper detektiert spezifisch humanes VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅. Diese beiden VEGF-A Spleißvarianten werden vorrangig von den meisten Tumorarten produziert (Nuefeld et al., 1999; Hicklin und Ellis, 2005).

2.4.2 Vorbehandlung und immunhistochemische Färbung

Für alle immunhistochemischen Färbungen war eine Vorbehandlung zur Freilegung der Antigene notwendig. Diese erfolgte über eine Hitzebehandlung. Dazu wurden die Schnitte 8 min in Zitratpuffer (pH 6,0) in einem Mikrowellenofen bei 800 Watt gekocht. Die endogene Peroxidase wurde mit 1% H₂O₂ in 100% Methanol blockiert (15 min). Zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Gewebe für 15 min mit 1:10 in TRIS-gepufferter Salzlösung und mit einem Biotin Blockierungs-Kit (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) inkubiert. Danach folgte die Inkubation bei 4 Grad Celsius über 12 h mit dem in TBS-Lösung verdünnten Primärantikörper (Verdünnung, siehe 2.4.1). Nach dem Spülen mit TBS-Lösung wurde das Gewebe für 30 min mit 1:400 verdünntem biotiniliertem anti-Maus F(ab')₂ bzw. anti-Ziege F(ab')₂-Brückenantikörper (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), je nach Klonalität des Primärantikörpers, behandelt. Nach einem weiteren Spülgang wurde das Gewebe mit dem Peroxidase-gekoppelten Avidin-Biotin-Komplex (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) für 30 min inkubiert und nach einem erneuten Spülgang mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) als Chromogen die spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen sichtbar gemacht (Hsu und Raine, 1981). Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurden alle Schnitte mit Hämatoxylin

gegengefärbt. Zur Dehydrierung durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe sowie 3 mal 10 min Xylol und wurden anschließend mit einem Deckglas versehen. Die Spezifität der Methode wurde durch Positivkontrollen, und zwar im Falle von VEGF mit Hilfe von Hämangioblastomen, überprüft. Bei Negativkontrollen ersetzte eine Isotypenkontrolle in entsprechender Konzentration den Primärantikörper, sodass eine unspezifische Bindung des Detektionssystems ausgeschlossen wurde. Diese Isotypenkontrolle bestand für VEGF aus einem monoklonalen Antikörper gegen ein Antigen des *Aspergillus niger* (Dako, Hamburg), welches im menschlichen Gewebe nicht vorkommt, und somit zu keiner spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion führen sollte. Im Falle von Gravin wurde ein polyklonales Kontrollserum (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) in entsprechender Konzentration verwendet.

2.5 Lichtmikroskopische Auszählung und Auswertung

Die Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop (Olympus BX50, Hamburg, Deutschland). Die Auswertung der TMA-Gewebeproben wurde quantitativ mit Hilfe eines Zähllokulars (Vanox AHBT3, Olympus, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Das benutzte Zählraster besteht aus einem Quadrat, unterteilt in 100 kleine Quadrate, deren Fläche, in der für die Auswertung verwendeten 200-fachen Vergrößerung, $0,0025\text{mm}^2$ entsprach. Es wurden pro Gewebestanze so viele Kästchen des Zähllokulars gezählt, bis entweder 200 Zellen gezählt waren - dann wurde nur noch das angefangene Kästchen zu Ende gezählt – oder, bis alle Kästchen des Zähllokulars ausgezählt waren. Eine eindeutige zytoplasmatische, und / oder membranständige sowie nukleäre Färbung wurde als positiv gewertet.

Zellen in Blutgefäßen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt; ebenso wenig positiv gefärbte Strukturen, die nicht eindeutig einer Zelle zugeordnet werden konnten. Des Weiteren wurden Neurone und Leukozyten in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Gefäßzellzahl wurde in allen Tumoren und im Normalhirn nach der gleichen Methode, wie die Tumorzellen (s.o.) ermittelt. Es wurden nur Zellen, die eindeutig einem Gefäß zugeordnet werden konnten, gezählt. Zwischen

Endothelzellen, Perizyten und periendothelialen Zellen wurde nicht unterschieden.

Die in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen stammen teilweise (Abbildung 9, 12 & 14) von Diafilm-Farbabzügen (Kodak, EPY64T, München, Deutschland), die zum Teil mittels Normarski-Technik aufgenommen wurden (Olympus). Die Abbildungen 17 & 21 wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen (Olympus E-20p).

2.6 Statistische Auswertung

Der Anteil immunreaktiver Zellen an der Gesamtzellzahl wurde unter Verwendung des Arcussinus der Quadratwurzel transformiert. Der post-hoc Vergleich wurde unter Einhaltung einer Signifikanzschwelle von 5% mit dem Tukey-Kramer HSD Test durchgeführt. Um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auszuarbeiten, wurden individuelle p-Werte berechnet. Der individuelle paarweise Vergleich wurde mit Hilfe des Student *t*-Tests durchgeführt.

Die im Ergebnisteil angegebenen unteren und oberen 95%-Konfidenzintervalle wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit lediglich wie im folgenden Beispiel dargestellt angegeben: (CI 12,2-25,5%). Die Werte der Konfidenzintervalle wurden gerundet angegeben.

Für alle statistischen Berechnungen wurde das Statistikprogramm JMP IN verwendet (www.jmp.com).

2.7 Tissue microarray Methode

Die Methode der Gewebeaufarbeitung mittels Tissue microarray stellt im Rahmen immunhistochemischer Untersuchungsansätze eine Möglichkeit zu einem, im Vergleich zur konventionellen Immunhistochemie, deutlich schnelleren und somit effizienteren Screeningverfahren dar. Mit diesem System, das erstmals im Jahr 1998 (Kononen et al., 1998) beschrieben wurde, können je nach Gewebebeschaffenheit und je nach Größe des Paraffinblocks bis zu 1000 Gewebeproben in einen einzigen Paraffinblock eingebracht und weiter verarbeitet werden (Abbildungen 8 & 9). Auf den in dieser Arbeit

verwendeten TMA-Paraffinblöcken befanden sich bis zu 108 Gewebezylinder. Vor- und Nachteile der TMA-Methode sind in der Diskussion unter 4.1 behandelt.

Um die TMA-Paraffinblöcke herzustellen, wurden zuerst auf HE-gefärbten, konventionellen Gewebeschnitten der Donorparaffinblöcke repräsentative Tumorareale lichtmikroskopisch untersucht und farblich gekennzeichnet. Dies geschah mit unterschiedlichen Farben für die verschiedenen, definierten Areale (Tumor, Infiltrationszone, weiße bzw. graue Substanz). Danach wurden die markierten Areale von den HE-gefärbten Schnitten auf die jeweiligen Blöcke übertragen. Dieses Verfahren war unerlässlich, um unerwünschte Gewebезonen, wie z.B. Einblutungen und großflächige Nekroseareale auszuschließen. Im Übrigen wurde das ausgesuchte Gewebe nicht weiter selektioniert.

Die Tissue microarrays wurden nach der Methode von Kononen hergestellt (Kononen et al., 1998) Mit Hilfe der TMA-Maschine (Abbildung 8; Beecher Instruments Inc., Sun Prairie; WI, USA) wurden in Abständen von ca. 1,5 mm Löcher in einen frischen Paraffinblock (Akzeptor-Block) gestanzt und sofort danach mit Gewebezylindern aus dem Donor-Block gefüllt. Der Donor-Block besteht aus dem eigentlichen Zielgewebe-Präparat. Der frische Paraffinblock wurde durch Festschrauben an der Plattform der TMA-Maschine befestigt, um eine exakte Positionierung zu gewährleisten. Hierfür lassen sich die Nadeln an feinen Schrauben nachjustieren. Mit einer dünnen Stanze von 600 µm Durchmesser wurden dünne Gewebezylinder aus dem Donor-Block herausgestanzt, die dann mit Hilfe von x-y-Schrauben, welche eine Veränderung und Justierung der Position zulassen, am frischen Paraffinblock in die gewünschte Position gebracht wurden. Die Zahl der Gewebeprobe pro Paraffinblock wurde auf 110 (maximal 11 Reihen und 10 Spalten) limitiert, um Gewebeverluste beim Schneidevorgang zu vermeiden. Versiegelt wurden die fertigen TMA-Paraffinblöcke mit einem auf 42 Grad Celsius vorgeheizten Objektträger, um ein eventuelles Herausgleiten der Gewebezylinder beim Schneidevorgang zu verhindern.



Abb. 8: TMA-Maschine (MTA-1; Beecher Instruments Inc., Sun Prairie; WI, USA).

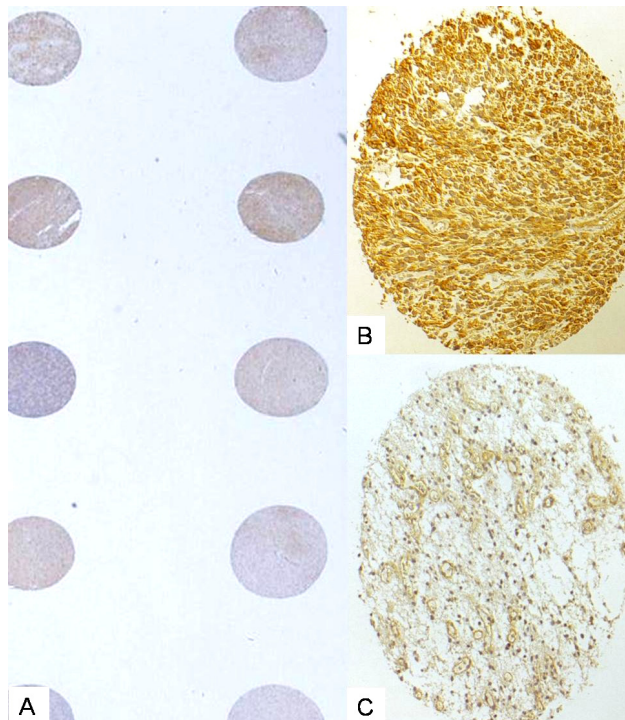


Abb. 9: TMA-Stanzen; (Vergrößerung A/B/C: 20-/100-/100-fach).

3 ERGEBNISSE

3.1 Allgemeine Ergebnisse

Vorbemerkung: Wenn in den Kapiteln *Ergebnisse* und *Diskussion* der Begriff „Expression“ verwendet wird, ist hiermit nicht die mRNA-Ebene gemeint, sondern im engeren Sinne die Immunreaktivität, bezogen auf den jeweils untersuchten Faktor, also die Protein-Ebene.

3.1.1 Ergebnisse der Auswertung der Zellzahl

In Astrozytomen konnte ein eindeutiger und statistisch signifikanter Anstieg der Gesamtzellzahl mit dem WHO-Grad nachgewiesen werden (Abbildung 10). Eine Ausnahme bildet die Gruppe der diffusen Astrozytome WHO-Grad II, die einen leichten, statistisch jedoch nicht signifikanten Abfall der Gesamtzellzahl aufweisen.

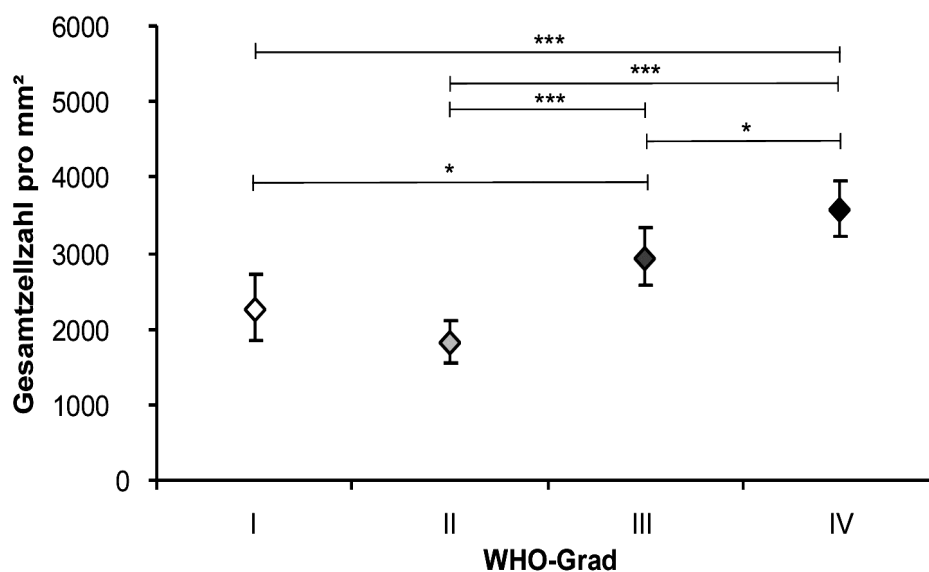


Abb. 10: Gesamtzellzahl pro mm² in Astrozytomen vom WHO-Grad I-IV.

Der Mittelwert für die Gruppe der pilozytischen Astrozytome WHO-Grad I betrug 2200 (CI 1900-2700), für diffuse Astrozytome WHO-Grad II 1800 (CI 1600-

2100), für anaplastische Astrozytome WHO-Grad III 2900 (CI 2600-3300) und für Glioblastome WHO-Grad IV 3600 (CI 3400-4000) gezählte Zellen.

Die p-Werte ergaben: Vergleich Grad I zu II ($p=0,09$), Grad I zu III ($p=0,0195$), Grad I zu IV ($p<0,0001$) sowie Grad II zu III ($p<0,0001$), Grad II zu IV ($p<0,0001$) und Grad III zu IV ($p=0,0106$).

3.1.2 Ergebnisse der Auswertung der Gefäßzellen

Die Gruppe der pilozytischen Astrozytome vom WHO-Grad I wies mehr Gefäßzellen pro Gesamtzellzahl auf als die Astrozytome der anderen WHO-Grade (Abbildung 11).

Der Mittelwert für die Gruppe der pilozytischen Astrozytome WHO-Grad I betrug 5,7% (CI 3,8-7,9%), für diffuse Astrozytome WHO-Grad II 3,0 (CI 1,9-4,3%), für anaplastische Astrozytome WHO-Grad III 2,5% (CI 1,7-3,5%) und für Glioblastome WHO-Grad IV 1,4% (CI 0,9-2,0%) Gefäßzellen pro gezählte Gesamtzellen.

Dies war für den Gruppenvergleich WHO-Grad I versus WHO-Grad III statistisch signifikant ($p=0,002$) und für den Vergleich WHO-Grad I gegen WHO-Grad IV Tumore hochsignifikant ($p<0,0001$; Abbildung 11).

Die Auswertung der Gefäßzellzahl pro Fläche ergab ebenfalls erhöhte Werte in pilozytischen Astrozytomen gegenüber den WHO-Grad II-IV Tumoren (kein Schaubild).

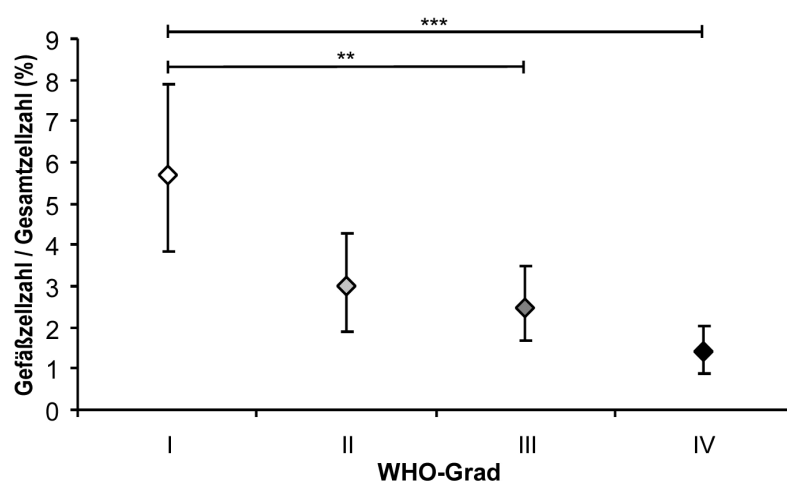


Abb. 11: Gesamtgefäßzellzahl pro Gesamtzellzahl in Astrozytomen vom WHO-Grad I-IV in %.

3.1.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Vorversuche an konventionellen Gewebeschnitten

Diese Vorversuche dienten der Etablierung der Antikörper sowie zur morphologischen Kontrolle und zur Darstellung der Heterogenität der Antikörperanfärbung am konventionellen Glioblastomgewebeschnitt. Für VEGF konnte eine Anfärbung der palisadenbildenden Zellen sowie der Endothelzellen in Gefäßproliferaten in Glioblastomen gezeigt werden (Abbildung 12).

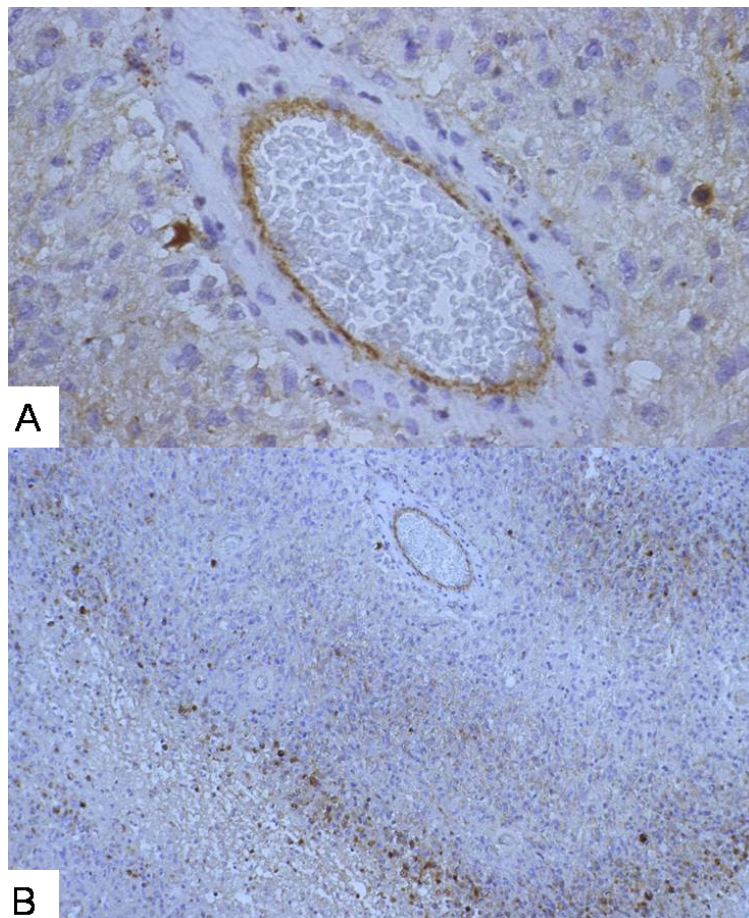


Abb. 12: VEGF-markierte Zellen im Endothel und in Pseudopalisaden (konventioneller Glioblastomgewebeschnitt; Vergrößerung A/B: 200-/40-fach).

3.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

3.2.1 Gravin

In pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I waren prozentual signifikant mehr Zellen Gravin-positiv als in den Astrozytomen der Grade II, III und IV ($p < 0,0001$; Abbildung 13 & 17). Für die Gruppe der pilozytischen Astrozytome WHO-Grad I ergab sich ein Mittelwert von 57,2% (CI 45,5-68,5%) Gravin-immunreaktiver Zellen. Für diffuse Astrozytome vom WHO-Grad II konnte ein Mittelwert von 17,4% (CI 10,9-25,0%), für anaplastische Astrozytome WHO-Grad III ein Mittelwert von 21,2% (CI 15,1-27,9%) und für die Gruppe der Glioblastome WHO-Grad IV ein Mittelwert von 25,9% (CI 20,6-31,7%) Gravin-positiver Zellen ermittelt werden.

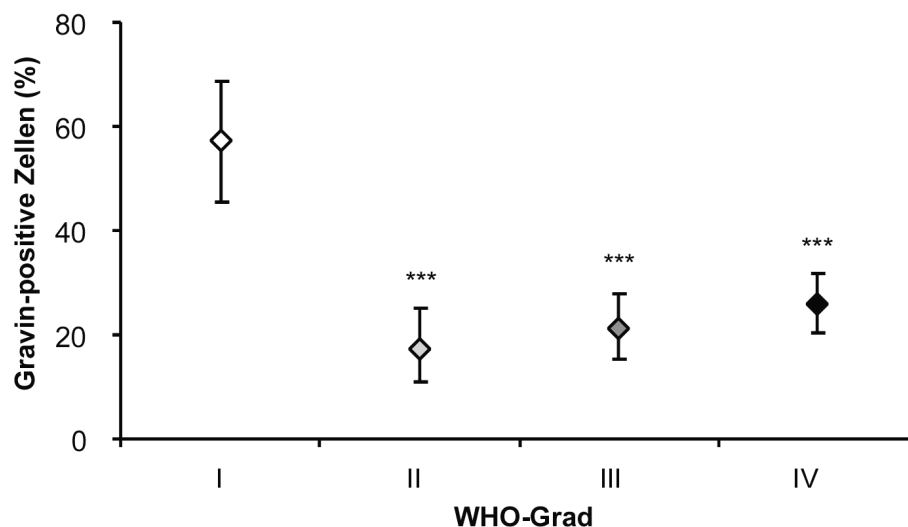


Abb. 13: Gravin-immunreaktive Zellen pro Gesamtzellzahl in Astrozytomen der WHO-Grade I-IV (%).

In Glioblastomen konnten Gravin-positiv Astrozyten beobachtet werden, die mit stark immunreaktiven Endfüßen an Gravin-negative glomeruloide Gefäßproliferate angrenzen (siehe Pfeile in Abbildung 14).

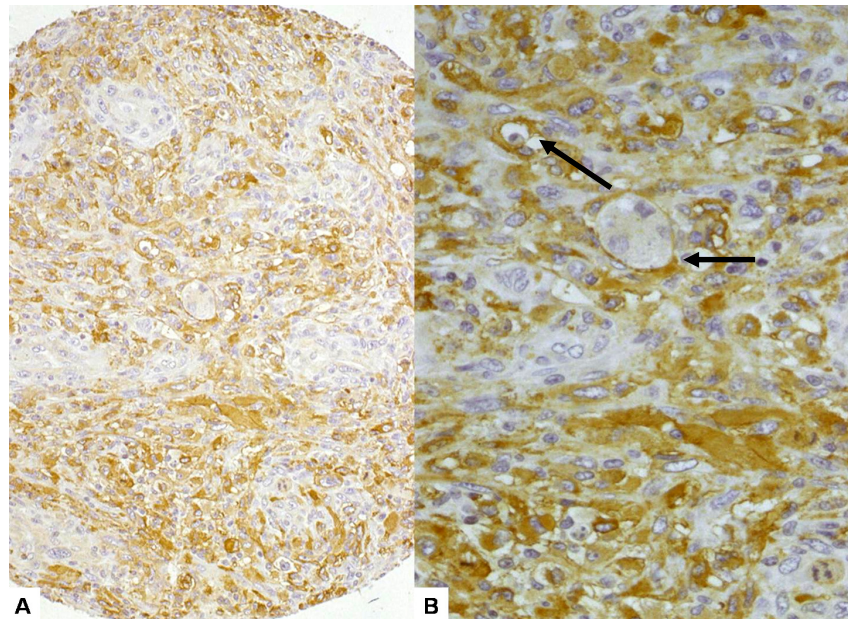


Abb. 14: Gravin-immunreaktive Zellen im Glioblastom mit Gravin-negativen, glomeruloiden Gefäßproliferaten. Die Pfeile zeigen Gravin-positive Zellen mit an Gefäßproliferate angrenzenden Endfüßen (Vergrößerung A/B: 40-/200-fach).

Des Weiteren zeigten sich in den definierten Tumorzonen der Glioblastomgewebeprobe signifikant mehr Zellen Gravin-positiv als in den vorher definierten Infiltrationszonen ($p=0.0063$; Abbildung 15). Der Mittelwert der Gravin-positiven Zellen in der definierten Tumorzone lag bei 18,4% (CI 12,7-25,0%), für die Infiltrationszone bei 10,5% (CI 6,2-15,9%). Hieraus konnte ein Wert von 1,75 für das Verhältnis von Tumorgewebe zu Infiltrationsgewebe hinsichtlich Gravin-positiver Zellen errechnet werden.

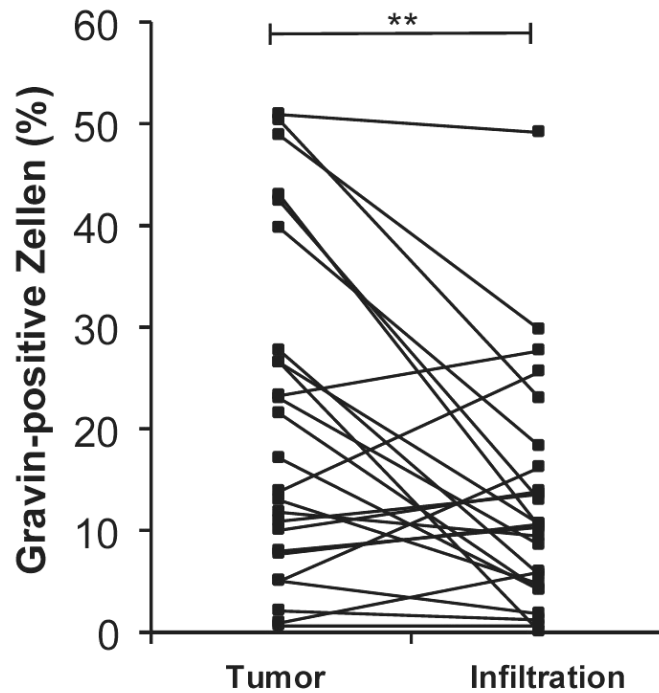


Abb. 15: Paarweiser Vergleich von Tumorregionen mit den korrespondierenden Infiltrationszonen in Glioblastomgewebe hinsichtlich Gravin-immunreaktiver Zellen (%) der Gesamtzellzahl.

Die Auswertung der Normalhirnstanzen ergab eine ca. 20-fach niedrigere Gravin-Expressionsrate im Normalhirn als im Tumorgewebe. Jedoch konnte im paarweisen Vergleich kein signifikanter Unterschied von grauer zu weißer Substanz bezüglich der Gravin-Expression festgestellt werden (Abbildung 16). Der Mittelwert lag bei 1,1% Gravin-positiver Zellen (CI 0,02-3,8%) für die Substantia grisea-Gruppe und bei 0,5% Gravin-positiver Zellen (CI 0,06-2,6%) für die Substantia alba-Proben.

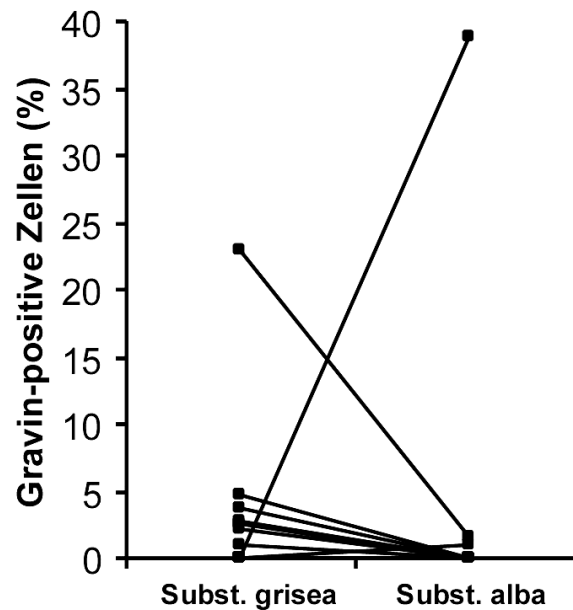


Abb. 16: Gravin-gefärbte Zellen im Normalhirn (%). Paarweiser Vergleich Substantia grisea mit Substantia alba (nicht signifikant, $p > 0,05$).

Der paarweise Vergleich der Primär- und Rezidivtumoren (WHO-Grad IV) ergab kein signifikantes Ergebnis. Die Primärtumorfälle wiesen einen Mittelwert von 30,2% (CI 20,4-41,1%), die Rezidivtumoren einen Mittelwert von 31,2% (CI 21,2-42,1%) Gravin-positiver Zellen auf.

Die Korrelation zwischen Gravin-Expression und relativer Gefäßzellzahl (Anzahl Gefäßzellen pro Gesamtzellzahl) lieferte für alle WHO-Grade kein signifikantes Ergebnis. Ebenso bestand keine Korrelation zwischen der Gravin-Expression und der Gesamtzelldichte.

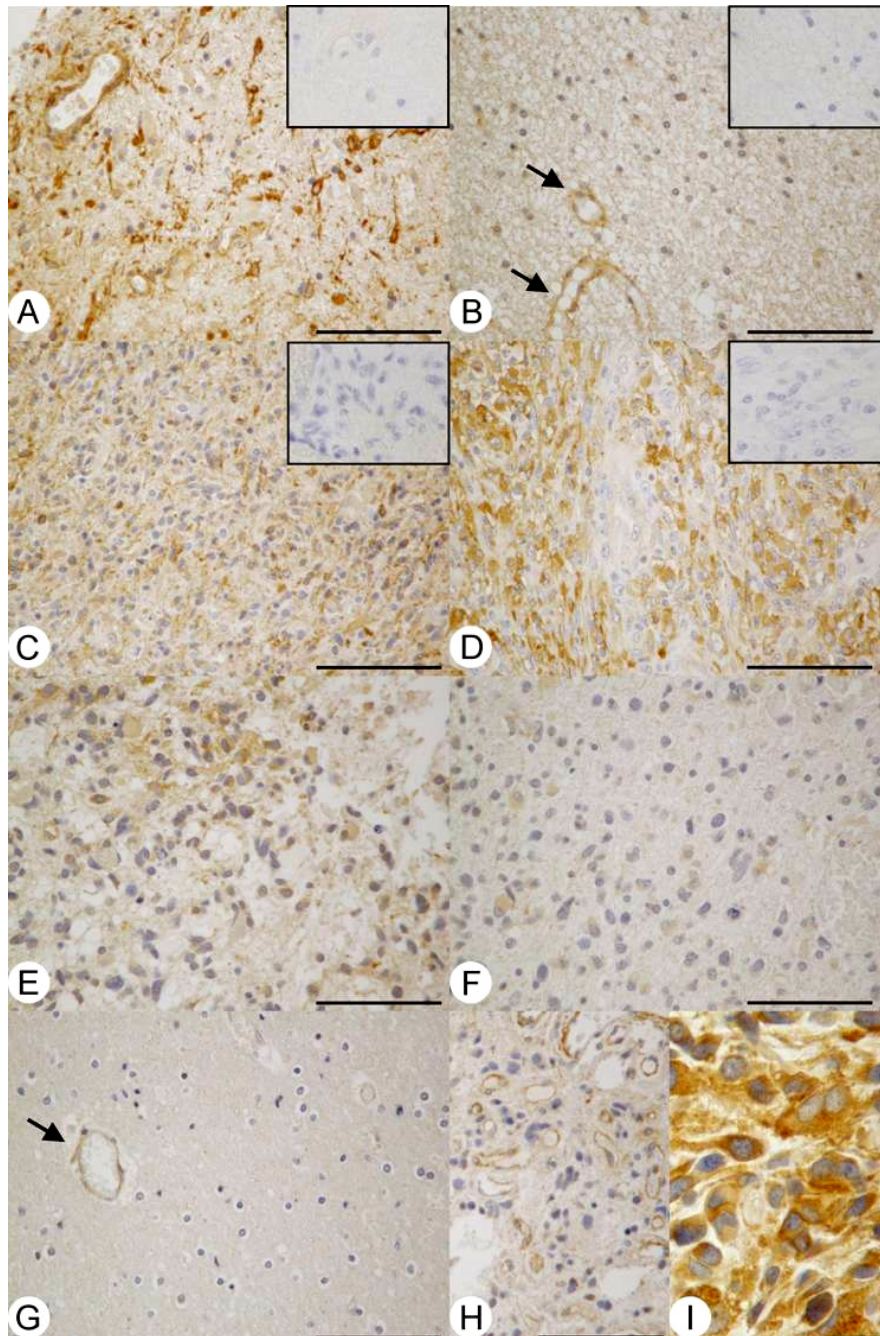


Abb. 17: Gravin-immunreaktive Zellen im pilozytischen Astrozytom (A), im diffusen Astrozytom WHO-Grad II mit Gravin-positiven Endothelien (Pfeil) (B), im anaplastischen Astrozytom (C) und im GBM (D, E) und in der zu E korrespondierenden Infiltrationszone (F). Bild G zeigt Gravin-positive Endothelien (Pfeil) in der Subst. alba von Normalhirngewebe; Bild H und I zeigen deutliche aber seltene Färbemuster in anaplastischen Astrozytomen: In Bild H erkennt man positive Endothelien und im Bild I nahezu 100% Gravin-positive Zellen mit astrozytären Fortsätzen. In Bild A-D sind rechts oben exemplarisch die entsprechenden Isotypkontrollen dargestellt (Vergrößerung Bild A-H: 400-fach; Bild I: 1000-fach).

3.2.2 VEGF

In Glioblastomen (WHO-Grad IV) zeigte sich eine tendenziell höhere Expression von VEGF als in den Astrozytomen der Grade I-III. Insbesondere der Vergleich Glioblastom versus anaplastisches Astrozytom zeigte einen deutlich höheren Mittelwert an VEGF-positiven Zellen im Glioblastom. Es konnte jedoch zwischen den vier WHO-Graden kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der relativen Häufigkeit VEGF-positiver Zellen gezeigt werden ($p > 0,05$ für alle Vergleichsanalysen; Abbildung 18).

Für die Gruppe der pilozytischen Astrozytome WHO-Grad I ergab sich ein Mittelwert von 10,2% (CI 4,6-17,6%) VEGF-immunreaktiver Zellen. Für die Gruppe der diffusen Astrozytome vom WHO-Grad II konnte ein Mittelwert von 12,2% (CI 7,2-18,2%), für anaplastische Astrozytome WHO-Grad III ein Mittelwert von 8,2% (CI 4,6-12,6%) und für die Gruppe der Glioblastome WHO-Grad IV ein Mittelwert von 14,7% (CI 11,1-18,7%) VEGF-positiver Zellen ermittelt werden (Abbildung 18 & 21).

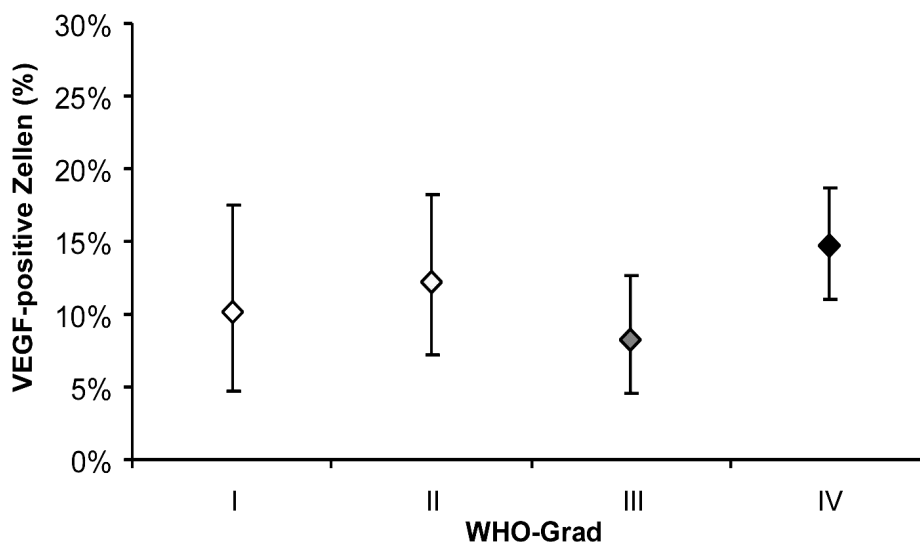


Abb. 18: VEGF-immunreaktive Zellen pro Gesamtzellzahl in Astrozytomen der WHO-Grade I-IV (%); (nicht signifikant, $p > 0,05$ für alle Vergleichsanalysen).

Das VEGF-Expressionsmuster der TMA-Stanzen entsprach der in der Literatur beschriebenen Akkumulation von VEGF-positiven Zellen in Pseudopalisaden um strichförmige Nekrosen (Abbildung 21E, 21F) und in Gefäßen.

Die Normalhirnproben wiesen in der grauen Substanz signifikant mehr VEGF-positive Zellen auf, als in der weißen Substanz ($p=0.0062$; Abbildung 19). Der Mittelwert der VEGF-Expressionsrate lag bei 9,9% (CI 5,7-15,0%) gefärbter Zellen in der Substantia grisea und bei 2,6% (CI 0,6-5,6%) VEGF-immunreaktiver Zellen in der Substantia alba.

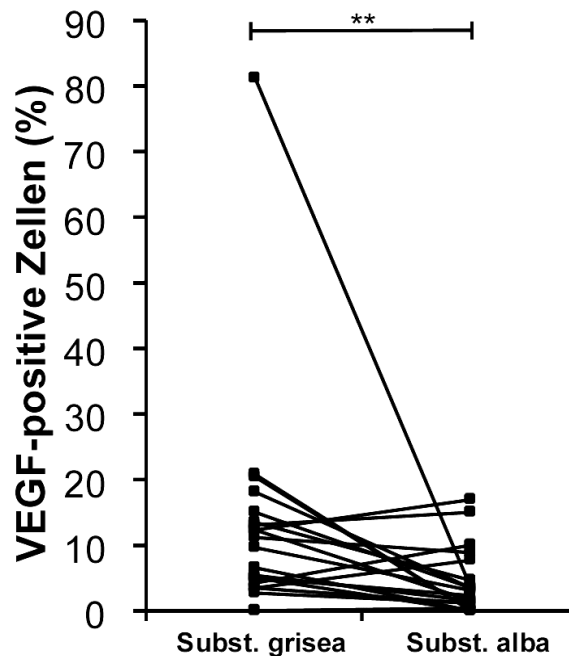


Abb. 19: VEGF-gefärbte Zellen im Normalhirn (%). Vergleich Substantia grisea mit Substantia alba.

Im paarweisen Vergleich der definierten Tumor- und der korrespondierenden Infiltrationszonen der Glioblastomgewebeproben konnte eine tendenziell höhere VEGF-Expression im Tumor gezeigt werden, welche jedoch nicht statistisch signifikant war (Abbildung 20). Der Mittelwert der VEGF-positiven Zellen in den definierten Tumorzonen ergab 12,4% (CI 6,6-19,8%) sowie 7,2% (CI 2,8-13,4%) für die Infiltrationszonen. Hieraus ergab sich ein Wert von 1,72 für das

Verhältnis von Tumorgewebe zu Infiltrationsgewebe hinsichtlich VEGF-positiver Zellen.

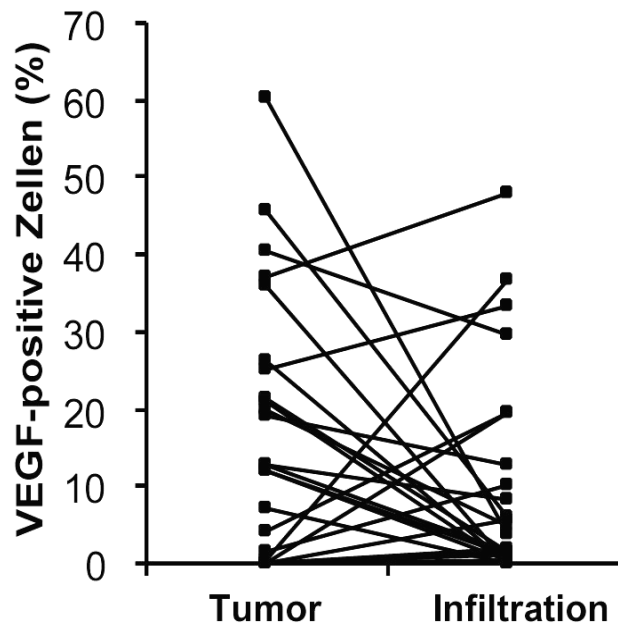


Abb. 20: Paarweiser Vergleich von VEGF-gefärbten Zellen (% der Gesamtzellzahl) in Tumoren und in den definierten Infiltrationszonen in Glioblastomen; (nicht signifikant, $p > 0,05$).

Der paarweise Vergleich der Primär- und Rezidivtumoren (WHO-Grad IV) ergab kein signifikantes Ergebnis hinsichtlich der jeweiligen VEGF-Expressionsrate. Die Primärtumorfälle wiesen einen Mittelwert von 18,8% (CI 11,2-27,8%), die Rezidivtumoren einen Mittelwert von 19,7% (CI 11,9-28,9%) VEGF-positiver Zellen auf.

Wie auch bei der Gravin-Expression konnte auch für die VEGF-Expression weder eine Korrelation mit der Gesamtzelldichte noch eine Korrelation mit der relativen Gefäßzellzahl (Gefäßzellen pro Gesamtzellzahl) gezeigt werden.

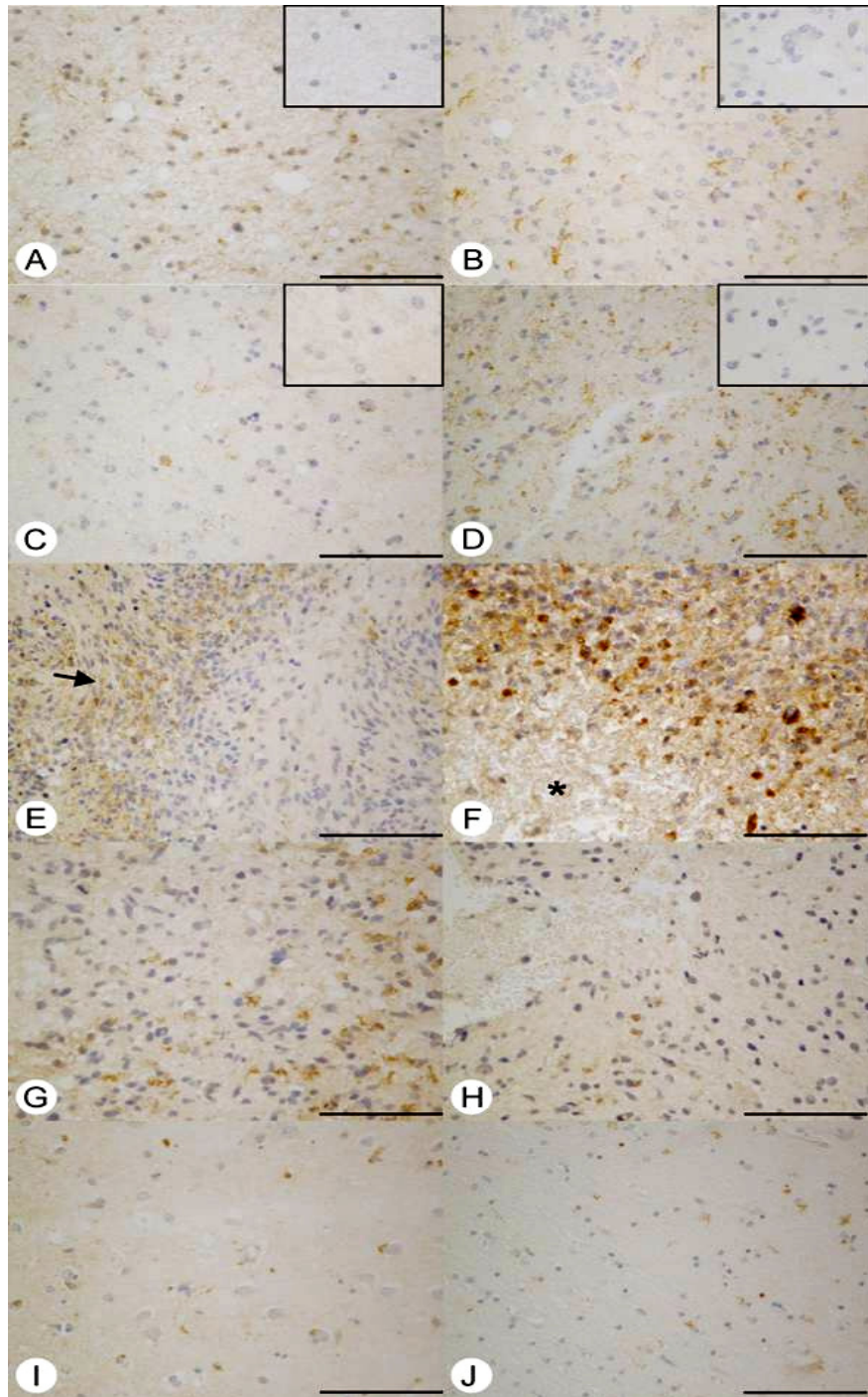


Abb. 21: VEGF-immunreaktive Zellen im pilozytischen Astrozytom (A), im diffusen Astrozytom WHO-Grad II (B), im anaplastischen Astrozytom (C) und im GBM mit verschiedenen Expressionsprofilen und verschiedener Zelldichte (D-H). In Bild F markiert * ein Nekroseareal, welches von kräftig VEGF-positiven Zellen umgeben ist. Bild H zeigt die Infiltrationszone korrespondierend zur Tumorzone von Bild G. Bild I zeigt VEGF-gefärbte Zellen in der Subst. grisea, Bild J in der Subst. alba von Normalhirngewebe. In Bild A-D sind rechts oben die Isotypkontrollen exemplarisch dargestellt (Vergrößerung Bild A-J: 400-fach).

3.2.3 Korrelation der Expressionsraten beider Antikörper

Der Vergleich der VEGF- mit der Gravin-Expression jeweils einer Patientin / eines Patienten ergab eine statistisch signifikante positive Korrelation in anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III ($p=0.0109$; Abbildung 22a) und eine statistisch hochsignifikante positive Korrelation in Glioblastomen WHO-Grad IV ($p<0.0001$; Abbildung 22b).

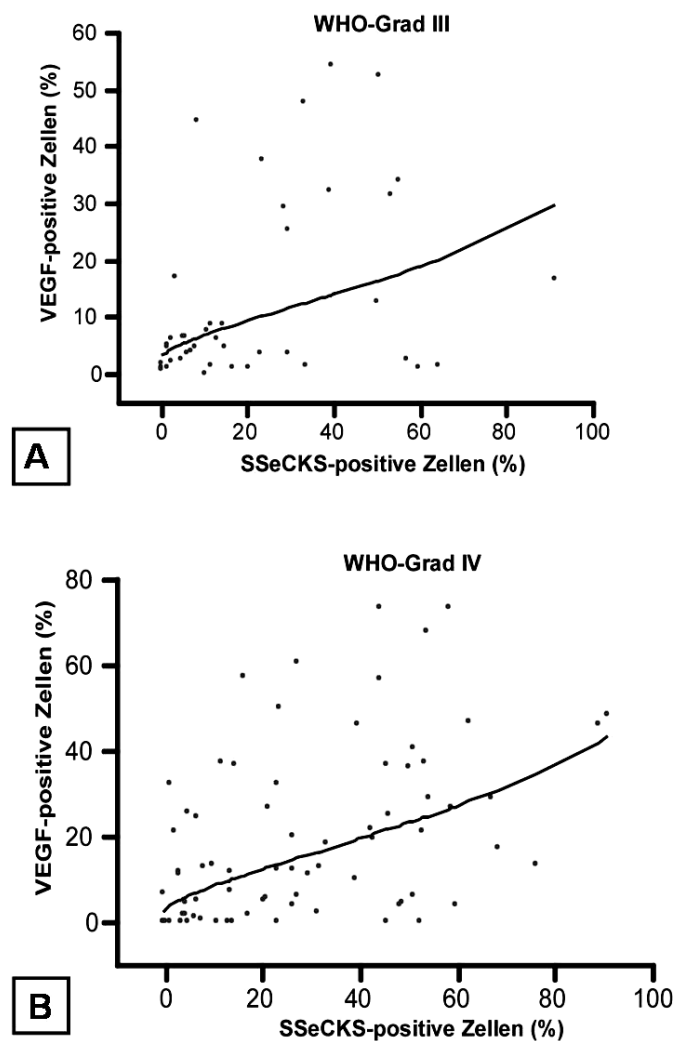


Abb. 22: Korrelation von VEGF und Gravin immunreaktiven Zellen in anaplastischen Astrozytomen (A; $p=0.0109$) bzw. in Glioblastomen (B; $p<0.0001$).

4 DISKUSSION

Zu Beginn soll hier die in dieser Arbeit verwendete TMA-Methode diskutiert werden, da sie von der herkömmlichen immunhistologischen Verarbeitungstechnik deutlich abweicht.

4.1 Vor- und Nachteile der TMA-Methode

Die Vorteile der TMA-Methode im Vergleich mit konventionellen immunhistochemischen Untersuchungsansätzen lassen sich folgenderweise zusammenfassen:

1. Ein erhöhter Probendurchsatz mit allen daraus entstehenden Vorteilen (statistisch validere Aussagen hinsichtlich Expression und eventueller prognostischer Bedeutung unterschiedlicher Biomarker).
2. Es entsteht eine konstante und somit standardisierte Färbequalität, da alle auf einem Objektträger befindlichen Stenzen in *einer* immunhistochemischen Verarbeitung gefärbt werden.
3. Es besteht die Möglichkeit einer mehrmaligen immunhistopathologischen Verarbeitung nahezu identischer Gewebeareale durch Anfertigung serieller TMA-Schnitte (z.B. zur Untersuchung von Koexpressionen einzelner Proteine).
4. Die standardisierte Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Stenzen weist weniger Spielraum für personenspezifische Auswertungsunterschiede auf, und ist somit reliabler als die Auswertung eines konventionellen immunhistologischen Gewebeschnitts.

Die Nachteile der TMA-Methode:

1. Eine heterogene Expressionsrate des zu untersuchenden Biomarkers kann nicht suffizient überprüft werden. Daraus ergibt sich, dass vor allem heterogene Gewebetypen ungünstig für die Bearbeitung mit der TMA-Methode sein können.

2. Das Verfahren ist für diagnostische Zwecke schlecht geeignet, wegen 1.), und weil die morphologisch-histologische Begutachtung an Stanzen von 600 µm Durchmesser nur bedingt möglich ist.
3. Hoher organisatorischer Aufwand.
4. Die bei den Vorteilen unter 2.) genannte konstante Färbung eines Objektträgers und der darauf befindlichen Stanzen, ist eingeschränkt, wenn die Stanzen zu nahe an den Rand des Objektträgers aufgezogen werden, da randständig eine ständige Benetzung des Gewebes mit den Reagenzien in vielen Fällen nicht gewährleistet ist.

4.2 Probleme der Angiogeneseforschung

Die Hemmung der Angiogenese stellt einen vielversprechenden Ansatz in der Tumorthherapie dar. Viele pharmakologisch antiangiogen wirksame Therapieformen wurden bisher in die klinische Forschung überführt, bisher jedoch ohne deutlichen Erfolg (Sivakumar et al., 2004; Ton und Jayson, 2004). Die offensichtliche Komplexität der Regulation der Angiogenese scheint der Suche nach einer Substanz, die die Bildung neuer Blutgefäße spezifisch im Tumor verhindert, entgegenzustehen. Einige Wirkstoffe haben Eingang in die klinische Forschung gefunden oder sind bereits zugelassen. Als Beispiel soll hier Bevacizumab (Avastin[®]) aufgeführt werden. Bevacizumab wurde im Jahr 2004 als erster Angiogenese-Inhibitor zur Behandlung des metastasierten Kolonkarzinoms zugelassen. Es handelt sich um einen rekombinanten, humanisierten, monoklonalen IgG1-kappa-Antikörper, der humanes VEGF bindet und somit die biologische Aktivität von VEGF hemmt.

Das Ziel der pharmakologischen Forschung auf dem Gebiet der Angiogenese-Inhibition ist es, möglichst zielgerichtete Inhibitoren der Angiogenese zu entwickeln, um keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei Patienten zu erzeugen.

In jüngster Zeit wird dieses Konzept der Tumorthherapie durch Angiogenese-Inhibition jedoch partiell in Frage gestellt. Es wurde anhand von Videomikroskopieuntersuchungen gezeigt, dass bestimmte antiangiogene Therapien zwar die Gefäßneubildung im Tumormodell bremsen können, die Perfusion der verbleibenden Gefäße, und damit die Blutversorgung des

Tumors, jedoch besser war als vor der Therapie (Vajkoczy, 2006). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte eine Zunahme von Satellitentumoren nach Antiangiogenesetherapie im Mausmodell (Lamszus et al., 2003).

Eine weitere Entdeckung zeigte Grenzen der therapeutischen Angiogenese-Inhibition, wie sie heute durchgeführt wird, auf: *vasculogenic mimicry* bezeichnet die Bildung von sogenannten *vascular channels* in Tumoren; d.h., es entstehen blutleitende Kanäle im Gewebe ohne Beteiligung von Endothelzellen (Warren, 1966; Folberg und Maniotis, 2004; Yue und Chen, 2005). Endothelzell-spezifische Therapiestrategien versagen hier.

4.3 Allgemeine Ergebnisse

4.3.1 Zellzahl in Astrozytomen und im Normalhirn

Hohe Zelldichte wird bei Astrozytomen als ein wichtiges Malignitätskriterium angesehen (Kleihues und Cavenee, 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen deutlichen Anstieg der Gesamtzellzahl mit dem WHO-Grad. Diese Beobachtung stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Zelldichte in Astrozytomen überein (Kleihues und Cavenee, 2000). Das pilozytische Astrozytom WHO-Grad I stellte sich als tendenziell, jedoch statistisch nicht signifikant, zellreicher als das diffuse Astrozytom WHO-Grad II dar, was auf die Gefäßproliferate in WHO-Grad I Tumoren zurückzuführen sein könnte.

Diese Ergebnisse weisen einerseits auf die Validität der Anwendung der TMA-Methode bei Astrozytomen hin, andererseits auf eine repräsentative Probenauswahl. Zu anderen Arbeiten differierende Ergebnisse hinsichtlich Gesamtzellzahl, begründen sich zumeist in unterschiedlich Schnittdicken (3 μm versus 6 μm) bzw. geringen Fallzahlen.

Problematisch bleibt die Definition der „Infiltrationszone“, die nach morphologischen Kriterien durchgeführt wurde und sicher als eine Art „konstruierte Übergangszone“ anzusehen ist. Sie spielt jedoch bei der Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit eine untergeordnete Rolle und soll deswegen an dieser Stelle nicht weiter besprochen werden.

4.3.2 Gefäßzellzahl und -morphologie in Astrozytomen

Die Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich Gefäßzellzahl pro Gesamtzellzahl spiegeln nicht das bisher in der Literatur bekannte Bild wider. Obwohl das Glioblastom zu den hochvaskularisierten Tumoren gezählt wird (Plate et al., 1994; Machein und Plate, 2000; Abbildung 23, Eberhard et al., 2000), war in den untersuchten Stenzen nicht das Glioblastom, sondern das pilozytische Astrozytom WHO-Grad I der, im Verhältnis zur Gesamtzellzahl, gefäßreichste Tumor (Abbildung 11). Die Auswertung der Gefäßzellzahl pro Fläche ergab ein ähnliches Ergebnis, jedoch weniger deutlich signifikantes Ergebnis. Als prinzipiell mögliche Fehlerquellen für dieses überraschende Ergebnis lassen sich vier Punkte nennen: erstens die Auswahl der Astrozytomgewebeproben, zweitens die Verwendung der TMA-Methode, drittens die Auszählung der Gefäßzellen und viertens die statistische Auswertung. Die Punkte eins, drei und vier entziehen sich meiner Erkenntnis nach jedweder Diskussion (siehe auch Material und Methoden). Die Verwendung der TMA-Methode birgt jedoch, durch das singuläre Betrachten einer ca. 600 µm breiten Stanze, das Risiko, die Heterogenität eines Gewebes nicht ausreichend zu berücksichtigen. Aus diesem Grund ist es bei Verwendung der TMA-Methode unerlässlich, Voruntersuchungen an konventionellen Gewebeschnitten durchzuführen.

Zusätzlich zur Erörterung möglicher Fehlerquellen, lassen sich zwei Gründe für das zur Literatur differierende Ergebnis nennen: Erstens gehören Glioblastome sicherlich zu den sehr heterogenen Tumoren, was ihre Gefäßzelldichte angeht (Burger und Kleihues, 1989; Eberhard et al., 2000). Zweitens untersuchten die verschiedenen Autoren die Gefäßzellen in Glioblastomen und in niedriggradigeren Astrozytomen mit recht verschiedenen Methodiken: einige Autoren zählten Gefäßzellen in den drei gefäßreichsten Arealen der Tumoren (Assimakopoulou et al., 1997); andere Autoren benutzten "microvessel density scores", z. B. von 1+ bis 4+ (Leon et al., 1996). Chaudhry und einige andere Autoren benutzten einen Antikörper gegen vWF, um entstehende Mikrogefäße nicht zu übersehen (Chaudhry et al., 2001). So scheinen also sowohl die Benutzung eines gefäßdetektierenden Antikörpers, als auch die Durchführung der Untersuchungen an konventionellen Gewebeschnitten möglicherweise dazu

zu verleiten, eher den gefäßreichen Zonen Aufmerksamkeit zu schenken und die großen, zellreichen und teilweise gefäßarmen Areale, wie wir sie vielfach in höhergradigen Gliomen beobachten konnten, leicht zu übersehen. Aus diesen Beispielen geht hervor, dass Aussagen über die Gefäßzellzahl in Tumoren trivial erscheinen, es aber keineswegs sind. Insbesondere das Glioblastom mit Gefäßproliferaten einerseits, und zellreichen und gefäßarmen bis -freien Arealen andererseits, birgt diese Gefahr. Eberhard et al. konnten zeigen, dass es sich beim Glioblastom zwar um einen äußerst gefäßreichen malignen Tumor handelt, jedoch mit erheblicher Variationsbreite innerhalb einer Gruppe von 30 untersuchten Glioblastomen (Abbildung 23, Eberhard et al., 2000).

Die Morphologie der Gefäßzellen (Abbildung 12) entsprach in den untersuchten Astrozytomproben den aus der Literatur bekannten Beschreibungen (Kleihues und Cavenee, 2000), was wiederum auf eine repräsentative Gewebeauswahl hinweist.

In pilozytischen Astrozytomen und in Glioblastomen konnten Gefäßproliferate beobachtet werden, wohingegen in diffusen Astrozytomen keine auffälligen Gefäßstrukturen auffielen. In anaplastischen Astrozytomen konnten gelegentlich „aufgestellte Endothelien“ beobachtet werden.

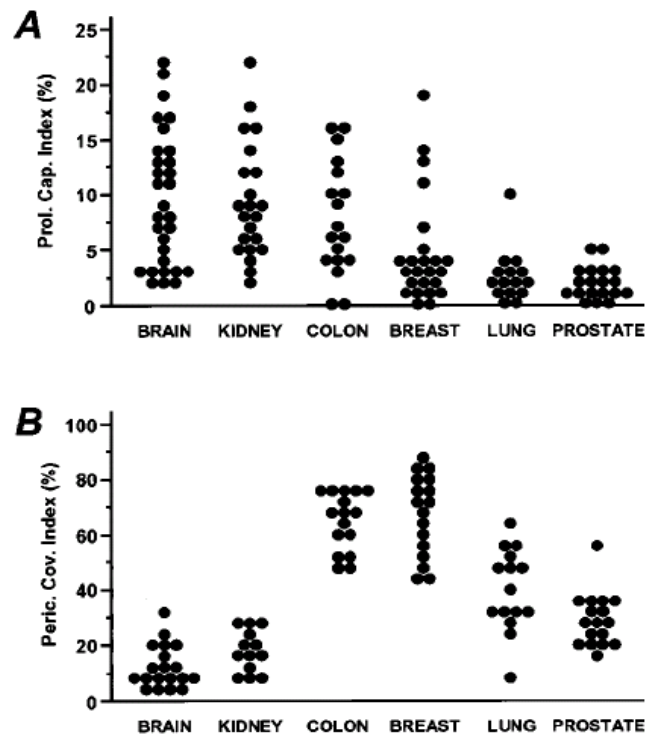


Abb. 23: Abbildung A zeigt die Anzahl von Kapillaren mit proliferierenden Endothelzellen pro Gesamtzahl der gezählten Kapillaren (=Proliferating Capillary Index) in verschiedenen Tumoren.

Abbildung B zeigt die Anzahl von Kapillaren, in deren Wand sowohl Endothelzellen als auch Perizyten immunhistochemisch nachgewiesen werden konnten pro Gesamtkapillanzahl (=Pericyte Coverage Index); (Eberhard et al., 2000).

4.4 Angiogenese in Astrozytomen

4.4.1 VEGF-Expression an konventionellen Gewebeschnitten

Die hohe VEGF-Expression, besonders in den Zellen, die in den perinekrotischen Pseudopalisaden um die strichförmigen Nekrosen liegen, konnte in den Vorversuchen (Abbildung 12), gemäß dem aus der Literatur bekannten Bild, demonstriert werden (Plate et al., 1992; Plate, 1999). Auch die Expression von VEGF in Endothelien konnte auf konventionellen Glioblastomgewebeschnitten gezeigt werden. Dieses Expressionsprofil von VEGF stimmt mit dem in der Literatur beschriebenen überein (Plate et al., 1994; Shweiki et al., 1992). Für die Etablierung des in dieser Arbeit verwendeten Antikörpers wurde dies als ein Hinweis gewertet, dass der verwendete Antikörper zuverlässig VEGF detektiert.

4.4.2. VEGF-Expression in Astrozytomen

Der von vielen Autoren beschriebene Anstieg der VEGF-positiven Zellen in höhergradigen Gliomen (Oehring et al., 1999; Chaudhry et al., 2001; Machein und Plate, 2000; Plate et al., 1994) konnte für die untersuchten Astrozytomgewebeproben nicht bestätigt werden.

Die statistische Auswertung zeigte, dass kein signifikanter Unterschied in der VEGF-Expression zwischen den untersuchten Astrozytomen aller vier WHO-Grade besteht. Ein erhöhter Mittelwert von VEGF-positiven Zellen in Glioblastomen, gegenüber den Mittelwerten der VEGF-positiven Zellen in WHO-Grad I-III Tumoren, ließ sich jedoch feststellen (Abbildung 18). Dies entspricht zumindest tendenziell den Ergebnissen von Plate et al., die einen Anstieg der VEGF-Expression mit dem WHO-Grad in astrozytären Tumoren beschrieben hatten (Plate et al., 1994).

Dennoch könnte auch in diesem Fall das heterogene Expressionsprofil von VEGF in höhergradigen Gliomen einen Einfluss auf das zur Literatur differierende Ergebnis gehabt haben. Zudem wurden die genannten Studien mit vergleichsweise kleinen Fallzahlen durchgeführt (Oehring et al., 1999; Chaudhry et al., 2001; Machein und Plate, 2000; Plate et al., 1994).

Die Normalhirnproben zeigten ebenfalls eine deutliche VEGF-Expression, die interessanterweise in der grauen Substanz im Mittelwert nur um ca. 5% niedriger war als im Glioblastom. Das Expressionsprofil zeigte sich auch im Normalhirn VEGF-typisch, teilweise mit VEGF-positiven Endothelien. Weiterhin ließ sich ein signifikanter Unterschied in der VEGF-Expression zwischen grauer und weißer Substanz zeigen. Die hohe VEGF-Expression in der grauen Substanz ist vereinbar mit der VEGF zugeschriebenen neuroprotektiven Wirkung (Storkebaum und Carmeliet, 2004) und passt in das Bild, das von dem pleiotropen Mitogen VEGF in letzter Zeit gezeichnet wird (Greenberg und Jin, 2005).

Das Ergebnis der ähnlichen Expressionsraten von VEGF in Normalhirn- und in Glioblastomgewebe wirft zusätzlich Fragen hinsichtlich VEGF-inhibierender Therapieoptionen beim Glioblastom auf. So muss anhand dieser Ergebnisse diskutiert werden, ob die möglichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen einer antiangiogenetischen Therapie im Verhältnis zum zu erreichenden Nutzen für den Patienten stehen.

4.4.3 Gravin-Expression in Astrozytomen

Diese Arbeit ist die erste Untersuchung zur Gravin-Expression in Astrozytomen. Deshalb können die Ergebnisse nicht mit bereits bestehenden Untersuchungen verglichen und zur Zusammenschau gebracht werden.

Das Expressionsniveau von Gravin in Normalhirnproben bewegte sich bei ca. 1%. Die in den untersuchten Astrozytomgewebeproben gefundenen hohen Gravin-Expressionsraten verdeutlichen einen grundsätzlichen Unterschied im Proteinexpressionsprofil zwischen normalen und neoplastisch transformierten Astrozyten.

In WHO-Grad I Tumoren war die Gravin-Expression ca. 60-fach höher als in normalem Hirngewebe und statistisch signifikant höher als in den WHO-Grad II-IV Tumoren. Diese starke Gravin-Expression in pilozytischen Astrozytomen kann als Reaktion auf die in pilozytischen Astrozytomen relativ hohe Gefäßzellzahl mit Gefäßproliferaten angesehen werden. Pilozytische Astrozytome imponieren, trotz biologisch vergleichsweise benignem Verhalten,

in der kraniellen Bildgebung durch Kontrastmittelaufnahme, was auf eine Bluthirnschrankenstörung hinweist (Fulham et al., 1993). Jedoch zeigen sie selten infiltratives Wachstum und rufen peritumoral kaum Ödem in gesundem Hirngewebe hervor (Kleihues und Cavenee, 2000).

Da Gravin als tumorsuppressiver Faktor beschrieben ist (Gelman et al., 2000; Xia et al., 2001; Gelman, 2002; Boulwood et al., 2004), könnte die hohe Expressionsrate von Gravin in pilozytischen Astrozytomen mit dem geringen infiltrativen Wachstum dieser Tumoren in Verbindung stehen. Man könnte mutmaßen, dass Gravin eine inhibitorische Funktion in der Migration und Proliferation der malignen Astrozyten hat, wie es beispielsweise für Gravin in anderen Tumorentitäten gezeigt werden konnte (Wasenius et al., 2003). Ein weiterer Hinweis für diese Hypothese ist die bekannte Funktion von Gravin als Regulator zytoskelettaler Proteine (Gelman et al., 2000).

Trotz hoher Expressionsraten von Gravin in pilozytischen Astrozytomen weisen diese Tumoren häufig Bluthirnschrankenstörungen auf. Lee et al. konnten zeigen, dass es sich bei Gravin um einen die Bluthirnschranke abdichtenden Faktor handelt. Warum dies in pilozytischen Astrozytomen dennoch nicht gelingt, könnte nach dem Modell von Lee prinzipiell auch durch eine veränderte oder verminderte Ang-1-Produktion bedingt sein. Ebenso könnten strukturelle Alterationen am Tie-2-Rezeptor, über den Ang-1 seine Wirkung entfaltet, in einer verminderten Wirksamkeit des Liganden resultieren bzw. die Signaltransduktion beeinflussen (Abb. 3, Lee et al., 2003).

Die auch in Glioblastomen deutlich vorhandene Expression von Gravin (Abbildung 13), lässt sich unter Umständen mit der Gemeinsamkeit von Gefäßproliferaten im pilozytischen Astrozytom und im Glioblastom erklären. Gravin scheint vermehrt bei vorhandenen Gefäßproliferaten, möglicherweise reaktiv, von Astrozyten exprimiert zu werden. Man kann annehmen, dass Gravin in den proliferierenden Endothelien die Bluthirnschranke durch Induktion von tight junctions aufrecht erhalten soll, wie es von Lee et al. (Lee et al 2003) propagiert wurde. Dies misslingt jedoch offensichtlich, sowohl in Glioblastomen als auch in pilozytischen Astrozytomen, was die in der Bildgebung typische

Bluthirnschrankenstörung dieser Tumoren beweist (Fulham et al., 1993; Kleihues und Cavenee, 2000).

Andererseits ist es jedoch wahrscheinlich, dass verschiedene Mechanismen zur Bluthirnschrankenstörung im pilozytischen Astrozytom und im Glioblastom führen.

Von einem tumorsuppressivem Aspekt kann bei den teilweise stark Gravin exprimierenden Glioblastomproben nur bedingt ausgegangen werden.

Die statistisch signifikante Hochregulation von Gravin im Tumor, verglichen mit der vorher definierten Infiltrationszone desselben Patienten, spricht jedoch für eine Rolle in der Regulation tumorspezifischer Regelkreise. Diese These wird unterstützt durch die ca. 20-fach niedrigere Expression von Gravin im Normalhirn. Unterschiede in der Gravin-Expression, wie sie von Siegel et al. (Siegel et al., 2002) beschrieben wurden, konnten in den hier untersuchten Normalhirnproben zwischen grauer und weißer Substanz nicht festgestellt werden (Abbildung 16).

Der, verglichen mit WHO-Grad II-IV Tumoren, circa doppelt so hohe Mittelwert Gravin-positiver Zellen in pilozytischen Astrozytomen, ist insofern interessant, als dass es sich beim pilozytischen Astrozytom um einen, im biologischen Verhalten wie auch genetisch, von den Astrozytomen WHO-Grad II-IV deutlich unterschiedlichen Tumor handelt. Ob es sich bei der erhöhten Gravin-Expression in pilozytischen Astrozytomen um ein intrinsisches Phänomen dieses Tumors handelt, kann mit dieser Arbeit nicht beantwortet werden, stellt sich jedoch als Frage an weitere Arbeiten.

4.4.4 Korrelation der Expressionsraten beider Antikörper

Sowohl die Gravin-, als auch die VEGF-Expression zeigten eine deutliche positive Korrelation in anaplastischen Astrozytomen und in Glioblastomen. Dieses Ergebnis ist sicherlich zum einen Ausdruck der massiv gestörten Angiogeneseregulation in diesen Tumoren; zum anderen stimmt es jedoch auch mit der Beobachtung überein, dass höhergradige Gliome ein besonders breites Proteinexpressionsprofil aufweisen. Die Koexpression könnte jedoch auch als ein Hinweis auf gemeinsame Regulationsmoleküle von VEGF und

Gravin bzw. auf die Verknüpfung von Regelkreisen verstanden werden. Interessanterweise liegen die Gene von VEGF und Gravin beide auf Chromosom 6. Ob diese Koinzidenz jedoch in Zusammenhang mit der Regulation beider Faktoren steht bleibt fraglich, da die beiden Gene auf verschiedenen Armen des Chromosoms 6 liegen: das VEGF-A-Gen des Menschen befindet sich auf Chromosom 6p21.3 (Tischer et al., 1991; Houck et al., 1991; Poltorak et al., 1997), das für Gravin codierende Gen liegt auf Chromosom 6q24-25.2 (Fujii et al. 1996; Theile et al. 1996).

Die positive Korrelation der Gravin- und VEGF-Expression ist ein mittelbarer Widerspruch zur erst kürzlich veröffentlichten Arbeit von Su et al., in der eine Suppression der VEGF-Expression in Prostatakrebszellen durch Gravin beschrieben wurde (Su et al., 2006). In anaplastischen Astrozytomen und in Glioblastomen mit jeweils positiver Gravin-VEGF-Korrelation stellt sich die Frage nach Ursache und Wirkung. Wird im Tumor wegen erhöhter VEGF-Level Gravin reaktiv gebildet, oder wird Gravin unabhängig gebildet und kann jedoch seine tumorsuppressive Wirkung wegen überwiegender VEGF-Synthese in höhergradig malignen Gliomen nicht ausüben? Diese Frage kann mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode nicht beantwortet werden, könnte jedoch eine Fragestellung zukünftiger Arbeiten, beispielsweise als Zellkulturexperiment, darstellen.

4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Wichtige Schlussfolgerungen und Anregungen für zukünftige Untersuchungen, die aus dieser Arbeit hervorgehen, sind:

- 1) Die TMA-Methode ist prinzipiell auch für heterogene Tumore, wie z. B. das Glioblastom, als immunhistochemische Screeningmethoden geeignet.
- 2) Die erste Expressionsstudie von Gravin an Astrozytomen zeigte hohe Expressionsraten in pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I, passend zu den tumorsuppressiven Eigenschaften dieses Faktors.
- 3) Der, in der Literatur beschriebene graduelle Anstieg der VEGF-Expression mit dem WHO-Tumorgrad in Astrozytomen konnte nicht nachvollzogen werden.
- 4) Die Normalhirnproben zeigten ebenfalls eine deutliche VEGF-Expression, die in der grauen Substanz im Mittelwert nur um ca. 5% niedriger war als im Glioblastom, was eine antiangiogene Therapie wegen möglicher Nebenwirkungen fragwürdig erscheinen lässt.
- 5) Die hohe positive Korrelation der Gravin- und VEGF-Expression in WHO-Grad III und WHO-Grad IV Astrozytomen, wirft die Frage nach möglicher gemeinsamer Regulationsmoleküle auf. Weitere molekularbiologische Untersuchungen könnten in Zukunft Erkenntnisse in diese Richtung liefern.
- 6) Die hohe positive Korrelation der Gravin- und VEGF-Expression in WHO-Grad III und WHO-Grad IV Astrozytomen könnte jedoch auch als Gegenregulationsmechanismus gedeutet werden mit beispielsweise tumorintrinsic hohem Gravin und konsekutiver VEGF-Hochregulation bzw. vice versa.
- 7) Gravin kann seine Funktion als ein die Bluthirnschranke abdichtender Faktor in pilozytischen Astrozytomen und in Glioblastomen trotz teilweise hoher Expression nicht ausüben.
- 8) Woran liegt dieser verloren gegangene Einfluss von Gravin auf die Bluthirnschranke?
- 9) Wird Gravin reaktiv in höhergradigen Gliomen und intrinsic im pilozytischen Astrozytom gebildet?

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Angiogenese spielt in der Pathophysiologie vieler Krankheiten eine entscheidende Rolle. Astrozytome stellen die häufigsten hirneigenen Tumore dar und haben v. a. im Fall des Glioblastoms eine schlechte Prognose mit mittleren Überlebenszeiten von ca. einem Jahr. Die Hauptaufgabe dieser Arbeit war es, die Expression zweier auf die Angiogenese antagonistisch einwirkender Faktoren in 194 Astrozytomen aller vier WHO-Grade und in 23 Normalhirnproben zu untersuchen, um so Faktoren mit möglicher diagnostischer oder therapeutischer Relevanz hinsichtlich ihres Expressionsprofils im „Zielgewebe“ näher zu charakterisieren. Die Datenlage für die beiden untersuchten Faktoren bezüglich ihrer Expression in Gehirntumoren war diametral. Während VEGF zu den bestuntersuchtesten Regulatoren der Angiogenese gehört, und auch in Hirngewebe und –tumoren gut untersucht ist, war zur Zeit der Fertigstellung dieser Arbeit zu Gravin in Astrozytomen noch keine Veröffentlichung bekannt.

In den untersuchten Gewebeproben wurden verschiedene Bereiche definiert, wie z.B. eine Tumorregion und eine Infiltrationszone desselben Tumors. In dieser Arbeit wurden die beiden Faktoren mit immunhistochemischen Methoden untersucht. Die TMA-Methode wurde verwendet, um einerseits die Vorteile dieser Methode zu nutzen (s. 4.1) und andererseits, um die Validität der Methode selbst bei der Verarbeitung von Hirngewebe zu überprüfen.

Die statistische Auswertung ergab für den als antiangiogen beschriebenen Faktor Gravin eine hohe Expression in pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I. Da dieser Tumor die beste Prognose der untersuchten Astrozytome besitzt und kaum infiltratives Wachstum *in vivo* zeigt, passt dieses Ergebnis gut in das Bild des mehrfach als tumorsuppressiv beschriebenen Faktors Gravin.

In Glioblastomen zeigten sich signifikant mehr Gravin-gefärbte Zellen in der Tumorregion als in der vorher definierten Infiltrationszone, was entweder als Ausdruck eines reaktiven Gegenregulationsphänomens zu deuten ist, oder für eine gestörtes Expressionsprofil im hochmalignen Glioblastom sprechen könnte.

Für VEGF konnte das in der Literatur beschriebene Bild der vermehrten VEGF-Expression bei steigendem WHO-Grad nicht bzw. nur annäherungsweise reproduziert werden. In Normalhirnproben zeigte sich eine stärkere VEGF-Expression in der grauen Substanz als in der weißen. Die VEGF-Expressionslevel waren im Glioblastom nur um ca. 5% höher als in der grauen Substanz der Normalhirnproben, was den Versuch einer Anti-VEGF-Therapie bei Astrozytomen, wegen möglicher unerwünschter Nebenwirkungen auf gesundes ZNS, fragwürdig erscheinen lässt.

VEGF und Gravin zeigten sich in anaplastischen Astrozytomen signifikant und in Glioblastomen hochsignifikant positiv korreliert. Hier stellt sich die Frage, ob und wenn ja, wie sich die beiden Faktoren gegenseitig regulieren. Jedoch korrelierte überraschenderweise keiner der beiden untersuchten Angiogenesefaktoren mit der Gefäßzellichte.

Diese, teilweise unvorhersehbaren, Ergebnisse demonstrieren die Unabdingbarkeit immunhistochemischer Forschung an menschlichem Tumor- und Normalgewebe.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abounader R, Laterra J. 2005. Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis. *Neuro-oncol*, 7:436-51.
2. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. 1998. VEGF-D is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:548-53.
3. Algire GH, Chalkley HW, Legallais FY, Park HD. 1945. Vascular reactions of normal and malignant tissue in vivo. *J Natl Cancer Inst*, 6:73-85.
4. Anderson KC. 2001. Targeted therapy for multiple myeloma. *Semin Hematol*, 38:286-294.
5. Assimakopoulou M, Sotiropoulou-Bonikou G, Maraziotis T, Papadakis N, Varakis I. 1997. Microvessel density in brain tumors. *Anticancer Res*, 17:4747-53.
6. Ausprunk DH, Folkman J. 1977. Migration and proliferation of endothelial cells in performed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular Res*, 14(1):53-65.
7. Auvinen M, Laine A, Paasinen-Sohns A, Kangas A, Kangas L, Saksela O, Andersson LC, Holtta E. 1997. Human ornithine decarboxylase overproducing NIH3T3 cells induce rapidly growing, highly vascularized tumors in nude mice. *Cancer Res*, 57:3016-3025.
8. Badet J. 1999. Angiogenin, a potent mediator of angiogenesis. Biological, biochemical and structural properties. *Pathol Biol (Paris)*, 47:345-51.
9. Bagnato A, Spinella F. 2003. Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 14(1):44-50.
10. Bar RS, Boes M, Dake BL, Booth BA, Henley SA, Sandra A. 1988. Insulin, insulin-like growth factors, and vascular endothelium. *Am J Med*, 85:59-70.
11. Bein K, Ware JA, Simons M. 1998. Myb-dependent regulation of thrombospondin 2 expression. Role of mRNA stability. *J Biol Chem*, 273:21423-21429.
12. Benelli R, Morini M, Brigati C, Noonan DM, Albini A. 2003. Angiostatin inhibits extracellular HIV-Tat-induced inflammatory angiogenesis. *Int J Oncol*, 22(1):87-91.
13. Bergers G, Benjamin LE. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3(6):401-410.
14. Bobrovnikova-Marjon EV, Marjon PL, Barbash O, Vander Jagt DL, Abcouwer SF. 2004. Expression of angiogenic factors VEGF and IL-8/CXCL8 is highly responsive to ambient glutamine availability: role of nuclear factor kappaB and activating protein-1. *Cancer Res*, 64:4858-69.
15. Boulwood J, Pellagatti A, Watkins F, Campbell LJ, Esoof N, Cross NC, Eagleton H, Littlewood TJ, Fidler C, Wainscoat JS. 2004. Low expression of the putative tumour suppressor gene gravin in chronic myeloid leukaemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 126:508-11.

16. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. 2005. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncol*, 7:122-33.
17. Brown NS, Bicknell R. 1998. Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-d-ribose and angiogenesis. *Biochem J*, 334:1-8.
18. Burger PC, Kleihues P. 1989. Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implications for evaluation of needle biopsies. *Cancer*, 63:2014-2023.
19. Bussolino F, Colotta F, Bocchietto E, Guglielmetti A, Mantovani A. 1993. Recent developments in the cell biology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor: activities on endothelial cells. *Int J Clin Lab Res*, 23:8-12.
20. Bussolino F, Albini A, Camussi G, Presta M, Viglietto G, Ziche M, Persico G. 1996. Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur J Cancer*, 32A:2401-12.
21. Cao Y. 1999. Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer. *Haematologica*, 84:643-50.
22. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsensien 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*, 380:435-439.
23. Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6 (4):389-395.
24. Carmeliet P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9(6):653-660.
25. Cerimele F, Brown LF, Bravo F, Ihler GM, Kouadio P, Arbisier JL. 2003. Infectious angiogenesis: *Bartonella bacilliformis* infection results in endothelial production of angiopoietin-2 and epidermal production of vascular endothelial growth factor. *Am J Pathol*, 163(4):1321-7.
26. Chang CY, Li MC, Liao SL, Huang YL, Shen CC, Pan HC. 2005. Prognostic and clinical implication of IL-6 expression in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci*, 12:930-3.
27. Chaudhry IH, O'Donovan DG, Brenchley PE, Reid H, Roberts IS. 2001. VEGF expression correlates with tumour grade and vascularity in gliomas. *Histopathology*, 39:409-15.
28. Chiarugi V, Magnelli L, Gallo O. 1998. Cox-2, iNOS and p53 as playmakers of tumor angiogenesis. *Int J Mol Med*, 2:715-9.
29. Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Ziche M, Bicknell R. 1997. An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res*, 57:1814-19.
30. Claffey KP, Shih S-C, Mullen A, Dziennis S, Cusick JL, Abrams KR, Lee SW, Detmar M. 1998. Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Mol Biol Cell*, 9:469-481.
31. Coats SR, Covington JW, Su M, Pabon-Pena LM, Eren M, Hao Q, Vaughan DE. 2000. SSeCKS gene expression in vascular smooth muscle

- cells: regulation by angiotensin II and a potential role in the regulation of PAI-1 gene expression. *J Mol Cardiol*, 32:2207-19.
32. Cooke JP. 2006. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of angiogenesis. *Eur J Clin Pharmacol*, 62 Suppl 13:115-21.
 33. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. 1994. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91:4082-4085.
 34. Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., Bouck, N. 1994..Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*, 265:1582–1584.
 35. Damert A, Machein M, Breier G, Fujita MQ, Hanahan D, Risau W, Plate KH. 1997. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression in a rat glioma is conferred by two distinct hypoxia-driven mechanisms. *Cancer Res*, 57:3860-3864.
 36. Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ. 1999. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res*, 59:4574–7.
 37. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. 1999. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*, 285:245–8.
 38. De Falco S, Gigante B, Persico MG. 2002. Structure and function of placental growth factor. *Trends Cardiovasc Med*, 12(6):241-6.
 39. Dentelli P, Del Sorbo L, Rosso A, Molinar A, Garbarino G, Camussi G, Pegoraro L, Brizzi MF. 1999. Human IL-3 stimulates endothelial cell motility and promotes in vivo new vessel formation. *J Immunol*, 163:2151–2159.
 40. Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C, Bajou K, Masson V, Gerard RD, Gils A, Carmeliet G, Carmeliet P, Declerck PJ, Noel A, Foidart JM. 2002. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J*, 16:147-154.
 41. Dhanabal M, Jeffers M, LaRochelle WJ, Lichenstein HS. 2005. Angioarrestin: a unique angiopoietin-related protein with anti-angiogenic properties. *Biochem Biophys Res Commun*, 333:308-15.
 42. Diaz BV, Lenoir MC, Ladoux A, Frelin C, Demarchez M, Michel S. 2000. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J Biol Chem*, 275:642–50.
 43. Dinney CPN, Bielenberg DR, Perrotte P, Reich R, Eve BY, Bucana CD, Fidler IJ. 1998. Inhibition of basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis, and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic interferon-alpha administration. *Cancer Res*, 58:808-814.
 44. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. 2000. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res*, 60:1388-93.
 45. Ellison D, Love S, Chimelli L, Harding BN, Lowe J, Vinters HV. 2004. *Neuropathology – A reference text of CNS pathology*. Mosby, second edition.

46. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. 1998. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol*, 140(4):947-959.
47. Feldkamp MM, Lau N, Rak J, Kerbel RS, Guha A. 1999. Normoxic and hypoxic regulation of VEGF by astrocytoma cells is mediated by Ras. *Int J Cancer*, 81:118-124.
48. Fernandez A, Udgawa T, Schwesinger C, Beecken W, Achilles-Gerte E, McDonnell T, D'Amato R. 2001. Angiogenic potential of prostate carcinoma cells overexpressing bcl-2. *J Natl Cancer Inst*, 93:208-13.
49. Ferrara N, Henzel WJ. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161:851-58.
50. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. 1998. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med*, 4:336-40.
51. Ferrara N, Alitalo K. 1999 a. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med*, 5:1359-64.
52. Ferrara N. 1999 b. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol*, 237:1-30.
53. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9:669-76.
54. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, Gale NW, Witzernath M, Rosseau S, Suttorp N, Sobke A, Herrmann M, Preissner KT, Vajkoczy P, Augustin HG. 2006. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med*, 12:235-9.
55. Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. 2005. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol*, 15:297-310.
56. Folberg R, Maniotis AJ. 2004 Vasculogenic mimicry. *APMIS*, 112:508-25.
57. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. 1971 a. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*, 133(2):275-288.
58. Folkman J. 1971 b. Tumour angiogenesis: Therapeutic implications. *NEJM*, 285:1182-1186.
59. Folkman J. 1992. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol*, 3(2):65-71.
60. Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1:27-31.
61. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani f, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 16:4604-13.
62. Fruhbeck G. 2006. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J*, 393:7-20.
63. Fu X, Roberts WG, Nobile V, Shapiro R, Kamps MP. 1999. mAngiogenin-3, a target of oncoprotein E2a-Pbx1, encodes a new angiogenic member of the angiogenin family. *Growth Factors*, 17:125-137.

64. Fulham MJ, Melisi JW, Nishimiya J, Dwyer AJ, Di Chiro G. 1993. Neuroimaging of juvenile pilocytic astrocytomas: an enigma. *Radiology*, 189:221-5.
65. Fujii H, Zhou W, Gabrielson E. 1996. Detection of frequent allelic loss of 6q23-q25.2 in microdissected human breast cancer tissues. *Genes Chromosomes Cancer*, 16:35-9.
66. Furuwatari, C., Yagi A, Yamagami O, Ishikawa M, Hidaka E, Ueno I, Furihata K, Ogiso Y, Katasuyama T. 1998. A comprehensive system to explore p53 mutations. *Am J Clin Pathol*, 110, 368–373.
67. Gelati M, Corsini E, Frigerio S, Pollo B, Broggi G, Croci D, Silvani A, Boiardi A, Salmaggi A. 2003. Effects of thalidomide on parameters involved in angiogenesis: an in vitro study. *J Neurooncol*, 64:193-201.
68. Gelman IH, Tomblor E, Vargas J Jr.. 2000. A role for SSeCKS, a major protein kinase C substrate with tumour suppressor activity, in cytoskeletal architecture, formation of migratory processes, and cell migration during embryogenesis. *Histochem J*, 32:13-26.
69. Gelman IH. 2002. The role of SSeCKS/gravin/AKAP12 scaffolding proteins in the spatiotemporal control of signaling pathways in oncogenesis and development. *Front Biosci*, 7:1782-97.
70. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. 1997. Differential transcriptional regulation of the two VEGF receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*, 272:23659-67.
71. Goldman E. 1907. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet*, ii:1236-1240.
72. Goldman JE, Corbin E. 1991. Rosenthal fibres contain ubiquitinated alpha B-crystallin. *Am J Pathol*, 139: 933-938.
73. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 74:111–122.
74. Gordon T, Grove B, Loftus JC, O'Toole T, McMillan R, Lindstrom J, Ginsberg MH. 1992. Molecular cloning and preliminary characterization of a novel cytoplasmic antigen recognized by myasthenia gravis sera. *J Clin Invest*, 90:992-9.
75. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. 2002. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J*, 21:1743-53.
76. Greenberg DA, Jin K. 2005. From angiogenesis to neuropathology. *Nature*, 438:954-9.
77. Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, Barleon B, Marme D. 1995. Both v-Ha-ras and v-raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem*, 270:25915–25919.
78. Grzelinski M, Bader N, Czubyko F, Aigner A. 2005. Ribozyme-targeting reveals the rate-limiting role of pleiotrophin in glioblastoma. *Int J Cancer*, 117:942-51.
79. Gullino PM. 1995. Prostaglandins and gangliosides of tumor microenvironment: their role in angiogenesis. *Acta Oncol*, 34:439–41.

80. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M. 2005. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*. 9(5):617-28.
81. Hanahan D, Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86:353-364.
82. Hanahan D. 1998. A flanking attack on cancer. *Nat Med*, 4:13-4.
83. Hayes AJ, Huang WQ, Mallah J, Yang D, Lippman ME, Li LY. 1999. Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc Res*, 58:224-37.
84. Hayostek CJ, Shaw EG, Scheithauer B, O'Fallon JR, Weiland TL, Schomberg PJ, Kelly PJ, Hu TC. 1993. Astrocytomas of the cerebellum. A comparative clinicopathologic study of pilocytic and diffuse astrocytomas. *Cancer*, 72: 856-869.
85. Heaney AP, Horwitz GA, Wang Z, Singson R, Melmed S. 1999. Early involvement of estrogen-inducing pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis. *Nature Med*, 5:317-1321.
86. Heldin CH, Westermark B. 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, 79:1283-316.
87. Hertig AT. 1935. Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contrib Embryol*, 25:39-81.
88. Herzog Y, Kalcheim C, Kahane N, Reshef R, Neufeld G. 2001. Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech Dev*, 109:115-119.
89. Hicklin DJ, Ellis LM. 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 23:1011-27.
90. Ho HK, Jang JJ, Kaji S, Spektor G, Fong A, Yang P, Hu BS, Schatzman R, Quertermous T, Cooke JP. 2004. Developmental endothelial locus-1 (Del-1), a novel angiogenic protein: its role in ischemia. *Circulation*, 109:1314-19.
91. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. 1998. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol*, 274:H1054-8.
92. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. 1991. The VEGF family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*, 5:1806-14.
93. Hoyt WF, Baghdassarian SA. 1969. Optic glioma of childhood. Natural history and rationale for conservative management. *Br J Ophthalmol*, 53:793-798.
94. Hsu SM, Raine L. 1981. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 29(11):1349-53.
95. Huang H, Campbell SC, Nelius T, Bedford DF, Veliceasa D, Bouck NP, Volpert OV. 2004. Alpha1-antitrypsin inhibits angiogenesis and tumor growth. *Int J Cancer*, 112(6):1042-8.
96. Hunter J. 1787. *Lectures of the Principles of Surgery. The Works of John Hunter. Vol I*, J. Palmer (editor).

97. Hyder SM, Stancel GM. 1999. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol Endocrinol*, 13:806–11.
98. Ide AG, Baker NH, Warren SL. 1939. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentgenol*, 42:891-9.
99. Ilgren EB, Stiller CA. 1987. Cerebellar astrocytomas. Part I. Macroscopic and microscopic features. *Clin Neuropathol*, 6:185-200.
100. Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG. 1995. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med*, 1:822–6.
101. Irrthum A, Karkkainen MJ, Devriendt K, Alitalo K, Vikkula M. 2000. Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase. *Am J Hum Genet*, 67:295-301.
102. Iruela-Arispe ML, Dvorak HF. 1997. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost*, 78:672–7.
103. Isner JM, Losordo DW. 1999. Therapeutic angiogenesis for heart failure. *Nat Med*, 5:491-2.
104. Jackson D, Volpert OV, Bouck N, Linzer DI. 1994. Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin related protein. *Science*, 266:1581–4.
105. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. 1997. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J*, 11:457–65.
106. Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M, Vogt PK. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:1749–1753.
107. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Beitman M, Alitalo K. 1995. Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:3566-70.
108. Karkkainen M, Makinen T, Alitalo K. 2002. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol*, 4:E2-E5.
109. Karl E, Warner K, Zeitlin B, Kaneko T, Wurtzel L, Jin T, Chang J, Wang S, Wang CY, Strieter RM, Nunez G, Polverini PJ, Nor JE. 2005. Bcl-2 acts in a proangiogenic signaling pathway through nuclear factor-kappaB and CXC chemokines. *Cancer Res*, 65:5063-9.
110. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H. 1999. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*, 126:4895-902.
111. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. 1989. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, 246:1309-1312.
112. Kini AR, Peterson LA, Tallman MS, Lingen MW. 2001. Angiogenesis in acute promyelocytic leukemia: induction by VEGF and inhibition by all-trans retinoic acid. *Blood*, 97:3919-3924.
113. Kitamura H, Okita K, Fujikura D, Mori K, Iwanaga T, Saito M. 2002. Induction of SSeCKS in vascular endothelial cells by bacterial lipopolysaccharide. *J Histochem Cytochem*, 50:245-55.

114. Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R. 2002. The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv Exp Med Biol*, 515:33-48.
115. Kleihues P, Cavenee WK. Editors. 2000. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. IARC Press, Lyon, France, 1:9-54.
116. Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W. 1998. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol*, 8:529-32.
117. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel DL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM. 1992. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 258(5089):1798-1801.
118. Koch AE, Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ. 1995. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature*, 376:517-9.
119. Koch AE. 1998. Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 41:951-62.
120. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. 1998. Tissue micro arrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4(7):844-7.
121. Konstantinova I, Lammert E. 2004. Microvascular development: learning from pancreatic islets. *Bioessays*, 26(10):1069-75.
122. Kostourou V, Robinson SP, Cartwright JE, Whitley GS. 2002. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase I enhances tumour growth and angiogenesis. *Br J Cancer*, 87:673-80.
123. Kozian DH, Ziche M, Augustin HG. 1997. The activin-binding protein follistatin regulates autocrine endothelial cell activity and induces angiogenesis. *Lab Invest*, 76:267-76.
124. Krampera M, Pasini A, Rigo A, Scupoli MT, Tecchio C, Malpeli G, Scarpa A, Dazzi F, Pizzolo G, Vinante F. 2005. HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood*, 106:59-66.
125. Kroll J, Waltenberger J. 1998. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun.*, 252:743-6.
126. Kunz M, Ibrahim SM. 2003. Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Mol Cancer*, 2:23
127. Kuroda T, Kitadai Y, Tanaka S, Yang X, Mukaida N, Yoshihara M, Chayama K. 2005. Monocyte chemoattractant protein-1 transfection induces angiogenesis and tumorigenesis of gastric carcinoma in nude mice via macrophage recruitment. *Clin Cancer Res*, 11:7629-36.
128. Lamszus K, Kunkel P, Westphal M. 2003. Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy. *Acta Neurochir Suppl*, 88:169-77.
129. Lantos PL, Louis DN, Rosenblum MK, Kleihues P. 2002. Tumours of the nervous system. *Greenfield's Neuropathology*. Seventh edition. Edited by Graham DI, Lantos PL, 11:767-1052.
130. Lay Y, Schneider D, Kieszun A, Hauck-Schmalenberger I, Breier G, Brandhorst D, Brandhorst K, Iken M, Brendel MD, Bretzel RG, Linn T.

2005. Vascular endothelial growth factor increases functional beta-cell mass by improvement of angiogenesis of isolated human and murine pancreatic islets. *Transplantation*, 79(11):1530-6.
131. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P. 2005. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res*, 65:599-608.
132. Le Buanec H, D'Anna R, Lachgar A, Zagury JF, Bernard J, Ittele D, d'Alessio P, Hallez S, Giannouli C, Burny A, Bizzini B, Gallo RC, Zagury D. 1999. HPV-16 E7 but not E6 oncogenic protein triggers both cellular immunosuppression and angiogenic processes. *Biomed Pharmacother*, 53:424-531.
133. Lee SW, Kim WJ, Choi YK, Song HS, Son MJ, Gelman IH, Kim YJ, Kim KW. 2003. SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med*, 9:900-6.
134. Leon SP, Folkerth RD, Black PM. 1996. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer*, 77:362-72.
135. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246:1306-1309.
136. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. 2004. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*, 350:672-83.
137. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. 2001. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*, 61:253-270.
138. Lin X, Nelson PJ, Frankfort B, Tomblor E, Johnson R, Gelman IH. 1995. Isolation and characterization of a novel mitogenic regulatory gene, 322, which is transcriptionally suppressed in cells transformed by src and ras. *Mol Cell Biol*, 15:2754-62.
139. Lin X., Tomblor E, Nelson PJ, Ross M, Gelman IH. 1996. A novel src- and ras-suppressed protein kinase C substrate associated with cytoskeletal architecture. *J Biol Chem*, 271:28430-8.
140. Lin X, Nelson P, Gelman IH. 2000. SSeCKS, a major protein kinase C substrate with tumor suppressor activity, regulates G(1)-->S progression by controlling the expression and cellular compartmentalization of cyclin D. *Mol Cell Biol*, 20:7259-72.
141. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*, 77:638-643.
142. Loeffler S, Fayard B, Weis J, Weissenberger J. 2005. Interleukin-6 induces transcriptional activation of VEGF in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int J Cancer*, 115:202-23.
143. Lopez-Ocejo O, Vilorio-Petit A, Bequet-Romero M, Mukhopadhyay D, Rak J, Kerbel RS. 2000. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene*, 19:4611-4620.

144. Machein MR, Plate KH. 2000. VEGF in brain tumors. *J Neurooncol*, 50:109-20.
145. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277:55–60.
146. Maldaun MV, Suki D, Lang FF, Prabhu S, Shi W, Fuller GN, Wildrick DM, Sawaya R. 2004. Cystic glioblastoma multiforme: survival outcomes in 22 cases. *J Neurosurg*, 100:61-7.
147. Manfredi MG, Lim S, Claffey KP, Seyfried TN. 1999. Gangliosides influence angiogenesis in an experimental mouse brain tumor. *Cancer Res*, 59:5392-7.
148. Marconcini L, Marchio S, Morbidelli L, Cartocci E, Albini A, Ziche M, Bussolino F, Oliviero S. 1999. C-fos-induced growth factor/VEGF D induces angiogenesis in vivo and vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:9671-9676.
149. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. 2001. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*, 112:RE21.
150. McBride WG. 1977. Thalidomide embryopathy. *Teratology*, 16:79-82.
151. McGirr SJ, Kelly PJ, Scheithauer BW. 1987. Stereotactic resection of juvenile pilocytic astrocytomas of the thalamus and basal ganglia. *Neurosurgery*, 20: 447-452.
152. McGregor LM., McCune BK, Graff JR, McDowell PR, Romans KE, Yancopoulos GD, Ball DW, Baylin SB, Nelkin BD. 1999. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:4540-4545.
153. McKinnon H, Gherardi E, Reidy M, Bowyer D. 2006. Hepatocyte growth factor/scatter factor and MET are involved in arterial repair and atherogenesis. *Am J Pathol*, 168:340-8.
154. Meitar D, Crawford SE, Rademaker AW, Cohn SL. 1995. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 14:405–414.
155. Mitola S, Soldi R, Zanon I, Barra L, Gutierrez MI, Berkhout B, Giacca M, Bussolino F. 2000. Identification of specific molecular structures of human immunodeficiency virus type 1 Tat relevant for its biological effects on vascular endothelial cells. *J Virol*, 74:344-53.
156. Mizukami Y, Fujiki K, Duerr EM, Gala M, Jo WS, Zhang X, Chung DC. 2006. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor through the induction of PI3K/Rho/ROCK and c-Myc. *J Biol Chem*, 281:13957-63.
157. Moore BB, Keane MP, Addison CL, Arenberg DA, Strieter RM. 1998. CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family. *J Investig Med*, 46:113–20.
158. Moses MA, Wiederschain D, Wu I, Fernandez CA, Ghazizadeh V, Lane WS, Flynn E, Sytkowski A, Tao T, Langer R. 1999. Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:2645–50.

159. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP. 1995 a. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res*, 55:6161–6165.
160. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Zhou XM, Foster D, Brugge JS, Sukhatme VP. 1995 b. Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature*, 375:577–581.
161. Nakao S, Kuwano T, Tsutsumi-Miyahara C, Ueda S, Kimura YN, Hamano S, Sonoda KH, Saijo Y, Nukiwa T, Strieter RM, Ishibashi T, Kuwano M, Ono M. 2005. Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularisation and tumor growth. *J Clin Invest*, 115:2979-91.
162. Nauck M, Karakiulakis G, Perruchoud AP, Papakonstantinou E, Roth M. 1998. Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, 341:309-315.
163. Nauert JB, Klauck TM, Langeberg LK, Scott JD. 1997. Gravin, an autoantigen recognized by serum from myasthenia gravis patients, is a scaffold protein. *Curr Biol*, 7:52-62.
164. Nelson PJ, Moissoglu K, Vargas J, Klotman PE, Gelman IH. 1999. Involvement of the protein kinase C substrate, SSeCKS, in the actin-based stellate morphology of mesangial cells. *J Cell Sci*, 112:361-70.
165. Nemoto T, Hori H, Yoshimoto M, Seyama Y, Kubota S. 2002. Overexpression of onithine decarboxylase enhances endothelial proliferation by suppressing endostatin expression. *Blood*, 99:1478-81.
166. Nguyen M, Strubel NA, Bischoff J. 1993. A role for sialyl Lewis-X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis. *Nature*, 365: 267–9.
167. Nuefeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB*, 13:9-22.
168. Oehring RD, Miletic M, Valter MM, Pietsch T, Neumann J, Fimmers R, Schlegel U. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytic gliomas-a prognostic factor? *J Neurooncol*, 45:117-25.
169. Ohgaki H, Eibl RH, Schwab M, Reichel MB, Mariani L, Gehring M, Petersen I, Holl T, Wiestler OD, Kleihues P. 1993. Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. *Mol Carcinog*, 8:74-80.
170. Ohgaki H, Kleihues P. 2005. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 109(1):93-108.
171. Oosthuyse B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudénbach V, Vermeylen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. 2001. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet.*, 28:131-38.
172. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. 1994. Angiostatin: a novel

- angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 79:315–28.
173. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88:277–85.
 174. O'Reilly MS, Pirie-Shepherd S, Lane WS, Folkman J. 1999. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science*, 285:1926–8.
 175. Pajusola K, Aprelikova O, Pelicci G, Weich H, Claesson-Welsh L, Alitalo K. 1994. Signalling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors. *Oncogene*, 12:3545-55.
 176. Park HY, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE, Jang Y, Cho SY, Kim HS. 2001. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med*, 33:95-102.
 177. Park JE, Lee H, Lee JA, Park SG, Kim NS, Park BC, Cho S. 2005. Annexin A3 is a potential angiogenic mediator. *Biochem Biophys Res Commun*, 337(4):1283-7.
 178. Patan S, Haenni B, Burri PH. 1996. Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM): 1. pillar formation by folding of the capillary wall. *Microvasc Res*, 51:80-98.
 179. Pelengaris S, Littlewood T, Khan M, Elia G, Evan G. 1999. Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell*, 3:565–577.
 180. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. 1992. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 189:824–31.
 181. Pepper MS. 1997. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 8:21–43.
 182. Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS. 1997. Neutralizing antibodies against EGF and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate VEGF production by tumour cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumours. *Am J Pathol*, 151:1523–1530.
 183. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. 1992. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*, 359:845–848.
 184. Plate KH, Breier G, Weich HA, Mennel HD, Risau W. 1994. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *Int J Cancer*, 59:520-9.
 185. Plate KH. 1999. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58:313–320.

186. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Keshet E, Neufeld G. 1997. VEGF145, a secreted VEGF isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem*, 272:7151-8.
187. Powell J. 1999. Update on hemangiomas and vascular malformations. *Curr Opin Pediatr*, 11:457-63.
188. Rajkumar SV, Witzig TE. 2000. A review of angiogenesis and antiangiogenic therapy with thalidomide in multiple myeloma. *Cancer Treat Rev*, 26(5):351-362.
189. Rak, J, Mitsushashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS. 1995. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 55:4575-4580.
190. Rak, J, Mitsushashi Y, Sheehan C, Tamir A, Vilorio-Petit A, Filmus J, Mansour SJ, Ahn NG, Kerbel RS. 2000. Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res*, 60:490-498.
191. Ravi, R., Morkerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. 2000. Regulation of tumor angiogenesis by p53- induced degradation of hypoxia inducible factor-1 α . *Genes Dev*, 14:34-44.
192. Ren B, Yee KO, Lawler J, Khosravi-Far R. 2005. Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochem Biophys Acta*, 1765:178-88.
193. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. 1999. Human erythropoietin induces a proangiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood*, 93:2627-2636.
194. Ribatti D. 2005. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol*, 128:303-9.
195. Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386:671-674.
196. Röttgen M. 1999. Angiogenese als Pathogenitätsmechanismus. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
197. Rooney P, Kumar S, Ponting J, Wang M. 1995. The role of hyaluronan in tumour neovascularization. *Int J Cancer*, 60:632-6.
198. Rosen EM, Lamszus K, Laterra J, Polverini PJ, Rubin JS, Goldberg ID. 1997. HGF/SF in angiogenesis. *Ciba Found Symp*, 212:215-29.
199. Rusnati M, Tanghetti E, Urbinati C, Tulipano G, Marchesini S, Ziche M, Presta M. 1999. Interaction of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) with free gangliosides: biochemical characterization and biological consequences in endothelial cell cultures. *Mol Biol Cell*, 10: 313-27.
200. Saez E, Ruthberg SE, Mueller E, Oppenheim H, Smoluk J, Yuspa SH, Spiegelman BM. 1995. C-fos is required for malignant progression for skin tumors. *Cell*, 82:721-732.

201. Sato N, Nariuchi H, Tsuruoka N, Nishihara T, Beitz JG, Calabresi P, Frackelton AR. 1990. Actions of TNF and IFN- γ on angiogenesis in vitro. *J Invest Dermatol*, 95:85S–9S.
202. Sato Y, Okamura K, Morimoto A, Hamanaka R, Hamaguchi K, Shimada T, Ono M, Kohno K, Sakata T, Kuwano M. 1993. Indispensable role of tissue-type plasminogen activator in growth factor-dependent tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro. *Exp Cell Res*, 204:223–9.
203. Schiffer D, Chio A, Giordana MT, Leone M, Soffieti R. 1988. Prognostic value of histologic factors in adult cerebral astrocytoma. *Cancer*, 61:1386–1393.
204. Schnaper HW, McGowan KA, Kim-Schulze S, Cid MC. 1996. Oestrogen and endothelial cell angiogenic activity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 23:247–50.
205. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219:983–985.
206. Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G. 1996. Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood*, 87:3877–82.
207. Sheibani N, Frazier WA. 1996. Repression of thrombospondin-1 expression, a natural inhibitor of angiogenesis, in polyoma middle T transformed NIH3T3 cells. *Cancer Lett*, 107:45–52.
208. Sherif ZA, Nakai S, Pirollo KF, Rait A, Chang, EH. 2001. Down-modulation of bFGF-binding protein expression following restoration of p53 function. *Cancer Gene Ther*, 8:771–782.
209. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushima H, Sato M. 1990. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinas gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, 5:519–24.
210. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359:843–5.
211. Siegel SM, Grove BD, Carr PA. 2002. SSeCKS immunolabeling in rat primary sensory neurons. *Brain Res*, 926:126–36.
212. Simantov R, Febbraio M, Silverstein RL. 2005. The angiogenic effect of thrombospondin-2 is mediated by CD36 and modulated by histidine-rich glycoprotein. *Matrix Biol*, 24:27–34.
213. Sivakumar B, Harry LE, Paleolog EM. 2004. Modulating angiogenesis: more vs less. *JAMA*, 292:972–7.
214. Slevin M, Krupinski J, Kumar S, Gaffney J. 1998. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation. *Lab Invest*, 78:987–1003.
215. Stefansson S, McMahon GA, Petitclerc E, Lawrence DA. 2003. Plasminogen activator inhibitor-1 in tumor growth, angiogenesis and vascular remodeling. *Curr Pharm Des*, 9:1545–1564.

216. Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A, Keshet E. 1995. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol*, 15:5363-5368.
217. Stifter S. 2006. The role of nuclear factor kappaB on angiogenesis regulation through monocyte chemotactic protein-1 in myeloma. *Med Hypotheses*, 66:384-6.
218. Storkebaum E, Carmeliet P. 2004. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest*, 113:14-18.
219. Streb JW, Kitchen CM, Gelman IH, Miano JM. 2004. Multiple promoters direct expression of three AKAP12 isoforms with distinct subcellular and tissue distribution profiles. *J Biol Chem*, 279:56014-23.
220. Streb JW, Miano JM. 2005. AKAP12-alpha, an atypical serum response factor-dependent target gene. *J Biol Chem*, 280:4125-34.
221. Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA. 1999. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:1246-51.
222. Su B, Zheng Q, Vaughan MM, Bu Y, Gelman IH. 2006. SSeCKS metastasis-suppressing activity in MatLyLu prostate cancer cells correlates with vascular endothelial growth factor inhibition. *Cancer Res*, 66:5599-607.
223. Tait CR, Jones PF. 2004. Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. *J Pathol*, 204(1):1-10.
224. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. 2005. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*, 65:550-63.
225. Tanaka S, Sugimachi K, Yamashita Y, Shirabe K, Shimada M, Wands JR, Sugimachi K. 2003. Angiogenic switch as a molecular target of malignant tumors. *J Gastroenterol*, 38 Suppl 15:93-97.
226. Tangkeangsirisin W, Serrero G. 2004. PC cell derived growth factor (PCDGF/GP88, progranulin) stimulates migration, invasiveness and VEGF expression in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 25:1587-92.
227. Tao J, Wang HY, Malbon CC. 2003. Protein kinase A regulates AKAP250 (gravin) scaffold binding to the beta2-adrenergic receptor. *EMBO J*, 22:6419-29.
228. Theile M, Seitz S, Arnold W, Jandrig B, Frege R, Schlag PM, Haensch W, Guski H, Winzer KJ, Barrett JC, Scherneck S. 1996. A defined chromosome 6q fragment (at D6S310) harbors a putative tumor suppressor gene for breast cancer. *Oncogene*, 13:677-85.
229. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD. 2000. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med*, 6:460-3.
230. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. 1991. The human gene for VEGF. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*, 266:11947-54.
231. Ton, NC, Jayson, GC. 2004. Resistance to anti-VEGF agents. *Curr Pharm Des*, 10(1):51-64.

232. Vajkoczy P. 2006. Intravitale Beobachtungen zur Tumorangiogenese und Therapieantwort. Vortrag im Rahmen des 27. Deutschen Krebskongresses in Berlin.
233. Veikkola T, Alitalo K. 1999. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol*, 9:211–20.
234. Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Stewart DJ. 2002. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation*, 106:913-919.
235. Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmítko PE, Zucco L, Wang CH, Badiwala MV, Mickle DA, Weisel RD, Fedak PW, Stewart DJ, Kutryk MJ. 2004. CRP attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between CRP and cardiovascular disease. *Circulation*, 109:2058-67.
236. Vinals F, Pouyssegur J. 2001. TGF-beta1 promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling. *Mol Cell Biol*, 21:7218-30.
237. Volpert OV, Fong T, Koch AE, Peterson JD, Waltenbaugh C, Tepper RI, Bouck NP. 1998. Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *J Exp Med*, 188:1039–46.
238. Von Deimling A, Louis DN, Menon AG, von Ammon K, Petersen I, Ellison D, Wiestler OD, Seizinger BR. 1993. Deletions on the long arm of chromosome 17 in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol*, 86:81-85.
239. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello CA, Apte RN. 2003. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:2645-50.
240. Wang D, DuBois RN. 2004. COX-2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:415-416.
241. Warren BA. 1966. The ultrastructure of capillary sprouts induced by melanoma transplants in the golden hamster. *J R Microsc Soc*, 86:177-87.
242. Wasenius VM, Hemmer S, Kettunen E, Knuutila S, Franssila K, Joensuu H. 2003. Hepatocyte growth factor receptor, matrix metalloproteinase-11, tissue inhibitor of metalloproteinase-11, and fibronectin are up-regulated in papillary thyroid carcinoma: a cDNA and tissue microarray study. *Clin Cancer Res*, 9:68-75.
243. Xia W, Unger P, Miller L, Nelson J, Gelman IH. 2001. The Src-suppressed C kinase substrate, SSeCKS, is a potential metastasis inhibitor in prostate cancer. *Cancer Res*, 61:5644-51.
244. Yabu T, Tomimoto H, Taguchi Y, Yamaoka S, Igarashi Y, Okazaki T. 2005. Thalidomide-induced antiangiogenic action is mediated by ceramide through depletion of VEGF receptors, and is antagonized by sphingosine-1-phosphate. *Blood*, 106(1):125-134.
245. Yi M, Sakai T, Fassler R, Ruoslahti E. 2003. Antiangiogenic proteins require plasma fibronectin or vitronectin for in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:11435-8.
246. Yue TL, Wang X, Loudon CS, Gupta S, Pillarisetti K, Gu JL, Hart TK, Lysko PG, Feuerstein GZ. 1997. 2-Methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite, induces apoptosis in endothelial cells and inhibits

- angiogenesis: possible role for stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas expression. *Mol Pharmacol*, 51:951–62.
247. Yue WY, Chen ZP. 2005. Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? *J Histochem Cytochem*, 53:997-1002.
248. Zhai Y, Ni J, Jiang GW, Lu J, Xing L, Lincoln C, Carter KC, Janat F, Kozak D, Xu S, Rojas L, Aggarwal BB, Ruben S, Li LY, Gentz R, Yu GL. 1999. VEGI, a novel cytokine of the tumor necrosis factor family, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of colon carcinomas in vivo. *FASEB J*, 13:181–189.
249. Zhang N, Deuel TF. 1999. Pleiotrophin and midkine, a family of mitogenic and angiogenic heparin-binding growth and differentiation factors. *Curr Opin Hematol*, 6:44–50.
250. Zhong J, Eliceiri B, Stupack D, Penta K, Sakamoto G, Quertermous T, Coleman M, Boudreau N, Varner JA. 2003. Neovascularisation of ischemic tissues by gene delivery of the extracellular matrix protein Del-1. *J Clin Invest*, 112:30-41.
251. Zhou L, Isenberg JS, Cao Z, Roberts DD. 2006. Type I collagen is a molecular target for inhibition of angiogenesis by endogenous thrombospondin-1. *Oncogene*, 25(4):536-45.