

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Pigment Epithelium-derived Factor in Augen von
Aderhautmelanompatienten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katja Höhne

aus Leipzig

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. H. Heimann.

2. Prof. Dr. med. A. Pfeiffer

3. Prof. Dr. med. H. Hoerauf

Datum der Promotion: 14.06.2009

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 5

1. EINLEITUNG 7

Angiogenese und Tumorangiogenese	10
Pigment epithelium-derived factor (PEDF).....	11
Vascular endothelial growth factor (VEGF).....	12
Kontrollgruppen	14
Makulaforamen	14
Ablatio retinae	15
Fragestellungen	17

2. MATERIAL UND METHODEN18

Geräte.....	18
Chemikalien	19
Biochemikalien.....	20
Antikörper	20
Software.....	21
Patienten.....	21
Glaskörperproben	21
Albuminbestimmung	23
Messung von PEDF	23
SDS-Gelelektrophorese	23
Western blot, Antikörperbehandlung und Detektion	25
Kompetition	26
Messung von VEGF.....	27
Immunhistologie	28

3. ERGEBNISSE 29

Charakterisierung der untersuchten Gruppen.....	29
Nachweis von PEDF im Glaskörper.....	30
Kompetition	32

Quantitative Auswertung der PEDF-Konzentrationen	33
Nachweis von VEGF im Glaskörper	35
Korrelation von PEDF mit klinischen und histologischen Parametern	38
PEDF und Patientenalter	38
PEDF-Konzentration und Geschlecht	39
PEDF und histologische Merkmale	40
PEDF und Tumorausdehnung.....	41
PEDF und Albuminkonzentration	42
Albuminkonzentration und Vaskularisationsgrad.....	43
Zusammenhang zwischen PEDF- und VEGF-Konzentration im Glaskörper	44
Immunhistologie.....	45
Immunhistologie für PEDF	45
PEDF-Negativ-Kontrollen	47
Immunhistologischer Nachweis von VEGF	48
Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse	51
4. DISKUSSION	52
PEDF und VEGF im Glaskörper beim Aderhautmelanom	52
PEDF und klinische Parameter	59
PEDF und VEGF vor und nach Protonenbestrahlung.....	60
5. ZUSAMMENFASSUNG	62
6. LITERATURNACHWEIS	63
7. LEBENS LAUF	75
8. DANKSAGUNG	76

Abkürzungsverzeichnis

AHMM	malignes Aderhautmelanom
Ang2	Angiopoetin-1
APAAP	Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase
bFGF	basic Fibroblast growth factor
cDNA	Core DNA, Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FasL	Fas Ligand
HbA _{1c}	Glykosyliertes Hämoglobin
HIF- α	Hypoxia-inducible factor-1 α
HRP	Horseradish peroxidase
IGF-1	Insulin-like growth factor
IL-1 β	Interleukin 1 β
mab	monoclonal antibody
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
OCT	Optische Kohärenztomographie
pab	polyclonal antibody
PBS	Proteine buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDR	Proliferative diabetische Retinopathie
PEDF	Pigment epithelium-derived factor

PEDF-R	PEDF-Rezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVR	Proliferative Vitreoretinopathie
RPE	retinales Pigmentepithel
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler des Mittelwertes
SF ₆	Schwefelhexafluorid
TGF- β	transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase-1
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TSP-1	Thrombospondin-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-R	VEGF-Rezeptor
vWF	Von-Willebrand-Faktor

1. Einleitung

Maligne Tumorerkrankungen stellen in der Medizin eine besondere Herausforderung dar. Trotz großer Fortschritte in der Diagnostik und der Behandlung von Tumoren und trotz intensiver Forschungsarbeiten sind viele Aspekte in der Tumorentwicklung noch nicht vollständig verstanden und viele maligne Erkrankungen nicht heilbar. Ein wichtiges Konzept in der Entstehung von malignen Tumoren ist das der Tumorangiogenese, das seit den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts intensiv untersucht wird. (1-3) Maligne Tumoren sind in der Lage, Substanzen wie Vascular endothelial growth factor (VEGF) zu sezernieren, die die Entstehung von tumoreigenen Gefäßen induzieren und damit die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung im Tumor zu gewährleisten. (4) Ein wichtiger therapeutischer, klinisch bereits erfolgreich genutzter Ansatz ist es daher, die Tumorangiogenese durch VEGF-Antagonisten zu hemmen. (5, 6)

Inzwischen sind auch viele Zytokine identifiziert worden, die die Angiogenese hemmen können. Unter ihnen ist Pigment epithelium-derived factor (PEDF) das bisher stärkste bekannte antiangiogene Zytokin, das u.a. auch direkte und indirekte antitumorale Wirkungen hat. (7, 8) Für eine Reihe von malignen Erkrankungen wie z. B. das Mammakarzinom, das Osteosarkom und das hepatozelluläre Karzinom ist gezeigt worden, daß PEDF eine wesentliche Rolle bei der Hemmung der Metastasierung durch Hemmung der Tumorangiogenese spielt und eng mit bei der Überlebensrate assoziiert ist. (9-11) In Zellkulturexperimenten von Prostatakarzinomzellen ist gezeigt worden, daß PEDF die Apoptose dieser Zellen triggern kann, indem es die Tumorzellen für eine stressinduzierte Apoptose sensitiviert. (12)

In der Augenheilkunde ist der wichtigste primäre intraokulare Tumor das Aderhautmelanom, das sowohl ein eigenes Blutgefäßsystem als auch „microvascular channels“ ausbildet. (13) Auch beim Aderhautmelanom ist VEGF maßgeblich an der Tumorangiogenese beteiligt. (14)

PEDF ist in vielen okulären Geweben vorhanden. Untersuchungen haben ergeben, daß ischämische, dystrophische und degenerative ophthalmologische Erkrankungen mit veränderten PEDF-Konzentrationen assoziiert sind. (15-18)

Bisher ist jedoch nicht untersucht worden, ob PEDF in der Pathophysiologie des malignen Aderhautmelanoms ebenfalls antiangiogene oder antitumorale Wirkungen hat, die zusätzlich zu den bisherigen Behandlungsmöglichkeiten nutzbar sein können.

Ziel dieser Arbeit ist es daher nachzuweisen, ob und in welchen Konzentrationen PEDF im Glaskörper und in histologischen Schnitten beim Aderhautmelanom vorliegt, um damit unser Verständnis der Tumorangio-genese beim Aderhautmelanom zu vertiefen.

Malignes Aderhautmelanom

In der Ophthalmologie ist das maligne Aderhautmelanom mit einer Inzidenz von rund 6 Neuerkrankungen pro 1 Million Einwohner und Jahr in den westlichen Nationen insgesamt eine seltene Erkrankung, aber der mit Abstand häufigste primäre maligne intraokulare Tumor. Die Inzidenz steigt mit dem Lebensalter mit einem Gipfel in der 5. Lebensdekade. (19-21)

Das maligne Aderhautmelanom kann grundsätzlich von allen melanozytenhaltigen Strukturen des Auges ausgehen, am häufigsten sind jedoch die Aderhaut und der Ziliarkörper Ausgangspunkt des Tumorwachstums. Die Behandlung des Tumors bestand lange Zeit in der primären Enukleation (Entfernung des Augapfels), um die Metastasierung zu verhindern. Heutzutage gilt die Bestrahlung mit Rutheniumapplikator oder Protonen als Therapie der Wahl. Dabei entscheiden die Lage und die Ausdehnung des Tumors über die Wahl der Therapie. Bei großen Tumoren (mehr als 7 mm Prominenz) nehmen die radiogenen Komplikationen stetig zu, weshalb sich an die Bestrahlung die chirurgische Tumorentfernung anschliesst.

Die Prognose beim Aderhautmelanom ist abhängig von der Metastasierung des Tumors. Bei Diagnosestellung sind Metastasen sehr selten (unter 0,5 %) vorhanden, jedoch kommt es unabhängig von der gewählten Therapie trotz guter lokaler Tumorkontrolle in rund 30 % aller Erkrankungen zu einer Metastasierung innerhalb der folgenden fünf Jahre nach Diagnosestellung. Da im Auginnenraum kein Lymphsystem existiert, erfolgt die Metastasierung hämatogen mit vorwiegender Absiedelung in die Leber. Nach dem Auftreten von Metastasen beträgt die Lebenserwartung nur noch wenige Monate. (20, 22) Anhand klinischer Parameter wird die Prognose bei zunehmender Tumorgroße, höherem Patientenalter und männlichem Geschlecht schlechter.

Sowohl an der Ausbildung des tumoreigenen Gefäßsystems, der Metastasierung und der Entstehung von Neovaskularisationen sind angiogenetische Prozesse beteiligt. Boyd et al. konnten zeigen, daß im Kammerwasser und in der Glaskörperflüssigkeit von Melanompatienten die VEGF-Konzentrationen im Vergleich zu Kontrollen deutlich erhöht waren. (23) Dieser Befund stützt die Hypothese, daß das Melanom aktiv Angiogenese betreibt und VEGF dabei wahrscheinlich eine treibende Kraft ist.

Aufgrund dieser Befunde scheint es sinnvoll, dem malignen Aderhautmelanom auch mit antiangiogenetischen Strategien entgegenzutreten. Zur Zeit existieren keine Publikationen, in denen untersucht wurde, welche Rolle der stärkste bekannte Angiainhibitor am Auge, das PEDF, bei der Entstehung des Aderhautmelanoms spielt. Deshalb wurden Glaskörperproben von Aderhautmelanompatienten gewonnen, die sich einer primären Enukleation, einer Endoresektion oder einer transskleralen Tumorexzision unterzogen. In diesen Proben wurden die Konzentrationen von PEDF, VEGF und Albumin in der Glaskörperflüssigkeit gemessen und getestet, ob Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern bestehen.

Angiogenese und Tumorangiogenese

Unter Angiogenese versteht man die Aussprossung neuer Kapillaren aus bereits existierenden Kapillaren. Sie ist ein genau regulierter physiologischer Prozeß, der unter anderem eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, in der Wundheilung, beim Aufbau des Endometriums und bei degenerativen Erkrankungen spielt. (24)

Als wesentliche Induktoren der Angiogenese gelten Hypoxie bzw. Ischämie, durch die es zu einer Produktion von Hypoxia-induced factor-1 α (HIF-1 α) kommt. Dieser führt zur Aktivierung der Transskription des VEGF-Genes. Bei verschiedenen Tumoren hat sich gezeigt, dass HIF- α und der Grad der Tumolvaskularisation positiv korrelieren. (25) Weiterhin kommt es zu einer Ausschüttung proangiogener Faktoren wie basic Fibroblast growth factor (bFGF), Insuline-like growth factor (IGF-1), Angiopoetin 2 (Ang2), Platelet-derived growth factor (PDGF) und Tumornekrosefaktor (TNF- α). Endogene Inhibitoren der Angiogenese, dazu zählen PEDF, Transforming growth factor (TGF- β), Angiostatin, Endostatin, Thrombospondin 1 (TSP1) und Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP), werden hingegen vermindert ausgeschüttet. (26-28)

Der formale Ablauf der Angiogenese gliedert sich in folgende Prozesse: Endothelzellproliferation, Migration, Auflösung der Extrazellulärmatrix, Bildung neuer Stränge, Lumenbildung und Initiierung des Blutflusses. In stark vereinfachten Modellen geht man davon aus, daß sich pro- und antiangiogenetische Faktoren die Waage halten. Unter hypoxischen Bedingungen ist jedoch diese Balance zugunsten der Angiogenese verschoben. Am Auge findet man angiogenetische Prozesse bei der

proliferativen diabetischen Retinopathie, Gefäßverschlüssen, der exsudativen Form der altersbedingten Makuladegeneration oder der Frühgeborenenretinopathie.

Für uveale Melanome und auch einige andere maligne Tumore ist jedoch gezeigt worden, dass parallel zur Angiogenese auch die sogenannte „vasculogenic mimicry“ zur Gefäßversorgung des Tumors beiträgt. Hierbei bilden entdifferenzierte, aggressive Tumorzellen gefäßähnliche Räume, die nicht mit Endothelzellen ausgekleidet sind, jedoch Anschluss an das Gefäßsystem haben und Serum und teilweise Erythrozyten enthalten. (13, 29) Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Tumorangiogenese beim Aderhautmelanom noch nicht vollständig verstanden ist. Insbesondere ist bis jetzt die Rolle von PEDF, das sowohl antiangiogene als auch neurotrophe und tumorsuppressive Eigenschaften hat, bei der Entstehung von Aderhautmelanomen noch nicht untersucht worden. (30)

Pigment epithelium-derived factor (PEDF)

PEDF ist zur Zeit ein sehr intensiv untersuchtes Protein, da es vielfältige Funktionen bei der Zelldifferenzierung aufweist und bisher das Zytokin mit der stärksten antiangiogenen Potenz ist. (7) PEDF ist ein 50 kDa-Glykoprotein, das aufgrund seiner Aminosäuresequenz und Strukturhomologie zu den Serpinen (*Serine protease inhibitors*, dazu gehören u.a. Antithrombin und Antitrypsin, Ovalbumin, Thyroxin-bindendes Protein, Cortisol-bindendes Protein, Angiotensinogen) gezählt wird, obwohl seine antiproteolytischen hinter einer Reihe anderer Funktionen zurückstehen. Sein Gen befindet sich auf Chromosom 17p13. (31) Es handelt sich um ein hoch konserviertes Protein, das auch bei Mäusen, Ratten, Rindern, Vögeln und Schweinen nachgewiesen werden konnte. Am Auge finden sich PEDF und PEDF-mRNA in hohen Konzentrationen in allen Geweben, die avaskulär sind: Cornea, Kammerwasser, Linse und Glaskörper. Es ist aber auch im retinalen Pigmentepithel, in der Netzhaut, Iris und Ziliarkörper nachweisbar. (32) PEDF ist aber auch im Gehirn, Rückenmark, Leber, Serum, Knochen und Knorpel, Herz und Lunge zu finden. (11, 33-35)

Im Extrazellulärraum bindet PEDF nichtkovalent über ionische Wechselbeziehungen an Glukosaminoglykane und Proteoglykane. (36, 37) An aktiven, proliferierenden Endothelzellen löst es die Apoptose durch Aktivierung des Fas/FasL-Systems aus und wirkt damit antiangiogen. (38) Es spielt eine wichtige Rolle bei der Reifung neuronaler

Zellen und wirkt dort durch Hemmung der Apoptose neuroprotektiv und neurotroph. (39-42). Auch direkte, d.h. nicht durch antiangiogenetische Prozesse vermittelte, antitumoröse Effekte sind beschrieben worden. Diese verschiedenen Funktionen werden durch unterschiedliche Epitope des PEDF-Moleküls hervorgerufen und durch wahrscheinlich zwei zellständige Rezeptoren (PEDF-R^a und PEDF-Rⁿ) vermittelt. (43)

PEDF interagiert mit dem VEGF-R-1 durch Hemmung der Abspaltung des C-terminalen Endes mit konsekutiver Hemmung der VEGF-VEGF-R-2 vermittelten Angiogenese.(44) Exogenes PEDF kann an Osteosarkomzelllinien die Expression von VEGF-mRNA und VEGF vermindern. (45)

Verschiedene Arbeiten zeigen sowohl im Tiermodell als auch in humanen Glaskörperproben, daß bei verschiedenen ischämischen retinalen Erkrankungen wie beim Zentralvenen- oder Venenastverschluß oder bei der proliferativen diabetischen Retinopathie die Konzentrationen des PEDF-Moleküls, seiner cDNA und der mRNA deutlich vermindert sind und dadurch ein proangiogenetisches Milieu entsteht. (46-48)

Seit einiger Zeit wird auch untersucht, welche Rolle PEDF bei der Tumorangio-genese und der Metastasierung von Tumoren spielt. Eine niedrigere PEDF-Expression im Tumorgewebe ging bei Prostatakarzinomen, Pankreaskarzinomen, Gliomen, Lymphangiomen und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen mit einer höheren Gefäßdichte und mit einer gesteigerten Metastasierung einher. (49-53)

Bisher ist nicht untersucht worden, ob PEDF auch an der Tumorangio-genese beim malignen Aderhautmelanom beteiligt ist und ob sich dadurch zukünftig neue therapeutische Ansätze entwickeln lassen.

Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist der stärkste bekannte angiogenetische und die Vasopermeabilität steigernde Mediator. Es gibt mehrere VEGF-Rezeptoren, die sich auf den Endothelzellen der Choriokapillaris und der retinalen Kapillaren, die die äußere beziehungsweise innere Blut-Retina-Barriere darstellen, befinden. VEGF beeinflusst dort die Dichtigkeit dieser Barriere durch die Regulation der Tight junctions. (24)

Es wurde gezeigt, dass insbesondere unter hypoxischen Bedingungen die Expression von VEGF-mRNA in RPE-Zellen, Perizyten, retinalen Endothelzellen (54) und retinalen Gliazellen um ein Vielfaches gesteigert wird und die VEGF-Rezeptoren auf Endothelzellen vermehrt exprimiert werden. (55, 56) Erhöhte VEGF-Konzentrationen in Nährmedien von Zellkulturexperimenten führen zu einer Zunahme der Migration und Proliferation von Endothelzellen. VEGF spielt eine besonders wichtige Rolle in der Tumorangio-genese z.B. bei kolorektalen Karzinomen, Mammakarzinom und hepatozellulärem Karzinomen. (24, 57)

Missotten et al. konnten nachweisen, dass die VEGF-Konzentrationen im Kammerwasser bei Melanompatienten deutlich erhöht sind und daß das VEGF aus dem Tumorgewebe selbst und der Netzhaut stammt. (58) Es steht heute außer Frage, dass VEGF auch an der Tumorangio-genese beim uvealen Melanom massgeblich beteiligt ist. (58-60)

Kontrollgruppen

Makulaforamen

Makulaforamina haben eine Prävalenz von circa 0,3 % mit einer Zunahme mit steigendem Lebensalter. Die meisten Makulaforamina sind idiopathisch, sehr selten entstehen sie als Folge eines Traumas oder bei hoher Myopie. (61) Gass beschreibt vier Stadien und legt in seinem pathogenetischen Konzept eine tangential bzw. anteroposterior an der vitreomakulären Grenzfläche angreifende Kraft zugrunde. Diese Kraft bewirkt, daß die Photorezeptoren der Fovea zentrifugal weggezogen werden und auf diese Weise ein durchgreifendes Foramen entsteht. (62, 63) An der vitreomakulären Grenzfläche finden sich bei dieser Erkrankung oft epiretinale Membranen um die Fovea herum, die Gliazellen enthalten. (63, 64) Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob diese Gliazellen ursächlich an der Pathogenese der Makulaforamina beteiligt sind oder ob sie als reaktive Veränderung, beispielsweise als Wundheilungsmechanismus, auftreten.

Die Behandlung des Makulaforamens besteht in der Pars plana Vitrektomie, bei der zunächst der Glaskörper, und dann die epiretinale Membran entfernt wird. Dieser Glaskörper kann für weitere Untersuchungen wie in dieser Arbeit verwendet werden.

In der Literatur über okuläre Angiogenese dient diese Erkrankung als Kontrollgruppe, da hier keine Veränderungen an den retinalen Gefäßen auftreten. Deshalb geht man davon aus, dass hier die gemessenen Konzentrationen pro- und antiangiogenetischer Zytokine denen bei ruhender Angiogenese entsprechen.

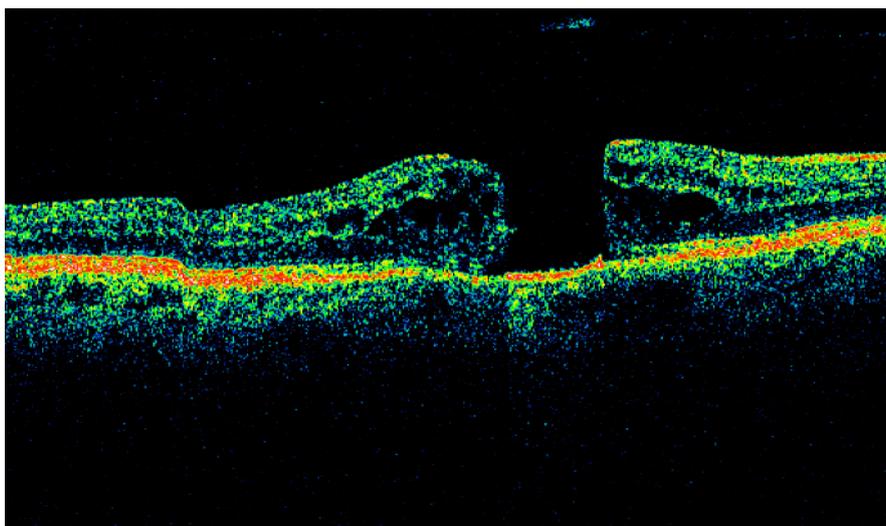


Abbildung 1: Optische Kohärenztomographie (OCT) eines Auges mit einem durchgreifenden Makulaforamen. Die Fovea hat ihre typische Struktur verloren, die Photorezeptoren der Fovea sind zur Seite gewichen. Rot ist das RPE kodiert, die Unterbrechung in der darüberliegenden Netzhautstruktur entspricht dem Makulaforamen.

Ablatio retinae

Gelangt verflüssigter Glaskörper durch einen Defekt in der Netzhaut zwischen die neurosensorische Netzhaut und das retinale Pigmentepithel, entsteht eine rhegmatogene Ablatio retinae (Netzhautablösung). Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass es innerhalb kurzer Zeit, d.h. innerhalb einer Stunde, zu einer gesteigerten Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF-}\alpha$, Interleukin 1β ($\text{IL-1}\beta$) und etwas zeitlich versetzt zu Transforming growth factor- β ($\text{TGF-}\beta$) und Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) kommt. $\text{TNF-}\alpha$ induziert eine Signalkaskade über Caspase 3, die in der Apoptose der Photorezeptoren resultiert. (65)

Es kommt aber auch zu einer gesteigerten Expression von bFGF, das den Caspasesweg hemmt und daher neuroprotektiv, d.h. der Photorezeptoratrophy entgegen wirkt. Quelle der Zytokinfreisetzung scheinen hierbei vor allem die Müller-Stützzellen zu sein. (65)

Glaskörperproben von Patienten mit einer Netzhautablösung enthalten deutlich höhere Konzentrationen von $\text{TNF-}\alpha$ (66, 67), $\text{IL-1}\beta$ (66, 68) MCP-1 (69), (70) und bFGF (68), (71, 72, 73). Bisher konnte ebenso gezeigt werden, dass VEGF in Augen mit

rhegmatogener Netzhautablösung erhöht ist, wenn gleichzeitig eine proliferative Vitreoretinopathie (PVR) vorhanden ist. (74) PEDF, das ebenfalls neuroprotektive Eigenschaften hat, wurde gleichfalls bisher im Glaskörper im Vergleich mit Makulaforamina erhöht gemessen. (74)

Eine Netzhautablösung muss operativ behandelt werden. Hierbei stellt die Pars plana Vitrektomie eine Möglichkeit dar. Zunächst wird wie bei den Makulaforamina der Glaskörper entfernt, danach die Netzhaut wieder zur Anlage gebracht und eine Endotamponade (Silikon oder SF₆) eingebracht. Auch hier kann der Glaskörper für weitere Untersuchungen genutzt werden.

Fragestellungen

In dieser Arbeit sollen folgende Fragen geklärt werden:

Wie verhalten sich Glaskörperkonzentrationen von PEDF und VEGF bei Aderhautmelanompatienten im Vergleich zu den Kontrollgruppen?

Gibt es eine Korrelation von PEDF mit VEGF oder mit dem Ausmaß der Schrankenstörung?

Korreliert die PEDF-Konzentration im Glaskörper mit dem Vaskularisationsgrad, Pigmentierungsgrad oder dem Nekrosegrad des Tumors, mit seiner Ausdehnung oder dem Alter und Geschlecht der Patienten?

Läßt sich PEDF in histologischen Schnitten von Aderhautmelanomen nachweisen?
Wenn ja, gibt es Korrelationen mit der PEDF-Konzentration im Glaskörper?

Unterscheiden sich die VEGF und PEDF-Konzentrationen des Aderhautmelanoms vor und nach der Bestrahlung?

2. Material und Methoden

Geräte

Biorad power pac 2000	Biorad, Richmond, USA
Cobas mira S	Hoffmann La-Roche, Basel, Schweiz
Detektionskamera LAS 1000	Fuji Foto Film Co. Ltd, Japan
Digitalkamera AxioCam Color	Zeiss, Jena, Deutschland
Elektrophoresekammer und Zubehör	Biorad, Hercules, USA
Eppendorf Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Feuchtkammer	eigene Herstellung
Fujifilm Intelligent Dark Box	Fuji Photo Film Co. Ltd, Tokio, Japan
High Voltage Power Pack P30	Biometra, Göttingen, Deutschland
Imobilon-P Transfer Membrane	Millipore, Eschborn, Deutschland
Microtom HM 360	Microm, Walldorf, Deutschland
Mikroskop AxioPlan 2	Zeiss, Jena, Deutschland
Objektträger	Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
Personal LAB Workbench V3.0	BioChem ImmunoSystems, Freiburg i. Br., Deutschland
pH-Meter CG 842	Schott, Mainz, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttler WT12	Biometra, Göttingen, Deutschland
Ultrazentrifuge Sorvall® Discovery M120	Hitachi, München, Deutschland
Vortexer	IKA GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland
Waagen	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wallac Victor ² ™ 1420 Multilabel Counter	Wallac, Freiburg, Deutschland
Whatman Papier	Whatman International, Maidstone, England
Zentrifuge 5414D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
96-well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schnellkochtopf	Silit, Riedlingen, Deutschland

Chemikalien

Acrylamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxosulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Arginin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bisacrylamid	Sigma, Saint Louis, USA
Citrat	Sigma, Saint Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue G	Serva, Heidelberg, Deutschland
D(+) – Sucrose	Sigma, Saint Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eindecklösung (Gelatine)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Calbiochem, La Jolla, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Papanicolaou-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pyronin Y	Sigma, Saint Louis, USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sucofin (Milchpulver)	Edeka, Potsdam, Deutschland
TEMED	Sigma, Saint Louis, USA
Tris Base	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Tween 20	Sigma, Saint Louis, USA
Xylen	Sigma, Saint Louis, USA
NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mercaptoethanol	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland

Biochemikalien

ABX Diagnostics Albumin	ABX Diagnostics, Montpellier, Frankreich
Biotinylierte Proteinleiter	Cell Signalling Technology, Beverly, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Saint Louis, USA
BS ³ (Bis(sulfosuccinimidyl) suberat)	Pierce, Rockford, USA
Glucopetidase F	Sigma, Saint Louis, USA
Phototope™ -HRP-Detection kit	Cell Signalling Technology, Beverly, USA
Quantikine® Immunoassay humanVEGF	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Rekombinantes hPEDF	Chemicon, Temecula, USA
Sulfo-DST (Disulfosuccinimidyltartrat)	Pierce, Rockford, USA

Antikörper

Erstantikörper

HRP-linked anti-biotin Antikörper	Cell Signalling, Beverly, USA
Goat anti-human PEDF polyclonal Antikörper	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Rabbit anti-human PEDF polyclonal ab	DIFE, Potsdam, Deutschland
Mouse anti-human PEDF monoclonal ab	Chemicon, Temecula, USA
PEDF goat polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
VEGF mouse monoclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Zweitantikörper

Mouse HRP-linked anti-goat IgG	Dako, Glostrup, Dänemark
Goat HRP-linked anti-rabbit IgG (H&L)	Cell Signalling, Beverly, USA
AffiniPure mouse-antigoat-IgG	dianova, Hamburg, Deutschland
APAAP linked-antimouse mab	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Brückenantikörper Mouse IgG	Dako, Glostrup, Dänemark

Software

SPSS Version 11.5	SPSS Inc., Chicago, USA
AxioVision	Zeiss, Jena, Deutschland
AIDA 2.11	Fuji Photo Film Co. Ltd, Tokio, Japan

Patienten

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden Glaskörperproben von Aderhautmelanompatienten untersucht, die große Aderhautmelanome (mehr als 5,6 mm Prominenz) aufwiesen und deshalb mit einer Endoresektion, einer transskleralen Tumorexzision oder einer primären Enukleation versorgt wurden. Die Kontrollgruppen bestanden aus Patienten mit einem Makulaforamen oder mit einer rhegmatogenen Ablatio retinae. Anamnestisch, durch Bestimmung der Nüchtern glukose und des HbA_{1c}- Wertes wurde ein Diabetes mellitus ausgeschlossen. Ein weiteres Ausschlußkriterium war das Vorliegen einer zweiten, vom Aderhautmelanom unabhängigen Tumorerkrankung oder eine andere systemische, chronisch-entzündliche Erkrankung.

Glaskörperproben

Die Glaskörperflüssigkeit wurde bei Pars plana Vitrektomien in der Augenklinik der Charité, Campus Benjamin Franklin, Berlin, zwischen 2002 und 2004 gewonnen. Bei einer Pars plana Vitrektomie werden routinemäßig drei Zugänge durch die Pars plana gelegt, wobei zwei der Sklerotomien als Arbeitskanäle dienen und die dritte Sklerotomie einen Stutzen für die Spülflüssigkeit enthält. Abweichend von normalen Operationsverlauf blieb die Infusion verschlossen, bis circa 250 bis 500 µl Glaskörperflüssigkeit mit dem Ocutom entfernt worden waren. Der entfernte Glaskörper wurde in sterile Eppendorfgefäße gefüllt, sofort mit Eis gekühlt, zentrifugiert, aliquotiert und unverzüglich im Labor der Augenklinik bei - 80°C bis zu den Messungen eingefroren.

Die Patienten mit Aderhautmelanomen wurden in drei Gruppen eingeteilt, die den Operationen entsprechen, bei denen der Glaskörper gewonnen wurde. Sofort nach der

Enukleation wurde eine Pars plana Vitrektomie durchgeführt, um den Glaskörper zu bergen.

Bei der transskleralen Tumorexzision wird bei der Entfernung des Tumors durch die Sklera eine partielle Vitrektomie durchgeführt; dieser entfernte Glaskörper wurde dann untersucht.

Circa 1 Woche vor einer Endoresektion wurde eine Protonenbestrahlung des Melanoms am Hahn-Meitner-Institut mit 60 CGE durchgeführt. Die Protonen geben ihre kinetische Energie am „Bragg peak“ auf Bruchteile eines Millimeters ab und schädigen dadurch sehr genau den Tumor; die umliegende Netzhaut, der Sehnerv und andere Strukturen des Auges bleiben weitestgehend geschützt. Im Rahmen der bei der Endoresektion durchgeführten Vitrektomie erfolgte die Asservierung des untersuchten Glaskörpers.

Bei einer Enukleation wird der Bulbus als Ganzes entfernt. Nach der Enukleation wurden die Bulbi in Formalin gebracht, in Paraffin gebettet und histologisch von einem erfahrenen Ophthalmopathologen untersucht. Dabei wurden im Rahmen der klinischen Routine der Pigmentationsgrad, der Zelltyp, der Vaskularisationsgrad und der Nekroseanteil des Tumors bestimmt. Jeweils ein Schnitt der enukleierten Augen wurde immunhistochemisch auf PEDF und VEGF untersucht.

Albuminbestimmung

Albumin wurde turbidimetrisch gemessen. Bei diesem Verfahren werden Antialbuminantikörper mit der Glaskörperflüssigkeit versetzt. Dadurch entstehen Antikörper-Albumin-Komplexe, die durchfallendes Licht streuen. Die Änderung der Lichtintensität nach dem Durchgang durch die Meßküvette ist direkt proportional zur Albuminkonzentration in der Glaskörperflüssigkeit.

Messung von PEDF

SDS-Gelelektrophorese

Proteinprobenpuffer, 1x, pH 6,8

200 mM Tris HCl
400 mM DTT
8% SDS
0,4 % Pyronin Y
40 Vol % Glycerin

Proteinlaufpuffer, 10x, pH 6,8

2 M Glycin
250 mM Tris Base
1% SDS

Acrylamidstammlösung 30%

29,2 % Acrylamid
0,8 % Bisacrylamid

Trenngel (10%)

375 mM Trispuffer pH 8,0
10 Vol % 30% Acrylamidstammlösung
1 % SDS
1 % APS
0,07 % TEMED

Sammelgel (5%)	63 mM Trispuffer pH 8,0
	5 Vol % 30% AcrylamidstammLösung
	0,1 % SDS
	0,1 % APS
	0,1 % TEMED

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Trennung von Proteingemischen. Dabei wandern die Proteine nach ihrer Größe und Ladung in einem elektrischen Feld. Die äußere Ladung eines Proteins wird durch die Aminosäuresequenz (Primärstruktur) und die räumliche Struktur (Tertiärstruktur) bestimmt. Durch Erhitzen auf 95°C und reduzierende Substanzen wie DTT wird die Tertiärstruktur der Proteine durch Spaltung von Disulfidbrücken aufgehoben. SDS umgibt das Protein mit einer negativen Ladung, so daß in der SDS-Gelelektrophorese Proteine nur noch nach ihrer Größe, aber unabhängig von der nativen räumlichen Struktur und Ladung aufgetrennt werden.

Das Probenvolumen setzte sich aus 1 µl Glaskörperflüssigkeit, 14 µl Aqua dest und 5 µl Proteinprobenpuffer zusammen. Die Proben wurden in Eppendorfröhrchen pipettiert, gründlich gevortext, bei 95 °C für 4 min im Thermocycler erhitzt und danach langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden die Proben auf das Acrylamidgel aufgetragen und eine Spannung von 80 bis 120 V angelegt, bis die Laufmittelfront den unteren Gelrand erreicht hatte.

Western blot, Antikörperbehandlung und Detektion

Kathodenpuffer	100 mM Arginin 0,01 % SDS
Anodenpuffer 1	300 mM Tris Base 20 Vol % Methanol
Anodenpuffer 2	100 mM Tris Base 20 Vol % Methanol
TBST-Puffer	100 mM Tris Base 1,5 M NaCl 0,5 Vol % Tween 20
Blocklösung	5 % Milchpulverlösung in TBST

Western blotting und die anschliessende Antikörperbehandlung sind Methoden, um die aufgetrennten Proteinfractionen aus dem Polyacrylamidgel sichtbar zu machen. Dabei werden die aufgetrennten Proteingemische aus dem Gel auf eine Membran (Nylon, PVDF) durch ein elektrisches Feld übertragen. Diese Membran kann dann mit einer Antikörperlösung gegen das nachzuweisende Protein behandelt werden. Mit einem Zweitantikörper, der entweder biotinyliert oder mit HRP versetzt ist, kann dann das entsprechende Protein durch Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht des untersuchten Proteins kann mit Hilfe einer Proteinleiter abgeschätzt werden, die auf jedem Gel aufgetragen wird.

In dieser Arbeit sind die Gele nach der „Semi-dry-Methode“ geblotted worden. Dabei werden erst sechs Blätter Whatman-Papier in Kathodenpuffer getränkt, dann das Gel und die PVDF-Membran darauf gelegt und dann darauf vier Blätter Whatman-Papier mit Anodenpuffer 2 und zwei Blätter mit Anodenpuffer 1 gelegt. Dieses „Sandwich“ liegt dann zwischen zwei Elektrodenplatten, an die für 45 Minuten eine Spannung von 20 V angelegt wird.

Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran mindestens 30 Minuten in 5%ige Milchpulverlösung gelegt, um freie Bindungstellen der Membran zu blockieren, an die die Antikörper binden könnten.

Danach wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert. Dann wurde mehrmals mit TBST gespült und ein geeigneter HRP-konjugierter Zweitantikörper ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur dazugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde wieder mit TBST gründlich gespült.

Für die Detektion wurde die Membran dann mit einem Luminol-Chemilumineszenz-Substrat für eine Minute inkubiert. Durch HRP wird Luminol in Gegenwart von Peroxidase in einen angeregten Zustand gebracht. Der Grundzustand wird durch Emission von Licht wiederhergestellt. Diese Lichtemission kann mit einer Kamera detektiert werden. Dabei ist die Lichtintensität proportional zur Proteinkonzentration. Somit kann mit einer bekannten Standardkonzentration auf die Proteinkonzentration in der Probe geschlossen werden.

Kompetition

Durch eine Kompetition kann man unterscheiden, ob detektierbare Banden auf einem Western Blot durch eine spezifische Antigen-Antikörperbindung oder durch unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers an ähnliche Epitope in der Probe entstehen. Für die PEDF-Nachweise wurde rekombinantes PEDF im Überschuß (1:50) mit einem anti-human-PEDF-Antikörper in PBS über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Bei einer Kompetition sind alle Proben doppelt auf einem Acrylamidgel aufgetragen worden. Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran geteilt und eine Hälfte mit der Kompetitionslösung und die andere Hälfte mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Banden, die nach der Inkubation mit dem Primärantikörper sichtbar waren, aber nicht nach der Inkubation mit der Kompetitionslösung, wurden als spezifisch gewertet.

Messung von VEGF

VEGF ist ein Zytokin, das in sehr geringen Konzentrationen im Glaskörper nachweisbar ist (pg/ml). Diese geringen Mengen sind mit einem Western blot nicht mehr detektierbar, deshalb wurde VEGF im Glaskörper mittels ELISA (Enzyme linked immunosorbent Assay) gemessen.

Wir verwendeten einen handelsüblichen ELISA (Quantikine[®] von R&D Systems), der nach der Sandwichtechnik arbeitet. Bei diesem ELISA ist ein monoklonaler Antikörper gegen humanes VEGF bereits auf der 96-Well-Platte aufgetragen. In der Probe enthaltenes VEGF wird an den anti-VEGF-Antikörper gebunden. Ein zweiter polyklonaler HRP-konjugierter anti-VEGF-Antikörper wird dann an das bereits gebundene VEGF gebunden. Dann wird ein Farbreagenz hinzugefügt. Unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid kommt es durch HRP mit Tetramethylbenzidin zu einer blauen Farbreaktion, deren Intensität abhängig von der VEGF-Konzentration in der Probe ist. Die Intensität kann spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 540 nm gemessen werden.

Der Assay wurde für rekombinantes humanes VEGF₁₆₅ kalibriert, detektiert aber auch VEGF₁₂₀. Als untere Nachweisgrenze gibt der Hersteller für diesen Assay „typical less than 9 pg/ml“, also weniger als 9 pg/ml an.

Es wurde eine Standardreihe von 0 bis 2000 pg/ml zweifach angelegt. Jede Glaskörperprobe wurde zweimal gemessen. In jedes Well wurden 250 µl Diluent (Proteinpuffer) und 100 µl Glaskörperflüssigkeit pipettiert, zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal gründlich gewaschen. Danach wurde der Zweitantikörper ebenfalls zwei Stunden inkubiert und der Überschuss gewaschen. Dann wurde das Farbreagenz hinzugegeben, und nach 25 Minuten mit einer Stopplösung (2 N H₂SO₄) die Farbreaktion unterbrochen. Im Anschluß daran wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 540 nm die optische Dichte und daraus die VEGF-Konzentration im Glaskörper bestimmt.

Bei Glaskörperproben, deren Konzentration oberhalb des Messbereichs waren, wurde eine Verdünnung von 1:2 mit dem Diluent angesetzt.

Aus den jeweils zwei Meßwerten pro Probe wurde der Mittelwert gebildet und mit diesem die statistische Auswertung durchgeführt.

Immunhistologie

Tris-Puffer (pH 7,4)

34,25 g

Tris-HCl

4,5 g

Tris-Base

43,75 g

NaCl

mit 5 l Aqua dest. auffüllen

Die Melanome aus den enukleierten Augen wurden immunhistochemisch auf VEGF und PEDF untersucht. Dabei wurde jeweils ein Schnitt auf VEGF und ein Schnitt auf PEDF gefärbt.

Die Tumoren wurden in Paraffin gebettet und mit dem Microtom in 4 µm dicke Schnitte geschnitten. Dann wurden die Schnitte in Xylen entparaffiniert und im Schnellkochtopf unter Druck für 5 min in Citratpuffer (pH 6,0) denaturiert und mit BSA freie Bindungsstellen blockiert.

Für die VEGF-Färbung wurde dann der VEGF-Antikörper in der Verdünnung 1:100, der Brückenantikörper mit 1:50 und der APAAP-Antikörper mit 1:20 für jeweils 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit Spülpuffer (Tris-Puffer) gründlich gewaschen.

Für die PEDF-Färbung wurden die Schnitte mit anti-PEDF-goat-Antikörper inkubiert (Verdünnung 1:100), danach mit einem mouse-anti-goat-Antikörper (Verdünnung 1:20) versetzt, und anschliessend mit dem Brückenantikörper und dem APAAP-markierten Antikörper inkubiert.

Alle Schnitte wurden mit Papanicolaoulösung gegengefärbt und lichtmikroskopisch untersucht.

3. Ergebnisse

Charakterisierung der untersuchten Gruppen

In der Tabelle 3.1. sind die Häufigkeiten der Erkrankungen in den entsprechenden Gruppen und das Geschlecht in absoluten Zahlen angegeben. Das Alter ist in Jahren als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Tab. 3.1. Charakterisierung der untersuchten Gruppen: Erkrankungen, Anzahl, Geschlecht und Alter der Patienten in Jahren.

Erkrankung	Anzahl	Männer: Frauen	Alter
Aderhautmelanome	56	26 : 30	59 \pm 12
Tumorexzision	20	9 : 11	54 \pm 9
Endoresektion	20	10 : 10	56 \pm 11
Enukleation	16	8 : 8	68 \pm 10
Kontrollen			
Makulaforamen	20	3 : 17	64 \pm 10
Rhegmatogene Ablatio	24	13 : 11	60 \pm 21

Nachweis von PEDF im Glaskörper

In der Glaskörperflüssigkeit enthaltenes PEDF wurde mit SDS-Gelelektrophorese und Westernblot quantitativ nachgewiesen. Abb. 3.1 zeigt einen Westernblot, auf dem rekombinantes PEDF als Standard in den Mengen 10 µg (1), 5 µg (2) und 2,5 µg (3) aufgetragen wurde. In den folgenden Bahnen (4) bis (9) sind Glaskörperproben von sechs Patienten mit Aderhautmelanomen aufgetragen worden. Bei Inkubation mit polyklonalen und monoklonalen anti-human-PEDF-Antikörpern zeigt sich eine typische Bande bei rund 50 kDa. Durch Kompetition wurde die Spezifität der Bande nachgewiesen.

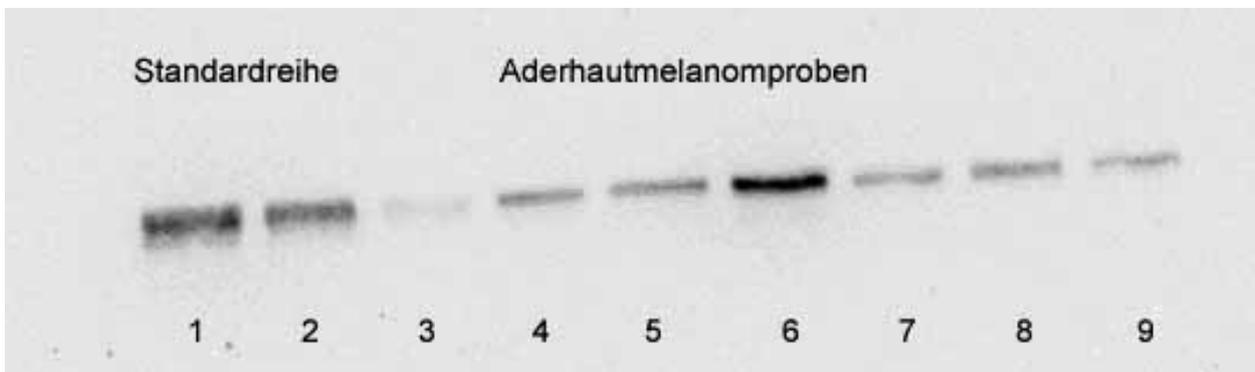


Abb. 3.1: Western blot mit Standardreihe und 6 Proben von Aderhautmelanompatienten. Die Reihen 1, 2 und 3 enthalten rekombinantes PEDF mit 10 µg – 5 µg – 2,5 µg als Standardreihe. Die Reihen 4 bis 9 zeigen die PEDF-Bande von 6 verschiedenen Aderhautmelanomproben.

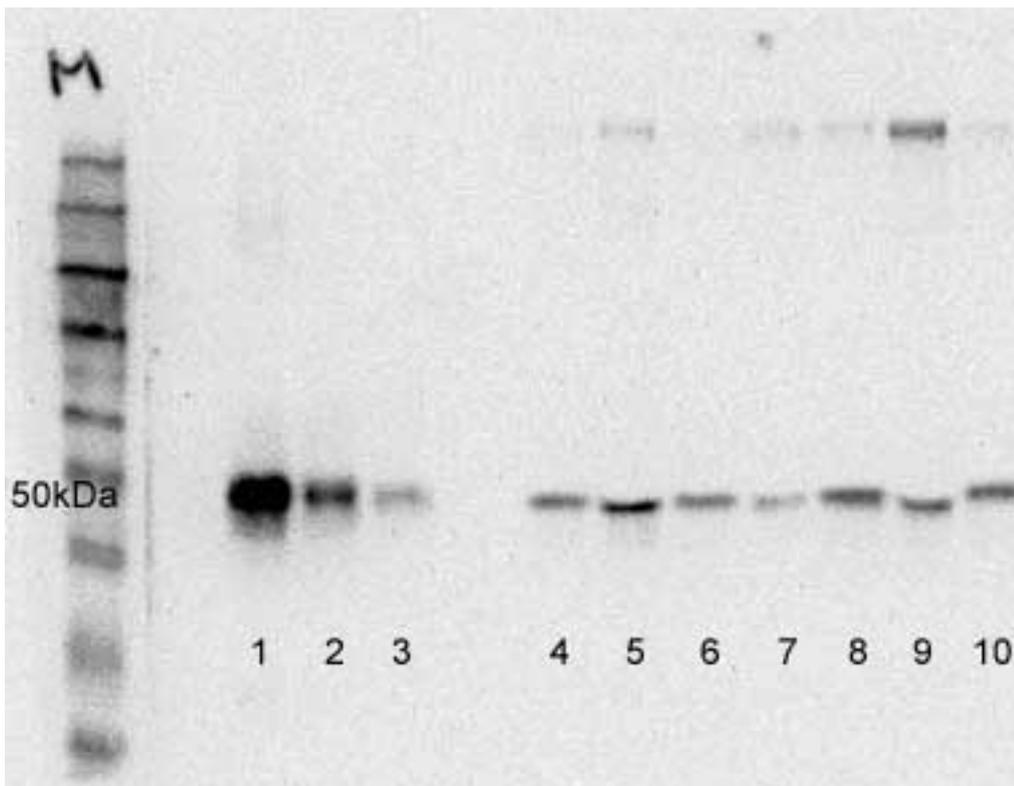


Abb. 3.2: In Reihe M wird die Proteinleiter zur Abschätzung des Molekulargewichtes der dargestellten Banden gezeigt. In den Reihen 1 – 10 sind jeweils Banden bei 50 kDa zu sehen. Die Reihen 1 – 3 enthalten rekombinates PEDF in den Konzentrationen 10 μg – 5 μg – 2,5 μg . Die Reihen 4 – 10 zeigen verschiedene Aderhautmelanomproben.

Nach dem Schema in Abbildung 3.2 wurden alle Aderhautmelanomproben und alle Kontrollen aufgetragen. Es zeigt sich eine deutliche Bande bei 50 kDa, die dem Molekulargewicht von PEDF entspricht.

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung aller Gele sind in den Diagrammen 3.1 und 3.2 dargestellt.

Kompetition

In Abbildung 3.3 erfolgt der spezifische Nachweis von PEDF durch Kompetition.

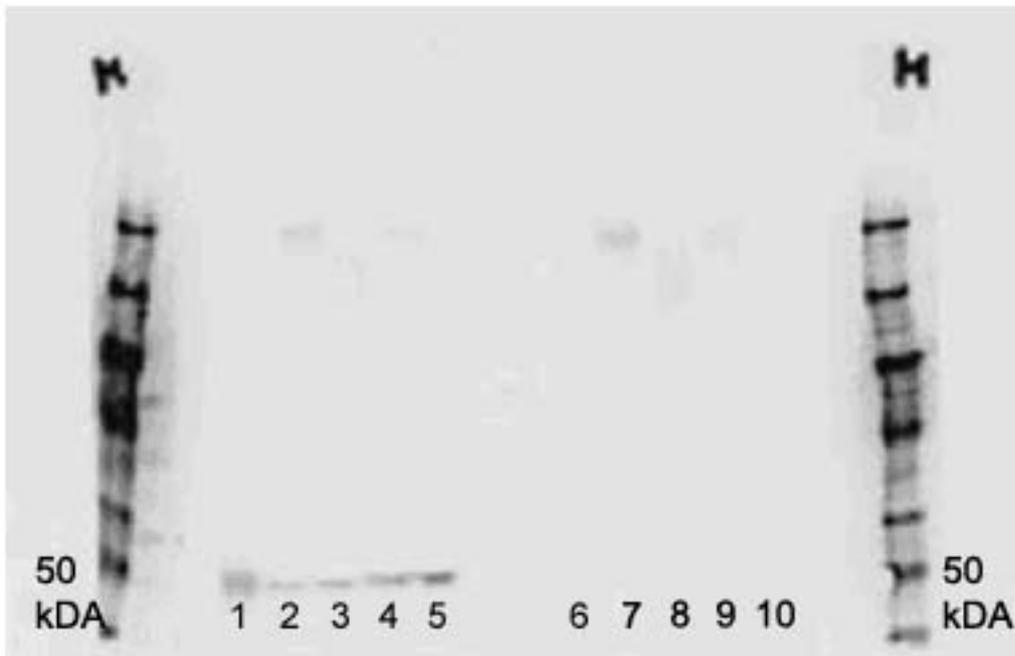


Abb. 3.3: Spezifischer Nachweis von PEDF: Die beiden äußeren Reihen, markiert mit M, enthalten den Längenmarker. In den Reihen 1 – 10 sind zweimal hintereinander in gleicher Reihenfolge 5 Proben von Aderhautmelanomen aufgetragen worden.

Die Reihen 1 – 5 wurden wie mit dem PEDF-Antikörper inkubiert, die Reihen 6 – 10 mit der Kompetitionslösung. In den mit der Kompetitionslösung behandelten Reihen ist bei 50 kDa keine Bande zu sehen, so daß davon auszugehen ist, daß diese Bande spezifisch für PEDF ist.

Quantitative Auswertung der PEDF-Konzentrationen

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Gele sind in den Diagrammen 3.1 und 3.2 dargestellt. Die Daten sind normalverteilt.

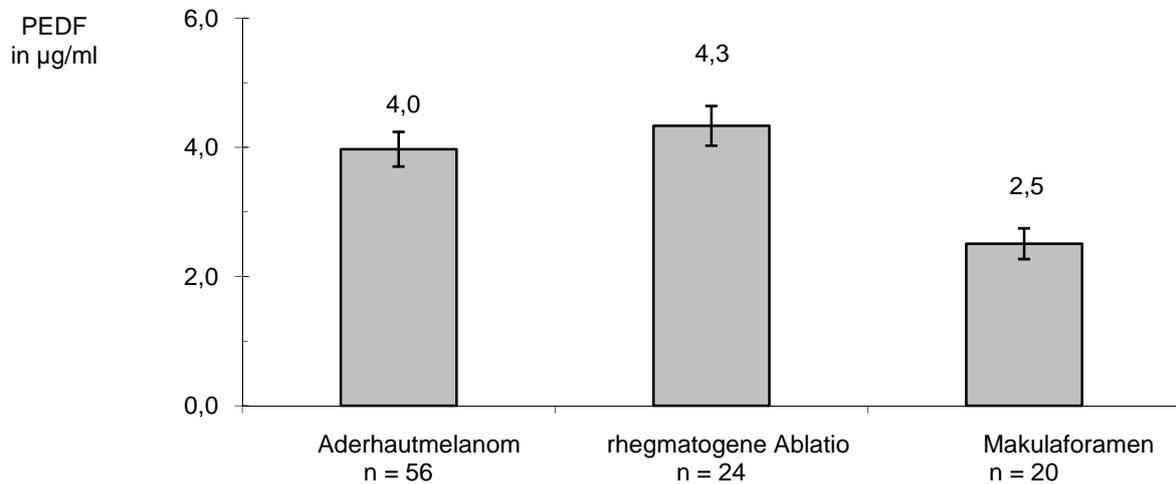


Diagramm 3.1: PEDF-Konzentrationen im Glaskörper bei Aderhautmelanomen im Vergleich zu den Kontrollen. Die Balkenhöhen entsprechen den Gruppenmittelwerten, die Fehlerbalken den Standardfehlern.

Die Konzentrationen bei Aderhautmelanomen (4,0 µg/ml) und bei Ablatio retinae (4,3 µg/ml) unterscheiden sich statistisch nicht signifikant. Der Konzentrationsunterschied zur Gruppe der Makulaforamen ist jedoch für beide Gruppen signifikant. (t-Test, $p = 0,02$)

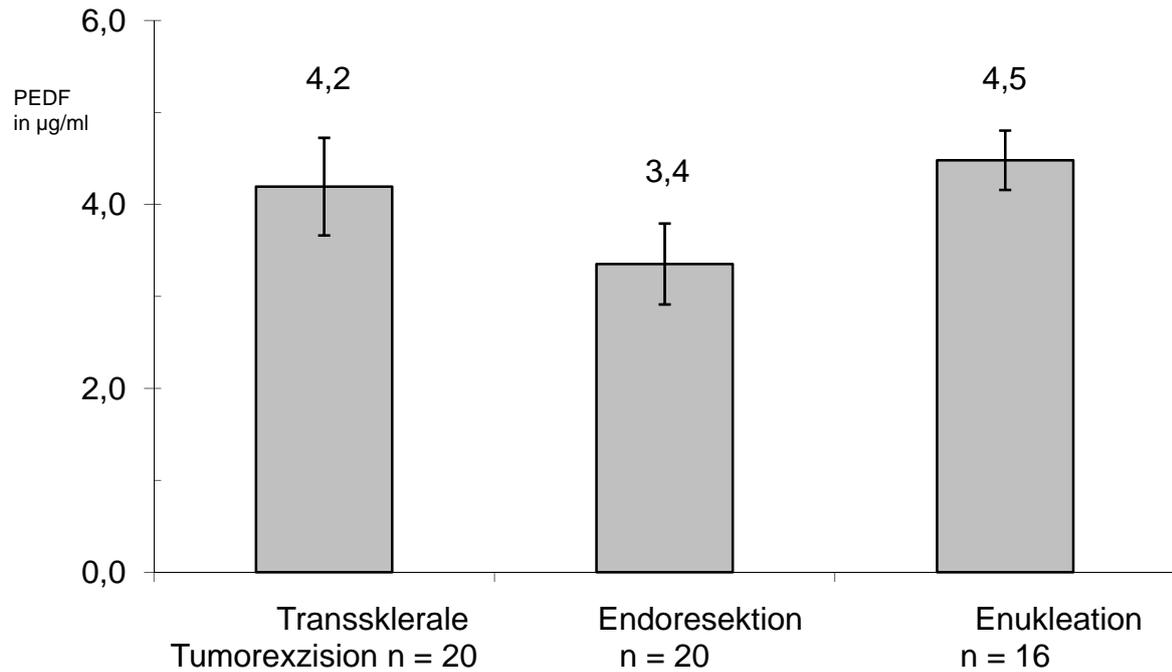


Diagramm 3.2: PEDF-Konzentrationen im Glaskörper bei Aderhautmelanomen, unterteilt in die Untergruppen transsklerale Tumorexzision, Endoresektion und Enukleation. Die Balkenhöhe entspricht dem Mittelwert, die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler der Mittelwertes.

Die einfaktorielle ANOVA ergibt keinen signifikanten Unterschied der Gruppenmittelwerte ($p = 0,2$). Die PEDF-Konzentrationen in den drei Untergruppen unterscheiden sich demnach nicht.

Nachweis von VEGF im Glaskörper

VEGF wurde bei 11 Patienten mit Makulaforamen, 12 Patienten mit rhegmatogener Ablatio und 34 Patienten mit malignem Aderhautmelanom mit einem ELISA bestimmt. Im Diagramm 3.3 sind die VEGF-Konzentrationsverteilungen bei den Kontrollen und Aderhautmelanomen im logarithmischen Maßstab dargestellt.

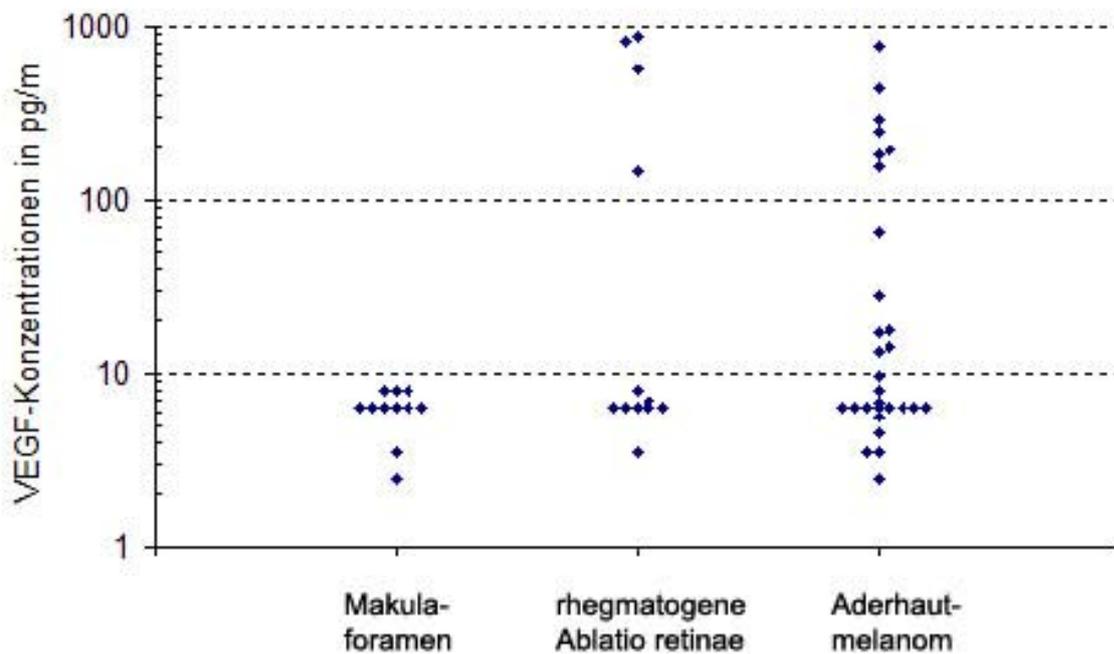


Diagramm 3.3: VEGF-Konzentrationsverteilungen im Glaskörper bei Makulaforamen, rhegmatogener Ablatio retinae und Aderhautmelanom.

Da die Verteilung der Daten nicht einer Normalverteilung entspricht, wurde der Rangsummentest nach Mann-Whitney verwendet. Es ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Für die Gruppenmittelwerte zwischen Aderhautmelanomen und Makulaforamina beträgt $p = 0,07$, für Aderhautmelanome und rhegmatogene Ablatio ist $p = 0,9$ und zwischen rhegmatogener Ablatio und Makulaforamen ist $p = 0,3$.

Diagnose	Anzahl	Median	MW	SD	SE
AHMM	30	7,3	84	168	30
Tumorexzision	9	6,3	82	156	52
Endoresektion	8	6,5	8	3,8	1,3
Enukleation	13	28	133	214	59
Kontrollen					
rhegmatogene Ablatio	14	6,3	175	320	85
Makulaforamen	13	6,3	6,1	1,5	0,4

Tabelle 3.1.: VEGF-Konzentrationen im Glaskörper angegeben in pg/ml.
 MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; SE = Standardfehler des Mittelwertes.

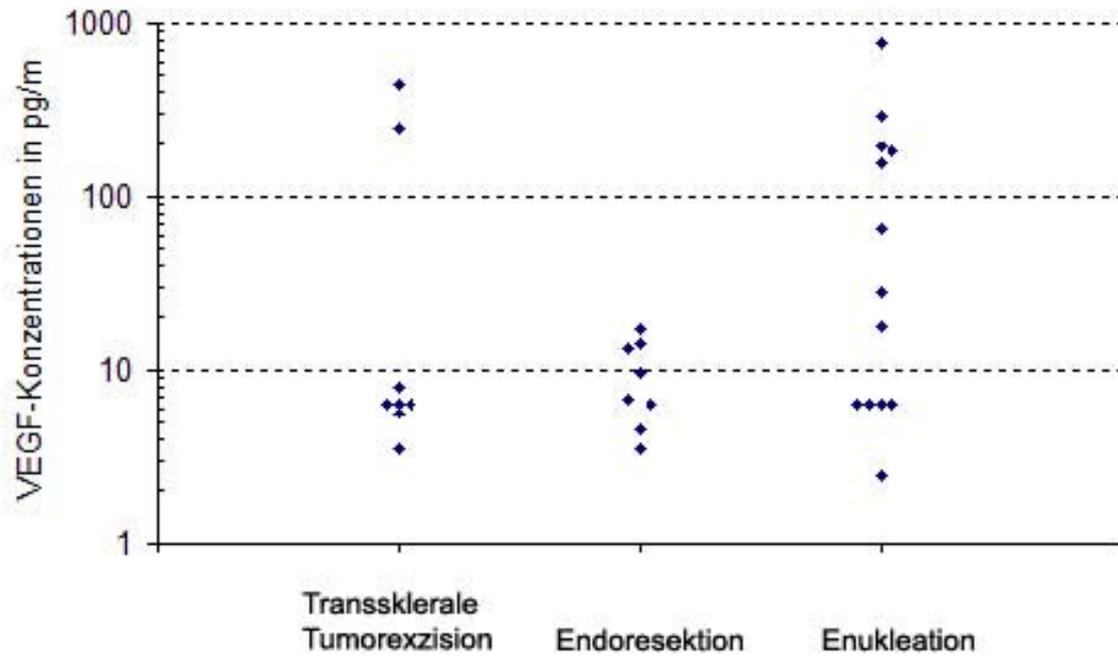


Diagramm 3.4: VEGF-Konzentrationen im Glaskörper bei transskleraler Tumorexzision, Endoresektion, und Enukleation. Die einfaktorielle ANOVA zwischen den Operationsgruppen ergibt keine Gruppenunterschiede ($p = 0,3$).

Korrelation von PEDF mit klinischen und histologischen Parametern

PEDF und Patientenalter

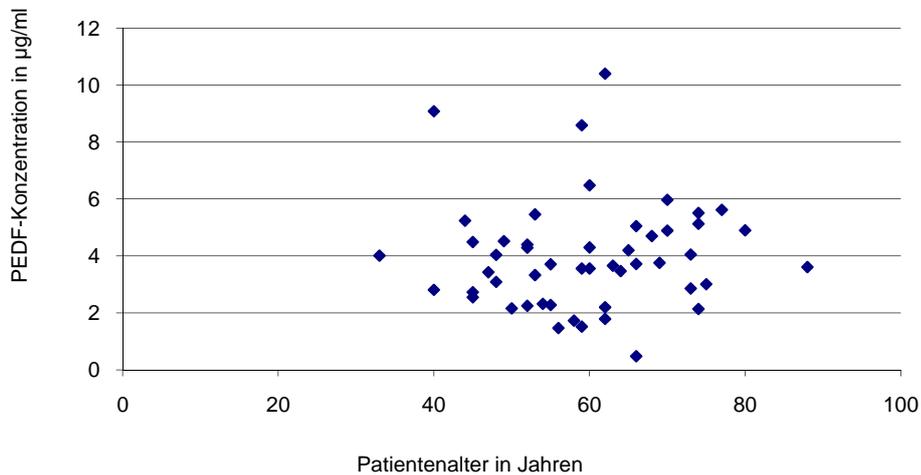


Diagramm 3.5: PEDF-Konzentration in Abhängigkeit vom Patientenalter. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson beträgt 0,48, ist also schwach positiv, aber statistisch nicht signifikant ($p = 0,8$)

Auch bei den Kontrollen gibt es keine signifikante Korrelation zwischen Patientenalter und der PEDF-Konzentration im Glaskörper. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson beträgt $-0,06$ ($p = 0,7$)

PEDF-Konzentration und Geschlecht

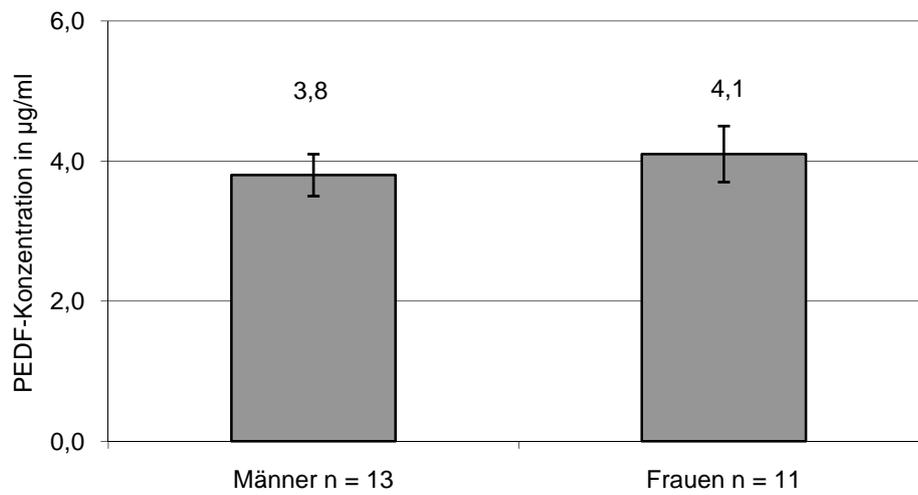
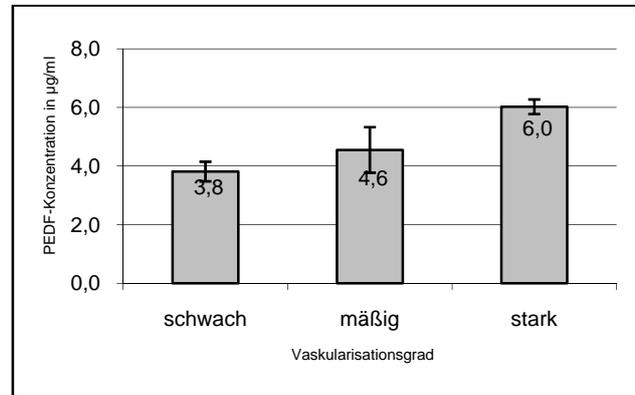
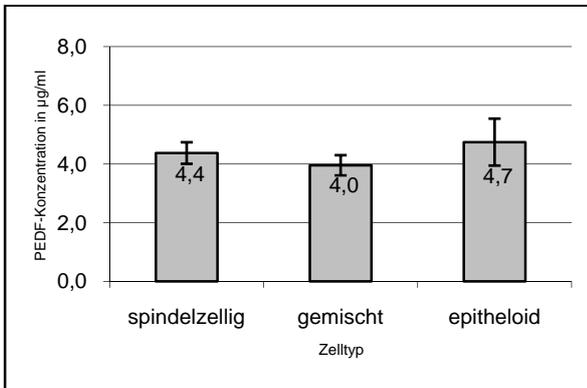


Diagramm 3.6: PEDF-Konzentration im Glaskörper in Abhängigkeit vom Geschlecht. Die Balkenhöhen entsprechen den Gruppenmittelwerten, Standardfehler entsprechen den Fehlerbalken.

Im T-Test ergibt sich $p = 0,5$, statistisch besteht kein signifikanter Unterschied.

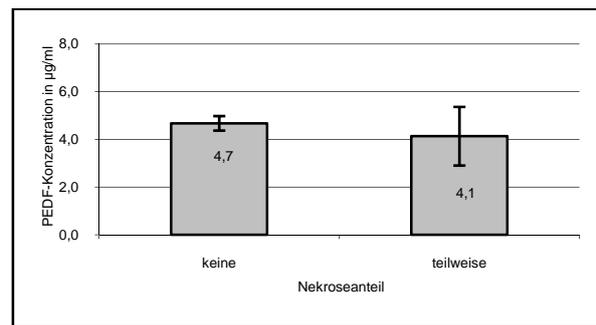
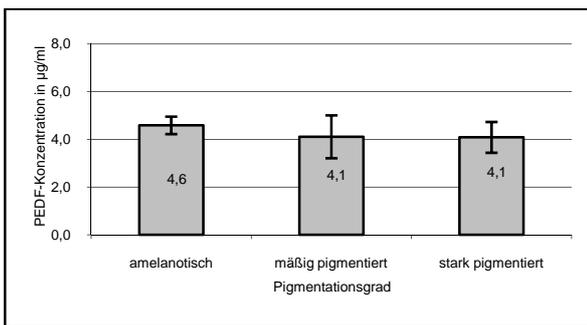
PEDF und histologische Merkmale

Im folgenden sind in den Diagrammen 3.7a – d für die 16 Augen aus der Gruppe der Enukleationen die PEDF-Konzentrationen in Abhängigkeit von Zelltyp, Vaskularisationsgrad, Pigmentationsgrad, und Nekrosenanteil dargestellt.



3.7a)

3.7b)



3.7c)

3.7d)

Diagramme 3.7a – d: PEDF-Konzentrationen im Glaskörper von Aderhautmelanomen in Abhängigkeit von histologischen Parametern. Aufgetragen sind die Mittelwerte, die Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern des Mittelwertes.

Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) ergibt keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede beim Zelltyp ($p = 0,8$), Pigmentationsgrad ($p = 0,8$) und Nekrosegrad ($p = 0,6$). Beim Vaskularisationsgrad ist der Gruppenunterschied jedoch signifikant ($p = 0,02$).

PEDF und Tumorausdehnung

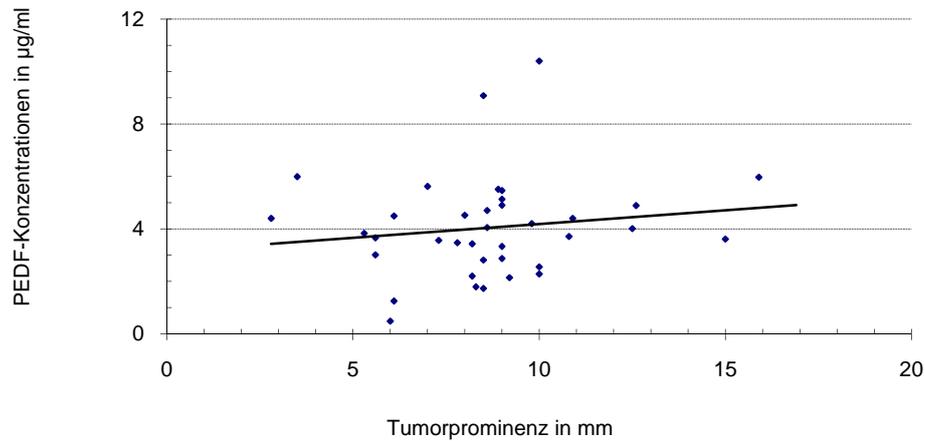


Diagramm 3.8: Verhältnis von Tumorprominenz und der PEDF-Konzentration im Glaskörper von Melanompatienten.

Die eingetragene Trendlinie zeigt eine positive Korrelation mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0,4 und einer Signifikanz von $p = 0,004$. Für den basalen Tumordurchmesser ist die Korrelation deutlich schwächer ($= 0,2$) und nicht signifikant ($p = 0,3$)

PEDF und Albuminkonzentration

Das Diagramm 3.9 zeigt die Albuminkonzentrationen im Glaskörper beim Aderhautmelanom und in den beiden Kontrollgruppen. Der Unterschied zwischen den Aderhautmelanomen ($2,1 \pm 0,2$ g/l) ist im Vergleich zu den Kontrollen ($0,3 \pm 0,07$ g/l bzw. $0,4 \pm 0,2$ g/l) hoch signifikant (t-Test, $p = 0,003$)

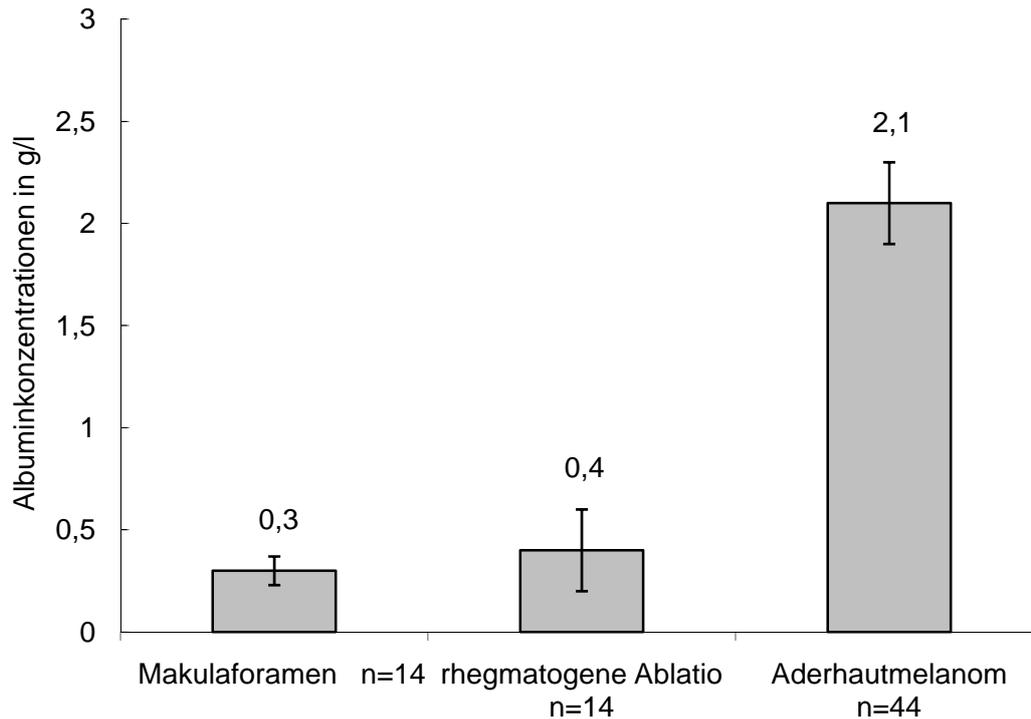


Diagramm 3.9: Albuminkonzentration im Glaskörper bei Makulaforamen, rhegmatogener Ablatio retinae und Aderhautmelanom. Die Balkenhöhen entsprechen dem Gruppenmittelwert, die Fehlerbalken dem Standardfehlern des Mittelwertes.

In dem folgenden Punktwolkendiagramm (Diagramm 3.10) ist für jede AHMM-Probe die Glaskörperkonzentration von PEDF in Abhängigkeit von der entsprechenden Albuminkonzentration aufgetragen. Es besteht eine positive Korrelation, der Korrelationskoeffizient nach Pearson beträgt 0,5 und ist hoch signifikant ($p = 0,008$).

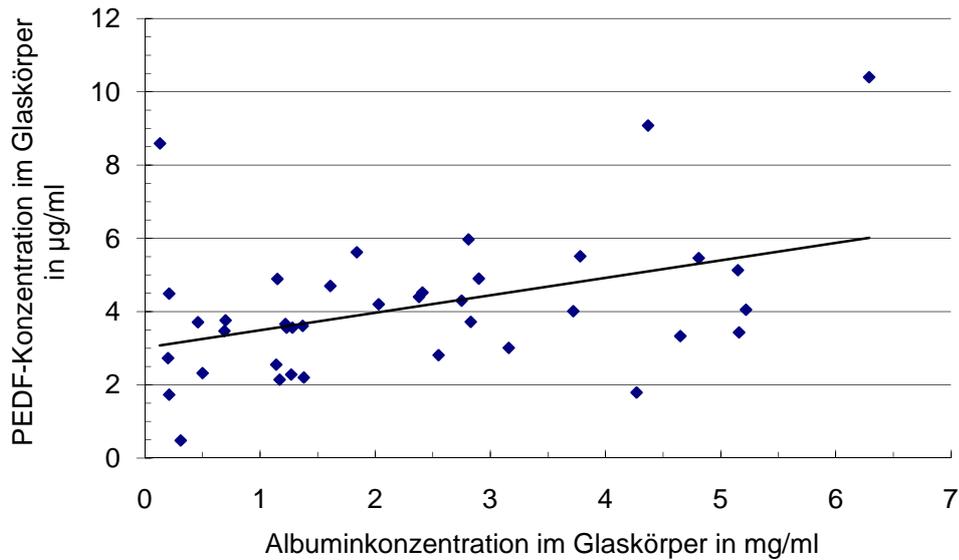


Diagramm 3.10: Korrelation von PEDF und Albuminkonzentrationen im Glaskörper.

Albuminkonzentration und Vaskularisationsgrad

Untersucht man die Gruppenmittelwerte der Albuminkonzentrationen in der Gruppe der enukleierten Augen bei den Vaskularisationsgraden ergibt die einfaktorielle ANOVA einen signifikanten Gruppenunterschied ($p = 0,03$).

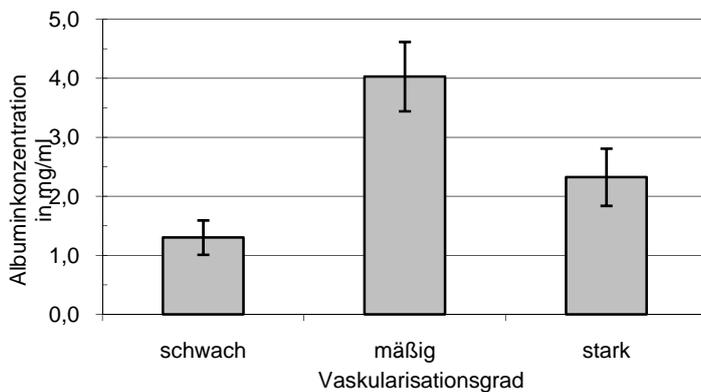


Diagramm 3.11: Albuminkonzentration im Glaskörper in Abhängigkeit vom Vaskularisationsgrad. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

Die einfaktorielle ANOVA ergibt einen statistisch signifikanten Gruppenunterschied ($p = 0,03$).

Zusammenhang zwischen PEDF- und VEGF-Konzentration im Glaskörper

In der Abbildung 4.5 sind für jede Glaskörperprobe die PEDF-Konzentration und die VEGF-Konzentration dargestellt.

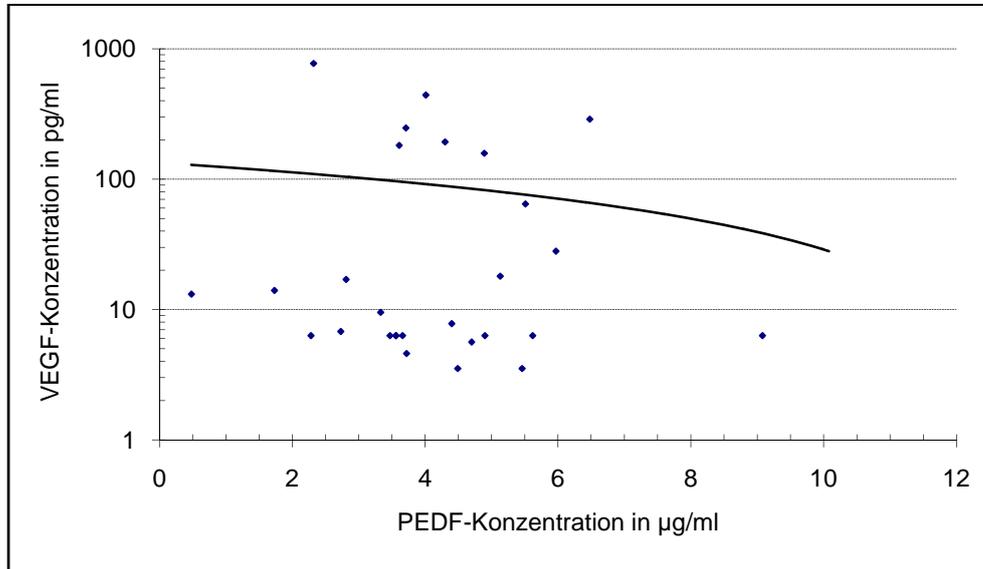


Abb. 4.5: Zusammenhang zwischen VEGF-Konzentration und PEDF-Konzentration im Glaskörper

In dem vorliegenden Kollektiv besteht eine negative Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von $-0,2$ ($p = 0,8$). Diese Korrelation ist nicht signifikant.

Immunhistologie

Immunhistologie für PEDF

Es wurden 16 Melanome, die bei einer Enukleation gewonnen wurden, immunhistochemisch behandelt. Es wurde jeweils ein Schnitt mit Anti-PEDF-Antikörpern und ein Schnitt mit Anti-VEGF-Antikörpern angefertigt.

Bei der PEDF-Färbung zeigte das Tumorgewebe meist eine negative oder sehr schwache Färbung. Bei zwei Melanomen konnte eine diffuses Anfärbungsmuster beobachtet werden, das entsprechend Tumorzellnestern angeordnet war (siehe Abb. 5.1). In drei Präparaten wurden einige wenige Zellen pro Gesichtsfeld sehr kräftig angefärbt. Die Färbung trat dann immer intrazytoplasmatisch und über den gesamten Tumor verteilt auf (siehe Abb. 5.2). Sowohl stark als auch schwach pigmentierte Tumoren zeigen PEDF-positive Färbungen. Intratumorale Endothelzellen ließen sich nicht anfärben. Die Netzhaut war schwach anfärbbar. Nur einige Pigmentepithelzellen wiesen eine Anfärbung auf.

Abb. 5.1: PEDF-Immunhistologie eines mäßig pigmentierten Aderhautmelanoms. Bei 10-facher Vergrößerung sieht man nesterförmige Anfärbungen des Tumors. Einige Stellen erscheinen durch die Pigmentierung dunkler. Diese pigmentierten Melanomzellen sind nestförmig angeordnet und ihr Zytoplasma färbt sich auch stärker an. Bei 40-facher Vergrößerung sieht man die zytoplasmatische Anfärbung.

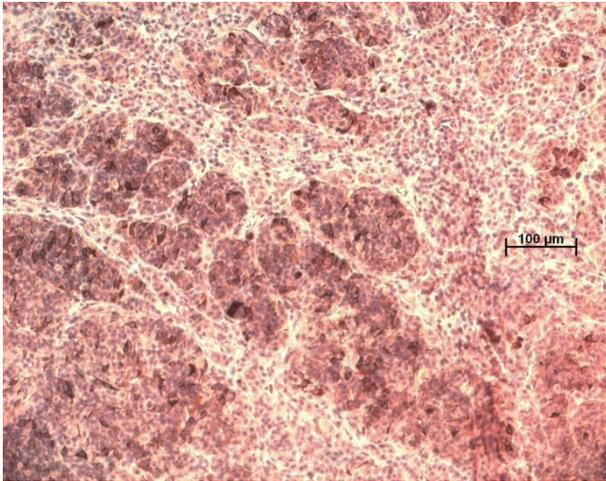


Abb. 5.1a: 10-fache Vergrößerung

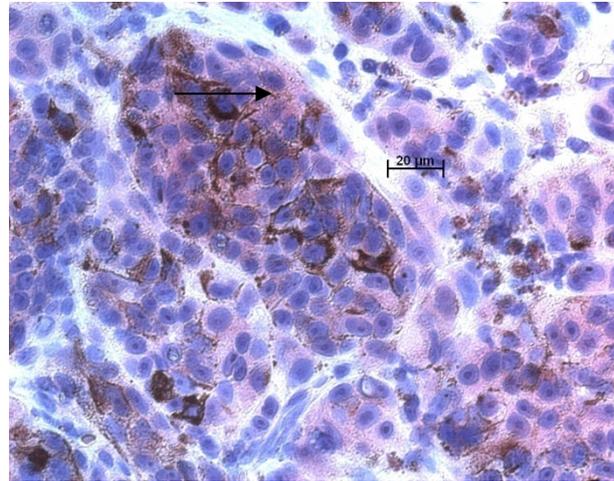


Abb. 5.1b: 40-fache Vergrößerung

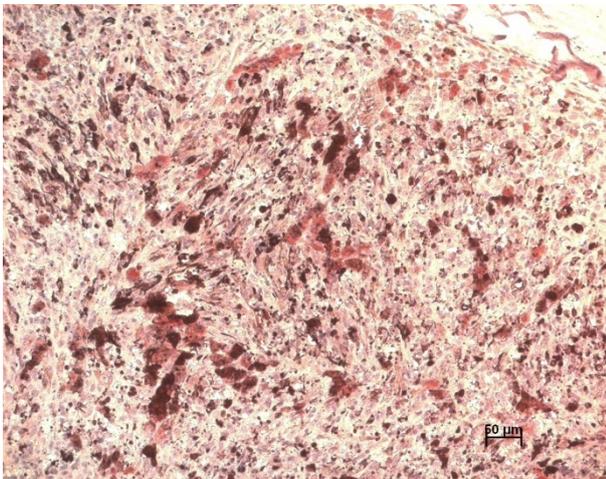


Abb. 5.2a: 10-fache Vergrößerung

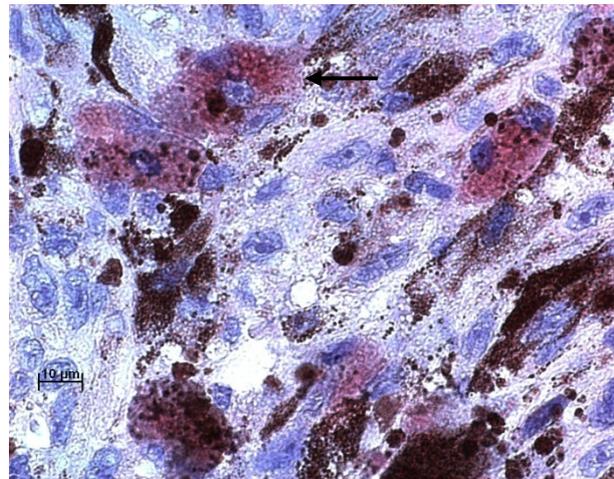


Abb. 5.2b: 63-fache Vergrößerung

Abbildung 5.2: PEDF-Immunhistologie eines mäßig pigmentierten Aderhautmelanoms. Bei zehnfacher Vergrößerung sind einzelne Melanomzellen angefärbt, an diesem Präparat läßt sich jedoch kein bestimmtes Anfärbungsmuster erkennen. Bei 63-facher Vergrößerung ist gut zu erkennen, daß das Zytoplasma einiger Melanomzellen (Pfeil) deutlich angefärbt ist.

PEDF-Negativ-Kontrollen

Zum Vergleich werden in der Abbildung 5.3 Negativ-Kontrollen, bei denen der PEDF-Antikörper durch PEDF blockiert wurde, gezeigt.

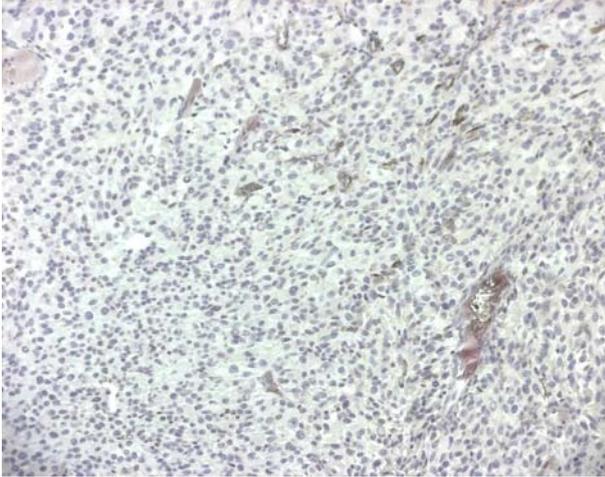


Abb. 5.3a: PEDF-Negativkontrolle bei 10-facher Vergrößerung

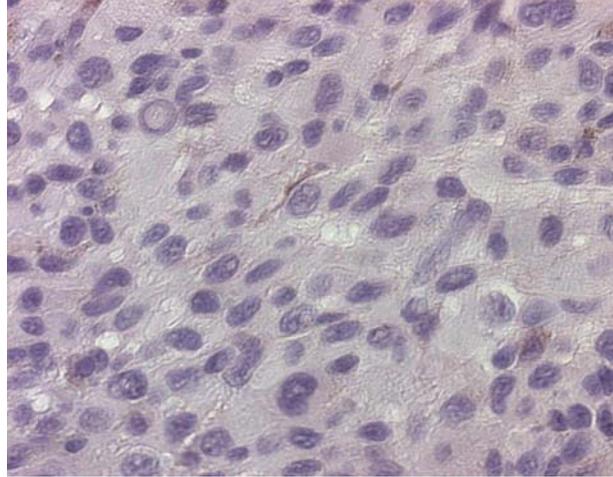


Abb. 5.5b: PEDF-Negativ-Kontrolle bei 40-facher Vergrößerung

Immunhistologischer Nachweis von VEGF

Die VEGF-Immunhistochemie zeigt regelmäßig eine schwächere Anfärbbarkeit im Tumorzentrum und eine stetige Intensitätszunahme zur Tumorperipherie hin mit teilweise sehr intensiver Immunoreaktivität (Abb. 5.4). Dabei sind die Melanomzellen intrazytoplasmatisch angefärbt. Die Färbungen treten clusterförmig auf, es ist aber kein bestimmtes Verteilungsmuster erkennbar. Die Immunoreaktivität ist besonders intensiv, wenn in der Tumorperipherie die Zellen eine langgestreckte Form annehmen. Endothelzellen des Tumors sind nicht oder sehr schwach anfärbbar (Abb. 5.6.). In dem einzigen stark vaskularisierten Tumor war jedoch eine besonderes intensive Anfärbbarkeit der Melanomzellen um die Gefäße zu beobachten, die Endothelien selbst waren jedoch frei.

Starke Immunoreaktivität zeigen auch das retinale Pigmentepithel und das Pigmentepithel des Ziliarkörpers (Abb. 5.4). In der Netzhaut findet man in der Ganglienzellschicht, der Bipolarzellschicht und auch in der Photorezeptorschicht eine intensive positive Färbung (Abb. 5.5.).

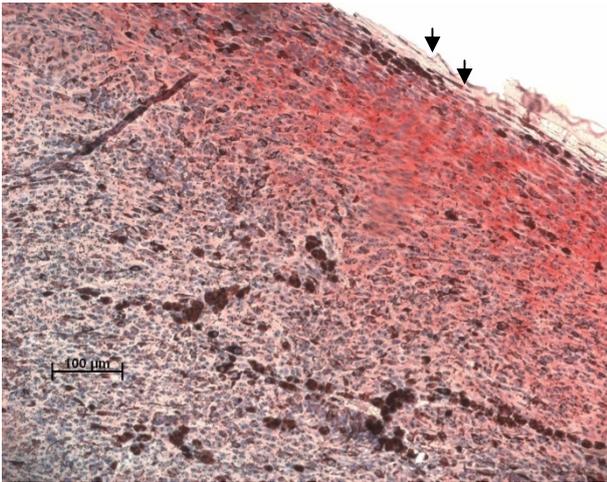


Abb. 5.4: VEGF-an der Tumoroberfläche

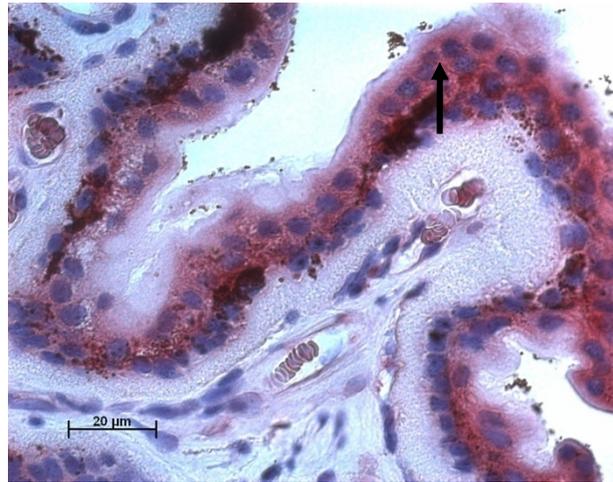


Abb. 5.5: VEGF im Ziliarkörper

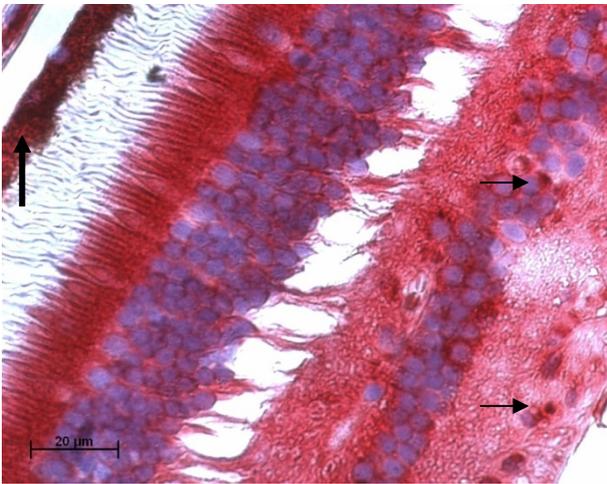


Abb. 5.6: VEGF in der Netzhaut

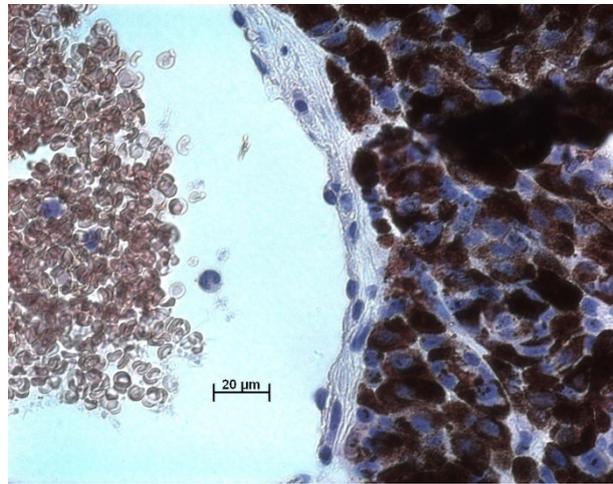


Abb. 5.7: VEGF im Endothel

VEGF-Immunhistochemie. **Abb. 5.4:** Aderhautmelanom 10-fach vergrößert. Deutlich zu erkennen ist die Intensitätszunahme der Färbung vom Tumorzentrum zur Tumorperipherie (Pfeile). **Abb. 5.5:** Das Pigmentepithel des Ziliarkörpers zeigt deutliche Immunreaktivität, Vergrößerung 40-fach; **Abb. 5.6:** Schnitt durch die Netzhaut über einem Melanom, 40-fache Vergrößerung. Die große Pfeilspitze deutet auf das retinale Pigmentepithel, die kleinen Pfeilspitzen zeigen auf Ganglienzellen beziehungsweise Bipolarzellen, die kräftige Immunreaktionen aufweisen. **Abb. 5.7:** Schnitt durch ein kräftig pigmentiertes Aderhautmelanom, Vergrößerung 40-fach. Angeschnitten ist ein Gefäß, die auskleidenden Zellen (Pfeile) sind nicht angefärbt.

Kontrollen für VEGF

Als Negativ-Kontrolle ist in Abbildung 5.8 ein Schnitt nach der Kompetition eines mäßig pigmentierten Aderhautmelanoms zu sehen. Die Positiv-Kontrolle erfolgt durch Inkubation eines Präparates einer Plazenta mit dem VEGF-Antikörper (siehe Abbildung 5.9).

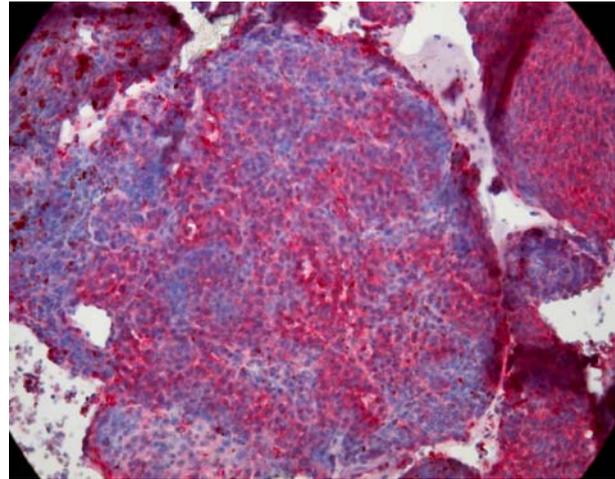
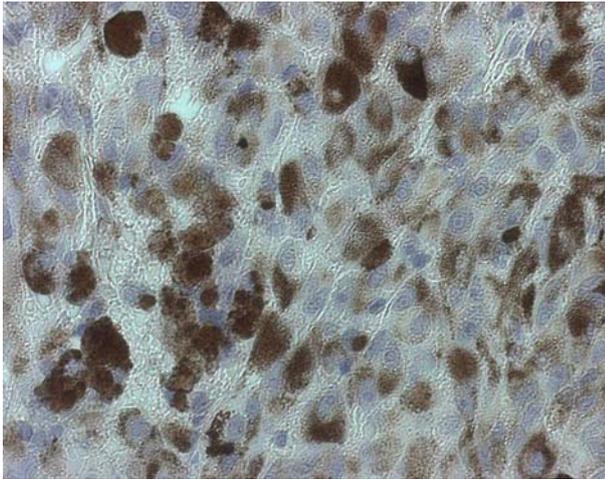


Abbildung 5.8: Negativ-Kontrolle von VEGF (Melanom nach Kompetition) Abb 5.9: Positiv-Kontrolle von VEGF (Plazenta)

Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse

Die PEDF-Konzentration ist bei Aderhautmelanomen (4,0 µg/ml) im Vergleich zu Makulaforamina (2,5 µg/ml) signifikant erhöht. Die PEDF-Konzentration bei Netzhautablösungen (4,3µg/ml) ist ebenfalls erhöht und unterscheidet sich statistisch nicht von der PEDF-Konzentration der Aderhautmelanomproben.

Die VEGF-Konzentrationen sind bei Aderhautmelanomen (7,3 pg/ml) im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen (6,3 pg/ml) nicht erhöht.

Es besteht ein positiver, signifikanter Zusammenhang zwischen der Albuminkonzentration und der PEDF-Konzentration im Glaskörper. Die Glaskörperkonzentrationen von PEDF und VEGF korrelieren nicht miteinander.

Bei Aderhautmelanomen korrelieren die PEDF-Konzentrationen positiv mit der TumorgroÙe und dem Vaskularisationsgrad. Andere histologische Parameter, das Patientenalter oder das Geschlecht korrelieren nicht mit der PEDF-Konzentration.

PEDF ist an histologischen Schnitten im Tumorgewebe, in der Netzhaut und im retinalen Pigmentepithel nachweisbar.

Die PEDF-Konzentrationen in den unterschiedlichen Aderhautmelanomgruppen (Transsklerale Tumorexzision, Endoresektion und Enukleation) unterscheiden sich nicht.

4. Diskussion

PEDF und VEGF im Glaskörper beim Aderhautmelanom

Pigment epithelium-derived factor ist das stärkste bisher bekannte antiangiogene, neurotrophe und neuroprotektive Zytokin, das auch zunehmend durch seine direkten und indirekten antitumoralen Wirkungen in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses rückt. In der Augenheilkunde wurden seine antiangiogenen Wirkungen vor allem bei der proliferativen diabetischen Retinopathie und der altersabhängigen Makuladegeneration gezeigt. Während für viele maligne Tumore bereits viele Daten darauf hinweisen, daß PEDF eine wichtige Rolle in der Tumorzelldifferenzierung und der Regulation der Gefäßdichte spielt, ist dieser Effekt beim Aderhautmelanom, dem häufigsten primären intraokulären Tumor, noch nicht untersucht worden.

Pigment epithelium-derived factor (PEDF) wurde erstmals von Tombran-Tink et al. 1989 beschrieben. (75) Nachweisbar ist das PEDF-Molekül in RPE-Zellen, von denen es in die Interphotorezeptormatrix sezerniert wird. (76, 77) In zehnfach niedrigerer Konzentration ist es in der Glaskörperflüssigkeit und im Kammerwasser vorhanden. Publierte Glaskörperkonzentrationen liegen bei Kontrollgruppen (Makulaforamen) im Bereich von 1 – 3 µg/ml Glaskörperflüssigkeit, wobei unterschiedliche Meßmethoden (Western blot, ELISA) benutzt wurden. (15, 78, 79) In unserer Kontrollgruppe mit den Makulaforamina beträgt der Mittelwert 2,5 µg/ml ± 0,3 µg/ml. Diese Ergebnisse sind mit den bisher publizierten Daten vergleichbar.

Anhand dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass in der Glaskörperflüssigkeit von Aderhautmelanompatienten die PEDF-Konzentration im Vergleich zum Makulaforamen signifikant erhöht ist.

An histologischen Schnitten von humanen Augen ist PEDF in nahezu allen Zellen, insbesondere aber in Photorezeptoren und Ganglienzellen nachgewiesen worden. (32, 80) An Rinderaugen gelang der Nachweis von PEDF-mRNA nur in RPE-Zellen, jedoch nicht in retinalen Zellen. (81) Eine andere Arbeit an gesunden Rattenaugen zeigt, daß PEDF-mRNA in RPE-Zellen, retinalen Ganglienzellen und Epithelzellen des Ziliarkörpers vorliegt. (82) In der aktuellen Literatur wird kontrovers diskutiert, ob prinzipiell jede Zelle im Auge PEDF synthetisieren kann oder ob PEDF von

spezialisierten Zellen wie RPE-Zellen synthetisiert und sezerniert wird und von anderen Zellen ein Uptake erfolgt. Auf retinalen Zellen konnte bisher ein membranständiger PEDF-Rezeptor isoliert werden, der über den Phospholipase-Weg intrazelluläre Wirkungen vermittelt. (43) Auf Motoneuronen konnte ein Uptake von PEDF demonstriert werden. (83) Aus diesen Überlegungen folgt, dass aus Veränderungen der PEDF-Glaskörperkonzentrationen nicht auf den Ort der Veränderungen geschlossen werden kann.

Glaskörperflüssigkeit besteht zu 98 % aus Wasser. Das restliche Volumen setzt sich überwiegend aus kollagenen Fasern, Proteoglykanen, Glukosaminoglykanen, löslichen Proteinen wie Albumin und in geringen Konzentrationen einer Reihe von Zytokinen wie PEDF und VEGF zusammen. (84, 85) Alberdi et al. belegen, dass PEDF sowohl über eine Bindungsstelle für Proteoglykane als auch für Glukosaminoglykane verfügt, beides Substanzen, die in hohen Konzentrationen im Glaskörper vorkommen. (37) Daher ist anzunehmen, dass der Glaskörper, ebenso wie der Extrazellulärraum der Retina, eine Art Speicherfunktion für PEDF übernimmt.

PEDF ist zur Zeit der wichtigste und potenteste bekannte Mediator, der in der Lage ist, die VEGF-induzierte Angiogenese zu inhibieren. (7) Angiogenese tritt bei einer Reihe von ischämischen Erkrankungen der Netzhaut auf. Ein klinisch außerordentlich wichtiges Beispiel dafür ist die proliferative diabetische Retinopathie, bei der es zu Gefäßaussprossungen in den Glaskörperraum, ausgehend von retinalen Gefäßen, kommt. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass bei der proliferativen diabetischen Retinopathie im Vergleich zu Kontrollen die Glaskörperkonzentration von PEDF erniedrigt ist. Nach panretinaler Laserkoagulation kommt es wieder zu einer Erhöhung der PEDF-Konzentrationen. Erklärt wird dieser Zusammenhang damit, dass durch die Laserkoagulation funktionstüchtige Neuronen und Gliazellen der Netzhaut zerstört werden, so daß die Hypoxie relativ abnimmt. Es folgt eine Abnahme der proangiogenetischen Mediatoren und PEDF wird wieder vermehrt sezerniert. Somit wird ein antiangiogenetisches Umfeld für retinale Endothelzellen geschaffen. (15, 86) Dawson et al. zeigte an Zellkulturen mit Retinoblastomzellen, dass es unter hypoxischen Bedingungen im Nährmedium zu einer Abnahme der PEDF-Konzentration und parallel dazu zu einer VEGF-Zunahme kam. (7) Neuere Arbeiten an Müllerstützzellen zeigen ebenfalls eine hypoxiebedingte verminderte PEDF-Freisetzung. (87) Eine weitere aktuelle Arbeit demonstriert, dass Retinoide und Dexamethason die PEDF-Translation steigern können. (88)

Das maligne Aderhautmelanom ist der häufigste primäre okuläre Tumor bei Erwachsenen mit einer Inzidenz von 6 auf 1 Million Einwohner in den westlichen Staaten mit einer Zunahme der Inzidenz im Alter. (19-21) Als prognostisch ungünstig gelten eine zunehmende Tumorgöße, eine anteriore Lage, eine Monosomie 3, Vorliegen von Epitheloidzellen und bestimmte „microvascular patterns“. Ein aktuelles Modell zur Tumorangiogenese bei uvealen Melanomen geht von folgenden sequenziellen Schritten aus: Zunächst kommt es zu Alterationen im Retinoblastom-Protein-Pathway mit erhöhter Cyclin D-Expression und verminderter p16Ink4a-Expression. (89, 90). Damit treten Melanozyten wieder in den Zellzyklus ein. Später kommt es zu einer gesteigerten Expression von MDM2, das p53 bindet und inaktiviert, womit die Apoptose der Zellen auf verschiedene Reize wie freie Radikale, Bestrahlung oder Chemotherapeutika verhindert wird. Aktuelle Klassifikationen sprechen hier von einem „Class I Melanoma“ mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 95 %. Im weiteren Verlauf tritt ein „Klassenwechsel“ ein („Class II Melanoma“), assoziiert mit dem Auftreten einer Monosomie 3, dem Auftreten von epitheloiden Zellen, zunehmender Tumorgöße, Metastasierung und einer 5-Jahres-Überlebensrate von 15 – 30%. (91, 92)

Die Metastasierung hängt in entscheidendem Maße von der Gefäßversorgung des Tumors ab. Lange Zeit war man der Meinung, daß Tumore ab einer bestimmten Zellzahl bzw. einer bestimmten Größe die Angiogenese induzieren, um ihre Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zu sichern. Tumorangiogenese bedeutet, dass Endothelzellen aus bestehenden Kapillaren in das Tumorgewebe migrieren, proliferieren, neue Lumina ausbilden und schließlich die Blutzirkulation initiieren.

Der Aufbau der Mikrozirkulation beim Aderhautmelanom ist jedoch weitaus komplexer. Es gibt Gefäße, die aus dem bereits existierenden Gefäßbett in das Tumorgewebe einragen. (93) Weiterhin wurden in uvealen Melanomzellen in vitro Gefäße nachgewiesen, die sowohl aus Endothelzellen als auch entdifferenzierten Tumorzellen bestehen, sogenannten „mosaic channels“. (94) Eine weitere Besonderheit stellt die „vasculogenic mimicry“, die Imitation von Gefäßen, dar. Maniotis et al. beschrieben 1999 „fluid conducting channels“, die in aggressiven Melanomzelllinien auftreten. Sie transportieren Plasma und Erythrozyten, enthalten aber keine Endothelzellen. (29) Hier liegt kein klassischer angiogentischer Prozeß zugrunde, sondern ein vaskulogener Prozeß: Vaskulogenese beschreibt das Entstehen von Blutgefäßen de novo, ohne das Vorhandensein eines bestehenden Kapillarbettes.

Inzwischen wurde in einer Vielzahl weiterer maligner Tumoren „vasculogenic mimicry“ nachgewiesen. Hierzu zählen u.a. das kutane Melanom (95), (96), das inflammatorische und das duktales Mammakarzinom (97), das Ovarialkarzinom (98), Prostatakarzinom (99) und Phäochromozytom (100).

Weiter wird das Verständnis für die Angiogenese beim Aderhautmelanom dadurch verkompliziert, dass in Genanalysen von hochaggressiven Melanomzellen circa 210 Gene verändert exprimiert werden als bei Melanozyten. Melanomzellen gehen beim Switch von Klasse I in Klasse II in einen entdifferenzierten Status über und weisen teilweise Eigenschaften embryonaler Stammzellen auf. Unter anderem exprimieren sie VE-Cadherin, EphA2, CD31, CD38, VEGF und seine Rezeptoren VEGF-R-1, VEGF-R-2, vWF, TIE-1, MHC Klasse II, KIT und Desmin, also Proteine, die für Endothelzellen oder Fibroblasten typisch sind. Auch die Morphologie ändert sich dabei, ähnelt zunehmend Endothelzellen und „microvascular patterns“ treten auf. (101, 102)

VEGF und PEDF gelten derzeit als Schlüsselmoleküle in der Regulation der (Tumor-) Angiogenese. Postuliert wird eine Balance zwischen pro- und antiangiogenen Substanzen, während der die Angiogenese ruht. Während es bereits beim uvealen Melanom eine große Anzahl an Untersuchungen zur Rolle von VEGF und seinen Rezeptoren VEGF-R-1 und VEGF-R-2 gibt, sind bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Daten, welche die Rolle von PEDF bzw. seines/seiner Rezeptoren in der Pathogenese beim Aderhautmelanom untersuchen, veröffentlicht worden.

Wir hätten erwartet, dass im Zusammenspiel mit der Hochregulation proangiogenetischer Mediatoren wie VEGF die PEDF-Konzentration im Glaskörper abnimmt, um wie bei bereits untersuchten proliferativen Erkrankungen ein proangiogenetisches Milieu zu schaffen.

So war es überraschend, dass zunächst die Glaskörperkonzentration von PEDF in Augen mit Aderhautmelanomen (4,0 µg/ml) im Vergleich zu Kontrollen (2,5 µg/ml) deutlich erhöht war, jedoch statistisch nicht verschieden von der bei der Gruppe mit rhegmatogener Ablatio retinae. (4,6 µg/ml; $p > 0,05$) war. Drei Möglichkeiten der Interpretation sollen hier diskutiert werden.

1. Störungen der Blut-Retina-Schranke
2. Begleitablatio des Melanoms

3. Synthese durch Melanomzellen

Zu 1. In sehr geringen Konzentrationen ist Albumin in der Glaskörperflüssigkeit gesunder Augen nachweisbar. (85) Die Albuminkonzentrationen im Glaskörper bei malignen Aderhautmelanomen sind in dieser Arbeit siebenfach höher als in den beiden Kontrollgruppen, und sie sind höher in Aderhautmelanomproben mit höherem Vaskularisationsgrad. Da Albumin ausschliesslich in der Leber synthetisiert wird und mit einem Molekulargewicht von 68 kDa eine intakte Blut-Retina-Schranke nicht passieren kann, spricht das Vorliegen einer Albuminerhöhung in Glaskörper für eine Schrankenstörung, die durch die Tumorgefäße entsteht.

PEDF ist nicht nur im Auge und im zentralen Nervensystem zu finden, sondern bei gesunden Probanden auch in einer Konzentration von rund 5 µg/ml im Blut. (103) Bei Typ-1-Diabetikern mit proliferativer diabetischer Retinopathie ist die PEDF-Konzentration im Serum höher (10,4 µg/ml) als bei Typ-1-Diabetikern ohne proliferative diabetische Retinopathie (7,8 µg/ml). (104) Aus diesem Grund wurden Proben von Diabetikern aus dieser Untersuchung ausgeschlossen. Eine andere Arbeit demonstriert, daß bei der Colitis ulcerosa die PEDF-Konzentrationen in Serum höher als bei gesunden Probanden sind und mit der Krankheitsaktivität korrelieren. (105) Auch kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Adipositas, Hypertriglyzeridämie oder Insulinämie korrelieren mit den PEDF-Serumkonzentrationen. (106)

Es ist daher gut vorstellbar, dass ein gewisser Teil des gemessenen PEDF aus dem Serum stammt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Serumwerte jedoch nicht bestimmt, so daß dieser Anteil nicht abgeschätzt werden kann.

Zu 2. Bei allen in dieser Studie untersuchten Augen mit Aderhautmelanomen fand sich eine Begleitablätio, die typischerweise bei diesem Tumor auftritt. Die PEDF-Konzentration steigt von Makulaforamen, rhegmatogener Ablätio retinae zum malignen Aderhautmelanom stetig an. Der Unterschied der PEDF-Konzentrationen bei Makulaforamen und rhegmatogener Ablätio retinae ist bereits von Ogata et al. beschrieben worden. (107) Bei der rhegmatogenen Ablätio retinae liegt normalerweise ein Netzhautloch oder Netzhautriß vor. Durch diesen Netzhautdefekt kann verflüssigter Glaskörper zwischen die neurosensorische Netzhaut und das retinale Pigmentepithel gelangen und so zur Netzhautablösung führen. In der Interphotorezeptormatrix liegt eine zehnfach höhere PEDF-Konzentration als im Glaskörper vor. Nach Ogata et al.

gelangt freies PEDF aus der Interphotorezeptormatrix durch den Netzhautdefekt in den Glaskörperraum und führt so zu einer Erhöhung der PEDF-Konzentration im Glaskörper. (74)

Diese Interpretation ist jedoch kontrovers zu sehen, wenn man sich verdeutlicht, dass eine weitere Eigenschaft des PEDF in seiner neurotrophen und neuroprotektiven Wirkung liegt. An undifferenzierten Y79-Retinoblastomzellen führt die Zugabe von PEDF zu einer Differenzierung der Zellen mit der Ausbildung typischer Neuriten. (75) Jablonski et al. konnten im Tiermodell zeigen, daß die Entfernung des RPE von der neurosensorischen Retina (entsprechend einer Netzhautablösung) zu einer Photorezeptordegeneration und einer Abnahme der Opsinlevel in den Photorezeptoren führt. Die Zugabe von isoliertem PEDF verhindert diese Photorezeptordegeneration und normalisiert die Opsinlevel. (108) Cayouette et al. konnten in Mäusen, die eine Photorezeptoratrophy entwickeln und ein Tiermodell für die Retinitis pigmentosa darstellen, mit der intraokularen Injektion von PEDF die Photorezeptoratrophy deutlich verlangsamen bzw. in ihrem Ausmaß deutlich einschränken. (17)

Bei neurologischen degenerativen Erkrankungen wie der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) sind im Liquor die PEDF-Konzentrationen erhöht. Von den Autoren wird dieser Befund als eine möglicherweise reaktive Erhöhung der PEDF-Konzentration des Organismus auf die Schädigung der Motoneurone gedeutet. (34) Eine aktuelle Arbeit zeigt, daß Patienten mit M. Alzheimer, der mit einer Degeneration von zerebralen Neuronen einhergeht, ebenfalls erhöhte Liquorkonzentrationen an PEDF aufweisen. (109) Die Mechanismen, die im zentralen Nervensystem zu der PEDF-Zunahme führen, sind jedoch noch nicht verstanden.

Histologisch läßt sich auch an humanen Augen mit rhegmatogener Netzhautablösung eine Photorezeptoratrophy zeigen. Auch an unseren histologischen Schnitten von Aderhautmelanomen zeigt sich teilweise eine Photorezeptoratrophy. Bisher ist unklar, ob und wie die Wechselwirkungen zwischen Photorezeptoren und den in direktem Kontakt stehenden RPE-Zellen die Sekretion und Expression von PEDF regulieren.

Prinzipiell wäre aber denkbar, daß der Verlust des Kontaktes der Photorezeptoren und der RPE-Zellen zueinander bei einer Begleitablösung zu einer Zunahme der PEDF-Freisetzung aus RPE-Zellen führt, oder aber dass Netzhautzellen (Photorezeptoren und Gliazellen) Mediatoren ausschütten, die die PEDF-Sekretion anregen und damit das

Überleben retinaler Zellen verlängern. Damit könnten auch diese Zelltypen einen Beitrag zu der beobachteten Konzentrationserhöhung im Glaskörper leisten. Zusammenfassend läßt sich vermuten, daß die PEDF-Zunahme auch bei der Netzhautablösung einen reaktiven Schutzmechanismus für die Photorezeptoren darstellt, und zwar unabhängig vom Pathomechanismus der Netzhautablösung (rhegmatogene Netzhautablösung oder Begleitablösung beim uvealen Melanom). Es wäre sicherlich interessant zu wissen, wie sich im zeitlichen Verlauf der Netzhautablösung die PEDF-Konzentrationen im Glaskörper verhalten. Es besteht kein Zusammenhang zwischen der Fläche der Netzhautablösung und der PEDF-Konzentration (Daten nicht gezeigt). Über die Dauer der Ablatio retinae können klinisch keine genauen Angaben gemacht werden, da die Patienten den Beginn der Erkrankung oft nicht bemerken. Klinisch interessant wäre auch, ob durch eine peri- oder intraoperative Gabe von PEDF in den Glaskörperraum während der Ablatiochirurgie ein besseres funktionelles Ergebnis erreicht werden kann.

Zu 3. An sechzehn enukleierten Augen wurden histologische Schnitte des Tumors angefertigt, und mit monoklonalen Anti-PEDF-Antikörpern gefärbt. Die Tumorzellen zeigten insgesamt sehr ähnliche Färbemuster, meist war das Zytoplasma nur schwach gefärbt, an drei Schnitten konnten Zellen mit deutlicher zytoplasmatischer Anfärbung gesehen werden. An einigen Tumoren fand sich eine clusterartige Ansammlung von etwas stärker positiv gefärbten Tumorzellen, scharf abgegrenzt zu schwach oder negativ gefärbten Arealen, die „extravascular matrix patterns“ entsprechen. Diese Färbungen traten nach Inkubation mit Kompetitionslösungen nicht auf, so daß die Färbungen wahrscheinlich spezifisch für PEDF sind.

Immunhistologische Färbungen und erhöhte Glaskörperkonzentrationen erlauben noch keinen Rückschluss auf den Ort der PEDF-Synthese: Die Frage, ob Melanomzellen selbst PEDF synthetisieren und sezernieren, bleibt offen. In-situ-Hybridisierungen könnten eventuell vorhandene mRNA sichtbar machen und nachweisen, ob die Melanomzellen in der Lage sind, PEDF zu synthetisieren. Denkbar wäre theoretisch aber auch hier ein PEDF-up-take in die Melanomzellen wie bereits weiter oben beschrieben. (110)

PEDF und klinische Parameter

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Tumorprominenz auch die PEDF-Konzentration ansteigt. Die basale Tumorausdehnung hingegen hatte keinen Einfluss auf die PEDF-Konzentration. Das Patientenalter hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die PEDF-Konzentration oder die Anzahl positiver Zellen in der Immunhistologie. Der Grad der Pigmentierung, der Anteil nekrotischer Areale und der Zelltyp (epitheloid, spindelzellig, gemischt) zeigte ebenfalls keinen Zusammenhang mit der PEDF-Konzentration im Glaskörper.

Bei höherem Vaskularisationsgrad war die PEDF-Konzentration im Glaskörper jedoch höher als bei geringerem Vaskularisationsgrad. Hier ist die Interpretation schwierig: Da PEDF im Serum vorliegt, kann PEDF aus dem Blutkreislauf eingeschwemmt worden sein. Andererseits könnte aber auch die lokale Produktion von PEDF den Grad der Vaskularisierung des Tumors mitbestimmen.

Sowohl der Ursprung der PEDF-Erhöhung als auch die Funktion beim Aderhautmelanom bleiben offen. Bei verschiedenen malignen Erkrankungen wie Prostatakarzinomen (49) oder bei Lebermetastasen (11) korreliert die PEDF-Expression des Tumors mit der Prognose: Je geringer die Expression, um so höher ist die Metastasierungsrate und um so schlechter die Prognose. (111) Erklärt wird dieser Effekt damit, dass die Tumorangio-genese, an der auch proliferierende Endothelzellen beteiligt sind, durch PEDF gehemmt wird. Die Interpretation wird aber schwieriger dadurch, dass insbesondere beim Aderhautmelanom durch Folberg et al. gezeigt wurde, dass die Vaskularisierung des Tumorgewebes nicht nur durch Tumorangio-genese, sondern auch durch „vasculogenic mimicry“ erfolgt. Uveale Melanomzellen, aber auch einige andere wie kutane Melanomzelllinien, sind in der Lage, ein Gefäßsystem mit PAS-positiver Basalmembran auszubilden, das keine Endothelzellen enthält, aber Kontakt zum Gefäßsystem hat. (29, 112) Noch ist völlig ungeklärt, ob und wie PEDF an der „vasculogenic mimicry“ beteiligt sein könnte. Anastassiou et al. publizierten 2001, daß durch immunologische Färbungen in Aderhautmelanomen Fas/FasL nachgewiesen werden konnte. Melanome mit einer fehlenden oder verminderten FasL-Expression wiesen eine deutlich schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate auf und zeigten eine deutliche Tendenz zur skleralen Invasion. (113) Da bereits beschrieben worden ist, dass uveale Melanomzellen teilweise

endotheliale Eigenschaften aufweisen und daß PEDF einen Teil seiner antiapoptotischen Wirkungen via Fas/FasL-System vermittelt, sollten weitere Untersuchungen zeigen, ob PEDF an uvealen Zellen über diesen Mechanismus wirkt.

Weiterhin sehen wir nur eine schwache negative Korrelation zwischen PEDF und seinem bisher stärksten Gegenspieler, dem VEGF, die keine Signifikanz aufweist. Während man bei anderen okulären Erkrankungen eine gegenläufige Tendenz klar erkennen kann, ist dies bei den Aderhautmelanomen in diesem Kollektiv nicht so. Auch hier kann wieder diskutiert werden, ob bei dieser Erkrankung eher die antiangiogenen oder eher die neuroprotektiven und antitumorösen Wirkungen in Vordergrund stehen.

Bei der Interpretation aller Ergebnisse ist anzumerken, dass nur Proben von weit fortgeschrittenen, das heißt sehr grossen Aderhautmelanomen vorliegen. Von kleineren Melanomen ist es schwierig, Probenmaterial zu gewinnen, da Biopsien wegen der Verschleppungsgefahr technisch anspruchsvoll sind und die Diagnose anhand rein klinischer Befunde wie ophthalmoskopischer Aspekt und Sonografie sicher gestellt werden kann. Insofern haben wir keine Daten, wie sich PEDF und VEGF bei kleineren Tumoren, die auch eine bessere Prognose haben, verhalten.

PEDF und VEGF vor und nach Protonenbestrahlung

Teil dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob sich durch eine Protonenbestrahlung die PEDF- und VEGF-Konzentrationen im Glaskörper verändern. Es wurden Glaskörperproben von Patienten mit Endoresektionen, denen eine Protonenbestrahlung vorausgegangen war, mit denen von transskleralen Tumorexzisionen verglichen, die im Anschluss an die Tumorexzision mit einer Rutheniumapplikatoraufnähung behandelt wurden.

Der Standard in der Therapie von Aderhautmelanomen besteht in der Bestrahlung mittels Rutheniumapplikatorbrachytherapie oder der Protonentherapie, anhängig von der Lokalisation des Tumors. Mit steigender Tumorgrosse nimmt die Wahrscheinlichkeit für schwer zu beherrschende radiogene Komplikationen (Strahlenretinopathie, Strahlenoptikopathie, Neovaskularisationsglaukom) mit den Folgen größerer Tumornekrosen zu. Seit den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts entfernte man deshalb große Tumoren via transskleraler Resektion und bestrahlte danach mittels Rutheniumapplikator. Dieses Vorgehen eignet sich gut für anterior gelegene Tumoren,

mit zunehmender posteriorer Lage des Tumors steigt jedoch die Komplikationsrate. Deshalb wurde für posterior gelegene Tumore die Entfernung des Tumors via Pars plana Vitrektomie eingeführt. Um eine transretinale Verschleppung von vitalen Tumorzellen zu vermeiden, wird circa 10 Tage vor der Endoresektion eine Protonenbestrahlung durchgeführt. (114) Die Protonenbestrahlung führt zur Apoptose von Tumorzellen. Di Pietro et al. zeigten in Zellkulturen von Melanomzellen, Knochenmetastasen, Prostatakarzinomen, Mammakarzinom und Schilddrüsenkarzinomen, dass eine Protonenbestrahlung zu einer vermehrten Apoptose durch Hochregulation von Proteinen der bcl-2-Familie führt. (115, 116) Die Protonenbestrahlung erlaubt eine genaue Applikation der Strahlendosis unter Schonung der umliegenden Strukturen wie Netzhaut, Fovea und Sehnerv, da die Energie der Protonen genau im „Bragg peak“ abgegeben wird. (117)

Wir konnten in dieser Arbeit keinen Unterschied bezüglich der PEDF- bzw. VEGF-Konzentrationen im Glaskörper zwischen der mit Protonen vorbestrahlten Gruppe (Endoresektionen) und der nicht bestrahlten Gruppe (transklerale Tumorexzisionen) nachweisen. Beide Zytokine zeigen innerhalb der ersten 10 Tage nach der Bestrahlung keine Konzentrationsänderung im Glaskörper. Für PEDF mag es mehrere Gründe geben: Anhand der bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit ist es unwahrscheinlich, dass Aderhautmelanome selbst grosse Mengen an PEDF produzieren; eher ist anzunehmen, daß PEDF aus dem Blutkreislauf durch eine defekte Blut-Retina-Schranke eingeschwemmt wird oder von anderen Geweben am Auge wie dem retinalen Pigmentepithel gebildet wird. Weiterhin bietet der Glaskörper mit seinen Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen reichlich Bindungsstellen für PEDF und übernimmt damit eine Art Speicherfunktion. (36, 37)

Auch für VEGF ist bekannt, dass es nicht nur im Tumor, sondern auch in der Netzhaut gebildet wird, die auch nach der Protonenbestrahlung weiterhin VEGF produziert. Anhand der vorliegenden Daten ist ebenfalls schwierig abzuschätzen, wie sich die Konzentrationen längerfristig verändern.

5. Zusammenfassung

Das Aderhautmelanom ist der häufigste maligne intraokulare Tumor. Bisher ist die Tumorangio-genese bei Aderhautmelanom noch nicht vollständig geklärt. Es gibt bis dato keine Untersuchungen, welche Rolle PEDF als stärkstes antiangiogenes Zytokin dabei spielt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß in der Glaskörperflüssigkeit von Augen mit Aderhautmelanomen die PEDF-Konzentration deutlich höher als in Proben von Augen mit Makulaforamina ist. Deutlich erhöht zeigte sich die PEDF-Konzentration jedoch auch in Augen mit rhegmatogener Netzhautablösung.

In den immunhistologischen Untersuchungen zeigte sich an einem Präparat einzelne stark positiv gefärbte Zellen, die anderen Präparate zeigten schwächere positive Färbungen.

Die Ursache für die PEDF-Erhöhung im Glaskörper kann auf mehreren Ursachen beruhen: 1. der Produktion durch den Tumor selbst, 2. der Reaktion der Netzhaut und des retinalen Pigmentepithels auf die Begleitablätio beim Aderhautmelanom und 3. der Einschwemmung aus dem systemischen Kreislauf durch die defekte Blut-Retina-Schranke der Tumorgefäße.

Anders als bei anderen okulären Erkrankungen, bei denen die Angiogenese eine Rolle spielt, kommt es nicht zu einer relativen PEDF-Abnahme im Vergleich zu VEGF.

Die PEDF-Konzentrationen im Glaskörper korrelieren positiv mit der Tumorgroße und dem Vaskularisationsgrad, nicht aber mit anderen bekannten prognostischen Parametern wie dem Alter, dem Geschlecht, dem Pigmentationsgrad, dem Nekrosegrad oder dem Zelltyp.

Weitere experimentelle Studien sollten sich mit der Interaktion von Fas/FasL und PEDF an Melanomzellen beschäftigen. Weiterhin bleibt durch den Nachweis von RNA zu klären, ob Melanomzellen PEDF produzieren können oder ob Melanomzellen PEDF-Rezeptoren aufweisen. Klinische Untersuchungen können versuchen, einen Zusammenhang zwischen Metastasierung und PEDF herzustellen.

6. Literaturnachweis

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-6.
2. Folkman J. Tumor angiogenesis: role in regulation of tumor growth. *Symp Soc Dev Biol* 1974;30(0):43-52.
3. Gullino PM. Angiogenesis and oncogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1978;61(3):639-43.
4. Senger DR, Van de Water L, Brown LF, et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 1993;12(3-4):303-24.
5. McCormack PL, Keam SJ. Bevacizumab: a review of its use in metastatic colorectal cancer. *Drugs* 2008;68(4):487-506.
6. Socinski MA. Bevacizumab as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer. *Drugs Today (Barc)* 2008;44(4):293-301.
7. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285(5425):245-8.
8. Fernandez-Garcia NI, Volpert OV, Jimenez B. Pigment epithelium-derived factor as a multifunctional antitumor factor. *J Mol Med* 2007;85(1):15-22.
9. Cai J, Parr C, Watkins G, et al. Decreased pigment epithelium-derived factor expression in human breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 2006;12(11 Pt 1):3510-7.
10. Dass CR, Contreras KG, Dunstan DE, et al. Chitosan microparticles encapsulating PEDF plasmid demonstrate efficacy in an orthotopic metastatic model of osteosarcoma. *Biomaterials* 2007;28(19):3026-33.
11. Uehara H, Miyamoto M, Kato K, et al. Expression of pigment epithelium-derived factor decreases liver metastasis and correlates with favorable prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2004;64(10):3533-7.

12. Guan M, Jiang H, Xu C, et al. Adenovirus-mediated PEDF expression inhibits prostate cancer cell growth and results in augmented expression of PAI-2. *Cancer Biol Ther* 2007;6(3):419-25.
13. Folberg R, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry. *Apmis* 2004;112(7-8):508-25.
14. Boyd SR, Tan DS, de Souza L, et al. Uveal melanomas express vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor and support endothelial cell growth. *Br J Ophthalmol* 2002;86(4):440-7.
15. Spranger J, Osterhoff M, Reimann M, et al. Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes* 2001;50(12):2641-5.
16. Holekamp NM, Bouck N, Volpert O. Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2002;134(2):220-7.
17. Cayouette M, Smith SB, Becerra SP, et al. Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations. *Neurobiol Dis* 1999;6(6):523-32.
18. Ogata N, Matsuoka M, Imaizumi M, et al. Decreased levels of pigment epithelium-derived factor in eyes with neuroretinal dystrophic diseases. *Am J Ophthalmol* 2004;137(6):1129-30.
19. Egan KM, Seddon JM, Glynn RJ, et al. Epidemiologic aspects of uveal melanoma. *Surv Ophthalmol* 1988;32(4):239-51.
20. Bergman L, Seregard S, Nilsson B, et al. Uveal melanoma survival in Sweden from 1960 to 1998. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(8):3282-7.
21. Jensen OA. Malignant melanomas of the human uvea: 25-year follow-up of cases in Denmark, 1943--1952. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1982;60(2):161-82.
22. Kujala E, Makitie T, Kivela T. Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(11):4651-9.

23. Boyd SR, Zachary I, Chakravarthy U, et al. Correlation of increased vascular endothelial growth factor with neovascularization and permeability in ischemic central vein occlusion. *Arch Ophthalmol* 2002;120(12):1644-50.
24. Das A, McGuire PG. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(6):721-48.
25. Semenza GL, Agani F, Feldser D, et al. Hypoxia, HIF-1, and the pathophysiology of common human diseases. *Adv Exp Med Biol* 2000;475:123-30.
26. Ogata N, Ando A, Uyama M, et al. Expression of cytokines and transcription factors in photocoagulated human retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239(2):87-95.
27. Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* 2000;59(1):47-53.
28. Werdich XQ, McCollum GW, Rajaratnam VS, et al. Variable oxygen and retinal VEGF levels: correlation with incidence and severity of pathology in a rat model of oxygen-induced retinopathy. *Exp Eye Res* 2004;79(5):623-30.
29. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155(3):739-52.
30. Ek ET, Dass CR, Choong PF. Pigment epithelium-derived factor: a multimodal tumor inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2006;5(7):1641-6.
31. Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez IR, et al. Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol Vis* 1996;2:11.
32. Karakousis PC, John SK, Behling KC, et al. Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol Vis* 2001;7:154-63.
33. Bilak MM, Corse AM, Bilak SR, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58(7):719-28.

34. Kuncel RW, Bilak MM, Bilak SR, et al. Pigment epithelium-derived factor is elevated in CSF of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2002;81(1):178-84.
35. Sawant S, Aparicio S, Tink AR, et al. Regulation of factors controlling angiogenesis in liver development: a role for PEDF in the formation and maintenance of normal vasculature. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325(2):408-13.
36. Meyer C, Notari L, Becerra SP. Mapping the type I collagen-binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity. *J Biol Chem* 2002;277(47):45400-7.
37. Alberdi E, Hyde CC, Becerra SP. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to glycosaminoglycans: analysis of the binding site. *Biochemistry* 1998;37(30):10643-52.
38. Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* 2002;8(4):349-57.
39. Araki T, Taniwaki T, Becerra SP, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) differentially protects immature but not mature cerebellar granule cells against apoptotic cell death. *J Neurosci Res* 1998;53(1):7-15.
40. Houenou LJ, D'Costa AP, Li L, et al. Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons. *J Comp Neurol* 1999;412(3):506-14.
41. Sugita Y, Becerra SP, Chader GJ, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) has direct effects on the metabolism and proliferation of microglia and indirect effects on astrocytes. *J Neurosci Res* 1997;49(6):710-8.
42. Taniwaki T, Becerra SP, Chader GJ, et al. Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture. *J Neurochem* 1995;64(6):2509-17.
43. Notari L, Baladron V, Aroca-Aguilar JD, et al. Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* 2006;281(49):38022-37.

44. Cai J, Jiang WG, Grant MB, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Biol Chem* 2006;281(6):3604-13.
45. Takenaka K, Yamagishi S, Jinnouchi Y, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF)-induced apoptosis and inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in MG63 human osteosarcoma cells. *Life Sci* 2005;77(25):3231-41.
46. Duh EJ, Yang HS, Suzuma I, et al. Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(3):821-9.
47. Gao G, Li Y, Fant J, et al. Difference in ischemic regulation of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium--derived factor in brown norway and sprague dawley rats contributing to different susceptibilities to retinal neovascularization. *Diabetes* 2002;51(4):1218-25.
48. Gao G, Li Y, Zhang D, et al. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS Lett* 2001;489(2-3):270-6.
49. Filleur S, Volz K, Nelius T, et al. Two functional epitopes of pigment epithelial-derived factor block angiogenesis and induce differentiation in prostate cancer. *Cancer Res* 2005;65(12):5144-52.
50. Hase R, Miyamoto M, Uehara H, et al. Pigment epithelium-derived factor gene therapy inhibits human pancreatic cancer in mice. *Clin Cancer Res* 2005;11(24 Pt 1):8737-44.
51. Guan M, Pang CP, Yam HF, et al. Inhibition of glioma invasion by overexpression of pigment epithelium-derived factor. *Cancer Gene Ther* 2004;11(5):325-32.
52. Sidle DM, Maddalozzo J, Meier JD, et al. Altered pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor levels in lymphangioma pathogenesis and clinical recurrence. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;131(11):990-5.
53. Zhang L, Chen J, Ke Y, et al. Expression of pigment epithelial derived factor is reduced in non-small cell lung cancer and is linked to clinical outcome. *Int J Mol Med* 2006;17(5):937-44.

54. Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, et al. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 1995;113(12):1538-44.
55. Hata Y, Nakagawa K, Ishibashi T, et al. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal glial cells promotes in vitro angiogenesis. *Virchows Arch* 1995;426(5):479-86.
56. Sueishi K, Hata Y, Murata T, et al. Endothelial and glial cell interaction in diabetic retinopathy via the function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Pol J Pharmacol* 1996;48(3):307-16.
57. Ng IO, Poon RT, Lee JM, et al. Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2001;116(6):838-45.
58. Missotten GS, Notting IC, Schlingemann RO, et al. Vascular endothelial growth factor a in eyes with uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 2006;124(10):1428-34.
59. Boyd SR, Tan D, Bunce C, et al. Vascular endothelial growth factor is elevated in ocular fluids of eyes harbouring uveal melanoma: identification of a potential therapeutic window. *Br J Ophthalmol* 2002;86(4):448-52.
60. Sheidow TG, Hooper PL, Crukley C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in uveal melanoma and its correlation with metastasis. *Br J Ophthalmol* 2000;84(7):750-6.
61. la Cour M, Friis J. Macular holes: classification, epidemiology, natural history and treatment. *Acta Ophthalmol Scand* 2002;80(6):579-87.
62. Gass JD. Idiopathic senile macular hole. Its early stages and pathogenesis. *Arch Ophthalmol* 1988;106(5):629-39.
63. Gass JD. Reappraisal of biomicroscopic classification of stages of development of a macular hole. *Am J Ophthalmol* 1995;119(6):752-9.
64. Cheng L, Freeman WR, Ozerdem U, et al. Prevalence, correlates, and natural history of epiretinal membranes surrounding idiopathic macular holes. Virectomy for Macular Hole Study Group. *Ophthalmology* 2000;107(5):853-9.

65. Nakazawa T, Matsubara A, Noda K, et al. Characterization of cytokine responses to retinal detachment in rats. *Mol Vis* 2006;12:867-78.
66. El-Ghrably IA, Dua HS, Orr GM, et al. Detection of cytokine mRNA production in infiltrating cells in proliferative vitreoretinopathy using reverse transcription polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* 1999;83(11):1296-9.
67. Limb GA, Daniels JT, Pleass R, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 by glial Muller cells: response to soluble and extracellular matrix-bound tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol* 2002;160(5):1847-55.
68. Kon CH, Occeleston NL, Aylward GW, et al. Expression of vitreous cytokines in proliferative vitreoretinopathy: a prospective study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(3):705-12.
69. Abu el-Asrar AM, Van Damme J, Put W, et al. Monocyte chemotactic protein-1 in proliferative vitreoretinal disorders. *Am J Ophthalmol* 1997;123(5):599-606.
70. Mitamura Y, Takeuchi S, Yamamoto S, et al. Monocyte chemotactic protein-1 levels in the vitreous of patients with proliferative vitreoretinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 2002;46(2):218-21.
71. La Heij EC, van de Waarenburg MP, Blaauwgeers HG, et al. Basic fibroblast growth factor, glutamine synthetase, and interleukin-6 in vitreous fluid from eyes with retinal detachment complicated by proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 2002;134(3):367-75.
72. Cassidy L, Barry P, Shaw C, et al. Platelet derived growth factor and fibroblast growth factor basic levels in the vitreous of patients with vitreoretinal disorders. *Br J Ophthalmol* 1998;82(2):181-5.
73. La Heij EC, Van De Waarenburg MP, Blaauwgeers HG, et al. Levels of basic fibroblast growth factor, glutamine synthetase, and interleukin-6 in subretinal fluid from patients with retinal detachment. *Am J Ophthalmol* 2001;132(4):544-50.
74. Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, et al. Inverse levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in the vitreous of eyes with rhegmatogenous retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 2002;133(6):851-2.

75. Tombran-Tink J, Johnson LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30(8):1700-7.
76. Tombran-Tink J, Shivaram SM, Chader GJ, et al. Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J Neurosci* 1995;15(7 Pt 1):4992-5003.
77. Wu YQ, Notario V, Chader GJ, et al. Identification of pigment epithelium-derived factor in the interphotoreceptor matrix of bovine eyes. *Protein Expr Purif* 1995;6(4):447-56.
78. Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, et al. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2002;134(3):348-53.
79. Boehm BO, Lang G, Volpert O, et al. Low content of the natural ocular anti-angiogenic agent pigment epithelium-derived factor (PEDF) in aqueous humor predicts progression of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2003;46(3):394-400.
80. Schmidt-Erfurth U, Schlotzer-Schrehard U, Cursiefen C, et al. Influence of photodynamic therapy on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor 3, and pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(10):4473-80.
81. Perez-Mediavilla LA, Chew C, Campochiaro PA, et al. Sequence and expression analysis of bovine pigment epithelium-derived factor. *Biochim Biophys Acta* 1998;1398(2):203-14.
82. Ogata N, Wada M, Otsuji T, et al. Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(4):1168-75.
83. Alberdi E, Aymerich MS, Becerra SP. Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. *J Biol Chem* 1999;274(44):31605-12.
84. Bishop PN. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Prog Retin Eye Res* 2000;19(3):323-44.

85. Yamane K, Minamoto A, Yamashita H, et al. Proteome Analysis of Human Vitreous Proteins. *Mol Cell Proteomics* 2003;2(11):1177-87.
86. Boehm BO, Lang G, Feldmann B, et al. Proliferative diabetic retinopathy is associated with a low level of the natural ocular anti-angiogenic agent pigment epithelium-derived factor (PEDF) in aqueous humor. a pilot study. *Horm Metab Res* 2003;35(6):382-6.
87. Eichler W, Yafai Y, Keller T, et al. PEDF derived from glial Muller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis. *Exp Cell Res* 2004;299(1):68-78.
88. Tombran-Tink J, Lara N, Apricio SE, et al. Retinoic acid and dexamethasone regulate the expression of PEDF in retinal and endothelial cells. *Exp Eye Res* 2004;78(5):945-55.
89. Coupland SE, Anastassiou G, Stang A, et al. The prognostic value of cyclin D1, p53, and MDM2 protein expression in uveal melanoma. *J Pathol* 2000;191(2):120-6.
90. Coupland SE, Bechrakis N, Schuler A, et al. Expression patterns of cyclin D1 and related proteins regulating G1-S phase transition in uveal melanoma and retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 1998;82(8):961-70.
91. Ehlers JP, Harbour JW. Molecular pathobiology of uveal melanoma. *Int Ophthalmol Clin* 2006;46(1):167-80.
92. Tschentscher F, Husing J, Holter T, et al. Tumor classification based on gene expression profiling shows that uveal melanomas with and without monosomy 3 represent two distinct entities. *Cancer Res* 2003;63(10):2578-84.
93. Rummelt V, Mehaffey MG, Campbell RJ, et al. Microcirculation architecture of metastases from primary ciliary body and choroidal melanomas. *Am J Ophthalmol* 1998;126(2):303-5.
94. Chen X, Maniotis AJ, Majumdar D, et al. Uveal melanoma cell staining for CD34 and assessment of tumor vascularity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(8):2533-9.
95. Thies A, Mangold U, Moll I, et al. PAS-positive loops and networks as a prognostic indicator in cutaneous malignant melanoma. *J Pathol* 2001;195(5):537-42.

96. Warso MA, Maniotis AJ, Chen X, et al. Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in primary cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 2001;7(3):473-7.
97. Shirakawa K, Kobayashi H, Sobajima J, et al. Inflammatory breast cancer: vasculogenic mimicry and its hemodynamics of an inflammatory breast cancer xenograft model. *Breast Cancer Res* 2003;5(3):136-9.
98. Sood AK, Seftor EA, Fletcher MS, et al. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol* 2001;158(4):1279-88.
99. Sharma N, Seftor RE, Seftor EA, et al. Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: role in vasculogenic mimicry. *Prostate* 2002;50(3):189-201.
100. Favier J, Plouin PF, Corvol P, et al. Angiogenesis and vascular architecture in pheochromocytomas: distinctive traits in malignant tumors. *Am J Pathol* 2002;161(4):1235-46.
101. Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, et al. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res* 2004;64(20):7205-9.
102. Onken MD, Ehlers JP, Worley LA, et al. Functional gene expression analysis uncovers phenotypic switch in aggressive uveal melanomas. *Cancer Res* 2006;66(9):4602-9.
103. Petersen SV, Valnickova Z, Enghild JJ. Pigment-epithelium-derived factor (PEDF) occurs at a physiologically relevant concentration in human blood: purification and characterization. *Biochem J* 2003;374(Pt 1):199-206.
104. Katakami N, Kaneto H, Yamasaki Y, et al. Increased serum pigment epithelium-derived factor levels in type 1 diabetic patients with diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;81(1):e4-7.
105. Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Parfieniuk A, et al. Pigment epithelium-derived factor in ulcerative colitis: possible relationship with disease activity. *Regul Pept* 2007;140(1-2):1-4.

106. Nakamura K, Yamagishi SI, Adachi H, et al. Serum levels of pigment epithelium-derived factor (PEDF) are positively associated with visceral adiposity in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2008.
107. Ogata N, Tombran-Tink J, Nishikawa M, et al. Pigment epithelium-derived factor in the vitreous is low in diabetic retinopathy and high in rhegmatogenous retinal detachment. *Am J Ophthalmol* 2001;132(3):378-82.
108. Jablonski MM, Tombran-Tink J, Mrazek DA, et al. Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. *J Neurosci* 2000;20(19):7149-57.
109. Yamagishi S, Inagaki Y, Takeuchi M, et al. Is pigment epithelium-derived factor level in cerebrospinal fluid a promising biomarker for early diagnosis of Alzheimer's disease? *Med Hypotheses* 2004;63(1):115-7.
110. Bilak MM, Becerra SP, Vincent AM, et al. Identification of the neuroprotective molecular region of pigment epithelium-derived factor and its binding sites on motor neurons. *J Neurosci* 2002;22(21):9378-86.
111. Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, et al. Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* 2003;9(6):774-80.
112. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000;156(2):361-81.
113. Anastassiou G, Coupland SE, Stang A, et al. Expression of Fas and Fas ligand in uveal melanoma: biological implication and prognostic value. *J Pathol* 2001;194(4):466-72.
114. Bechrakis NE, Hocht S, Martus P, et al. [Endoresection following proton beam irradiation of large uveal melanomas]. *Ophthalmologe* 2004;101(4):370-6.
115. Di Pietro C, Piro S, Tabbi G, et al. Cellular and molecular effects of protons: apoptosis induction and potential implications for cancer therapy. *Apoptosis* 2006;11(1):57-66.

116. Petrovic I, Ristic-Fira A, Todorovic D, et al. Radiobiological analysis of human melanoma cells on the 62 MeV CATANA proton beam. *Int J Radiat Biol* 2006;82(4):251-65.
117. Courdi A, Caujolle JP, Grange JD, et al. Results of proton therapy of uveal melanomas treated in Nice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45(1):5-11.

7. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8. Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Bechrakis, der dieses Thema vorgeschlagen hat.

Meinem Betreuer in allen klinischen Fragen, Herrn Dr. med. H. Heimann, möchte ich von ganzem Herzen danken: Er führte mich eigentlich an ein ganz anderes Thema heran und begleitete – trotz ungeplanter Entwicklungen – diese Arbeit mit viel Engagement.

Prof. Dr. med. Foerster und die Oberärzte der Augenklinik am CBF haben die Glaskörperproben zur Verfügung gestellt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Spranger und Prof. Dr. med. Pfeiffer, die die Umsetzung des experimentellen Teils dieser Arbeit in den Laboren der KLE in Potsdam-Rehbrücke ermöglicht haben.

Viele Menschen haben mit großen und kleinen Hilfen bei der praktischen Umsetzung geholfen: Isabel Göhring, Andrea Stempel, Madlen Freudenberg, Dr. Martin Osterhoff, Katrin Sprengel, Dr. Frank Isken, Karin Oberländer, Sibylle Thormann, Dr. Pawel Namsollek, Dr. Matthias Möhlig, Beate Jahn.

Ansporn auf den letzten Metern: Özzi, Sibylle, Rita. Und vor allem Peter.

Erklärung

„Ich, Katja Höhne, erkläre, daß ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Pigment epithelium-derived factor in Augen von Aderhautmelanompatienten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 15.11.2008

Katja Höhne