Aus der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie

(Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. F. Schöndube)

im Zentrum Chirurgie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Analyse der Neoangiogenese anhand des Vergleichs der CD31- und PEDF-Expression im vitalen Gewebe des Adeno- und Plattenepithelkarzinoms der Lunge

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Angelika Oellerich geb. Böhler

aus

Rheinfelden

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: PD Dr. med. B. Danner
II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Ulrich Schildhaus
III. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Claudia Binder

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2016

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis 1
II. Abbildungsverzeichnis 4
III. Tabellenverzeichnis 6
IV. Abkürzungsverzeichnis 6

1 Einleitung ... 9
1.1 Epidemiologie des Lungenkarzinoms ... 9
1.2 Ätiologie ... 10
1.3 Histopathologische Aspekte ... 12
1.3.1 Lokalisation ... 12
1.3.2 Histologische Einteilung ... 12
1.4 Pathogenese ... 14
1.5 Klinische Präsentation ... 16
1.6 Diagnostik und Staging ... 17
1.6.1 Anamnese, klinische Untersuchung und Basislabor ... 17
1.6.2 Bildgebung der Erstdiagnostik ... 18
1.6.3 Sputumzytologie ... 19
1.6.4 Bronchoskopie ... 20
1.6.5 Positronenemissionstomographie (PET) ... 20
1.6.6 Skelettszintigraphie ... 20
1.6.7 Schädel-MRT oder Schädel-CT ... 21
1.6.8 Weitere Möglichkeiten zur histologischen Sicherung ... 21
1.6.9 Lymphknotenstaging, physiologisches Staging und Metastasierung ... 21
1.7 Stadieneinteilung ... 22
1.7.1 Stadieneinteilung nach TNM und UICC ... 22

1.7.2 Stadieneinteilung beim kleinzelligen Bronchialkarzinom 26
1.8 Therapie 26
1.8.1 Chirurgische Resektion 26
1.8.2 Strahlentherapie 27
1.8.3 Pharmakotherapie 27
1.8.4 Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms 28
1.8.5 Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms 29
1.9 Prognose 31
1.10 Tumorangiogenese 31
1.11 Angiogenesefaktoren 33
1.11.1 CD31 (PECAM-1) 35
1.11.2 PEDF 36
1.12 Zielsetzung der Arbeit 37
2 Material und Methoden 38
2.1 Datenerfassung und Auswahl des Patientenkollektivs 38
2.2 Immunhistochemie 40
2.2.1 Selektion der Tumorblöcke und Anfertigung der Präparate 40
2.2.2 Beschreibung des immunhistochemischen Verfahrens und der Antikörper 40
2.2.3 Molekularbiologische Reagenzien 42
2.2.4 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen 43
2.2.5 Färbeprotokoll für CD31 und PEDF 43
2.3 Auswertung der Immunhistochemie 46
2.3.1 Anfertigung der Fotografien 46
2.3.2 Auswertung des immunhistochemischen Signals 48
2.3.4 Tabelle zur Auswertung des CD31-Signals 48
2.3.5 Tabelle zur Auswertung der PEDF-Signale 48
2.4 Statistisches Verfahren 51

3 Ergebnisse 53

3.1 Beschreibung der Patientenkollektive 53

3.2 Untersuchungen zur Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von verschiedenen Einflussgrößen anhand des Kollektivs der Plattenepithelkarzinompatienten 56

3.2.1 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von den Tumorstadien (nach UICC 2010) ... 56

3.2.2 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der Tumorgröße 57

3.2.3 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus 58

3.2.4 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom CD31-Expressionsstatus 59

3.2.5 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der PEDF- Fläche 60

3.2.6 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der PEDF- Intensität 61

3.2.7 Häufigkeitsverteilung der Messwerte für CD31 und PEDF 61

3.3 Untersuchungen zur CD31- und PEDF- Expression anhand des Vergleichs von Adeno- und Plattenepithelkarzinompatienten 63

3.3.1 Verteilung der Messwerte der einzelnen Variablen 63

3.3.2 Korrelation der CD31- Expression und der PEDF- Intensität 65

3.3.3 Korrelation der CD31- Expression und der PEDF- Fläche 67

3.4 Korrelation der Messwerte des Gesamtkollektivs zwischen Untersucher 1 und Untersucher 2 70

4 Diskussion 72

4.1 Beurteilung der Studienergebnisse und Vergleich mit anderen Studien 72

4.2 Beurteilung der beschriebenen methodischen Ansätze 80

4.3 Zusammenfassung und Ausblick 81

5 Literaturverzeichnis 82

6 Danksagung 92

7 Lebenslauf 93

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten in Deutschland 1980-2006 (adaptiert nach Vorlage aus RKI: Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trend) **10**

Abbildung 1.2: Erstsymptome beim Bronchialkarzinom (nach Classen et al. 2009) **17**

Abbildung 1.3: Übersicht über das Vorgehen bei der Bildgebung (nach Dietel et al. 2008) **19**

Abbildung 1.4: Behandlungspfad beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (aus Seifert und Nemat 2010) **29**

Abbildung 2.1: Darstellung der Visualisierungsmethode für CD31 **41**

Abbildung 2.2: Darstellung der Visualisierungsmethode für PEDF **42**

Abbildung 2.3: Grafik zur Darstellung der Anfertigung der Fotografien **47**

Abbildung 2.4: Markierung von CD31 (links) und PEDF (rechts) eines Tumorpräparates in 25facher Vergrößerung (Abbildungen oben) und 100facher Vergrößerung (Abbildungen unten) **47**

Abbildung 2.5: Darstellung eines Beispielpräparates in 25facher Vergrößerung ohne (Bild oben) und mit (Bild unten) Markierung zur Auswertung des PEDF-Signals **50**

Abbildung 2.6: Darstellung eines Tumorpräparates in 100facher Vergrößerung der PEDF-Färbung. Die Abbildungen zeigen beispielhaft die unterschiedlichen Intensitätsstufen: keine Färbung (A), schwache Intensität des PEDF-Signals (B), mittlere Intensität (C) und starke Intensität (D) **50**

Abbildung 3.1: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse für das Gesamtüberleben des Kollektivs der Plattenepithelkarzinompatienten **53**

Abbildung 3.2: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Tumorstadien **56**

Abbildung 3.3: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Tumorgröße **57**

Abbildung 3.4: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus **58**

Abbildung 3.5: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der CD31-Expression **59**

Abbildung 3.6: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der PEDF-Expression, gemessen an der PEDF- Fläche **60**

Abbildung 3.7: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit des PEDF - Signals, gemessen an der PEDF- Intensität **62**
Abbildung 3.8: Häufigkeitsverteilung der CD31-Messwerte **62**
Abbildung 3.9: Häufigkeitsverteilung der Messwerte für die PEDF-Fläche **62**
Abbildung 3.10: Häufigkeitsverteilung der Messwerte für die PEDF-Intensität **63**
Abbildung 3.11: Darstellung der Verteilung der Messwerte des CD31-Signals in Form von Boxplots **64**
Abbildung 3.12: Darstellung der Verteilung der Messwerte der PEDF- Fläche in Form von Boxplots **64**
Abbildung 3.13: Darstellung der Verteilung der Messwerte der PEDF- Intensität in Form von Boxplots **65**
Abbildung 3.14: Darstellung der Korrelation des CD31-Signals und der PEDF-Intensität des Gesamtkollektivs **65**
Abbildung 3.15: Darstellung der Korrelation des CD31-Signals und der PEDF-Intensität beim Kollektiv der Plattenepithelkarzinompatienten **66**
Abbildung 3.16: Darstellung der Korrelation des CD31-Signals und der PEDF-Intensität beim Kollektiv der Adenokarzinompatienten **67**
Abbildung 3.17: Darstellung der Korrelation des CD31-Signals und der PEDF-Fläche des Gesamtkollektivs. **67**
Abbildung 3.18: Darstellung der Korrelation des CD31-Signals und der PEDF-Fläche beim Kollektiv der Adenokarzinompatienten **68**
Abbildung 3.19: Darstellung der Korrelation des CD31-Signals und der PEDF-Fläche beim Kollektiv der Plattenepithelkarzinompatienten **69**
Abbildung 3.20: Korrelation der CD31-Expression zwischen Untersucher 1 und Untersucher 2 **70**
Abbildung 3.21: Korrelation der PEDF-Fläche zwischen Untersucher 1 und Untersucher 2 **71**
Abbildung 3.22: Korrelation der PEDF-Intensität zwischen Untersucher 1 und Untersucher 2 **71**

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: 7.TNM-Klassifikation der Bronchialkarzinome **23**
Tabelle 1.2: 6.TNM-Klassifikation der Bronchialkarzinome **24**
Tabelle 1.3: UICC-Stadium (2009) **25**
Tabelle 1.4: UICC-Stadium (2002) **25**
Tabelle 1.5: Prognose des NSCLC in Abhängigkeit des Stadiums **30**
Tabelle 1.6: Angiogenesefaktoren und deren Hauptfunktionen **33**
Tabelle 2.1: Molekularbiologische Reagenzien **42**
Tabelle 2.2 : Zusammensetzung der Lösung Mayer´s Hämalaun **43**
Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Lösung TBS-Puffer **43**
Tabelle 2.4: Tabellarische Darstellung des Färbeprotokolls für CD31 und PEDF **44**
Tabelle 2.5: CD31: Anzahl Mikrogefäße **48**
Tabelle 2.6: PEDF: Anzahl Spots/ Signal-Intensität **48**
Tabelle 2.7: Definition der Größe der PEDF-Signale **49**
Tabelle 3.1: Gruppierung des Plattenepithelkarzinomkollektivs nach Tumorstadium **54**
Tabelle 3.2: Patientencharakteristika **54**

IV. Abkürzungsverzeichnis

3-JÜR	3-Jahresüberlebensrate
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
AC	Adenokarzinom
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AJCC	*American Joint Comitee on Cancer*
Ang-1	Angiopoietin-1
Ang-2	Angiopoietin-2
AP	alkalische Phosphatase
bFGF	*Basic Fibroblast Growth Factor*
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
CD31	*cluster of differentiation 31*
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CHART	*Continuous Hyperfractionated Accelerated Radiation Therapy*
CN	Cyanid
CO	Kohlenstoffmonoxid
CT	Computertomographie

DAB+	3,3'-Diaminobenzidin
EBUS-FNA	endobronchiale ultraschallgesteuerte Feinnadelaspiration
ECM	extrazelluläre Matrix
ECOG	*Eastern Cooperative Oncology Group*
EGF	*Epidermal Growth Factor*
EMA	*Epithelial Membrane Antigen*
EUS-FNA	endosonographische Feinnadelaspiration
Fas/Fas-L	Todesrezeptor Fas (APO-1, CD 95)/ Fas-Ligand
FDG-PET	Fluordesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie
FEV_1	Forcierte Einsekundenkapazität
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
Gy	Gray
Hb	Hämoglobin
HRP	*Horseradish peroxidase*
IARC	International Agency for Research on Cancer
IF-α/β	Interferon- α/β
K-ras	*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
kDa	Kilodalton
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LK	Lymphknoten
M	Fernmetastasierung
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
MRT	Magnetresonanztomographie
MVD	intratumorale Gefäßdichte
MW	Mittelwert
N	Lymphknotenstatus
NSCLC	*Non-Small Cell Lung Cancer / Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom*
PA	Plasminogen-Aktivator
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PDGF	*Platelet-Derived Growth Factor*
PECAM-1	*Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*
PEDF	*Pigment epithelium derived factor*
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
R&D	*Research and Diagnostics*
Ras	*Rat sarcoma*
RB	Retinoblastom

RKI	Robert Koch-Insitut
STD	Standardabweichung
SCC	*Squamous Cell Carcinoma/* Plattenepithelkarzinom
SCLC	*Small Cell Lung Cancer/* Kleinzelliges Lungenkarzinom
SH2	*Srs-homology 2*
SHP-2	*Src Homology Region 2 Domain Phosphatase 2*
T	Tumorausbreitung
TBS-Puffer	*Tris-buffered Saline* Puffer
TGF-β	*Transforming Growth Factor β*
TIMPs	*Tissue-Inhibitors of MMP*
T_{LCO}	Transferfaktor für Kohlenmonoxid
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TNM	Tumor/Nodus/Metastase
TSP-1	Thrombospondin-1
TT-FNA	transthorakale Feinnadelaspiration
UICC	*Union Internationale Contre le Cancer*
VAMLA	videoassistierte mediastinale Lymphadenektomie
VCAM-1	*Cascular cell adhesion molecule-1*
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
WHO	World Health Organization/ Weltgesundheitsorganisation
µm	mikrometer

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Lungenkarzinoms

Das Bronchialkarzinom zählt in der Bundesrepublik Deutschland zu der dritthäufigsten Krebserkrankung. Allein in Deutschland erkrankten im Jahr 2006 nach Schätzungen des Robert Koch-Instituts etwa 32.500 Männer und 14.600 Frauen an Lungentumoren und die Tendenz ist steigend (RKI und GEKID 2010). Die Zahl der jährlichen Erkrankungsfälle hat sich bei den Frauen seit 1980 fast verdreifacht, wobei dagegen die Inzidenz bei Männern seit Anfang der 1990er-Jahre kontinuierlich rückläufig ist (RKI 2010). Gleichartige Trends sind auch in anderen europäischen Industrienationen zu verzeichnen. Diese unterschiedliche Entwicklung der Männer im Vergleich zu den Frauen lässt sich dadurch erklären, dass seit Mitte der 1980er Jahre der Anteil rauchender Männer zurückgegangen ist, bei den Frauen lässt sich hingegen ein Anstieg der Rauchprävalenz verzeichnen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 69 Jahren. Laut Robert Koch-Institut verstarben im Jahr 2006 in Deutschland 40.771 Patienten an einem Bronchialkarzinom, darunter 28.898 Männer und 11.873 Frauen (RKI und GEKID 2010). Lungenkrebs stellt damit bei Männern die häufigste krebsbedingte Todesursache dar, bei Frauen steht er an dritter Stelle nach Brust- und Darmkrebs. Wie in Europa steht das Bronchialkarzinom in den USA an der Spitze aller zum Tode führenden malignen Erkrankungen. Während die Inzidenz bei Männern seit mehreren Jahren sinkt, ist bei der weiblichen Bevölkerung ein weiterer Anstieg zu beobachten, sodass hier als krebsbedingte Todesursache der Lungentumor auch bei Frauen auf Platz eins gerückt ist (Jemal et al. 2008). Diese Entwicklung ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Die aktuellen Überlebensraten in Deutschland liegen bei Männern zwischen 13% und 17% und bei Frauen zwischen 13% und 19% (RKI und GEKID 2010).

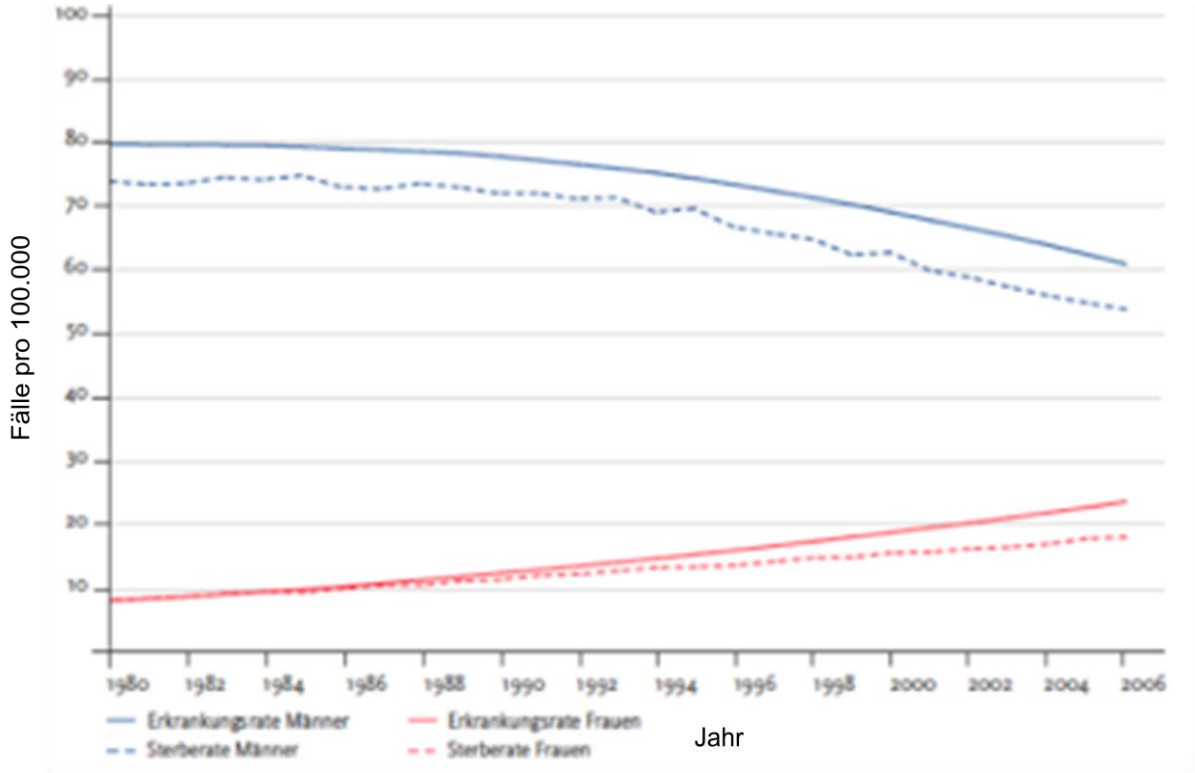


Abbildung 1.1: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten in Deutschland 1980-2006 (adaptiert nach Vorlage aus RKI: Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trend)

1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Lungenkarzinoms ist in den meisten Fällen bekannt. Studien ergaben eine direkte Assoziation des Zigarettenkonsums auf die Tumorentstehung. Bei Männern sind 83-92% der Lungentumoren und bei Frauen 57-80% direkt auf das Rauchen zurückzuführen (Boyle 1997). Die Weltgesundheits-Organisation geht davon aus, dass bis zum Jahre 2025 jährlich 10 Millionen Menschen weltweit an den Folgen des Tabakkonsums sterben werden (Smith und Glynn 2000). Das Rauchverhalten mit seinen Konsequenzen ist durch eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung charakterisiert. Somit steigt das Lungenkrebsrisiko mit zunehmender Dosis, dies betrifft sowohl die tägliche Rauchmenge als auch die kumulative Anzahl gerauchter Zigaretten oder anderer Tabakprodukte (Kreuzer et al. 2006). Die Dauer und Anzahl des Zigarettenkonsums wird in Packyears angegeben, wobei ein Packyear definiert ist als der Konsum von einer Zigarettenschachtel mit 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr. Eine Verdopplung der Packyears führt zu einer 2- bis 4-fach höheren Lungenkarzinomsterblichkeit (Häußinger und Kohlhäufl 2006). Nicht nur das Aktivrauchen, sondern auch das Passivrauchen geht mit einem erhöhten Risiko einher, an Lungenkrebs zu erkranken. Unter Passivrauchen

versteht man die inhalative Aufnahme von Tabakrauch aus der Raumluft. Eine Metaanalyse aus 51 Studien ergab, dass das Risiko, ein Bronchialkarzinom zu entwickeln, bei Passivrauchern um den Faktor 1,25 erhöht ist (Bofetta 2002). Verantwortlich für die Entwicklung des Bronchialkarzinoms durch Tabakrauch sind die schädlichen Substanzen, die durch Inhalieren in die Lunge eindringen und als Kanzerogene wirken. Im Tabakrauch sind ca. 7000 unterschiedliche chemische Substanzen enthalten. Im Experiment haben sich mehrere als hoch wirksame Kanzerogene erwiesen, so konnten über 55 Kanzerogene im Tabakrauch gesichert werden, von denen die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine zu den besonders gefährlichen zählen (Hecht 1999).

Neben dem Tabakrauch als Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Lungenkrebs spielen noch weitere Schadstoffe eine wichtige Rolle. Zu den berufsbedingten Noxen zählen unter anderem Stoffe wie Asbest, Beryllium, Arsen, Cadmium, Chrom-VI-Verbindungen, Senfgas, Nickel, Vinylchlorid, Gammastrahlen, Alphastrahlen (Radon) sowie Nitrosamine. Diese Noxen gehen mit einem erhöhten Risiko einer Lungenkrebsentstehung einher, sind jedoch nur für einen kleinen Teil aller bösartigen Neubildungen der Lunge verantwortlich. Asbest ist ein Silikat-Mineral, welches aus unterschiedlichen Fasern wie Krokydolith, Klinochrysotil, Grunerit, Anthophyllit oder Aktinolith besteht. Bei Aufnahme der Asbestfasern in die Lunge besteht ein 6-fach erhöhtes relatives Risiko, ein Bronchialkarzinom zu entwickeln (Bilello et al. 2002). In 50% der Fälle sind Asbestfasern die Ursache für ein Pleuramesotheliom.

Eine weitere Rolle spielen auch umweltbedingte Noxen. Wichmann beschreibt in seinem Gutachten aus dem Jahre 2003 über den Nutzen von Dieselpartikelfiltern, dass jährlich in Deutschland zirka 800.000 Menschen versterben, von diesen Todesfällen sind etwa 1 bis 2% den Kfz-Abgasen aus Dieselfahrzeugen zuzuordnen, hierunter sind 1100 bis 2200 der Todesfälle Folge von Lungenkrebs (Wichmann 2003).

1.3 Histopathologische Aspekte

1.3.1 Lokalisation

Die Lokalisation des Tumors ist wichtig für dessen Operabilität, Metastasierungsweg und Früherkennung. Am häufigsten befindet sich der Tumor in der rechten Lunge und dort wiederum im Oberlappen. Man vermutet, dass dies auf die bessere Belüftung sowie auf die zunehmende Häufung der Narbenkarzinome in diesem Bereich zurückzuführen ist. Man unterscheidet zwischen den folgenden Wachstumsformen (Böcker et al. 2008):

· zentral gelegene und hilusnahe Tumoren (60-70%)
· periphere, relativ scharf begrenzte Tumoren (30-40%)
· diffus infiltrierende Tumoren (ca. 2,5%)

Tumoren, die eher peripher gelegen sind, imponieren im Röntgenbild vor allem als Rundherd. Histologisch handelt es sich dabei meist um Adenokarzinome und großzellige Lungentumore. Die zentral gelegenen Tumoren befinden sich im röntgenologisch schwer fassbaren Bereich, sind jedoch bronchoskopisch zugänglich. Die zentralen Karzinome führen zu Atelektasen und chronischen Retentionspneumonien, histologisch dominieren hier die kleinzelligen Karzinome und Plattenepithelkarzinome. Diffus infiltrierende Tumoren sind selten und ahmen radiologisch das Bild einer Pneumokokken- oder Klebsiellenpneumonie nach. Histologisch sind es meist bronchioloalveoläre Karzinome (Behr et al. 2009; Böcker et al. 2008).

1.3.2 Histologische Einteilung

Die histologische Einteilung des Bronchialkarzinoms erfolgt nach der WHO-Klassifikation und wird aufgrund therapeutischer Konsequenzen und biologischer Eigenschaften in kleinzellige (SCLC) und nichtkleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC) unterschieden. Dabei sind Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, kleinzellige und großzellige Karzinome die häufigsten histologischen Typen (Böcker et al. 2008). Diese werden im Folgenden näher beschrieben.

Plattenepithelkarzinom (SCC)

Der häufigste histologische Tumortyp ist mit 30 bis 40% das Plattenepithelkarzinom und ist vorwiegend zentral lokalisiert (Böcker et al. 2008). Dieses hat in den letzten Jahren an Häufigkeit abgenommen. Devesa et al verglichen die Häufigkeit der Tumortypen anhand einer Datenbank der International Agency for Research on Cancer (IARC) von Patienten zwischen Ende der 70er Jahre und Mitte der 80er Jahre. Sie fanden heraus, dass die

Häufigkeit der Plattenepithelkarzinome bei der männlichen Bevölkerung in Nord-Amerika und einigen europäischen Ländern um mindestens 30% abgenommen hat (Devesa et al. 2005). Hingegen ist bei den Frauen eine Zunahme, besonders in den Niederlanden und in Norwegen zu verzeichnen (Devesa et al. 2005). Dieser Trend ist durch den zunehmenden Tabakkonsum der weiblichen Bevölkerung zu erklären.

Das Plattenepithelkarzinom wird von einer Basalzelle abgeleitet, die über eine Basalzellhyperplasie, intraepitheliale Neoplasie und ein Carzinoma in situ in ein Karzinom übergeht (Thomas 2001). Plattenepithelkarzinome können papilläre, klarzellige, kleinzellige und basaloide Wachstumsmuster aufzeigen. Im Querschnitt sind Hornperlen zu sehen. Das Plattenepithelkarzinom zeigt unterschiedliche Differenzierungsgrade. Hoch differenzierte Plattenepithelkarzinome zeigen relativ gleichförmige Epithelkomplexe mit zellulären Atypien, Verhornungszeichen (wirbelartige und zwiebelschalenähnliche Hornperlen) sowie Nachweis von Interzellularbrücken. Die Zellen haben meist eine polyglonale Form und sind in einem faserigen Stroma eingebettet. Charakteristisch für ein fortgeschrittenes Tumorstadium sind ausgedehnte Nekrosen bis hin zu Tumorkavernen (Böcker et al. 2008).

Adenokarzinom (AC)

Das Adenokarzinom findet sich bei der Häufigkeitsverteilung an zweiter Stelle mit etwa 45% und einem stetigen Anstieg sowohl bei Frauen als auch Männern (Böcker et al. 2008). Devesa et al zeigten in ihrer Veröffentlichung, dass die Häufigkeit des Adenokarzinoms der Lunge in einigen Ländern Europas zunimmt, bei der männlichen Bevölkerung um 50%, bei den Frauen in Norwegen, Italien und Frankreich sogar um mehr als 50% (Devesa et al. 2005). Auch ist das Adenokarzinom die häufigste Krebsform bei Nichtrauchern, weshalb angenommen wird, dass andere Faktoren bei der Entstehung eine wichtige Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, dass beispielsweise Östrogen- und Wachstumsfaktoren die Tumorprogression fördern (Marquez-Garban et al. 2007).

Primäre Adenokarzinome sind vorwiegend peripher lokalisiert (Thomas 2001). Charakteristisch sind ausgedehnte zentrale Vernarbungen, was eine Abgrenzung zu Narbenkarzinomen bei beispielsweise einer Tuberkulose schwierig gestaltet (Thomas 2001). Histologisch zeigt das Adenokarzinom papilläre oder azinäre Strukturen mit Schleimbildung. Zwischen den Tumorgebieten ist reichlich Stroma vorhanden. Immunhistochemisch sind die Adenokarzinome meist CEA-, Panzytokeratin- und EMA-positiv und in 30% der Fälle auch positiv für neuroendokrine Marker.

Eine besondere Form ist das bronchioloalveoläre Karzinom (sog. Alveolarzellkarzinom),

bei welchem es zu einer tapetenförmigen Auskleidung der Alveolarräume unter Nutzung der vorbestehenden Lungenstruktur kommt. Klinisch imponiert der Tumor oft als behandlungsrefraktäre Pneumonie.

Kleinzelliges Karzinom (SCLC)

Etwa 20% der Lungentumoren weisen einen kleinzelligen Aufbau auf (Böcker et al. 2008). Diese Karzinome haben eine sehr hohe Malignität und ein frühes Metastasierungs-potential mit einer schlechten Prognose. In 80% der Fälle ist der Tumor bei Diagnose-stellung bereits metastasiert. Betroffen sind meist Männer im höheren Lebensalter, jedoch zunehmend auch junge Frauen. Beim kleinzelligen Karzinom handelt es sich um die wenig differenzierte und hoch maligne Variante der neuroendokrinen Tumoren. Diese Tumoren weisen klinisch gelegentlich paraneoplastische Syndrome durch eine ektope Hormonbildung wie beispielsweise eine ACTH-Produktion mit resultierendem Cushing-Syndrom auf (Thomas 2001). Histologisch charakteristisch sind die kleinen Tumorzellen mit einem Zell- und Kerndurchmesser zwischen 5 und 8 µm, die einzeln oder in einem lockeren Zellverband liegen. Typisch in Biopsien sind Quetschartefakte und Nekrosen (Böcker et al. 2008).

Großzelliges Karzinom

Hierbei handelt es sich um ein entdifferenziertes Karzinom, das meist von einem Adenokarzinom, seltener von einem Plattenepithelkarzinom, abgeleitet wird und bevorzugt peripher vorkommt. Das zytologische Bild wird beherrscht von Zell- und Kernpolymorphie sowie sehr prominenten Nukleolen (Thomas 2001). Es fehlen differenzierte Strukturen wie Verhornung oder Verschleimung.

1.4 Pathogenese

Die Entstehung der Bronchialkarzinome geschieht in mehreren Stufen. Eine genetische Prädisposition in Bezug auf Karzinogenaktivierungs- und Deaktivierungsenzyme erklärt, weshalb manche Individuen trotz entsprechender Exposition keinen Tumor entwickeln (Böcker et al. 2008; Riede et al. 2004). Molekularzytologische Untersuchungen haben gezeigt, dass das Lungenkarzinom bis auf wenige Ausnahmen aneuploid ist und multiple chromosomale Veränderungen aufweist. Es kommt zu chromosomalen Ungleichgewichten, die meistens auf dem Verlust oder Zugewinn ganzer Chromosomen, Chromosomenarme oder kleinerer Chromosomenabschnitte beruhen. Im Anfangsstadium der

Karzinomentstehung findet man vor allem beim Kleinzeller einen Allelverlust der Chromosomen 3p, 13q und 17p. Beim Chromosom 3 geht Genmaterial für die Codierung von Differenzierungsfaktoren verloren, beim Chromosom 13q das RB-Tumorsupressorgen und bei Chromosom 17p geht das p53-Tumorsupressorgen verloren. Das p53-Protein wirkt in einer funktionstüchtigen Zelle antiproliferativ und auch das RB-Protein wirkt im Zellzyklus durch eine Steuerfunktion am G1-S-Phase-Kontrollpunkt (Böcker et al. 2008; Riede et al. 2004). Im weiteren Verlauf der Tumorentstehung kommt es noch zu einer Aktivierung von Onkogenen aus der myc- und ras-Familie. Dabei sind die Protoonkogenmutationen von K-ras insbesondere beim Adenokarzinom zu beobachten. Die myc-Onkogenveränderungen kommen insbesondere beim kleinzelligen Bronchialkarzinom vor. Neben diesen klassischen Genveränderungen ist es in neueren Studien bereits gelungen, eine Vielzahl an weiteren Genen zu identifizieren, die bei Lungentumoren unter- oder überexprimiert sind (Böcker et al. 2008; Riede et al. 2004).

Lungentumoren besitzen eine große chromosomale Instabilität und zeichnen sich somit durch eine hohe genetische Variabilität aus. Dies wiederum führt zu einer großen Variabilität in der Morphologie und des Phänotyps und folglich wahrscheinlich zur Ausbildung von Chemoresistenzen und Neigung zu früher Tumorprogression und Metastasierung. Diese Eigenschaft des Tumors trägt dazu bei, dass wir eine hohe Mortalität und einen begrenzten Erfolg der Chemotherapie zu verzeichnen haben (Böcker et al. 2008; Riede et al. 2004). Danner et al. konnten zeigen, dass genetische Veränderungen durchaus eine klinische, wenn aktuell auch noch keine zielgerichtete, therapeutische Relevanz haben. Eine retrospektive Studie von 80 Patienten, welche an einem Lungenkarzinom erkrankt waren, hat ergeben, dass die erhobenen klinisch-pathologischen Daten und Follow-up-Daten mit den chromosomalen Instabilitäten, gemessen anhand vergleichender genomischer Hybridisierung, korrelieren (Danner et al. 2011a). Eine weitere Studie, welche ein Patientenkollektiv betrachtete, das an einem primären kolorektalen Tumor mit Lungenmetastasen erkrankt war, konnte zeigen, dass der Grad der chromosomalen Instabilität und des chromosomalen Ungleichgewichts in den Lungenmetastasen dem des Primärtumors entspricht. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass sich viele der genetischen Ereignisse schon früh während der Tumorprogression manifestieren (Danner et al. 2011b).

1.5 Klinische Präsentation

Typische Frühsymptome, welche die Patienten zum Arzt führen und eine frühe Diagnosestellung ermöglichen, existieren in dieser Form beim Lungenkarzinom nicht. Bei Symptomen wie chronischem Husten, Dyspnoe, unklarem Thoraxschmerz, Gewichtsverlust, Lymphknotenschwellung, rezidivierenden Infekten und Hämoptysen sollte differentialdiagnostisch auch immer an einen Lungentumor gedacht werden. Die Symptome sind stark abhängig von der Lokalisation, dem Stadium und der Ausbreitung des Tumors (Classen et al. 2009). Die Symptome entstehen durch Invasion und Obstruktion angrenzender Strukturen, durch Infiltration der regionalen Lymphknoten und Ausbreitung in das Lymphgefäßsystem, durch Wachstum an entfernten metastatischen Herden nach hämatogener Ausbreitung und durch paraneoplastische Fernwirkungen (Classen et al. 2009). Die Fernwirkungen, als paraneoplastisches Syndrom bezeichnet, kommen durch die Sekretion von Peptidhormonen oder durch immunologische Kreuzreaktionen zustande und werden vor allem beim kleinzelligen Bronchialkarzinom beobachtet. In Autopsien finden sich beim Plattenepithelkarzinom in über 50% der Fälle extrathorakale Metastasen, beim Adenokarzinom und großzelligen Karzinom in 80% und beim kleinzelligen Bronchialkarzinom sogar in über 95% der Fälle. Bei diesen Untersuchungen fanden sich in nahezu allen Organsystemen Metastasen (Classen et al. 2009; Dietel et al. 2008). Symptome einer extrathorakalen Metastasierung bzw. einer Ausbreitung des Tumors in benachbarte Strukturen können Heiserkeit (Rekurrensparese), Horner-Syndrom (Infiltration Ggl. Stellatum mit Miosis, Ptosis und Enophthalmus), Brachialgien (Infiltration Plexus brachialis), Krampfanfälle (zerebrale Metastasierung) und viele weitere sein. Diese Symptome gehen in der Regel mit einer infausten Prognose einher (Classen et al. 2009).

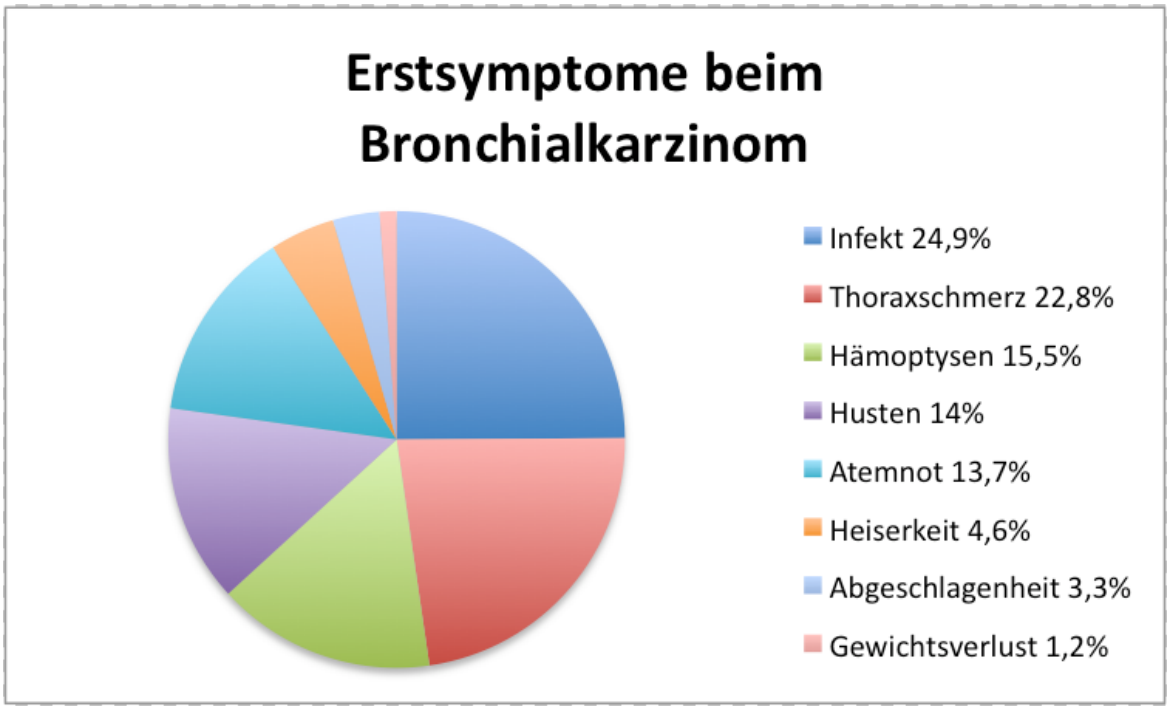


Abbildung 1.2: Erstsymptome beim Bronchialkarzinom adaptiert nach Classen et al. 2009, Seite 354

1.6 Diagnostik und Staging

Da beim Bronchialkarzinom ein typisches Warnsymptom, das eine frühzeitige Diagnosestellung ermöglichen würde, nicht existiert, ist es von besonderer Wichtigkeit, bei geringstem Verdacht und insbesondere bei Vorhandensein von Risikofaktoren eine konsequente Diagnostik durchzuführen.

Die Diagnostik beim Bronchialkarzinom hat das Ziel, den malignen Prozess zu klassifizieren, indem der histologische Typ und das Grading bestimmt werden sollen. Das Staging dient dazu, die Histologie und Ausdehnung des Tumors festzulegen und kann somit Aussagen über die Prognose liefern (Classen et al. 2009). Die Therapie des Lungentumors ist streng auf den histologischen Typ und auf das jeweilige Stadium abgestimmt (Seifert und Nemat 2010).

1.6.1 Anamnese, klinische Untersuchung und Basislabor

Wichtig bei der Anamnese des Patienten sind eine genaue Erhebung der Familien- und Eigenanamnese, mit Fokus auf bereits aufgetretene Malignome in der Vorgeschichte. Bei der Eigenanamnese ist das Rauchverhalten des Patienten und die berufliche Laufbahn in Erfahrung zu bringen, um eine eventuelle Exposition mit den potentiellen beruflichen

Karzinogenen herauszufinden. Dies ist von besonderer Bedeutung bei eventueller Anerkennung als Berufskrankheit. Des Weiteren sind die obengenannten spezifischen Symptome und andere Begleiterkrankungen des Patienten zu erfragen. Bei der Labordiagnostik sollten folgende Parameter erhoben werden: kleines Blutbild (Erythrozyten, Hb, Leukozyten), Blutkörpersenkungsgeschwindigkeit (BSG), Elektrolyte, Kreatinin, Harnstoff, Leberenzymwerte, AP und LDH. Danner et al. untersuchten LDH als prognostischen Marker und konnten zeigten, dass die Exprimierung von LDH bei gesteigertem Zellumsatz erhöht ist (Danner et al. 2010). Die alkalische Phosphatase und das Serumkalzium können Hinweise auf Knochenmetastasen geben.

1.6.2 Bildgebung der Erstdiagnostik

Bei einem klinischen Verdacht ist das Röntgenbild in 2 Ebenen der erste Schritt, hier zeigt sich der Tumor direkt oder indirekt als Rundherd, Raumforderung, Atelektase, Mediastinalverbreiterung oder mit einem Pleuraerguss (Dietel et al. 2008; Seifert und Nemat 2010). Sowohl bei positivem als auch bei negativem Befund und Diskrepanz zur Klinik des Patienten sollte eine weiterführende Diagnostik erfolgen. Hier lässt sich sagen, dass die Sensitivität einer CT-Aufnahme zur Diagnose eines malignen Rundherdes sehr hoch ist (Wahidi et al. 2007). Die Vorteile einer CT-Aufnahme sind die überlappungsfreie Darstellung sowie der Nachweis von regionalen und extrathorakalen Metastasen.
Ein weiteres diagnostisches Mittel ist die Sonographie von Thoraxwand und Pleura parietalis zur Darstellung von pathologischen Prozessen wie beispielsweise einem Pleuraerguss mit quantitativer Beurteilung der Thoraxwandinfiltration (Classen et al. 2009).

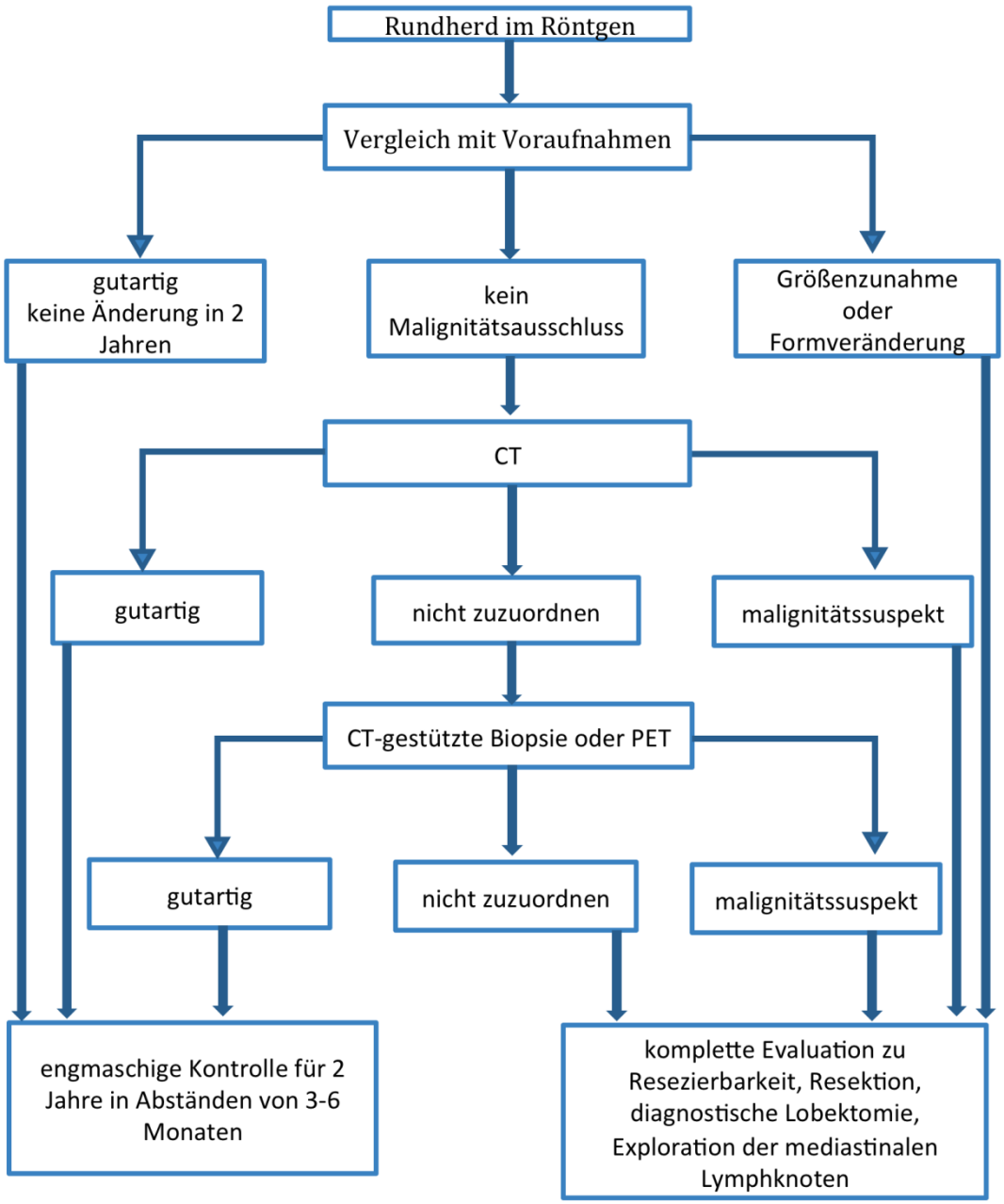


Abbildung 1.3: Übersicht über das Vorgehen bei der Bildgebung nach Dietel et al. 2008, Seite 694

1.6.3 Sputumzytologie

Die Sputumzytologie ist eine nichtinvasive Diagnostik zum Nachweis eines Lungenkarzinoms, allerdings ist ihre diagnostische Genauigkeit abhängig von der Zahl der gewonnenen Proben, der Aufarbeitung dieser sowie der Tumorlage und Tumorgröße; die Methode ist bei zentralen Tumoren und bei bestehenden Hämoptysen geeignet

(Risse et al. 1987). Es sollte immer eine histologische Sicherung der Raumforderung angestrebt werden.

1.6.4 Bronchoskopie

Die Bronchoskopie mit der Möglichkeit der zytologischen und histologischen Sicherung der Raumforderung ist der wichtigste Schritt (Classen et al. 2009). Falls der Tumor bronchoskopisch nicht zu fassen ist, sollten andere Verfahren evaluiert werden wie beispielsweise eine transthorakale Feinnadelpunktion (TT-FNA), die transbronchiale endoluminale und sonographiegesteuerte Biopsie (EBUS-FNA) oder eine transösophageale Biopsieentnahme (EUS-FNA) (Seifert und Nemat 2010).

1.6.5 Positronenemissionstomographie (PET)

Dieses Verfahren beruht auf der erhöhten biologischen Aktivität von Tumorzellen. Für das NSCLC ist die Fluordesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET) als diagnostisches Verfahren empfohlen (Seifert und Nemat 2010). Die Kombination von FDG-PET und CT (FDG-PET-CT) bietet bei einer Auflösung von bis zu 4 mm eine hohe Genauigkeit zur Abklärung des Lymphknotenstatus und der Fernmetastasen. Dieses Verfahren ist jedoch anfällig für Prozesse mit erhöhtem Zellumsatz wie Entzündungen.

1.6.6 Skelettszintigraphie

Ein unauffälliger Befund erlaubt es, Knochenmetastasen auszuschließen, eine positive Knochenszintigraphie bedarf weiterer Abklärung. Falls eine FDG-PET mit kompletter Skelettdarstellung erfolgt ist, kann auf eine Szintigraphie verzichtet werden, da die FDG-PET-Untersuchung der Knochenszintigraphie überlegen ist. Gemäß aktuellen Metaanalysen weist die konventionelle Skelettszintigraphie eine Sensitivität von 82% bei einer Spezifität von 62% beim Nachweis von ossären Metastasen auf, die FDG-PET-Diagnostik hingegen weist Werte sowohl für Sensitivität als auch Spezifität von über 90% auf (Silvestri et al. 2007).

1.6.7 Schädel-MRT oder Schädel-CT

Die Indikation besteht bei Patienten mit neurologischer Symptomatik, einem kurativen Therapieplan und bei Patienten mit einer aggressiven, multimodalen Therapie. Absolute Indikation besteht bei einem kleinzelligen Karzinom (Seifert und Nemat 2010).

1.6.8 Weitere Möglichkeiten zur histologischen Sicherung

Falls mittels der oben genannten Verfahren keine histologische Sicherung erzielt werden konnte, besteht als invasives Verfahren die Möglichkeit einer Feinnadelbiopsie oder CT-gesteuerten Punktion der Raumforderung. Dieser Eingriff geht mit einer erhöhten Komplikationswahrscheinlichkeit einher, wie beispielsweise Pneumothorax und Zellverschleppung. Eine weitere Möglichkeit bietet die Punktion von malignen Pleuraergüssen, falls diese begleitend zum Tumorgeschehen vorhanden sind, sowie als weiteres Verfahren eine Thorakotomie/Thorakoskopie.

1.6.9 Lymphknotenstaging, physiologisches Staging und Metastasierung

Das Lymphknotenstaging mit dem Ziel, den Lymphknotenbefall zu klären, kann sowohl präoperativ als auch intraoperativ erfolgen und ist von entscheidender Bedeutung bei der Frage nach einem neoadjuvanten Therapieansatz. CT-Aufnahmen sind unerlässlich für das präoperative Staging nicht kleinzelliger Bronchialkarzinome, um eine Beteiligung mediastinaler Lymphknoten, der Plaura und abdominelle Metastasierung zu entdecken. Eine Beteiligung mediastinaler Lymphknoten sollte histologisch mittels Mediastinoskopie oder Thorakotomie abgeklärt werden. Ergänzend kann eine videoassistierte mediastinale Lymphadenektomie (VAMLA) erfolgen (Seifert und Nemat 2010).

Bei Patienten mit einem Lungentumor bestehen oftmals Begleiterkrankungen, die das kardiale und pulmonale System betreffen. Vor geplanten Lungenkarzinomresektionen ist es von Bedeutung, die klinische und funktionelle Operabilität des Patienten abzuschätzen. Die perioperative Letalität nimmt insbesondere bei Patienten in hohem Lebensalter und bei bestehenden Komorbiditäten zu (de Perrot et al. 1999). Vor Durchführung der präoperativen Untersuchungen zum Abschätzen der Operabilität sollte der Patient eine maximale und optimierte Therapie erhalten und sich in kardiopulmonal stabilem Allgemeinzustand befinden (Barrera et al. 2005). Bei Patienten mit erhöhtem Risiko wird zudem eine Lungenfunktionsuntersuchung mit Spirometrie und CO-Transferfaktor oder Ganzkörperplethysmographie (Miller 1993) sowie Bestimmung einer arteriellen Blutgasanalyse (Epstein et al. 1993) empfohlen. Bei pathologischen Befunden

sollte außerdem eine Lungenperfusionsszintigraphie (Pierce et al. 1994) erfolgen. Ziel ist es, die voraussichtliche postoperative FEV_1 und T_{LCO} zu berechnen, hier werden Werte von über 30% des Solls als untere Grenze empfohlen (Pierce et al. 1994, Olsen et al. 1975).

Der regionäre Lymphknotenbefall tritt beim Bronchialkarzinom frühzeitig in Erscheinung. Hämatogene Fernmetastasen sind beim kleinzelligen Karzinom häufig schon bei Diagnosestellung vorhanden, so befinden sich bei Diagnosestellung 25-35% der Patienten in einem „Limited disease"-Stadium und 60-70% sogar in einem „Extensive disease"-Stadium (Classen et al. 2009; Herold 2011). Die häufigsten Lokalisationen für Fernmetastasen sind Leber, Gehirn, Nebennieren und das Skelett.

1.7 Stadieneinteilung

1.7.1 Stadieneinteilung nach TNM und UICC

Die Einteilung des Bronchialkarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation, welche auf einen ersten Vorschlag von Dr. Clifton Mountain zurückgeht und die von der AJCC (American Joint Comitee on Cancer) 1973 und von der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) im Jahr 1974 verabschiedet wurde. Diese Klassifikation ist eine weltweit etablierte Methode, um maligne Tumorerkrankungen anhand der Tumorausbreitung (T), des Lymphknotenstatus (N) und der Fernmetastasierung (M) gemäß ihrer Prognose in verschiedene Stadien einzuteilen. Eine aktualisierte 7. Auflage der TNM-Einteilung wurde im Jahre 2009 veröffentlicht (Detterbeck et al. 2009). Die TNM-Klassifikation ist in der Tabelle 1.1 und Tabelle 1.2 und die Stadieneinteilung nach UICC in der Tabelle 1.3 und 1.4 zu sehen. Auffällig in der aktualisierten Ausgabe ist eine genauere Klassifizierung gemäß der Tumorgröße. Tumoren ≤ 3 cm wurden bisher als T1 klassifiziert, in der neuen Ausgabe werden diese in T1a (<2 cm) und T1b (>2 cm) differenziert. Genauso zeigt es sich bei den Tumoren >3 cm, nach der neuen Klassifizierung werden diese in T2a (3-5 cm) und T2b (5-7 cm) eingeteilt. Tumoren, welche eine Größe von >7 cm betragen, verhalten sich prognostisch wie T3-Tumore und werden nun in der neuen Einteilung generell als T3 klassifiziert. Eine weitere Änderung besteht bei Befall von umliegenden Strukturen. Die in der 6. Auflage als T4 klassifizierten zusätzlichen Lungenherde im selben Lungenlappen werden nun als T3 definiert, der Befall eines ipsilateralen Lappens, ehemals als M1 klassifiziert, wird nun als T4 bezeichnet. Tumorherde in einem kontralateralen Lungenlappen werden nun als M1a bezeichnet. Auffallend ist, dass eine Infiltration des N. phrenicus als T3 bezeichnet wird und ein Befall des N. laryngeus recurrens bei schlechterer Prognose als T4.

Tabelle 1.1: 7.TNM-Klassifikation der Bronchialkarzinome. Aus Detterbeck et al. 2009

T	**Primärtumor**
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar oder positive Zytologie im Sputum oder bei Bronchialspülung, Tumor jedoch weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumordurchmesser < 3cm, Tumor umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus
T1a	Größter Tumordurchmesser <2 cm
T1b	Größter Tumordurchmesser >2 und <3 cm
T2	Größter Tumordurchmesser >3 cm und <7 cm und eines der folgenden Kriterien: Befall des Hauptbronchus >2 cm distal der Carina, Infiltration der Pleura visceralis, assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus
T2a	Größter Tumordurchmesser >3 und <5 cm
T2b	Größter Tumordurchmesser >5 und <7 cm
T3	Größter Tumordurchmesser >7 cm oder Tumor jeder Größe mit direkter Infiltration wenigstens einer der folgenden Strukturen: Brustwand (inkl. Sulcus-superior-Tumoren), Zwerchfell, N. phrenicus, Parietales Perikard und Mediastinale Pleura oder Befall des Hauptbronchus <2 cm distal der nichtbefallenen Carina, oder Tumor mit Atelektase oder obstruktiver Entzündung der ganzen Lunge oder separate Tumorknoten im selben Lappen wie der Primärtumor
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration wenigstens einer der folgenden Strukturen: Mediastinum, große Gefäße, Trachea, N. laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper, Carina oder vom Primärtumor getrennte Tumorknoten in einem anderen Lungenlappen derselben Seite
N	**Regionäre Lymphknoten (LK)**
Nx	regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	keine regionären Lymphknoten

N1	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen perihilären Lymphknoten
N2	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subcarinalen Lymphknoten
N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hiliären, ipsi- oder kontralateralen Skalenus LK oder supraklavikulären LK
M	**Fernmetastasen**
M0	keine Fernmetastasen
M1a	Vom Primärtumor getrennte Tumorherde in einem kontralateralen Lungenlappen, Pleurametastasen oder maligner Pleura- oder Perikarderguss
M1b	Andere Fernmetastasen

Tabelle 1.2: 6.TNM-Klassifikation der Bronchialkarzinome. Aus UICC 2002

T	**Primärtumor**
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar oder positive Zytologie im Sputum oder bei Bronchialspülung, Tumor jedoch weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumordurchmesser < 3 cm, Tumor umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus
T2	Wenigstens eines der folgenden Kennzeichen ist erfüllt: - größter Tumordurchmesser >3 cm oder - Befall des Hauptbronchus >2 cm distal der Carina oder - Infiltration der Pleura visceralis oder - assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge
T3	Tumor jeder Größe mit direkter Infiltration wenigstens einer der folgenden Strukturen: Brustwand (inkl. Sulcus-superior-Tumoren), Zwerchfell, parietales Perikard oder mediastinale Pleura oder Befall des Hauptbronchus <2 cm distal der nichtbefallenen Carina, oder Tumor mit Atelektase oder obstruktiver Entzündung der ganzen Lunge
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration wenigstens einer der folgenden Strukturen:

	Mediastinum, große Gefäße, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper, Carina oder Tumor mit malignem Pleuraerguss oder vom Primärtumor getrennte Tumorknoten Lungenlappen derselben Seite
N	**Regionäre Lymphknoten (LK)**
Nx	regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	keine regionären Lymphknoten
N1	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen perihilären Lymphknoten
N2	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subcarinalen Lymphknoten
N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hiliären, ipsi- oder kontralateralen Skalenus LK oder supraklavikulären LK
M	**Fernmetastasen**
Mx	Fernmetastasen nicht beurteibar
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen, auch vom Primärtumor getrennte Tumorherde in einem anderen Lungenlappen (ipsi-oder kontralateral)

Tabelle 1.3: UICC-Stadium (2009). Aus Detterbeck et al. 2009

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a, T1b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b T1a, T1b, T2a	N0 N1	M0 M0
IIB	T2b T3	N1 N0	M0 M0
IIIA	T1a, T1b, T2a, T2b T3 T4	N2 N2, N2 N0, N1	M0 M0 M0
IIIB	Jedes T T4	N3 N2	M0 M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1a, M1b

Tabelle 1.4: UICC-Stadium (2002). Aus UICC 2002

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0

IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T1	N1	M0
IIB	T2 T3	N1 N0	M0 M0
IIIA	T1,T2 T3	N2 N1, N2	M0 M0
IIIB	jedes T T4	N3 jedes N	M0 M0
IV	jedes T	jedes N	M1

1.7.2 Stadieneinteilung beim kleinzelligen Bronchialkarzinom

Da das kleinzellige Lungenkarzinom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung meist schon metastasiert hat, kann auch folgende Einteilung benutzt werden (Classen et al. 2009; Herold 2011):

- Very limited disease (Stadium I):

T1-T2 ohne hiliären Lymphknotenbefall

- Limited disease (Stadium I-III nach TNM):

Befall eines Hemithorax mit oder ohne ipsi- oder kontralaterale mediastinale oder ipsilaterale supraklavikuläre Lymphknotenmetastasen und mit oder ohne ipsilateralen Pleuraerguss unabhängig vom zytologischen Ergebnis

- Extensive disease (Stadium IV nach TNM):

Jede Ausbreitung, die mehr als limited disease darstellt.

1.8 Therapie

Das Therapieverfahren wird in Abhängigkeit von Histologie und Stadium des Bronchialkarzinoms gewählt.

1.8.1 Chirurgische Resektion

Für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom in den Stadien I und II ist Operation in kurativer Absicht das Verfahren der Wahl, dies meint eine vollständige Resektion des Tumors mit histologisch tumorfreien Resektionsrändern und eine radikale Lymphadenektomie; rechts beinhaltet dies die Lymphknotenstationen 2, 4, 7, 8 und 9; auf der linken Seite die Stationen 4, 5, 6, 7, 8, und 9 (Seifert und Nemat 2010). Der

onkologisch kleinstmögliche Eingriff ist die Lobektomie; in Abhängigkeit der Tumorlokalisation kann jedoch auch eine Pneumektomie oder rechtseitig eine obere Bilobektomie (Entfernung von Ober- und Mittellappen) oder eine untere Bilobektomie (Entfernung von Unter- und Mittellappen) erforderlich sein (Henne-Bruns et al. 2001). Keilresektionen, Segmentresektionen und atypische Resektionen sollten nur bei funktionellen Einschränkungen durchgeführt werden und gehen mit einem erhöhten Risiko an Lokalrezidiven und einem reduzierten Gesamtüberleben einher (Sugarbaker 2003). Tumoren, bei denen aufgrund der zentralen Lokalisation eine Pneumektomie erforderlich wäre, stellt die Manschettenresektion eine Alternative dar, um möglichst viel gesundes Lungengewebe zu erhalten. Hierbei wird ein Lungenlappen inklusive einer Manschette des Hauptbronchus reseziert mit nachfolgender Reanastomisierung des nachgeschalteten Bronchus (Henne-Bruns et al. 2001).

1.8.2 Strahlentherapie

Die Radiotherapie findet ihre Anwendung bei funktioneller Inoperabilität, nichtresektablen Tumorstadien, Verweigerung zur Operation sowie als adjuvante Therapieoption, wenn sich operativ ein N2-Befall gezeigt hat oder lediglich eine R1- oder R2-Resektion möglich war. Inoperable Patienten im Stadium I/II sollten mit konventioneller Fraktionierung eine Gesamtdosis von >60 Gy erhalten oder nach dem sogenannten CHART-Regime (hyperfraktionierte, akzelerierte Radiotherapie) behandet werden (Rowell und Williams 2001). Bei Patienten im Stadium IIIA empfiehlt sich eine Radiochemotherapie. Die Bestrahlung sollte bis spätestens 4 Wochen nach Beenden der adjuvanten Chemotherapie beginnen und eine Dosis von 50-60 Gy betragen. Eine Sonderstellung stellt der Pancoast-Tumor dar, ein peripheres Lungenkarzinom der Lungenspitze, das Pleurakuppe und Thoraxwand arrodiert und dabei Halssympathikus und zervikale Nervenwurzeln schädigt. Hier wird im Stadium II-IIIB eine neoadjuvante Radiochemotherapie mit nachfolgender Operation empfohlen (Marra et al. 2007; Rusch et al. 2007). Die Strahlentherapie wird ebenfalls zur Schmerztherapie bei Knochenmetastasen eingesetzt, hier ist eine Einzeitbestrahlung mit 8 Gy sowie eine fraktionierte Strahlentherapie (4x5 Gy oder 10x3 Gy) möglich (Rades et al. 2005).

1.8.3 Pharmakotherapie

Chemotherapeutika werden sowohl als neoadjuvante und adjuvante Therapie als auch in palliativen Therapiekonzepten angewandt. Als neoadjuvante Therapie dienen sie zur

Tumorreduktion um eine Operation zu ermöglichen und Mikrometastasen zu erfassen. Das Ziel ist es, eine vollständige Resektabilität zu ermöglichen. Die neoadjuvante Chemotherapie als Bestandteil der Therapie, ist bislang überwiegend in Stadium III untersucht worden. Eine randomisierte Studie konnte in der Multivarianzanalyse einen Überlebensvorteil für Patienten im Stadium N0 oder N1 mit neoadjuvanter Chemotherapie zeigen, jedoch nicht für Patienten im Stadium N2 (Depierre et al. 2002). Die adjuvante Chemotherapie wird zur systemischen Behandlung von Mikrometastasen und zur Senkung der Rezidivrate eingesetzt. Drei randomisierte Phase-III-Studien zeigten eine signifikante Verlängerung des Überlebens mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 15% mit adjuvanter Chemotherapie im Vergleich zu 4,1% ohne Chemotherapie; außerdem konnte die 5-Jahres-Rate an tumorfreiem Überleben von 5,1% auf 12 % angehoben werden (Arriagada et al. 2004; Douillard et al. 2006; Winton et al. 2005).

1.8.4 Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Da das kleinzellige Bronchialkarzinom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in den meisten Fällen bereits disseminiert ist, stellt hier die operative Therapie nur eine geringe Rolle dar, in diesen Fällen muss primär systemisch behandelt werden. Im Stadium T1N0 ist eine primäre Operation mit Polychemotherapie und Bestrahlung indiziert (Herold 2011; Seifert und Nemat 2010). Nach Erreichen einer Remission wird zur Verbesserung der Prognose eine prophylaktische Schädelbestrahlung empfohlen. Bei Patienten im Stadium „Extensive disease“ ist der Therapieansatz palliativ mit Polychemotherapie. Bei Metastasen im Bereich des Skeletts und Gehirns sowie oberer Einflussstauung wird eine Radiotherapie durchgeführt.

1.8.5 Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms

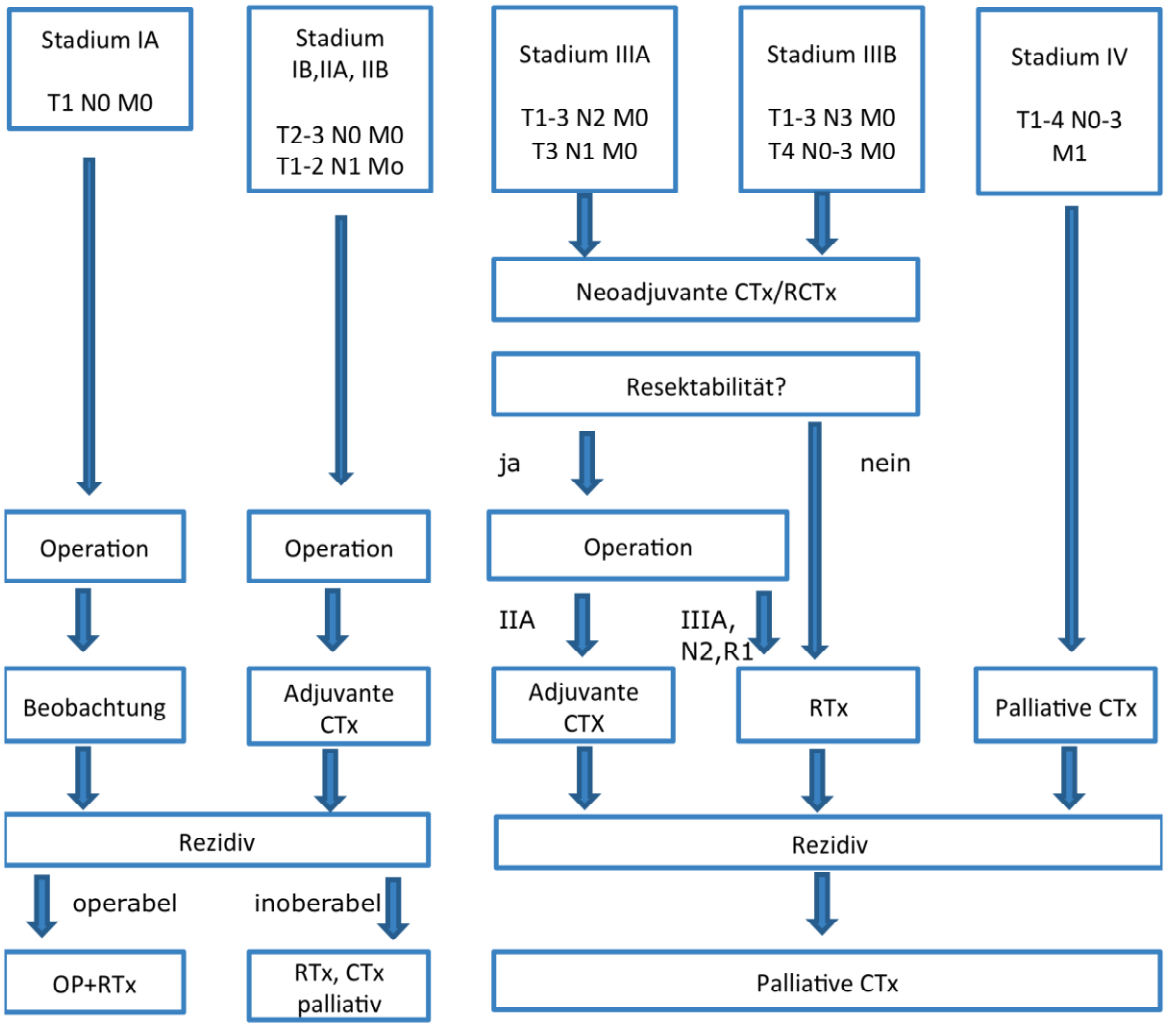


Abbildung 1.4: Behandlungspfad beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom aus Seifert und Nemat 2010, Seite 243

Bei Patienten in frühen Stadien ist ein kurativer Therapieansatz möglich, hier wird in den Stadien I und II bei adäquater Lungenfunktion und beherrschbaren Komorbiditäten eine vollständige Resektion des Tumors mit histologisch tumorfreien Resektionsrändern und radikaler Lymphadenektomie durchgeführt. Um das Resektionsausmaß festzulegen gelten die anatomischen Strukturen, so werden Lobektomien, Bilobektomien und Pneumektomien vorgenommen, in besonderen Fällen auch limitierte Operationen wie Keil-, Segment- und atypische Resektionen, welche jedoch mit einem erhöhten Rezidivrisiko und reduziertem Gesamtüberleben verknüpft sind (Sugarbaker 2003). Ein wichtiger Faktor für den postoperativen Erfolg ist die Erfahrung des Operateurs und der

Klinik. Es konnte gezeigt werden, dass die Mortalität bei Patienten, die in Tumorzentren operiert wurden, deutlich geringer ist als außerhalb (Silvestri et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass eine adjuvante Chemotherapie mit Platinpräparaten das Überleben der Patienten im Stadium II verbessern kann (Winton et al. 2005). Patienten im Stadium III wird eine neoadjuvante Chemotherapie empfohlen, bei der in Studien gezeigt werden konnte, dass es zu einer signifikanten Verbesserung des Überlebens führt im Vergleich zur alleinigen Operation (Rosell et al. 1999; Roth et al. 1998). Um ein Therapiekonzept für Patienten im Stadium IV festzulegen, ist deren Therapiemotivation und Allgemeinzustand, der mit Hilfe des Karnofsky-Index abgeschätzt wird, von zentraler Bedeutung. Der Karnofski-Index ist eine Skala, die von maximal 100 Prozent (keinerlei Einschränkung) bis zu 0 Prozent (Tod) reicht und dient somit der Bewertung von symptombezogener Einschränkung der Aktivität, Selbstversorgung und Selbstbestimmung von Tumorpatienten. Motivierte Patienten in gutem Allgemeinzustand (Karnofsky-Index mindestens 70%) sollten eine Chemotherapie mit Medikamenten der neueren Generation (beispielsweise Paclitaxel, Gemcitabin und Topectan) erhalten. Bei einem Karnofsky-Index bei 60% wird eine Monotherapie mit einem Taxan, Vinorelbin oder Gemcitabin empfohlen. Bei einem niedrigeren Karnofsky-Index ist von einer Chemotherapie abzuraten (Huber und Schalhorn 2009). Darüber hinaus wird diesen Patienten eine palliative Therapie angeboten. Zu den palliativen Behandlungsmaßnahmen gehören: Sauerstofflangzeitapplikation, endobronchiale Lasertherapie, Endobrachyradiotherapie, Implantation tracheobronchialer Stents, Kontrolle maligner Pleura- und Perikardergüsse, Therapie extrathorakaler Metastasen und eine adäquate und individuell auszurichtende Schmerztherapie nach dem WHO-Stufenschema.

1.9 Prognose

Obwohl sowohl die diagnostischen als auch die therapeutischen Möglichkeiten in den letzten Jahren deutlich zugenommen haben, muss dennoch gesagt werden, dass die Prognose des Lungenkarzinoms weiterhin schlecht ist. Die unten stehende Tabelle 1.5 zeigt die Prognose in Abhängigkeit des Stadiums (Brundage et al. 2002) .

Tabelle 1.5: Prognose des NSCLC in Abhängigkeit des klinischen Stadiums (nach Brundage et al. 2002)

Stadium	**3-JÜR (in %)**	**5-JÜR**
cIA (n=687)	71	61
cIB (n=1189)	46	38
cIIA (n=29)	38	34
cIIB (n=357)	33	24
cIIIA (n=551)	18	13
cIIIB (n=1030)	7	5
cIV (n=1427)	2	1

1.10 Tumorangiogenese

Die gefäßwandbildenden Endothelzellen gehören zu den sich am seltensten teilenden Zellen (Denekamp 1993). Die Steuerung der Neoangiogenese erfolgt über Stimulatoren und Inhibitoren, die sich unter physiologischen Bedingungen im Gleichgewicht befinden. Im Rahmen dieses Gleichgewichtes findet ein notwendiger Zellumsatz, jedoch kein quantitativer Zuwachs an Endothelzellen statt (Denekamp 1993). Demnach erfolgt unter physiologischen Bedingungen keine Angiogenese; sie findet kontrolliert und kurzzeitig für Prozesse wie beispielsweise der Wundheilung statt.

Tumorzellen bilden in der Regel zusammenhängende Cluster und sind auf passive Diffusion für die Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport von Abfallprodukte angewiesen (Sutherland 1988). Ab einer Tumorgröße von zirka 3 mm^2 ist die Ernährung des Gewebes durch alleinige Diffusion nicht mehr gewährleistet und somit ist ein weiteres Wachstum nur möglich, wenn der Tumor zur Angiogenese, also der Aussprossung von Kapillaren aus vorbestehenden Blutgefäßen, fähig ist. Durch diesen Prozess gelangt der Tumor aus dem avaskulären in den vaskulären Zustand, der Tumor erfährt einen sogenannten „angiogenen Switch“ was seine Transformation in den angiogenen Typ beschreibt (Hanahan und Folkman 1996). Es gibt eine große Anzahl von proangiogenen und antiangiogenen Faktoren, einige werden vom Tumor selbst

produziert, andere entstehen von den Wirtszellen als Reaktion auf den Tumor und wieder andere kommen im normalen Gewebe vor (Carmeliet und Jain 2000). Der Übergang in die angiogene Phase (Hanahan und Folkman 1996) ist ein hochkomplizierter Prozess, welcher noch nicht vollständig geklärt wurde, es wird jedoch angenommen, dass die Hypoxie eine wichtige Stelle einnimmt (Shweiki et al. 1992).

Beim „angiogenen Switch“ ist das Verhältnis von Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese für die Gefäßneubildung verantwortlich (Campbell et al. 1998; Hanahan und Folkman 1996). Durch den angiogenen Stimulus werden Endothelzellen in der Nähe des Tumors aktiviert (Papetti und Herman 2002) und es kommt zur Sekretion von proteolytischen Enzymen, welche weitestgehend in Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und den Plasminogen-Aktivator (PA) eingeteilt werden können (Pepper 2001). PA aktiviert Plasminogen zu Plasmin. Das erste Ziel dieser Proteasen ist die Basalmembran (Pepper 1997), ihre Destabilisierung erlaubt es nun den Endothelzellen in die umliegende Matrix einzudringen, zu proliferieren und in Richtung des auslösenden Reizes zu migrieren. Die Endothelzellen sezernieren auf ihrem Weg weiterhin proteolytische Enzyme, welche die Extrazelluläre Matrix auflösen (Burke und DeNardo 2001) sowie Wachstumsfaktoren wie beispielsweise VEGF. Die migrierenden Endothelzellen bilden ein Lumen als Vorstufe für ein neues Gefäß, welches bis dahin als „unreif“ bezeichnet wird (Ferrara et al. 2003). Anschließend erfolgt die Bildung von geschlossenen Anastomosen und die Entstehung eines funktionellen Gefäßnetzes, jedoch sind die tumorbezogenen Zellen aufgrund der kontinuierlichen Sekretion von proangiogenen Faktoren nicht in der Lage, eine Stabilität und kontinuierliche Basalmembran auszubilden (Papetti und Herman 2002). Insgesamt ist das Gefäßnetz unregelmäßig, undicht und gewunden (Hashizume et al. 2000). Angiogenese unter physiologischen Bedingungen erfährt einen Reifungsprozess, die Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren sistiert, die Migration, Proliferation und Proteolyse kommen zum Stillstand, es werden enge Zell-Zell-Verbindungen und eine kontinuierliche Basalmembran aufgebaut (Paweletz und Knierim 1989). Dieser Reifungsprozess entfällt bei der tumorinduzierten Angiogenese. Durch das stetige Wachstum des Tumors besteht ständig ein hypoxisches Areal im zentralen Bereich des Tumors und somit der Bedarf einer verbesserten Blutversorgung. Durch die Angiogenese wird der Tumor nun zum einen mit Sauerstoff und Nähstoffen versorgt, wodurch ein schnelles Wachstum möglich wird (Muthukkaruppan et al. 1982) und zum anderen erhöht es die Wahrscheinlichkeit, dass Tumorzellen in die Blutbahn gelangen (Schirrmacher 1985). Somit ist die Neoangiogenese für das Wachstum, die Progression und Metastasierung von Tumoren essentiell (Folkman 1989). Dies hat die Hoffnung geschürt,

einen therapeutischen Angriffspunkt auf der Basis der Anti-Angiogenese zu finden, um den Tumor in seinem avaskulären Zustand zu halten.

1.11 Angiogenesefaktoren

In den letzten Jahren sind verschiedene Angiogenesefaktoren, die von Zellen wie Monozyten, Endothelzellen, Bindegewebszellen, Lymphozyten und Tumorzellen freigesetzt werden, identifiziert worden. Die Tabelle 1.6 gibt einige Angiogenesefaktoren und deren Hauptfunktionen wieder. Das derzeit am häufigsten angewandte Verfahren zur Quantifizierung der Angiogenese in malignen Tumoren ist die Bestimmung der intratumoralen Gefäßdichte (MVD). Um die Kapillaren darzustellen sind spezifische Marker und immunhistochemische Verfahren erforderlich.

Tabelle 1.6: Angiogenesefaktoren und deren Hauptfunktionen

Faktor	**Expression**	**Funktion**	**Referenzen**
Angiopoietin-1 (Ang-1)	Expression durch Perizyten im normalen Gewebe und Tumorzellen	Stimulation der Endothelzellen; Hemmung der Endothelzellapoptose, Reifung neuer Gefäße	(Davis et al. 1996; Jones 1997; Stratmann et al. 1998)
Angiopoietin-2 (Ang-2)	freigesetzt von aktivierten Endothelzellen	Lockerung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte	(Jones 1997; Stratmann et al. 1998)
Angiostatin	Nebenprodukt der Plasminogenproteolyse	Hemmung der Endothelzellmigration, Proliferation und Gefäßformierung	(Moser et al. 2002; O'Reilly et al. 1994; Stack et al. 1999)
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	Expression in normalem Gewebe und Tumorgewebe	Stimulation der Proliferation und Expression des Plasminogen Aktivator	(Han und Liu 1999; Presta et al. 1992; Shing et al. 1984)
Endostatin	Nebenprodukt der Kollagenproteolyse	Hemmung der Endothelzellmigration, Proliferation und Gefäßbildung	(O'Reilly et al. 1997)
IF-α/β, Interleukine	freigesetzt von Immunzellen	Hemmung der Endothelzellmigration, Proliferation; Downregulation von VEGF und bFGF	(Carmeliet und Jain 2000; Dvorak und Gresser 1989; Maier et al.

			1999)
Matrix Metalloproteinase (MMPs)	freigesetzt von Tumorzellen und aktivierten Endothelzellen	Degradation der Basalmembran und ECM, Erleichterung der Zellmigration	(Vihinen und Kahari 2002)
Plasminogen Aktivator (PAs)	freigesetzt von aktivierten Endothelzellen	Aktivierung von Plasminogen in Plasmin	(Pepper 2001; Pepper et al. 1992)
Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI)	freigesetzt von Fibroblasten und aktivierten Endothelzellen	Hemmung der Erzeugung von Angiostatin, Hemmung der PA-induzierten Proteolyse und der Endothelzellmigration	(Pepper 2001; Pepper et al. 1992)
Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	freigesetzt von Thrombozyten, aktivierten Endothelzellen, Makrophagen	Stimulation der Strangbildung der Endothelzellen, Rekrutieren von glatten Muskelzellen und Pericyten	(Hirschi und D'Amore 1996; Papetti und Herman 2002; Uemura et al. 2002)
Plasmin	entsteht aus aktiviertem Plasminogen durch PA	Degradation der Basalmembran und ECM, Erleichterung der Zellmigration	(Pepper 2001; Stack et al. 1999)
Transforming Growth Factor β (TGF-β)	exprimiert in normalem Gewebe und Tumorgewebe, aktiviert durch Plasmin	Stimulation der Endothelzellformation, PA-Expression und Synthese der ECM	(Bikfalvi 1995; Mandriota et al. 1996)
Tissue-Inhibitors of MMP (TIMPs)	Vorkommen in normalem Gewebe	Hemmung von Angiostatin, Hemmung der Proteolyse durch MMPs und Endothelzellmigration	(Jiang et al. 2002; Vihinen und Kahari 2002)
Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF-α)	freigesetzt von aktivierten Makrophagen	Stimulation der Endothelzellformation, Hemmung der Endothelzellproliferation und Migration	(Maier et al. 1999; Papetti und Herman 2002)
Thrombospondin-1 (TSP-1)	freigesetzt von Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Makrophagen und Tumorzellen	Hemmung der Endothelzellmigration und Proliferation, sowie der Gefäßbildung und Synthese der ECM	(Good et al. 1990; Han und Liu 1999)

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	freigesetzt von hypoxischen Tumorzellen und Makrophagen	Stimulation der Endothelzellen, Proliferation, Exprssion der Proteasen, Differenzierung und Permeabilität	(Ferrara 2000; Klagsbrun und D'Amore 1996; Leung et al. 1989)

1.11.1 CD31 (PECAM-1)

CD31 oder auch PECAM-1 genannt, ist ein einkettiges transmembranes Glykoprotein vom Typ I mit einer Molekülmasse von 130 kDa, das Bestandteil der Basalmembran ist und der Immunglobulin-Gen-Superfamilie angehört. Es ist auf den Zellen des vaskulären Systems vorhanden, wobei es auf den Endothelzellen mit einer Dichte von einer Million Molekülen pro Zelle am stärksten exprimiert wird, im Vergleich dazu enthalten Monozyten und Neutrophile Granulozyten etwa 100.000 Moleküle pro Zelle (Newman 1994). Durch das Verteilungsmuster lässt sich erkennen, dass CD31 eine wichtige Rolle in der Gefäßfunktion einnimmt (Newman 1997). CD31 ist ein sehr spezifischer Marker für vaskuläre Endothelzellen und in einer hohen Dichte auf den Endothelzellen exprimiert. Durch den Einsatz von CD31-Antikörper ist es somit möglich, Blutgefäße und Angiogeneseprozesse zu markieren. Es gibt viele Beweise dafür, dass CD31 eine wichtige Stellung in der Adhäsionskaskade während Entzündungsprozessen einnimmt, was zur Extravasation der Leukozyten führt. Muller et al. waren die ersten, die zeigten, dass Monozyten oder Neutrophile, welche mit spezifischen PECAM-1- Antikörpern vorbehandelt wurden, eine Endothelschicht deutlich schlechter passieren konnten. Durch Blockierung der endothelialen Zellverbindung, blockiert PECAM-1 ebenfalls die Transmigration der Leukozyten, dies zeigt, dass PECAM-1 sowohl auf Seiten der Endothelzellen als auch auf Seiten der Leukozyten fungiert (Muller et al. 1993). Albelda et al. konnten zeigen, dass PECAM-1 homophile Bindungen zwischen CD31 Molekülen eingeht (Albelda et al. 1991). Die homophilen PECAM-1/PECAM-1-Verbindungen sind dafür verantwortlich, dass sich die Konzentration dieser Moleküle an den Endothelzellen der intrazellulären Verbindungen erhöht (Albelda et al. 1991). Mehrere Studien konnten außerdem zeigen, dass PECAM-1 neben homophilen Verbindungen auch heterophile Verbindungen mit nichttransfizierten, PECAM-1-negativen Zellen eingeht (Albelda et al. 1991; Muller et al. 1992). PECAM-1 ist außerdem für eine Signalweiterleitung in die Zelle verantwortlich und erhält Signale aus der Zelle. Der erste experimentelle Nachweis über eine Signaltransduktion in die Zelle, zeigten die Studien von Tanaka et al (Tanaka et al. 1992). Eine Antikörper-induzierte Dimerisierung von PECAM-1 auf der Oberfläche von T-

Zellen führt zu einer verstärkten Adhäsion an die Substrate von β_1-Integrinen VCAM-1 (über $\alpha_4\beta_1$) und Fibronectin (über $\alpha_5\beta_1$) (Tanaka et al. 1992). Die Funktion von β_2-Integrinen wird ebenfalls moduliert durch die Dimerisierung von PECAM-1 in den Lymphokin-aktivierten Killerzellen (Piali et al. 1993), den Monozyten und Neutrophilen (Berman und Muller 1995) und in den natürlichen Killerzellen (Berman et al. 1996). De Lisser et al. konnten unter anderem zeigen, dass Zellen, die mit PECAM-1 transfiziert wurden, ihre zytoplasmatische Domäne verlieren und so nicht mehr fähig sind, mit nichttransfizierten Zellen zu assoziieren und ihre heterophile Bindungsfähigkeit verloren geht (DeLisser et al. 1994). Weitere Studien konnten zeigen, dass PECAM-1 an bestimmten Tyrosinresten phosphoryliert wird und Tyr_{663} in der zytoplasmatischen Domäne von PECAM-1 eine spezifische Bindungsstelle für Srs-homology 2 (SH2) darstellt, eine Domäne der Protein-Thyrosin Phosphatase, SHP-2 (Jackson et al. 1997). SHP-2 ist eine ubiquitär exprimierte Thyrosinphosphatase, welche mit mehreren autophosphorylierten Rezeptor-Tyrosinkinasen assoziiert ist wie PDGF und EGF (Feng et al. 1993; Vogel et al. 1993). PECAM-1 scheint, zusätzlich zu seiner Rolle bei der Aktivierung von Integrinen über eine Signaltransduktion von außen nach innen, auch in der Lage zu sein, auf Integrin-vermittelte Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen zu reagieren. Lu et al. konnten zeigen, dass die Bindung von Integrinen in kultivierten Endothelzellen zu einer Dephosphorylierung von PECAM-1 führt (Lu et al. 1996), während die Studien von Jackson et al. Zeigen konnten, dass die Integrin-vermittelte Wechselwirkung in einer Erhöhung der Thyrosinphosphorylierung von PECAM-1 resultiert (Jackson et al. 1997). Man geht davon aus, dass das relative Gleichgewicht der Kinasen- und Phosphatasenaktivität die Phosphorylierung von PECAM-1 und von anderen zellulären Rezeptoren steuert.

1.11.2 PEDF

PEDF ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 50 kDa, das in den späten 1980-er Jahren von Joyce Tombran-Tink und Lincoln Johnson während Studien an humanen retinalen Pigmentepithelzellen entdeckt wurde (Tombran-Tink et al. 1991). Sie erkannten, dass PEDF als Serin-Protease-Inhibitor der Serpinfamilie angehört, jedoch konnte kein inhibitorischer Effekt auf Proteasen nachgewiesen werden (Becerra et al. 1995). PEDF vereinigt mehrere Eigenschaften. Es agiert als Überlebensfaktor für zerebrale Granulazellen im Kleinhirn (Taniwaki et al. 1995), für spinale Motoneurone (Bilak et al. 1999) und Neurone des Hippocampus (DeCoster et al. 1999). Außerdem weist PEDF ein sehr großes Potential als antiangiogener Faktor während der

Neovaskularisierung von Blutgefäßen auf (Tombran-Tink und Barnstable 2003b, a). Dawson et al. zeigten, dass PEDF ein potenter Angiogeneseinhibitor speziell im Auge ist (Dawson et al. 1999). PEDF besitzt die Fähigkeit, die Apoptose von endothelialen Zellen in aktiven Umbauprozessen von Gefäßen zu induzieren (Bouck 2002; Jimenez und Volpert 2001); eine entscheidende Rolle dabei spielt die Aktivierung des Fas/Fas-L-Signalweges (Volpert et al. 2002). Endothelzellen, stimuliert durch VEDF und bFGF, exponieren Fas an ihrer Oberfläche und PEDF induziert die Expression von FasL. Lediglich die Endothelzellen, die sich im Umbau befinden, sind empfänglich für die Induktion der Apoptose durch PEDF (Volpert et al. 2002). Die Fähigkeit, Neovaskularisation im Gewebe zu unterdrücken, impliziert, dass der Verlust von PEDF während maligner Prozesse ein optimales Umfeld für Tumorvaskularisation darstellt. So gelang es beispielsweise Crawford et al. zu zeigen, dass PEDF in Neuroblastomen das Gleichgewicht des proangiogenen Effektes von VEGF beeinflusst (Crawford et al. 2001). PEDF fungiert nicht nur als Inhibitor der Tumorangiogenese, PEDF hat auch einen direkten Effekt auf die Tumorzellapoptose. Doll et al. konnten zeigen, dass PEDF die Apoptose in kultivierten Prostatatumorzellen triggert (Doll et al. 2003). PEDF führt zum einen direkt zu einer stress-induzierten Apoptose von Tumorzellen, zum anderen indirekt durch die Hemmung der Angiogenese, was wiederum einen hypoxischen Stress bedeutet. Ein weiterer Effekt von PEDF ist, dass es die Migration verschiedener Zelllinien hemmt, dies konnte beispielsweise bei Melanomzellen, bei denen PEDF überexprimiert wurde, gezeigt werden (Garcia et al. 2004). Ein möglicher Mechanismus könnte hier die Bindung von PEDF an Kollagen I und Kollagen III sein (Kozaki et al. 1998).

1.12 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob durch den Vergleich der immunhistochemisch gefärbten Proben der Patienten, die an einem Bronchialkarzinom erkrankt waren, eine Korrelation in der Expression von CD31 und PEDF zu erkennen ist. Durch die Erhebung der klinischen Daten sowie der Follow-up-Daten ist zu untersuchen, ob zudem eine Aussage anhand der CD31- und PEDF-Expression zur Prognose möglich ist. Die Überlebensanalyse und somit Untersuchung zur Prognoseaussage wurde anhand des Kollektivs der Patienten, welche an einem Plattenepithelkarzinom erkrankt waren, durchgeführt. Eine weitere Dissertationsarbeit aus der Arbeitsgruppe untersuchte hier den Einfluss bei den Patienten, die an einem Adenokarzinom erkrankt waren. In der vorliegenden Arbeit wurden widerum die beiden Tumorentitäten verglichen. Interessant ist hier, ob Unterschiede im Expressionsmuster bei einem Plattenepithel- und Adenokarzinom der Lunge zu sehen sind. PECAM-1

könnte darüber hinaus ein Ziel für künftige Antikrebsmedikamente sein. Es ist ein Molekül, das eine potentielle Aktivität in der Pathogenese von Tumoren einnimmt. Als Molekül der Zelladhäsion und Signaltransduktion nimmt es an der Angiogenese (DeLisser et al. 1997; Zhou Z et al. 1999) sowie an der Gefäßpermeabilität (Graesser et al. 2002), der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutkreislauf (Schenkel et al. 2004) und dem Widerstand der Endothelzellen gegenüber endotoxischem Stress und Apoptose teil. Folglich könnte die Inhibierung von PECAM-1 das Tumorwachstum hemmen, indem dadurch die Tumorneovaskularisation gehemmt wird. Außerdem sorgt es für eine zunehmende Anfälligkeit für apoptotischen Stress und Begrenzung der Leukozyten-infiltration in den Tumor.

Basierend auf seinen antiangiogenen, antiproliferierenden und prodifferenzierenden Eigenschaften und auf seinem direkten Antitumor-Effekt, welcher bei der Induktion der Differenzierung oder der Apoptose der Tumorzellen involviert ist, wird ebenfalls PEDF ein Antitumorpotential zugesprochen (Ek et al. 2006a, b; Fernandez-Garcia et al. 2007).

2 Material und Methoden

2.1 Datenerfassung und Auswahl des Patientenkollektivs

In dieser Arbeit wurde zum einen das Überleben eines Patientenkollektivs mit Plattenepithelkarzinomen der Lunge in Abhängigkeit verschiedener Einflussgrößen untersucht und zum anderen ein Vergleich zwischen diesem Kollektiv und einer weiteren Patientengruppe mit Adenokarzinomen der Lunge angestellt. Die Einflussgrößen betreffen pathologische Charakteristika wie Stadieneinteilung des Tumors, Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Auswertungsgrößen der CD31-Expression und PEDF-Signalstärke. Für die Auswahl der Patienten konnte auf eine komplexe, relationale Datenbank zugegriffen werden, in der insgesamt 280 Patienten mit einem NSCLC in einem Zeitfenster von 2000 bis 2006 gespeichert sind. In dieser Datenbank (Access 2003) sind die prä-, intra- und postoperativen Patientendaten gespeichert; hier konnte auf die komplexe Vorarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe zurückgegriffen werden. Die präoperativen Daten beinhalten Informationen über die Patienten, die vor einem operativen Eingriff erhoben werden. Diese sind demographische Merkmale (Alter, Geschlecht), Anamneseerhebung mit Symptom- und Beschwerdebeschreibung, eine

umfassende Laboranalyse, Ergebnisse der Diagnostik zum klinischen Staging (Computertomographie des Thorax, Magnetresonanztomographie des Schädels, Sonographie des Abdomens, Bronchoskopie der Lunge mit histologischer Tumorklassifikation (cTNM), Mediastinoskopie, Lungenperfusionsszintigraphie) und funktionelle Parameter (Blutgasanalyse, Lungenfunktionsprüfung, Karnofsky-Index) sowie durchgeführte neoadjuvante Therapien. Intraoperativ werden Informationen festgehalten, die sich auf die Operationsdauer, Lungenresektionstechnik, eventuelle intraoperative Erweiterungen des Resektats, Besonderheiten und Zuordnung der entnommenen Lymphknoten beziehen. Die postoperativen Daten dokumentieren die Verweildauer der Patienten auf der Intensivstation mit Angaben über den intraoperativen Blutverlust und eventuelle Transfusionsapplikation sowie postoperative Komplikationen und gegebenenfalls notwendiger Revisionseingriffe. Auch erfasst wurden Laboranalysen sowie postoperative Behandlungen wie Chemotherapie und Bestrahlung. Ebenfalls angegeben ist die histopathologische TNM-Klassifikation nach Mountain (1997) mit Angabe über Anzahl und etwaige Infiltration der entnommenen Lymphknoten (pT und pN), die TNM-Klassifikation wurde dabei auf die aktualisierte 7.Auflage der Einteilung aus dem Jahr 2009 übertragen. Um eine Verlaufsbeurteilung der Patienten auch nach der stationären Behandlung zu erlangen, wurde in Vorarbeiten an die weiterbetreuenden Haus- und Fachärzte ein strukturierter Nachsorgebogen versandt, in dem der Arzt folgende Informationen mitteilen sollte: Zeitpunkt des letzten Arztbesuches und Auskunft über den Allgemeinzustand des Patienten, der anhand der ECOG-Skala gemessen wurde, Informationen über den Primärtumor (klinischer oder bildgebender Nachweis eines Rezidivs), den eventuellen Zweittumor und ob nach Beenden der primären Therapie noch weitere Behandlungen wie Chemo- oder Strahlentherapien eingeleitet wurden und ob Metastasen aufgetreten sind. Falls der Patient verstorben war, wurden Angaben über Todeszeitpunkt und Ursache dokumentiert. Mit Hilfe dieser Nachsorgebögen war es möglich, den poststationären Verlauf der Patienten festzuhalten. In diese Studie wurden die auf diese Weise in Vorarbeiten erhobenen Daten von insgesamt 69 Patienten mit einbezogen. Die Auswahl des Kollektivs erfolgte nach bestimmten Kriterien, nach denen die Patienten keine Fernmetastasierung und keinen Residualtumor hatten. Der Fokus liegt auf dem Primarius als Todesursache und Vergleiche anhand der Überlebenswahrscheinlichkeiten lassen Rückschlüsse auf die Eigenschaften des Primärtumors zu. Zur Erforschung der Neoangiogenese spielt es eine Rolle, ob der Tumor bereits Fernmetastasen aufweist. Dem Gesamtkollektiv gehören 42 Patienten mit einem Plattenenpithelkarzinom der Lunge und 27 Patienten mit einem Adenokarzinom an.

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Selektion der Tumorblöcke und Anfertigung der Präparate

Nachdem das Patientenkollektiv definiert war, wurden die in Paraffin eingebetteten Tumorblöcke dem Archiv der Pathologie der Georg-August-Universität entliehen. In Zusammenarbeit mit der Pathologie wurden die geeigneten Tumorblöcke mit Hilfe des pathologischen Befundes und der eingehenden Betrachtung der dazugehörigen Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitte am Lichtmikroskop herausgesucht. Es wurde der Tumorblock gewählt, der zum Zeitpunkt der Resektion den größten Anteil an vitalem Tumorgewebe aufweist. Die Tumorblöcke wurden gekühlt, damit sie sich mit dem Schlittenmikrotom SM 2000 R (Leica, Wetzlar, Deutschland), versehen mit einer „Mikrotome Blade S 35 –Klinge“ (Feather, Kita-Ku, Japan), in Präparate von 1 µm zuschneiden ließen. Die Schnitte wurden zuerst in kaltes, entionisiertes Wasser und anschließend behutsam in 45°C warmes Wasser gegeben. Somit wurde eine Streckung der Oberfläche herbeigeführt. Die Schnitte wurden anschließend vorsichtig auf Objektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) angebracht und konnten so über Nacht bei Raumtemperatur trocknen. Durch dieses Verfahren sind die Schnitte im Dunkeln und bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar und einfärbbar.

2.2.2 Beschreibung des immunhistochemischen Verfahrens und der Antikörper

Das in dieser Studie angewandte immunhistochemische Verfahren der indirekten Zwei-Schritt-Methode als Visualisierungsmethode beruht auf der Affinität von Antikörper und Antigenen. Im ersten Schritt wird der spezifische Primärantikörper auf das Gewebe gegeben, dieser geht nun eine Reaktion mit dem zu untersuchenden Epitop ein.
Der CD31- Primärantikörper Clone JC70A ist ein monoklonaler Antikörper der Firma DakoCytomation (Hamburg, Deutschland), der aus der Maus gewonnen wird und immunogen für ein Präparat der Milz-Zellmembran eines Patienten mit Haarzellenleukämie ist. Der Antikörper markiert Endothelzellen und kann somit zur Analyse der Angiogenese bei Tumoren genutzt werden (DeYoung et al. 1995; Engel et al. 1996; Giatromanolaki et al. 1996; Parums et al. 1990). Der Sekundärantikörper rabbit-anti-mouse stammt aus dem Kaninchen und ist ebenfalls von der Firma DakoCytomation (Hamburg, Deutschland). Die Visualisierungsmethode für CD31 ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Das Färbeergebnis ist ein bräunliches Signal.

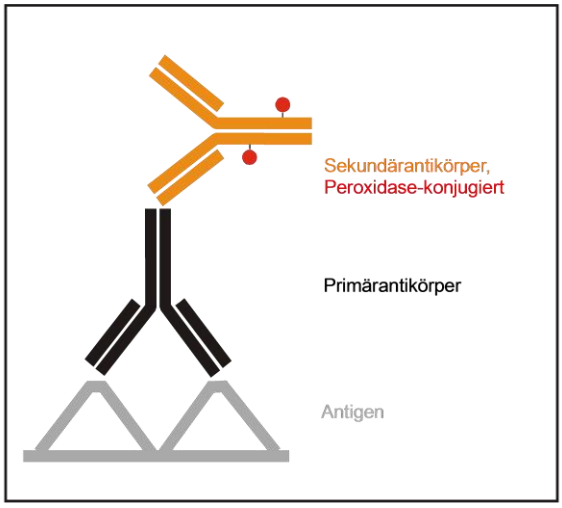


Abbildung 2.1: Darstellung der Visualisierungsmethode für CD31

Als PEDF-Primärantikörper wurde der Anti-human Serpin F1/PEDF Antikörper der Firma R&D (Abingdon, Großbritannien) verwendet. Es ist ein monoklonaler Antikörper der IgG-Fraktion, der aus der Maus gewonnen wird. Als Immunogen dienten menschliche rekombinante Seroinen F1. Die Konzentration des Antikörpers beträgt 25µg/ml. Im nächsten Schritt wird bei dem PEDF-Primärantikörper ein EnVision-Polymer-Konjugat hinzugegeben, dieses geht nun eine weitere Bindung mit dem Primärantikörper ein. Die Zusammensetzung des EnVision-Polymer-Konjugats beinhaltet ein Dextran-Polymer, welches die Sekundärantikörper und das Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) trägt. An das Polymer können etwa 70 Enzyme neben 10 Antikörper binden. Hier wurde das HRP-gelabelte EnVision der Firma DakoCytomation (Hamburg, Deutschland) verwendet. Da sowohl der Sekundärantikörper als auch das EnVision-Polymer-Konjugat mit einem Enzym gekoppelt sind, kann mit einer Enzym-Substrat-Reaktion eine Farbentstehung erzielt werden, wodurch die Reaktion und damit die Anwesenheit des Epitops sichtbar gemacht werden kann. Somit wurde durch Inkubation mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB+) Substratchromogen die Färbung abgeschlossen, die sich als braun gefärbtes Präzipitat am Ort des Antigens darstellt. Die Abbildung 2.2 zeigt die Visualisierungsmethode für PEDF.

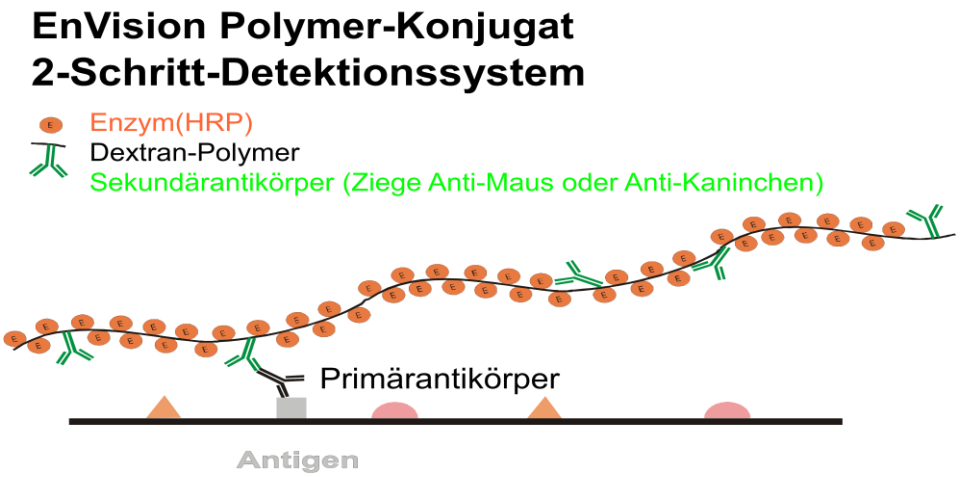


Abbildung 2.2: Darstellung der Visualisierungsmethode für PEDF

Durch Versuchsreihen ließen sich die optimalen Verdünnungen der Antikörper ermitteln, um eine bestmögliche Signalgebung ohne unspezifische Hintergrundfärbung zu erzielen. Antikörper-Diluent dient zur Vorbereitung primärer und sekundärer Antikörperverdünnungen und der negativen Kontrollreagenzien. Eine optimale Farbgebung ließ sich bei dem CD31-Primärantikörper durch eine Verdünnung von 1:30 erzielen. Der Sekundärantikörper wurde 1:100 verdünnt. Der PEDF-Primärantikörper stellte sich mit einer Verdünnung von 1:20 am optimalsten dar.

2.2.3 Molekularbiologische Reagenzien

Tabelle 2.1: Molekularbiologische Reagenzien

Formalin Solution neutral buffered 10%ig	Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraplast Plus (65°C)	Firma Sherwood Medical Co., Norfolk, USA
Hämatoxylin	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumjodat	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalialaun	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Chlorhydrat	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Alkohol 100%-, 96%-, 70%-, 50%-,30%ig	Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland

Entionisiertes Wasser	Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland
Citrat Puffer 10%ig S 2031, pH 6	Firma DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
Tris	Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 3%ig S 2023	Firma DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
AK Diulent S 2022	Firma DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
DAB+ Chromogen	Firma DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
Entellan	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland

2.2.4 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Tabelle 2.2 : Zusammensetzung der Lösung Mayer´s Hämalaun

Mayer's Hämalaun	
Hämatoxylin	1 g
K Al(So_4) 12 H_2O	50 g
Na-Jodat	0,2 g
Zitronensäure	1 g
Chlorhydrat	30 g
Aqua dest.	ad 1 L

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Lösung TBS-Puffer

TBS-Puffer
1,0 M Tris = 60,56 g Tris
3,0 M NaCl = 87,66 g NaCl
=> in 600 ml bi.dest lösen, pH auf 7,6 einstellen und auf 1000 ml auffüllen
=> 500 µl Tween 20
=> Gebrauchslösung 1:10 verdünnen

2.2.5 Färbeprotokoll für CD31 und PEDF

Immunhistochemische Färbeprotokolle bestehen im Wesentlichen aus drei Teilprozessen. Dazu gehören die Gewebevorbereitung, die Antikörperinkubation und die Visualisierung der Reaktion.

Bei Formalin fixiertem Gewebe ist es durch die Einwirkung des Formalins zu einer Vernetzung der Proteine gekommen. Vor der immunhistochemischen Färbung müssen die Schnitte mittels Xylolbäder entparaffiniert und durch eine Alkoholreihe rehydratisiert werden. Eine fehlerhafte Entfernung von Paraffin kann zu Störungen im Färbemuster der nachfolgenden Immunreaktion führen. Die Fixierung der Gewebeproben führt zu einer starken Maskierung von antigenen Bindungsstellen, es kommt zu einer Aldehydvernetzung von Proteinen. Durch die Antigendemaskierungs-Methode können diese Antigene wieder freigelegt werden und so der immunhistochemischen Färbung zugänglich gemacht werden. Die nachfolgende Tabelle 2.4 zeigt die Schritte des Färbeprotokolls für CD31 und PEDF zusammengefasst.

Tabelle 2.4: Tabellarische Darstellung des Färbeprotokolls für CD31 und PEDF

1) Objektträger entparaffinieren in 3 Xylolbäder für jeweils 4 Minuten
2) Rehydrierung über zweimal 100%igen Alkohol und jeweils einmal in 96%igen, 70%igen, 50%igen, 30%igen Alkohol und entionisiertem Wasser für je 4 Minuten.
3) Die Antigen-Demaskierung, also die Freilegung der Antigene für die immunhistochemische Färbung, erfolgt mittels 10%igem Citratpuffer S 2031, pH6 (Dako, Hamburg, Deutschland) für 40 Minuten bei 90°C im Dampfgarer (Braun, Kronberg, Deutschland).
4) Nachdem die Präparate bei Raumtemperatur 20 Minuten abgekühlt haben, werden diese in 0,05 M und pH 7,6 Tris-Puffer fünfmal für jeweils 2 Minuten gewaschen. Anschließend werden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift Dako Pen (Firma DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) umrandet. Dies gewährleistet, dass die Reagenzien nicht auf dem gesamten Präparat verlaufen.
5) Danach folgt die Blockierung der endogenen Peroxidase mit 3%-igem Wasserstoffperoxyd S 2023 (Dako, Hamburg, Deutschland) in der feuchten Kammer für 15 Minuten. Dadurch wird die Peroxidaseaktivität von Erythrozyten gehemmt, die sonst zu einer diffusen Hintergrundfärbung führt.
6) Erneutes Waschen der Objektträger wie in Schritt 4.
7) Die Objektträger werden mit Antikörper-Diluent S 2022 (Dako, Hamburg, Deutschland) in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert, damit es im Nachfolgenden nicht zu unspezifischen Antikörperbindungen kommt, anschließend wird das Antikörper-Diluent abgeklopft.

8) Die vorbereiteten Präparate werden nun mit dem Primärantikörper in einer feuchten Kammer über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Wie bereits erwähnt, wurde für den CD31-Primärantikörper eine Verdünnung von 1:30 und für den PEDF-Primärantikörper eine Verdünnung von 1:120 gewählt.

Der Antikörper wird auf alle Präparate mit Ausnahme der negativen Kontrolle gegeben, welche nur mit Antikörper-Diluent behandelt wird. Mit Hilfe der Negativkontrolle, die nicht mit dem Primärantikörper behandelt wird, lassen sich unspezifische Anfärbungen und Hintergrundfärbungen bewerten.

9) Erneutes Waschen der Objektträger wie in Schritt 4.

10) Anschließend erfolgt bei der CD31-Färbung die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Die PEDF-Schnitte werden mit einem Tropfen EnVision, HRP-gelabelt der Firma DakoCytomation (Hamburg, Deutschland) bedeckt.

11) Erneutes Waschen der Objektträger wie in Schritt 4.

12) Da der Sekundärantikörper mit dem Enzym HRP gekoppelt ist, kann nun in diesem Schritt durch Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB+) Substratchromogen (Dako, Hamburg, Deutschland), einem Farbstoff, die Farbentstehung erzielt werden. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur.

13) Unter lichtmikroskopischer Kontrolle erfolgt dann der Abbruch der Farbreaktion durch Spülung mit bidestilliertem Wasser für 3 Minuten.

14) Es folgt zur Gegenfärbung die Kernfärbung mit Mayer´s Hämalaun für 2,5 Minuten, welche anschließend unter fließendem Wasser für 8 Minuten abgespült wird.

15) Anschließend wird die Dehydrierung je 3 Minuten in zweimal 96%igem, zweimal 100%igem Alkohol und viermal in Xylol durchgeführt. Die Eindeckung der Präparate erfolgt mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) über Xylol.

2.3 Auswertung der Immunhistochemie

2.3.1 Anfertigung der Fotografien

Um die Tumorareale genau festlegen zu können, wurden die zuvor fotografierten Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparate zur Hilfe genommen, um vitale Tumorzellverbände von Bindegewebe, Lymphknoten, entzündlichen Infiltraten und Nekrose zu definieren. Nach Durchsicht der genannten Präparate wurden nun zunächst die mit dem CD31-Antikörper immunhistochemisch angefärbten Präparate betrachtet und mit Hilfe des computergestützten Bildanalysesystems anaLYSIS® auf ihre Mikrogefäßdichte untersucht. Anhand der 6,25fachen Vergrößerung wurde das Präparat systematisch durchgesehen und drei unterschiedliche Stellen mit vitalem Tumor definiert. Hier wurde insbesondere darauf geachtet, einen ausreichenden Abstand zu Nekrosearealen einzuhalten. Die so in der 6,25fachen Vergrößerung ausgewählten drei Areale wurden dann in der 25fachen Vergrößerung nach Hotspots durchsucht. Als Hotspots sind Areale definiert mit sehr starker Signalintensität, demnach sind es Bereiche mit hoher Gefäßdichte. Diese Hotspots wurden dann mit dem Bildbearbeitungsprogramm anaLYSIS® fotografiert und gespeichert. Für die computergestützte Bildanalyse wurde ein Standard-PC mit einer an ein Lichtmikroskop angeschlossenen Fotokamera verwendet. Dasselbe Mikroskop wurde auch zur manuellen Auszählung eingesetzt. Das Abbild des im Lichtmikroskop bestimmten Ausschnittes wurde mit der Fotokamera in den Bildspeicher des Analyseprogramms übertragen. Pro Areal wurden 2 Bilder in 25facher Vergrößerung angefertigt, demnach insgesamt 6 Bilder in dieser Vergrößerung. Nun wurden von jedem dieser Areale in 100facher Vergrößerung zwei Bereiche mit hoher Signaldichte fotografiert, also insgesamt 12 Bilder in 100facher Vergrößerung angefertigt. Für ein Tumorpräparat ergeben sich somit 18 Fotografien. Nachdem die Bilder für CD31 erstellt waren, wurden die PEDF- gefärbten Präparate hinzugenommen und exakt die Präparatausschnitte, die bei CD31 fotografiert wurden, aufgesucht und nach dem gleichen Schema fotografiert. So wurde sichergestellt, dass insbesondere im Hinblick auf die Auswertung jeweils der sich entsprechende Ausschnitt des Präparates von CD31 und PEDF betrachtet wird. Somit ist ein unmittelbarer Vergleich der Signalverteilung und Signalintensität von CD31 und PEDF möglich.

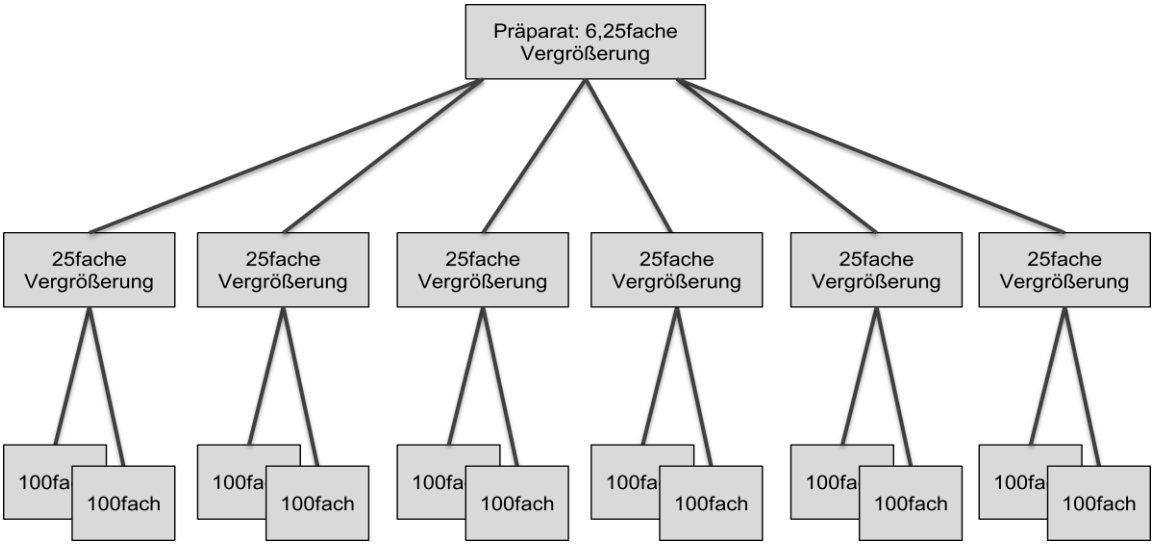


Abbildung 2.3: Grafik zur Darstellung der Anfertigung der Fotografien

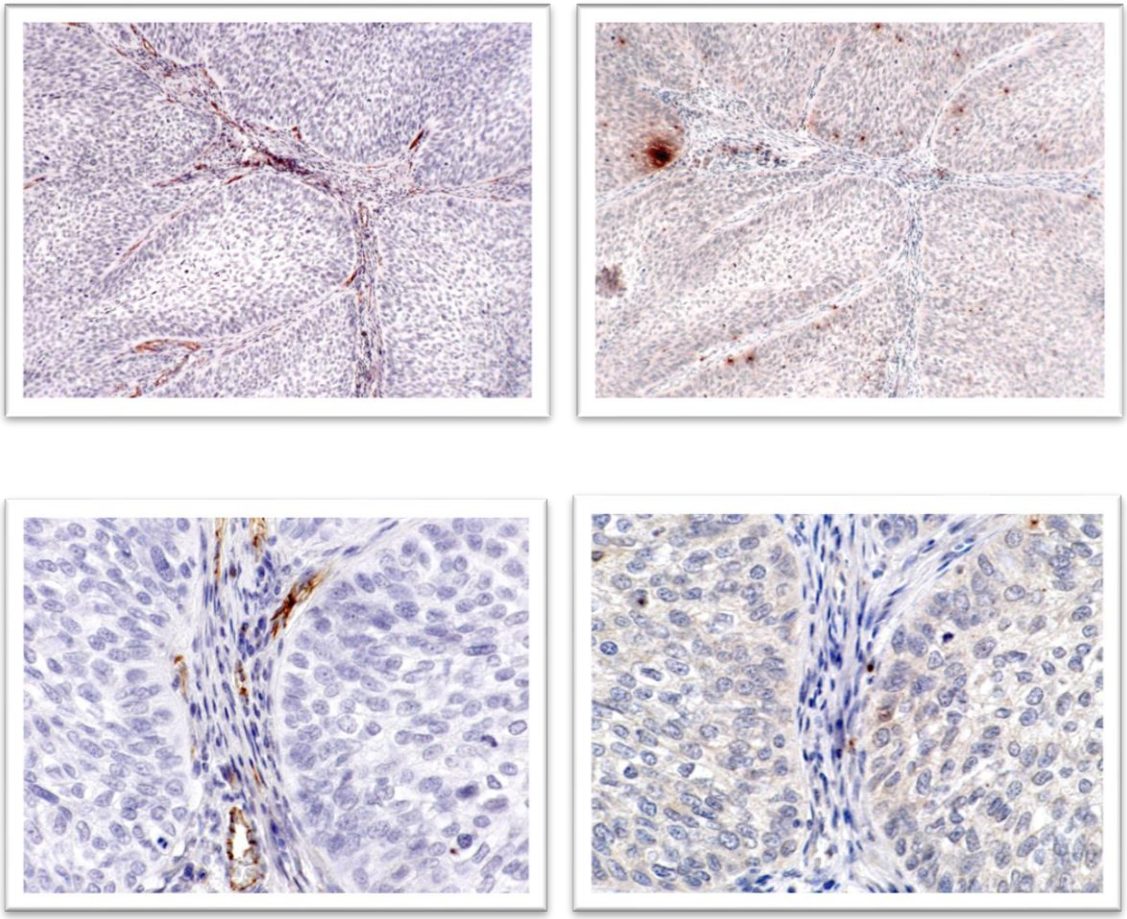


Abbildung 2.4: Markierung von CD31 (links) und PEDF (rechts) eines Tumorpräparates in 25facher Vergrößerung (Abbildungen oben) und 100facher Vergrößerung (Abbildungen unten)

2.3.2 Auswertung des immunhistochemischen Signals

Die Auswertung der CD31- und der PEDF-Signale wurde zusätzlich von einer weiteren unabhängigen Person durchgeführt, es bestand kein Einblick in die klinischen Daten der Patienten. Im Folgenden sind die Tabellen aufgezeigt, in die jeder Untersucher die erhobenen Daten für jedes Präparat dokumentiert hat.

2.3.4 Tabelle zur Auswertung des CD31-Signals

Tabelle 2.5: CD31: Anzahl Mikrogefäße

Vergrößerung	Feld 1		Feld 2		Feld 3	
	Hotspot1	Hotspot2	Hotspot1	Hotspot2	Hotspot1	Hotspot2
100x						
100x						

Für die Auswertung der Mikro-Gefäß-Dichte *(microvessel density)* der Tumorpräparate wurden die Fotografien in 100facher Vergrößerung betrachtet. Dabei galt es, alle braungefärbten Signale im vitalen Tumorbereich zu zählen, entweder als Einzelstelle oder als zusammenhängende Markierung. Jede braun kontrastierte Endothelzelle und jedes Endothel-„Nest“, welches klar von anderen Endothelstrukturen abgrenzbar war, wurde als einzelnes Mikrogefäß gezählt. Das Vorhandensein eines Gefäßlumens war für die Bewertung als Mikrogefäß nicht erforderlich (Weidner et al. 1991).

2.3.5 Tabelle zur Auswertung der PEDF-Signale

Tabelle 2.6: PEDF: Anzahl Spots/ Signal-Intensität

Vergrößerung	Wert	Feld 1		Feld 2		Feld 3	
25x	Anzahl	Hotspot1	Hotspot2	Hotspot1	Hotspot2	Hotspot1	Hotspot2
	klein						
	mittel						
	groß						
100x	Intensität1						
100x	Intensität2						

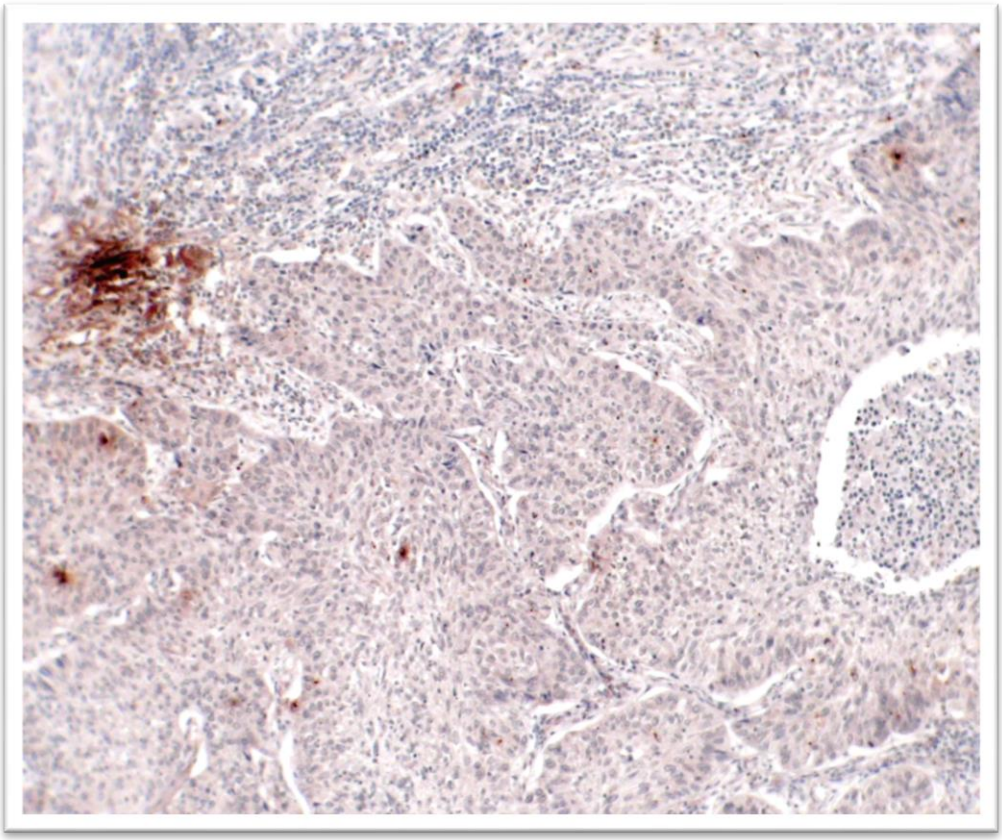
Für die Auswertung des PEDF-Signals wurden die Fotografien in 25facher und 100facher Vergrößerung betrachtet, die exakt den Ausschnitten der CD31-Bilder entsprechen. Die

PEDF-Anfärbungen stellten sich als Signalflecken unterschiedlicher Größe dar. Die Einteilung der Größe ist in Tabelle 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.7: Definition der Größe der PEDF-Signale

klein	bis 250 μm^2 bzw. bis 996 $Pixel^2$
mittel	von 250 μm^2 bis 1250 μm^2 bzw. von 996 $Pixel^2$ bis 4980 $Pixel^2$
groß	über 1250 μm^2 bzw. über 4980 $Pixel^2$

Für die Berechnung der PEDF-Fläche wurden zunächst die Signalformationen direkt anhand des Bildes in der 25fachen Vergrößerung umrandet. Mit Hilfe des Analyseprogramms anaLYSIS® wurde dann die entsprechende Flächengröße bestimmt. Dem liegt folgender Umrechnungsfaktor zugrunde: $Pixel^2$ entspricht 0,251 μm^2. Angegeben wurde die Anzahl und der Summenwert in $Pixel^2$ pro Bild. Die Messung erfolgte stets am Lichtmikroskop, die so bearbeiteten Fotografien wurden gespeichert und die Größe und Anzahl der einzelnen Signale in eine Tabelle übertragen. Pro Präparat wurden somit 6 Fotografien beurteilt.



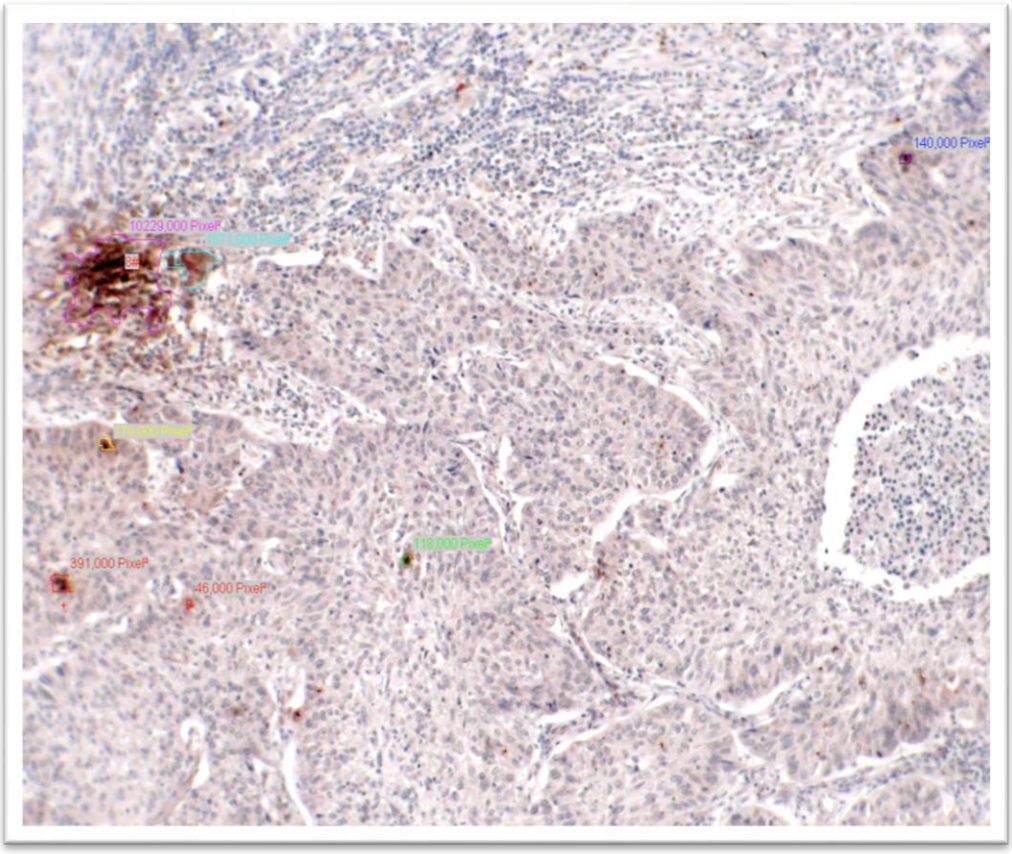
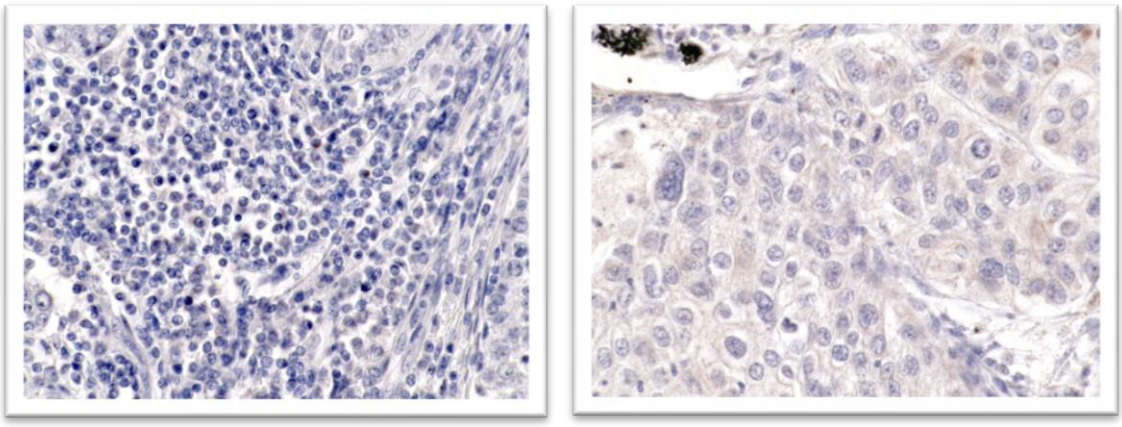
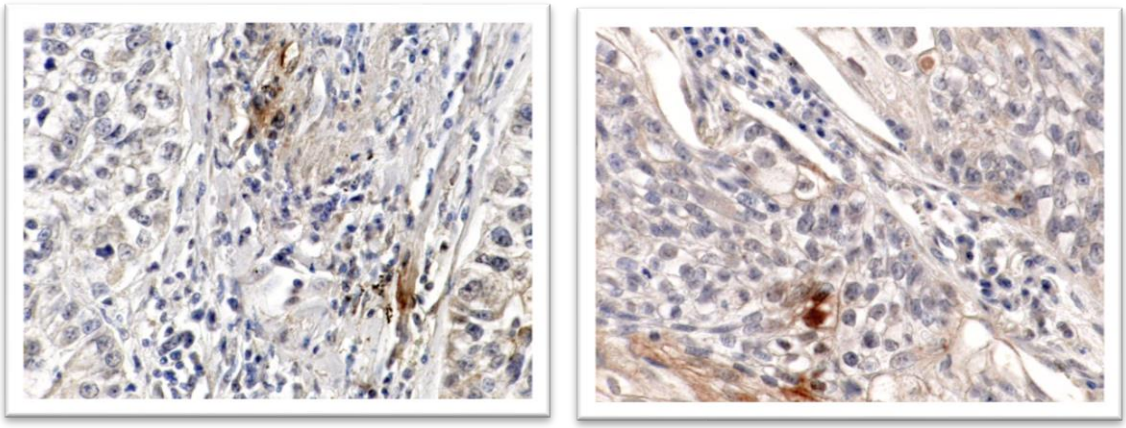


Abbildung 2.5: Darstellung eines Beispielpräparates in 25facher Vergrößerung ohne (Bild oben) und mit (Bild unten) Markierung zur Auswertung des PEDF-Signals

Die Signalintensität wurde in 100facher Vergrößerung bestimmt, dabei wurden die verschiedenen Intensitätsstufen definiert als keine (0), schwache (1), mittlere (2) oder starke (3) Färbung. Ein Beispiel hierfür zeigt die Abbildung 2.5. Die Intensität wurde für jedes Bild eines Tumorpräparates beurteilt und anschließend der Mittelwert für das jeweilige Präparat errechnet. Es ergaben sich demnach pro Präparat 12 Fotografien, die nach diesem Schema beurteilt wurden.



A: keine PEDF-Färbung B: schwache PEDF-Intensität



C: mittlere PEDF-Intensität D: starke PEDF-Intensität

Abbildung 2.6: Darstellung eines Tumorpräparates in 100facher Vergrößerung der PEDF-Färbung. Die Abbildungen zeigen beispielhaft die unterschiedlichen Intensitätsstufen: keine Färbung (A), schwache Intensität des PEDF-Signals (B), mittlere Intensität (C) und starke Intensität (D)

2.4 Statistisches Verfahren

Die statistische Analyse mit den erhobenen Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik der Georg-August-Universität Göttingen. Die Analysen zur Überlebensstatistik wurden mit der Statistica-Software, Version 9 für Windows von StatSoft durchgeführt. Die Untersuchungen zum Vergleich der Daten der Plattenepithelkarzinome und der Adenokarzinompatienten erfolgte mit dem Statistikprogramm SAS. Für die Häufigkeitsverteilung der Messwerte für CD31 und PEDF wurden die jeweiligen Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet und anhand von Histogrammen dargestellt. Die Korrelation der Messwerte des Plattenepithelkollektivs und des Adenokarzinomkollektivs zwischen Untersucher 1 und Untersucher 2 wurde mittels der Pearsonschen Korrelation berechnet und dargestellt. Hier wurden die jeweiligen Mittelwerte herangezogen. Für die Untersuchung der Korrelation der CD31-Parameter und der PEDF- Intensität sowie der PEDF-Fläche wurden ebenfalls die Pearsonsche Korrelation angewandt. Die Überlebenszeitanalysen in Abhängigkeit verschiedener Variablen wurden mittels der Kaplan-Meier-Methode geschätzt. Die Signifikanz bei den oben genannten Untersuchungen wurde mit dem jeweiligen p-Wert angegeben. Dabei wurde bei einem Signifikanzniveau von 5% ($P<0,05$) die angenommene Nullhypothese (Gleichheit zwischen Gruppen) verworfen. Es ergab sich eine statistische Signifikanz mit einem p-Wert $<0,05$ in der Überlebenszeit. Für die

Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der gemessenen Variablen (CD31, PEDF-Intensität und PEDF-Fläche) wurde jeweils das Patientenkollektiv in zwei Gruppen geteilt, wobei die Teilungsgrenze mit Hilfe von Mittelwert und Median berechnet wurde. Der Median ist der Wert, welcher an der mittleren Stelle einer Auflistung von Zahlenwerten steht, wenn diese der Größe nach sortiert werden. Die Darstellung der Verteilung der Messwerte der einzelnen Variablen (CD31, PEDF-Intensität, PEDF-Fläche) erfolgte zur anschaulicheren Darstellung in Form von Boxplots, dabei wurde eine separate Darstellung für Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom vorgenommen. Diese wurden mit der Statistiksoftware *R* auf Grundlage folgendes Algorithmus „boxplot(x,data=)“ erstellt. Dabei bezeichnet x die gemessenen Werte der oben genannten Variablen. Die Statistische Signifikanz der Überlebenszeitanalysen in Abhängigkeit der CD31-Expression, PEDF-Intensität sowie der PEDF-Fläche wurde mittels der Cox-Regression errechnet, um die Unabhängigkeit der eingeteilten Gruppen zu bewahren. Mit Hilfe des Cox-Modells lässt sich der Einfluss von erklärenden Variablen auf eine Überlebenszeit untersuchen.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung der Patientenkollektive

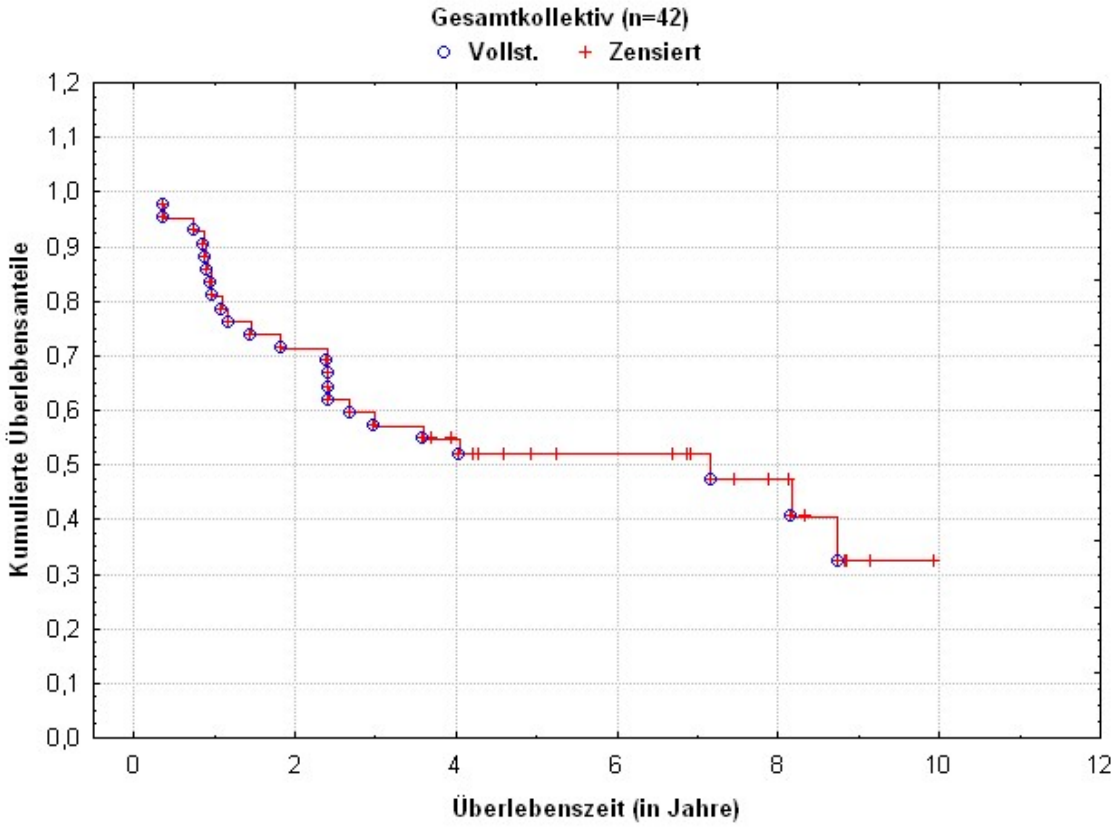


Abbildung 3.1: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse für das Gesamtüberleben des Kollektivs der Plattenepithelkarzinompatienten

In der nachfolgenden Tabelle 3.2 sind die Charakteristika der Patientenkollektive aufgeführt, welche für die verschiedenen Fragestellungen herangezogen wurden.

Für die Untersuchungen zur Überlebensanalyse wurde das Kollektiv der Patienten, welche an einem Plattenepithelkarzinom erkrankt waren betrachtet. Insgesamt gehören dieser Gruppe 42 Patienten an, davon sind 41 Patienten Männer und eine Frau. Vier der Patienten bekamen eine neoadjuvante Chemotherapie, ansonsten wurden keinerlei präoperative Therapien durchgeführt. Das durchschnittliche Lebensalter bei Operation lag bei 65,86 (STD 7,77) wobei die Altersspanne von 49,76 bis 80,22 reichte. Eine begleitende adjuvante Chemotherapie bekamen 6 Patienten, ebenso eine Radiotherapie. Die ermittelte Stadieneinteilung zeigt eine relativ gleichmäßige Verteilung. Die Mehrheit der Patienten befindet sich in den Stadien 1a bis 3a nach der neusten UICC 2010. Lediglich 2 Patienten befinden sich im Stadium 3b. Nach dem letzten Follow-up, das im Januar 2010 durchgeführt wurde, waren insgesamt 18 Patienten an dem Primärtumor, 5

Patienten an einer nicht-tumorbedingten Ursache verstorben und 19 Patienten waren weiterhin in gutem Allgemeinzustand am Leben. In der Abbildung 3.1 ist graphisch die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse für das Gesamtüberleben des vorliegenden Patientenkollektivs dargestellt.

Tabelle 3.1: Gruppierung des Plattenepithelkarzinomkollektivs nach Tumorstadium

	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb
verstorben an Primärtumor in %	12,5	46,67	0	50	62,50	66,67
verstorben nicht-tumorbedingt in %	25	6,67	0	0	12,5	33,33
Lebend in %	62,5	46,66	100	50	25	0

Das Kollektiv der Adenokarzinompatienten weist ebenfalls weder eine Fernmetastasierung noch einen Residualtumor auf und umfasst 27 Patienten, davon 20 Männer und 7 Frauen, deren Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation bei 63,18 Jahren lag (STD 10,91). Vier der Patienten bekamen eine neoadjuvante Chemotherapie und ein Patient eine neoadjuvante Bestrahlung. Eine begleitende adjuvante Chemotherapie wurde bei vier Patienten durchgeführt, ebenso eine Radiotherapie. Die Stadieneinteilung zeigt eine ungleiche Verteilung. 16 Patienten befanden sich im Stadium I (Ia=10, Ib=6), 5 Patienten in Stadium II (IIa=1, IIb=4) und 6 Patienten im Stadium IIIa. Nach dem letzten Follow-up, durchgeführt im Januar 2010, verstarben insgesamt 14 Patienten an einem Primärtumor, 7 Patienten an einer nicht tumorbedingten Ursache und 6 Patienten waren weiterhin am Leben.

Tabelle 3.2: Patientencharakteristika

Kollektiv	Gesamtkollektiv (n = 69)	Plattenepithel-karzinomkollektiv (n= 42)	Adenokarzinom-kollektiv (n = 27)
durchschnittliches Lebensalter bei Operation	64,76	65,85	63,18
Geschlecht Frau Mann	 8 (12%) 61 (88%)	 1 (2%) 41 (98%)	 7 (26%) 20 (74%)
Neoadjuvante Chemotherapie	8 (12%)	4 (10%)	4 (15%)

Tumorstadium (UICC 2010)			
IA	18 (26%)	8 (19%)	10 (37%)
IB	14 (20%)	8 (19%)	6 (22%)
IIA	9 (13%)	8 (19%)	1 (4%)
IIB	11 (16%)	7 (17%)	4 (15%)
IIIA	15 (22%)	9 (21%)	6 (22%)
IIIB	2 (3%)	2 (5%)	0
Grading			
1	1 (2%)	0	1 (4%)
2	45 (65%)	28 (67%)	17 (63%)
3	23 (33%)	14 (33%)	9 (33%)
Lymphknotenstatus			
N0	44 (63%)	27 (64%)	17 (63%)
N1	13 (19%)	9 (21%)	4 (15%)
N2	11 (16%)	5 (12%)	6 (22%)
N3	1 (2%)	1 (2%)	0
Adjuvante Chemotherapie	10 (14%)	6 (14%)	4 (15%)
Adjuvante Radiotherapie	10 (14%)	6 (14%)	4 (15%)
Todesursache			
Primärtumor	32 (46%)	18 (43%)	14 (51%)
nicht tumorbedingt	12 (17%)	5 (12%)	7 (26%)
lebend nach letztem Nachbeobachtungszeitraum	25 (36%)	19 (45%)	6 (22%)

3.2 Untersuchungen zur Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von verschiedenen Einflussgrößen anhand des Kollektivs der Plattenepithelkarzinompatienten

3.2.1 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von den Tumorstadien (nach UICC 2010)

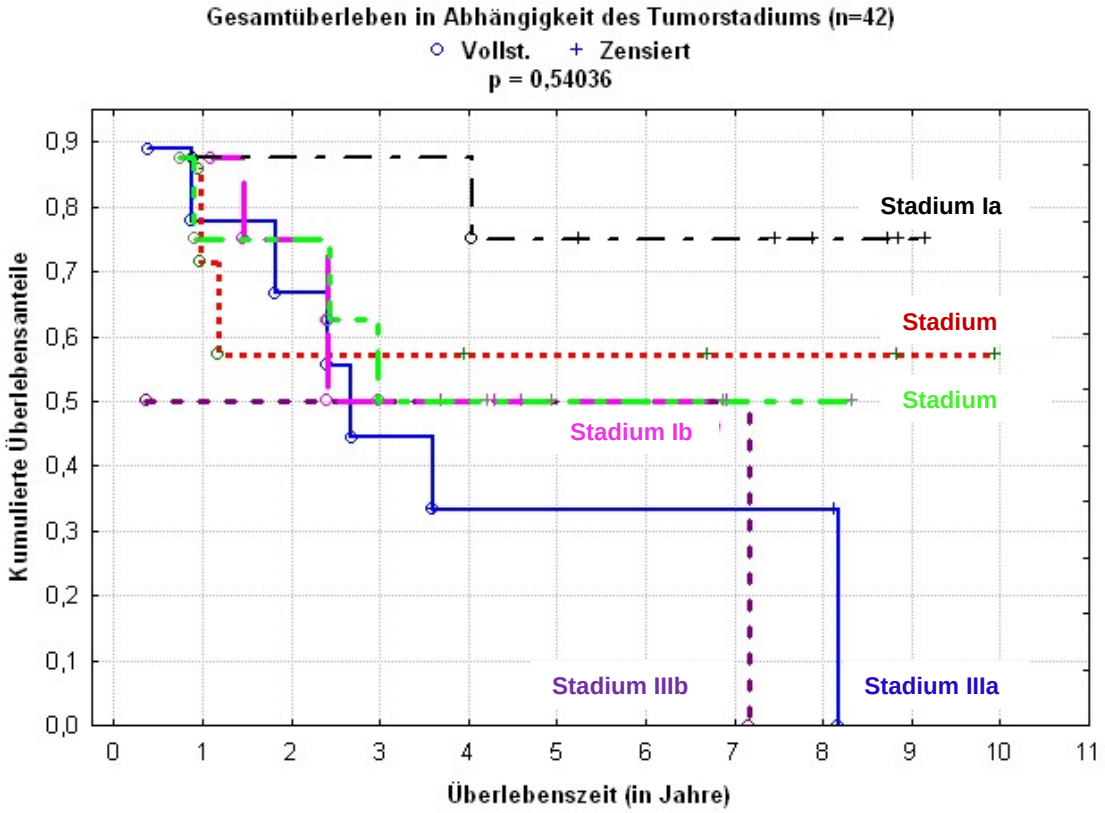


Abbildung 3.2: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von den Tumorstadien

In Abbildung 3.2 sind die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Tumorstadien (nach UICC 2010) aufgezeigt. Anhand der 5-Jahresüberlebensraten ist eine deutliche Abstufung zu Gunsten der niedrigeren Stadien zu erkennen, was die bessere Überlebensprognose in diesen Stadien verdeutlicht. Nach 3 Jahren beträgt das Gesamtüberleben im Stadium Ia 88% und nach 5 Jahren liegt es bei 75% und bleibt auf diesem Niveau, selbst nach über 9 Jahren. Im Stadium Ib beträgt die 5-JÜR 50%, im Stadium IIa ebenfalls und im Stadium IIb liegt sie bei 57%. Das Stadium IIIa hat eine 5-JÜR von 50%, nach 7,15 Jahren jedoch ist kein Patient mehr am Leben. Im Stadium IIIb ist eine 5-JÜR von 33% zu beobachten und nach 8,16 Jahren ist kein Patient mehr am Leben.

3.2.2 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der Tumorgröße

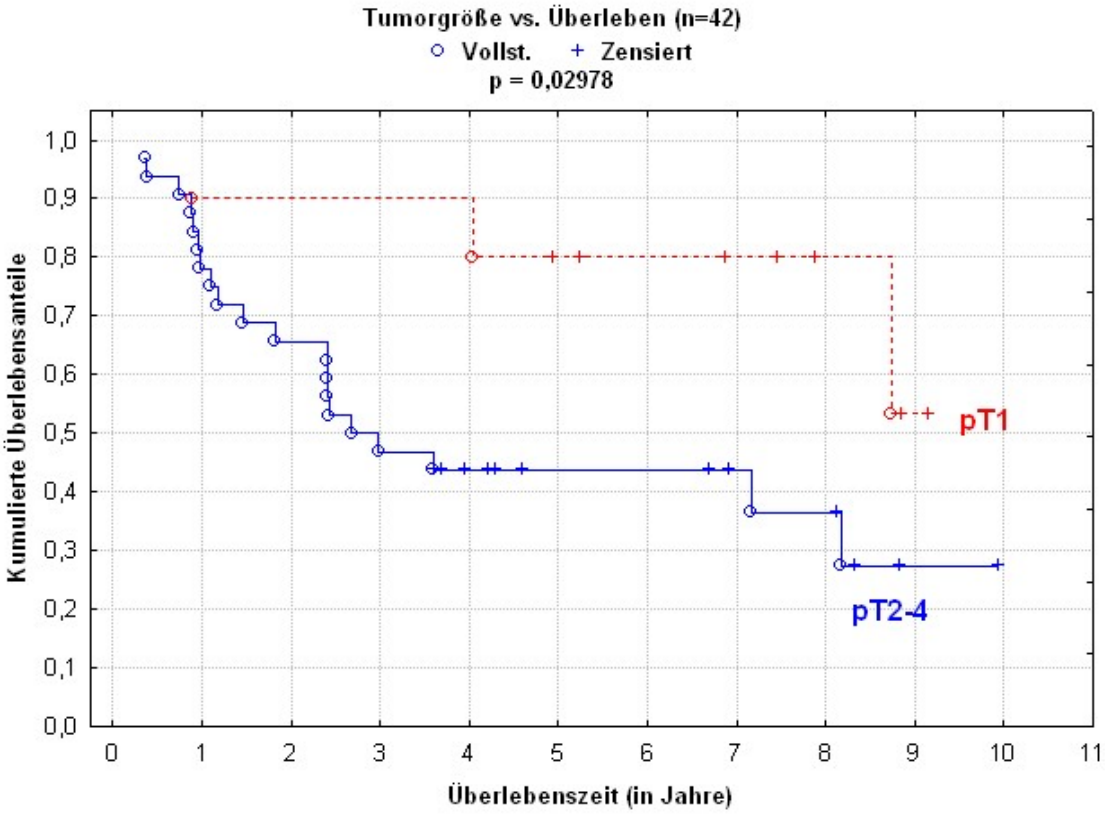


Abbildung 3.3: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der Tumorgröße

In Abbildung 3.3 sind die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit der Tumorgröße dargestellt. Es findet sich ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,029 zwischen den Patienten mit einem pT1-Tumor (n=10) und den Patienten mit einem pT2-4 Tumor (n=32). Dieser Unterschied spiegelt sich in der Überlebensprognose wider. Die Patienten mit einem pT1-Tumor haben eine 3-JÜR von 90% und eine 5-JÜR von 80%, während Patienten mit einem Tumor größer als pT1 eine 3-JÜR von 48% und eine 5-JÜR von 44% aufweisen. In dem hier untersuchten Patientenkollektiv haben die Patienten mit einem Tumor geringeren Durchmessers eine deutlich bessere Prognose.

3.2.3 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus

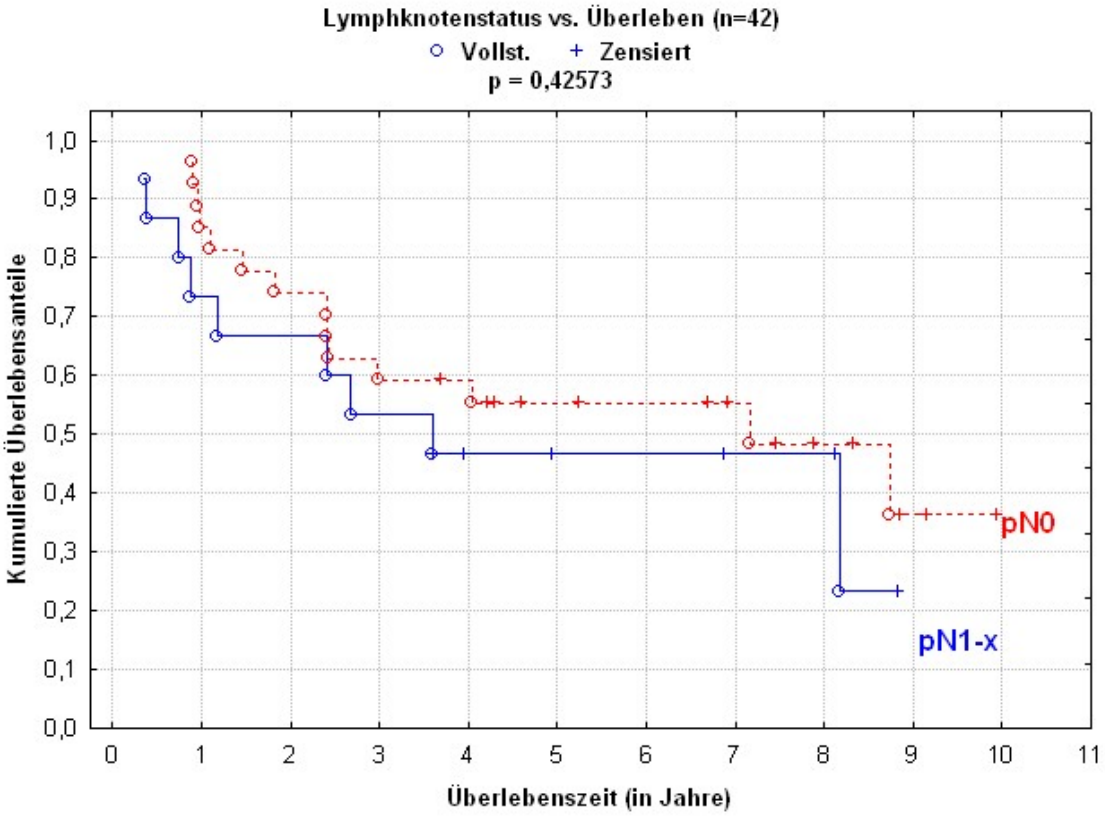


Abbildung 3.4: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus

In Abbildung 3.4 sind die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus dargestellt. Abgebildet sind ein positiver Lymphknotenstatus, als pN1-x bezeichnet (n=15) versus negativem Status, als pN0 bezeichnet (n=27). Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden (p = 0,426). Es lässt sich jedoch ein tendenziell prognostisch besserer Verlauf abzeichnen, mit einer 5-JÜR von 55,6% für N0 im Vergleich zu einer 5-JÜR bei Patienten mit einem positiven Lymphknotenstatus von 46,6%.

3.2.4 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom CD31-Expressionsstatus

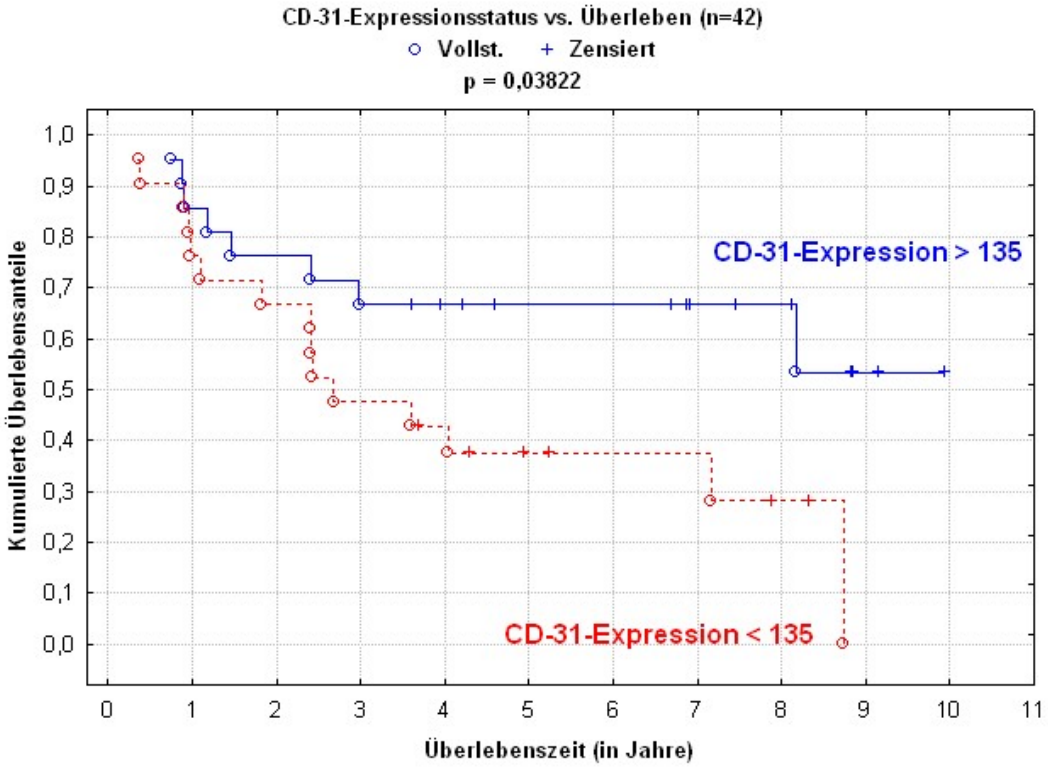


Abbildung 3.5: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der CD31-Expression

Die Abbildung 3.5 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der CD31-Expression, hierzu wurden die ausgewerteten Daten der Auszählung des CD31-Signals der Fotografien hinzugezogen. Um die Mikrogefäßdichte auf das Überleben zu beziehen, wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen geteilt. Die Teilungsgrenze wurde bei dem Median der Mittelwerte aller Präparatmesswerte für CD31 (MW=150,9) festgelegt, welcher 135 beträgt. 21 Patienten gehörten somit der Gruppe an, bei der mehr als 135 braungefärbte Signale gezählt wurden und bei 21 Patienten wurden weniger als 135 solcher Mikrogefäße gezählt. Es zeigt sich eine statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,038, welcher mit der Cox-Regression errechnet wurde um die Unabhängigkeit der eingeteilten Gruppen zu bewahren. Mit Hilfe des Cox-Modells lässt sich der Einfluss von erklärenden Variablen auf eine Überlebenszeit untersuchen. In der Kaplan-Meier-Darstellung ist zu erkennen, dass sich die Höhe der CD31-Expression in der Prognose widerspiegelt. Die 5-JÜR der Patienten mit hoher CD31-Expression beträgt 67% und befindet sich auch noch nach 10 Jahren bei 53%, während bei Patienten mit CD31-Expressionsstärke unter 135 die 5-JÜR bei 37% liegt und nach weniger als neun Jahren kein Patient mehr am Leben war.

3.2.5 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der PEDF- Fläche

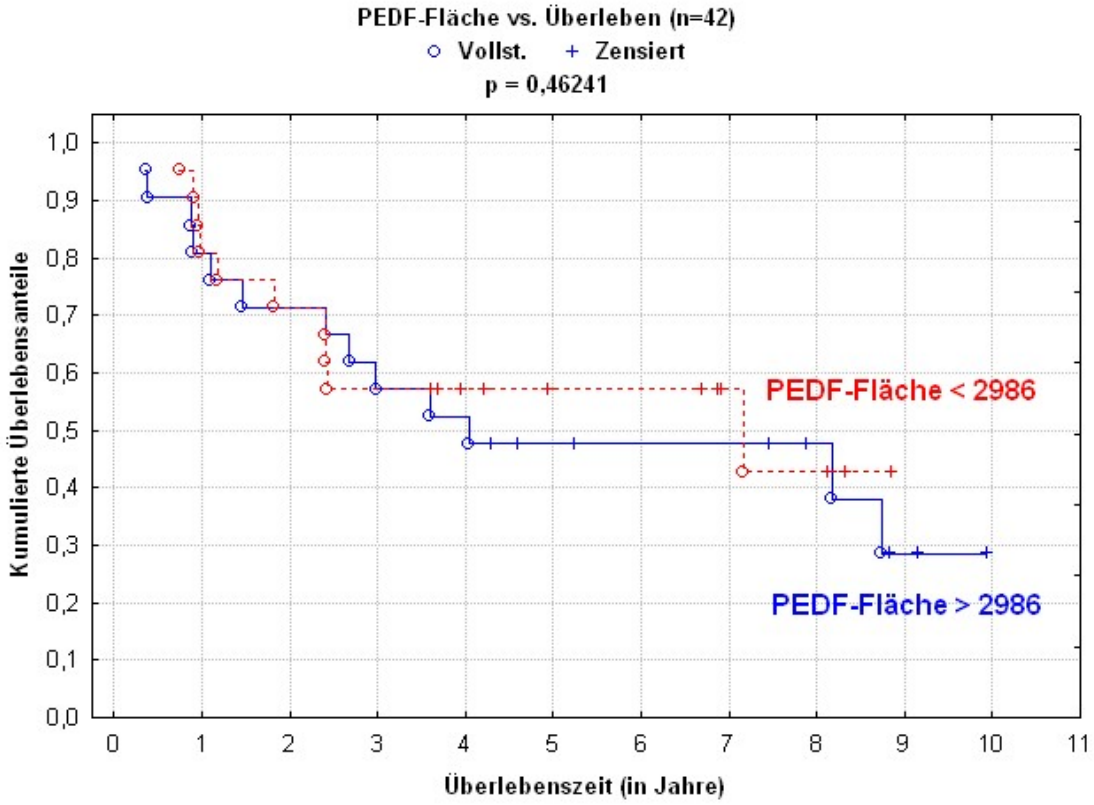


Abbildung 3.6: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der PEDF-Expression, gemessen an der PEDF- Fläche

Die Abbildung 3.6 stellt die Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit von der PEDF-Expression, gemessen als PEDF- Fläche, dar. Hierfür wurden die Daten der Auswertung der Fotografien genommen. Um das Patientenkollektiv für die Darstellung in zwei Gruppen teilen zu können, wurde auch hier der Median (2986) berechnet und als Teilungsgrenze bestimmt. Die eine Gruppe weist eine PEDF- Fläche von über 2986 auf und die andere Gruppe liegt unterhalb dieser Grenze. Die Berechnung des p-Wertes anhand der Cox-Regression ergab keine statistische Signifikanz, er beträgt 0,462. In der Kaplan-Meier-Darstellung ist keine eindeutige Überlebensprognose zuzuordnen. Die 3-JÜR der beiden Gruppen liegen bei 57%, die 5-JÜR liegt bei der Gruppe der PEDF-Fläche < 2986 weiterhin bei 57%, während sie bei der zweiten Gruppe auf 47% abgefallen ist.

3.2.6 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der PEDF- Intensität

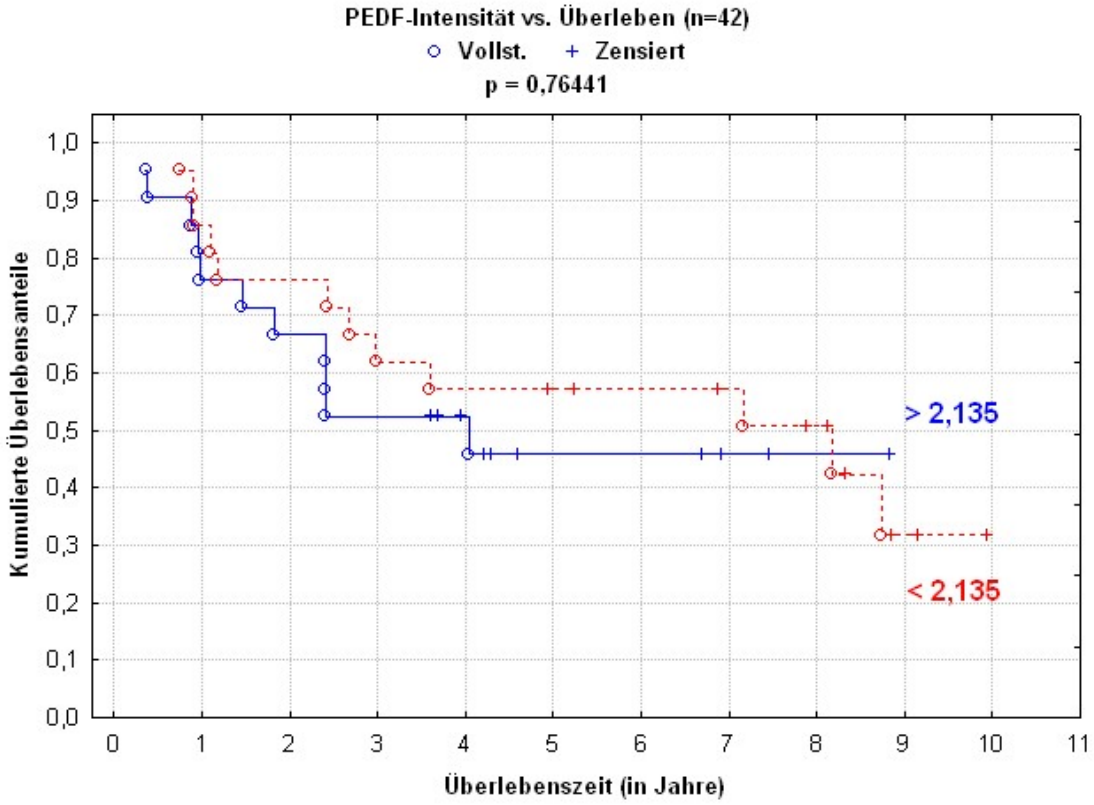


Abbildung 3.7: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom PEDF -Signal, gemessen an der PEDF- Intensität

Die Abbildung 3.7 stellt die Kaplan-Meier-Kurven in Abhängigkeit von der PEDF-Intensität dar. Auch hier wurden 2 Gruppen gebildet. Die Grenze für die Gruppenbildung liegt bei dem Median der Mittelwerte der Intensitätsbestimmung, welcher 2,135 ergab. Die erste Gruppe mit 21 Patienten weist eine Intensität höher als der Median auf und die andere Gruppe liegt unter dieser Grenze und besteht ebenfalls aus 21 Patienten. Der p-Wert, errechnet mit der Cox-Regression, ist statistisch nicht signifikant, er beträgt 0,764. Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen eine anfangs bessere Überlebensprognose der Patienten der Gruppe mit einer geringeren PEDF- Intensität. Die 3-JÜR beträgt hier 64% und die 5-JÜR liegt bei 57%. Die Patienten der Gruppe mit einer Intensität > 2,135 haben eine 3-JÜR von 62% und eine 5-JÜR von 46%.

3.2.7 Häufigkeitsverteilung der Messwerte für CD31 und PEDF

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Häufigkeitsverteilungen für die ausgezählten Messwerte. Pro Tumorpräparat wurden 12 Fotografien in der 100fachen Vergrößerung angefertigt. Die CD31-Auszählung erfolgte anhand dieser Bilder. Für die Darstellung der

CD31-Häufigkeitsverteilung wurden die Mittelwerte aller CD31-Signalauszählungen gebildet. Der Median der 42 Mittelwerte liegt bei 135.

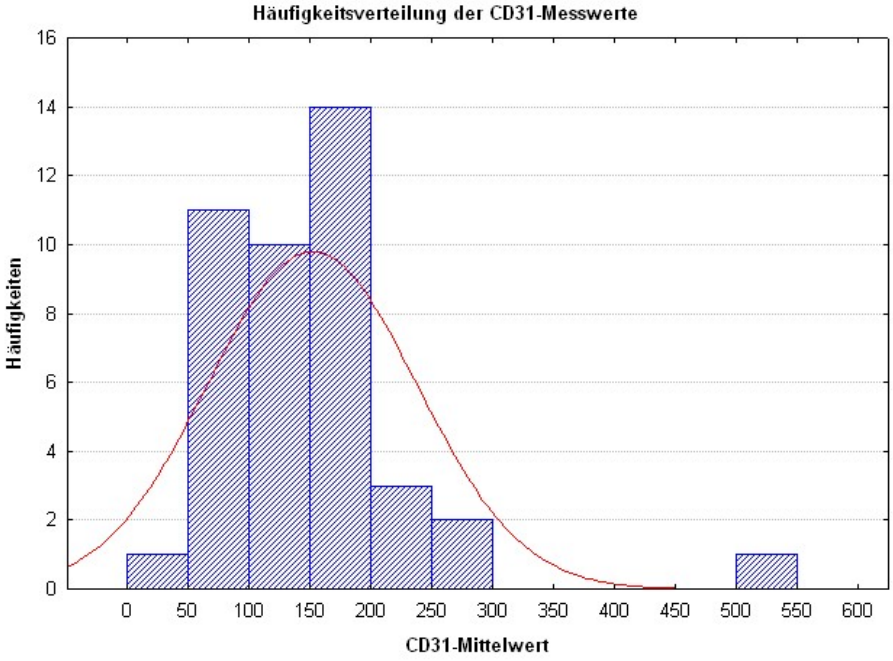


Abbildung 3.8: Häufigkeitsverteilung der CD31-Messwerte

Die Häufigkeitsverteilung der PEDF-Fläche ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Aus den Flächen der 6 histologischen Bilder wurde eine Gesamtfläche für das Präparat gebildet. Die Gesamtfläche ist für die Häufigkeitsverteilung herangezogen worden.

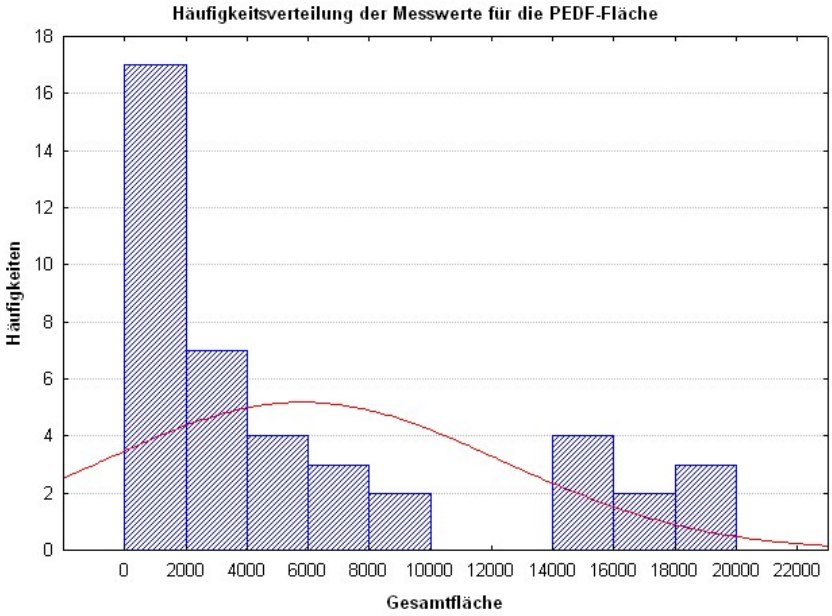


Abbildung 3.9: Häufigkeitsverteilung der Messwerte für die PEDF-Fläche

Die Beurteilung der PEDF-Intensität erfolgte anhand der Fotografien, die in 100facher Vergrößerung angefertigt wurden. Für die Darstellung des Histogramms wurden die Mittelwerte der 12 PEDF-Intensitäten pro Tumorpräparat gebildet. Der Median dieser Werte beträgt 2,135.

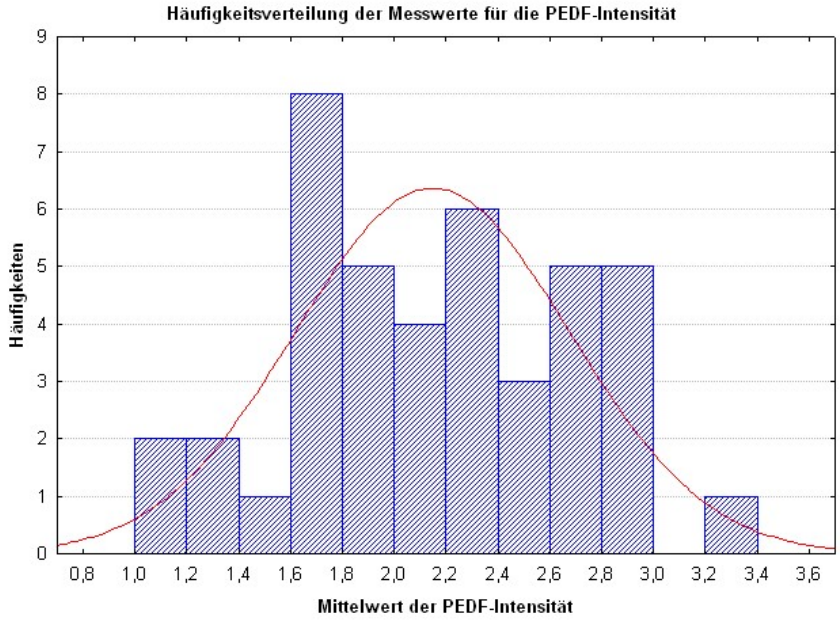


Abbildung 3.10: Häufigkeitsverteilung der Messwerte für die PEDF-Intensität

3.3 Untersuchungen zur CD31- und PEDF- Expression anhand des Vergleichs von Adeno- und Plattenepithelkarzinompatienten

3.3.1 Verteilung der Messwerte der einzelnen Variablen

Zur anschaulicheren Darstellung der Messergebnisse sind in nachfolgenden Abbildungen die Messwerte für CD31, PEDF- Intensität und PEDF- Fläche in Form von Boxplots abgebildet. Dabei sind jeweils die Messergebnisse der Plattenepithelkarzinompatienten denen der Adenokarzinompatienten gegenübergestellt. Man kann erkennen, dass der Median der Werte des Kollektivs der Plattenepithelkarzinompatienten über dem der Adenokarzinompatienten liegt. Dies gilt sowohl für das CD31-Signal als auch für die PEDF- Intensität und PEDF- Fläche.

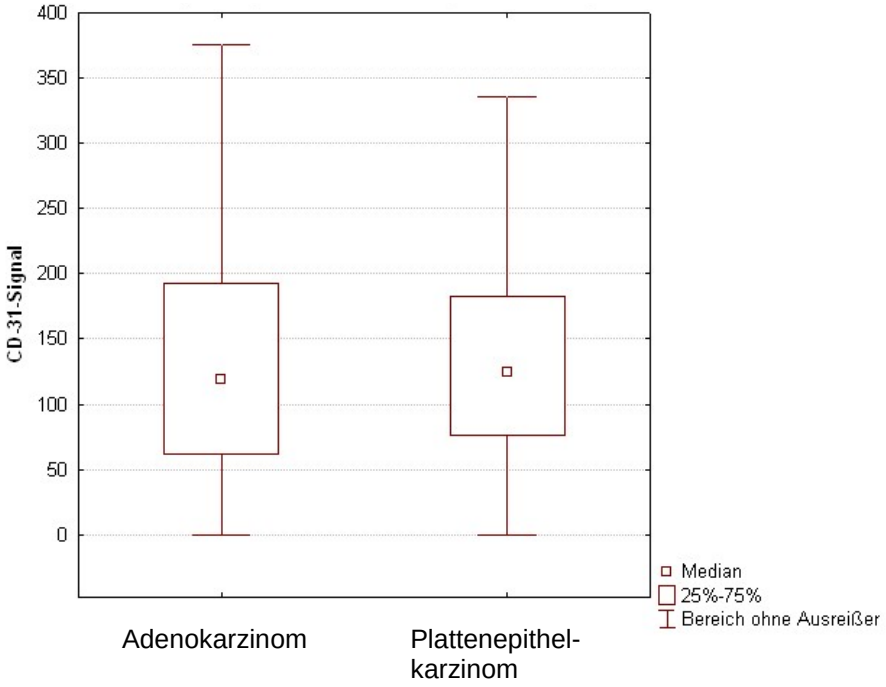


Abbildung 3.11: Darstellung der Verteilung der Messwerte des CD31-Signals in Form von Boxplots

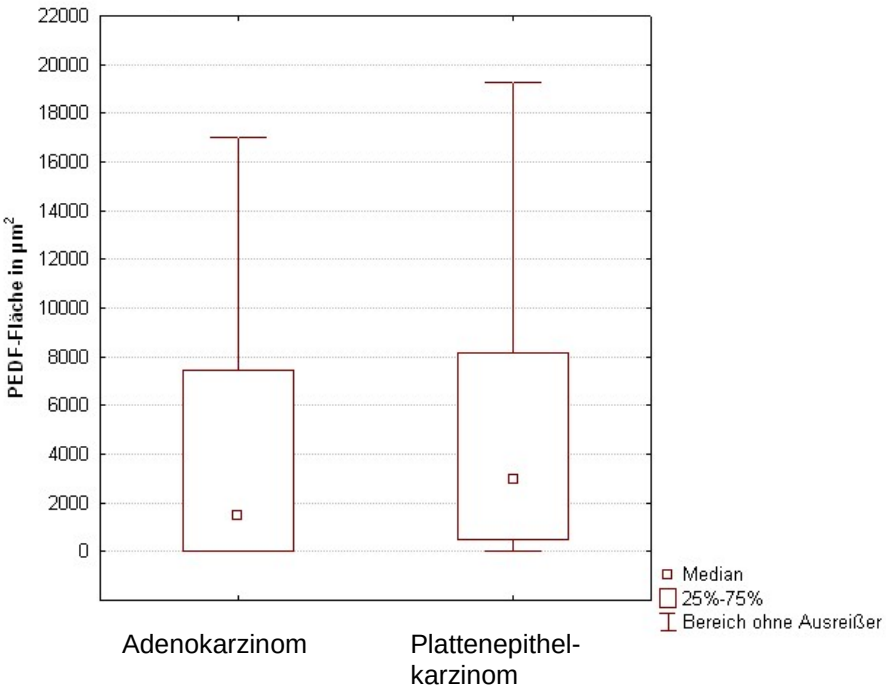


Abbildung 3.12: Darstellung der Verteilung der Messwerte der PEDF- Fläche in Form von Boxplots

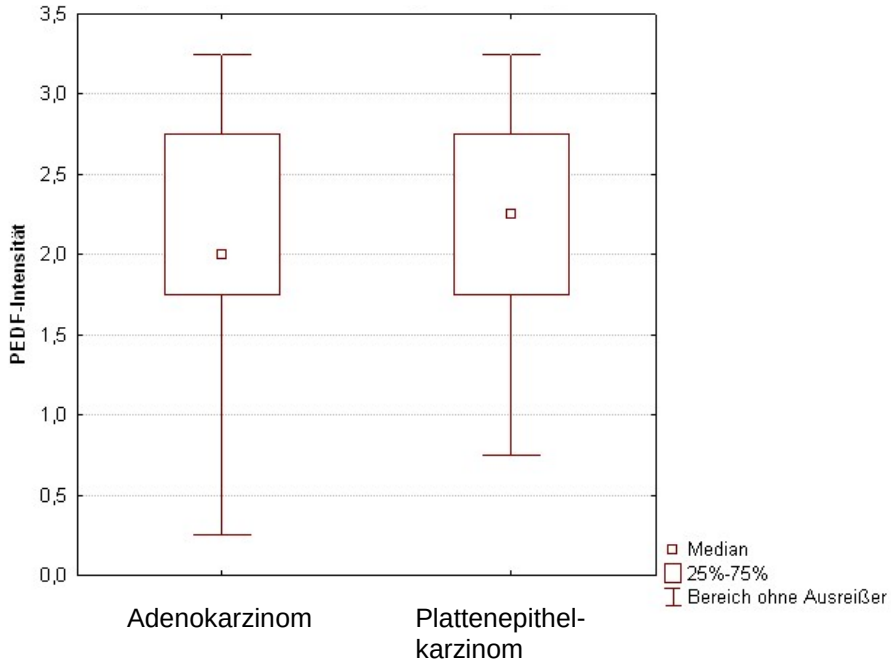


Abbildung 3.13: Darstellung der Verteilung der Messwerte der PEDF- Intensität in Form von Boxplots

3.3.2 Korrelation der CD31- Expression und der PEDF- Intensität

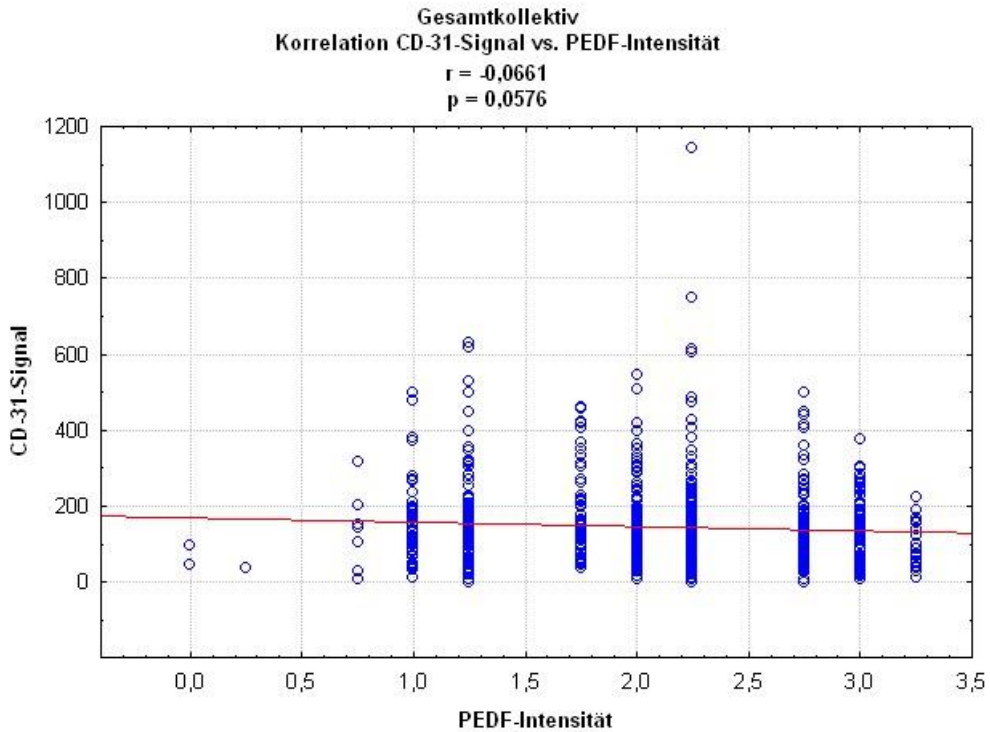


Abbildung 3.14: Darstellung der Korrelation des CD31-Signals und der PEDF- Intensität des Gesamtkollektivs

Für die Darstellung der Korrelation der CD31-Expression und der PEDF-Intensität wurden die 12 Werte für CD31 mit den 12 Werten für die PEDF- Intensität pro Präparat miteinander verglichen. Die Darstellung für das Gesamtkollektiv (n=69) zeigt die Abbildung 3.14. Mit einem p-Wert von 0,058 ergab sich keine statistische Signifikanz, dennoch ist eine negative Korrelation des CD31-Signals im Verhältnis zur PEDF-Intensität zu erkennen. In der Abbildung 3.15 ist die Korrelation der CD31-Signale und der PEDF-Intensität des Kollektivs der Plattenepithelkarzinompatienten dargestellt, hier zeigt sich ein Trend für eine negative Korrelation mit einem bei großer Fallzahl signifikantem p-Wert (p=0,013). Im Vergleich dazu ergab sich bei alleiniger Betrachtung des Adenokarzinomkollektivs keine signifikante Korrelation. Die Darstellung ist in Abbildung 3.16 zu sehen.

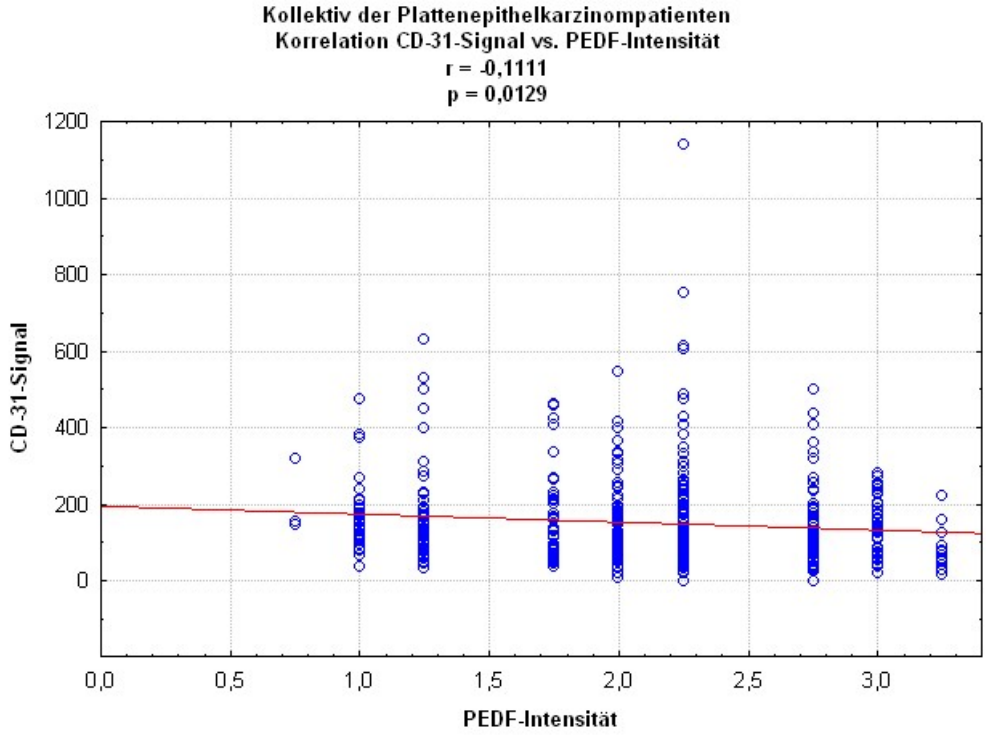


Abbildung 3.15: Darstellung der Korrelation des CD31-Signals und der PEDF- Intensität beim Kollektiv der Plattenepithelkarzinompatienten

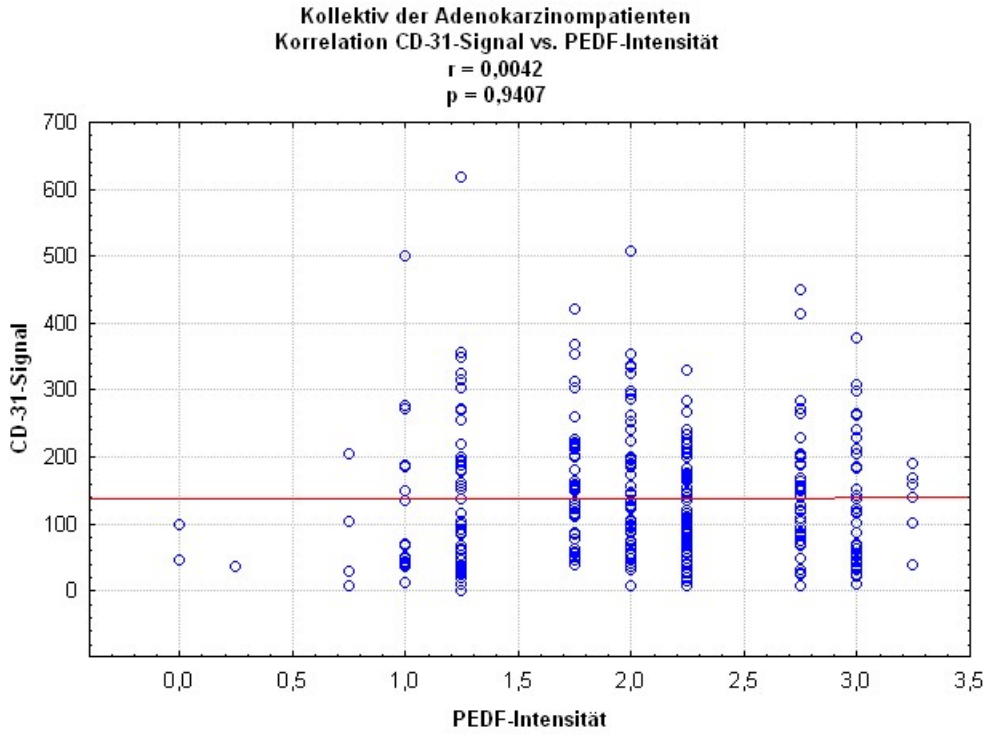


Abbildung 3.16: Darstellung der Korrelation des CD31-Signals und der PEDF- Intensität beim Kollektiv der Adenokarzinompatienten

3.3.3 Korrelation der CD31- Expression und der PEDF- Fläche

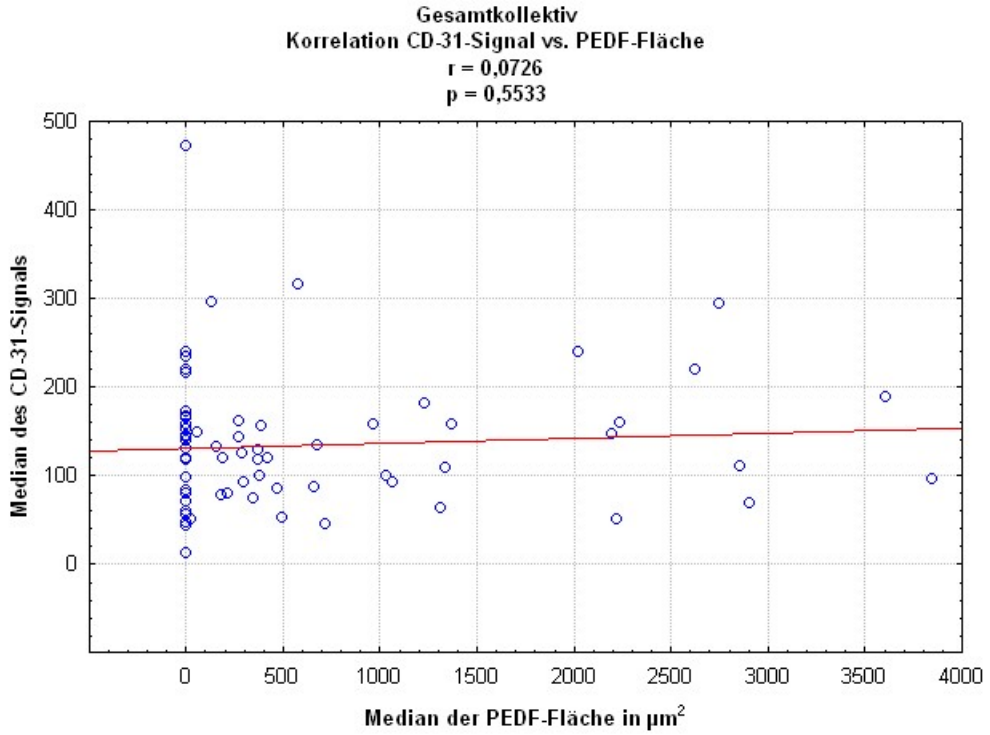


Abbildung 3.17: Darstellung der Korrelation des CD31-Signals und der PEDF- Fläche des Gesamtkollektivs.

Für die Untersuchung der Korrelation des CD31-Signals und der PEDF- Fläche wurde zum Vergleich der Daten der Median der CD31-Auszählungen pro Präparat gebildet und ebenso der Median der PEDF- Flächenberechnung. Für die Berechnung der PEDF-Fläche wurden pro Präparat 6 Fotografien in 25facher Vergrößerung angefertigt, anhand dieser Bilder wurde die Fläche der PEDF-Signalgebung gemessen, die sich fleckförmig darstellt. Aus den Flächen der 6 histologischen Bilder wurde eine Gesamtfläche für das Präparat gebildet. Die Gesamtfläche ist für die Häufigkeitsverteilung herangezogen worden. Die Medianwerte des CD31-Signals und der PEDF-Fläche wurden anschließend miteinander korreliert. Für das Gesamtkollektiv (n=69) ergab sich keine signifikante Korrelation (p= 0,553) wie in Abbildung 3.17 zu sehen ist. Wurde die Korrelation nur für das Kollektiv der Adenokarzinompatienten betrachtet, ergab sich eine positive Korrelation von CD31 und der PEDF- Fläche (p= 0,025). Hier verhalten sich die Signale gleichsinnig. Die Darstellung ist in Abbildung 3.18 zu betrachten. Bei Untersuchung des alleinigen Plattenepithelkarzinomkollektivs zeichnete sich wiederum keine signifikante Korrelation ab (p= 0,530), wie die Darstellung 3.19 zeigt.

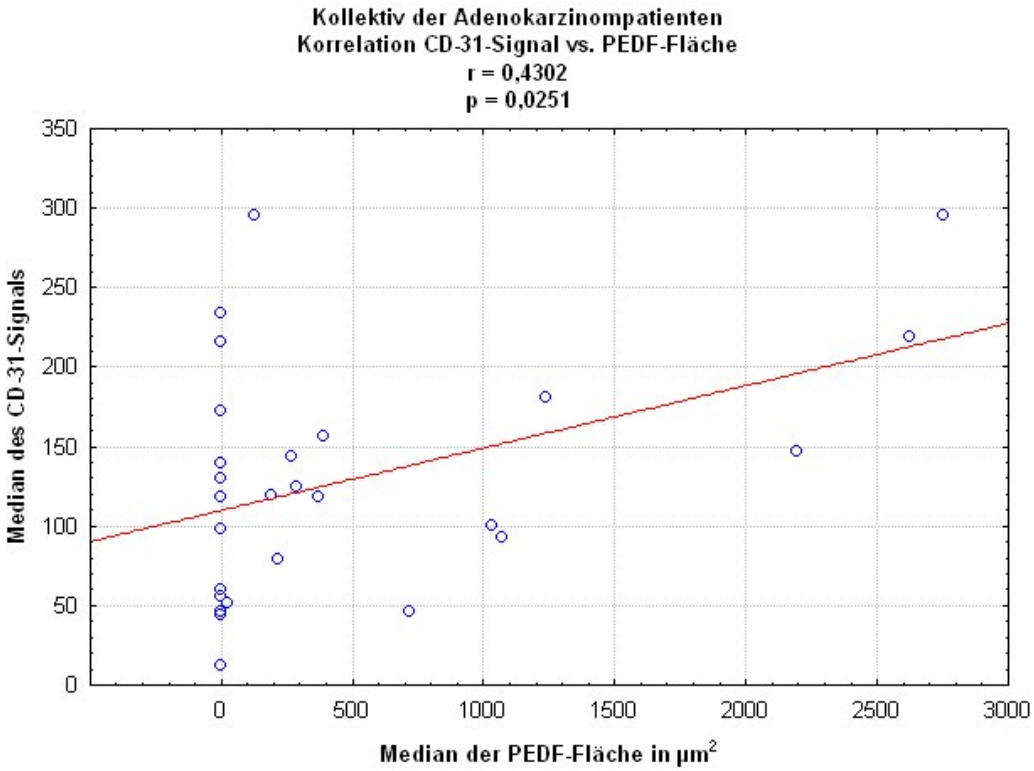


Abbildung 3.18: Darstellung der Korrelation des CD31-Signals und der PEDF- Fläche beim Kollektiv der Adenokarzinompatienten

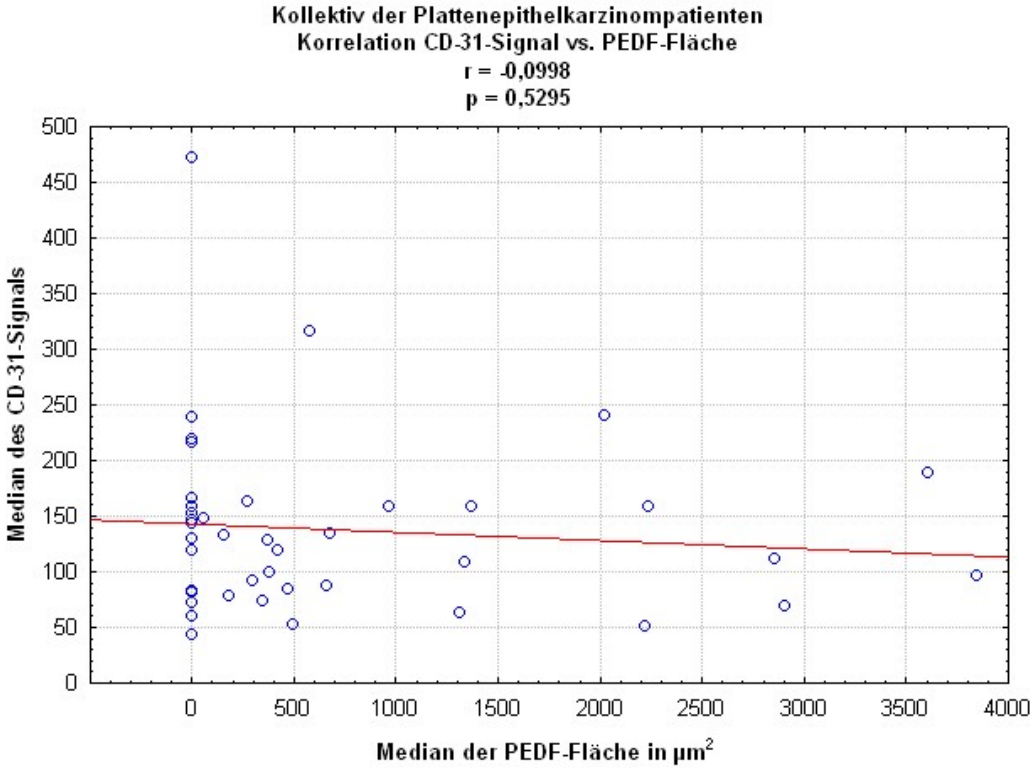


Abbildung 3.19: Darstellung der Korrelation des CD31-Signals und der PEDF- Fläche beim Kollektiv der Plattenepithelkarzinompatienten

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dem hier untersuchten Patientenkollektiv die Patienten mit einem Tumor von geringerem Durchmesser eine deutlich bessere Überlebensprognose haben als Patienten mit einem Tumor größeren Durchmessers. Untersuchungen zur Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom CD31-Expressionsstatus ergaben ein statistisch signifikant besseres Überleben bei hoher CD31-Expression. Zudem ergibt sich eine signifikante Korrelation der CD31-Signale und der PEDF-Intensität bei Betrachtung des Kollektivs der Plattenepithelkarzinompatienten. Bei Betrachtung der CD31-Signale und der PEDF-Fläche für das Kollektiv der Adenokarzinompatienten besteht ebenfalls eine signifikante Korrelation.

3.4 Korrelation der Messwerte des Gesamtkollektivs zwischen Untersucher 1 und Untersucher 2

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Korrelationen der Messwerte des Gesamtkollektivs zwischen Untersucher 1 und Untersucher 2 bildlich dargestellt. Die Korrelation der CD31-Auswertung ist mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0,996 eindeutig. Der Mittelwert von Untersucher 2 liegt mit einem Wert von 147,90 minimal über dem Wert des Untersuchers 1, welcher 145,99 beträgt.

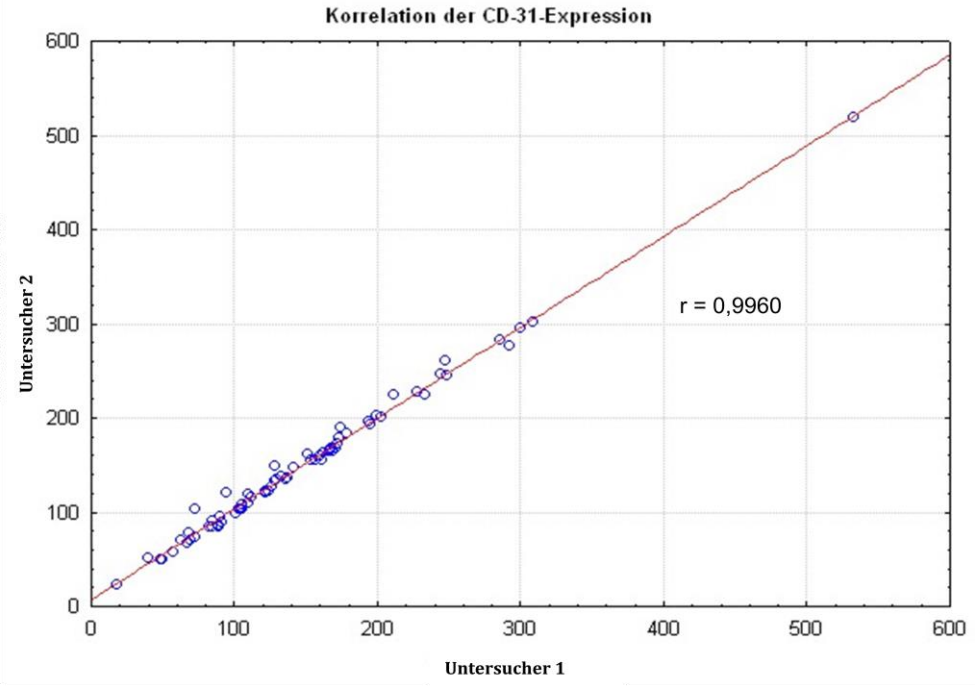


Abbildung 3.20: Korrelation der CD31-Expression zwischen Untersucher 1 und Untersucher 2

Abbildung 3.21 zeigt die Korrelation der PEDF-Fläche, gemessen in μm^2. Der Korrelationskoeffizient ergibt 0,780 und zeigt eine gute Korrelation zwischen den Untersuchern, weicht jedoch in der Konsistenz leicht ab. Der Mittelwert von Untersucher 1 liegt mit 5384 μm^2 leicht über dem von Untersucher 2, welcher 5247 μm^2 beträgt.

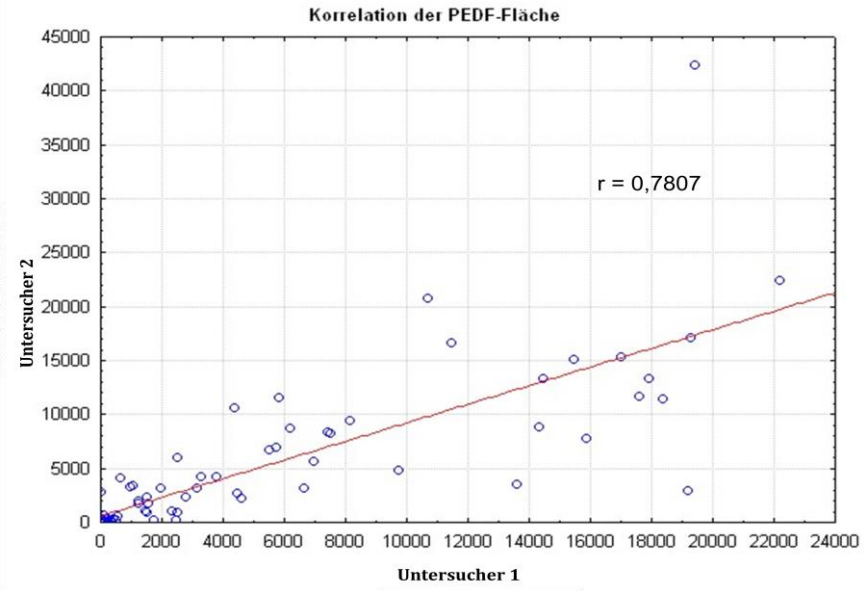


Abbildung 3.21: Korrelation der PEDF-Fläche zwischen Untersucher 1 und Untersucher 2

In Abbildung 3.22 ist die Korrelation der PEDF-Intensität dargestellt. Der Mittelwert des Untersuchers 2 liegt auch hier mit einem Mittelwert von 2,18 etwas über dem Mittelwert von 2,11 des Untersuchers 1. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson beträgt 0,966 und zeigt auch hier eine eindeutige lineare Korrelation.

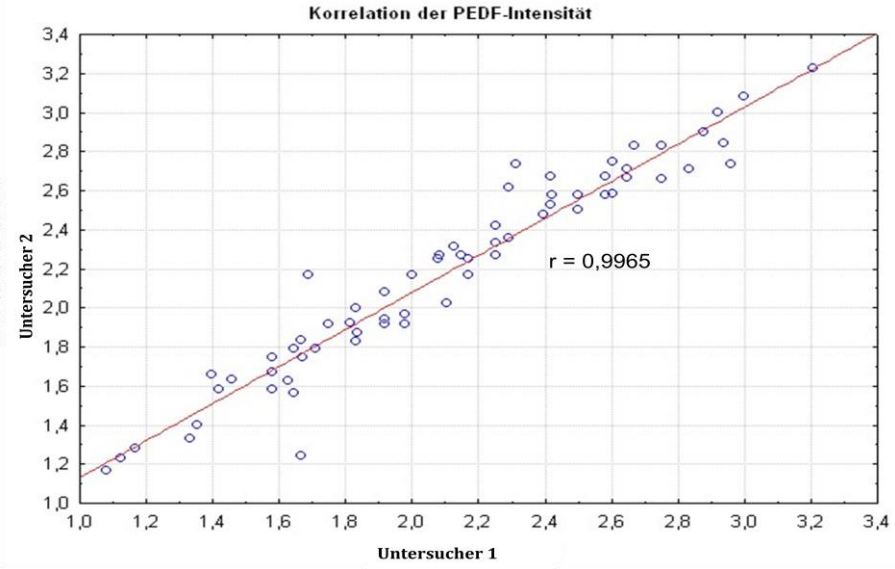


Abbildung 3.22: Korrelation der PEDF-Intensität zwischen Untersucher 1 und Untersucher

4 Diskussion

4.1 Beurteilung der Studienergebnisse und Vergleich mit anderen Studien

In der vorliegenden Studie wurden Untersuchungen zur Neoangiogenese bei Bronchialkarzinompatienten durchgeführt. Hierzu werden CD31 (PECAM-1), welcher als Marker für vorhandene Neoangiogenese fungiert, sowie PEDF als Antiangiogenesefaktor beschrieben und deren Einfluss auf die Gefäßbildung untersucht. Anhand des Kollektivs der Plattenepithelkarzinomproben wurden zunächst Aussagen über die Prognose in Abhängigkeit diverser Variablen gemacht. Die in der Literatur beschriebenen klassischen Einflussgrößen wie Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Tumorstadieneinteilung auf die Überlebensraten konnten in dieser Arbeit bestätigt werden, allerdings erbrachte lediglich die Untersuchung der Tumorgröße eine statistisch signifikante Aussage. Hier konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem pT1-Tumor eine deutlich bessere Überlebensprognose haben als Patienten mit einem Tumor der Größe T2 oder größer. Betrachtet man die Jahresüberlebenszeiten, ist ersichtlich, dass Patienten in einem weit fortgeschrittenen Stadium eine schlechtere Prognose aufweisen als Patienten in einem anfänglichen Stadium. Ebenfalls ist bei Betrachtung des Lymphknotenstatus ersichtlich, dass Patienten ohne Lymphknotenmetastasierung eine bessere Überlebensprognose zeigen als Patienten mit positivem Lymphknotenstatus. Zahlreiche Wissenschaftler beschäftigen sich zunehmend mit der Erforschung neuer Einflussgrößen auf das Tumorwachstum und seine Aggressivität. Hierbei ist die Angiogenese ein zentraler Bestandteil. Einige Studien konnten zeigen, dass eine vermehrte Angiogenese, gemessen an einer erhöhten Gefäßdichte im Tumorgewebe im Vergleich zum normalen Gewebe mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Die intratumorale Gefäßdichte wurde als ein unabhängiger Prognosefaktor für Brust- (Toi et al. 1993) und Blasentumoren beschrieben (Dickinson et al. 1994;). Weidner et al konnten zudem eine Korrelation mit Metastasenbildung bei invasiven Brust- und Prostatakarzinomen feststellen, ermittelt anhand des Faktor VIII. In einer Studie von 49 Patientinnen mit einem Mammakarzinom zeigte die Gruppe mit der geringsten Kapillarisierung nur zu 14% eine Metastasierung, während die Patienten mit einer sehr starken Gefäßdichte zu 100% Metastasen aufwiesen (Weidner et al. 1993; Weidner et al. 1991).

Eine Reihe von Studien haben in den letzten Jahren die prognostische Relevanz der Neoangiogenese auch bei Lungentumoren nachgewiesen (Chandrachud et al. 1997; Fontanini et al. 1997; Hansen et al. 2000; Horak et al. 1992; Toi et al. 1995; Vartanian

und Weidner 1994). Horak et al. zeigten, dass das Tumorgewebe eine stärkere Vaskularisierung besitzt als normales Lungengewebe und dass die Anzahl der Gefäße mit der Lymphknotenmetastasierung assoziiert ist (Horak et al. 1992). Toi et al. untersuchten die intratumorale Gefäßdichte, die sogenannte MVD *(microvessel density)* anhand der Faktoren VIII und VEGF und zeigten in einer postoperativen Studie bei Patienten mit primärem Lungentumor durch Vergleiche von negativen und positiven Lymphknotenmetastasen mittels immunhistochemischer Präparate, dass MVD ein potenter prognostischer Marker ist (Toi et al. 1995). Trotz der vielen Studien, die eine Korrelation zwischen der MVD und der Prognose bei Lungentumoren aufzeigen, müssen Untersuchungen berücksichtigt werden, die keine Beziehung zwischen Gefäßdichte und Prognose ergaben. In einer Studie von 88 Patienten mit einer Beobachtungsperiode von über 5 Jahren zeigten Chandrachud et al., dass die Gefäßdichte nicht assoziiert ist mit dem Alter, Tumortyp, Tumorgröße, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Überlebenszeit (Chandrachud et al. 1997).

Die Angiogenese ist ein komplexes Phänomen, das im Tumorgewebe vermehrt aktiviert wird. Derzeit ist das am häufigsten verwendete Verfahren, um die Angiogenese beurteilen zu können, die Quantifizierung der intratumoralen Gefäßdichte. Um die Mikrogefäße sichtbar zu machen, wird ein immunhistochemisches Verfahren angewandt (wie bereits in Kapitel 2 beschrieben). In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswertung bezüglich der Expression der Angiogenesefaktoren in Anlehnung an die bereits beschriebene Methodik von Weidner et al. durchgeführt (Weidner et al. 1991). Weidner et al. bestimmten die MVD beim Bronchialkarzinom anhand des Faktors VIII, indem die immunhistochemischen Färbungen ausgezählt und die Intensität bestimmt wurde. Das Patientenkollektiv bestand zu 61% aus metastasierten Lungenkarzinom-patienten. Sie konnten zeigen, dass die Anzahl sowie die Intensität bei Patienten mit metastasiertem Lungentumor im Vergleich zu den nichtmetastasierten Patienten deutlich erhöht war (Weidner et al. 1991). Derzeit werden neuere Antikörper eingesetzt, die sich durch ihre höhere Sensitivität etabliert haben wie CD31 (Giatromanolaki et al. 1997).

In der vorliegenden Studie ergab eine hohe CD31-Expression ein statistisch signifikant besseres Überleben der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom. Dieses Ergebnis war aufgrund anderer veröffentlichten Studien recht unerwartet und steht teilweise in Widerspruch zu bereits durchgeführten Untersuchungen. Eine Metaanalyse über die Rolle einiger MVD-Faktoren bei Patienten mit Lungentumor zeigte, dass eine starke Signalgebung der MVD mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. In die Analyse

wurden acht Studien über CD31 eingeschlossen, wobei sieben der Studien den Einfluss von CD31 auf NSCLC untersuchten und eine Studie ein Patientenkollektiv, welches an einem Adenokarzinom erkrankte, betrachtete (Meert et al. 2002). Die Studien schlossen teilweise Patienten unterschiedlichen Stadiums ein, so betrachteten fünf der Studien Patienten im Stadium I und drei der Studien Patienten in den Stadien I bis III, dies erschwert den Vergleich und die Aussagen der Studien. In der Metaanalyse konnte zudem erkannt werden, dass eine standardisierte Beurteilung bei der Zählung der MVD nötig ist. Vor allem die Unterschiede bei der Benutzung unterschiedlicher Antikörperklone, die Identifizierung der sogenannten *hot spots* und die Auszählungsmethoden machten einen Vergleich schwer (Meert et al. 2002). Für die Auszählung ist es wichtig, das Gebiet mit der maximalen Gefäßdichte zu identifizieren (Vermeulen et al. 1997). Dies kann beim Lungentumor erschwert sein, da die Grenze zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe oftmals unscharf durch das Vorhandensein von Atelektasen, Fibrose und Entzündungszellen zu erkennen ist (Meert et al. 2002). Wie bereits erwähnt, habe ich mich in der vorliegenden Arbeit auf das von Weidner et al. beschriebene Auszählungsverfahren gestützt (Weidner et al. 1991). Eine Studie über die Prognose des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms in den Stadien IB-IIA in Abhängigkeit von VEGF, CD31, CD34 und CD105 ergab, dass eine hohe MVD gemessen durch CD34 eine starke Korrelation mit einem niedrigen Überleben hat. Die anderen Angiogenesefaktoren konnten dies nicht eindeutig zeigen, was womöglich daran liegt, dass die Faktoren wie CD31 eher mit metastasierenden Prozessen korrelieren (Mineo et al. 2004). Duarte et al. konnten in ihrer Analyse bezüglich der CD31-Quantifizierung keine Aussagen über das Überleben der Patienten treffen (Duarte et al. 1998).

Untersuchungen des CD31-Angiogenesefaktors an weiteren Tumorentitäten erbrachten unterschiedliche Ergebnisse. Eine Studie an Patienten mit Brustkrebs beschäftigte sich mit der prognostischen Bedeutung der Quantität von PECAM-1. Die Untersuchungen ergaben für die Gesamtüberlebenszeit eine schlechtere Prognose, wenn CD31 stark exprimiert war. Bei einer Signalgebung des CD31-Markers von über 20% korrelierte diese bei lymphknotenpositiven Patienten mit der metastasenfreien Überlebenszeit und der rezidivfreien Überlebensrate (Charpin et al. 1997). Eine weitere Studie ergab ebenfalls das Ergebnis von CD31 als einen unabhängigen Prognosefaktor bei primären Mammakarzinompatienten (Toi et al. 1993). Untersuchungen bei Patienten mit invasivem Blasenkrebs zeigten, dass MVD, gemessen anhand des CD31-Faktors, einen unabhängigen Prognosefaktor auf das Überleben der Patienten darstellt (Dickinson et al. 1994). Studien an Patienten mit malignem Melanom zeigten, dass bei metastasiertem

Melanom eine erhöhte Gefäßdichte, gemessen anhand des CD31-Faktors, besteht, jedoch nicht bei den metastasenfreien Patienten, die keine erhöhte CD31-Expression zeigten (Demirkesen et al. 2006). Zudem zeigte sich bei CD31 eine hohe Assoziation zwischen starker CD31 Signalgebung und der Präsenz von positiven Lymphknoten-metastasen. CD31 zeigt einen starken prognostischen Einfluss bezüglich Gesamt-überlebenszeit und die rezidivfreie Zeit (Valencak et al. 2004). Untersuchungen zur Rolle der Adhäsionsmoleküle bei lymphatischer Metastasierung zeigten eine Assoziation der CD31-Expression und Metastasierung bei T-Zell-Lymphomen (Roos 1993). Bei chronisch lymphatischer Leukämie der B-Zellen (B-CLL) konnte ein solcher Zusammenhang nicht eindeutig belegt werden (Ibrahim et al. 2003). Studien an klarzelligen Nierenzellkarzinompatienten zeigten ein besseres Gesamtüberleben bei hoher CD31-Endotheldichte als bei Patienten mit geringer CD31-Dichte (Anastassiou et al. 1996).

DeLisser et al. untersuchten in Tiermodellen der Ratte und Maus den Effekt der Hemmung von CD31 und zeigten die zentrale Rolle von CD31 in der Neubildung von Gefäßen durch Interaktionen von endothelialen Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen (DeLisser et al. 1997). In weiteren Mausmodellen mit Tumoren des humanen nicht-kleinzelligen Lungenkrebs, murinen Melanomen und murinen Mesotheliomen konnte die Beteiligung von PECAM-1 in der Bildung neuer Gefäße gezeigt werden (Zhou et al. 1999). In einem weiteren Tiermodell wurden Tumore, die in der menschlichen Haut gewachsen sind, auf immundefiziente Mäuse übertragen, die dann mit einem Antikörper gegen humanes PECAM-1 behandelt wurden. Bei diesen Mäusen zeigte sich eine abnehmende Dichte der Gefäßformation um den Tumor (Cao et al. 2002). Diese Studien zeigen, dass die zentrale Rolle des CD31-Faktors in der Neoangiogenese unumstritten ist. Allerdings ist auffällig, dass die Ergebnisse der veröffentlichten Studien, die sich mit diesem Faktor und seiner Aussage über die Prognose bei Tumoren auseinandersetzten, Unterschiede aufweisen. Zum einen zeigen sich diese Unterschiede im Vergleich der verschiedenen Tumorentitäten und zum anderen kommen die Studien an Lungentumoren zu entgegengesetzten Aussagen wie oben beschrieben. Dies verdeutlicht, dass CD31, obgleich seine Funktion in der Neoangiogenese gezeigt wurde und auch die zentrale Rolle der Neoangiogenese für das Tumorwachstum von entscheidender Bedeutung ist, als prognostischer Faktor nicht bei allen Tumoren gleich bedeutend ist. Ein großer Teil der Studien sieht in CD31 einen wichtigen Prognosefaktor, der bei starker Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Da es jedoch Studien zu CD31 gibt, die einen prognostischen Vorteil auf das Überleben sehen, wenn CD31 hoch exprimiert wird, (Anastassiou et al. 1996) und Studien, die keine Korrelation herausgefunden haben (Duarte et al. 1998) oder diese Korrelation nur bei metastasierten Tumoren finden

(Demirkesen et al. 2006; Mineo et al. 2004), sollte CD31 nicht als unabhängiger Prognosefaktor für alle Tumorentitäten gelten.

Womöglich läuft das Tumorwachstum nicht bei jedem Tumor in gleicher Form ab und ist auch eher ein unkontrollierter Vorgang. Für die Zukunft wichtig scheint es herauszufinden, wie das Tumorwachstum bei den unterschiedlichen Tumorentitäten organisiert ist, da es auffällig ist, dass die Studien an beispielsweise Mammakarzinom-patienten alle zu dem Ergebnis kommen, dass eine starke CD31-Exprimierung mit einer schlechten Prognose assoziiert und dagegen die Studien bei Bronchialkarzinompatienten zu ungleichen Aussagen führen.

Bei Patienten mit CD31 positivem Tumor, die eine starke Expression von CD31 aufweisen, stellt eine Antitumortherapie mit dem Angriffspunkt der CD31-Rezeptoren eine mögliche Behandlung dar. In Tiermodellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung von CD31 eine Dichteabnahme der Gefäßformation erzielt (Cao et al. 2002; DeLisser et al. 1997; Zhou et al. 1999). Zu untersuchen bleibt, inwieweit diese Antagonisierung den Tumor tatsächlich bekämpft oder ob es nur ein weiteres Wachstum blockiert. Bergom et al zeigten, dass PECAM-1 auch einen direkten Effekt auf den Tumor ausübt. Sie zeigten, dass bei Überexpression in Mesotheliomzellen CD31 Resistenzen gegenüber die von Etoposid als DNA-schädigendes Chemotherapeutikum ausgeübte Apoptose induziert. PECAM-1 scheint demnach die Zellen vor Chemotherapie-induzierter Apoptose zu schützen. Eine Senkung der PECAM-1-Expression könnte demnach die Tumorzellen anfälliger für bestimmte Chemotherapeutika machen (Bergom et al. 2006).

Als Antiangiogenesefaktor wurde der Faktor PEDF untersucht. PEDF ist ein Mitglied der Serinproteaseinhibitorfamilie, deren Mitglieder sich untereinander ähneln und wichtige Funktionen bei zellulären Prozessen ausüben (Steele et al. 1993; Xu et al. 2006), für PEDF jedoch konnte bisher kein inhibitorischer Effekt auf Proteasen nachgewiesen werden (Becerra et al. 1995). PEDF spielt eine zentrale Rolle als natürlicher Angiogenesehemmer (Steele et al. 1993) und besitzt ein sehr großes Potential als antiangiogener Faktor während der Neovaskularisation von Blutgefäßen (Tombran-Tink und Barnstable 2003a). Es konnte gezeigt werden, dass PEDF der stärkste endogene Inhibitor der Angiogenese ist, wobei seine Potenz doppelt so hoch wie Angiostatin und mehr als siebenmal so hoch wie Endostatin ist (Anastassiou et al. 1996). PEDF ist in der Lage, die Endothelzellmigration selbst in Anwesenheit von proangiogenen Faktoren wie VEGF, Fibroblasten-Wachstumsfaktor-1, Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 und Inter-leukin-8 zu hemmen (Hansen et al. 1998).

In der vorliegenden Studie wurden Überlebenszeitanalysen in Abhängigkeit des PEDF-Signals durchgeführt. Sowohl die Untersuchungen zur PEDF-Fläche als auch zur PEDF-Intensität ergaben hier keine Korrelation auf das Überleben und somit auf die Prognose.

In einer Studie über die Expression von PEDF und seiner Prognose bei NSCLC wurden 91 Patienten beobachtet; es konnte gezeigt werden, dass die Expression von PEDF im Tumorgewebe geringer ist und dass die PEDF-Expressionsstärke negativ mit dem Tumorstadium, der Tumorgröße und dem Überleben der Patienten korreliert (Zhang et al. 2006). Eine weitere Studie mit rekombinantem PEDF, welches auf zwei Lungenkrebszelllinien gegeben wurde, ergab *in vitro* ein signifikant reduziertes Wachstum der Tumorzellen ohne das Wachstum der anderen vaskulären Zelllinien zu beeinflussen. Ebenfalls konnte eine verringerte Motilität und Adhäsion an die extrazelluläre Matrix im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden (Chen et al. 2009). Eine andere Untersuchung beschäftigte sich mit der Wirkung eines Ribozymtransgens, welches die menschliche PEDF-Expression hemmen soll. Die Wirkung wurde auf in vitro Lungenkrebszellen, endotheliales Zellwachstum und die Angiogenese untersucht. Es zeigte sich sowohl in der menschlichen Lungenkrebslinie als auch in den Endothelzellen (HECV) ein erheblich beschleunigtes Wachstum, wenn PEDF ausgeschaltet wurde (Zhang et al. 2005). Ein Gentransfer des PEDF-Faktors zeigte *in vitro* und *in vivo* nach intratumoraler Verabreichung in einen Lungentumor eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums, ein verlängertes Überleben der Mäuse und eine verminderte Gefäßdichte im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mahtabifard et al. 2003). Dieser Antitumoreffekt konnte auch in einem weiteren Mausmodell des Lungenkarzinoms beobachtet werden. Auch hier verursachte eine intratumorale Injektion des PEDF eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums, und es konnte eine Abnahme der Mikrogefäßdichte beobachtet werden (Wang et al. 2003).

Untersuchungen an einem Patientenkollektiv mit einem duktalen Adenokarzinom des Pankreas ergaben eine Assoziation zwischen der PEDF-Expression und geringer MVD. Außerdem zeigten die Patienten in einem geringeren Tumorstadium eine stärkere PEDF-Signalgebung und die PEDF-positiven Patienten zeigten ein besseres Überleben im Vergleich zu den PEDF-negativen Patienten (Uehara et al. 2004). Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der Frage, ob PEDF ein potenter Tumorsuppressor und somit ein möglicher Kandidat in der Krebstherapie darstellt. Die Untersuchungen wurden in vitro und in vivo anhand von Pankreaskarzinomzelllinien und einem Mausmodell durchgeführt. Es zeigte sich, dass PEDF eine stark hemmende Wirkung auf die Proliferation und

Migration der Zellen ausübt und die Größe der Tumore mit einer Überexpression an PEDF deutlich kleiner war als die der Kontrollgruppe. In Gentransfermodellen verursacht eine intratumorale Injektion eines Vektors, welcher für PEDF codiert, eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums und eine verminderte Gefäßdichte (Hase et al. 2005). Eine weitere Studie wurde entworfen um die Wirkung von rekombinantem PEDF auf die Gefäßneubildung und das Wachstum des Zervixkarzinoms zu untersuchen. Die Studie zeigte eine Herunterregulation des PEDF-Faktors in Zervixkarzinomnestern. Eine intraperitoneale Injektion von PEDF in xenotransplantierten Mäusen mit einem Zervixkarzinom zeigte eine Unterdrückung des Tumorwachstums mit einer Reduktion um 68%. Die Gefäßdichte von Tumorgewebe, das mit PEDF behandelt wurde, nahm signifikant ab (Yang et al. 2010). Bei epithelialen Ovarialkarzinomen zeigte sich ebenfalls eine stark reduzierte PEDF-Expression des Tumorgewebes im Vergleich zum normalen Gewebe. Darüber hinaus hemmt exogenes PEDF das Wachstum von Ovarialkarzinomzelllinien und zugeführtes Östrogen hemmt die Expression von PEDF (Cheung et al. 2006). Ebenso in Wilms-Tumoren der Niere konnte eine reduzierte PEDF-Expression im Vergleich zum normalen Nierengewebe nachgewiesen werden (Abramson et al. 2006; Abramson et al. 2003). Untersuchungen an Zelllinien des Glioblastoma multiforme, dem häufigsten bösartigen Hirntumor bei Erwachsenen, zeigten, dass PEDF die Expression von VEGF herunterreguliert und die Apoptose fördert. Die induzierte Apoptose ist mit einem Anstieg an p53 und Bax und einer Hemmung von Bcl-2 verbunden und zeigt somit den hemmenden Einfluss von PEDF auf den Zellzyklus und den fördernden Einfluss auf die Apoptose (Zhang et al. 2007). Die Induktion von PEDF auf die Apoptose von Tumorzellen und die Unterdrückung des Proangiogenesefaktors VEGF konnte auch in kultivierten menschlichen Osteosarkomzellen gezeigt werden (Takenaka et al. 2005). In einer weiteren Studie wurden *in vitro* und *in vivo* die Wachstumseigenschaften einer humanen, malignen Melanomzelllinie untersucht. Diese wurde transfiziert, sodass PEDF überexprimiert wurde. Es konnte eine Unterdrückung der Tumorangiogenese und eine Induktion der Fas-Ligand-abhängigen Apoptose in Tumorzellen beobachtet werden (Abe et al. 2004).

Der antiangiogene Effekt von PEDF zeigt sich als sehr spezifisch. Während bei Untersuchungen am Tiermodell neovaskuläre Gefäße in ihrer Entwicklung gehemmt werden, nimmt PEDF auf die Entwicklung normaler Gefäße keinen Einfluss (Wong et al. 2004). Diese Eigenschaft ist für die Therapiemöglichkeit mittels PEDF sehr wichtig.

Die Daten der Studien über die Wirkung des PEDF-Faktors deuten darauf hin, dass PEDF eine entscheidende biologische Wirkung auf die Tumorangiogenese ausübt und

dass PEDF eine mögliche neue Therapieoption in der Bekämpfung der verschiedenen Tumorentitäten bedeutet.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich außerdem mit dem Verhalten der untersuchten Faktoren CD31 und PEDF bei Adeno- und Plattenepithelkarzinompatienten. Diese Faktoren wurden ausgewählt, da sie laut aktuellem Wissensstand (s.o.) teilweise antagonistische Funktionen bezüglich Angiogenese ausüben. Dazu zählt insbesondere ihre gegensätzliche Auswirkung auf die Proliferation der Endothelzellen. Betrachtet man das Kollektiv der Plattenepithelkarzinome ist auffällig, dass sich CD31 und PEDF, gemessen anhand der Intensität, entgegengesetzt verhalten mit einer statistischen Signifikanz und einem p-Wert von 0,013. Es zeigt sich ein Trend für eine negative Korrelation bei jedoch kleinem Korrelationskoeffizienten (-0,0661). Die Plattenepithelkarzinome könnten eine verstärkte Abhängigkeit von Vaskularisierungsprozessen haben. Betrachtet man die Korrelation des CD31-Signals und der PEDF-Fläche ergab sich für das Gesamtkollektiv keine signifikante Korrelation (p= 0,553), das Kollektiv der Adenokarzinompatienten zeigte jedoch eine positive Korrelation (p= 0,025). Die Untersuchung des alleinigen Plattenepithelkarzinomkollektivs ergab wiederum keine signifikante Korrelation (p= 0,526). Weiterhin lässt sich auch hier das Phänomen erahnen, dass sich Tumorentitäten unterschiedlich verhalten könnten, da wir unterschiedliche Signalmuster bei den Proben der Patienten des Plattenepitelkarzinomkollektivs und des Adenokarzinomkollektivs sehen.

Trotz der bedeutenden Fortschritte in der chirurgischen Resektion und neoadjuvanten und adjuvanten Chemotherapie und Radiotherapie gibt es eine signifikante Anzahl an Tumoren, die nicht mehr auf solch eine aggressive Behandlung ansprechen. Gerade bei diesen Tumoren verspricht man sich durch gezielte Therapie eine mögliche Heilung zu erlangen. Um das erreichen zu können, ist es wichtig, den Tumor und seine Signalwege und Mechanismen des Wachstums zu erforschen. Verschiedene Ziele werden untersucht wie Signalwege, Matrix-Zell-Interaktionen und Tumorangiogenese. Angiogenese, der Prozess durch den neue Blutgefäße entstehen, ist ein zentraler Schritt für das Tumorwachstum und eine mögliche Metastasierung. Daher ist der Therapieansatz mit dem Ziel der Inhibition der Neovaskularisation ein vielversprechendes Konzept in der Krebstherapie.

In den vergangenen Jahren wurden bereits Medikamente entwickelt, die ihre Angriffspunkte in der Neoangiogenese haben. Die Präparate lassen sich in vier Gruppen

einteilen: Matrixmetalloprotease-Inhibitoren, Inhibitoren der Endothelzellen, Inhibitoren der proangiogenetischen Faktoren und die Integrinantagonisten. Das Hauptziel dieser Medikamente ist es, eine weitere Progression der Erkrankung zu verhindern. Bei alleiniger Gabe sind Voll- oder Teilremissionen selten zu erreichen, da diese Substanzen an sich nicht zytotoxisch sind, ihren Angriffspunkt stellen die Endothelzellen dar und nicht die Tumorzellen selbst. Eine klinisch relevante Wirksamkeit wird sich nur durch eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit zeigen, was Langzeitstudien beobachten. Eine interessante Entdeckung ist, dass CD31 ein Schutzmechanismus für Chemotherapie-induzierte Apoptose zu besitzen scheint (Bergom et al. 2006), wonach eine Kombinationstherapie eines CD31-Inhibitors mit einem Chemotherapeutikum erfolgsversprechende Wirkung erzielen könnte.

4.2 Beurteilung der beschriebenen methodischen Ansätze

Der Nachweis von Neoangiogenese am Primärtumor wird anhand immunhistochemischer Färbungen durchgeführt, so auch in dieser Studie. Studien zur Neoangiogenese werden mittels unterschiedlicher Antikörper durchgeführt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich die Antikörper in ihrer Wirksamkeit und ihrem Färbeergebnis unterscheiden, demnach kann es zu deutlich unterschiedlichen Tumorgefäßzahlen desselben Tumorareals kommen. Jedoch sieht man auch im Vergleich von Studien, die denselben Antikörper verwendet haben, Unterschiede in den Resultaten.

Zudem muss berücksichtigt werden, dass es unterschiedliche Methoden in der Quantifizierung der Gefäßdichte gibt. In den erwähnten Studien über die Korrelation des CD31-Faktors beim Bronchialkarzinom wurden unterschiedliche Methoden zur Quantifizierung angewendet. Mineo et al. stützten sich bei dem Vergleich der Faktoren VEGF, CD31, CD34 und CD105 auf die Methode von Weidner und konnten für CD31 keinen entscheidenden Einfluss auf die Prognose feststellen (Mineo et al. 2004). Duarte et al. führten ebenfalls die Methodik nach Weidner durch, kamen aber bei der CD31-Quantifizierung zu keinem Zusammenhang von CD31 und dem Überleben der Patienten (Duarte et al. 1998). In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls die Auswertung anhand der Methode nach Weidner et al. angewandt. Bei dieser Methodik werden verschiedene Areale der Tumorpräparate bei 40facher und 100facher Vergrößerung auf den Bereich der stärksten Gefäßdichte hin untersucht. Nun wird bei 200facher Vergrößerung in vier orthogonal zueinander liegenden 0,74mm^2 großen Feldern die MVD bestimmt. Auf diese

Weise wird die maximale Gefäßdichte eines Tumorpräparates ermittelt, welche dann als Maß für das angiogenetische Potential des Tumors gilt. Eine andere Methodik stellt die Chalkley Count-Analyse dar, hier erfolgt eine relative Bestimmung der Mikrogefäßdichte durch Zählung der Schnittpunkte eines Messrasters mit den markierten Endothelstrukturen (Chalkley 1943).

Des Weiteren gibt es Variationen in der Wahl der Messfeldgröße und der Gefäßidentifikation. Die Gefäßidentifikation erfolgt durch den Betrachter am Lichtmikroskop und ist demnach eine subjektive Entscheidung. In der Regel werden alle gefärbten Strukturen gezählt, es muss kein eindeutiges Gefäßlumen erkennbar sein. Individuelle Unterschiede in der Anzahl der detektierten Mikrogefäße pro Standardfläche sind in Abhängigkeit von der Erfahrung des Untersuchers vorzufinden (Vermeulen et al. 1997) und betragen bis zu 30% (Hansen et al. 1998). In der vorliegenden Studie wurde die Auswertung nach entsprechender Einarbeitung in die Methode von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt. Wie bereits im Kapitel „Ergebnisse“ dargestellt, zeigten die Resultate der beiden unabhängigen Untersucher eine eindeutige lineare Korrelation, errechnet mittels der Pearson Korrelation, welche nahezu identische Untersuchungsergebnisse anzeigt mit einem sehr hohen Korrelationskoeffizienten.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Studie die in der Literatur beschriebenen klassischen Einflussgrößen auf das Überleben wie Tumorstadium, Tumorgröße und Lymphknotenstatus, ermittelt anhand des Kollektivs der Plattenepithelkarzinompatienten, bestätigt werden konnten. Der Einfluss der Tumorgröße ergab hier ein statistisch signifikantes Ergebnis, Patienten mit einem pT1-Tumor wiesen eine deutlich bessere Überlebensprognose auf als Patienten mit einem pT2-Tumor oder größer. Zur Untersuchung der Neoangiogenese wurde die intramurale Gefäßdichte mittels immunhistochemischer Färbung von CD31 und PEDF betrachtet. CD31 ist als Neoangiogenesefaktor und PEDF als Antiangiogenesefaktor beschrieben. Eine hohe CD31-Expression zeigte ein signifikant besseres Überleben der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom. Der Marker PEDF, gemessen anhand der Intensität und Fläche, konnte keinen Einfluss auf das Überleben zeigen. In der vorliegenden Arbeit wurden zudem die Korrelationen der Faktoren zueinander anhand des Kollektivs der Plattenepithelkarzinompatienten und der Patienten, die an einem Adenokarzinom erkrankt waren, untersucht. Hierbei zeigte sich nur für das Plattenepithelkarzinom ein leicht hemmender Einfluss der PEDF-Intensität auf die CD31-Expression.

5 Literaturverzeichnis

(2001): BTS guidelines: guidelines on the selection of patients with lung cancer for surgery. Thorax 56(2): 89-108

Abe R, Shimizu T, Yamagishi S, Shibaki A, Amano S, Inagaki Y, Watanabe H, Sugawara H, Nakamura H, Takeuchi M, et al. (2004): Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo. Am J Pathol 164(4): 1225-1232

Abramson LP, Stellmach V, Doll JA, Cornwell M, Arensman RM, Crawford SE (2003): Wilms' tumor growth is suppressed by antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in a xenograft model. J Pediatr Surg 38(3): 336-342; discussion 336-342

Abramson LP, Browne M, Stellmach V, Doll J, Cornwell M, Reynolds M, Arensman RM, Crawford SE (2006): Pigment epithelium-derived factor targets endothelial and epithelial cells in Wilms' tumor. J Pediatr Surg 41(8): 1351-1356

Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ (1991): Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. J Cell Biol 114(5): 1059-1068

Anastassiou G, Duensing S, Steinhoff G, Zorn U, Grosse J, Dallmann I, Kirchner H, Ganser A, Atzpodien J (1996): Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): a potential prognostic marker involved in leukocyte infiltration of renal cell carcinoma. Oncology 53(2): 127-132

Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J (2004): Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 350(4): 351-360

Barrera R, Shi W, Amar D, Thaler HT, Gabovich N, Bains MS, White DA (2005): Smoking and timing of cessation: impact on pulmonary complications after thoracotomy. Chest 127(6): 1977-1983

Becerra SP, Sagasti A, Spinella P, Notario V (1995): Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin. Neurotrophic activity does not require the serpin reactive loop. J Biol Chem 270(43): 25992-25999

Behr J, Buck AK, Gallenberger S, Hauck RW, Häußinger K, Huber RM, Mueller-Lisse UG (2009): Diagnostik des Lungenkarzinoms. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumoren der Lunge und des Mediastinums. In:Tumorzentrum München. 8.Auflage; Zuckerschwerdt Verlag München: 11-40

Bergom C, Goel R, Paddock C, Gao C, Newman DK, Matsuyama S, Newman PJ (2006): The cell-adhesion and signaling molecule PECAM-1 is a molecular mediator of resistance to genotoxic chemotherapy. Cancer Biol Ther 5(12): 1699-1707

Berman ME, Muller WA (1995): Ligation of platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) on monocytes and neutrophils increases binding capacity of leukocyte CR3 (CD11b/CD18). J Immunol 154(1): 299-307

Berman ME, Xie Y, Muller WA (1996): Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. J Immunol 156(4): 1515-1524

Bikfalvi A (1995): Significance of angiogenesis in tumour progression and metastasis. Eur J Cancer 31A(7-8): 1101-1104

Bilak MM, Corse AM, Bilak SR, Lehar M, Tombran-Tink J, Kuncl RW (1999): Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. J Neuropathol Exp Neurol 58(7): 719-728

Bilello KS, Murin S, Matthay RA (2002): Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer. Clin Chest Med 23(1): 1-25

Böcker W, Denk H, Heitz P, Moch H: Pathologie. 4.Auflage; Urban&Fischer München 2008

Bofetta P (2002): Involuntary smoking and lung cancer. Scand J Work Environ Health 28: 30-40

Bouck N (2002): PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. Trends Mol Med 8(7): 330-334

Boyle P (1997): Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: a review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, October 1996. Lung Cancer 17(1): 1-60

Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ (2002): Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. Chest 122(3): 1037-1057

Burke PA, DeNardo SJ (2001): Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy. Crit Rev Oncol Hematol 39(1-2): 155-171

Campbell SC, Volpert OV, Ivanovich M, Bouck NP (1998): Molecular mediators of angiogenesis in bladder cancer. Cancer Res 58(6): 1298-1304

Carmeliet P, Jain RK (2000): Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 407(6801): 249-257

Cao G, O'Brien CD, Zhou Z, Sanders SM, Greenbaum JN, Makrigiannakis A, DeLisser HM (2002): Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. Am J Physiol Cell Physiol 282(5): C1181-1190

Chalkley HW (1943): Method for quantitative morphologic analysis of tissues. J Natl Cancer Inst 4: 47-53

Chandrachud LM, Pendleton N, Chisholm DM, Horan MA, Schor AM (1997): Relationship between vascularity, age and survival in non-small-cell lung cancer. Br J Cancer 76(10): 1367-1375

Charpin C, Garcia S, Bouvier C, Martini F, Andrac L, Bonnier P, Lavaut MN, Allasia C (1997): CD31/PECAM automated and quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas: correlation with patient follow-up. Am J Clin Pathol 107(5): 534-541

Chen J, Ye L, Zhang L, Jiang WG (2009): The molecular impact of pigment epithelium-derived factor, PEDF, on lung cancer cells and the clinical significance. Int J Oncol 35(1): 159-166

Cheung LW, Au SC, Cheung AN, Ngan HY, Tombran-Tink J, Auersperg N, Wong AS (2006): Pigment epithelium-derived factor is estrogen sensitive and inhibits the growth of human ovarian cancer and ovarian surface epithelial cells. Endocrinology 147(9): 4179-4191

Classen M, Diehl V, Kochsiek W, Schmiegel W, Berdel WE, Böhm M: Innere Medizin. 6.Auflage; Urban&Fischer, München,Jena 2009

Crawford SE, Stellmach V, Ranalli M, Huang X, Huang L, Volpert O, De Vries GH, Abramson LP, Bouck N (2001): Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity. J Cell Sci 114(Pt 24): 4421-4428

Danner BC, Didilis VN, Wiemeyer S, Stojanovic T, Kitz J, Emmert A, Fuzesi L, Schondube FA (2010): Long-term survival is linked to serum LDH and partly to tumour LDH-5 in NSCLC. Anticancer Res 30(4): 1347-1351

Danner BC, Hellms T, Jung K, Gunawan B, Didilis V, Füzesi L, Schöndube FA (2011a): Prognostic value of chromosomal cluster in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. Ann Thorac Surg 92: 1038-1043

Danner BC, Gerdes JS, Jung K, Sander B, Enders C, Liersch T, Seipelt R, Gutenberg A, Gunawan B, Schöndube FA, Füzesi L (2011b): Comparison of chromosomal aberrations in primary colorectal carcinomas to their pulmonary metastases. Cancer Genetic; 204: 122-128

Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, et al. (1996): Isolation of angiopoietin-1, a

ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. Cell 87(7): 1161-1169

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(5425): 245-248

de Perrot M, Licker M, Reymond MA, Robert J, Spiliopoulos A (1999): Influence of age on operative mortality and long-term survival after lung resection for bronchogenic carcinoma. Eur Respir J 14(2): 419-422

DeCoster MA, Schabelman E, Tombran-Tink J, Bazan NG (1999): Neuroprotection by pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons. J Neurosci Res 56(6): 604-610

DeLisser HM, Chilkotowsky J, Yan HC, Daise ML, Buck CA, Albelda SM (1994): Deletions in the cytoplasmic domain of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) result in changes in ligand binding properties. J Cell Biol 124(1-2): 195-203

DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, et al. (1997): Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. Am J Pathol 151(3): 671-677

Demirkesen C, Buyukpinarbasili N, Ramazanoglu R, Oguz O, Mandel NM, Kaner G (2006): The correlation of angiogenesis with metastasis in primary cutaneous melanoma: a comparative analysis of microvessel density, expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor. Pathology 38(2): 132-137

Denekamp J (1993): Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. Br J Radiol 66(783): 181-196

Depierre A, Milleron B, Moro-Sibilot D, Chevret S, Quoix E, Lebeau B, Braun D, Breton JL, Lemarie E, Gouva S, et al. (2002): Preoperative chemotherapy followed by surgery compared with primary surgery in resectable stage I (except T1N0), II, and IIIa non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 20(1): 247-253

Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT (2009): The new lung cancer staging system. Chest 136(1): 260-271

Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM (2005): International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. Int J Cancer 117(2): 294-299

DeYoung BR, Swanson PE, Argenyi ZB, Ritter JH, Fitzgibbon JF, Stahl DJ, Hoover W, Wick MR (1995): CD31 immunoreactivity in mesenchymal neoplasms of the skin and subcutis: report of 145 cases and review of putative immunohistologic markers of endothelial differentiation. J Cutan Pathol 22(3): 215-222

Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, Hollyer J, Sibley GN, Harris AL (1994): Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. Br J Urol 74(6): 762-766

Dietel M, Suttorp N, Zeitz M, Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J (2008): Harrisons Innere Medizin. ABW Wissenschaftsverlag GmbH,Berlin 17

Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, Bergh AR, Lee C, Abramson LP, Cornwell ML, Pins MR, Borensztajn J, Crawford SE (2003): Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. Nat Med 9(6): 774-780

Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, Gonzales-Larriba JL, Grodzki T, Pereira JR, Le Groumellec A, Lorusso V, et al. (2006): Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIA non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. Lancet Oncol 7(9): 719-727

Duarte IG, Bufkin BL, Pennington MF, Gal AA, Cohen C, Kosinski AS, Mansour KA, Miller JI (1998): Angiogenesis as a predictor of survival after surgical resection for stage I non-small-cell lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg 115(3): 652-658; discussion 658-659

Dvorak HF, Gresser I (1989): Microvascular injury in pathogenesis of interferon-induced necrosis of subcutaneous tumors in mice. J Natl Cancer Inst 81(7): 497-502

Ek ET, Dass CR, Choong PF (2006a): PEDF: a potential molecular therapeutic target with multiple anti-cancer activities. Trends Mol Med 12(10): 497-502

Ek ET, Dass CR, Choong PF (2006b): Pigment epithelium-derived factor: a multimodal tumor inhibitor. Mol Cancer Ther 5(7): 1641-1646

Engel CJ, Bennett ST, Chambers AF, Doig GS, Kerkvliet N, O'Malley FP (1996): Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer when controlled for Dukes staging. Am J Surg Pathol 20(10): 1260-1265

Epstein SK, Faling LJ, Daly BD, Celli BR (1993): Predicting complications after pulmonary resection. Preoperative exercise testing vs a multifactorial cardiopulmonary risk index. Chest 104(3): 694-700

Feng GS, Hui CC, Pawson T (1993): SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. Science 259(5101): 1607-1611

Fernandez-Garcia NI, Volpert OV, Jimenez B (2007): Pigment epithelium-derived factor as a multifunctional antitumor factor. J Mol Med 85(1): 15-22

Ferrara N (2000): Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. Recent Prog Horm Res 55: 15-35; discussion 35-16

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003): The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 9(6): 669-676

Folkman J (1989): What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst(82): 4-6

Fontanini G, Lucchi M, Vignati S, Mussi A, Ciardiello F, De Laurentiis M, De Placido S, Basolo F, Angeletti CA, Bevilacqua G (1997): Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study. J Natl Cancer Inst 89(12): 881-886

Garcia M, Fernandez-Garcia NI, Rivas V, Carretero M, Escamez MJ, Gonzalez-Martin A, Medrano EE, Volpert O, Jorcano JL, Jimenez B, et al. (2004): Inhibition of xenografted human melanoma growth and prevention of metastasis development by dual antiangiogenic/antitumor activities of pigment epithelium-derived factor. Cancer Res 64(16): 5632-5642

Giatromanolaki A, Koukourakis M, O'Byrne K, Fox S, Whitehouse R, Talbot DC, Harris AL, Gatter KC (1996): Prognostic value of angiogenesis in operable non-small cell lung cancer. J Pathol 179(1): 80-88

Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Theodossiou D, Barbatis K, O'Byrne K, Harris AL, Gatter KC (1997): Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 3(12 Pt 1): 2485-2492

Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP (1990): A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. Proc Natl Acad Sci U S A 87(17): 6624-6628

Graesser D, Solowiej A, Bruckner M, Osterweil E, Juedes A, Davis S, Ruddle N, Engelhardt B, Madri JA (2002): Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice. J Clin Invest 92: 109:383

Han ZC, Liu Y (1999): Angiogenesis: state of the art. Int J Hematol 70(2): 68-82

Hanahan D, Folkman J (1996): Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86(3): 353-364

Hansen S, Grabau DA, Rose C, Bak M, Sorensen FB (1998): Angiogenesis in breast cancer: a comparative study of the observer variability of methods for determining microvessel density. Lab Invest 78(12): 1563-1573

Hansen S, Grabau DA, Sorensen FB, Bak M, Vach W, Rose C (2000): The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. Clin Cancer Res 6(1): 139-146

Hase R, Miyamoto M, Uehara H, Kadoya M, Ebihara Y, Murakami Y, Takahashi R, Mega S, Li L, Shichinohe T, et al. (2005): Pigment epithelium-derived factor gene therapy inhibits human pancreatic cancer in mice. Clin Cancer Res 11(24 Pt 1): 8737-8744

Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM (2000): Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. Am J Pathol 156(4): 1363-1380

Häußinger K, Kohlhäufl M (2006): Ätiologie und Epidemiologie des Bronchialkarzinoms. In: Tumoren der Lunge und des Mediastinums. Hrsg.v. Huber RM. 7.Auflage; Tumorzentrum München und Zuckschwerdt Verlag, München 2006,S.1-6

Hecht SS (1999): Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. J Natl Cancer Inst 91(14): 1194-1210

Henne-Bruns D, Dürig M, Kremer B: Chirurgie. Duale Reihe. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2001

Herold G: Innere Medizin. Herold, Köln 2011

Hirschi KK, D'Amore PA (1996): Pericytes in the microvasculature. Cardiovasc Res 32(4): 687-698

Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniewska K, Harris AL (1992): Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. Lancet 340(8828): 1120-1124

Huber RM, Schalhorn A (2009): Therapieplan für das Lungenkarzinom. In: Tumor Zentrum München. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge-Tumoren der Lunge und des Mediastinums. Zuckerschwerdt Verlag München: 82-85

Ibrahim S, Jilani I, O'Brien S, Rogers A, Manshouri T, Giles F, Faderl S, Thomas D, Kantarjian H, Keating M, et al. (2003): Clinical relevance of the expression of the CD31 ligand for CD38 in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Cancer 97(8): 1914-1919

Jackson DE, Ward CM, Wang R, Newman PJ (1997): The protein-tyrosine phosphatase SHP-2 binds platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and forms a distinct signaling complex during platelet aggregation. Evidence for a mechanistic link between PECAM-1- and integrin-mediated cellular signaling. J Biol Chem 272(11): 6986-6993

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008): Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 58(2): 71-96

Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE (2002): Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. Oncogene 21(14): 2245-2252

Jimenez B, Volpert OV (2001): Mechanistic insights on the inhibition of tumor angiogenesis. J Mol Med (Berl) 78(12): 663-672

Jones PF (1997): Tied up (or down?) with angiopoietins. Angiogenesis 1(1): 38-44

Klagsbrun M, D'Amore PA (1996): Vascular endothelial growth factor and its receptors. Cytokine Growth Factor Rev 7(3): 259-270

Kozaki K, Miyaishi O, Koiwai O, Yasui Y, Kashiwai A, Nishikawa Y, Shimizu S, Saga S (1998): Isolation, purification, and characterization of a collagen-associated serpin, caspin, produced by murine colon adenocarcinoma cells. J Biol Chem 273(24): 15125-15130

Kreuzer M, Jöckel KH, Wichmann HE, Straif K (2006): Rauchen, Passivrauchen und Krebserkrankungen. Aktuelle Studien aus Deutschland und ihr Beitrag zur IARC-Monographie. Der Onkologe 12(11): 1094-1105

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989): Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246(4935): 1306-1309

Lu TT, Yan LG, Madri JA (1996): Integrin engagement mediates tyrosine dephosphorylation on platelet-endothelial cell adhesion molecule 1. Proc Natl Acad Sci U S A 93(21): 11808-11813

Mahtabifard A, Merritt RE, Yamada RE, Crystal RG, Korst RJ (2003): In vivo gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits tumor growth in syngeneic murine models of thoracic malignancies. J Thorac Cardiovasc Surg 126(1): 28-38

Maier JA, Morelli D, Lazzerini D, Menard S, Colnaghi MI, Balsari A (1999): Inhibition of fibronectin-activated migration of microvascular endothelial cells by interleukin-1alpha, tumour necrosis factor alpha and interferon gamma. Cytokine 11(2): 134-139

Mandriota SJ, Menoud PA, Pepper MS (1996): Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells. J Biol Chem 271(19): 11500-11505

Marquez-Garban DC, Chen HW, Fishbein MC, Goodglick L, Pietras RJ (2007): Estrogen receptor signaling pathways in human non-small cell lung cancer. Steroids 72(2): 135-143

Marra A, Eberhardt W, Pottgen C, Theegarten D, Korfee S, Gauler T, Stuschke M, Stamatis G (2007): Induction chemotherapy, concurrent chemoradiation and surgery for Pancoast tumour. Eur Respir J 29(1): 117-126

Meert AP, Paesmans M, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Verdebout JM, Lafitte JJ, Mascaux C, Sculier JP (2002): The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. Br J Cancer 87(7): 694-701

Miller JI, Jr. (1993): Physiologic evaluation of pulmonary function in the candidate for lung resection. J Thorac Cardiovasc Surg 105(2): 347-351; discussion 351-342

Mineo TC, Ambrogi V, Baldi A, Rabitti C, Bollero P, Vincenzi B, Tonini G (2004): Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. J Clin Pathol 57(6): 591-597

Moser TL, Stack MS, Wahl ML, Pizzo SV (2002): The mechanism of action of angiostatin: can you teach an old dog new tricks? Thromb Haemost 87(3): 394-401

Muller WA, Berman ME, Newman PJ, DeLisser HM, Albelda SM (1992): A heterophilic adhesion mechanism for platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31). J Exp Med 175(5): 1401-1404

Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM (1993): PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. J Exp Med 178(2): 449-460

Muthukkaruppan VR, Kubai L, Auerbach R (1982): Tumor-induced neovascularization in the mouse eye. J Natl Cancer Inst 69(3): 699-708

Newman PJ (1994): The role of PECAM-1 in vascular cell biology. Ann N Y Acad Sci 714: 165-174

Newman PJ (1997): The biology of PECAM-1. J Clin Invest 100(11 Suppl): S25-29

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(2): 315-328

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(2): 277-285

Olsen GN, Block AJ, Swenson EW, Castle JR, Wynne JW (1975): Pulmonary function evaluation of the lung resection candidate: a prospective study. Am Rev Respir Dis 111(4): 379-387

Papetti M, Herman IM (2002): Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. Am J Physiol Cell Physiol 282(5): C947-970

Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY (1990): JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. J Clin Pathol 43(9): 752-757

Paweletz N, Knierim M (1989): Tumor-related angiogenesis. Crit Rev Oncol Hematol 9(3): 197-242

Pepper MS (1997): Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(4): 605-619

Pepper MS (2001): Extracellular proteolysis and angiogenesis. Thromb Haemost 86(1): 346-355

Pepper MS, Vassalli JD, Orci L, Montesano R (1992): Proteolytic balance and capillary morphogenesis in vitro. EXS 61: 137-145

Piali L, Albelda SM, Baldwin HS, Hammel P, Gisler RH, Imhof BA (1993): Murine platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)/CD31 modulates beta 2 integrins on lymphokine-activated killer cells. Eur J Immunol 23(10): 2464-2471

Pierce RJ, Copland JM, Sharpe K, Barter CE (1994): Preoperative risk evaluation for lung cancer resection: predicted postoperative product as a predictor of surgical mortality. Am J Respir Crit Care Med 150(4): 947-955

Presta M, Rusnati M, Urbinati C, Tanghetti E, Statuto M, Pozzi A, Gualandris A, Ragnotti G (1992): Basic fibroblast growth factor bound to cell substrate promotes cell adhesion, proliferation, and protease production in cultured endothelial cells. EXS 61: 205-209

Rades D, Stalpers LJ, Veninga T, Schulte R, Hoskin PJ, Obralic N, Bajrovic A, Rudat V, Schwarz R, Hulshof MC, et al. (2005): Evaluation of five radiation schedules and prognostic factors for metastatic spinal cord compression. J Clin Oncol 23(15): 3366-3375

Riede U-N, Werner M, Schäfer H-E (2004): Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 5

Risse EK, van't Hof MA, Vooijs GP (1987): Relationship between patient characteristics and the sputum cytologic diagnosis of lung cancer. Acta Cytol 31(2): 159-165

RKI (2010): Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Robert Koch-Institut. Berlin 61-69

RKI GEKID (2010): Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.(Hrsg) 7: 48-52

Roos E (1993): Adhesion molecules in lymphoma metastasis. Semin Cancer Biol 4(5): 285-292

Rosell R, Gomez-Codina J, Camps C, Javier Sanchez J, Maestre J, Padilla J, Canto A, Abad A, Roig J (1999): Preresectional chemotherapy in stage IIIA non-small-cell lung cancer: a 7-year assessment of a randomized controlled trial. Lung Cancer 26(1): 7-14

Roth JA, Atkinson EN, Fossella F, Komaki R, Bernadette Ryan M, Putnam JB, Jr., Lee JS, Dhingra H, De Caro L, Chasen M, et al. (1998): Long-term follow-up of patients enrolled in a randomized trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non-small-cell lung cancer. Lung Cancer 21(1): 1-6

Rowell NP, Williams CJ (2001): Radical radiotherapy for stage I/II non-small cell lung cancer in patients not sufficiently fit for or declining surgery (medically inoperable): a systematic review. Thorax 56(8): 628-638

Rusch VW, Giroux DJ, Kraut MJ, Crowley J, Hazuka M, Winton T, Johnson DH, Shulman L, Shepherd F, Deschamps C, et al. (2007): Induction chemoradiation and surgical resection for superior sulcus non-small-cell lung carcinomas: long-term results of Southwest Oncology Group Trial 9416 (Intergroup Trial 0160). J Clin Oncol 25(3): 313-318

Schenkel A, Chew T, Muller WA (2004): Platelet endothelial cell adhäsion molecule deficiency or blockade signficantly reduces leukocyte emigration in a majority of mouse strains. J Immunol 173: 6403-6408

Schirrmacher V (1985): Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies. Adv Cancer Res 43: 1-73

Seifert S, Nemat A (2010): Die Rolle der Chirurgie beim Lungenkarzinom. Pneumologe 7: 237-244

Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M (1984): Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. Science 223(4642): 1296-1299

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992): Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 359(6398): 843-845

Silvestri GA, Handy J, Lackland D, Corley E, Reed CE (1998): Specialists achieve better outcomes than generalists for lung cancer surgery. Chest 114(3): 675-680

Silvestri GA, Gould MK, Margolis ML, Tanoue LT, McCrory D, Toloza E, Detterbeck F (2007): Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest 132(3 Suppl): 178S-201S

Smith RA, Glynn TJ (2000): Early lung cancer detection: current and ongoing challenges. Cancer 89(11 Suppl): 2327-2328

Stack MS, Gately S, Bafetti LM, Enghild JJ, Soff GA (1999): Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. Biochem J 340 (Pt 1): 77-84

Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J (1993): Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. Proc Natl Acad Sci U S A 90(4): 1526-1530

Stratmann A, Risau W, Plate KH (1998): Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. Am J Pathol 153(5): 1459-1466

Sugarbaker DJ (2003): Lung cancer. 6: The case for limited surgical resection in non-small cell lung cancer. Thorax 58(7): 639-641

Sutherland RM (1988): Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. Science 240(4849): 177-184

Takenaka K, Yamagishi S, Jinnouchi Y, Nakamura K, Matsui T, Imaizumi T (2005): Pigment epithelium-derived factor (PEDF)-induced apoptosis and inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in MG63 human osteosarcoma cells. Life Sci 77(25): 3231-3241

Tanaka Y, Albelda SM, Horgan KJ, van Seventer GA, Shimizu Y, Newman W, Hallam J, Newman PJ, Buck CA, Shaw S (1992): CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of beta 1 integrin-mediated adhesion. J Exp Med 176(1): 245-253

Taniwaki T, Becerra SP, Chader GJ, Schwartz JP (1995): Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture. J Neurochem 64(6): 2509-2517

Thomas C (2001): Histopathologie. Lehrbuch und Atlas zur allgemeinen und speziellen Pathologie. Schattauer GmbH, Stuttgart 13

Toi M, Kashitani J, Tominaga T (1993): Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. Int J Cancer 55(3): 371-374

Toi M, Inada K, Suzuki H, Tominaga T (1995): Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. Breast Cancer Res Treat 36(2): 193-204

Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV (1991): PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. Exp Eye Res 53(3): 411-414

Tombran-Tink J, Barnstable CJ (2003a): Therapeutic prospects for PEDF: more than a promising angiogenesis inhibitor. Trends Mol Med 9(6): 244-250

Tombran-Tink J, Barnstable CJ (2003b): PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. Nat Rev Neurosci 4(8): 628-636

Uehara H, Miyamoto M, Kato K, Ebihara Y, Kaneko H, Hashimoto H, Murakami Y, Hase R, Takahashi R, Mega S, et al. (2004): Expression of pigment epithelium-derived factor decreases liver metastasis and correlates with favorable prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res 64(10): 3533-3537

Uemura A, Ogawa M, Hirashima M, Fujiwara T, Koyama S, Takagi H, Honda Y, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Nishikawa S (2002): Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. J Clin Invest 110(11): 1619-1628

UICC (2002): TNM Classification of Malignant Tumours. Wiley and Sons Sixth ed

Valencak J, Heere-Ress E, Kopp T, Schoppmann SF, Kittler H, Pehamberger H (2004): Selective immunohistochemical staining shows significant prognostic influence of lymphatic and blood vessels in patients with malignant melanoma. Eur J Cancer 40(3): 358-364

Vartanian RK, Weidner N (1994): Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. Am J Pathol 144(6): 1188-1194

Vermeulen PB, Libura M, Libura J, O'Neill PJ, van Dam P, Van Marck E, Van Oosterom AT, Dirix LY (1997): Influence of investigator experience and microscopic field size on microvessel density in node-negative breast carcinoma. Breast Cancer Res Treat 42(2): 165-172

Vihinen P, Kahari VM (2002): Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. Int J Cancer 99(2): 157-166

Vogel W, Lammers R, Huang J, Ullrich A (1993): Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. Science 259(5101): 1611-1614

Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, Amin M, Bouck NP (2002): Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. Nat Med 8(4): 349-357

Wahidi MM, Govert JA, Goudar RK, Gould MK, McCrory DC (2007): Evidence for the treatment of patients with pulmonary nodules: when is it lung cancer?: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest 132(3 Suppl): 94S-107S

Wang L, Schmitz V, Perez-Mediavilla A, Izal I, Prieto J, Qian C (2003): Suppression of angiogenesis and tumor growth by adenoviral-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor. Mol Ther 8(1): 72-79

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991): Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med 324(1): 1-8

Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J (1993): Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. Am J Pathol 143(2): 401-409

Wichmann E (2003): Abschätzung positiver gesundheitlicher Auswirkungen durch den Einsatz von Partikelfiltern bei Dieselfahrzeugen in Deutschland. Gutachten im Auftrag des Umweltbundesamtes Berlin: 32-37

Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, Cormier Y, Goss G, Inculet R, Vallieres E, et al. (2005): Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 352(25): 2589-2597

Wong WT, Rex TS, Auricchio A, Maguire AM, Chung D, Tang W, Bennett J (2004): Effect of over-expression of pigment epithelium derived factor (PEDF) on developing retinal vasculature in the mouse. Mol Vis 10: 837-844

Xu X, Zhang SS, Barnstable CJ, Tombran-Tink J (2006): Molecular phylogeny of the antiangiogenic and neurotrophic serpin, pigment epithelium derived factor in vertebrates. BMC Genomics 7: 248

Yang J, Chen S, Huang X, Han J, Wang Q, Shi D, Cheng R, Gao G, Yang X (2010): Growth suppression of cervical carcinoma by pigment epithelium-derived factor via anti-angiogenesis. Cancer Biol Ther 9(12): 967-974

Zhang L, Chen J, Ke Y, Mansel RE, Jiang WG (2005): Down-regulation of PEDF expression by ribozyme transgene in endothelial and lung cancer cells and its impact on angiogenesis in vitro. Oncol Rep 14(6): 1615-1619

Zhang L, Chen J, Ke Y, Mansel RE, Jiang WG (2006): Expression of pigment epithelial derived factor is reduced in non-small cell lung cancer and is linked to clinical outcome. Int J Mol Med 17(5): 937-944

Zhang T, Guan M, Xu C, Chen Y, Lu Y (2007): Pigment epithelium-derived factor inhibits glioma cell growth in vitro and in vivo. Life Sci 81(16): 1256-1263

Zhou Z, Christofidou-Solomidou M, Garlanda C, DeLisser HM (1999): Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. Angiogenesis 3(2): 181-188

6 Danksagung

Nach vielen Jahren intensiver Arbeit liegt sie nun vor: meine Dissertation. Damit ist es an der Zeit, mich bei denjenigen zu bedanken, die mich in dieser wichtigen Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet haben. Zu besonderem Dank bin ich meinem Betreuer PD Dr. med. Bernd Danner verpflichtet. Er hat auch nach längeren Ruhe- und Korrekturphasen nicht das Interesse verloren, meine Arbeit abermals zu lesen und zu beurteilen. Das weiß ich sehr zu schätzen und bedanke mich dafür. Ohne seinen wertvollen akademischen Rat wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Ebenso geht mein Dank an Frau Waldmann-Beushausen. Sie hat mir bei der Betreuung der methodischen Durchführung mit Rat und Tat zur Seite gestanden, war immer sehr geduldig und hat mich aufgebaut.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Klaus Jung und seiner Arbeitsgruppe, die mir bei der Erhebung der statistischen Analysen essentiell geholfen haben.

7 Lebenslauf

Angelika Oellerich geb. Böhler

Am 09. August 1983 wurde ich als Tochter von Sigrid Böhler, geborene Peters, und Günter Böhler in Rheinfelden geboren.
Nach dem Besuch der Grundschule wechselte ich zur weiteren schulischen Ausbildung auf das Gymnasium Schönau im Schwarzwald. Von der 6. bis zur 12. Klasse besuchte ich die Deutsche Schule Rom in Italien, wo meine Eltern als Lehrer tätig waren. Mein Abitur legte ich am Gymnasium Schönau im Schwarzwald nach insgesamt 13 Schuljahren im Jahr 2003 mit der Gesamtnote 1,7 ab.
Im Jahr 2004 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Semmelweis Universität Budapest in Ungarn. Dort legte ich im Frühjahr 2006 die ärztliche Vorprüfung (Physikum) mit der Note 1,9 ab. Nach dem Physikum führte ich mein weiteres Studium an der Georg-August-Universität in Göttingen fort. Seit 2008 bin ich Doktorandin in der Klinik für Thorax-Herz-Gefäß-Chirurgie. Meine medizinische Ausbildung im Rahmen des Praktischen Jahres absolvierte ich an der Universitätsklinik Göttingen, den Lehrkrankenhäusern in Weende und Northeim sowie dem Cardiocentro Ticino in Lugano und dem SRO Spital Langenthal in der Schweiz.
Nachdem ich im Februar 2011 das medizinische Staatsexamen mit der Note 2,5 abgelegt hatte, trat ich im April 2011 eine Stelle als Assistenzärztin in der Abteilung für Kardiologie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt an. Seit April 2013 setze ich meine Weiterbildung zum Facharzt für Transfusionsmedizin im Blutspendedienst Frankfurt am Main fort.