

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Mannheim

(Direktor: Prof. Dr. med. Sergij Goerdts)

# **Analyse der Angiogenese bei primär kutanen B-Zell-Lymphomen**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der  
Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität  
zu Heidelberg

vorgelegt von  
Christine Stumpf  
aus  
Mosbach  
2019

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Moritz Felcht

## Inhalt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	1
1. EINLEITUNG.....	4
<b>1.1 Primär kutanes B-Zell-Lymphom (PCBCL)</b> .....	4
<b>1.2 Stufen der Klassifikation und Einteilung der Subtypen</b> .....	4
1.2.1 Primär kutanes folliculäres B-Zell-Lymphom.....	7
1.2.2 Primär kutanes Marginalzonen B-Zell-Lymphom .....	7
1.2.3 Primär kutanes diffus großzelliges B-Zell-Lymphom vom Beintyp (PCLBCL, LT).....	8
<b>1.3 Überblick zur aktuellen Therapie</b> .....	10
1.3.1 Therapie der indolenten PCBCL .....	10
1.3.2 Therapie des PCLBCL, LT .....	11
<b>1.4 Angiogenese</b> .....	12
1.4.1 Wichtige Faktoren und Prinzipien während der Angiogenese .....	15
1.4.2 Das Tip-Stalk-Phalanx-Zellmodell.....	17
1.4.3 Angiopoietin-2 .....	20
1.4.4 Integrine .....	24
1.4.5 Angiogenese beim PCBCL .....	27
2. MATERIAL UND METHODEN .....	28
<b>2.1 Material</b> .....	28
2.1.1 Biochemikalien.....	28
2.1.2 Antikörper.....	29
2.1.3 Patienten .....	30
<b>2.2 Methoden</b> .....	31
2.2.1 Immunhistochemische dreifach Färbung von Integrin-CD34-Tie2 .	31
2.2.2 Angiopoietin-1-/-2-/-Tie2-ELISA .....	33

3.	ERGEBNISSE.....	36
3.1	Angiopoietin-2 ist im Serum von PCLBCL, LT Patienten erhöht .....	36
3.2	Im Serum von PCBCL Patienten lassen sich niedrige Ang-1 Werte nachweisen .....	37
3.3	PCBCL enthalten Tie2 <sup>low</sup> EC .....	39
3.4	Das Endothel von PCLBCL zeigte starke Expression der drei angiogenen Integrine, $\alpha v\beta 3$ , $\alpha v\beta 5$ und $\alpha 5\beta 1$ .....	39
3.5	FAK Aktivität.....	44
4.	DISKUSSION.....	45
5.	ZUSAMMENFASSUNG .....	54
6.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	56
7.	TABELLENVERZEICHNIS.....	57
8.	LITERATURVERZEICHNIS UND EIGENE PUBLIKATION.....	58
8.1	Literaturverzeichnis .....	58
8.2	Eigene Publikation.....	76
9.	LEBENS LAUF.....	77
10.	DANKSAGUNG.....	79

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2C5	Anti-Osteopontin-Antikörper
Ang-1/-2	Angiopoetin-1/2
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-6	B-cell lymphoma 6
BSA	engl.: bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
CDH	engl.: cadherin 5, type 2 (vascular endothelium) gene
CTCL	engl.: Cutaneous T Cell Lymphoma
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DII4	engl.: Delta-like ligand 4
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
EC	Endothelzelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EORTC	Engl.: European Organisation for Research and Treatment of Cancer
Eph4	Ephrinrezeptor 4
Ephrin-B2	Ephrinligand 2
ESM1	engl.: endothelial cell-specific molecule 1
EZM	Extrazellulärmatix
FAK	engl.: fokal adhesion kinase
FERM	engl.: band four-point-one ezrin radixin moesin homology domains
Flt4	engl.: fms-related tyrosine kinase 4
FOX-P1	Forkhead box protein P1
Hes	engl.: Hairy/enhancer of split
Hey	engl.: Hairy/enhancer of split related with YRPW motif
HIF	Hypoxieinduzierter Faktor
INC	engl.: incorporated
IRF4	Interferon regulatory factor 4 gene
KCl	Kaliumchlorid
Kdr	engl.: kinase insert domain receptorprovided
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat

M.O.M.	engl.: Mouse on Mouse
MIDAS	engl.: metal-ion-dependent adhesion site
mRNA	engl.: messenger RNA
MUM1	Multiple myeloma antigen 1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NCT01430013	Nationales Centrum für Tumorerkrankungen Heidelberg - Studiennummer der klinischen Studie
Nrarp	engl.: Notch-regulated ankyrin repeat protein
p21	Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen, Kontrolle des Zellzyklus
p53	Tumorsuppressor, „Wächter des Genoms“
PAX	engl.: paired box
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PCBCL	Primär kutanes B-Zell-Lymphom
PCFCL	Primär kutanes follikuläres B-Zell-Lymphom
PCLBCL, LT	primär kutanes diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, vom Beintyp
PCMZL	Primär kutanes Marginalzonen B-Zell-Lymphom
PDGFB	engl.: pericyte-derived-growth factor beta
PECAM	engl.: Platelet endothelial cell adhesion molecule
p-FAK	engl.: Phosphorylated Focal Adhesion Kinase
PFK-1	Phosphofruktokinase
PFKFB3	engl.: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
pH	pH-Wert
Prism Graph	wissenschaftliches Graphik-Analyse-Statistik-Programm
RAC	engl.: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RCC	engl.: renal cell carcinoma =RCC
RGD	Aminosäuresequenz: Arginin (R)- Glycin (G)-Asparaginsäure (D) (im Einbuchstabencode)
rpm	engl.: rpm= rounds per minute
RXR	engl.: retinoid X receptor
Syn.	Synonym
TBS	engl.: phosphate buffered saline
TE	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/ Ethylenediaminetetraacetic acid

TEK	engl.: Tyrosine Kinase, with Ig and EGF homology domains-2
TGF	Transforming growth factor beta
Tie2	Tyrosinkinase-Rezeptor der Endothelzellen
Tie2 <sup>low</sup>	engl.: low = wenig, gering)= reduzierte Menge an Rezeptoren
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polysorbat
Tyr397	Tyrosin 397
U.S.	engl.: United States
Unc5b	engl.: unc-5 netrin receptor
uPAR	engl.: Urokinase-type plasminogen activator receptor
Upm	Umdrehungen pro Minute
VE	engl.: vascular endothelial
VEGF	engl.: vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
WHO/EORTC	World Health Organization/ European Organization for Research and Treatment of Cancer
$\alpha 5\beta 1$	alpha5beta1
$\alpha v\beta 3$	alphavbeta3
$\alpha v\beta 5$	alphavbeta5

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Primär kutanes B-Zell-Lymphom (PCBCL)

Primär kutane B-Zell-Lymphome (PCBCL) stellen B-Zell-Neoplasien dar, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einzig eine kutane Manifestation aufweisen (Willemze et al., 2005; (Swerdlow et al. 2016)).

Im Vergleich mit den nodalen B-Zell-Lymphomen bestehen Unterschiede in der Klinik, Prognose und Therapie (Geissinger 2007; (Willemze et al. 2019)).

PCBCL repräsentieren mit einer Inzidenz von 0,3/100.000 die zweithäufigste Gruppe der kutanen Lymphome (Kempf et al., 2012). PCBCL, sind jedoch mit einem Anteil von 20-25% aller primär kutanen Lymphome wesentlich seltener als kutane T-Zell Lymphome (CTCL) (Willemze et al., 2005). Bemerkenswert ist die steigende Inzidenz der kutanen B-Zell-Lymphome (Korgavkar und Weinstock, 2014, Jenni et al., 2011, Benest et al., 2013). Es konnte ein statistisch signifikanter Anstieg der Neuerkrankungen über einen Zeitraum von 37 Jahren verzeichnet werden. Diese Entwicklung ist nicht vollständig geklärt. Mögliche Erklärungen könnten Veränderungen bei der Einteilung oder Datenerhebung sein (Korgavkar und Weinstock, 2014; Jenni et al., 2011).

### 1.2 Stufen der Klassifikation und Einteilung der Subtypen

Die Einteilung lymphatischer Neoplasien nach der Abstammung und dem Grad der Differenzierung der Tumorzellen wurde bereits in den 1970er Jahren von Karl Lennert an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel erarbeitet und in der Kiel-Klassifikation festgelegt (Lennert et al., 1975). So orientierte sich auch die 1994 veröffentlichte, überarbeitete europäisch-amerikanische Klassifikation der lymphoiden Neoplasien (engl.: Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL)) an einer Einteilung nach klinischen Gesichtspunkten, histologischer Morphologie, immunologischen Aspekten und Genetik (Harris et al., 1994). Dies führte zu einer Erweiterung der Kiel-Klassifikation. Aufbauend auf den vorherigen Klassifikationen entstand 2005 die WHO/EORTC Klassifikation, in der fünf Typen der primär kutanen B-Zell Lymphome aufgeführt werden (Tabelle 1). Die Klassifikation von hämatopoetischen und lymphatischen Neoplasien der WHO wurde in regelmäßigen Abständen, entsprechend neuesten Forschungsergebnissen, fortlaufend angepasst.



Zuletzt wurde sie 2016 und 2018/2019 aktualisiert (Swerdlow et al. 2016; Willemze et al. 2019)

2019 wurde die Klassifikation um das EBV positive, mukokutane Ulcus erweitert. Die PCBCL können in dieser Klassifikation in sechs Typen gruppiert werden (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1: Einteilung kutaner B-Zell-Lymphome innerhalb der unterschiedlichen Klassifikationen (EORTC, WHO und WHO/EORTC)**

\* engl.: NOS not otherwise specified, nicht weiter spezifiziert

WHO-EORTC (2005)	WHO (2016 und 2019)
primär kutanes Marginalzonen B-Zell-Lymphom	extranodales Marginalzonen B-Zell-Lymphom (MALT Typ)
primär kutanes Follikelzentrum Lymphom	primär kutanes Follikelzentrum – Zell Lymphom
primär kutanes großzelliges B-Zell-Lymphom (vom Beintyp)	diffuses kutanes großzelliges B-Zell-Lymphom vom Beintyp
Primär kutanes diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (andere)	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom NOS*
primär kutanes intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom	intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom
	EBV <sup>+</sup> mukokutanes Ulcus

Die Einteilung der drei häufigsten PCBCL Entitäten erfolgt somit sowohl in der WHO-EORTC Klassifikation von 2005 als auch in der aktuellen WHO Klassifikation von 2016 und im Rahmen der Aktualisierung 2018/2019 in die drei häufigsten PCBCL-Subtypen:

- primär kutanes follikuläres B-Zell-Lymphom (PCFCL)
- primär kutanes Marginalzonen B-Zell-Lymphom (PCMZL)
- primär kutanes diffus großzelliges B-Zell-Lymphom vom Beintyp (PCLBCL, LT)
- Daneben gibt es noch einige selten auftretende großzellige PCBCL (Felcht et al. 2019; Willemze et al. 2019).

Die Diagnose der Erkrankung definiert sich jeweils aus der individuellen Klinik, der Histologie, immunhistochemischen Untersuchungen sowie den entsprechenden molekularbiologischen Analysen (Felcht et al. 2017). Dabei ist wichtig, dass bei allen Formen von primär kutanen Lymphomen zunächst ein nodales Lymphom mit sekundär

kutanen Infiltraten mittels Staginguntersuchungen (körperliche Untersuchung, Blutanalysen, Sonographie der Lymphknoten, computertomographische Untersuchung von Hals bis Becken, Knochenmarkspunktion, Gastroskopie und ggf. Magnetresonanzuntersuchung des Kopfes) ausgeschlossen wird (Kempf und Sander 2010).

Die Schwerpunkte dieser Arbeit sind die drei häufigsten PCBCL-Subtypen.

### 1.2.1 Primär kutanes follikuläres B-Zell-Lymphom

Die Ätiologie des PCFCL ist weitgehend unbekannt (Geissinger et al., 2007). Patienten, die an einem PCFCL erkranken, sind im Median 55 Jahre alt (Altersbereich 24-87 Jahre) (Jenni et al., 2011). Das PCFCL manifestiert sich hauptsächlich im Kopf-Hals-Bereich und am Stamm (Willemze et al., 1997). Morphologisch imponieren vereinzelt oder gruppiert stehende erythematöse Papeln und konfluierende Plaques ohne epidermale Beteiligung (Felcht und Klemke, 2011; Kempf et al., 2012; (Nicolay und Wobser 2016).

In der konventionellen Histologie sind zahlreiche follikuläre, diffuse oder gemischt follikulär-diffuse Infiltrate sichtbar. Sie bestehen hauptsächlich aus Zentrozyten und Zentroblasten, welche ein sehr inhomogenes polymorphes Erscheinungsbild aufweisen. Das Vorkommen reicht bis in die Dermis und Subkutis, zur Epidermis hin bildet sich jedoch häufig eine sogenannte Grenzzone, da die Epidermis regelhaft nicht infiltriert wird (Burg et al., 2005). Alle PCBCL-Tumorzellen exprimieren die B-Zell Marker CD20 (engl.: cluster of differentiation (CD)), CD79a und PAX 5, während die T-Zell Marker CD2, CD3, CD4, CD5 und CD8 in den immunhistologischen Färbungen in den Tumorzellen nicht nachweisbar sind. Bcl-2, welches beim programmierten Zelltod (Apoptose) eine Rolle spielt, wird meistens nicht exprimiert. Bei Bcl-2-Expression der Tumorzellen sollten weitere Staginguntersuchungen mittels Knochenmarkspunktion, Magenspiegelung und computertomographischer Untersuchung von Hals und Becken großzügig indiziert werden, um ein nodales Lymphom auszuschließen (Nicolay und Wobser 2016).

PCFCL-Tumorzellen weisen daneben die Expression von Bcl-6 auf, das wie CD10 in den Keimzentren von B-Zellen exprimiert wird (Kodama et al., 2005). Im Gegensatz dazu lässt sich keine Expression des Transkriptionsfaktors FOX-P1 detektieren (Espinet et al., 2011). Die Prognose ist mit einer Fünfjahresüberlebensrate von 95% sehr gut (Willemze et al., 2005). Aus diesem Grund wird das PCFCL auch als indolentes PCBCL bezeichnet.

### 1.2.2 Primär kutanes Marginalzonen B-Zell-Lymphom

Als mögliches Pathogen konnte in einzelnen Fällen eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi*-Bakterien nachgewiesen werden (Goodlad et al., 2000). Diskutiert werden in Einzelfällen auch antigene Stimuli wie z.B. Tätowierungspigment (Sanguenza et al., 1992), rezidivierende Herpes simplex-Virus Typ1-Infektionen (*Herpes simplex in loco*

*recurrens*; Zendri et al., 2005) und Gripeschutzimpfungen (May et al., 2005). Eine Studie konnte hingegen keine Assoziation zwischen PCMZL und *Chlamydomphila psittaci* Infektionen nachweisen (Ferreri et al., 2012).

Patienten mit einem PCMZL sind im Median 41 Jahre alt (Altersbereich 19-76 Jahre) (Jenni et al., 2011). Betroffen sind hier insbesondere die obere Extremität und der Stamm. Das PCMZL manifestiert sich als erythematöse Plaques oder Papeln bis hin zu lividen Knoten. Rezidive sind häufig, extrakutane Beteiligung und Ulzerationen jedoch selten beschrieben (Willemze et al., 2005; Felcht und Klemke, 2011; (Nicolay und Wobser 2016). Histologisch imponieren zahlreiche noduläre Infiltrate der Keimzentren mit Tumorzellen. Die Keimzentren bestehen aus zahlreichen kleinen Lymphozyten mit einem sehr homogenen Erscheinungsbild mit geringgradigen Kernatypien. Die Infiltrate reichen bis in die Dermis, wobei die Epidermis nicht infiltriert wird, und es auch hier häufig zur Ausbildung einer Grenzzone kommt (Burg et al., 2005). Die Tumorzellen exprimieren CD20, CD79a und PAX 5, jedoch nicht CD2, CD3, CD4, CD5 und CD8. Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 wird im Gegensatz zu Bcl-6 exprimiert. Ob MUM-1 und FOX-P1 exprimiert werden, ist nicht gesichert. CD10 konnte nicht nachgewiesen werden.

Auch für das PCMZL ist mit einer Fünfjahresüberlebensrate von 90-100 % die Prognose sehr gut (Willemze et al., 2005). Aus diesem Grund werden PCFCL und PCMZL als indolente PCBCL zusammengefasst.

### 1.2.3 Primär kutanes diffus großzelliges B-Zell-Lymphom vom Beintyp (PCLBCL, LT)

Das PCLBCL, LT betrifft vornehmlich ältere Patienten. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 80 Jahren (Altersbereich 18-90 Jahre) (Jenni et al., 2011). Gehäuft treten PCLBCL, LT bei Frauen an den unteren Extremitäten als roter bis dunkelrot wachsende Knoten auf, welche im fortgeschritten Stadium ulzerieren können (Willemze et al., 2005; Felcht und Klemke, 2011). In morphologischen Gesichtspunkten, der Molekulargenetik und der klinischen Ausprägung zeigt das PCLBCL, LT Ähnlichkeiten zum nodalen B-Zell-Lymphom und weist beispielsweise analoge, molekulare Aberrationen im p53-Signalweg auf (Senff et al., 2008; Koens et al., 2014; (Willemze et al. 2019).

Das histologische Bild imponiert mit einem dichten, monomorphen Infiltrat in der Dermis, das auch bis in die Subkutis reichen kann. Auch hier kann die Epidermis ausgespart bleiben (Grenzzone). Auffällig ist das insgesamt inhomogene Bild mit mittelgroßen und großen Lymphozyten mit Kernatypien und hoher Mitoseaktivität,

sowie der zerstörten Hautanhangsgebilde (Burg et al., 2005). In den immunhistologischen Färbungen lassen sich auch beim PCLBCL, LT die Expression der B-Zell Marker CD20, CD79a und PAX 5 und keine Expression der T-Zell Marker CD2, CD3, CD4, CD5 und CD8 in den Tumorzellen nachweisen. In einem Fall ist es einer Forschergruppe allerdings gelungen, CD5 zum ersten Mal dokumentiert im PCLBCL, LT nachzuweisen, was insgesamt jedoch selten beschrieben wird (Papoudou-Bai et al. 2019; Kempf et al. 2014). Der Transkriptionsfaktor FOX-P1 wird in physiologisch aktivierten B-Zellen exprimiert (Hu et al., 2006; Dengler et al., 2008; Espinet et al., 2011) und in PCLBCL, LT überexprimiert (Shaffer et al., 2002), was mit einer ungünstigen Prognose verbunden ist. Das Multiple Myelom-Antigen 1 (MUM1= engl.: multiple myeloma antigen1) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Reifung und Differenzierung von B-Zellen in reife Plasmazellen reguliert. Eine hohe Expression von MUM1 wird bei Erkrankungen der Plasmazellen wie dem Multiplen Myelom beobachtet (Shaffer et al., 2009), ist aber auch beim PCLBCL, LT stark erhöht (Papoudou-Bai et al. 2019) und kann als wichtiges diagnostisches Kriterium zur Unterscheidung zwischen dem PCFCL genutzt werden (Kempf et al. 2014). Die für das PCLBCL, LT typische Erhöhung von MUM1 scheint aber nicht abhängig von genetischen Rekombinationsprozessen oder Amplifikationen zu sein. Sogar eine zusätzliche Kopie des Allels führte zu keiner Erhöhung der MUM1-positiven Zellen in der immunhistologischen Färbung (Pham-Ledard et al. 2010). Aus diesem Grund ergibt sich die Wahrscheinlichkeit einer MUM1-Erhöhung aus epigenetischen Regulationsmechanismen oder Deregulationsmechanismen während der Onkogenese (Pham-Ledard et al. 2010). Die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 ist beim PCLBCL, LT detektierbar, während CD10 nur schwach exprimiert wird oder nicht nachweisbar ist (Willemze et al., 2005; Felcht et al. 2019). Die Fünfjahresüberlebensrate der Patienten wurde lange Zeit mit nur 50% angegeben, neuere Daten zeigen jedoch eine Fünfjahresüberlebensrate von 66%-70% (Felcht et al., 2012b; Grange et al., 2014; Felcht et al. 2019).

Tabelle 2 stellt vergleichend die Expression der wichtigsten immunhistochemischen Marker dar.

**Tabelle 2: Immunhistochemische Marker in der Übersicht**

Entität	B-Zell Marker	T-Zell Marker	BCL-2	BCL-6	MUM-1 (IRF4)	FOX-P1	CD10
	CD20 CD79a PAX	CD2 CD3 CD4 CD5 CD8					
PCFCL	+	-	-	+	-	-	-/+
PCMZL	+	-	+	-	?	?	-
PCBCL, LT	+	-	+	schwach +	+	+	schwach +

Das klonale Rearrangement ist ein weiteres Kriterium bei der Diagnosestellung. Typisch ist hierbei die Monoklonalität der Immunglobuline in allen drei Entitäten (Felcht et al., 2011).

### 1.3 Überblick zur aktuellen Therapie

Die Therapie richtet sich generell nach der Einteilung der WHO/EORTC. Durch die genaue Klassifikation ist man heute in der Lage, dem Patienten die bestmögliche Therapie zukommen zu lassen bei gleichzeitigem Schutz vor einer Übertherapie, insbesondere einer inadäquaten Chemotherapie (Geissinger et al., 2007).

#### 1.3.1 Therapie der indolenten PCBCL

Das PCMZL und das PCFCL gehören zu den indolenten B-Zell-Lymphomen und als solche sollten sie primär nicht mit einer systemischen Chemotherapie behandelt werden (Senff et al., 2008). Die Therapie der Wahl ist in frühen Stadien die vollständige lokale Exzision der Läsionen oder eine lokale Bestrahlung (Klemke, 2014). In Fällen

mit nachgewiesener *Borrelia burgdorferi*-Infektion ist gegebenenfalls eine antibiotische Behandlung mit Cephalosporinen oder Tetracyclinen anzuwenden (Senff et al., 2008). Weitere Möglichkeiten sind die intraläsionale Applikation von Interferon- $\alpha$  sowie die intravenöse Injektion von Rituximab, einem monoklonalen CD20-Antikörper. Als Therapie der zweiten Wahl kommt eine Chemotherapie mit Bendamustin und Rituximab oder in Kombination mit Doxorubicin, alternativ Gemcitabin mit Rituximab, in Betracht (Stadler et al., 2013; Geissinger et al., 2007; Senff et al., 2008; Klemke, 2014; (Nicolay und Wobser 2016).

### 1.3.2 Therapie des PCLBCL, LT

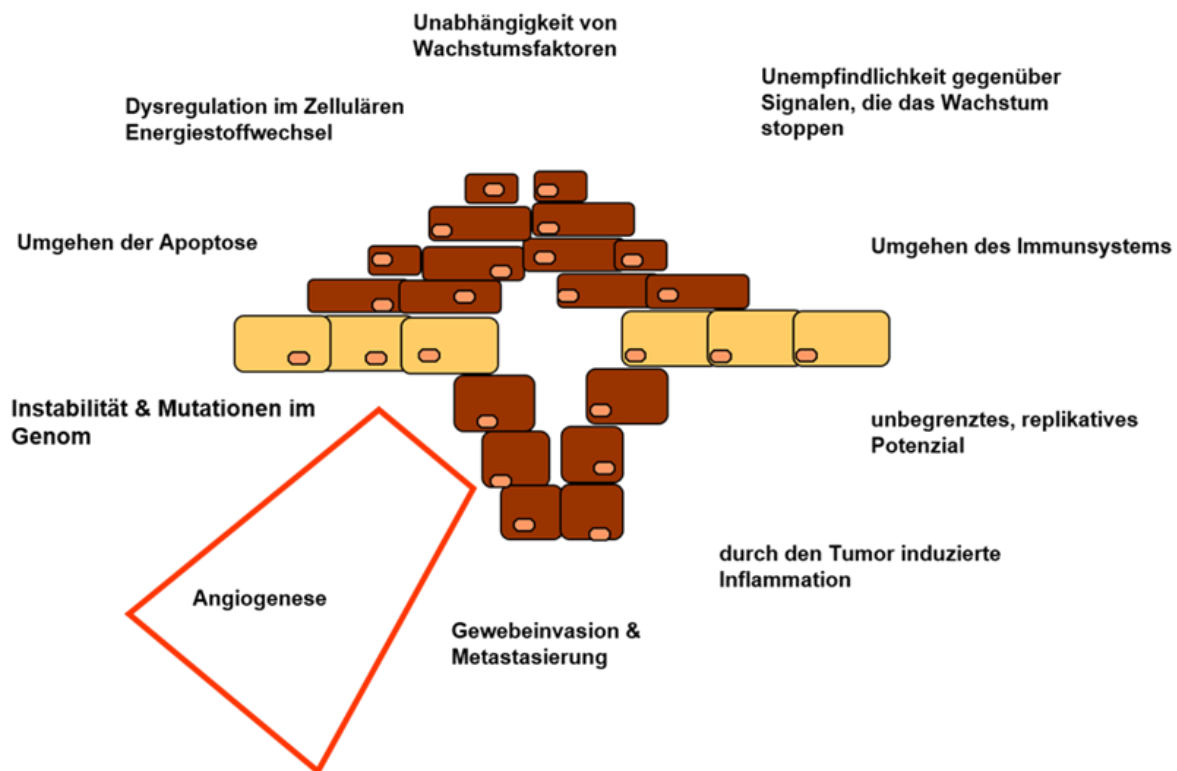
Der aggressive Verlauf macht eine Polychemotherapie ggf. kombiniert mit Rituximab notwendig. Allerdings ist die Standardtherapie mit CHOP (Cyclophosphamid, Hydroxy-Doxorubicin, Vincristin, Prednison) gerade für ältere, multimorbide Patienten nicht unproblematisch (Coiffier et al., 2002). Als häufige Nebenwirkungen sind mit 20% schwerwiegende Infektionen und 8% toxische Schäden auf das Herz zu nennen. Fieber mit Schüttelfrost, Übelkeit und Erbrechen und Haarausfall, aber auch die erheblich schädigende Wirkung auf die Leber, die Nieren, das Nervensystem sind weitere bekannte Nebenwirkungen (Coiffier et al., 2002). In dem Fall, in dem eine kombinierte Polychemotherapie aufgrund der schlechten Konstitution der älteren Patienten nicht in Frage kommt, sehen die EORTC Leitlinien als Zweitlinientherapie eine Rituximabmonotherapie oder Bestrahlung vor (Valencak et al., 2009; Senff et al., 2008). Eine Rituximabmonotherapie führt bei großzelligen B-Zell-Lymphomen häufig schnell zu Rezidiven, weshalb eine kombinierte Polychemotherapie mit Rituximab (Brandenburg et al., 2013) oder die Kombination Rituximab mit gleichzeitiger Bestrahlung (Valencak et al., 2009) die beste Lösung bei multimorbiden Patienten zu sein scheint. Letztendlich bleibt die Prognose des PCLBCL, LT mit einer Fünfjahresüberlebensrate mit 66-75% schlecht. Außer dem chimären monoklonalen Antikörper Rituximab, der spezifisch den B-Zell Marker CD20 bindet und somit gezielt auch in malignen B-Zellen die Apoptose induziert, fehlen bislang weitere spezifische Therapien. Ein Grund dafür ist, dass die Pathophysiologie der PCLBCL, LT immer noch weitestgehend unverstanden ist.

## 1.4 Angiogenese

Im Jahre 2000 beschrieben Hanahan und Weinberg in „The Hallmarks of Cancer“ sechs Veränderungen in der Zellphysiologie, die zusammen für maligne Neoplasien essentiell sind (Hanahan und Weinberg, 2000). Diese sind

- das Umgehen der Apoptose,
- die fortwährende Neubildung von Gefäßen,
- das Potential zur unbegrenzten Replikation,
- der Einbruch in umliegende Gewebe bei gleichzeitiger Metastasierung sowie
- die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren als auch die Unempfindlichkeit gegenüber Signalen, die das Wachstum aufhalten könnten.

In der erweiterten Version von 2011 „Hallmarks of Cancer: The Next Generation“ wird die Neuprogrammierung des Energiestoffwechsels und die Umgehung des Immunsystems als neue „Hallmarks“ (Kennzeichen) bei der Entstehung von neoplastischen Veränderungen beschrieben. Abbildung 1 stellt die „Hallmarks of Cancer“ bildlich dar (Hanahan und Weinberg, 2011).



**Abbildung 1: Kennzeichen der Krebsentstehung modifiziert nach Hanahan und Weinberg** (engl.: Hallmarks of Cancer; Hanahan und Weinberg, 2011)



Der Fokus des wissenschaftlichen Interesses lag lange Zeit auf der Analyse der Tumorzellen selbst. In den letzten Jahren zeigte sich, dass in den einzelnen Tumorarten neben der einzelnen Tumorzelle die Tumorumgebung deutlich variiert. Ein wichtiger Schritt in der Tumorentwicklung stellt die Angiogenese, die Neubildung von Gefäßen, dar.

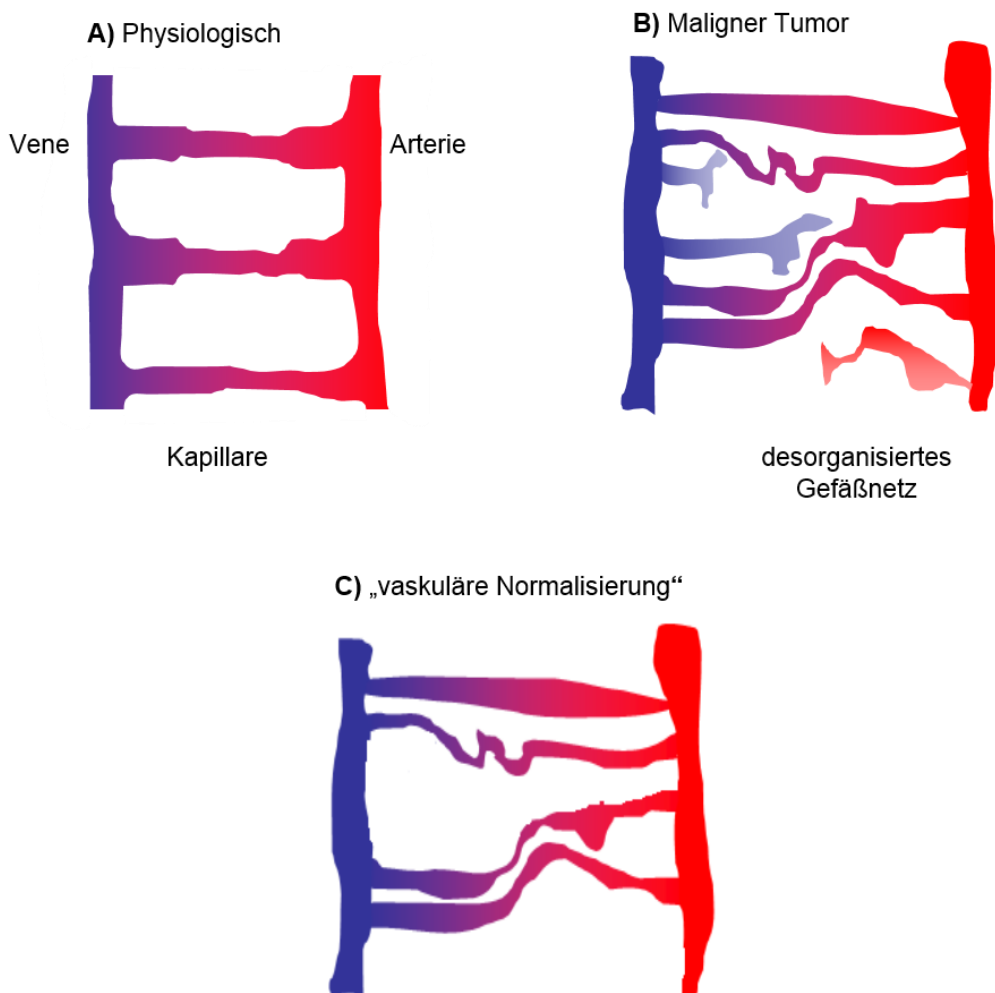
Während der physiologischen Embryogenese findet Angiogenese nach der Vaskulogenese statt. Im Zebrafisch konnte noch eine weitere Art der Gefäßneubildung beobachtet werden und betrifft die Entstehung der ersten Arterien und Venen in der Embryonalentwicklung (Swift und Weinstein, 2009; (Herbert et al. 2009). Diese erfolgt durch Aufspaltung aus einem gemeinsamen Vorläufergefäß.

Vaskulogenese beschreibt die Entstehung der ersten Blutgefäße und das sich entwickelnde kardiovaskuläre System. Es besteht aus mesodermalen Vorläuferzellen oder Angioblasten. Aus diesen so genannten „Blutinseln“ entwickelt sich das erste primitive Gefäßnetz. Dies ist beispielsweise bei der Entwicklung der dorsalen Aorta beim Zebrafisch zu beobachten (Risau und Flamme, 1995; Swift und Weinstein, 2009; Potente et al., 2011). Die darauf folgende Entstehung von Gefäßen aus diesem Primärplexus wird als Angiogenese bezeichnet (Risau, 1997). Sprossende Angiogenese beschreibt die Neubildung von Gefäßen durch Aussprossen aus dem bereits existierenden Gefäßnetz (Potente et al., 2011). Zu unterscheiden ist die nicht-sprossende Angiogenese, welche durch Intussuszeption (Syn.: Invagination) aus dem bestehenden Gefäßnetz resultiert. Beide Formen können parallel stattfinden. Dies wird beispielsweise während der Entwicklung der embryonalen Lunge (Risau, 1997) beobachtet. Unter physiologischen Bedingungen findet Angiogenese im adulten Organismus nur begrenzt statt, wie z.B. während des Ovarialzyklus, der Entwicklung der Plazenta (Folkman, 2007) und während des Haarwachstums (Mecklenburg et al., 2000). Als sich selbstlimitierender und zeitlich begrenzter Prozess spielt sie bei der Wundheilung eine Rolle. Während somit die Angiogenese unter physiologischen Bedingungen nur bei einzelnen Vorgängen stattfindet, ist Angiogenese bei zahlreichen pathologischen Vorgängen, wie in der Entstehung der Psoriasis vulgaris und der diabetische Retinopathie, essentiell (Folkman, 2007). Dies trifft auch für die Kanzerogenese zu.

Schon 1971 stellte Judah Folkman (1933-2008) die Hypothese auf, dass die Versorgung im Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoff und der Abtransport von Stoffwechselprodukten mit der Entfernung zur versorgenden Kapillare essentiell ist (Folkman, 1971). Letztendlich ist in den meisten Tumorarten kein Wachstum über

weniger als ein Millimeter möglich, wenn die Strecke zur nächsten versorgenden Kapillare größer als 100-150  $\mu\text{m}$  ist. Hierfür sind biophysikalische Eigenschaften von Sauerstoff verantwortlich, die eine Diffusion über 150  $\mu\text{m}$  in menschlichem Gewebe nicht erlauben (Schumacker und Samsel, 1989).

Das normale Gefäßnetz unterliegt der strengen Einteilung in Venen, Arterien und Kapillaren. Im Vergleich dazu wirkt das Gefäßnetz im Tumor chaotisch und desorganisiert mit zahlreichen blind endenden Gefäßen. Eine Differenzierung zwischen Arterien, Venen und Kapillaren ist nicht mehr möglich (Adams und Alitalo, 2007). In Abbildung 2 wird das physiologische Gefäßnetz dem aberranten Gefäßnetz im Tumor gegenübergestellt.



**Abbildung 2: Einteilung des Gefäßnetzes in Arterien, Venen, Kapillaren, A)** physiologisches Gefäßnetz, **B)** desorganisiertes Gefäßnetz im Tumor modifiziert nach Mc Donald (McDonald und Choyke 2003). **C)** Gefäßnetz nach „vaskulärer Normalisierung“ durch eine anti-angiogene Therapie, modifiziert nach Jain, 2005

### 1.4.1 Wichtige Faktoren und Prinzipien während der Angiogenese

Bereits im 19. Jahrhundert machten deutsche Wissenschaftler um Rudolph Virchow (1821-1902) die Entdeckung, dass einige Tumore stark vaskularisiert sind. Seit dieser Zeit und bis heute tritt die Angiogenese in den Fokus des weltweiten wissenschaftlichen Interesses in der Krebsforschung und der Tumorthherapie. Die Suche nach Wachstumsfaktoren, welche Angiogenese induzieren können, führte 1989 zur Entdeckung von VEGF (engl.: vascular endothelial growth factor) durch den italienischen Gynäkologen Napoleone Ferrara (Ferrara, 2002). VEGF gehört zu einer Familie vaskulotoper Wachstumsfaktoren. Fast alle Zellen exprimieren mehr VEGF als die Endothelzellen der Gefäße (Claffey et al., 1992; Bunn und Poyton, 1996), sodass VEGF-induzierte Effekte weitgehend parakrin über die VEGF-Rezeptoren in den Endothelzellen der Gefäßwände vermittelt werden (Bunn and Poyton, 1996; Koch et al., 2011). Der Zeitraum von der Entdeckung von VEGF bis zur Entwicklung der ersten antiangiogenen Therapie 2004 erstreckte sich über 14 Jahre. Es hat sich gezeigt, dass z.B. Patienten mit einem kolorektalen Karzinom, die eine Chemotherapie erhalten, von einer additiven Therapie mit dem VEGF-Antagonisten Bevacizumab profitieren (Ferrara und Kerbel, 2005; Ellis and Hicklin, 2008). Bevacizumab stellt einen humanisierten, monoklonalen Antikörper dar, der VEGF bindet und neutralisiert. Weitere zugelassene, antiangiogene Medikamente zur Kombinationstherapie sind auch Sorafenib und Sunitinib. Als Multikinaserezeptor-Antagonisten hemmen sie unter anderem die Phosphorylierung der VEGF-Rezeptoren (Ellis and Hicklin, 2008). Grundgedanke dieser antiangiogenen Therapie war es, den wachsenden Tumor von der Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff abzuschneiden und so eine Tumorregression zu induzieren. Die ersten Behandlungsergebnisse mit einer anti-VEGF-Monotherapie waren allerdings wenig erfolgreich (Ferrara und Kerbel, 2005; Ellis and Hicklin, 2008). Eine Kombination der üblichen Chemotherapien oder einer Radiotherapie mit einem VEGF-Antagonisten konnte hingegen das Ansprechen auf die Therapie deutlich steigern. Wie lässt sich also erklären, dass eine Therapie mit Bevacizumab den Tumor nicht „aushungert“, während Bevacizumab in Kombination die Effektivität einiger Zytostatika steigert. Eine mögliche Antwort könnte die von Rakesh Jain aufgestellte Hypothese der „vaskulären Normalisierung“ sein (Jain, 2005). Das in der Phase des Tumorwachstums zunehmend chaotischer und in der normalen Funktion gestörte Gefäßnetz wird unter dem Einfluss der antiangiogenen Therapie ausgedünnt, sowie „normalisiert“, und erscheint weniger chaotisch und desorganisiert

(Jain, 2005; Kerbel, 2008) (siehe Abbildung 2). Gleichzeitig wird so das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren annähernd wieder hergestellt. Durch die „vaskuläre Normalisierung“ wird eine Verbesserung der Durchblutung des Tumors erreicht. In der Konsequenz ergeben sich daraus eine bessere Verteilung einer systemischen Chemotherapie im Tumor sowie die Reduktion der Hypoxie. Vermeidung von Hypoxie ist essentiell für eine effektive Radiotherapie und bedeutet einen fehlenden Triggerfaktor für die Gefäßneubildung (Jain, 2005; Goel et al., 2012). Das Ang-2 und Tie2, sowie die Normalisierung des Gefäßnetzes eine wichtige Rolle spielen könnten, zeigte eine Forschergruppe um Jin-Sung Park 2018 (Park et al. 2016). Durch eine Normalisierung des Gefäßnetzes ist die kontinuierliche Erreichbarkeit der Chemotherapeutika an den Zielort gewährleistet. Ein weiterer Hinweis auf die therapeutischen Möglichkeiten, die Ang-2 bieten könnte, zeigte auch eine Forschungsgruppe um Hellmut G. Augustin. Sie konnten nachweisen, dass durch die Inhibition von Ang-2 das Metastasenwachstum reduziert werden kann (Srivastava et al. 2014). Dieses Ergebnis könnte eine Ergänzung und eine Verbesserung einer adjuvanten Tumorthherapie sein (Srivastava et al. 2014).

Neben Angiogenese und der Vaskulogenese besitzen Tumore weitere Methoden der Gefäßneubildung (Felcht und Thomas 2015): Endothelzellen werden von Tumorzellen verdrängt und ersetzt. Die Tumorzellen verhalten sich fortan wie Endothelzellen. Dies wird als vaskuläres Mimikry bezeichnet und konnte insbesondere im malignen Melanom nachgewiesen werden (Maniotis et al., 1999). Der funktionelle Wert für die arterielle Versorgung des Tumors wird jedoch kontrovers diskutiert. Eine weitere Möglichkeit ist die Intussuszeption, bei der sich ein Gefäß durch die Bildung einer Gewebebrücke in zwei Tochtergefäße aufteilt. Weiterhin könnten genetische Veränderungen in sogenannten Krebsstammzellen dazu führen, dass sich diese als reife Endothelzellen differenzieren können. Daneben versuchen Tumorzellen sich in der Nähe von bereits bestehenden Gefäßen anzusiedeln, um so von dem bestehenden Gefäßnetz profitieren zu können (engl.: vessel cooption) (Weis und Cheresh, 2011; Welte et al., 2013).

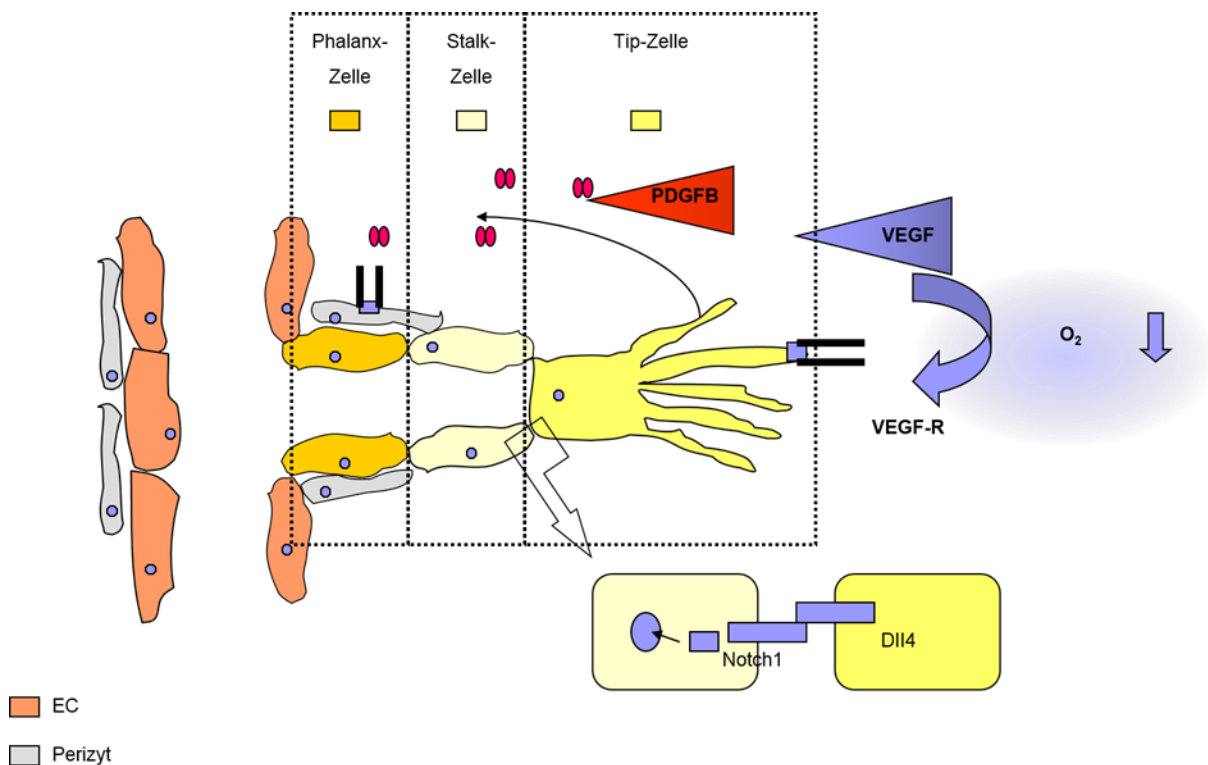
Am meisten ist über die sprossende Angiogenese bekannt, da diese sich besonders gut im Retina-Mausmodell untersuchen lässt (Pitulescu et al., 2010; Sawamiphak et al., 2010a). Beispielsweise ist es durch ex vivo Kultivierung von murinen Retinae möglich, das sich entwickelnde Gefäßnetz in Einzelzellanalyse zu untersuchen (Sawamiphak et al., 2010a). Mit dieser Methode war es auch möglich, nachzuweisen, dass die erste aussprossende Endothelzelle eines Gefäßnetzes sich von den

Folgezellen in morphologischen und funktionellen Kriterien unterscheidet und sich durch spezifische Markeranalysen differenzieren lässt. Diese Zelle wird Tip-Zelle bezeichnet (Phng und Gerhardt, 2009).

#### 1.4.2 Das Tip-Stalk-Phalanx-Zellmodell

Das Tip-Stalk-Phalanx-Zellmodell beschreibt die Entstehung von neuen Gefäßen aus dem existierenden Gefäßnetz. Es stellt den Ablauf unter physiologischen Bedingungen dar und man postuliert, dass es sich auf die Entstehung von Gefäßen im Tumor übertragen lässt. Ein definitiver Beweis hierfür steht jedoch bislang noch aus.

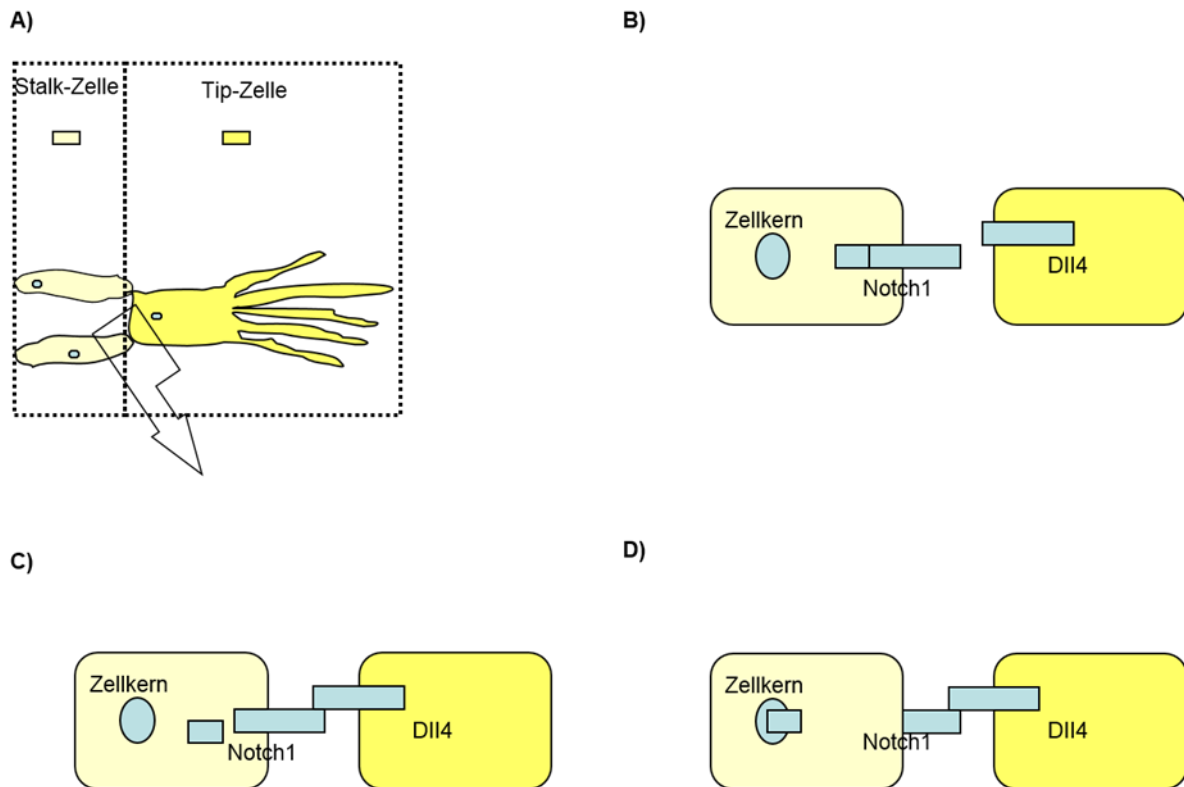
Die erste invadierende Endothelzelle wird als Sprosszelle (Tip-Zelle, engl.: tip cell) bezeichnet (Abbildung 3). Diese Zelle bildet kein Lumen und proliferiert selten. Sie ist einseitig polarisiert mit zahlreichen Filopodien, wodurch sie hoch beweglich ist und migrieren kann (Phng und Gerhardt, 2009).



**Abbildung 3: Das Tip-Stalk-Phalanx-Zellmodell**, Abbildung einer entstehenden Gefäßsprosse nach dem Tip-Stalk-Phalanx-Zellmodell mit Unterteilung in die jeweils beteiligten Zelltypen und Interaktion der verschiedenen pro-angiogenen Faktoren. (Zeichnung modifiziert nach Phng und Gerhardt, 2009).

Die Sprosszelle exprimiert den VEGF-Rezeptor, Dll4 und sezerniert PDGFB (engl.: pericyte-derived-growth factor beta). Die nachfolgende Stielzelle (engl.: stalk cell) formt bereits ein Lumen hinter der Sprosszelle. Der Stielzelle folgt eine Zelle, welche ebenfalls bereits ein Lumen formt und proliferiert. Diese Zelle wird als Phalanxzelle bezeichnet. Extraluminal sind die Phalanxzellen von Perizyten umgeben. Abbildung 3 zeigt das Tip-Stalk-Phalanx-Zellmodell schematisch.

Einen der stärksten angiogenen Reize stellt Hypoxie dar (Semenza, 2010). Hypoxische Zellen beginnen HIF-vermittelt (Hypoxie-induzierter Faktor) die Transkription von VEGF hochzuregulieren und in der Konsequenz mehr VEGF zu sezernieren. VEGF wird von den meisten Tumorzellen stärker exprimiert als von Endothelzellen. Der VEGF-Rezeptor ist insbesondere auf Endothelzellen lokalisiert. Der Mechanismus ist damit primär parakrin. Gesteigerte Mengen an HIF lassen sich in vielen Krebsarten beobachten (Pugh and Ratcliffe, 2003). Aus diesem Grund könnte sich auch das HIF-System als Angriffspunkt für eine anti-angiogene Therapie in der richtigen Kombination mit beispielsweise einer systemischen Chemotherapie für den entsprechenden Patienten eignen (Semenza, 2010). Gleichzeitig führt Hypoxie zu einer Hochregulation des VEGF-Rezeptors in der Tip-Zelle (Bunn and Poyton, 1996). Könnten alle Zellen gleichzeitig aussprossen, so würde dies zum Zerfall des betroffenen Gefäßes führen und damit zur Minderperfusion des betroffenen Gewebeabschnittes (Adams und Alitalo 2007). Um dies zu verhindern, wird eine gewisse Hierarchie innerhalb der Endothelzellen sichergestellt. Dies wird insbesondere über das Delta Dll4-Notch-System gewährleistet (Abbildung 4)



**Abbildung 4: Modell des Delta Notch Systems, A)** Zellgrenze zwischen der Stalk- und der Tip-Zelle. **B)** Die Stalk-Zelle exprimiert Notch 1, die Tip-Zelle Dll4. **C)** Proteolytische Spaltung von Notch 1 nach Bindung von Dll4 der Tip-Zelle. **D)** Der abgespaltene Teil von Notch 1 transloziert in den Zellkern und aktiviert dort die Zielgene von Notch 1 (Zeichnung modifiziert nach Phng und Gerhardt, 2009).

Während die Tip-Zelle Dll4 exprimiert, exprimiert die Stalk-Zelle Notch 1. Nach der Bindung von Dll4 der Tip-Zelle an Notch in der Stalk Zelle wird Notch proteolytisch gespalten (Andersson and Lendahl, 2014). Der intrazelluläre Anteil transloziert in den Zellkern, und es werden Zielgene von Notch aktiviert, wie z.B. Hes (engl.: Hairy/enhancer of split) und Hey (engl.: Hes-related protein) sowie Nrarp (engl.: Notch-regulated ankyrin repeatprotein) (Phng und Gerhardt, 2009)

Die Zellen konkurrieren darum, eine Tip-Zelle zu werden. Hat eine Zelle den Tip-Zell-Phänotyp erreicht, inhibiert sie durch das Delta Notch-System die nachfolgende Stalk-Zelle (Prinzip der lateralen Inhibition) (Phng und Gerhardt, 2009). Die Tip-Zelle sezerniert den Wachstumsfaktor PDGFB (engl.: pericyte-derived growth factor B) aus den Filopodien. Dieser stammt aus einer Familie von Wachstumsfaktoren (PDGF-A, PDGFF-B, PDGF-C, PDGF-D), die eine entscheidende Rolle während der Entwicklung einnehmen (Andrae et al., 2008). PDGFB bindet an den PDGFB-Rezeptor, der von den Perizyten, welche die Endothelzellen der Kapillaren umhüllen, exprimiert wird. Die Bindung von PDGFB mit seinem Rezeptor sorgt für die nötige Stabilisierung und Gefäßausreifung (Maturation) des entstehenden Gefäßnetzes (Augustin et al., 2009).

### 1.4.3 Angiopoietin-2

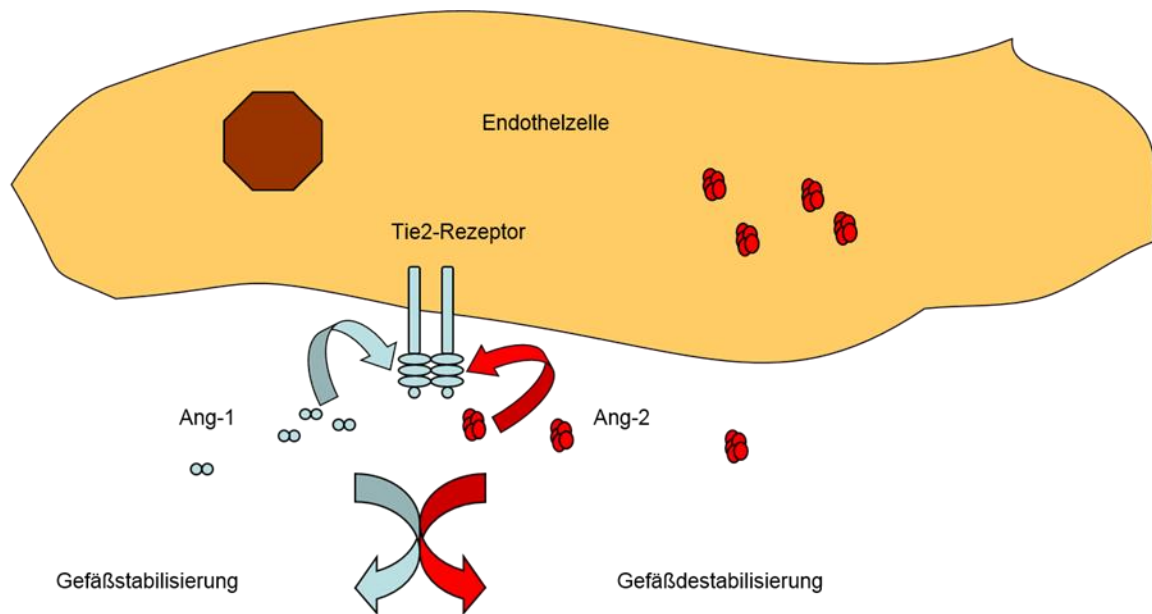
Während der Angiogenese stellt das Dll4-Notch 1-System eines der hauptverantwortlichen Systeme für die Regulation des Tip-Stalk-Phalanx-Zellmodells dar. Das Dll4-Notch 1-System wird jedoch auf der anderen Seite durch unterschiedliche angiogene Faktoren beeinflusst. So ist zum Beispiel bekannt, dass Ephrin-B2 über Notch 1 die Entstehung von Tip Zellen induziert (Sawamiphak et al., 2010a). Daneben konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Protein Angiopoietin-2 für die sprossende Angiogenese entscheidend ist (Felcht et al., 2012b; Gao et al., 2013). Dieses während der Angiogenese essentielle Liganden-Rezeptor-System beeinflusst Notch 1-vermittelt den Tip-Zell induzierten Phänotyp (Gao et al., 2013). Gleichzeitig konnte demonstriert werden, dass eine Ang-2-Inhibition mit einem Antikörper sowohl die Tip-Zellen als auch die Stalk-/Phalanxzellen reduziert (Felcht et al., 2012b).

Das Ang-/Tie2-System besteht aus den vier Liganden Angiopoietin 1-4 (Ang-1-4) und den Rezeptoren Tie1 und Tie2 (Augustin et al., 2009). Genetische Experimente im Mausmodell zeigen eine agonistische/antagonistische Wirkung von Ang-1 und Ang-2 (Maisonpierre et al., 1997). Von entscheidender Bedeutung bei der Untersuchung dieser unterschiedlicher Wirkungsweisen war die Züchtung der ersten Ang-2-defizienten-Maus, die erstmals 2002 beschrieben wurde (Gale et al., 2002). Während Ang-1 von muralen Zellen sezerniert wird (z.B. von Perizyten) und somit parakrin wirkt, wird Ang-2 fast ausschließlich von Endothelzellen selbst sezerniert und wirkt somit autokrin (Augustin et al., 2009). Ang-2 wird intrazellulär in Weibel-Paladekörperchen gespeichert (Fiedler und Augustin, 2006) und unter dem Einfluss von unterschiedlichen Stimuli, wie beispielsweise Scherkräften (Goettsch et al., 2008) und UV-Licht (Navid et al., 2012) sezerniert. Erhöhte Ang-2-Spiegel finden sich auch bei subkonfluenten Zellen, bei denen die Hochregulation von Ang-2 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte (Felcht et al. 2012b). In selten Fällen wird Ang-2-Expression in Tumorzellen selbst beschrieben (Nasarre et al., 2009; Maffei et al., 2010; Terpos et al., 2012). Neben malignen Melanomzellen (Nasarre et al., 2009) wurde eine Ang-2-Expression für chronisch lymphatische Leukämiezellen (Maffei et al., 2010) und Zellen beim multiplen Myelom (Terpos et al., 2012) beschrieben.

Ang-1 und Ang-2 binden beide den Rezeptor Tie2, der hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert wird. Die Experimente im Mausmodell lassen vermuten, dass Ang-1 funktionell gefäßstabilisierend ist. Eine Ang-1-Defizienz führt zu einem Stillstand



in der Entwicklung und schließlich zum Untergang des Mausembryos. Ang-1 ist in hohen Mengen im sich entwickelnden Herzen nachzuweisen, und ein Fehlen von Ang-1 führt zu einer gestörten Entwicklung von Endo- und Myokard (Suri et al., 1996). Versuche in der Mausretina konnten zeigen, dass die Applikation von Ang-1 die Gefäßdurchlässigkeit verringert (Lee et al., 2013). Ang-2-Defizienz hingegen ist mit dem Leben vereinbar. Eine globale Ang-2-Überexpression ähnelt im Phänotyp einer Ang-1-Defizienz. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass Ang-2 hauptsächlich gefäßdestabilisierend wirkt und somit funktionell Antagonist von Ang-1 ist. Dabei wirkt Ang-2 jedoch insbesondere als Verstärker von anderen angiogenen Molekülen (wie z.B. VEGF) (Scharpfenecker et al., 2005). In der Abwesenheit von Ang-1 agiert Ang-2 als Agonist (Yuan et al. 2009). Aus diesem Grund ist Ang-2 aus pharmakodynamischer Sicht ein partieller (Ant)-Agonist von Tie2. Ein weiteres Beispiel für die dynamische Regulation von Ang-2 und deren Auswirkung wurde während der Regeneration der Leber nach einer Leberteilresektion beobachtet (Hu et al., 2014). Hier wirkt das von den Endothelzellen sezernierte Ang-2 als räumlich und zeitlich begrenzender Faktor bei der Leberzellneubildung. Diese ist abhängig von der Regeneration der Sinusoidalzelle und der Leberparenchymzellen. In der Frühphase der Leberneusynthese wird Ang-2 in den sinusoidalen Endothelzellen der Leber herunterreguliert, was dann zu einer Herunterregulation des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  führt. Dies ermöglicht zunächst eine Hepatozytenproliferation, während das Wachstum der Sinusoidalzellen für einen gewissen Zeitraum blockiert wird. In der späten Phase wird Ang-2 wieder hochreguliert, in den Sinusoidalzellen wird der VEGF-2 Rezeptor exprimiert und ermöglicht so deren Proliferation (Hu et al., 2014). Abbildung 5 zeigt vereinfacht die ant/agonistische Wirkung von Ang-1/-2 am Tie2-Rezeptor im Überblick als Schema.

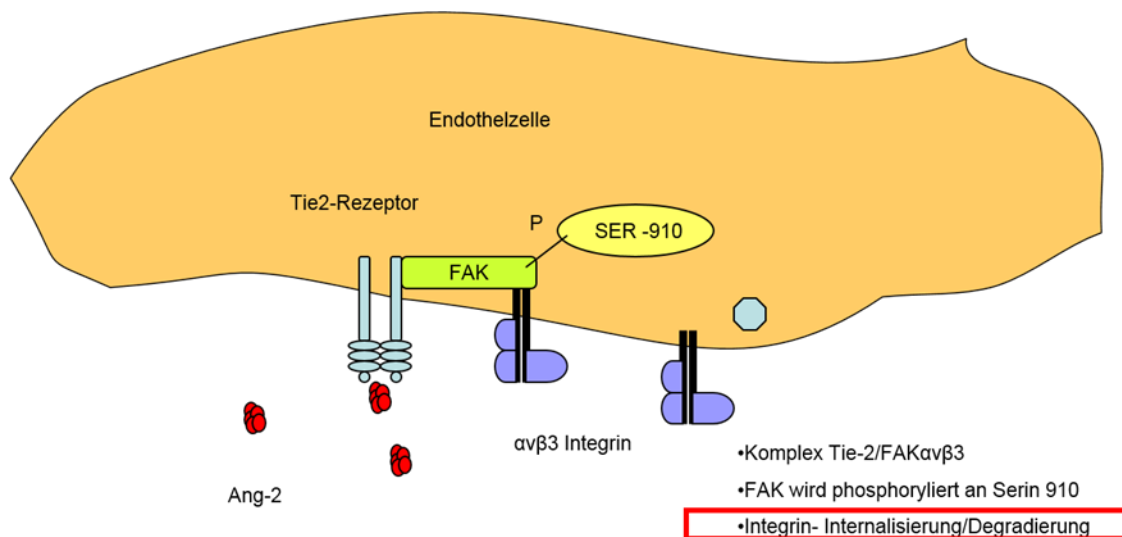


**Abbildung 5: Antagonistische Wirkung von Ang-1/Ang-2 am Tie2- Rezeptor, Ang-1 am Tie2- Rezeptor bedingt Gefäßstabilität. Die Bindung von Ang-2 an dem Tie2-Rezeptor wirkt gefäßdestabilisierend und proangiogen.**

Einige Arbeiten konnten in der Vergangenheit zeigen, dass Ang-2 unter bestimmten Bedingungen proangiogen wirken kann (Koh et al., 2002; Parikh et al., 2006; Daly et al., 2006; Felcht et al., 2012b; Daly et al., 2013). Diese bestimmten Bedingungen umfassen beispielsweise sehr hohe Konzentrationen von Ang-2 (Koh et al., 2002) oder die Abwesenheit des hochaffinen Angiotensin-Rezeptors Tie2. Dies kann auch Endothelzellen betreffen (EC Tie2<sup>low</sup>) (del Toro et al., 2010; Felcht et al., 2012b). Kürzlich konnte der Nachweis erbracht werden, dass dies besonders während der sprossenden Angiogenese für die Ausbildung von Tip- und Stalk-/Phalanxzellen wichtig ist (Felcht et al. 2012b). Während Stalk-/Phalanxzellen eine starke Expression von Tie2-Rezeptoren aufweisen, ist auf Tip-Zellen die Tie2-Expression reduziert (del Toro et al., 2010). Dies führt zu unterschiedlicher Signalgebung in Stalk-/Phalanxzellen und Tip-Zellen (Felcht et al., 2012b; Hakanpaa et al., 2015).

In Tie2-exprimierenden Endothelzellen induziert Ang-2-Stimulation eine Komplexbildung zwischen dem Tie2-Rezeptor, FAK (engl.: fokale Adhäsionskinase) und  $\alpha\beta 3$ -Integrin (Thomas et al., 2010). FAK wird an Serin 910 phosphoryliert und es kommt zu einer Integrininternalisierung und Integrindegredierung (Thomas et al., 2010). Da Integrine unter anderem für Zell- und Gewebestabilität verantwortlich gemacht werden (Johnson et al., 2009), könnte die beobachtete Integrininternalisierung gut den gefäßdestabilisierenden Effekt von Ang-2 erklären (Thomas et al., 2010; Scharpfenecker et al., 2005; Benest et al., 2013). Damit lassen

sich die beobachteten Veränderungen im inneren Anteil des Gefäßnetzes i.S. von Phalanxzellen gut erklären. Der molekulare Signalweg, der möglicherweise für die Gefäßdestabilisierung verantwortlich gemacht werden könnte, wird in Abbildung 6 vereinfacht zusammengefasst.



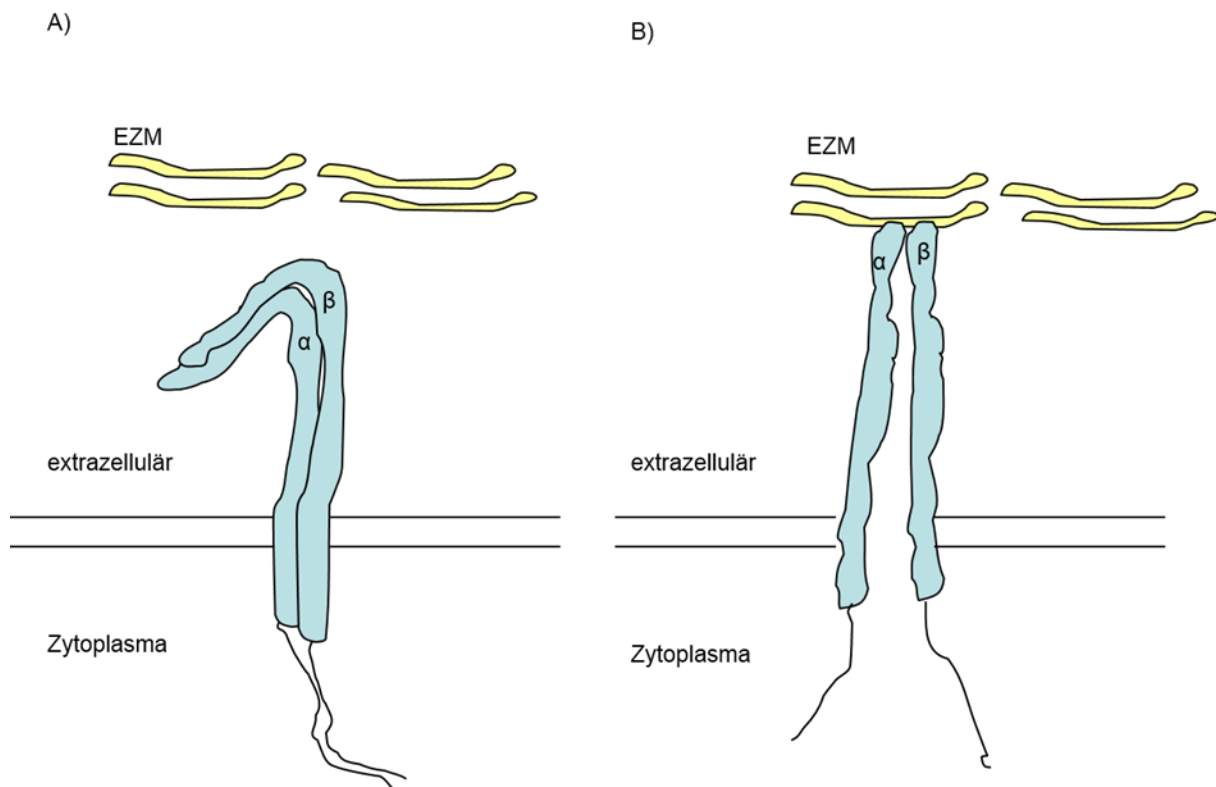
**Abbildung 6: Ang-2 Stimulation der EC induziert  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  Integrin-Internalisierung und Degradierung,** In Tie2-exprimierenden Endothelzellen induziert Ang-2-Stimulation eine Komplexbildung zwischen dem Tie2-Rezeptor, FAK und  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin. FAK wird an Serin 910 phosphoryliert, so kommt es zu einer Integrininternalisierung und Integrindegradierung (aufbauend auf Publikation Thomas, Felcht JBC 2010).

Daneben wurde kürzlich beschrieben, dass eine Ang-2 Stimulation auch in Anwesenheit von Tie2 proangiogen wirken kann (Daly et al., 2013). Dieser Tie2-abhängige Effekt könnte in Stalk-Zellen zum Tragen kommen und bisher noch nicht bis ins Detail untersuchte Voraussetzungen benötigen (pH-Wert, lokal gesteigerte Ang-2-Akkumulation intraluminal im Gefäß). Gesichert ist, dass Ang-2 in der Tie2<sup>low</sup> EC Migration und Aussprossung fördert (Felcht et al., 2012b). Mehrere Arbeiten konnten zeigen, dass Tip-Zellen keinen Tie2-Rezeptor exprimieren, so dass hier ein Ang-2-abhängiger und Tie2-unabhängiger Effekt zum Tragen kommt (del Toro et al., 2010; Felcht et al., 2012b; Hakanpaa et al., 2015). Es zeigte sich jedoch, dass Tip-Zellen unterschiedliche angiogene Integrine (u.a.  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ ,  $\alpha\text{v}\beta\text{5}$  und  $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ ) exprimieren und Ang-2 in der Abwesenheit von seinem Rezeptor Tie2 an angiogene Integrine binden kann (Desgrosellier and Cheresh, 2010; Sun et al., 2010; Felcht et al., 2012b; Hakanpaa et al., 2015).

#### 1.4.4 Integrine

Integrine gehören zu den Transmembranproteinen. Als Adhäsionsmoleküle sind Integrine wichtig für Zell-Zell Verbindungen und für eine Bindung mit der Extrazellulärmatrix (EZM) (Kechagia et al. 2019). Sie sind sowohl für die Stabilität von Geweben verantwortlich als auch für die Migration und für die Signaltransduktion in die Zelle (Johnson et al., 2009).

Sie werden in eine Familie aus 24 heterodimeren Membranrezeptoren zusammengefasst und bestehen je aus einer der  $18\alpha$ - und einer der  $8\beta$ - Untereinheiten (Barczyk et al., 2010). Zahlreichen Integrinen wird eine Bedeutung für die Angiogenese zugeschrieben. Diese sind u.a.  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha6\beta1$ ,  $\alpha6\beta4$ ,  $\alpha9\beta1$  und die Fibronektin-bindenden Integrine  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha5\beta1$  und  $\alpha\beta5$  (Avraamides et al., 2008). Fibronektin ist ein extrazelluläres Matrix-Protein mit der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure, die als RGD-Sequenz bezeichnet wird. Die RGD Sequenz stellt die häufigste Bindungsdomäne der drei Integrine  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta3$  dar. Die Integrine  $\alpha1\beta1$  und  $\alpha2\beta1$  binden dagegen an Laminin und Kollagen (Avraamides et al., 2008). Integrinaktivität wird u.a. durch Konformitätsänderung reguliert. Man unterscheidet eine aktive und eine inaktive Form der Integrine (siehe Abbildung 7).

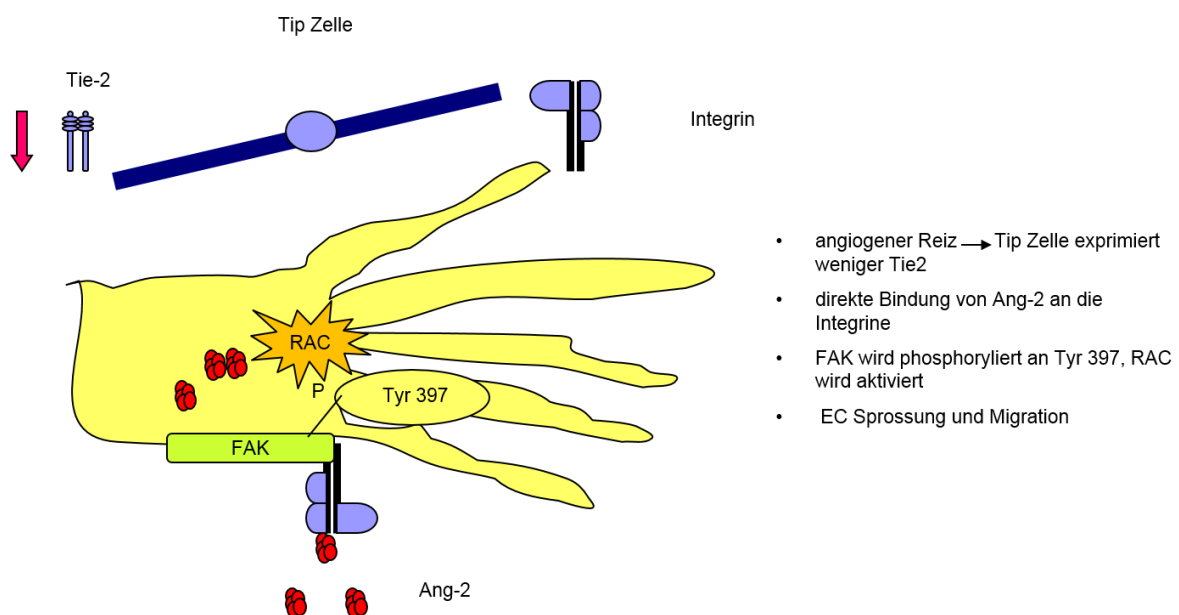


**Abbildung 7: Modell der Integrinaktivierung** **A)** inaktive Form der Integrine, die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten in enger Verbindung. **B)** aktive Form der Integrine, nach Ligandenbindung klappmesserartiges aufrichten der Untereinheiten. (Abbildung modifiziert nach Avraamides et al., 2008)

Man geht davon aus, dass Integrine während der Angiogenese im aktiven Konformer vorliegen. Dieser Prozess kann durch verschiedene Zytokine und Faktoren ausgelöst werden, wie beispielsweise durch Stimulation mit VEGF oder durch Scherkräfte (Tzima et al., 2001.; Mahabeleshwar et al., 2007). In der inaktiven Form der Integrine stehen der extra- und der intrazelluläre Anteil der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten der Integrine in enger Verbindung zueinander (Beglova et al., 2002; Lu et al, 2001; Arnaout et al., 2005; Avraamides et al., 2008). Nach der Bindung eines Liganden folgt die Trennung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sowohl extra- als auch intrazellulär. Der extrazelluläre Anteil verlängert sich durch Aufrichten klappmesserartig, wodurch es zu einer Verbindung mit der EZM (EZM= Extrazellulärmatrix) kommt (Abbildung 7) (Beglova et al.,2002; Lu et al., 2001; Arnaout et al., 2005). Diese Abläufe bilden wahrscheinlich die Grundlage für Integrin-vermittelte Zellmigration und so letztlich auch für die Angiogenese (Avraamides et al., 2008). Angiopoietine können direkt an drei angiogene Integrine ( $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  und  $\alpha v\beta 5$ ) binden (Carlson et al., 2001; Felcht et al., 2012b; Koh, 2013; Hakanpaa et al., 2015). Die Affinität ist jedoch im Vergleich mit dem Tie2-Rezeptor schwach, so dass man davon ausgehen kann, dass Ang-2 in der Anwesenheit von Tie2 primär diesen bindet, nicht aber die Integrine (Felcht et al.,

2012b). Darüber hinaus wird die Ang-2 Bindung über den pH-Wert reguliert. Die Ang-2-Integrinbindung ist verstärkt im sauren Milieu, wie es während der Angiogenese vorherrscht. Daneben konnte gezeigt werden, dass Metallionen-bindende Bindungsbereiche (engl.: metal-ion-dependent adhesionsite (MIDAS)) für eine Ang-2 Integrinbindung notwendig sind und die Bindung von Ang-2 an Integrine durch Zugabe von  $Mn^{2+}$  verstärkt wird (Felcht et al., 2012b). Die genaue Bindungssequenz von Ang-2 an Integrine ist jedoch nicht bekannt. Erste Studien deuten jedoch daraufhin, dass Ang-2 ähnlich wie Ang-1, extrazellulär an Integrine bindet (Felcht et al., 2012b; Carlson et al., 2001; Serini et al., 2008; Cascone et al., 2005).

Generell ist bei Integrinen sowohl eine inside-out- als auch eine outside-in-Signalgebung möglich (Zou et al., 2007). Da Ang-2 an den extrazellulären Anteil von Integrinen bindet (Felcht et al., 2012b), kann man von einer outside-in-Signalgebung ausgehen. Da der zyttoplasmatische Anteil der Integrine selbst keine enzymatische oder Kinaseaktivität besitzt, ist die Signaltransduktion abhängig von der Formierung eines Signalkomplexes. Ein Bestandteil ist neben vielen Adapterproteinen und verschiedenen Proteinkinasen (z.B. Paxillin, Src) auch die fokale Adhäsionskinase (FAK; engl.: fokal adhesion kinase) (Avraamides et al., 2008).



**Abbildung 8: Reaktionsschritte an der Tip-Zelle,** auf einen angiogenen Reiz hin wird Tie2 in der Tip-Zelle herunter reguliert (im Bild oben schematisch). Ang-2 bindet nun direkt an die Integrine. FAK wird phosphoryliert (P) an Tyrosin397 und RAC wird aktiviert, worauf die Endothelzelle sprossen und migrieren kann.

In Tie2<sup>low</sup> EC bindet Ang-2 direkt an die Integrine und induziert Phosphorylierung von FAK. Auch in diesem Fall wird also FAK phosphoryliert, allerdings nicht an Serin910, sondern an Tyrosin397. Zusätzlich lässt sich RAC Aktivität nachweisen, die gut mit dem beobachteten promigratorische Effekt korreliert (Felcht et al., 2012b). Abbildung 8 fasst die vermuteten Schritte nochmals zusammen und veranschaulicht den Zusammenhang zwischen der Herunterregulation des Tie2-Rezeptors und der daraus resultierenden direkten Bindung von Ang-2 an die Integrine.

Diese Beobachtungen sind jedoch alle bisher insbesondere unter physiologischen Bedingungen gemacht worden. Ob Ang-2 Integrin-vermittelte Effekte während der Tumorangio-genese hat, bleibt zu klären.

#### 1.4.5 Angiogenese beim PCBCL

Bisher wurde nur in zwei kleineren Arbeiten untersucht, ob sich das Gefäßnetz bei PCBCL verändert (Schaerer et al. 2000). In der Arbeit aus der Arbeitsgruppe von Werner Kempf wurde gezeigt, dass beim PCBCL im Vergleich zum B-Zell Pseudolymphom die Angiogenese erhöht ist (Schaerer et al. 2000).

Marion Wobser et al. konnte zeigen, dass die Gefäßdichte und die Expression von VEGF bei PCLBCL, LT im Vergleich zu indolenten PCBCL erhöht sind. Bisher wurde noch nicht untersucht ob sich das Angiopoietin System bei indolenten PCBCL und PCBCL. LT unterscheidet.

Deshalb war das Ziel der vorgelegten Arbeit Angiopoietin-2 und Angiopoietin-1 induzierte Signalgebung zwischen indolenten PCBCL und PCBCL, LT zu vergleichen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Biochemikalien

**Tabelle 3: Häufig verwendete Biochemikalien**

Biochemikalien	Bemerkung	Hersteller, Ort
TE-Puffer	Zusammensetzung	Eigene Herstellung
	10 mM Tris	
	1 mM EDTA	
	pH 8,0	
TBS	Zusammensetzung	Eigene Herstellung
	150 mM NaCl	
	10 mM Tris	
	pH 7,2	
	0,01 % Tween 20	
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Zusammensetzung	Eigene Herstellung
	137 mM NaCl	
	8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	2,7 mM KCl	
	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	pH 7,4	



## 2.1.2 Antikörper

**Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper**

Antikörper, Fluorochrom	Antigen/Epitop	Klone/Hersteller
Alphavbeta3	Integrin alphaV beta3	Chemicon MAB1976, clone LM609
Alpha5beta5	Integrin alpha5 beta5	Chemicon MAB1961, clone P1F1
Alpha5beta1	Integrin alpha5 beta1	Chemicon MAB 1969
Tie-2 (C-20)	Tie2 (C-Terminus)	Santa Cruz Sc324
CD34	CD34	Novocastra Prod.No. NCL-END Klon QBEnd/10

**Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper**

Antikörper, Fluorochrom	Antigen/Epitop	Hersteller
Streptavidin-Alexa488, Fitc		Molecular Probes Cat. No.S11223 1mg
Streptavidin-Alexa546, Cy3		Molecular Probes Cat. No.S11225 1mg
Goat biotinylated anti- rabbit ,ACE	Rabbit	Zymed bzw. Invitrogen Histostain-SP Kit Cat.No.95-6143

**Tabelle 6: Verwendete Reagenzien und Analysesets**

Reagenzien/ Analyseset		Hersteller
Zenon rabbit IgG labelling kit	Rabbit	Molekular Probes Cat.No.Z-25342
Biotin-Blocking System Ready-to-use Biotin/Avidin-Solution		Dako Code Nr. X0590 Product No. X059030-2
Goat Serum ready-to-use		Zymed
10% normal Ziegenserum Blocking Solution		Invitrogen Cat. No. 50-062Z 100ml
MOM Kit		Vector Laboratories, BMK-2202 Cat. No. PK-2200
Proteinkinase K		Qiagen 10 ml Cat No 19133
Fluorescence Mounting Medium		Dako Code Nr.S3023 Product No. S302380-2
Roti-Liquid Barrier Marker		Roth An92.1(rot)
Human Angiopoietin-2 Immunoassay (ELISA-Kit)		R&D, DANG20 Quantikine®
Human Angiopoietin-1 Immunoassay (ELISA-Kit)		R&D, DANG10 Quantikine®
Human Tie-2 Immunoassey (Elisa-Kit)		R&D, DTE200 Quantikine®
Xylol (Isomere)		ROTIPURAN® ≥99 %, p.a.,Roth Artikelnummer: 4436

### 2.1.3 Patienten

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden Hautbiopsien von 51 gut charakterisierten PCBCL Patienten verwendet.

Die Seren für die ELISA Untersuchungen wurden aus Vollblut von je drei Patienten mit PCFCL, PCMZL und PCLBCL, LT, sowie fünf gesunder Probanden gewonnen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Immunhistochemische dreifach Färbung von Integrin-CD34-Tie2

Generell können mit der Immunhistochemie Peptide und Proteine durch Antikörper nachgewiesen werden. Es lässt sich primär eine Aussage zur Lokalisation des untersuchten Peptids / Proteins treffen. Quantitative Aussagen über die Expressionsstärke sind möglich, jedoch sind hierbei insbesondere gleichbleibende Konditionen bei der Bildaufnahme die Voraussetzung. Die untersuchten Hautbiopsien wurden nach der Entnahme alle in Formalin (entspricht einer wässrigen, etwa 40%igen Formaldehydlösung) fixiert, um die ursprüngliche histologische Struktur der Gewebeproben zu erhalten. Danach folgte die Einbettung der Präparate in Paraffin. So ist es dann möglich, mit Hilfe eines Mikrotoms nur wenige Mikrometer dünne Schnitte anzufertigen, die auf Glasobjektträger aufgebracht werden, um nachfolgend untersucht werden zu können. Für aufbauende immunhistochemische Studien sind zunächst eine Entparaffinierung und eine Freilegung der Antigene notwendig. Dies kann durch Alkoholbäder in unterschiedlichen Konzentrationen erzielt werden. Hierfür wird die Gewebeprobe auf dem Glasobjektträger in einer entsprechenden Haltevorrichtung platziert und in einer Glasküvette mit verschiedenen flüssigen Medien vollständig benetzt. Zunächst beginnend mit Xylol ( $\geq 99\%$ ) für zweimal fünf Minuten, danach für je einmal fünf Minuten Ethanol 99 %, 80 %, 70%. Zuletzt folgt ein Waschschrift in destilliertem Wasser für zwei Minuten. Zur Abgrenzung der verschieden aufgebrauchten histologischen Gewebeproben auf den Objektträgern wurde ein Barriere- Marker verwendet.

Bei der Nutzung von in Formalin fixierten und danach in Paraffin eingebetteten Geweben ergibt sich der entscheidende Vorteil der deutlich besseren Strukturhaltung. Jedoch kann es durch diese Behandlung zu Proteinvernetzungen der Antigene kommen, die sich dann nicht mehr detektieren lassen. Durch eine enzymatische Vorbehandlung mit Proteinase K (20 mg/ml) für sechs Minuten bei 37°C im Brutschrank können diese Vernetzungen aufgebrochen werden und die Antigene liegen in demaskiertem Zustand vor.

Bei dieser, hier zur Anwendung kommenden Gewebe-Färbung, handelt es sich um eine markierte (Strept-) Avidin-Biotin-Methode. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin (Protein das vom Bakterium *Streptomyces avidinii* produziert wird) und Avidin (Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß) für Biotin (Vitamin H). Zur Detektion der verschiedenen Antigene kommen Antikörper zur Anwendung,

die mit Biotin und Avidin markiert sind. Um später die entsprechenden Proteine eindeutig identifizieren zu können, ist es notwendig, unspezifischen Hintergrund zu vermeiden. Hierzu werden die Schnitte zweimal für drei Minuten in TBS überschichtet und mit Hilfe eines Schüttlers kontinuierlich und gleichmäßig gewaschen. Nach 10 Minuten Inkubation mit Avidin-Lösung bei Raumtemperatur wiederholt man diesen Waschschrift, um danach wieder für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit der Biotin-Lösung zu inkubieren. Darauf folgt erneutes Waschen mit TBS unter gleichmäßigen rotierenden Bewegungen mit Hilfe des Schüttlers. Für die weiteren Detektiosschritte werden Antikörper gegen Mausepitope verwendet. Zunächst ist aber ein weiterer Blockierungsschritt mit dem M.O.M-Kit (Vector Laboratorien, INC, U.S.) nach Angaben des Herstellers zum Absättigen unspezifischer Bindungen notwendig.

In dieser Zeit sollte die erste Antikörpermischung hergestellt werden (Mouse anti-human CD34 1:50 in M.O.M. diluent). Nach fünf Minuten Inkubation verwirft man die Blockierungslösung. Danach werden 30 µl der hergestellten CD34-Antikörpermischung auf die Schnitte pipettiert. Nach Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgt ein erneuter Waschschrift für zweimal zwei Minuten mit TBS. Nach weiteren zehn Minuten bei Raumtemperatur gibt man nun das biotinylierte anti-mouse IgG aus dem M.O.M.-Kit (z.B. 5 µl in 12,5 ml PBS) hinzu. Nach einem erneuten Waschschrift mit TBS für zwei mal zwei Minuten und der Zugabe des Sekundärantikörpers Streptavidin-Alexa 488 (1:200 in PBS), kann sich dann nach 30 Minuten bei Raumtemperatur das erste Antigen CD34, welches ein spezifischer Gefäßmarker ist, detektieren lassen. Auch hier nutzt man die starke spezifische Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin. Nach einem neuen Waschschrift mit TBS, diesmal für dreimal fünf Minuten, folgt das erneute Blocken des endogenen Avidins und Biotins für jeweils weitere zehn Minuten wie oben schon beschrieben.

Zur Detektion des zweiten Antigens, Tie2, müssen zunächst abermals unspezifische Bindungen an die der Sekundärantikörper binden würde, blockiert werden. Dazu werden unspezifische Antigene durch Inkubation mit Ziegenserum für eine Stunde bei Raumtemperatur (ready-to-use der Firma Zymed) abgesättigt. Danach schließt sich die Inkubation mit dem Primärantikörper rabbit anti-mouse/human Tie2 (C-20) an. Sie erfolgt in der Verdünnung 1:100 in 1:3 Ziegenserum in PBS. Dieser Reaktionsschritt wird über Nacht im Kühlraum bei 4°C vollzogen.

Am nächsten Tag müssen die Proben von der Antikörperlösung befreit werden. Hierzu werden die Objektträger mit den Proben zunächst für fünf Minuten dreimal in TBS gewaschen. Danach erfolgt die Inkubation mit dem biotinylierten Zweitantikörper goat

biotinylated anti-rabbit (ready-to-use der Firma Zymed) für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen für zweimal fünf Minuten in TBS wird zur Detektion mit Streptavidin-Alexa 546 in der Verdünnung 1:250 in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach wieder in TBS gewaschen.

Das dritte Antigen, welches in dieser Färbung detektiert werden kann ist jeweils ein Integrin, z.B. das AlphaVBeta5-Integrin. Um Kreuzvernetzungen durch Zugabe weiterer Sekundärantikörper zu verhindern, wird dieser Antikörper vor Inkubation mit dem Schnitt bereits an einen fluoreszierenden Farbstoff gebunden. Im ersten Schritt werden biotinylierte Fab-Fragmente, die direkt an den Fc-Teil des nicht markierten Primärantikörper binden, zugegeben und inkubiert für 5 Minuten (1 µg AlphaVBeta5 add 5 µl Zenon Rabbit IgG Labeling Kit Component A). Danach gibt man 5 µl des Component B zum Blocken unspezifischer Bindungen zu. Nach weiterer fünfminütiger Inkubation wird dieser Antikörpermix in 10 % Ziegenserum mit 1 % BSA in PBS aufgenommen, auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C im Kühlraum oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

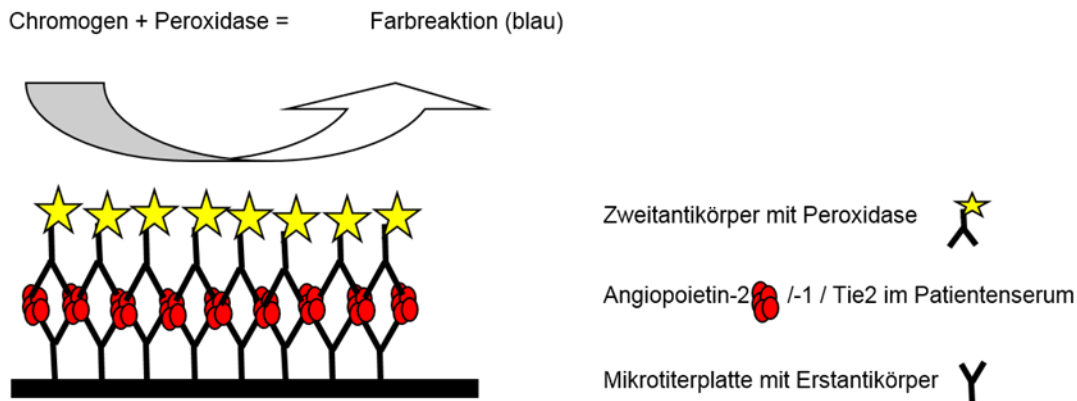
Nach dieser Inkubation werden die Schnitte für dreimal fünf Minuten in TBS gewaschen und danach in Fluorescent Mounting Medium eingedeckt. Die so behandelten Schnitte sind nun für die Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop vorbereitet und für ca. vier Monate stabil.

### 2.2.2 Angiopoietin-1/-2-/Tie2-ELISA

Das Reaktionsprinzip bei einem ELISA (engl.: enzyme linked immuno sorbent assay) besteht aus einer Antigen-Antikörper-Komplexbildung. Zunächst wird hierzu ein Erstantikörper an eine feste Phase, z.B. an Mikrotiterplatten, gebunden. Die Mikrotiterplatte wird mit dem zu untersuchenden Reaktionspartner (= Antigen= Ligand) überschichtetet. Bei passenden Reaktionspartnern kommt es zu einer nicht sichtbaren Antigen-Antikörper-Reaktion. Überschüssige oder nicht gebundene Antigene werden in den folgenden Waschschritten herausgewaschen. Danach erfolgt die Zugabe eines Zweitantikörpers, der mit einem Enzym, häufig Peroxidase, gekoppelt ist („Sandwich-Prinzip“, siehe Abbildung 9). Dieser bindet an das bereits vom Erstantikörper gebundenen Antigen. Nach Zugabe des Peroxidase-Substrates katalysiert die Peroxidase die Spaltung eines zugegeben Substrates, was zu einer Farbreaktion führt. Die enzymatische Farbreaktion ist nach wenigen Minuten mit dem bloßen Auge erkennbar und kann mittels Photometrie quantitativ detektiert werden.

Die Patientenserum, die möglicherweise unsere zu detektierenden Antigene enthalten, werden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Am Untersuchungstag werden die Seren frisch und langsam auf Eis aufgetaut. Außerdem ist es wichtig, alle benötigten Reagenzien, welche bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert sind, vor Beginn des ELISA und deren Benutzung auf Raumtemperatur zu bringen, um gute Reaktionsbedingungen zu schaffen. Als nächster Schritt erfolgt die Präparation des Angiopoietin-2- (bzw. Angiopoietin-1- oder Tie2) Standards, der im Reagenzienpaket (ELISA-Kit) enthalten ist. Diese Stocklösung wird mit 1 ml deionisiertem Wasser (entsalztem Wasser) gelöst. Diese Startkonzentration von 30.000 pg/ml wird entsprechend der Vorschrift mit dem Calibrator Diluent RD5-5 verdünnt, um die nötigen Standard-Konzentrationen für die Eichgerade zu erhalten. Das Calibrator Diluent RD5-5 dient zusätzlich als Nullwert des Standards. Danach erfolgt die Herstellung einer adäquaten Menge Waschpuffer für die insgesamt acht Waschschriffe. Hierzu werden 20 ml des Waschpufferkonzentrates in 500 ml deionisiertem Wasser gelöst. Die Proben werden jeweils in einer 1:5 Verdünnung (50  $\mu\text{l}$  Probe+200  $\mu\text{l}$  Calibrator Diluent RD5-5) in dem Calibrator Diluent, in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen angesetzt und weiter auf Eis gelagert. In jede halbkugelartige Vertiefung (Kavität) der Mikrotiterplatte werden 100  $\mu\text{l}$  Assay Diluent RD1-76 vorgelegt und je 50  $\mu\text{l}$  Standard, Kontrolle oder Probe dazu pipettiert. Die Platte wird dann mit dem im Kit enthaltenen Klebestreifen verschlossen und für zwei Stunden auf einem Schüttelinkubator mit 500 rpm (engl.: rpm= rounds per minute= Upm= Umdrehungen pro Minute) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgt der erste Waschschriff mit dem angesetzten Waschpuffer mit viermal 400  $\mu\text{l}$  in jede Kavität der Mikrotiterplatte. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Angiopoietin-2/-1-/Tie2-Conjugate zu jedem Reaktionsansatz in der Mikrotiterplatte und nach Verschluss mit dem Klebestreifen, erfolgt erneut eine Inkubation für zwei Stunden auf dem Schüttelinkubator bei Raumtemperatur. In den letzten 15 Minuten dieser Inkubationszeit wird die Substratlösung aus dem Color Reagent A und Color Reagent B im Verhältnis 1:1 angesetzt. Die Substratlösung muss bis zum Gebrauch lichtgeschützt gelagert werden. Nach erneutem viermaligem Waschen werden je 200  $\mu\text{l}$  Substrat Solution pro Reaktionsansatz in der Mikrotiterplatte zugegeben und die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur und lichtgeschützt auf der Arbeitsplatte ruhig stehend inkubiert. Nach dieser Zeit kann man eine blaue Farbreaktion beobachten. Zum Stoppen der Reaktion werden 50  $\mu\text{l}$  Stop Solution in jede Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert. Der Farbumschlag von blau zu gelb markiert das Reaktionsende. Innerhalb von 30 Minuten wird die Absorption als Maß der

vorhandenen Konzentration an Angiopoietin-2/-1/Tie2 im Photometer bei 450 nm gemessen (Korrekturfaktor  $\lambda=540$  oder 570 nm). Die Beschreibung des ELISA erfolgte explizit am Beispiel des Angiopoietin-2-ELISA. Bei der Durchführung ist jeweils nach der vom Hersteller ELISA-spezifischen Vorschrift für Angiopoietin-1 bzw. Tie2 verfahren worden.



**Abbildung 9: Generelles Prinzip des ELISA:** Ein Erstantikörper ist an eine feste Phase gebunden. Nach Überschichten mit dem Reaktionspartner bindet das gesuchte Antigen an den Erstantikörper. Ein mit dem Enzym Peroxidase gekoppelter Zweitantikörper bindet an eine andere Stelle des Antigens. Nach Zugabe des Peroxidase- Substrates (ein Chromogen, in diesem ELISA Tetramethylbenzidin), katalysiert die Peroxidase die Spaltung des Substrates, was zu einer Farbreaktion führt. Diese Reaktion kann im Photometer quantitativ bestimmt werden.

### 3. ERGEBNISSE

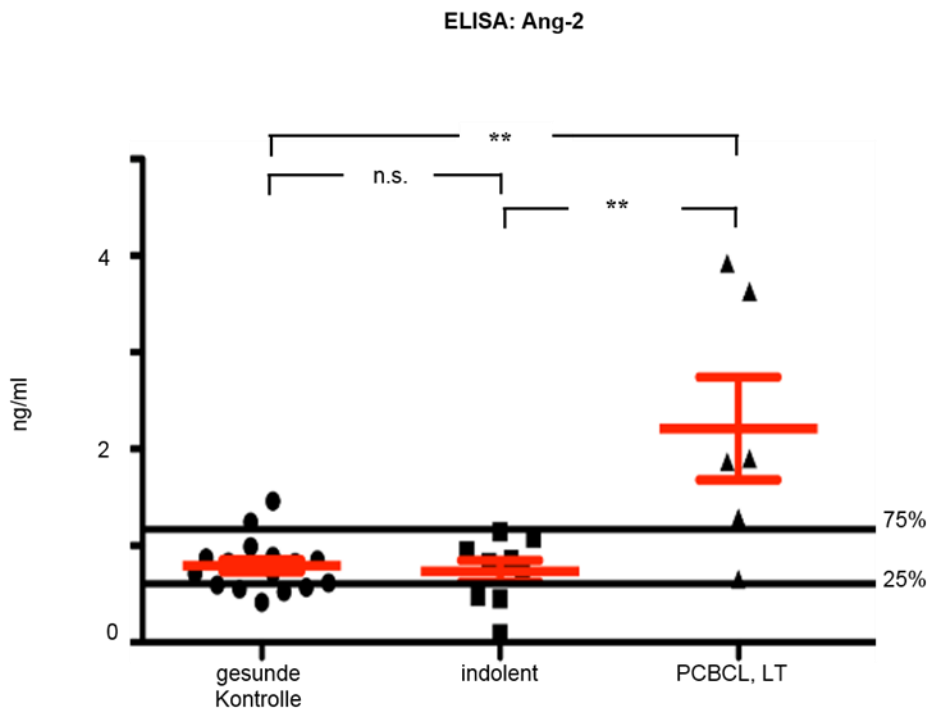
#### 3.1 Angiotensin-2 ist im Serum von PCLBCL, LT Patienten erhöht

Immunhistochemische Analysen von uns und Marion Wobser et al. hatten gezeigt, dass PCLBCL, LT eine höhere Gefäßdichte aufweisen als indolente PCBCL (Wobser et al., 2013; Teichert\*, Stumpf\* et al., 2015). Aufbauend hierauf sollten Microarray Analysen klären, welches Molekül für die Angiogenese beim PCBCL wichtig sein könnte. Hierfür wurde eine Spearman – Korrelationsanalyse zwischen den Endothelzellmarkern CD31 (PECAM-1), CD34 und VE-cadherin (CDH5) und den angiogenen Molekülen Ang-2 (ANGPTL2) sowie dem Tie2- (TEK) mit Hilfe der Microarray-Technik von Martin Teichert durchgeführt. Die Ergebnisse der Analyse sind in der gemeinsamen Publikation einsehbar (Teichert\*, Stumpf\* et al., 2015)

Die Auswertung der Analysen ergab einen signifikanten Zusammenhang der Expression von Ang-2 (ANGPTL2) sowie dem Tie2- (TEK) Rezeptor und den Pan-Endothelzellmarkern. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass in Tie2<sup>low</sup>-Endothelzellen Ang-2 direkt an die Integrine  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$  und  $\alpha 5\beta 1$  binden kann (Carlson et al., 2001; Felcht et al., 2012b; Koh, 2013; Hakanpaa et al., 2015).

Aufbauend auf den Microarray Analysen wurde die Menge an löslichem Ang-2 Protein in Patientenserum von PCBCL Patienten mittels ELISA Technik ermittelt und mit der Expression von gesunden Probanden verglichen. (Abbildung 10). Es zeigte sich, dass PCLBCL, LT signifikant höhere Ang-2 Spiegel aufweisen als gesunde Kontrollen und Patienten mit einem indolenten PCBCL.

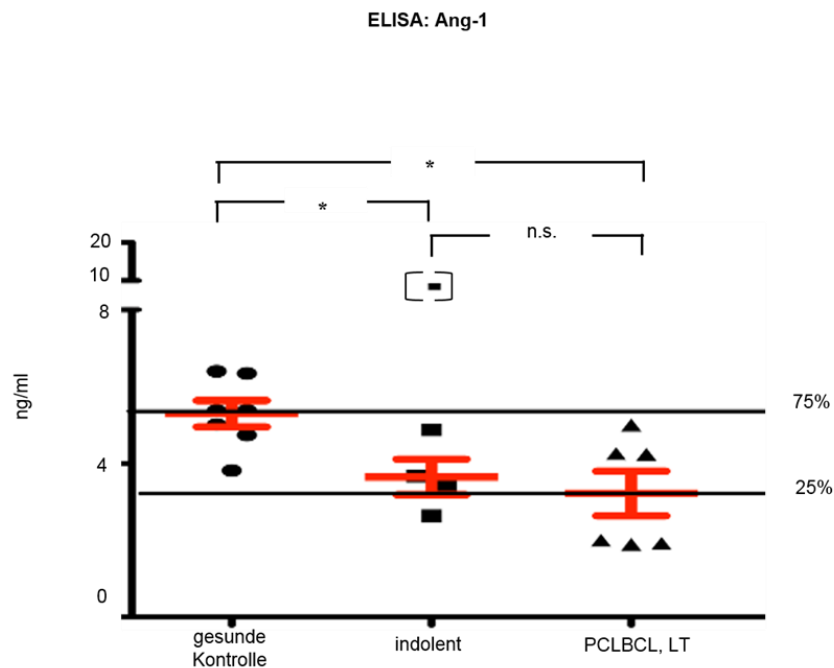




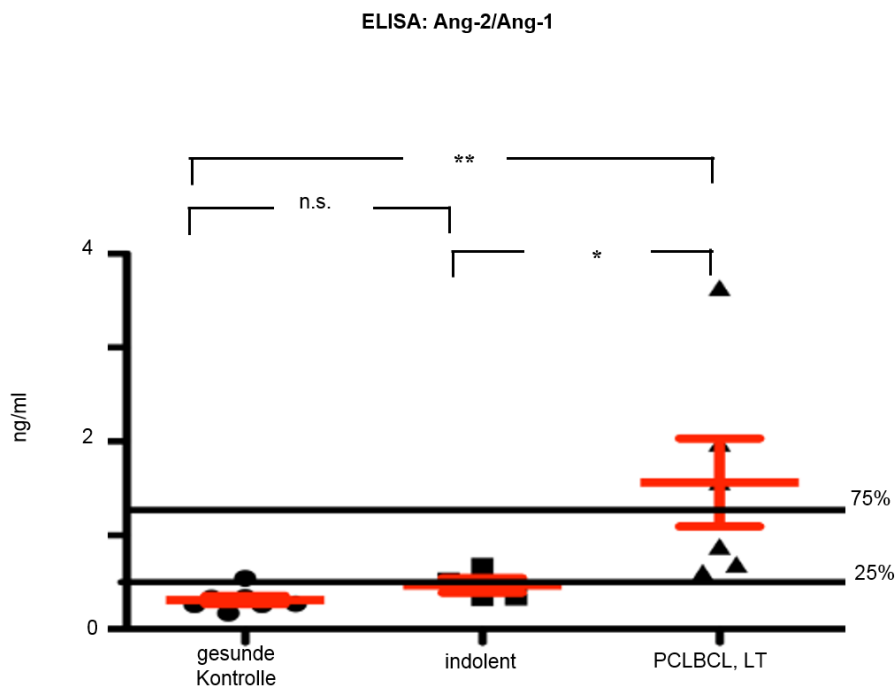
**Abbildung 10: Höhere Ang-2 Mengen im PCBCL, LT:** Die Mengen an Ang-2 wurden Mittels ELISA in 17 Serumproben, 15 gesunder Kontroll- Spender, 9 Proben, von 8 Patienten mit indolentem PCBCL und 6 Proben von 5 Patienten mit PCBCL, LT. bestimmt. Es ergab sich ein deutlich höherer ANG-2 Spiegel in den Serumproben der Patienten mit PCBCL, LT. P-Werte  $** < 0.01$ ; n.s. = nicht signifikant.

### 3.2 Im Serum von PCBCL Patienten lassen sich niedrige Ang-1 Werte nachweisen

Der Effekt einer Ang-2 Stimulation wird beeinflusst von der Expression von Ang-1. Aus diesem Grund wurde in aufbauenden Studien die Expression von Ang-1 mittels ELISA in den gleichen Patientenproben bestimmt und die Ang-1/Ang-2 Ratio gebildet (Abbildung 11 und 12). Die Analyse zeigte, dass PCBCL, LT und indolente PCBCL Patienten signifikant niedriger Ang-1 Spiegel im Blut aufweisen als gesunde Kontrollen (Abbildung 11). Bestimmt man die Ratio zwischen Ang-1 und Ang-2, weisen PCBCL, LT signifikant höhere Werte auf als indolente PCBCL Patienten und gesunde Kontrollen (Abbildung 12).



**Abbildung 11: Niedrigere Mengen an Ang-1 im PCLBCL, LT:** Die Mengen an Ang-1 wurden Mittels ELISA in 7 Serumprobengesunder Kontroll- Spender, 5 Proben, von 4 Patienten mit indolentem PCBCL und 6 Proben von 5 Patienten mit PCLBCL, LT bestimmt. Es ergab sich ein deutlich geringerer ANG-1 Spiegel in den Serumproben der Patienten mit PCLBCL, LT. P-Werte \* <0.05; n.s. =nicht signifikant.



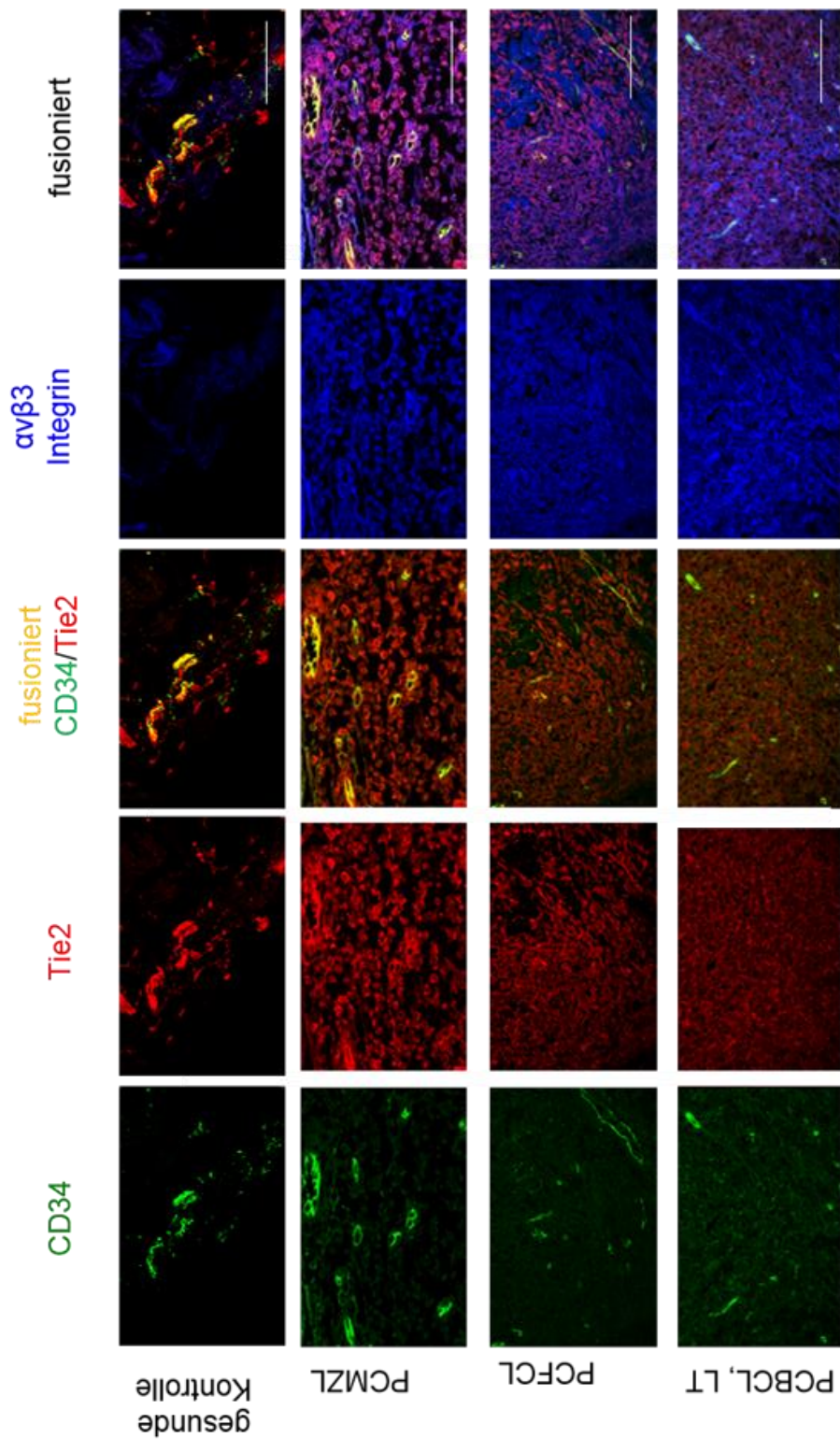
**Abbildung 12: Verhältnis von Ang-2/Ang-1:** Von den Seren 7 gesunder Kontroll-Spender, 4 indolenten und 6 Patienten mit PCLBCL, LT wurde das Verhältnis von Ang-2/Ang-1 bestimmt. Abgebildet sind hier die 25% und 75% Perzentile. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe eines Mann Whitney U Testes durchgeführt. Ein Wert von Ang-1 wurde als Ausreißer gewertet und nicht in die statistische Analyse miteingeschlossen. P-Werte \*\* <0,01; \* <0,05; n.s. =nicht signifikant.

### **3.3 PCBCL enthalten Tie2<sup>low</sup> EC**

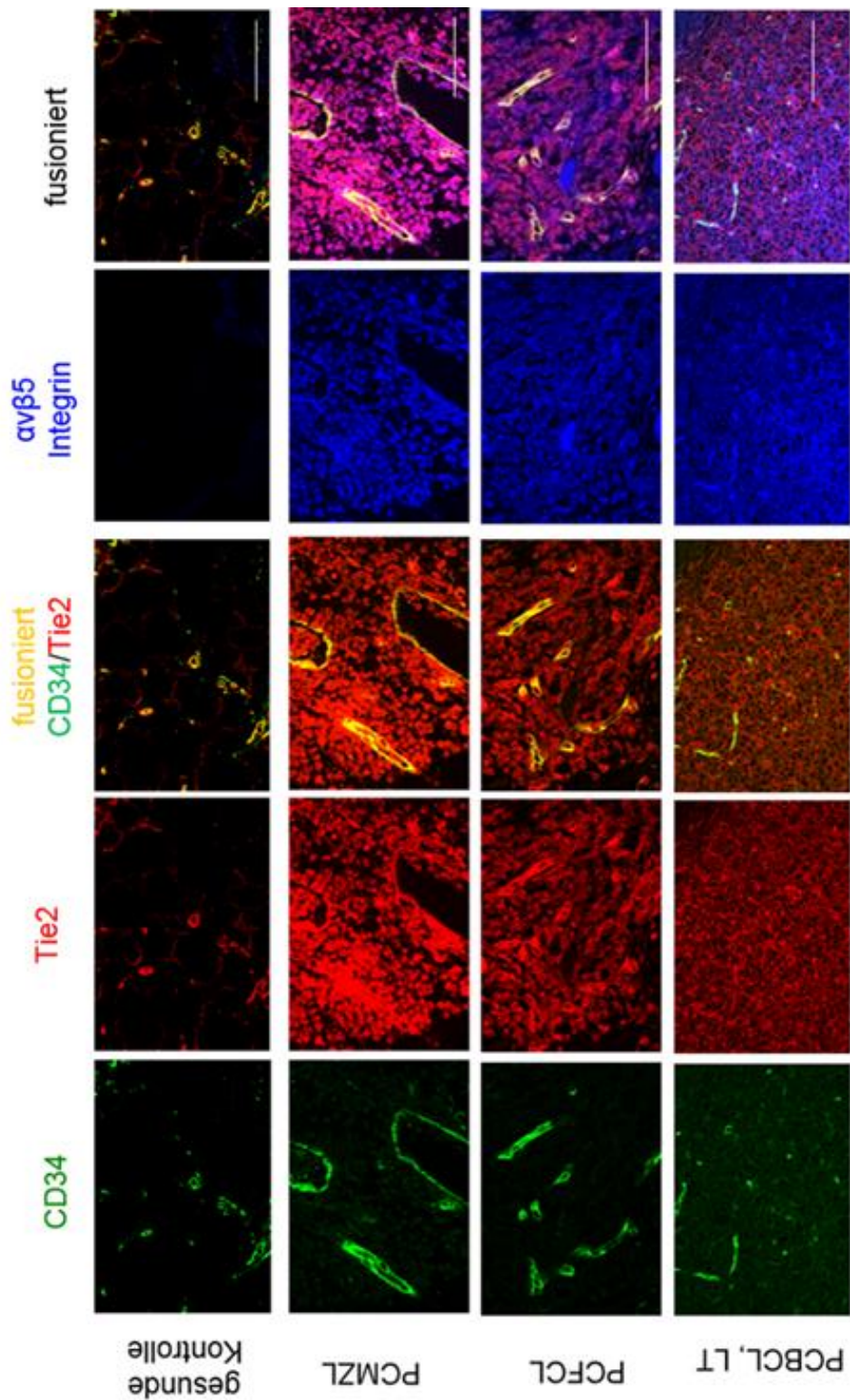
Aufbauende immunhistochemische Studien sollten die Expression des Angiopoietin Rezeptors Tie2 analysieren. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob es bei PCBCL Endothelzellen gibt, die nur geringe Expression von Tie2 Protein aufweisen und diese Endothelzellen die alternativen Bindungspartner  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$  und  $\alpha5\beta1$  Integrine exprimieren. Hierfür wurde eine Immunfluoreszenzfärbungen gegen den Gefäßmarker CD34 und die Angiopoietin-2 Bindungspartner Tie2 und eines der drei Integrine durchgeführt (Abbildungen 13 bis 15). Das Endothel von sieben gesunden Kontrollen, 23 indolenten Fällen und neun PCBCL, LT Fällen wurde analysiert. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mittels konfokalem Leica SP Mikroskop aufgenommen und anschließend mit Image J quantifiziert. Quantifizierende Analysen zeigten, dass sowohl in indolenten PCBCL als auch in PCLBCL, LT Tie2<sup>low</sup> Endothelzellen nachweisbar sind (Abbildung 16).

### **3.4 Das Endothel von PCBCL zeigte starke Expression der drei angiogenen Integrine, $\alpha\beta3$ , $\alpha\beta5$ und $\alpha5\beta1$**

Die visualisierte Immunfluoreszenzfärbung wurde für weitgehende Analysen verwendet, um zu klären, ob das Endothel von PCBCL die drei angiogenen Integrine ( $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$  und  $\alpha\beta1$ ) exprimiert (Abbildung 17). Quantifizierende Analysen mit Image J zeigten, dass alle drei Integrine sowohl vom Endothel der indolenten PCBCL als auch von dem der PCLBCL, LT exprimiert werden. Die Expression ist signifikant höher als in gesunder Haut.

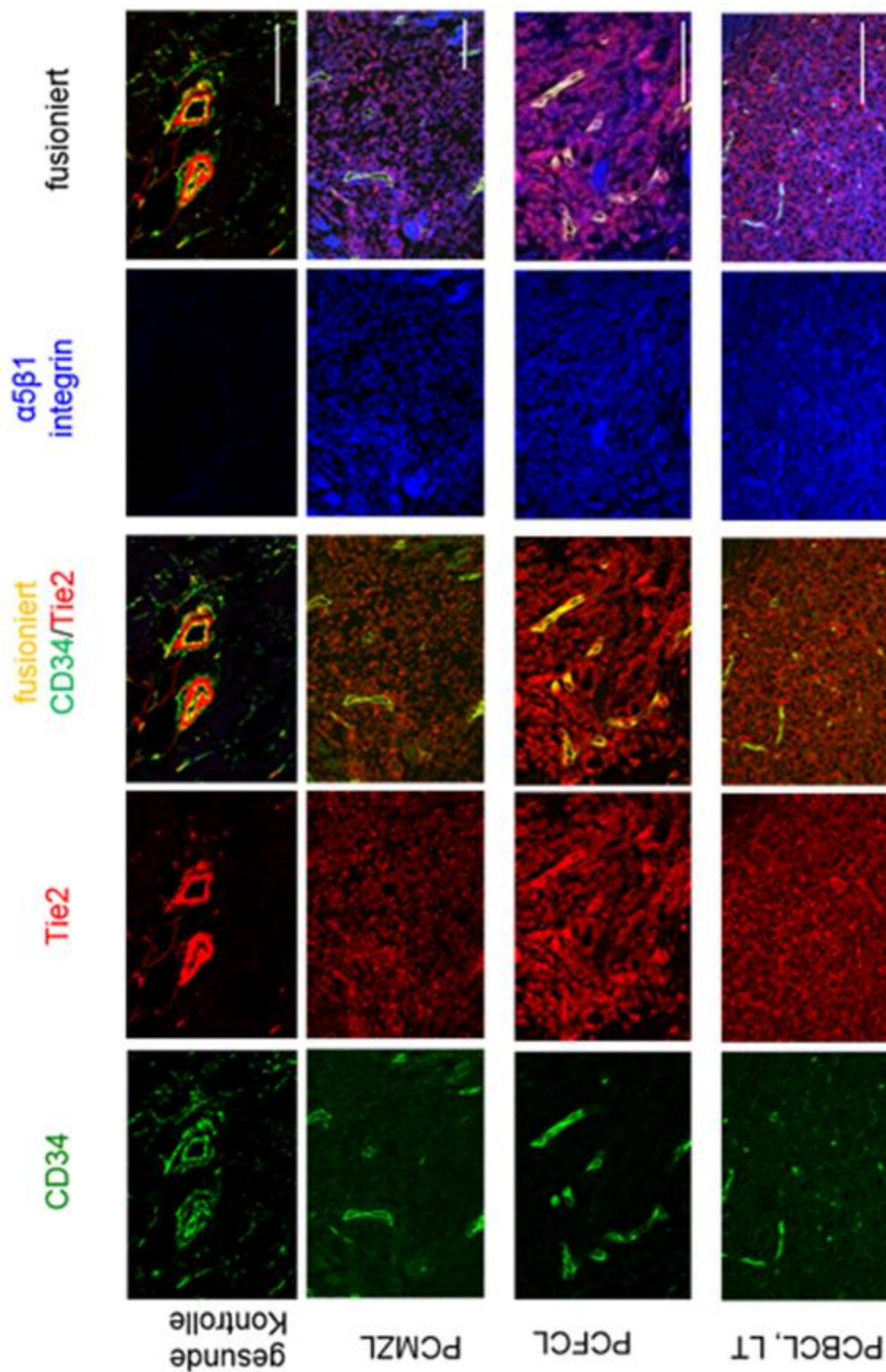


**Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbungen für CD34, Tie2-Rezeptor und  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  Integrin:** Repräsentative Bilder mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommen. Größenstandard 100  $\mu\text{m}$

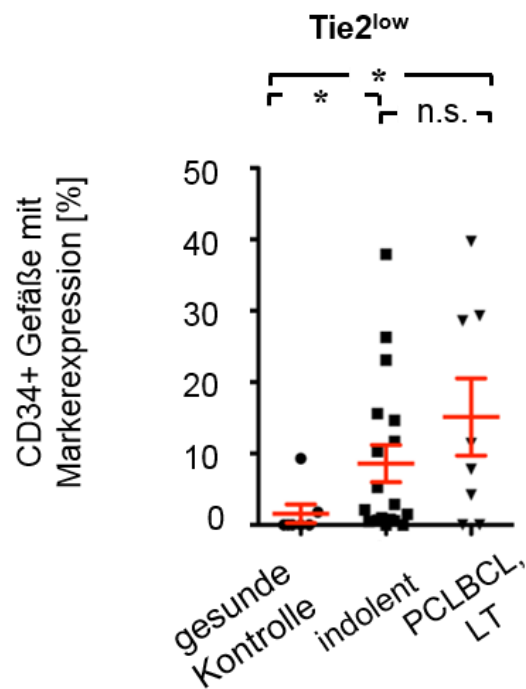


**Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbungen für CD34, Tie2-Rezeptor und  $\alpha\beta 5$  Integrin:** Repräsentative Bilder mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommen. Größenstandart 100  $\mu\text{m}$ .

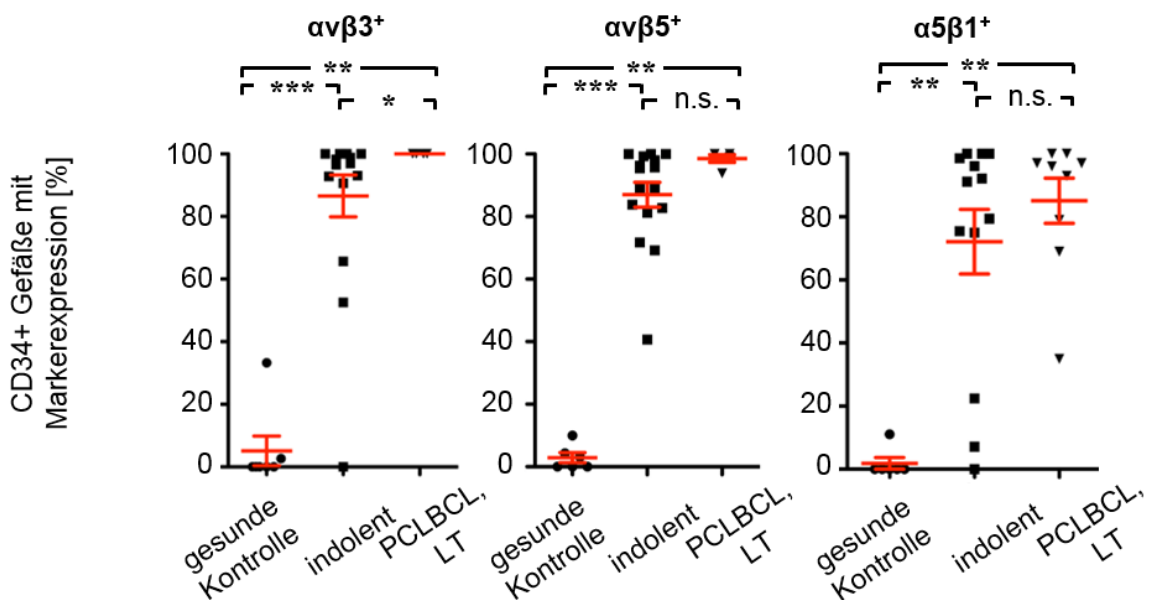




**Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbungen für CD34, Tie2-Rezeptor und  $\alpha 5\beta 1$  Integrin:** Repräsentative Bilder mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommen. Größenstandard 100  $\mu\text{m}$



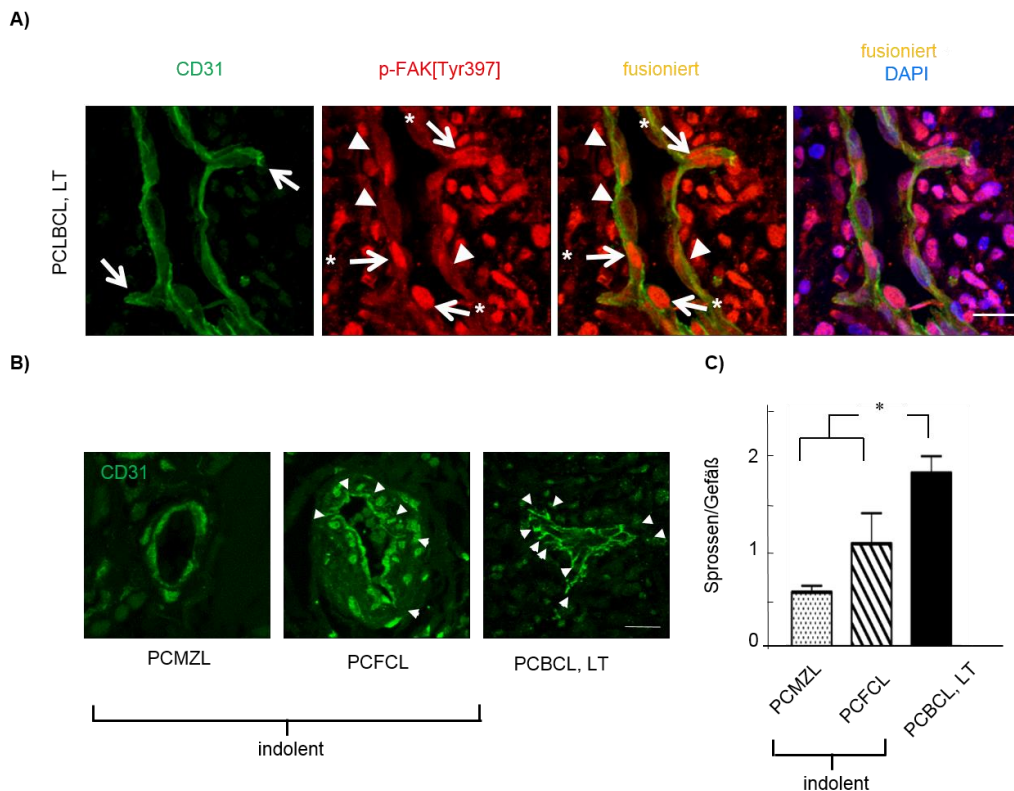
**Abbildung 16:  $Tie2^{low}$  exprimierende Gefäße wurden quantifiziert mit einem Quantifizierungsprogramm (Fiji).** Es dokumentierte sich eine reduzierte Menge an  $Tie2^{low}$  EC im PCLBCL, LT. Mann Whitney Test, P-Werte<sup>\*\*\*</sup><0.001; <sup>\*\*</sup><0.01; <sup>\*</sup><0.05; n.s. = nicht signifikant.



**Abbildung 17:  $\alpha v\beta 3$ -,  $\alpha v\beta 5$ -, und  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, exprimierende Gefäße wurden quantifiziert mit einem Quantifizierungsprogramm (Fiji).** Es dokumentierte sich eine gesteigerte Menge an angiogenen Integrinen und eine reduzierte Menge an  $Tie2^{low}$  EC im PCLBCL, LT. Mann Whitney Test, P-Werte<sup>\*\*\*</sup><0.001; <sup>\*\*</sup><0.01; <sup>\*</sup><0.05; n.s. = nicht signifikant.

### 3.5 FAK Aktivität

In Tie2<sup>low</sup>-Endothelzellen bindet Ang-2 direkt an angiogene Integrine  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$  und  $\alpha5\beta1$  und induziert die Phosphorylierung von FAK an Tyrosin397 (Felcht et al., 2012b). p-FAK [Tyr397] ist in höheren Mengen in nicht luminisierten Gefäßen detektierbar. Um die Expression von p-FAK [Tyr397] zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit CD31 als Endothelzellmarker und p-FAK [Tyr397] durchgeführt. Untersucht wurden sowohl die sprossenden Gefäße als auch p-FAK [Tyr397] Expression der Gefäße (Abbildung 18 A). Es zeigen sich größere Mengen an p-FAK [Tyr397] in sprossenden EC (Abbildung 18 A) als im Vergleich zu den nicht sprossenden EC (Abbildung 18 A). Bei der Untersuchung der sprossenden Gefäße im PCBCL zeigten sich beim PCLBCL, LT deutlich mehr Gefäßausprossungen im Vergleich mit indolenten PCBCL (Abbildung 18 B und C).



**Abbildung 18: Ang-2 induzierte, Tie2 unabhängige Signalgebung im PCLBCL, LT. A) Immunfluoreszenzfärbung mit EC-Marker CD31 und phosphoryliertem FAK an Tyrosin397 [p-FAK[Tyr397]].** Es zeigen sich größere Mengen an p-FAK [Tyr397] in sprossenden EC, weiße Pfeile, als im Vergleich dazu die nicht sprossenden EC, weiße Pfeilspitzen. **B) PCBCL** gefärbt mit EC-Marker CD31. Die weißen Pfeilspitzen markieren Gefäßsprossen, deutlich mehr Sprossen im Bein-Typ bei geringerem Gefäßlumen. **C) Berechnung der Sprossen/Gefäß** und deren Abbildung mit Hilfe von Prism Graph (Mann Whitney Test; indolent im Vergleich zum PCBCL, LT;  $*=P<0.05$ )



#### 4. DISKUSSION

PCBCL sind eine heterogene Gruppe von Tumoren. Unterschiede bestehen in der Klinik, der Überlebensrate und der Therapie (Willemze et al., 2005; Felcht et al., 2012a; (Jacob et al. 2018; McDonald und Choyke 2003; Nicolay und Wobser 2016).

Während bei indolenten PCBCL eine abwartende und beobachtende Haltung eine Möglichkeit darstellt, bleibt für die PCLBCL, LT in den allermeisten Fällen nur die systemische Therapie. Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Behandlung der PCLBCL, LT mit R-CHOP der Goldstandard (Senff et al., 2008). Diese ist allerdings sehr aggressiv und aufgrund der Toxizität und der Nebenwirkungen eine Behandlungsform, die gerade bei den älteren, davon betroffenen, multimorbiden Patienten, nicht immer möglich ist. Zusätzlich ist diese Therapie leider teilweise durch den Verlust des CD20-Antigens in ihrer Effektivität eingeschränkt. Da die Pathophysiologie von PCBCL heute noch weitgehend unverstanden ist, fehlen weitere zielgerichtete Therapiemöglichkeiten.

Ein wichtiges Grundprinzip bei der Entstehung von Tumoren ist die Angiogenese. Sie ist unerlässlich für ein Tumorwachstum über eine Größe von 0,5 mm hinaus. In klinischen Phase-II-Studien (wie z.B. die des Heidelberger Zentrums für Tumorerkrankungen (NCT01430013)) befinden sich aktuell anti-angiogene Therapien mit Endostatin oder Lenalidomid für die Behandlung nodaler Lymphome (Wang et al., 2012). Auch zeigen einige von den Richtlinien empfohlene Therapien für das CTCL, wie z.B. Bexaroten, Histon-Deacetylase-Inhibitoren, Thalidomid oder Lenalidomid anti-angiogene Effekte (Assaf et al., 2013; Fu et al, 2011).

Da Angiogenese unter physiologischen Bedingungen im adulten Organismus bis auf wenige Ausnahmen, wie z.B. während des Ovarialzyklus der Frau, nicht stattfindet, sollten die Nebenwirkungen einer anti-angiogene Therapie, im Vergleich mit zytostatischen Chemotherapien, gering sein. Man darf spekulieren, dass eine anti-angiogene Therapie gerade für multimorbide, ältere Patienten eine Alternative darstellt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es festzustellen, ob sich die Angiogenese zwischen indolenten PCMZL und PCFCL und PCLBCL, LT mit der intermediären Prognose unterscheidet.

Mögliche Unterschiede könnten einen ersten Hinweis darauf geben, ob möglicherweise eine anti-angiogene Therapie hier einen zukünftigen Therapieansatz darstellen könnte. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang das entstehende Gefäßnetz. Es ist verantwortlich für die Versorgung des Tumors mit

Sauerstoff und Nährstoffen. Um eventuelle Unterschiede in den verschiedenen Entitäten aufdecken zu können, wurden Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop erstellt und die Gefäßdichte bestimmt. Die Gefäßdichte spiegelt den Abstand zweier Gefäße zueinander wieder. Sie wird in vielen Publikationen als Maßstab für stattfindende Angiogenese im Rahmen der Tumorentstehung gesehen. Eine hohe Gefäßdichte konnte in vielen soliden humanen Tumoren beobachtet werden (Krnet et al., 2006). Generell wird davon ausgegangen, dass ein aggressiver Tumor mit einer hohen Gefäßdichte einhergeht und sich diese auch negativ auf die Prognose der Erkrankung auswirkt. Die Auswertung unserer Arbeitsgruppe (Teichert\*, Stumpf\* et al., 2015) ergab, dass die Gefäßdichte im PCLBCL, LT signifikant höher ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer kürzlich erschienen Veröffentlichung einer anderen Gruppe um Marion Wobser, in der jeweils eine höhere Gefäßdichte für das PCLBCL, LT gefunden wurde (Wobser et al., 2013). Ergänzend zu der Arbeit von Marion Wobser haben wir serielle Schnitte mit dem Gefäßmarker CD31 und Vllla sowie den dem Pan-Endothelzellmarker CD20 durchgeführt. Hiermit war es möglich, gezielt die Gefäßdichte im Tumorfiltrat zu bestimmen. In der vorgelegten Analyse zeigten Patienten mit einem PCLBCL, LT eine gesteigerte Gefäßdichte. Eine hohe Gefäßdichte wird in vielen Tumoren beobachtet und korreliert bei vielen dieser Tumoren mit einer schlechten Prognose. So beschreibt auch Judah Folkman, dass eine hohe Gefäßdichte und die Anzahl der Fernmetastasen korrelieren (Weidner et al. 1991). Beides korreliert mit einer schlechten Prognose. In der Gegenüberstellung der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit bezüglich der signifikant höheren Gefäßdichte beim PCLBCL, LT liegt die Vermutung nahe, dass ein Tumor unter besonderen Bedingungen keinen Sauerstoff mehr benötigt, um zu wachsen. In der Arbeit von 1991 konnte Weidner durchschnittlich 101 Gefäße/mm<sup>2</sup> bei den Karzinompatienten mit Metastasen bei einer höheren Gefäßdichte im Vergleich zu 45 Gefäße/mm<sup>2</sup> bei den Patienten ohne Metastasen mit einer geringeren Gefäßdichte detektieren (Weidner et al. 1991). In keiner weiteren Publikation danach wurden allerdings so hohe Unterschiede gesehen. Eine Arbeit der Gruppe um Hellmut G. Augustin veröffentlichte 2006 einen Fallbericht, in der sie die Gefäßdichte im Nierenzellkarzinom (engl.: renal cell carcinoma =RCC) untersuchten. Auch in diesem Fall war diese im anaplastischen RCC Grad 3 geringer als in gut ausdifferenzierten Grad 1 RCC und dem normalen Nierengewebe (Krnet et al., 2006). So deuten die Ergebnisse im anaplastischen RCC darauf hin, dass eine geringe Gefäßdichte für Wachstum und Überleben ausreichend ist und demzufolge auch keine gesteigerte Angiogenese nötig ist, so lange eine

minimale Gefäßdichte im Tumor aufrecht erhalten bleibt. Dies könnte teilweise durch den Warburg Effekt erklärt werden. Die Hypothese zur Krebsentstehung nach Otto Warburg (1883-1970) besagt, dass Tumorzellen einen Defekt in der mitochondrialen Atmung haben und aus diesem Grund die Energie für ihr Wachstum aus anaeroben Stoffwechselfvorgängen beziehen, für die kein Sauerstoff nötig ist. In diesem Zusammenhang beschreibt er den irreversiblen Verlust der sauerstoffabhängigen Atmung und die daraus resultierenden anaeroben Stoffwechselfvorgänge als elementaren Schritt für die Gewinnung von Adenosintriphosphat (ATP) und so für die nötige Energie im wachsenden Tumor (Warburg et al., 1924; Warburg, 1956,). Auch Folkman beschreibt einen direkten Zusammenhang mit der Anzahl der Gefäße und der Gefäßdichte beim Mammakarzinom in Arealen mit besonders aktiver Angiogenese. Er sieht die hohe Gefäßdichte und die Anzahl der Gefäße als Korrelation mit Fernmetastasen und einer unvorteilhaften Prognose. Diese Ergebnisse zusammengenommen, muss man die Frage stellen, ob die Bestimmung der Gefäßdichte sinnvoll ist oder nicht. Für sich alleine genommen beschreibt die Gefäßdichte eben nur den Abstand zwischen zwei Gefäßen und sagt per se nichts über die angiogene Aktivität, die Prognose oder über einen Therapieerfolg aus. In Kombination mit anderen Untersuchungen, wie z.B. die Bestimmung des Ang-1/Ang-2-Verhältnisses, könnte die Aussagekraft jedoch deutlich gesteigert werden (Hlatky et al., 2002).

In der vorgelegten Arbeit war im PCLBCL, LT im Vergleich mit indolenten PCBCL gesteigerte, sprossende Angiogenese nachweisbar.

Sprossende Angiogenese, die Neubildung von Gefäßen aus dem existierenden Gefäßnetz, ist stark abhängig von morphologischen Kriterien der beteiligten Tip- und Stalk-Zellen. Die erste invadierende Zelle, die sogenannte Tip-Zelle, weist kein Lumen auf, aber zahlreiche Filopodien, die für die Richtung der sprossenden, neuen Gefäße verantwortlich sind. Sie bestehen im Wesentlichen aus F-Actin, einem Bestandteil des Zytoskeletts, das für Bewegung und Haftung eine große Rolle spielt. Lange war man der Meinung, dass die Filopodien unerlässlich während der Angiogenese sind (Phng und Gerhardt, 2013). Neue Ergebnisse einer Forschergruppe um Li-Kun Phng und Holger Gerhardt zeigen jedoch, dass eine Endothelzellmigration ohne Filopodien möglich ist (Phng und Gerhardt, 2013). In einem Tiermodell mit dem Zebrafisch konnten sie z.B. durch Zugabe von Lactrulin B die Bildung von Filopodien inhibieren. Die Endothelzellen generieren dann in Abwesenheit von Filopodien Lamellipodien. Lamellipodien bestehen gleichermaßen aus F-Actin und sorgen für die Migration der

Endothelzellen, nur sehr viel langsamer. Ihre Forschungsergebnissen konnten zeigen, dass die Filopodien nicht ausschlaggebend für die Richtungssteuerung während der Endothelzellmigration sind, sehr wohl aber wichtig sind für effizientes Wachstum und den Anastomosen zu den entgegensprossenden Endothelzellen (Phng et al., 2013). Des Weiteren konnte eine Gruppe um Peter Carmeliet zeigen, wie wichtig die Glykolyse als energieproduzierender Stoffwechselweg bei der Entstehung neuer Gefäße ist. In ihrer Arbeit untersuchten sie die Rolle des Glykolyseaktivators PFKFB3 (6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase 3). PFKFB3 ist wiederum ein Aktivator von PFK-1 (Phosphofruktokinase-1), die eines der Schlüsselenzyme während der Glykolyse ist. In diesem Zusammenhang scheint PFKFB3 nicht nur für die Endothelzellmigration verantwortlich zu sein, sondern auch für die Bildung von F-Actin und so auch für die Entstehung von Lamellipodien und Filopodien (Bock et al., 2013). Die zweite Zelle, die Stalk-Zelle, formt bereits ein Lumen. Die Zellen eines neu wachsenden Blutgefäßes konkurrieren um den Tip-Zell-Phänotyp. Um die Integrität des Gefäßes sichern zu können, kann nur eine Zelle zur Tip-Zelle werden. Die folgenden Zellen werden durch das Dll-Notch System inhibiert. Um ein sicheres Maß für die angiogene Aktivität zur Verfügung zu haben, wäre es von Vorteil, einen spezifischen Tip-Zell-Marker etablieren zu können. Leider gibt es aber zum jetzigen Zeitpunkt keine spezifischen Marker auf Proteinebene. In der vorgelegten Arbeit war es nicht möglich zu unterscheiden, ob PCBCL, LT im Vergleich zu den indolenten PCBCL mehr oder weniger Tip-Zellen enthalten. Neben den fehlenden etablierten Markern kam hier erschwerend hinzu, dass nicht geklärt ist, ob Tip-Zellen in Tumoren enthalten sind. Tip- und Stalk-Zellen besitzen eine unterschiedliche Expression der Gene PDGFB, Dll4, Unc5b, Kdr und Flt4. Von diesen lässt sich mehr mRNA in den Tip-Zellen als in den Stalk-Zellen nachweisen (Phng und Gerhardt, 2009). Auch eine Gruppe um Raquel del Toro konnte in einer Veröffentlichung nur eine Reihe von Genen und den daraus resultierenden Proteinen identifizieren, die in höherem Maß in den Tip-Zellen exprimiert werden. Einzig Angiopoietin-2 konnte als sezernierendes Molekül in den Tip-Zellen detektiert werden (del Toro et al., 2010). Bis zu diesem Zeitpunkt konnte noch kein Marker auf Genebene identifiziert werden, der spezifisch für die Tip-Zellen ist und einzig und alleine in diesen exprimiert wird (Phng und Gerhardt, 2009). Neben dem Dll Notch 1-System ist Angiopoietin-2 wichtig für die sprossende Angiogenese (Felcht et al., 2012b). In Endothelzellen wirkt die Bindung von Ang-2 an seinen Rezeptor Tie2 gefäßdestabilisierend und somit proangiogen. Während die Ang-2-induzierten Effekte in Endothelzellen im Rahmen der physiologischen Angiogenese

weitestgehend aufgeklärt sind, sind die Erkenntnisse der Effekte von Ang-2 in Tumorzellen auf molekulargenetischer Ebene noch recht spärlich. Erste Studien konnten zeigen, dass die Stimulation von Ang-2 in menschlichen Mammakarzinomzellen zur Aktivierung von BCL-2 und damit zu einer schnelleren, erleichterten Metastasierung führt (Imanishi et al., 2011). Weiterhin konnte Ang-2 als Tumorsuppressor in einem Lymphommodell bei Mäusen charakterisiert werden (Bric et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit konnten signifikant höhere Mengen an Ang-2 im PCBCL, LT detektiert werden. Die Ang-2 Effekte sind durch verschiedene Mechanismen streng reguliert. Diese Prozesse beinhalten sowohl die Expression des funktionellen Antagonisten von Ang-2, Ang-1, als auch die des Tie-2-Rezeptors. Hohe Ang-2-Spiegel und niedrige oder konstante Ang-1-Spiegel sind obligat für Ang-2-induzierte Effekte. Ang-1 und Ang-2 besitzen die gleiche Bindungsaffinität zum Tie-2-Rezeptor (Augustin et al., 2009). In dieser Arbeit konnte im PCBCL, LT ein signifikant geringeres Ang-1-/2-Verhältnis festgestellt werden. Bei gleichzeitig hohen Ang-2 Spiegeln im PCBCL, LT lassen diese einen Ang-2-induzierten Effekt vermuten. Interessanterweise ließ sich bei sinkendem Ang-1-/Ang-2-Verhältnis auch eine signifikant geringere Expression des Tie-2-Rezeptors in den Endothelzellen detektieren. Eine solche Endothelzellsubpopulation mit geringer Tie2 Expression ist während der Tumorangiogenese in verschiedene Tumoren bereits beschrieben (Tanaka et al., 2002; Hida et al. 2004; Fathers et al., 2005; Hashizume et al., 2010; Felcht et al., 2012b). Während der physiologischen Angiogenese wird der Tie-2-Rezeptor in nicht luminisierten, sprossenden Tip-Zellen herunterreguliert (Felcht et al., 2012b). Daraus resultiert die Annahme, dass diese Endothelzellen mit geringer Tie2 Expression während der Tumorangiogenese im PCBCL, LT einen Tip-Zell-artigen Phänotyp repräsentieren. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass im PCBCL, LT signifikant mehr kleine Gefäße ohne Lumen zu detektieren sind. Eine Forschergruppe um Acker-Palmer machte kürzlich die gleiche Entdeckung. Sie beschrieben einen Tip-Zell-Phänotyp, der durch Ephrin-B2 während der Tumorangiogenese induziert wird (Sawamiphak et al., 2010b). Während der physiologischen Angiogenese induziert Ang-2 in Tie2<sup>low</sup>-Tip-Zellen die sprossende Angiogenese. Diese Sprossung aus dem bestehenden Gefäßnetz ist charakteristisch für die Tip-Zell-Morphologie. Entsprechend dieser Beobachtung reduziert die Inhibition von Ang-2 signifikant die Anzahl der Tip-Zellen *in vivo* sowie die Menge an Filopodien pro Tip-Zelle (Felcht et al., 2012b). Weitere Studien müssen klären, ob der Ang-2-induzierte Tip-Zell-Phänotyp auch den DIIV-Notch1 Signalweg

beeinflusst, der bei entzündungsbedingter Angiogenese beobachtet wurde (Gao et al., 2013). Daneben müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob die Tip-Zell Morphologie mit physiologischen Tip-Zell-Markern wie z.B. uPAR oder ESM1 korreliert (Phng und Gerhardt, 2009).

Ang-2 induziert in Tie2<sup>low</sup>-Tip-Zellen FAK-Phosphorylierung an Tyrosin397, RAC-Aktivierung sowie die Migration und das Sprossen von Endothelzellen. Tip-Zellen exprimieren Tie-2-Rezeptoren nur in geringem Ausmaß. Im Gegensatz dazu kann eine starke Expression von Tie-2-Rezeptoren in Stalk- und Phalanx-Zellen detektiert werden (Felcht et al., 2012b). In Gegenwart seines hochaffinen Rezeptors Tie2 induziert Ang-2 eine Komplexbildung zwischen dem Tie2-Rezeptor,  $\alpha\beta 3$  Integrin und FAK-Protein. FAK-Protein wird dann an Serin 910 phosphoryliert, was zur  $\alpha\beta 3$  Integrininternalisierung und Degradierung führt (Thomas et al., 2010). Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde nicht untersucht, ob Ang-2 Tie2-abhängige Effekte in PCBCL möglicherweise induziert. Es erscheint jedoch gut möglich, da bei allen PCBCL der Großteil der Gefäße den Tie2 Rezeptor exprimiert. Stattdessen lag der Fokus der Arbeit auf der Analyse von Ang-2 induzierten Tie2 unabhängigen Effekten. In Tie2<sup>low</sup> Endothelzellen induziert Ang-2 Stimulation FAK-Phosphorylierung an Tyrosin397 und Gefäßausprossung. In der vorgelegten Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass PCBCL, LT mehr p-FAK[Tyr397] Aktivität in Endothelzellen aufweisen.

FAK ist ein wichtiges Protein in fokalen Adhäsionskomplexen. In Verbindung mit den Integrinen ist FAK für die Zellmotilität verantwortlich. In einer Reihe von Versuchen während der Embryonalentwicklung von Mäusen konnte eine Forschergruppe um Ssang-Taek Lim zeigen, dass die Inaktivierung von FAK in Abhängigkeit von p53 und p21 zu einem Zellzyklusarrest führt. Von entscheidender Bedeutung ist das n-terminale Ende von FAK, FERM (Ezrin, Radixin, Moesin) (Lim et al., 2008). In Verbindung mit Integrinen, Wachstumsfaktoren und den entsprechenden Rezeptoren ist FAK für das Überleben der Zellen verantwortlich, indem es die Mengen an p53, einem Tumorsuppressor, gering hält. Entscheidend in diesem Regelkreis ist die Kinaseaktivität von FAK, durch die verschiedene andere Ligasen phosphoryliert werden, in den Zellkern dislozieren und so p53 inaktivieren (Lim et al., 2008). Dem gegenüber steht ein kinaseunabhängiger Funktionsmechanismus von FAK. Im Falle des Verlustes der Integrinhaftung von FAK oder entstehendem Zellstress wird FAK in das Zytosol freigesetzt und reichert sich hier an. Die gesteigerte Menge an FAK im Zytoplasma führt zu einem gesteigerten FERM-abhängigen Transport von FAK in den Zellkern. FAK reichert sich nun dort an und hält über den proteolytischen Abbau von

p53 die Menge an vorhandenem p53 gering. Dieser Mechanismus sorgt für ein gesteigertes Überleben der Zellen (Lim et al., 2008) und wirkt somit gleichzeitig proangiogen. Ob FAK Phosphorylierung an Thyrosin397 notwendig ist für sprossende Angiogenese, bleibt zu klären.

Funktionelle Analysen sind aktuell in PCBCL nicht möglich, da es keine etablierte Zelllinie hierfür gibt. Dies zu entwickeln wird eine der großen Herausforderungen der zukünftigen PCBCL-Forschung sein.

Es sind bereits einige anti-angiogene Therapeutika beschrieben und befinden sich in der Anwendung bei verschiedenen Arten von Krebs. Monotherapien z.B. mit Bevacizumab zeigen zwar anti-angiogene Effekte, führen aber nicht zu einem verlängerten Überleben in Versuchen mit Mäusen. Es konnte in anderen Veröffentlichungen gezeigt werden, dass die Kombination mit einer Chemotherapie das Überleben von Patienten mit T-Zell-Lymphom deutlich steigern kann (Mori et al., 2014). Bexaroten (LGD1069 = Tagretin<sup>®</sup>) ist eine weitere Substanz, welche für die Behandlung von kutanen T-Zell-Lymphomen zugelassen ist. Bexaroten ist ein synthetisches Retinoidanalogon. Es bindet spezifisch an den Retinoidrezeptor RXR und hemmt dort die Proliferation, Adhäsion, Migration und Invasion der Endothelzellen (Fu et al, 2011), es wirkt somit anti-angiogen. In einer weiteren Veröffentlichung kombinierten die Wissenschaftler Bexaroten mit Paclitaxel, einem Mitosegift einer Pflanzenart aus der Familie der Eibengewächse. Sie konnten damit eine bessere anti-proliferative und anti-metastatische Wirkung nachweisen. Zusätzlich konnten sie belegen, dass die Kombination der zwei Substanzen einer entstehenden Resistenz entgegenwirkt (Yen et al., 2006). Eine anti-VEGF-Therapie mit Bevacizumab zeigte im humanen diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom nur unbefriedigende Ergebnisse (Ruan et al., 2013). Auf der Suche nach weiteren Zielzellen für eine anti-angiogene Therapie konnten die PDGFB<sup>+</sup> Perizyten als vielversprechende Angriffspunkte ausgemacht werden (Chute und Himburg, 2013). Perizyten stabilisieren Endothelzellen der Kapillaren und sorgen so für kontinuierlichen Blutfluss in neu entstehenden Gefäßen. Durch die Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib oder einem selektiven, monoklonalen Antikörper (2C5), der den PDGFB blockiert (Ruan et al., 2013), konnte der Funktionsverlust und eine reduzierte Anzahl der Perizyten und somit ein verringertes Größenwachstum der Lymphome gezeigt werden (Chute und Himburg, 2013). In dieser Arbeit wurden auch verschiedene Integrine untersucht. Als Transmembranproteine wurde ihre wichtige Rolle innerhalb der Angiogenese bereits erläutert. In einer Veröffentlichung von Sara Weis und David

Cheresh wurde über die Integrine als mögliche therapeutische Ziele in der Behandlung des Glioblastoms berichtet (Weis und Cheresh, 2011): Patienten wurden mit Cilengitide, einem zyklischen Pentapeptid, behandelt, das selektiv an  $\alpha\beta3$ - und  $\alpha\beta5$ -Integrine bindet. Die Therapie erwies sich als sehr sicher und für die Patienten gut verträglich mit einer deutlich höheren Überlebensrate. Weitere Studien müssen klären, ob die Behandlung mit Cilengitide auch für andere Krebsarten in Frage kommt. Ein großes Problem bei der Behandlung von Patienten mit einer anti-angiogenen Therapie ist, dass es keine validen Biomarker gibt, um vorab herauszufinden, welcher Patient für eine derartige Therapie geeignet ist (Weis und Cheresh, 2011). Anti-angiogene Monotherapien sind leider oft nicht sehr erfolgreich. Bei einigen Krebsarten, wie z.B. Nieren- und Leberkrebs, zeigt eine anti-VEGF-Therapie mit Bevacizumab in Kombination mit einer Chemotherapie gute Erfolge. Gleichzeitig kann man sich die Frage stellen, warum es z.B. beim Kolon- oder Brustkrebs keine guten Ergebnisse mit der anti-angiogenen Therapie gibt. Entscheidend könnte auch bei diesen Krebsarten die unterschiedliche Gefäßstruktur sein (Weis und Cheresh, 2011). Ein weiterer wichtiger Hinweis, warum manche Therapien in manchen Tumorarten erfolgreich sind und in anderen nicht, könnte das Stammzellmodell liefern. In diesem beschreiben Corbin E. Meacham und Sean J. Morrison eine kleine Subpopulation von Nachkommen der sich teilenden Krebsstammzellen, welche tumorigene Eigenschaften besitzen und so in der Lage sind, einen Tumor neu bilden zu können. Es ist bis heute nicht geklärt, welche Krebsarten diesem Stammzellmodell folgen. Von entscheidender Bedeutung wäre, einen spezifischen Stammzellmarker zu etablieren, der es ermöglicht, die tumorigenen Stammzellen herauszufinden und diese dann gezielt zu bekämpfen (Meacham und Morrison, 2013). Dies könnte eine Therapie effektiver und für die Patienten nebenwirkungsärmer machen. Eine nebenwirkungsarme und gleichzeitig maximal wirksame Therapie zu finden, ist auch das Ziel beim PCLBCL, LT. Die vorgelegte Arbeit gibt einen ersten Hinweis darauf, dass möglicherweise das Angiopoietin-2/Tie2-System von höherer Bedeutung für die Angiogenese beim PCLBCL, LT sein könnte. Aufgrund des eingeschränkten klinischen Erfolges einer anti-VEGF Therapie ist man auf der Suche nach neuen Zielmolekülen der Angiogenese, welche dann auch in der Therapie Anwendung finden können. Interaktion von Tie2 bzw. seinen Liganden Ang-1/Ang-2 gelten aktuell als vielversprechend (Masiero et al., 2013; (Saharinen et al. 2017). Vielversprechend ist in diesem Kontext auch der funktionelle Antagonist am Tie2-Rezeptor, Ang-2. Die Expression von Ang-2 ist von vielen verschiedenen Stimuli des Tumors selbst und der



Tumorumgebung abhängig. In Verbindung mit VEGF spielt Ang-2 eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese, indem es gefäßdestabilisierend und damit proangiogen wirkt. Die Menge an Ang-2 im Serum korreliert mit der Menge an VEGF, z.B. im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Park et al. 2007). Die Patienten mit geringeren Ang-2-Spiegeln haben eine deutlich bessere Überlebensrate. Hohe Ang-2-Spiegel konnten auch im Malignen Melanom dokumentiert werden (Helfrich et al. 2009). Somit könnte die Menge an Ang-2 im Serum von Patienten ein aussagekräftiger Marker für die Progression, die Metastasierung und das Überleben der Betroffenen sein (Hu und Cheng, 2009, (Felcht und Thomas 2015)). Diese Beobachtungen zeigen das therapeutische Potential, welches hinter einer anti-Ang-2 Therapie in der Behandlung des PCLBCL, LT stecken könnte. In dieser Arbeit wurden höhere Ang-2 Werte in den PCLBCL, LT im Vergleich zu den gesunden Kontrollen PCFCL und PCMZL detektiert. Eine anti-Ang-2-Therapie könnte also unter diesen Umständen ein erfolgversprechendes Konzept sein. In der Therapie von Gefäßschäden, Inflammation und Sepsis könnte diese Art der Therapie ebenfalls entscheidend zu einem besseren Überleben der Patienten beitragen. Forscher einer Gruppe um Andrew V. Benest und Hellmut G. Augustin konnten zeigen, dass Ang-2, welches für die Gefäßpermeabilität verantwortlich ist, die Wirkung verschiedener Zytokine, wie z.B. Histamin, VEGF und Bradykinin verstärkt. Auch andere Arbeitsgruppen konnten erhöhte Ang-2 Expression in der Sepsis mit einer gesteigerten Hyperpermeabilität und einem Perizytenverlust feststellen. Ang-2 alleine kann diese Wirkung nicht erreichen. Ein Verlust von Ang-2 führt zu einer abgeschwächten zytokininduzierten Gefäßpermeabilität. In Anbetracht dieser Ergebnisse wird die mögliche Bedeutung einer anti-Ang-2 Therapie auch bei nicht-onkologischen Erkrankungen deutlich (Benest et al., 2013).

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Primär kutane diffus großzellige B-Zell-Lymphome, vom Beintyp (PCLBCL, LT), sind seltene Tumore, über deren Pathophysiologie wenig bekannt ist. Ob sich das Gefäßnetz bzw. die Angiogenese zwischen PCLBCL, LT und indolenten PCBCL unterscheidet, wurde bisher noch nicht im Detail untersucht. Ziel der vorgelegten Arbeit sollte es sein, das Gefäßnetz von indolenten PCBCL und PCLBCL, LT auf mögliche Unterschiede hin zu untersuchen.

Immunhistochemische Untersuchungen von uns (Teichert\*, Stumpf\* et al., 2015) und anderen (Wobser et al., 2013) konnten nachweisen, dass die Gefäßdichte in PCLBCL, LT signifikant höher ist als in indolenten PCBCL. Aufbauend hierauf wurde mittels ELISA Technologie die Serumkonzentration von Angiopoietin-1 und-2 von indolenten PCBCL, PCLBCL, LT und gesunden Kontrollen ermittelt und verglichen. Während Angiopoietin-1 sowohl im Serum von indolenten PCBCL als auch in PCLBCL, LT erniedrigt war, war Angiopoietin-2 einzig bei PCLBCL, LT Patienten im Serum erhöht. Daraus resultierte, dass die Ang-1/Ang-2 Ratio bei PCLBCL, LT signifikant höher war als bei indolenten PCBCL Patienten und den untersuchten gesunden Kontrollen. Aufbauend hierauf wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung die Expression des Angiopoietin Rezeptors Tie2 im Endothel von PCBCL untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl in indolenten als auch in PCLBCL, LT Tumoren das Endothel teilweise eine schwächere Tie2 Rezeptorexpression aufweist als das Endothel von gesunden Kontrollen. In der Abwesenheit von Tie2 kann Angiopoietin-2 an die angiogenen Integrine  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$  und  $\alpha 5\beta 1$  binden. Immunfluoreszenzfärbungen gegen diese drei Integrine konnten nachweisen, dass das Endothel sowohl von indolenten PCBCL als auch PCLBCL, LT eine starke Expression aller drei Integrine aufweist. Aufbauende konfokale Mikroskopanalysen wiesen nach, dass in PCLBCL, LT das Endothel durch eine stärkere Expression von an Tyrosin397 phosphoryliertem FAK Protein (p-FAK[Tyr397]) und gesteigerter sprossender Angiogenese gekennzeichnet ist. Sowohl p-FAK[Tyr397] Aktivität als auch sprossende Angiogenese werden in Endothelzellen mit niedriger Tie2 Expression durch Angiopoietin-2 induziert. Da Zellmodelle für die PCBCL Erkrankung fehlen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft werden, ob die ermittelten hohen Angiopoietin-2 Spiegel und detektierte p-FAK[Tyr397] Aktivität und sprossende Angiogenese funktionell in einem Zusammenhang stehen. Es sind weiterführende Analysen notwendig, um die nachgewiesene gesteigerte Angiopoietin-2 Expression in

PCLBCL, LT in ihrer Bedeutung beim PCLBCL, LT zu überprüfen und zu ermitteln, ob sich hier mögliche neue Therapieoptionen in Zukunft ergeben könnten.

## 6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b> Kennzeichen der Krebsentstehung modifiziert nach Hanahan und Weinberg .....	12
<b>Abbildung 2:</b> Einteilung des Gefäßnetzes in Arterien, Venen, Kapillaren .....	14
<b>Abbildung 3:</b> Das Tip-Stalk-Phalanx-Zellmodell.....	17
<b>Abbildung 4:</b> Modell des Delta Notch Systems.....	19
<b>Abbildung 5:</b> Antagonistische Wirkung von Ang-1/Ang-2 am Tie2- Rezeptor.....	22
<b>Abbildung 6:</b> Ang-2 Stimulation der EC induziert $\alpha\beta3$ Integrin-Internalisierung und Degradierung.....	23
<b>Abbildung 7:</b> Modell der Integrinaktivierung.....	25
<b>Abbildung 8:</b> Reaktionsschritte an der Tip-Zelle .....	26
<b>Abbildung 9:</b> Generelles Prinzip des ELISA.....	35
<b>Abbildung 10:</b> Höhere Ang-2 Mengen im PCLBCL, LT.....	37
<b>Abbildung 11:</b> Niedrigere Mengen an Ang-1 im PCLBCL, LT.....	38
<b>Abbildung 12:</b> Verhältnis von Ang-2/Ang-1.....	38
<b>Abbildung 13:</b> Immunfluoreszenzfärbungen für CD34, Tie2-Rezeptor und $\alpha\beta3$ Integrin .....	40
<b>Abbildung 14:</b> Immunfluoreszenzfärbungen für CD34, Tie2-Rezeptor und $\alpha\beta5$ Integrin .....	41
<b>Abbildung 15:</b> Immunfluoreszenzfärbungen für CD34, Tie2-Rezeptor und $\alpha5\beta1$ Integrin .....	42
<b>Abbildung 16:</b> Tie2 <sup>low</sup> exprimierende Gefäße wurden quantifiziert mit einem Quantifizierungsprogramm (Fiji) .....	43
<b>Abbildung 17:</b> $\alpha\beta3$ -, $\alpha\beta5$ -, und $\alpha5\beta1$ -Integrin, exprimierende Gefäße wurden quantifiziert mit einem Quantifizierungsprogramm (Fiji).....	43
<b>Abbildung 18:</b> Ang-2 induzierte, Tie2 unabhängige Signalgebung im PCLBCL, LT. A) Immunfluoreszenzfärbung mit EC-Marker CD31 und phosphoryliertem FAK an Tyrosin397 [p-FAK[Tyr397]].....	44

## 7. TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1:</b> <i>Einteilung kutaner B-Zell-Lymphome innerhalb der unterschiedlichen Klassifikationen (EORTC, WHO und WHO/EORTC).....</i>	5
<b>Tabelle 2:</b> <i>Immunhistochemische Marker in der Übersicht .....</i>	10
<b>Tabelle 3:</b> <i>Häufig verwendete Biochemikalien .....</i>	28
<b>Tabelle 4:</b> <i>Verwendete Primärantikörper .....</i>	29
<b>Tabelle 5:</b> <i>Verwendete Sekundärantikörper.....</i>	29
<b>Tabelle 6:</b> <i>Verwendete Reagenzien und Analysesets.....</i>	30

## 8. LITERATURVERZEICHNIS UND EIGENE PUBLIKATION

### 8.1 Literaturverzeichnis

1. Adams, R.H., and Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 464-478.
2. Andersson, E.R., and Lendahl, U. (2014). Therapeutic modulation of Notch signalling--are we there yet? *Nature reviews. Drug discovery* 13, 357-378.
3. Andrae, J., Gallini, R., and Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & development* 22, 1276-1312.
4. Arnaout, M.A., Mahalingam, B., and Xiong, J.-P. (2005). Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annual review of cell and developmental biology* 21, 381-410.
5. Assaf, C., Becker, J.C., Beyer, M., Cozzio, A., Dippel, E., Klemke, C.-D., Kurschat, P., Weichenthal, M., and Stadler, R. (2013). Treatment of advanced cutaneous T-cell lymphomas with non-pegylated liposomal doxorubicin--consensus of the lymphoma group of the Working Group Dermatologic Oncology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 11, 338-347.
6. Augustin, H.G., Koh, G.Y., Thurston, G., and Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 165-177.
7. Avraamides, C.J., Garmy-Susini, B., and Varner, J.A. (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews. Cancer* 8, 604-617.
8. Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and tissue research* 339, 269-280.

9. Beglova, N., Blacklow, S.C., Takagi, J., and Springer, T.A. (2002). Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nature structural biology* 9, 282-287.
10. Benest, A.V., Kruse, K., Savant, S., Thomas, M., Laib, A.M., Loos, E.K., Fiedler, U., and Augustin, H.G. (2013). Angiotensin-2 is critical for cytokine-induced vascular leakage. *PLoS one* 8, e70459.
11. Bock, K. de, Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B.W., Cantelmo, A.R., Quaegebeur, A., Ghesquière, B., Cauwenberghs, S., and Eelen, G., et al. (2013). Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 154, 651-663.
12. Brandenburg, A., Humme, D., Terhorst, D., Gellrich, S., Sterry, W., and Beyer, M. (2013). Long-term outcome of intravenous therapy with rituximab in patients with primary cutaneous B-cell lymphomas. *The British journal of dermatology* 169, 1126-1132.
13. Bric, A., Miething, C., Bialucha, C.U., Scuoppo, C., Zender, L., Krasnitz, A., Xuan, Z., Zuber, J., Wigler, M., and Hicks, J., et al. (2009). Functional identification of tumor-suppressor genes through an in vivo RNA interference screen in a mouse lymphoma model. *Cancer cell* 16, 324-335.
14. Bunn, H.F., and Poyton, R.O. (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiological reviews* 76, 839-885.
15. Burg, G., Kempf, W., Cozzio, A., Feit, J., Willemze, R., S Jaffe, E., Dummer, R., Berti, E., Cerroni, L., and Chimenti, S., et al. (2005). WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas 2005: histological and molecular aspects. *Journal of cutaneous pathology* 32, 647-674.
16. Carlson, T.R., Feng, Y., Maisonpierre, P.C., Mrksich, M., and Morla, A.O. (2001). Direct cell adhesion to the angiotensins mediated by integrins. *The Journal of biological chemistry* 276, 26516-26525.

17. Cascone, I., Napione, L., Maniero, F., Serini, G., and Bussolino, F. (2005). Stable interaction between alpha5beta1 integrin and Tie2 tyrosine kinase receptor regulates endothelial cell response to Ang-1. *The Journal of cell biology* 170, 993-1004.
18. Chute, J.P., and Himburg, H.A. (2013). Imatinib tackles lymphoma via the PDGFR $\beta$ + pericyte. *Blood* 121, 5107-5108.
19. Claffey, K.P., Wilkison, W.O., and Spiegelman, B.M. (1992). Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *The Journal of biological chemistry* 267, 16317-16322.
20. Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., van Den Neste, E., Salles, G., and Gaulard, P., et al. (2002). CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* 346, 235-242.
21. Daly, C., Eichten, A., Castanaro, C., Pasnikowski, E., Adler, A., Lalani, A.S., Papadopoulos, N., Kyle, A.H., Minchinton, A.I., and Yancopoulos, G.D., et al. (2013). Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition. *Cancer research* 73, 108-118.
22. Daly, C., Pasnikowski, E., Burova, E., Wong, V., Aldrich, T.H., Griffiths, J., Ioffe, E., Daly, T.J., Fandl, J.P., and Papadopoulos, N., et al. (2006). Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 15491-15496.
23. del Toro, R., Prahst, C., Mathivet, T., Siegfried, G., Kaminker, J.S., Larrivee, B., Breant, C., Duarte, A., Takakura, N., and Fukamizu, A., et al. (2010). Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* 116, 4025-4033.
24. Dengler, H.S., Baracho, G.V., Omori, S.A., Bruckner, S., Arden, K.C., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Rickert, R.C. (2008). Distinct functions for the



- transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. *Nature immunology* 9, 1388-1398.
25. Desgrosellier, J.S., and Cheresh, D.A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Cancer* 10, 9-22.
26. Ellis, L.M., and Hicklin, D.J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature reviews. Cancer* 8, 579-591.
27. Espinet, B., García-Herrera, A., Gallardo, F., Baró, C., Salgado, R., Servitje, O., Estrach, T., Colomo, L., Romagosa, V., and Barranco, C., et al. (2011). FOXP1 molecular cytogenetics and protein expression analyses in primary cutaneous large B cell lymphoma, leg-type. *Histology and histopathology* 26, 213-221.
28. Fathers, K.E., Stone, C.M., Minhas, K., Marriott, J.J.A., Greenwood, J.D., Dumont, D.J., Coomber, B.L. (2005): Heterogeneity of Tie2 expression in tumor microcirculation: influence of cancer type, implantation site, and response to therapy. In: *The American journal of pathology* 167 (6), S. 1753–1762. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61256-4.
29. Felcht, M.; Hillen, U.; Klemke, C-D. (2017): Diagnostik kutaner Lymphome. In: *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 68 (9), S. 696–701. DOI: 10.1007/s00105-017-4020-6.
30. Felcht, M., Klemke, C-D., Nicolay, J.P., Weiss, C., Assaf, C., Wobser, M. et al. (2019): Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, NOS and leg type: Clinical, morphologic and prognostic differences. In: *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 17 (3), S. 275–285. DOI: 10.1111/ddg.13773.
31. Felcht, M., Thomas, M.(2015): Angiogenesis in malignant melanoma. In: *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 13 (2), S. 125–136. DOI: 10.1111/ddg.12580.

32. Felcht, M., and Augustin, H. (2010). Neue Erkenntnisse in der Tumorangiogenese – Potenzial onkologischer und nicht-onkologischer Therapien. *Klinikerzt* 39, 12-17.
33. Felcht, M., Booken, N., Stroebel, P., Goerdts, S., and Klemke, C.-D. (2011). The value of molecular diagnostics in primary cutaneous B-cell lymphomas in the context of clinical findings, histology, and immunohistochemistry. *Journal of the American Academy of Dermatology* 64, 135-43, 143.e1-4.
34. Felcht, M., Heck, M., Weiss, C., Becker, J.C., Dippel, E., Müller, C.S.L., Nashan, D., Sachse, M.M., Nicolay, J.P., and Booken, N., et al. (2012a). Expression of the T-cell regulatory marker FOXP3 in primary cutaneous large B-cell lymphoma tumour cells. *The British journal of dermatology* 167, 348-358.
35. Felcht, M., and Klemke, C.-D. (2011). Diagnostik primär kutaner B-Zell-Lymphome. *Akt Dermatol* 37, 199-204.
36. Felcht, M., Luck, R., Schering, A., Seidel, P., Srivastava, K., Hu, J., Bartol, A., Kienast, Y., Vettel, C., and Loos, E.K., et al. (2012b). Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *The Journal of clinical investigation* 122, 1991-2005.
37. Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature reviews. Cancer* 2, 795-803.
38. Ferrara, N., and Kerbel, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967-974.
39. Ferreri, A.J.M., Ponzoni, M., Govi, S., Pasini, E., Mappa, S., Vito, A., Facchetti, F., Vezzoli, P., Doglioni, C., and Berti, E., et al. (2012). Prevalence of chlamydial infection in a series of 108 primary cutaneous lymphomas. *The British journal of dermatology* 166, 1121-1123.
40. Fiedler, U., and Augustin, H.G. (2006). Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends in immunology* 27, 552-558.

41. Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine* 285, 1182-1186.
42. Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature reviews. Drug discovery* 6, 273-286.
43. Fu, J., Wang, W., Liu, Y.-H., Lu, H., and Luo, Y. (2011). In vitro anti-angiogenic properties of LGD1069, a selective retinoid X-receptor agonist through down-regulating Runx2 expression on Human endothelial cells. *BMC cancer* 11, 227.
44. Gale, N.W., Thurston, G., Hackett, S.F., Renard, R., Wang, Q., McClain, J., Martin, C., Witte, C., Witte, M.H., and Jackson, D., et al. (2002). Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Developmental cell* 3, 411-423.
45. Gao, W., Sweeney, C., Walsh, C., Rooney, P., McCormick, J., Veale, D.J., and Fearon, U. (2013). Notch signalling pathways mediate synovial angiogenesis in response to vascular endothelial growth factor and angiopoietin 2. *Annals of the rheumatic diseases* 72, 1080-1088.
46. Geissinger, E., Adam, P., Müller-Hermelink, H.K., and Rüdiger, T. (2007). Kutane B-Zell-Lymphome. Klassifikation und Diagnostik. *Der Pathologe* 28, 15-20.
47. Goel, S., Wong, A.H.-K., and Jain, R.K. (2012). Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2, a006486.
48. Goetsch, W., Gryczka, C., Korff, T., Ernst, E., Goetsch, C., Seebach, J., Schnittler, H.-J., Augustin, H.G., and Morawietz, H. (2008). Flow-dependent regulation of angiopoietin-2. *Journal of cellular physiology* 214, 491-503.
49. Goodlad, J.R., Davidson, M.M., Hollowood, K., Ling, C., MacKenzie, C., Christie, I., Batstone, P.J., and Ho-Yen, D.O. (2000). Primary cutaneous B-cell lymphoma and *Borrelia burgdorferi* infection in patients from the Highlands of Scotland. *The American journal of surgical pathology* 24, 1279-1285.

50. Grange, F., Joly, P., Barbe, C., Bagot, M., Dalle, S., Ingen-Housz-Oro, S., Maubec, E., D'Incan, M., Ram-Wolff, C., and Dalac, S., et al. (2014). Improvement of survival in patients with primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type, in France. *JAMA dermatology* 150, 535-541.
51. Hakanpaa, L., Sipila, T., Leppanen, V.-M., Gautam, P., Nurmi, H., Jacquemet, G., Eklund, L., Ivaska, J., Alitalo, K., and Saharinen, P. (2015). Endothelial destabilization by angiopoietin-2 via integrin  $\beta$ 1 activation. *Nature communications* 6, 5962.
52. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
53. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
54. Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., Wolf-Peeters, C. de, Falini, B., and Gatter, K.C. (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361-1392.
55. Hashizume, Hiroya; Falcón, Beverly L.; Kuroda, Takashi; Baluk, Peter; Coxon, Angela; Yu, Dongyin et al. (2010): Complementary actions of inhibitors of angiopoietin-2 and VEGF on tumor angiogenesis and growth. In: *Cancer research* 70 (6), S. 2213–2223. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1977.
56. Helfrich, I., Edler, L., Sucker, A., Thomas, M., Christian, S., Schadendorf, D., Augustin, H.G. (2009): Angiopoietin-2 levels are associated with disease progression in metastatic malignant melanoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (4), S. 1384–1392. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1615.
57. Herbert, S.P. Huisken, J., Kim, T.N., Feldman, M.E., Houseman, B.T., Wang, R.A. et al. (2009): Arterial-venous segregation by selective cell sprouting: an alternative

- mode of blood vessel formation. In: *Science (New York, N.Y.)* 326 (5950), S. 294–298. DOI: 10.1126/science.1178577.
58. Hida, K., Hida, Y., Amin, D.N., Flint, A.F., Panigrahy, D., Morton, C.C., and Klagsbrun, M. (2004). Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer research* 64, 8249-8255.
59. Hlatky, L., Hahnfelddt, P., and Folkman, J. (2002). Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *Journal of the National Cancer Institute* 94, 883-893.
60. Hu, B., and Cheng, S.-Y. (2009). Angiopoietin-2: development of inhibitors for cancer therapy. *Current oncology reports* 11, 111-116.
61. Hu, J., Srivastava, K., Wieland, M., Runge, A., Mogler, C., Besemfelder, E., Terhardt, D., Vogel, M.J., Cao, L., and Korn, C., et al. (2014). Endothelial cell-derived angiopoietin-2 controls liver regeneration as a spatiotemporal rheostat. *Science (New York, N.Y.)* 343, 416-419.
62. Hu, H., Wang, B., Borde, M., Nardone, J., Maika, S., Allred, L., Tucker, P.W., and Rao, A. (2006). Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. *Nature immunology* 7, 819-826.
63. Imanishi, Y., Hu, B., Xiao, G., Yao, X., and Cheng, S.-Y. (2011). Angiopoietin-2, an angiogenic regulator, promotes initial growth and survival of breast cancer metastases to the lung through the integrin-linked kinase (ILK)-AKT-B cell lymphoma 2 (Bcl-2) pathway. *The Journal of biological chemistry* 286, 29249-29260.
64. Jacob, L.A., Asati, V., Lakshmaiah, K.C.; Govind, B.K., Lokanatha, D., Babu, S.Mc. et al. (2018): Primary cutaneous B-cell lymphoma: A single-center 5-year experience. In: *Indian journal of cancer* 55 (2), S. 134–137. DOI: 10.4103/ijc.IJC\_418\_17.

65. Jain, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science (New York, N.Y.)* 307, 58-62.
66. Jenni, D., Karpova, M.B., Seifert, B., Golling, P., Cozzio, A., Kempf, W., French, L.E., and Dummer, R. (2011). Primary cutaneous lymphoma: two-decade comparison in a population of 263 cases from a Swiss tertiary referral centre. *The British journal of dermatology* 164, 1071-1077.
67. Kechagia, J.Z.; Ivaska, J.; Roca-Cusachs, P. (2019): Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 20 (8), S. 457–473. DOI: 10.1038/s41580-019-0134-2.
68. Kempf, W., Kazakov, D.V., Mitteldorf, C. (2014): Cutaneous lymphomas: an update. Part 2: B-cell lymphomas and related conditions. In: *The American Journal of dermatopathology* 36 (3), 197-208; quiz 209-10. DOI: 10.1097/DAD.0b013e318289b20e.
69. Kempf, W.; Sander, C.A. (2010): Classification of cutaneous lymphomas - an update. In: *Histopathology* 56 (1), S. 57–70. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2009.03455.x.
70. Kempf, W., Denisjuk, N., Kerl, K., Cozzio, A., and Sander, C. (2012). Primary cutaneous B-cell lymphomas. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 10, 12-22; quiz 23.
71. Kempf, W., and Sander, C.A. (2010). Classification of cutaneous lymphomas - an update. *Histopathology* 56, 57-70.
72. Kerbel, R.S. (2008). Tumor angiogenesis. *The New England journal of medicine* 358, 2039-2049.
73. Klemke, C.-D. (2014). Kutane Lymphome. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 12, 7-31.

74. Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., and Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *The Biochemical journal* 437, 169-183.
75. Kodama, K., Massone, C., Chott, A., Metze, D., Kerl, H., and Cerroni, L. (2005). Primary cutaneous large B-cell lymphomas: clinicopathologic features, classification, and prognostic factors in a large series of patients. *Blood* 106, 2491-2497.
76. Koens, L., Zoutman, W.H., Ngarmmlertsirichai, P., Przybylski, G.K., Grabarczyk, P., Vermeer, M.H., Willemze, R., Jansen, P.M., Schmidt, C.A., and Tensen, C.P. (2014). Nuclear factor- $\kappa$ B pathway-activating gene aberrancies in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type. *The Journal of investigative dermatology* 134, 290-292.
77. Koh, G.Y., Kim, I., Kwak, H.J., Yun, M.-J., and Leem, J.C. (2002). Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiopoietin. *Experimental & molecular medicine* 34, 1-11.
78. Koh, G.Y. (2013). Orchestral actions of angiopoietin-1 in vascular regeneration. *Trends in molecular medicine* 19, 31-39.
79. Korgavkar, K., and Weinstock, M.A. (2014). Changing incidence trends of cutaneous B-cell lymphoma. *The Journal of investigative dermatology* 134, 840-842.
80. Krneta, J., Kroll, J., Alves, F., Prahst, C., Sananbenesi, F., Dullin, C., Kimmina, S., Phillips, D.J., and Augustin, H.G. (2006). Dissociation of angiogenesis and tumorigenesis in follistatin- and activin-expressing tumors. *Cancer research* 66, 5686-5695.
81. Johnson, M.S., Lu, N., Denessiouk, K., Heino, J., and Gullberg, D. (2009). Integrins during evolution: evolutionary trees and model organisms. *Biochimica et biophysica acta* 1788, 779-789.

82. Lee, J., Kim, K.E., Choi, D.-K., Jang, J.Y., Jung, J.-J., Kiyonari, H., Shioi, G., Chang, W., Suda, T., and Mochizuki, N., et al. (2013). Angiopoietin-1 guides directional angiogenesis through integrin  $\alpha\beta 5$  signaling for recovery of ischemic retinopathy. *Science translational medicine* 5, 203ra127.
83. Lennert, K., Stein, H., and Kaiserling, E. (1975). Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *The British journal of cancer. Supplement* 2, 29-43.
84. Lim, S.-T., Chen, X.L., Lim, Y., Hanson, D.A., Vo, T.-T., Howerton, K., Larocque, N., Fisher, S.J., Schlaepfer, D.D., and Ilic, D. (2008). Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Molecular cell* 29, 9-22.
85. Lu, C., Takagi, J., and Springer, T.A. (2001). Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *The Journal of biological chemistry* 276, 14642-14648.
86. Maffei, R., Martinelli, S., Santachiara, R., Rossi, D., Guarnotta, C., Sozzi, E., Zucchetto, A., Rigolin, G.M., Fiorcari, S., and Castelli, I., et al. (2010). Angiopoietin-2 plasma dosage predicts time to first treatment and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 116, 584-592.
87. McDonald, Donald M.; Choyke, Peter L. (2003): Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. In: *Nature medicine* 9 (6), S. 713–725. DOI: 10.1038/nm0603-713.
88. Mahabeleshwar, G.H., Feng, W., Reddy, K., Plow, E.F., and Byzova, T.V. (2007). Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. *Circulation research* 101, 570-580.
89. Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., and Papadopoulos, N., et al. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)* 277, 55-60.



90. Maniotis, A.J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E.A., Gardner, L.M., Pe'er, J., Trent, J.M., Meltzer, P.S., and Hendrix, M.J. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *The American journal of pathology* 155, 739-752.
91. Masiero, M., Simões, F.C., Han, H.D., Snell, C., Peterkin, T., Bridges, E., Mangala, L.S., Wu, S.Y.-Y., Pradeep, S., and Li, D., et al. (2013). A core human primary tumor angiogenesis signature identifies the endothelial orphan receptor ELTD1 as a key regulator of angiogenesis. *Cancer cell* 24, 229-241.
92. May, S.A., Netto, G., Domiati-Saad, R., and Kasper, C. (2005). Cutaneous lymphoid hyperplasia and marginal zone B-cell lymphoma following vaccination. *Journal of the American Academy of Dermatology* 53, 512-516.
93. Meacham, C.E., and Morrison, S.J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 501, 328-337.
94. Mecklenburg, L., Tobin, D.J., Muller-Rover, S., Handjiski, B., Wendt, G., Peters, E.M., Pohl, S., Moll, I., and Paus, R. (2000). Active hair growth (anagen) is associated with angiogenesis. *The Journal of investigative dermatology* 114, 909-916.
95. Mori, F., Ishida, T., Ito, A., Sato, F., Masaki, A., Narita, T., Suzuki, S., Yamada, T., Takino, H., and Ri, M., et al. (2014). Antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human adult T-cell leukemia/lymphoma mouse model. *European journal of haematology* 92, 219-228.
96. Nasarre, P., Thomas, M., Kruse, K., Helfrich, I., Wolter, V., Deppermann, C., Schadendorf, D., Thurston, G., Fiedler, U., and Augustin, H.G. (2009). Host-derived angiopoietin-2 affects early stages of tumor development and vessel maturation but is dispensable for later stages of tumor growth. *Cancer research* 69, 1324-1333.

97. Navid, F., Kolbe, L., Stüb, F., Korff, T., and Neufang, G. (2012). UV radiation induces the release of angiopoietin-2 from dermal microvascular endothelial cells. *Experimental dermatology* 21, 147-153.
98. Nicolay, J.P., Wobser, M. (2016): Cutaneous B-cell lymphomas - pathogenesis, diagnostic workup, and therapy. In: *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 14 (12), S. 1207–1224. DOI: 10.1111/ddg.13164.
99. Papoudou-Bai, A., Marinos, L., Vassou, A., Kapsali, E., Kanavaros, P. (2019): CD5-Positive Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma-Leg Type. In: *Case reports in dermatological medicine* 2019, S. 3730915. DOI: 10.1155/2019/3730915.
100. Parikh, S.M., Mammoto, T., Schultz, A., Yuan, H.-T., Christiani, D., Karumanchi, S.A., and Sukhatme, V.P. (2006). Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PLoS medicine* 3, e46.
101. Park, J-S., Kim, I-K., Han, S., Park, I., Kim, C., Bae, J. et al. (2016): Normalization of Tumor Vessels by Tie2 Activation and Ang2 Inhibition Enhances Drug Delivery and Produces a Favorable Tumor Microenvironment. In: *Cancer cell* 30 (6), S. 953–967. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.10.018.
102. Park, J-H.; Park, K-J.; Kim, Y-S.; Sheen, S-S.; Lee, K-S.; Lee, Hyoungh N. et al. (2007): Serum angiopoietin-2 as a clinical marker for lung cancer. In: *Chest* 132 (1), S. 200–206. DOI: 10.1378/chest.06-2915.
103. Pham-Ledard, A., Prochazkova-Carlotti, M., Vergier, B., Petrella, T., Grange, F., Beylot-Barry, M., and Merlio, J.-P. (2010). IRF4 expression without IRF4 rearrangement is a general feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *The Journal of investigative dermatology* 130, 1470-1472.
104. Phng, L.-K., and Gerhardt, H. (2009). Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Developmental cell* 16, 196-208.

105. Phng, L.-K., Stanchi, F., and Gerhardt, H. (2013). Filopodia are dispensable for endothelial tip cell guidance. *Development (Cambridge, England)* *140*, 4031-4040.
106. Pitulescu, M.E., Schmidt, I., Benedito, R., and Adams, R.H. (2010). Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nature protocols* *5*, 1518-1534.
107. Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* *146*, 873-887.
108. Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature medicine* *9*, 677-684.
109. Reiss, Y., Knedla, A., Tal, A.O., Schmidt, M.H.H., Jugold, M., Kiessling, F., Burger, A.M., Wolburg, H., Deutsch, U., and Plate, K.H. (2009). Switching of vascular phenotypes within a murine breast cancer model induced by angiotensin-2. *The Journal of pathology* *217*, 571-580.
110. Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* *386*, 671-674.
111. Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* *11*, 73-91.
112. Ruan, J., Luo, M., Wang, C., Fan, L., Yang, S.N., Cardenas, M., Geng, H., Leonard, J.P., Melnick, A., and Cerchietti, L., et al. (2013). Imatinib disrupts lymphoma angiogenesis by targeting vascular pericytes. *Blood* *121*, 5192-5202.
113. Saharinen, P.; Eklund, L.; Alitalo, K. (2017): Therapeutic targeting of the angiotensin-TIE pathway. In: *Nature reviews. Drug discovery* *16* (9), S. 635–661. DOI: 10.1038/nrd.2016.278.
114. Sangueza, O.P., Yadav, S., White, C.R., JR, and Brazier, R.M. (1992). Evolution of B-cell lymphoma from pseudolymphoma. A multidisciplinary approach using histology, immunohistochemistry, and Southern blot analysis. *The American Journal of dermatopathology* *14*, 408-413.

115. Sawamiphak, S., Ritter, M., and Acker-Palmer, A. (2010a). Preparation of retinal explant cultures to study ex vivo tip endothelial cell responses. *Nature protocols* 5, 1659-1665.
116. Sawamiphak, S., Seidel, S., Essmann, C.L., Wilkinson, G.A., Pitulescu, M.E., Acker, T., and Acker-Palmer, A. (2010b). Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature* 465, 487-491.
117. Schaerer, L.; Schmid, M. H.; Mueller, B.; Dummer, R. G.; Burg, G.; Kempf, W. (2000): Angiogenesis in cutaneous lymphoproliferative disorders: microvessel density discriminates between cutaneous B-cell lymphomas and B-cell pseudolymphomas. In: *The American Journal of dermatopathology* 22 (2), S. 140–143.
118. Scharpfenecker, M., Fiedler, U., Reiss, Y., and Augustin, H.G. (2005). The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *Journal of cell science* 118, 771-780.
119. Schumacker, P.T., and Samsel, R.W. (1989). Analysis of oxygen delivery and uptake relationships in the Krogh tissue model. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 67, 1234-1244.
120. Semenza, G.L. (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29, 625-634.
121. Senff, N.J., Noordijk, E.M., Kim, Y.H., Bagot, M., Berti, E., Cerroni, L., Dummer, R., Duvic, M., Hoppe, R.T., and Pimpinelli, N., et al. (2008). European Organization for Research and Treatment of Cancer and International Society for Cutaneous Lymphoma consensus recommendations for the management of cutaneous B-cell lymphomas. *Blood* 112, 1600-1609.
122. Serini, G., Napione, L., Arese, M., and Bussolino, F. (2008). Besides adhesion: new perspectives of integrin functions in angiogenesis. *Cardiovascular research* 78, 213-222.

123. Shaffer, A.L., Emre, N.C.T., Romesser, P.B., and Staudt, L.M. (2009). IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 2954-2961.
124. Shaffer, A.L., Rosenwald, A., and Staudt, L.M. (2002). Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nature reviews. Immunology* 2, 920-932.
125. Srivastava, K., Hu, J., Korn, C.; Savant, S.; Teichert, M.; Kapel, S.S. et al. (2014): Postsurgical adjuvant tumor therapy by combining anti-angiopoietin-2 and metronomic chemotherapy limits metastatic growth. In: *Cancer cell* 26 (6), S. 880–895. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.11.005.
126. Stadler, R., Assaf, C., Klemke, C.-D., Nashan, D., Weichenthal, M., Dummer, R., and Sterry, W. (2013). S2k Kurzleitlinie - Kutane Lymphome. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 11, 20-30.
127. Sun, W.Y., Pitson, S.M., and Bonder, C.S. (2010). Tumor necrosis factor-induced neutrophil adhesion occurs via sphingosine kinase-1-dependent activation of endothelial  $\alpha_5\beta_1$  integrin. *The American journal of pathology* 177, 436-446.
128. Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N., and Yancopoulos, G.D. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87, 1171-1180.
129. Swerdlow, Steven H.; Campo, Elias; Pileri, Stefano A.; Harris, Nancy Lee; Stein, Harald; Siebert, Reiner et al. (2016): The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. In: *Blood* 127 (20), S. 2375–2390. DOI: 10.1182/blood-2016-01-643569.
130. Swift, M.R., and Weinstein, B.M. (2009). Arterial-venous specification during development. *Circulation research* 104, 576-588.

131. Tanaka, S.; Sugimachi, K.; Yamashita Y., Y.; Ohga, T.; Shirabe, K.; Shimada, M. et al. (2002): Tie2 vascular endothelial receptor expression and function in hepatocellular carcinoma. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 35 (4), S. 861–867. DOI: 10.1053/jhep.2002.32535.
132. Terpos, E., Anargyrou, K., Katodritou, E., Kastiris, E., Papatheodorou, A., Christoulas, D., Pouli, A., Michalis, E., Delimpasi, S., and Gkatzamanidou, M., et al. (2012). Circulating angiopoietin-1 to angiopoietin-2 ratio is an independent prognostic factor for survival in newly diagnosed patients with multiple myeloma who received therapy with novel antimyeloma agents. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 130, 735-742.
133. Teichert, M., Stumpf, C., Booken, N., Wobser, M., Nashan, D., Hallermann, C., Mogler, C., Müller, C.S.L., Becker, J.C., and Moritz, R.K.C., et al. (2015). Aggressive primary cutaneous B-cell lymphomas show increased Angiopoietin-2-induced angiogenesis. *Experimental dermatology* 24, 424-429.
134. Thomas, M., Felcht, M., Kruse, K., Kretschmer, S., Deppermann, C., Biesdorf, A., Rohr, K., Benest, A.V., Fiedler, U., and Augustin, H.G. (2010). Angiopoietin-2 stimulation of endothelial cells induces alphavbeta3 integrin internalization and degradation. *The Journal of biological chemistry* 285, 23842-23849.
135. Tzima, E., del Pozo, M.A., Shattil, S.J., Chien, S., and Schwartz, M.A. (2001). Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *The EMBO journal* 20, 4639-4647.
136. Valencak, J., Wehsengruber, F., Rappersberger, K., Trautinger, F., Chott, A., Streubel, B., Muellauer, L., Der-Petrossian, M., Jonak, C., and Binder, M., et al. (2009). Rituximab monotherapy for primary cutaneous B-cell lymphoma: response and follow-up in 16 patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 20, 326-330.
137. Yuan, H.T., Khankin, E.V., Karumanchi, S.A., and Parikh, S.M. (2009). Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Molecular and cellular biology* 29, 2011-2022.

138. Wang, M., Fayad, L., Wagner-Bartak, N., Zhang, L., Hagemeister, F., Neelapu, S.S., Samaniego, F., McLaughlin, P., Fanale, M., and Younes, A., et al. (2012). Lenalidomide in combination with rituximab for patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. A phase 1/2 clinical trial. *The Lancet Oncology* 13, 716-723.
139. Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)* 123, 309-314.
140. Warburg, O., Posener, K., and Negelein, E. (1924). Über den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochemische Zeitschrift* 152, 319-344.
141. Weidner, N.; Semple, J. P.; Welch, W. R.; Folkman, J. (1991): Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. In: *The New England journal of medicine* 324 (1), S. 1–8. DOI: 10.1056/NEJM199101033240101.
142. Weis, S.M., and Cheresh, D.A. (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature medicine* 17, 1359-1370.
143. Welte, J., Loges, S., Dimmeler, S., and Carmeliet, P. (2013). Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *The Journal of clinical investigation* 123, 3190-3200.
144. Willemze, Rein; Cerroni, Lorenzo; Kempf, Werner; Berti, Emilio; Facchetti, Fabio; Swerdlow, Steven H.; Jaffe, Elaine S. (2019): The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. In: *Blood* 133 (16), S. 1703–1714. DOI: 10.1182/blood-2018-11-881268.
145. Willemze, R., Jaffe, E.S., Burg, G., Cerroni, L., Berti, E., Swerdlow, S.H., Ralfkiaer, E., Chimenti, S., Diaz-Perez, J.L., and Duncan, L.M., et al. (2005). WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 105, 3768-3785.
146. Willemze, R., Kerl, H., Sterry, W., Berti, E., Cerroni, L., Chimenti, S., Diaz-Perez, J.L., Geerts, M.L., Goos, M., and Knobler, R., et al. (1997). EORTC classification

for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood* 90, 354-371.

147. Wobser, M., Siedel, C., Kneitz, H., Bröcker, E.-B., Goebeler, M., Houben, R., and Geissinger, E. (2013). Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in different subtypes of primary cutaneous B-cell lymphoma. *Acta dermato-venereologica* 93, 656-662.
148. Yen, W.-C., Prudente, R.Y., Corpuz, M.R., Negro-Vilar, A., and Lamph, W.W. (2006). A selective retinoid X receptor agonist bexarotene (LGD1069, targretin) inhibits angiogenesis and metastasis in solid tumours. *British journal of cancer* 94, 654-660.
149. Yuan, Hai Tao; Khankin, Eliyahu V.; Karumanchi, S. Ananth; Parikh, Samir M. (2009): Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. In: *Molecular and cellular biology* 29 (8), S. 2011–2022. DOI: 10.1128/MCB.01472-08.
150. Zendri, E., Venturi, C., Ricci, R., Giordano, G., and Panfilis, G. de (2005). Primary cutaneous plasmacytoma: a role for a triggering stimulus? *Clinical and experimental dermatology* 30, 229-231.
151. Zou, Z., Chen, H., Schmaier, A.A., Hynes, R.O., and Kahn, M.L. (2007). Structure-function analysis reveals discrete beta3 integrin inside-out and outside-in signaling pathways in platelets. *Blood* 109, 3284-3290.

## 8.2 Eigene Publikation

1. Teichert, M\*, Stumpf, C\*, Booken, N., Wobser, M., Nashan, D., Hallermann, C., Mogler, C., Müller, C.S.L., Becker, J.C., and Moritz, R.K.C., et al. (2015). Aggressive primary cutaneous B-cell lymphomas show increased Angiopoietin-2-induced angiogenesis. *Experimental dermatology* 24, 424-429.

\*Beide Autoren haben gleichermaßen zur Arbeit beigetragen



## 9. LEBENSLAUF

### PERSONALIEN

Name und Vornamen: Stumpf, Christine, Carla  
Geburtsdatum: 19. Januar 1977  
Geburtsort: Mosbach  
Familienstand: ledig  
Vater: Franz Stumpf  
Mutter: Hannelore Stumpf, geb. Klingmann

### SCHULISCHER WERDEGANG

1983-1987 Lohrtal-Grundschule, Mosbach  
1987-1993 Pestalozzi-Realschule, Mosbach  
1993-1996 Wirtschaftsgymnasium Ludwig-Erhard-Schule, Mosbach  
24. Juni 1996 Abitur

### BERUFLICHER WERDEGANG

1996-1999 Biologie-Laboranten-Ausbildung am  
Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ)  
  
1999-2007 Tätigkeit als Biologielaborantin am  
Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ)  
Tumorimmunologie-Programm, Abteilung Immungenetik  
(Leiter: Prof. Dr. Peter H. Krammer)

## UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2007/2008	Beginn des Studiums der Medizin an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
12. März 2010	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05. Juni 2014	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
24. Juni 2014	Approbation als Ärztin
01. August 2014- 31. Juli 2017	Assistenzärztin in den Neckar-Odenwaldkliniken am Standort Mosbach, Abteilung Innere Medizin
01. September 2017- 01. September 2019	Facharztausbildung zur Fachärztin für Allgemeinmedizin, Praxis Dr. med. Gerhard Schaffert

## 10. DANKSAGUNG

Herrn PD Dr. med. Moritz Felcht danke ich für die unglaublich gute und fürsorgliche Betreuung, Hilfsbereitschaft, Großzügigkeit und Geduld, die er mir, trotz seiner Belastung in Klinik und Forschung, entgegenbrachte.

Herrn Prof. Dr. Hellmut Augustin für die Möglichkeit in seinem Labor am DKFZ Heidelberg mit meiner Arbeit beginnen zu können, sowie Stella Hertel für die ersten Arbeitsschritte die im Labor nach einer längeren Zeit ohne Labortätigkeit nötig waren.

Herrn Prof. Dr. med. Claus–Detlef Klemke danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Besonderen Dank schulde ich den Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Mannheim Frau Anneliese Pfisterer und Frau Inge Römer für die technische Unterstützung im Labor, sowie zur moralischen Unterstützung in schwierigen Phasen.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Marius Müller, Frau Natalie Ludwig und meinem ehemaligen Deutschlehrer aus der Realschule, Herrn Alfred Roos, für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren. Frau Renate Edelmann und Herrn Karl-Heinz Sinner für die fortwährende Unterstützung und Motivation.

Herrn Werner Braunsdorfer und Annerose Klingmann für die Fahrdienste zu diversen Prüfungen.

Nicht zu Letzt danke ich meinen Eltern, Hannelore und Franz Stumpf, sowie meinem Bruder Franz-Josef Stumpf und Petra van Egmond, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre. Für den Beistand, die vielen netten, aufmunternden Worte und gelegentlich die nötige Härte, welche für die Fertigstellung dieser Arbeit unabdingbar waren.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinem Vater, der die Fertigstellung derselben, aufgrund seines plötzlichen Todes am 27. April 2016, nicht mehr miterleben konnte.