

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
am Campus Benjamin Franklin der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Expression der Extra-Domäne B des Fibronectin (ED-B FN), ein
Marker der Angiogenese, an Blutgefäßen von normalen und bösartig
veränderten lymphatischen und haematopoetischen Geweben

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Stefanie Sauer
aus Dresden

Gutachter/in: 1. Priv.- Doz. Dr. med. H.-D.Menssen
2. Prof. Dr. med. H. Dürkop
3. Prof. Dr. rer. nat. D. Neri

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 1

Tabellenverzeichnis 2

Abbildungsverzeichnis 3

1 Einleitung..... 4

 1.1 Die Angiogenese 8

 1.2 Extra-Domäne B des Fibronectin 10

 1.3 Kurzüberblick über Lymphomerkrankungen 13

 1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit..... 14

2 Material und Methoden 16

 2.1 Übersicht über die Bezugsquellen 16

 2.2 Übersicht der verwendeten Lösungen und Puffer 17

 2.3 Die Gewebeproben 17

 2.3.1 Gefrierasservierte (kryopräservierte) Gewebeproben 18

 2.3.2 Paraffin-eingebettete Gewebeproben 18

 2.4 Aufbereitung der Gewebeproben 20

 2.4.1 Freilegung des ED-B FN Epitops am im Paraffin eingebetteten Gewebe
 21

 2.5 Immunhistologie 21

 2.5.1 Die Anti-ED-B FN Reagenzien 22

 2.5.2 Die immunhistologische Färbung nach der APAAP-Methode 22

 2.6 Kompetitionsversuch mit rekombinantem ED-B FN 23

 2.7 Die Immunhistologie mit dem mAk CD34 24

 2.8 Ko-Expressionsanalyse von CD34 und ED-B FN 24

 2.9 Mikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte 25

 2.10 Statistische Auswertung der Ergebnisse 26

3 Ergebnisse..... 27

 3.1 Nachweis des ED-B FN in kryoasservierten positiven Kontrollgeweben 27

 3.2 Die Epitop-Freilegung des ED-B FN mittels Dampfdruckbehandlung 27

 3.3 Die Bindung des mAk MX1 und des L19-IL2-Fusionsproteins an ED-B FN ist
 spezifisch und inhibierbar durch Überschuss an löslichem ED-B FN 29

Tabellenverzeichnis

3.4 Der ED-B FN Nachweis in nicht-neoplastisch infiltrierten lymphatischen und haematopoetischen Geweben.....	31
3.5 Nachweis des ED-B FN in den verschiedenen Lymphomentitäten und in EBV-assoziierten Lymphoproliferationen.....	35
3.6 Nachweis des ED-B FN in myeloproliferativen Erkrankungen.....	41
3.7 Ergebnisse der statistischen Auswertung.....	42
3.8 Nachweis des ED-B FN in weiteren reaktiv oder pathologisch veränderten Geweben und einem basozellulären Karzinom	44
3.9 Vergleichende Immunhistologie von mit CD34- und MX1-gefärbten Gewebeschnitten.....	46
3.10 Ko-Expressionsanalyse von CD34 und ED-B FN.....	48
4 Diskussion	52
5 Zusammenfassung	69
Literaturverzeichnis	71
Abkürzungsverzeichnis.....	82
Erklärung	84
Lebenslauf.....	85
Publikationsliste.....	86
Danksagung	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2: Nachweis des ED-B FN in gefrierasservierten Lymphom-Biopsaten	27
Tabelle 3: Nachweis des ED-B FN in nicht-neoplastisch infiltrierten lymphatischen und haematopoetischen Geweben	34
Tabelle 4: ED-B FN Nachweis in B-NHL und EBV-assoziierten Lymphoproliferationen.....	36
Tabelle 5: Nachweis des ED-B FN beim Hodgkin-Lymphom.....	38
Tabelle 6: Nachweis des ED-B FN beim T-NHL.....	40
Tabelle 7: Nachweis des ED-B FN bei myeloproliferativen Erkrankungen	41
Tabelle 8: Zusammenfassende Darstellung der statistischen Auswertung.....	43
Tabelle 9: Vorkommen von ED-B FN-positiven Gefäßen bei weiteren reaktiv oder pathologisch veränderten Geweben und einem basozellulären Karzinom	46

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Fibronectin.	11
Abbildung 2: 3D-Struktur von ED-B FN.	12
Abbildung 3: Immunhistologischer Nachweis des ED-B FN an Blutgefäßen im murinen F9-Teratokarzinom	28
Abbildung 4: Vergleich der Immunhistologie im kryoasservierten und im Paraffin eingebetteten Gewebe.	29
Abbildung 5: Konkurrenz der spezifischen Bindung von anti-ED-B FN-Antikörpern an ED-B FN durch Präinkubation mit rekombinatem löslichem ED-B FN.	30
Abbildung 6: Nachweis des ED-B FN mittels Immunhistologie in nicht-neoplastisch infiltriertem lymphatischem und haematopoetischem Gewebe.	32
Abbildung 7: Immunhistologischer Nachweis des ED-B FN beim B-NHL.	37
Abbildung 8: Immunhistologischer Nachweis des ED-B FN beim B-NHL.	38
Abbildung 9: Immunhistologischer Nachweis des ED-B FN beim Hodgkin-Lymphom.	39
Abbildung 10: Immunhistologischer Nachweis des ED-B FN beim T-NHL.	40
Abbildung 11: Immunhistologischer Nachweis des ED-B FN bei myeloproliferativen Erkrankungen.	42
Abbildung 12: Nachweis der ED-B FN-Expression in weiteren reaktiv/nicht-neoplastisch veränderten Geweben.	45
Abbildung 13: Vergleichende immunhistologische Färbungen mit den Antikörpern CD34 und MX1 an Gewebeschnitten von Lymphknoten und Plasmazellmyelom.	47
Abbildung 14: Immunfluoreszenz am Paraffinschnitt zur Darstellung der Ko-Expression von CD34 und ED-B FN im normalen und entzündlich veränderten Lymphknoten und im Nierenzellkarzinom.	49
Abbildung 15: Immunfluoreszenz am Paraffinschnitt zur Darstellung der Ko-Expression von CD34 und ED-B FN bei Lymphomen.	50

1 Einleitung

1 Einleitung

Bösartige Erkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in industrialisierten Ländern. So belegt die häufigste Tumorerkrankung, das Bronchialkarzinom, den Platz 4 in der deutschen Todesursachenstatistik 2010.¹ Standardtherapien der Krebsbehandlung bestehen aus operativen Verfahren und Strahlentherapie, wenn die Erkrankung noch lokal begrenzt ist, und aus Chemotherapie oder Immunchemotherapie, wenn sie bereits metastasiert hat. Ferner kann eine Hormontherapie bei metastasierten, hormonabhängigen Tumoren wie z. B. bei manchen Formen des Hormonrezeptorpositiven Brustkrebses oder beim Prostatakarzinom durchgeführt werden. Dabei nutzt insbesondere die Radio- und Chemotherapie den Umstand, dass schnell proliferierende Tumorzellen im Vergleich zu normal differenzierten Ausgangszellen besonders empfindlich auf Strahlentherapie und Zytostatika reagieren und somit bevorzugt zerstört werden können. Allerdings sind diese Therapien meist nicht tumorspezifisch und benötigen eine hohe Dosis, um die volle Wirksamkeit zu entfalten. Sie sind deshalb auch häufig mit vielen Nebenwirkungen verbunden.

Neue Therapien zielen selektiv und möglichst spezifisch auf den Tumor, um ihn zu zerstören. Eine große Rolle spielen dabei Tumor-assoziierte und Tumorzell-spezifische Antigene, gegen die monoklonale Antikörper oder Antikörperfragmente hergestellt werden können. Manche dieser Antikörper haben sich im klinischen Alltag bereits bewährt. So führt beispielsweise der CD20-Antikörper Rituximab in Kombination mit dem CHOP-Chemotherapie-Protokoll bei Patienten, die an einem hochmalignen Lymphom, dem DLBCL, erkrankt sind, zu einer deutlichen Erhöhung der Heilungsrate.²
³ Darüber hinaus bewirkt bei Frauen mit HER-2-positivem Mammakarzinom die Behandlung mit dem HER-2-Rezeptorantikörper Trastuzumab in Kombination mit Chemotherapie ein signifikant längeres Gesamtüberleben.⁴ Schließlich verbessern die anti-EGFR-Antikörper Cetuximab (chimärer Maus-Mensch mAk) und Panitumumab (humaner mAk) in Kombination mit Chemotherapie die Gesamtüberlebensrate und das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit fortgeschrittenem, Therapie-refraktärem kolorektalem Karzinom ohne kRAS-Mutation.^{5, 6}

1 Einleitung

Der Erfolg der Antikörper-targetierten Therapie bei malignen Erkrankungen liegt auch daran, dass zunehmend humanisierte oder vollhumane Antikörper eingesetzt werden oder Antikörper-Formatvarianten, um besondere pharmakokinetische Eigenschaften zu nutzen, oder auch solche mit erweiterter Genvariabilität, z. B. durch Herstellung synthetischer Genabschnitte. Spezies-fremde Antikörper, z. B. solche von der Maus, führen im menschlichen Organismus zur Bildung von Human-anti-Maus-Antikörpern, so dass die Mausantikörper rasch inaktiviert werden (neutralisierende Antikörper) oder zusätzlich sogar eine anaphylaktische Reaktion ausgelöst werden kann.⁷ Die Chimärisierung, angewandt z. B. beim mAk Rituximab, und Humanisierung, angewandt z. B. beim mAk Trastuzumab, von Antikörpern führt zu einer deutlich besseren Verträglichkeit beim Menschen und durch die humanen Fc-Anteile werden auch wichtige Effektorfunktionen, z. B. die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und die komplementvermittelte Zytolyse (CDC), induziert. Die monoklonalen Antikörper, bestehend aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, weisen ein hohes Molekulargewicht auf und diffundieren daher schlecht ins Gewebe. Sie zeichnen sich meist durch eine hohe Affinität, Maß der Bindungsstärke einer Bindung zwischen Antigen- und Antigenbindener Domäne, und Spezifität aus. Die Antigen-Antikörper-Bindungen können spontan dissoziieren, was durch einen hohen Antigenüberschuss oder unphysiologische pH-Werte begünstigt wird. Dies kann u. a. auch bei der Immunhistologie zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Antikörperfragmente, hergestellt z. B. durch die phage-display-technology, wie das Fv-Fragment (die Antigen-bindende variable Domäne [complementarity determining regions] der schweren und leichten Kette) oder das Fab-Fragment (antigenbindendes Fragment) können durch ihr geringeres Molekulargewicht dagegen leichter in das Gewebe, z. B. von Neoplasien, gelangen. Jedoch weisen die Fab-Fragmente eine geringere Bindungsaffinität zum Ziel-Epitop auf. Beim Fv-Fragment ist der Zusammenhalt der variablen Domäne relativ schwach. Um eine höhere Stabilität des Fv-Fragments zu erreichen, werden diese mit kurzen Peptiden, sog. Peptidlinkern, verbunden (scFv).⁸ Allerdings fehlt bei Fv- und Fab-Fragmenten die zelluläre immunmodulierende Wirkung, die über das Fc-Fragment vermittelt wird. Die Herstellung von konjugierten Antikörpern und Antikörperfragmenten unter Verwendung von Radioisotopen, Zytokinen oder zytotoxischen Substanzen, wie z. B. Gemtuzumab ozogamicin

1 Einleitung

(Mylotarg®), ermöglicht die spezifische Akkumulation dieser Substanz, z. B. auf der Zelloberfläche von Blasten einer akuten myeloischen Leukämie. So kann prinzipiell das therapeutische Arsenal zur Behandlung bösartiger Erkrankungen erweitert werden. Darüber hinaus besteht grundsätzlich auch die Möglichkeit der diagnostischen Nutzung solcher Immunkonjugate, z. B. durch Kopplung an ¹²⁴-Jod (Radioimmunkonjugat) zur Durchführung von Immuno-PETs.

Ein anderer Erfolg versprechender Weg liegt in der Entwicklung von Medikamenten, die gezielt in Signaltransduktionswege der Tumorzellen eingreifen, die für das Tumorstadium von essentieller Bedeutung sind. Als gutes Beispiel hierzu dient das Medikament Imatinib (Glivec®), das unter anderem zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) eingesetzt wird. In den entarteten Zellen der CML findet sich typischerweise eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 (t(9;22)(q34;q11); Philadelphia Chromosom). Durch diese Translokation entsteht ein Fusionsgen, BCR-ALB, das eine Tyrosinkinase kodiert, die deutlich länger und stärker wirksam ist als die der normalen Blutstammzellen. Der Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) Imatinib wurde gezielt entwickelt, um sich an die BCR-ABL-Tyrosinkinase, die als zentraler Pathomechanismus das Wachstum der CML-Zellen unterhält, anzulagern und zu inhibieren. So konnte durch den Einsatz von Imatinib eine 5-Jahresüberlebensrate von 89 % bei neudiagnostizierten Patienten mit CML erreicht werden.⁹ Nachfolge-Präparate wie Nilotinib und Dastinib werden bei Patienten mit CML eingesetzt, wenn eine Imatinib-Unverträglichkeit vorliegt, sowie bei fehlendem Ansprechen auf oder bei Auftreten eines Rezidivs unter Imatinib. So zeigte Nilotinib in ersten klinischen Studien eine 1-Jahresüberlebensrate von 79 % bei Patienten, die sich in der chronischen Phase der CML befanden und die eine Imatinib-Unverträglichkeit oder ein Imatinib-Versagen aufwiesen.¹⁰ Dasatinib erreichte in der 8-monatigen Verlaufskontrolle ein Ansprechen bei 30 % bis 90 % bei Patienten mit Imatinib-Toleranz oder Unverträglichkeit.^{11, 12, 13}

Bei den anderen bösartigen Erkrankungen wird nach ähnlichen Inhibitoren der Signaltransduktionswege gesucht, die für das Tumorstadium von zentraler Bedeutung sind. Die Heterogenität der genetischen Veränderung innerhalb der meisten Tumorentitäten ist jedoch wesentlich größer als bei der CML, so dass ähnlich wirksame Tyrosinkinase-

1 Einleitung

Inhibitoren zur Behandlung von soliden Tumorerkrankungen oder Lymphomen und den meisten akuten Leukämien noch nicht gefunden werden konnten. Allerdings konnten durch den Einsatz von TKI in molekularbiologisch definierten Subgruppen von Patienten mit metastasiertem, nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom klinische Erfolge erreicht werden. So zeigten kontrollierte Studien mit Erlotinib und Gefitinib eine Verlängerung des Gesamtüberlebens von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom.^{14, 15} Dabei unterdrücken Erlotinib und Gefitinib die Signalwege des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR), wenn dieser eine Deletion des Exon 19 oder eine L858R-Mutation des Exon 21 in soliden Tumoren aufweist (z. B. beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom). Auch kann bei Patienten, die an dem sehr seltenen gastrointestinalen Stromatumor (GIST) erkrankt sind, der u. a. cKIT-Mutationen aufweist, durch die Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Imatinib, dessen Nachfolge-Medikamenten, sowie mit Sunitinib eine verlängerte Remissionsfreiheit erreicht werden.^{16, 17}

Ein weiterer Ansatz, das Tumorwachstum zu vermindern, wird zunehmend in der gezielten Beeinflussung des Tumorstromas und der extrazellulären Matrix von Tumoren gesehen. So konnte gezeigt werden, dass stromale Strukturen als Reaktion auf infiltrierende Tumorzellverbände in einer charakteristischen Weise umgebaut werden, so dass sie als Target für eine gezielte Tumorthherapie in Frage kommen. Dabei spielt die extrazelluläre Matrix (ECM) im Tumorgewebe eine besondere Rolle in der Regulation des Phänotyps sowie der Proliferation, Differenzierung, Migration und sogar der Genexpression von infiltrierenden Tumorzellen. Integrine, u. a. das β 1-Integrin, vermitteln z. B. über die fokale Adhensions-Kinase (FAK) und durch Induktion der Proteine der BCL-2-Familie Überlebenssignale an die Tumorzellen. Proteine wie Laminin, Fibronectin und Collagen Typ I fördern die Resistenz der Tumorzellen gegenüber Zytostatika und Radiotherapie. Myofibroblasten, die durch Interaktion mit Tumorzellen oder durch von ihnen produzierte Signalstoffe aktiviert werden, können die ECM umgestalten. Ferner wird durch eine Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (u. a. VEGF) aus Tumorzellen oder aktivierten stromalen Zellen die Angiogenese angeregt. So werden insbesondere Angiogenese-Zielstrukturen (z. B. VEGF-Rezeptoren, deren Signaltransduktionswege oder VEGF direkt) als

1 Einleitung

Angriffspunkte gesehen, gegen die Medikamente zur Behandlung von malignen Erkrankungen entwickelt werden können.¹⁸

1.1 Die Angiogenese

Unter dem Begriff der Angiogenese wird die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen, durch Sprossung, Splittung und Fusion von Gefäßästen zusammengefasst.¹⁹ Durch Um- und Abbau der extrazellulären Matrix können Endothelzellen mit Hilfe von Migrations- und Proliferationsvorgängen in das Gewebe vordringen. Dort gruppieren sie sich zu einer röhrenähnlichen Struktur und fusionieren zu einem neuen Gefäß.²⁰ Im Gegensatz zu reifen Blutgefäßen zeigen neugebildete Blutgefäße im Tumorgewebe eine Desorganisation im histologischen Gefäßaufbau mit ungleichmäßigen Durchmessern, Dilatationen, Endothelfenestrierungen und einer erhöhten Durchlässigkeit der Gefäße.²¹ In Gebieten der Tumorproliferation wird darüber hinaus die extrazelluläre Matrix stark verändert.²² Physiologisch findet Angiogenese während der Embryonalzeit und fetalen Entwicklung statt. In gesunden ausgereiften Organen und Geweben des menschlichen Körpers tritt jedoch keine Angiogenese auf. Eine Ausnahme stellen der weibliche Fortpflanzungstrakt und speziell das Endometrium und die Ovarien dar.²³ Als Reize für die Neubildung von Blutgefäßen gelten vor allem Entzündung und Hypoxie.²⁴ Daher findet sich bei pathologischen Veränderungen, die mit Entzündungen oder einem gesteigerten Sauerstoffbedarf einhergehen, auch eine vermehrte Angiogenese (z. B. bei Wundheilung, diabetischer Retinopathie, Arteriosklerose und rheumathoider Arthritis).²⁵ Ferner führen das Tumorwachstum und die Proliferation von Tumorzellen in praktisch jedem tumor-infiltrierten Gewebe zur Neubildung von Blutgefäßen.²⁶ Grundlegende Arbeiten von Folkman und Kalluri haben die Bedeutung der Angiogenese bei der Entwicklung und dem Wachstum bösartiger Erkrankungen belegt. Sie postulierten zwei Phasen des Tumorwachstums.²⁷

- **Phase 1:** Entstehung einer Tumorzelle durch eine kritische Mutation in einer normalen Körperzelle. Durch eine ausgeglichene Zellteilungsrate und Zelltod bleibt die Anzahl der entarteten Zellen konstant. Es treten kein Tumorwachstum und keine Metastasierung auf.

1 Einleitung

- **Phase 2:** Ausbildung eines Angiogenese-Phänotyps, der Tumorwachstum und Metastasierung ermöglicht.

Ein bösartiger Tumor kann dank der ausreichenden Versorgung durch neu gebildete Gefäße rasch expandieren. Ab einem Durchmesser des Tumors von ca. 2 mm setzt dieser Vorgang der Angiogenese ein²⁸, der über Strukturen in der extrazellulären Matrix und auf den Zelloberflächen reguliert wird. In vielen vergleichenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Angiogenese im Tumorgewebe deutlich stärker ausgeprägt ist als im normalen Ausgangsgewebe. So besteht grundsätzlich die Möglichkeit, biochemische oder molekulare Marker der Angiogenese (VEGF / VEGFR, Integrin $\alpha_3\beta_v$, ED-B FN) als Zielstrukturen zu nutzen, um Malignome selektiv mit Medikamenten anzugreifen. Mit Hilfe von Antikörpern, die gegen Tumorzell- oder Tumorstroma-assoziierte Antigene gerichtet sind, ist es möglich geworden, toxische oder immunmodulierende Substanzen im Tumorgewebe gezielt anzureichern.²⁹ Eine weitere Strategie, das Wachstum und die Metastasierung von Malignomen zu bekämpfen, besteht darin, die Angiogenese selbst mittels inhibierender Medikamente zu blockieren. VEGF besitzt eine Schlüsselrolle in der Bildung der Angiogenese, die über VEGF-Rezeptoren auf Endothelien und anderen Zellen vermittelt wird. Gegen die VEGF-Signaltransduktionswege sind bereits einige Medikamente erfolgreich entwickelt worden, wie z. B. der humanisierte monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin®), der gegen VEGF gerichtet ist, sowie die TKI Sorafenib (Nexxavar®) und Sunitinib (Sutent®), die unter anderem die Signaltransduktion von VEGF-Rezeptoren blockieren.³⁰

Um das Ausmaß der Angiogenese in einem Gewebe zu messen, wird die Dichte der Mikrogefäße (MVD \approx microvessel density) pro Fläche im Gewebsschnitt mikroskopisch bestimmt. Dabei wird das Endothel immunhistologisch, z. B. mit CD34- oder CD31-Antikörpern, markiert. Der MVD wird eine prognostische Aussagekraft bei Tumorerkrankungen zugeschrieben.³¹ Durch Vergleich der MVD in Lymphomen und myeloproliferativen Erkrankungen mit normalen lymphatischen und haematopoetischen Geweben wurde eine gesteigerte Angiogenese in medullären und nodulären Lymphomen sowie in myeloproliferativen Erkrankungen nachgewiesen.^{32, 33, 34, 35} Weiterhin wurde beim hochmalignen B-NHL eine signifikant höhere MVD festgestellt als im niedrigmalignen B-

1 Einleitung

NHL.^{36, 37} Im folliculären Lymphom wurde interfollikulär eine höhere Gefäßdichte als intrafollikulär beschrieben.³⁸ Auch beim Plasmazellmyelom scheint die MVD in Verbindung mit dem Aktivitätsgrad der Erkrankung zu stehen³⁹, so dass empfohlen wurde, therapeutische Strategien an den Grad der Angiogenese als Ausdruck der Krankheitsaktivierung anzupassen.⁴⁰ In soliden Tumoren, z. B. im klarzelligen Nierenzellkarzinom, wurde ebenfalls eine höhere MVD im Vergleich zu normalem Nierengewebe nachgewiesen.⁴¹

1.2 Extra-Domäne B des Fibronectin

Die Extra-Domäne B des Fibronectins (ED-B FN) stellt eine Variante des Fibronectin dar. Das Fibronectin (FN) ist ein Glycoprotein, das aus ca. 2500 Aminosäureresten besteht.⁴² Nachgewiesen wurde es in der extrazellulären Matrix von Tumoren und zirkulierend im Blutplasma. Die genaue Funktion des FN ist nicht vollständig bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass FN eine funktionelle Rolle bei der Adhäsion, Migration, Differenzierung und Proliferation von Zellen einnimmt. So fanden sich bei Mäusen mit einem inaktiven FN-Gen große Gewebedefekte im Bereich des Mesoderms.⁴³ Das Glycoprotein FN ist aus drei sich wiederholenden Repeats (Typ I, II und III) zusammengesetzt. Repeat-Typ I und II sind durch Cysteinreste charakterisierte Strukturen, die Disulfidbrücken ausbilden. Der Repeat-Typ III bildet mit seinem aromatischen Anteil die spezifischen Bindungsdomänen. Dadurch kann das Protein mit verschiedenen Liganden, z. B. Zellen, Fibrin, Collagen und Heparin, interagieren. Molekulare Varianten von FN entstehen durch alternatives Splicen in der prä-mRNA des Repeat-Typs III (ED-A FN, ED-B FN, variable III-CS-Region) sowie durch posttranslationale Modifikation (de novo glykolisiertes FN). Die unterschiedliche Ausprägung in der III-CS-Region entscheidet über das Molekulargewicht und somit über die Löslichkeit des Proteins und eine mögliche Dimerisierung.⁴⁴

1 Einleitung

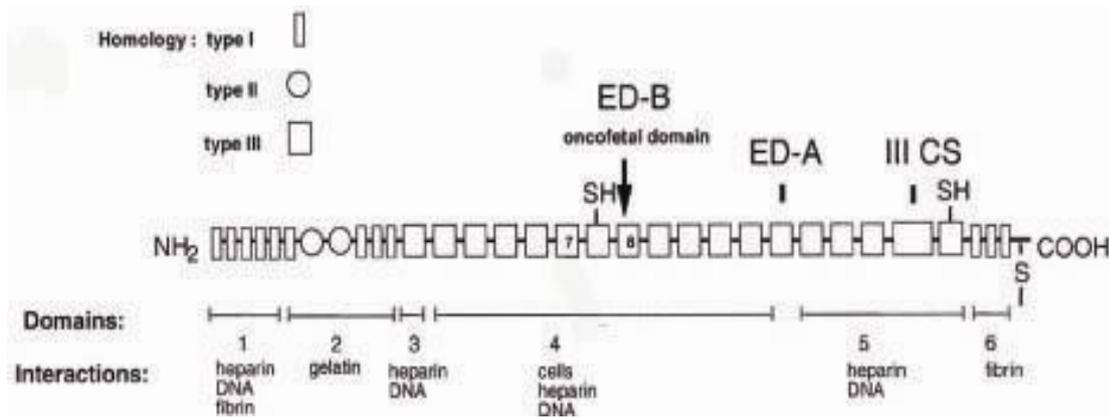


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Fibronectin.

Entnommen aus Ebbinghaus C, Scheuermann J, Neri D et al.⁵⁰

Das de novo glykolisierte FN ist definiert durch Glykolisierung in der III-CS-Region und wurde von der Gruppe um Prof. Hakamori entdeckt. Diese Isoform ist ein Protein, das vor allem in der extrazellulären Matrix des fetalen und malignen Gewebes zu finden ist.⁴⁵ Durch die Glykolisierung ist eine Änderung in der Substratspezifität der α -Gal-Nac Transferase möglich.⁴⁶ Das ED-A FN bildet eine dem ED-B FN sehr ähnlich FN-Variante. Es ist in der Nähe von zentralen Zellbindungsregionen lokalisiert und genauso wie ED-B FN ein Protein der extrazellulären Matrix. Auch die Funktionen des ED-A FN ähneln denen des ED-B FN. ED-B FN wurde erstmalig von Zardi et al.⁴⁷ beschrieben. Die Sequenz des ED-B FN besteht aus 91 Aminosäuren, die von einem einzelnen Exon kodiert werden, das durch differenzielles Splicing entweder in die mRNA komplett integriert oder ausgeschlossen wird. Die dreidimensionale Struktur des ED-B FN wurde mit Hilfe der NMR-Spektroskopie entschlüsselt. Dessen Grundstruktur besteht aus zwei antiparallelen β -Faltblättern, die zusammen die Form eines β -Sandwichs ergeben. Das eine β -Faltblatt wird aus drei β -Strängen, das andere aus vier β -Strängen zusammengesetzt.⁴⁸

1 Einleitung

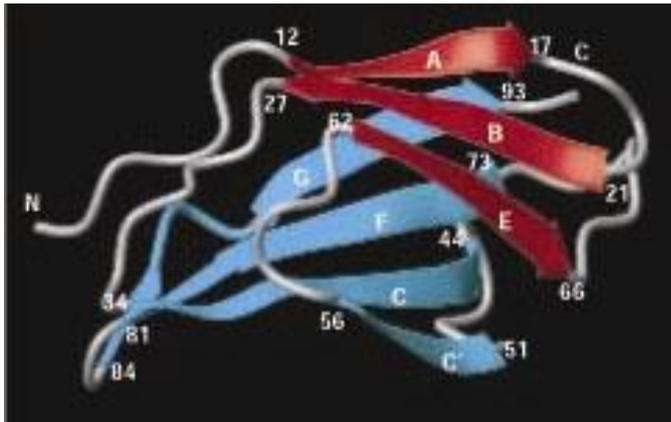


Abbildung 2: 3D-Struktur von ED-B FN.

Die rote Darstellung zeigt ein β -Faltblatt bestehend aus drei (A, B, E) β -Strängen, die blaue Darstellung zeigt das zweite β -Faltblatt bestehend aus vier (G, F, C, C') β -Strängen. Entnommen aus Fattorusso R, Pellicchia M, Viti F et al.⁴⁸

Knock-out-Mäuse mit einem fehlenden ED-B FN-Exon sind gesund, fertil und zeigen in vivo keinen auffälligen Phänotyp, aber das Wachstum der Fibroblasten ist verlangsamt. Offenbar besitzt ED-B FN keine Schlüsselfunktion in der Embryonalentwicklung, sondern es scheint an Modulationsvorgängen des Gewebewachstums beteiligt zu sein.⁴⁹

ED-B FN nimmt eine wichtige Funktion bei der Angiogenese durch Beeinflussung der Endothelfunktionen wie Adhäsion, Proliferation und Formation neuer Blutgefäße ein.^{50, 51} Durch Stimulation der Expression von VEGF und als potentieller Bindungspartner des $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin-Rezeptors induziert ED-B FN ebenfalls die Angiogenese.^{52, 53} ED-B FN wird hauptsächlich in der extrazellulären Matrix neu gebildeter Blutgefäße gefunden. Im Gegensatz dazu weisen reife Blutgefäße in gesunden Organen oder Geweben typischerweise kein ED-B FN auf.

Nachweis des ED-B FN in gesunden und krankhaft veränderten Geweben

ED-B FN ist im gesunden, ausgereiften Gewebe bis auf wenige Ausnahmen, z. B. in dem Ovar und Endometrium, nicht vorhanden.⁵⁴ Solide Tumore, wie z. B. das klarzellige Nierenzellkarzinom, weisen eine hohe Expression von ED-B FN an neu gebildeten Blutgefäßen und teilweise auch im Tumorstroma auf.^{55, 56} Im Gegensatz dazu ist in der gesunden ausgereiften Niere kein ED-B FN vorhanden.⁵⁷ ED-B FN ist

1 Einleitung

darüber hinaus bei Angiogenese-induzierenden Erkrankungen, z. B. bei Atherosklerose, rheumatoider Arthritis, sowie bei retinalen Erkrankungen und während der Wundheilung an den Blutgefäßen nachgewiesen worden.^{58, 59, 60, 61, 62, 63, 64}

1.3 Kurzüberblick über Lymphomerkrankungen

Die Einteilung der Lymphome erfolgt nach der WHO-Klassifikation.⁶⁵ Lymphomerkrankungen werden grob in Hodgkin-Lymphome (HL) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) unterteilt. Unter dem Begriff NHL wird eine Vielzahl von Lymphomtypen der B- und T-Zellreihe zusammengefasst.⁶⁶ Risikofaktoren für die Entstehung von Lymphomen, vor allem von NHL, sind erworbene oder angeborene Immundefekte (z. B. HIV-Infektionen, Infektionen durch HTLV 1, EBV oder *Helicobacter pylori*, immun-suppressive Dauertherapien) sowie eine erhöhte Strahlenexposition.⁶⁷ Im Gegensatz zu soliden Tumoren sind Lymphome Systemerkrankungen und bedürfen deshalb primär einer systemischen Behandlung, z. B. Chemotherapie. Operative Verfahren stehen bei ihnen im Hintergrund und werden meist zur Diagnosefindung oder in seltenen Fällen zur Vermeidung von Komplikationen durchgeführt. Auch die Strahlentherapie spielt bei der Lymphombehandlung nur eine begrenzte Rolle und wird hauptsächlich im lokalisierten Stadium und meist in Kombination mit einer Chemotherapie angewandt. Das HL spricht sehr gut auf Chemotherapie oder eine kombinierte Radiochemotherapie an und ist bei den meisten Patienten heilbar (in über 85 % der Fälle), wie große Sammelstatistiken belegen. So waren im Jahre 2010 in den USA 8490 der 74030 neu diagnostizierten Lymphompatienten an einem HL erkrankt. Allerdings sind im gleichen Zeitraum nur 1320 Patienten an einem HL verstorben.⁶⁸ Auch die meisten NHL-Entitäten sind durch eine Chemotherapie und im lokalisierten Stadium auch durch alleinige Strahlentherapie behandelbar und zeigen ein gutes Ansprechen. Tritt jedoch ein Rezidiv auf, so sind anhaltende Therapieerfolge oder gar Heilungen nur noch selten zu erreichen. So finden sich einige haematologische Neoplasien, wie z. B. das Plasmazellmyelom, die trotz Hochdosis-Chemotherapie meist nicht geheilt werden können.

Im Vergleich zu soliden Karzinomen sind die Patienten mit NHL oder HL durchschnittlich jünger. Das HL tritt typischerweise zwischen dem 15. – 35. Lebensjahr und im achten Lebensjahrzehnt gehäuft auf. Bei den NHL sind vor allem das Burkitt-Lymphom,

1 Einleitung

ALK-positive ALCL im Kindesalter und bei jungen Erwachsenen besonders oft aufzufinden. Die häufigste bösartige Erkrankung des Kindesalters ist jedoch die akute lymphoblastische Leukämie, die ihren Ausgang von B-Zellen nimmt.

Gerade weil Patienten mit Lymphomkrankungen jünger sind, werden Chemo- und Strahlentherapie-induzierte Nebenwirkungen wie z. B. das Auftreten einer Zweitneoplasie oder myelodysplastischer Syndrome erlebt. Neuere Medikamente wie z. B. der CD20-Antikörper Rituximab haben die Heilungschancen von Patienten z. B. mit diffus großzelligem B-Zell Lymphom (DLBCL) deutlich verbessert. Jedoch besteht noch ein deutlicher Bedarf an neuen Therapieansätzen für Patienten mit rezidivierten Lymphomen.

Die Neubildung von Blutgefäßen, Angiogenese, ist auch in lymphatischen und haematopoetischen Neoplasien erforderlich, um das Wachstum dieser Neoplasien zu unterhalten, wie in vielen Untersuchungen gezeigt werden konnte.^{28, 31 – 36, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75} Diese umfangreichen Beobachtungen lassen vermuten, dass ED-B FN an neugebildeten Blutgefäßen auch im Gewebe von lymphatischen Neoplasien vorhanden sein könnte und daher als mögliche vaskuläre Zielstruktur für selektive Therapien in Frage käme.

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel meiner Arbeit war es zu untersuchen, ob der Angiogenesemarker ED-B FN in normalen und bösartig veränderten haematopoetischen und lymphatischen Geweben nachweisbar ist. Dazu wurden Biopsate von über 200 Patienten, die an haematopoetischen oder lymphatischen Neoplasien erkrankt waren, systematisch mittels Immunhistologie auf das Vorhandensein von ED-B FN analysiert. Außerdem sollte untersucht werden, ob ein wesentlicher Unterschied im Vorhandensein von ED-B FN bei bösartigen haematologischen Erkrankungen im Vergleich zu normalem oder reaktiv bzw. inflammatorisch verändertem Ausgangsgewebe besteht.

Um diese Untersuchungen an routinemäßig in Paraffin eingebetteten Gewebeproben durchführen zu können, musste zunächst ein methodisches Problem gelöst werden, denn immunhistologische Untersuchungen mittels gentechnisch hergestellter Antikörper

1 Einleitung

(phage-display-technology) sind aufgrund ihrer relativ geringen Affinität am Paraffinschnitt in der Regel nur durch eine komplizierte Vorbehandlung des Gewebes zur Epitop-Freilegung möglich. Dabei wurde unter Verwendung eines Dampfdrucktopfes eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, das ED-B FN-Epitop in Paraffinschnitten schonend freizulegen, so dass es mittels der APAAP-Standardmethode immunhistologisch nachgewiesen werden konnte.

In Einzelnen sollten folgende Fragen im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden:

- 1. Lässt sich ED-B FN in Tumorbiopsaten von Patienten mit lymphatischen und haematologischen Neoplasien nachweisen?
- 2. Lässt sich ED-B FN auch in normal reifen, entzündlich/reaktiv veränderten haematopoetischen und lymphatischen Geweben nachweisen?
- 3. In welchem Umfang ist ED-B FN an neugebildeten Blutgefäßen in Biopsaten von lymphatischen und haematologischen Neoplasien vorhanden und gibt es einen Unterschied zwischen der Häufigkeit der ED-B FN-positiven Blutgefäße im Lymphomgewebe und nicht-neoplastischem lymphatischem Gewebe?
- 4. Sind zwischen den einzelnen lymphatischen und haematologischen Neoplasien Unterschiede in der Häufigkeit der ED-B FN-positiven Blutgefäße vorhanden?

2 Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Übersicht über die Bezugsquellen

Reagenzien	Bezugsquellen
mAk BC1	Zardi L., Genua, Italien
L19-IL2-Fusionsprotein	Philogen, SpA, Siena, Italien
mAk MX1	Bayer Schering Pharma, Berlin, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T™ Compound	Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Nederlands
Tween® 20 pure	Polyoxyethylene sorbitan monolaureate, Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
monoklonaler murinen Antikörper gegen humanes IL-2	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland, Klon: 5334
Dako REAL detection kit APAAP, Mouse, K 5000“	Dako, Hamburg, Deutschland
Kaninchen Anti-Maus-Serum	Dako, Hamburg, Deutschland, Z0259
APAAP-Komplex	Dako, Hamburg, Deutschland, D0651
Gelatine	Kaisers Glyceringelatine, Merck, Darmstadt
mAk CD34	Immunotech, Marseille, France, Klon: QBEND
Ziege-Anti-Maus Cy3-konjugierten Antikörper	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege-Anti-Maus Cy2-konjugiertem Antikörper	Dianova, Hamburg, Deutschland
TOTO3	Molecular Probes, Paisley, UK
Flourescent Mounting Medium	Dako, Hamburg, Germany, S3023

2 Material und Methoden

2.2 Übersicht der verwendeten Lösungen und Puffer

Citratpuffer (pH 6,0)	5 l H ₂ O dest. + 10,5 g Zitronensäure + NaOH bis pH 6,0
Hämalaun nach Mayer	3 l H ₂ O dest. + 3 g Hämatoxylin + 0,6 g Natriumjodat + 150 g Aluminiumkaliumsulfat Dodecalhydrat + 150 g Chloralhydrat + 3 g Zitronensäure
Tris-Puffer (mit oder ohne Tween® 20 pure) (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 144mM NaCl)	5 l H ₂ O dest. + 34,25 g Tris-HCl + 4,5 g Tris-Base + 43,99 g NaCl (+ 5 ml Tween® 20 pure)
RPMI Puffer (pH = 7,4-7,6)	50 ml RPMI (Seramed, 1640) + 400 ml Aqua dest. + 50 ml inaktiviertes Rinderserum + 0,5 g Natriumazid
HUSE (pH = 7,4-7,6)	10 ml Humanserum (Biseko, 184.076-08) + 90 ml RPMI

2.3 Die Gewebeproben

Die routinemäßig in Paraffin eingebetteten und die gefrierasservierten Proben von Lymphom- oder Leukämie-infiltrierten Geweben oder von inflammatorisch veränderten oder normalen lymphatischen Geweben wurden aus den Gewebebanken des Institutes der Pathologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Berlin, entnommen. Ein Votum für die Nutzung der Gewebe von der lokalen Ethikkommission lag vor. Sämtliche haematopoetischen und lymphatischen Tumore waren in Über-

2 Material und Methoden

einstimmung mit der WHO-Klassifikation eingeteilt.⁶⁵ Als Positivkontrollen wurden sowohl Paraffin-eingebettete als auch gefrierasservierte Tumorgewebe von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinomen (n = 6) sowie murines F9-Teratokarzinomgewebe verwendet. Das Gewebe des murinen F9-Teratokarzinoms wurde von Bayer Schering Pharma, Berlin, Deutschland, zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie des F9-Teratokarzinoms wurde über die American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. In Medium suspendierte F9-Tumorzellen wurden subkutan in athymische Nacktmäuse (acht Wochen alt, weibliche nude/nude CD1 Mäuse; Correzzana, Milano, Italien) injiziert.⁷⁶ F9-Tumore mit einem Durchmesser über 10 mm wurden den Mäusen entnommen und in zwei Hälften geteilt. Ein Teil der Gewebeprobe wurde mittels Routineverfahren in Paraffin eingebettet, der andere wurde in flüssigem Stickstoff gefrierasserviert (n = 1).

2.3.1 Gefrierasservierte (kryopräservierte) Gewebeproben

Folgende lymphatische Gewebe wurden untersucht: chronisch lymphatische Leukämie (n = 3; Lymphknoten n = 2; Tonsillen n = 1), Mantelzell-Lymphom (MZL, n = 8; Lymphknoten n = 7; Tonsillen n = 1), Follikuläres Lymphom Grad 1/2 (n = 6; Lymphknoten).

2.3.2. Paraffin-eingebettete Gewebeproben

Folgende nicht-neoplastische lymphatische oder haematopoetische Gewebe wurden untersucht: reaktive, nicht-neoplastische Knochenmarkbiopsate (n = 9), Knochenmarkbiopsate anderer Erkrankungen (n = 2; hämolytische Anämie n = 1; noduläres B-NHL ohne Nachweis einer Knochenmarkinfiltration n = 1), hyperplastische Tonsillen (n = 13; chronische Tonsillitis), Lymphknoten (n = 23) davon normale Lymphknoten (n = 10; tumorfreie Staging-Lymphknoten aus Neck-Dissektionspräparaten, Durchmesser max. 0,7 cm) und entzündlich veränderte Lymphknoten (n = 12); eitrige Aktinomyzeteninfektion (n = 1), HIV-assoziierte Lymphadenopathie (n = 1), EBV-assoziierte Lymphadenopathie/infektiöse Mononukleose (n = 2).

2 Material und Methoden

Biopsate folgender Hodgkin-Lymphome wurden untersucht: Klassisches Hodgkin-Lymphom (cHL, n = 50) davon cHL vom Mischtyp (cHL-MC, n = 24; Lymphknoten n = 23; Bronchus intermedius n = 1), nodulär-sklerosierendes cHL (cHL-NS, n = 23, Lymphknoten), lymphozytenreiches cHL (cHL-LR, n = 3, Lymphknoten) sowie das lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom (LPHL, n = 7, Lymphknoten).

Biopsate folgender B-NHL und EBV-assoziierte Lymphoproliferation wurden untersucht: Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom ((DLBCL, n = 38); zentroblastische Variante (n = 22; Lymphknoten n = 10; Tonsillen n = 4; Knochenmark n = 1; Magen n = 2; Hirn n = 1; Ovar n = 1; Weichgewebe n = 1; Nasenrachenraum n = 2); zentroimmunoblastische Variante (n = 5; Lymphknoten n = 2; Knochenmark n = 1; Dünndarm n = 1; mediastinal-thymiales Gewebe n = 1); immunoblastische Variante (n = 1, Lymphknoten); plasmoblastische Variante (n = 3, Lymphknoten); anaplastische Variante (n = 4, Lymphknoten); T-zellreiches B-Zell-Lymphom (n = 3, Lymphknoten), Follikuläres Lymphom (FL, n = 30); FL Grad 1/2 (n = 24; Lymphknoten n = 21; Jejunum mesenterium n = 1; Brustdrüse und darüber liegende Haut n = 1; Weichgewebe aus dem Trigonum carotis n = 1), FL Grad 3a (n = 3; Lymphknoten n = 1; Tonsille n = 1; Weichgewebe n = 1), FL Grad 3b (n = 3; Lymphknoten n = 2; Tonsille n = 1), Plasmazellmyelom (PM; n = 14; Knochenmark n = 13; Lymphknoten n = 1), Mantelzell-Lymphom (MZL, n = 12; Lymphknoten n = 8; Tonsillen n = 1; Knochenmark n = 2; Magen n=1), Chronische lymphatische Leukämie (CLL, n = 11; Knochenmark n = 4; Lymphknoten n = 6; Tonsillen n = 1), Marginalzonen-B-Zell-Lymphom (MGL, n = 4; Lymphknoten), Akute lymphoblastische B-Zell Lymphom/Leukämie (B-ALL, n = 4, Knochenmark), Lymphoplasmozytisches Lymphom (LPL, n = 3; Lymphknoten n = 2; Knochenmark n = 1), EBV-assoziierte Lymphoproliferation unter dem Bild eines B-NHL (n = 3).

Biopsate folgender T-NHL wurden untersucht: Anaplastisch großzelliges T-Zell-Lymphom (ALCL, n = 14; Lymphknoten Alk+, n = 5; Lymphknoten Alk-, n = 6; Haut Alk-, n = 3), Peripheres T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom, nicht weiter spezifiziert (T-NHL/NOS, n = 5; Lymphknoten n = 4; Knochenmark n = 1), Akutes lymphoblastisches T-Zell-Lymphom/Leukämie (T-ALL, n = 7; Lymphknoten n = 3; Knochenmark n = 2; Hoden n = 1; Haut n = 1).

2 Material und Methoden

Knochenmarkbiopsate wurden bei folgenden myeloproliferativen Neoplasien untersucht: Akute myeloische Leukämie (AML, n = 7), Chronische myeloische Leukämie (CML, n = 5), Primäre Myelofibrose (pM, n = 4), Essentielle Thrombozythämie (TE, n = 4), Polyzythämia vera (PV, n = 4).

Biopsate folgender Organe wurden von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen untersucht: Milz (n = 1, Milzruptur nach Polytrauma), Appendix (n = 4, chronische Appendizitis), Präputium (n = 2, Phimose), Schilddrüse (n = 3; Schilddrüsenhyperplasie ohne Entzündungszeichen n = 2; Schilddrüsenhyperplasie mit chronischen Entzündungszeichen n = 1), Speicheldrüse (n = 3; chronische Entzündung n = 1; tumorfrei aus dem Einzugsgebiet eines Plattenepithelkarzinoms n = 2), Brustdrüsen (n = 2; fibrozystische Mastopathie n = 1; Mastopathie Grad 2 nach Prechtel n = 1), Hautbiopsie (n = 2; basozelluläres Karzinom n = 1; entzündliches T-Zellinfiltrat der Haut n = 1).

2.4 Aufbereitung der Gewebeproben

Die Vorbereitung der gefrierasservierten Gewebe fand wie im Folgenden beschrieben statt. Die Gewebeproben wurden in Tissue-Tek® O.C.T™ Compound eingebettet, in flüssigen Stickstoff schockgefroren, und bei -80 °C kryoasserviert. Histologische Schnitte der gefrierasservierten Gewebeproben wurden mit Hilfe eines Kryostaten in eine Dicke von 5 µm hergestellt. Die Schnitte wurden dann 10 min in Aceton fixiert. Im Anschluss erfolgte die Immunhistologie nach der APAAP-Methode mit den Anti-ED-B FN-Reagenzien.

Das Paraffin eingebettete Gewebe wurde wie im Folgenden beschrieben aufbereitet.

Die Gewebeproben wurde 24 – 48 Stunden in einer 4%igen Formalinlösung fixiert und anschließend nach der Routinemethode in Paraffin eingebettet. Mittels eines Mikrotoms wurden von den erstarrten Paraffinblöcken 5 µm dicke histologische Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden auf Glasobjektträger übertragen und über einen Zeitraum von jeweils drei mal fünf Minuten im Xylolbad entparaffiniert. Durch eine absteigende Reihe von 96%iger, 80%iger und 76%iger Ethanollösung wurden die

2 Material und Methoden

Schnitte schließlich in Tris-Puffer mit Tween® 20 pure überführt. Das ED-B FN-Epitop wurde anschließend mit verschiedenen Verfahren freigelegt.

2.4.1 Freilegung des ED-B FN Epitops am im Paraffin eingebetteten Gewebe

Für die Freilegung der Epitope von ED-B FN mussten bekannte Verfahren der Antigen-Wiederherstellung deutlich modifiziert und optimiert werden.^{77, 78, 79}

1. Epitop-Freilegung mittels gesättigtem Dampfdruck: Die entparaffinierten histologischen Schnitte wurden in einen Hochdruckkochtopf gestellt, der 2000 ml einer optimierten Pufferlösung enthielt. Um eine optimale Epitopfreilegung zu erzielen, wurde eine Testreihe mit folgenden verschiedenen Pufferlösungen und unterschiedlichen Kochzeiten im Hochdruckkochtopf (125 °C, 100 kPa, 15 psi) durchgeführt.

-A: Citratpuffer (pH 6,0) mit einer Kochzeit von jeweils 2 Minuten, 5 Minuten, 10 Minuten,

-B: 2 mM EDTA Lösung (pH 8,0) mit einer Kochzeit von jeweils 1 Minute, 2 Minuten, 5 Minuten und 10 Minuten,

2. Enzymatische Epitopfreilegung: In einem alternativen Ansatz wurden entparaffinierte Gewebeschnitte 15 Minuten lang mit einer Proteaselösung (Protease, Type XIV, von Streptomyces griseus, P5147-5G, SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) bei 37 C° inkubiert.

Die histologischen Schnitte wurden wieder in Tris-Puffer mit Tween® 20 überführt und im Anschluss erfolgte die Immunhistologie nach der APAAP-Methode mit den Anti-ED-B FN Reagenzien.

2.5 Immunhistologie

Die Immunhistologie wurde nach der APAAP-Methode für monoklonale Antikörper durchgeführt. Der erste Schritt erfolgte durch die Inkubation des Primärreagenzes (monoklonaler Antikörper) auf dem Gewebe. Die spezifische Bindung des primären Antikörpers an das Epitop wurde mit Hilfe eines Kaninchen-Anti-Maus-Antikörpers (Sekundärantikörper) detektiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem APAAP-Komplex (alkalische Phosphatase anti-alkalischer Phosphatase-Komplex), der aus

2 Material und Methoden

alkalischer Phosphatase vom Kälberdarm und monoklonalem Mausantikörper gegen alkalische Phosphatase bestand. Die Wiederholung der Inkubationen mit dem Sekundärantikörper und dem APAAP-Komplex führt zu einer Verstärkung der Intensität der Farbreaktionen und soll gleichzeitig unspezifische Bindungen reduzieren. Die Ausfällung des roten Reaktionsproduktes erfolgt nach Zugabe einer Lösung, die Naphtholphosphat und Chromogene enthält, durch Entfernung von Phosphatresten.⁸⁰

2.5.1 Die Anti-ED-B FN Reagenzien

Zur Detektion des ED-B FN im Gewebe wurden drei verschiedenen Reagenzien genutzt:

- mAk BC1 ist ein muriner monoklonaler Antikörper, der ein benachbartes Epitop (β -Galactosidase-Fibronectin Fusionprotein) auf der Domain 4 des FN erkennt.⁸¹ Dieses tritt nur in Gegenwart von ED-B FN auf.
- L19-IL2-Fusionsprotein ist ein nichtkovalent gebundenes Dimer, bestehend aus dem humanen scFv L19, das mit einem humanen IL-2-Molekül fusioniert ist.⁸² Die Bindungsaffinität zu ED-B FN ist sehr hoch ($K_d = 54 \text{ pM}$).^{83, 84, 85}
- mAk MX1 ist ein muriner ED-B FN-spezifischer IgG2a monoklonaler Antikörper. Dabei wird ED-B FN an einem anderen Epitop detektiert als vom L19-IL2-Fusionsprotein (unveröffentlichte Daten, Willuda et al., Bayer Schering Pharma, Berlin, Deutschland).

Der größte Teil der immunhistologischen Untersuchungen ist mit dem mAk MX1 durchgeführt worden. Das L19-IL2-Fusionsprotein sowie der mAk BC1 wurden überwiegend im Paraffin eingebetteten Gewebe verwendet.

2.5.2 Die immunhistologische Färbung nach der APAAP-Methode

Die gefrierasservierten und die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden nach der Aufbereitung mit den primären ED-B FN-Reagenzien (mAk MX1, L19-IL2-Fusionsprotein oder mAk BC1) über 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jeder Inkubation wurden die kryopräservierten Schnitte mit Tris-Puffer, die in Paraffin eingebetteten Proben mit Tween® 20 pure-haltigem Tris-Puffer dreimal gespült. Das

2 Material und Methoden

gebundene Primärreagenz L19-IL2-Fusionsprotein wurde in einem Zwischenschritt mit einem monoklonalen murinen Antikörper gegen humanes IL-2 detektiert.

Die in Paraffin eingebetteten histologischen Schnitte wurden anschließend nach der APAAP-Methode für monoklonale Antikörper mit Hilfe des Kits „Dako REAL detection kit APAAP, Mouse, K 5000“, immunhistologisch gefärbt. Dabei wurden die Schnitte über 30 Minuten mit einer gepufferten Lösung inkubiert, die Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin enthielt. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Gewebeschnitte mit dem APAAP-Komplex in einer gepufferten Lösung. Bei den gefrierasservierten Proben wurde ebenfalls analog der APAAP-Methode für monoklonale Antikörper ein Kaninchen Anti-Maus-Serum, 1 : 20 verdünnt mit humanem Serum (HUSE), verwendet, mit dem der histologische Schnitt über 30 Minuten überschichtet wurde. Daraufhin erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem APAAP-Komplex, der in einer Verdünnung 1 : 50 mit RPMI-Lösung angewandt wurde. Diese letzten beiden Schritte wurden sowohl am im Paraffin eingebetteten als auch an den gefrierasservierten Proben wiederholt, wobei die Inkubationszeiten je zehn Minuten betragen. Durch eine 10-minütige Überschichtung der histologischen Schnitte mit der Entwicklungslösung aus dem „Dako REAL detection kit APAAP, Mouse, K 5000“ erfolgte die Präzipitation mit dem Farbumschlag ins Rote. Diese Lösung enthielt u. a. die Chromogene Red 1, 2, 3, Naphtholphosphat und den Inhibitor der endogenen alkalischen Phosphatase Levamisole in einer gepufferter Lösung. Schließlich wurden die Proben eine Minute lang in Hämalaun nach Mayer gegengefärbt und dann in Glyceringelatine eingebettet.

2.6 Wettbewerbsversuch mit rekombinantem ED-B FN

Aufgrund der unterschiedlichen Epitoperkennung der Anti-ED-B FN-Reagenzien konnte dieser Versuch nur mit dem mAk MX1 und dem L19-IL2-Fusionsprotein durchgeführt werden. Als Testgewebe wurden gefrierasservierte wie auch in Paraffin eingebettete Proben des F9-Teratokarzinoms und des klarzelligen Nierenzellkarzinoms verwendet.

Die histologischen Schnitte wurden wie oben beschrieben (für die in Paraffin eingebetteten Proben wurden die Freilegungsmethode 1B für 5 Minuten verwandt) vorbehandelt. Die Anti-ED-B FN-Reagenzien wurden über 15 Minuten mit einem

2 Material und Methoden

Überschuss an humanem rekombinatem ED-B FN (11 kDa, Bayer Schering Pharma, Berlin, Deutschland) präinkubiert. Diese Mischung wurde für fünf bis zehn Minuten auf die Proben aufgetragen. Ein Kontrollschnitt des Gewebes (gleiche Verfahrensweise, aber keine Zugabe von rekombinantem ED-B FN) wurde mitgeführt. Die Proben wurden dann nach der APAAP-Methode wie beschrieben bearbeitet. Anschließend wurden die ED-B FN-Darstellungen in den unterschiedlich behandelten Gewebeschnitten miteinander verglichen.

2.7 Die Immunhistologie mit dem mAk CD34

In Paraffin eingebettete Gewebeproben von folgenden Erkrankungen wurden untersucht: entzündlich veränderter Lymphknoten (n = 1), DLBCL (n = 1, Ovar), cHL-NS (n = 1, Lymphknoten), PM (n = 1, Knochenmark), klarzelliges Nierenzellkarzinom (n = 1).

Es wurden jeweils zwei aufeinanderfolgende Schnitte eines Gewebeblocks verwendet. Einer wurde mit dem mAk MX1, der andere mit dem murinen monoklonalen Antikörper CD34 immunhistologisch gefärbt. Die histologischen Schnitte wurden wie oben beschrieben (für die in Paraffin eingebetteten Proben wurde die Freilegungsmethode 1B für fünf Minuten verwandt) vorbehandelt. Zur Gefäßdarstellung wurden die Schnitte über 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem CD34-mAk inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Tris-Puffer mit Tween® 20 dreimal gespült und nach der beschriebenen APAAP-Methode weiterbehandelt. Die Immunhistologie mit dem mAk MX1 ist wie oben genannt durchgeführt worden. Die Proben wurden mikroskopisch ausgewertet und miteinander verglichen.

2.8 Ko-Expressionsanalyse von CD34 und ED-B FN

Für diesen Versuch wurde ausschließlich in Paraffin eingebettetes Gewebe verwendet. Dabei wurden Gewebeproben folgender Erkrankungen und deren normales Ausgangsgewebe untersucht: klarzelliges Nierenzellkarzinom (n = 1), normaler Lymphknoten (n = 1), entzündlich veränderter Lymphknoten (n = 1), hyperplastische Tonsille (n = 1), reaktive, nicht-neoplastische Knochenmarkbiopsate (n = 2), cHL (n = 2) davon cHL-MC

2 Material und Methoden

(n = 1, Lymphknoten) und cHL-NS (n = 1, Lymphknoten), DLBCL (n = 1, zentroblastische Variante, Lymphknoten), FL 3 (n = 1, Lymphknoten), FL 1/2 (n = 1, Lymphknoten), MGL (n = 1, Lymphknoten), PM (n = 1, Knochenmark), CLL (n = 1, Tonsille). Für die Färbung wurde das in Paraffin eingebettete Gewebe wie oben beschrieben vorbehandelt, die Freilegungsmethode 1B wurde für fünf Minuten verwandt und die histologischen Schnitte wurden in Tris-Puffer mit Tween® 20 pure überführt. Die Schnitte wurden mit dem MX1-mAk über eine Dauer von 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jedem Schritt wurden die Schnitte dreimal mit Tris-Puffer mit Tween® 20 pure gespült. Es erfolgte eine 45-minütige Inkubation mit einem Ziege-Anti-Maus Cy3-konjugierten Antikörper. Die noch freien Maus-Immunglobuline wurden mit Hilfe eines Ziege-Anti-Mausserums geblockt. Anschließend wurde der CD34-mAk über 30 Minuten auf das Gewebe gegeben. Dieser wurde von einem Ziege-Anti-Maus Cy2-konjugiertem Antikörper über 45 Minuten detektiert. Die Darstellung der Zellkerne wurde durch eine dreiminütige Inkubation der Schnitte mit TOTO3 erreicht. Die Proben wurden schließlich in Fluorescent Mounting Medium eingebettet und mit einem konfokalen Mikroskop (Leitz, Wetzlar, Germany) ausgewertet. Durch den Argon-Krypton-Laser im Mikroskop strahlt das TOTO3 in sichtbarem blauem Licht (Wellenlänge: 460 – 490 nm). Der MX1-mAk, gebunden an den Cy3-konjugierten Anti-Maus-Antikörper, strahlt in sichtbarem rotem Licht (Wellenlänge: 620 – 780 nm), der CD34-mAk, gebunden an den Cy2-konjugierten Anti-Maus-Antikörper, strahlt in sichtbarem grünem Licht (Wellenlänge: 490 – 570 nm). Die Ko-Lokalisation von ED-B FN und CD34 wurde als gelbe Fluoreszenz dargestellt.

2.9 Mikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden mikroskopisch auf das Vorhandensein von ED-B FN hin untersucht und anschließend mikroskopisch semi-quantitativ analysiert. Dabei wurde in zehn mikroskopischen Gesichtsfeldern bei einer 400-fachen Vergrößerung von zwei geübten Auswertern die Rate an ED-B FN-positiven Blutgefäßen im Verhältnis zu allen erkennbaren Blutgefäßen unabhängig voneinander bestimmt. Die Ergebnisse zur Rate der ED-B FN-positiven Blutgefäße von den zehn Gesichtsfeldern eines jeden Auswerters wurden gemittelt und miteinander verglichen. Schließlich wurden die

2 Material und Methoden

ausgewerteten Proben nach der Rate der ED-B FN-positiven Blutgefäßen in vier Gruppen eingeteilt; in die erste Gruppe fielen Gewebeproben, bei denen über 90 %, in die zweite solche, die zwischen 89 % und 50 %, in die dritte solche, die zwischen 49 % und 10 % und in die vierte Gruppe solche, die unter 10 % ED-B FN-positiv Blutgefäße aufwiesen. Die vierte Gruppe wurde als ED-B FN-negative Gruppe gewertet.

2.10 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software SPSS® Base System 13.0 für Windows (SPSS GmbH Software, Theresienhöhe 13, 80339 München, Deutschland) statistisch ausgewertet. Der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben wurde verwendet. Zur statistischen Auswertung wurden nur die Ergebnisse von Paraffin eingebetteten Proben herangezogen, die immunhistologisch mit dem mAk MX1 gefärbt wurden.

3 Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis des ED-B FN in kryoasservierten positiven Kontrollgeweben

ED-B FN fand sich in der Immunhistologie mit den drei genutzten anti-ED-B FN Reagenzien (mAk MX1, mAk BC1, L19-IL2-Fusionsprotein) im Gewebe des gefrierasservierten F9-Teratokarzinoms und beim klarzelligen Nierenzellkarzinom an nahezu allen Blutgefäßen (Abbildung 3). Ebenso konnte an kryo-präservierten histologischen Schnitten von verschiedenen Lymphomentitäten ein hoher Prozentsatz an ED-B FN-positiven Blutgefäßen nachgewiesen werden (Tabelle 2).

Tabelle 1: Nachweis des ED-B FN in gefrierasservierten Lymphom-Biopsaten

Entitäten (MX1-mAk, gefrierasserviertes Gewebe)	Prozent ED-B FN-positiver Blutgefäße, klassifiziert nach Gruppen			
	>90 %	50-89 %	10-49 %	<10 %
Chronische lymphatische Leukämie	0/3	0/3	2/3	1/3
Mantelzell-Lymphom	3/8	3/8	2/8	0/8
Follikuläres Lymphom Grad ½	2/6	4/6	0/6	0/6

3.2 Die Epitop-Freilegung des ED-B FN mittels Dampfdruckbehandlung

ED-B FN konnte bisher mittels Immunhistologie an Paraffin-eingebetteten Schnitten nicht zufriedenstellend nachgewiesen werden. Daher wurden mehrere Versuche unternommen, durch eine Vorbehandlung der entparaffinierten Schnitte das ED-B FN Epitop besser freizulegen und für ED-B FN-bindende Antikörper detektierbar zu machen. Dabei erwies sich eine 5-minütige Vorbehandlung der Schnitte mit dampfgesättigtem Hochdruck in einer 2 mM EDTA-Lösung als besonders geeignet. Nach dieser Vorbehandlung der Schnitte ließen sich mit allen drei verwendeten primären Antikörpern (mAk BC1, L19IL2-Fusionsprotein, mAk MX1) ED-B FN-positiv gefärbte Blutgefäße finden. Mit Blick auf die Qualität und Intensität der Färbung des Gewebes fand sich eine ähnlich gute Darstellung der ED-B FN-positiven Gefäße im Vergleich zu den immunhistochemisch bearbeiteten Kryoschnitten der gleichen Gewebe. Im F9-Teratokarzinom

3 Ergebnisse

wie auch im klarzelligen Nierenzellkarzinom waren ca. 100 % der Blutgefäße positiv für ED-B FN. Bei Lymphomentitäten fielen die Ergebnisse zur ED-B FN Expression an Blutgefäßen im gefrierasservierten und im Paraffin-eingebetteten Material ebenfalls sehr ähnlich aus (Abbildung 4). Die Morphologie der Gewebe war in den Paraffin-eingebetteten histologischen Schnitten, methodisch bedingt, allerdings deutlich besser als in den gefrierasservierten Schnitten.

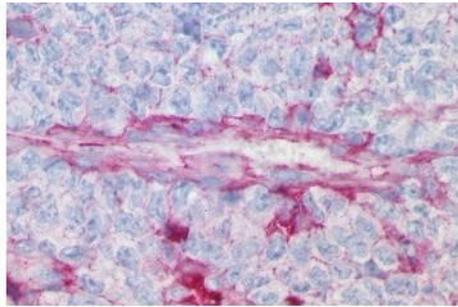


Bild A

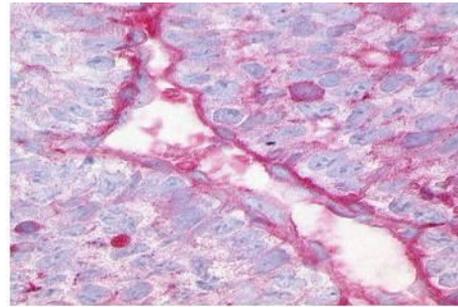


Bild B

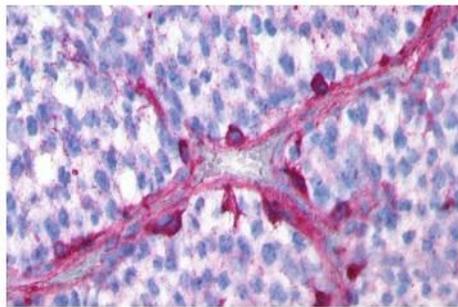


Bild C

Abbildung 3: Immunhistologischer Nachweis des ED-B FN an Blutgefäßen im murinen F9-Teratokarzinom

A-C: F9-Teratokarzinom, Paraffin eingebettetes Gewebe; A: MX1-mAk, Vergrößerung 200-fach; B: L19-IL2-Fusionsprotein, Vergrößerung 200-fach; C: BC1-mAk, Vergrößerung 150-fach. Das Vorhandensein von ED-B FN an den Gefäßen ist in allen Schnitten erkennbar an den roten Farbstoffpräzipitaten.

3 Ergebnisse

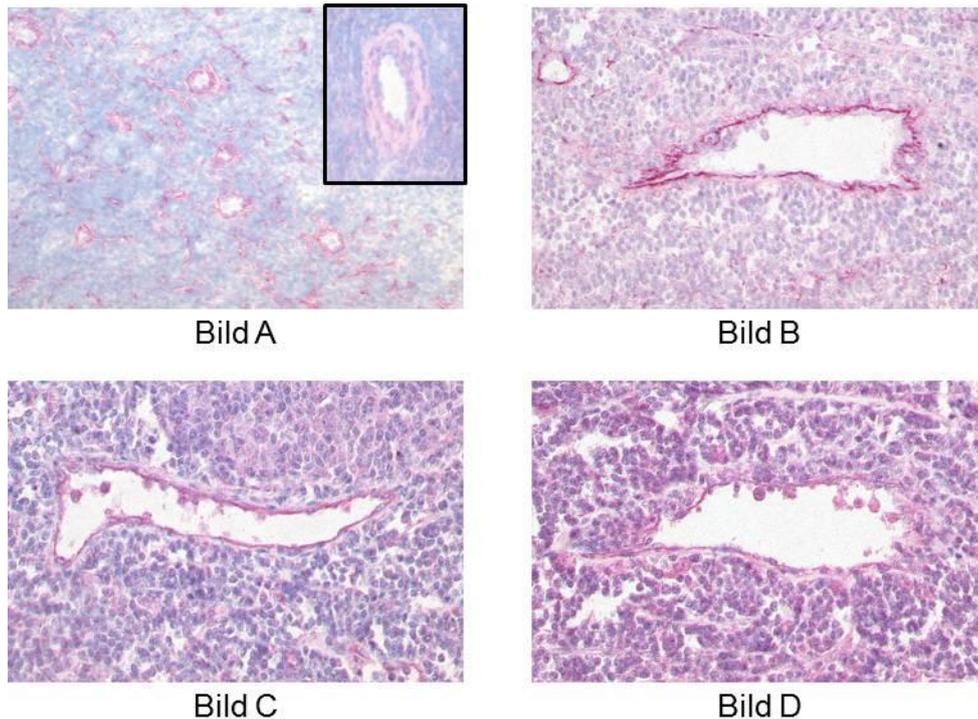


Abbildung 4: Vergleich der Immunhistologie im kryoasservierten und im Paraffin eingebetteten Gewebe.

A-D: follikuläres Lymphom Grad 1/2; A: MX1-mAk, gefrierasserviertes Gewebe, Vergrößerung 100-fach, Bildeinsatz: Vergrößerung 100-fach, ED-B FN ist rosarot dargestellt und an Gefäßen lokalisiert. B: MX1-mAk, Paraffin eingebettetes Gewebe, Vergrößerung 100-fach, deutliche dunkelrote Darstellung des ED-B FN am zentralen Gefäß. C: L19-IL2-Fusionsprotein, Paraffin-eingebettetes Gewebe, Vergrößerung 150-fach, Gefäßdarstellung durch Nachweis von ED-B FN (dunkelrosa). Bild D: BC1-mAk, Paraffin eingebettetes Gewebe, Vergrößerung 150-fach, schwach-positiv ED-B FN Darstellung des zentralen Gefäßes.

3.3 Die Bindung des mAk MX1 und des L19-IL2-Fusionsproteins an ED-B FN ist spezifisch und inhibierbar durch Überschuss an löslichem ED-B FN

Um die Bindungsspezifität zu beweisen, wurde rekombinantes lösliches ED-B FN mit dem mAk MX1 sowie mit dem L19-IL2-Fusionsprotein präinkubiert. Bei einem molekularen Überschuss von rekombinantem ED-B FN zum Antikörper im Verhältnis von 74 : 1 (mAk MX1, in Paraffin eingebettetes Gewebe), 148 : 1 (mAk MX1, gefrier-

3 Ergebnisse

asserviertes Gewebe), 360 : 1 (L19-IL2-Fusionsprotein, in Paraffin eingebettetes Gewebe) und 1465 : 1 (L19-IL2-Fusionsprotein, gefrierasserviertes Gewebe) wurde eine nahezu komplette Inhibition der Antikörperbindung an Gefäß-ständiges ED-B FN erreicht (Abbildung 5).

ohne Zugabe von rekombinanten ED-B FN

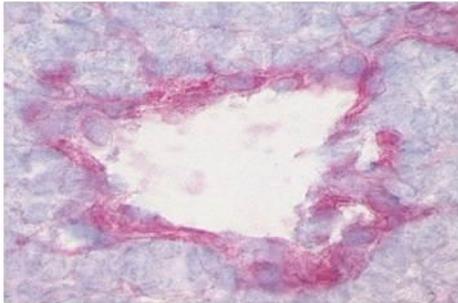


Bild A

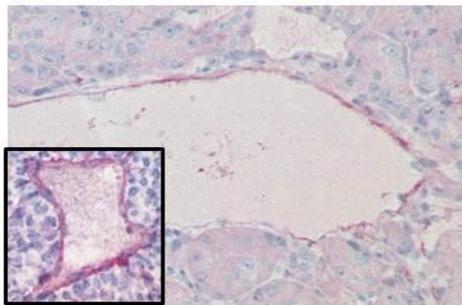


Bild C

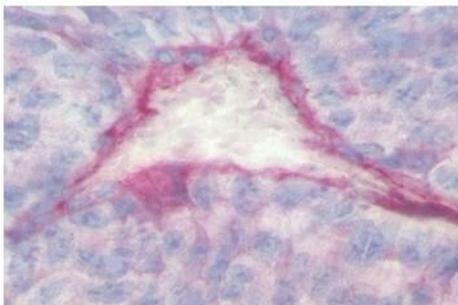


Bild E

mit Zugabe von rekombinanten ED-B FN (0,13 g/l)

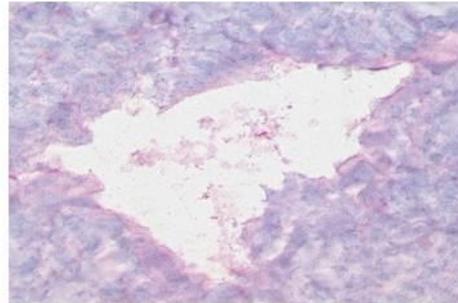


Bild B

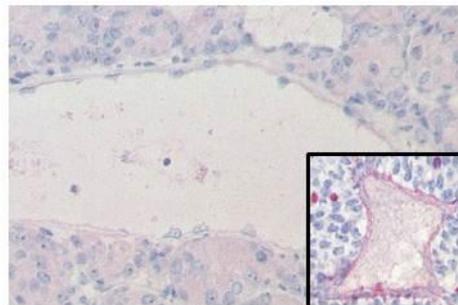


Bild D

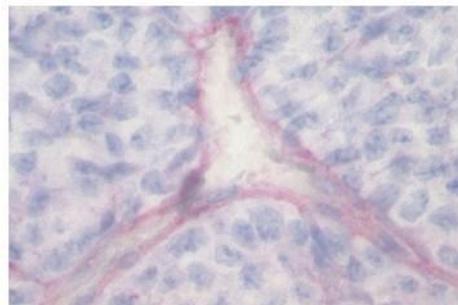


Bild F

Abbildung 5: Konkurrenz der spezifischen Bindung von anti-ED-B FN-Antikörpern an ED-B FN durch Präinkubation mit rekombinatem löslichem ED-B FN.

A, B: F9-Teratokarzinom, gefrierasserviertes Gewebe, L19-IL2-Fusionsprotein, Ver-

3 Ergebnisse

Vergrößerung 500-fach; C, D: klarzelliges Nierenzellkarzinom, L19-IL2-Fusionsprotein, Paraffin-eingebettetes Gewebe, Vergrößerung 200-fach, Bildeinsatz: F9-Teratokarzinom, L19-IL2-Fusionsprotein, Paraffin-eingebettetes Gewebe, Vergrößerung 100-fach; E, F: F9-Teratokarzinom, MX1-mAk, Paraffin-eingebettetes Gewebe, Vergrößerung 500-fach; bei den rechten Abbildungen sind anhand der Rotfärbung ED-B FN-positive Gefäße zu erkennen. In der linken Abbildung finden sich die jeweils nachfolgenden Schnitte, die mit dem löslichen ED-B FN-präinkubiertem Antikörper prozessiert wurden. Es lassen sich fast keine ED-B FN-positiven Gefäße mehr nachweisen, so dass von einer nahezu vollständigen Konkurrenz durch lösliches ED-B FN ausgegangen werden kann.

3.4 Der ED-B FN Nachweis in nicht-neoplastisch infiltrierten lymphatischen und haematopoetischen Geweben

Das normale lymphatische und haematopoetische Gewebe zeigt hoch signifikant weniger ED-B FN-positive Gefäße als neoplastisches Gewebe ($p \leq 0,001$ (Tabelle 8); Tabelle 3, Abbildung 6).

Im reaktiven, nicht-neoplastischen Knochenmark waren keine bzw. nur sehr wenige ED-B FN-positive Blutgefäße zu finden. Allerdings war in zwei Knochenmarkbiopsaten ein höherer Anteil an ED-B FN-positiven Blutgefäßen nachweisbar. Bei diesen Patienten war eine hämolytische Anämie bzw. ein noduläres B-NHL ohne Knochenmarksinusoidinfiltration diagnostiziert worden. Die ED-B FN-positiven Blutgefäße des Knochenmarks waren von einer fibrotischen Wand umgeben. An den normalen Sinusoiden, die keinen Hinweis auf einen fibrotischen Prozess zeigten, war kein ED-B FN nachweisbar.

In normalen Lymphknoten konnten keine bzw. nur sehr wenig ED-B FN-positive Blutgefäße nachgewiesen werden. Dagegen wiesen entzündlich veränderte Lymphknoten und die hyperplastischen Tonsillen signifikant mehr ED-B FN-positive Blutgefäße auf als normale Lymphknoten ($p < 0,001$). Der ED-B FN-Nachweis in den hyperplastischen Tonsillen verlief sehr unterschiedlich. In sieben Fällen konnte eine sehr hohe Anzahl an ED-B FN-positiven Blutgefäßen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fand sich in fünf Fällen eine Rate an ED-B FN-positiven Blutgefäßen

3 Ergebnisse

von unter 10 %. ED-B FN wurden an Blutgefäßen jeglichen Durchmessers beobachtet. Die meisten der ED-B FN-positiven Gefäße waren am Rand des Keimzentrums, der Mantelzone und Marginalzone der Lymphfollikel lokalisiert.

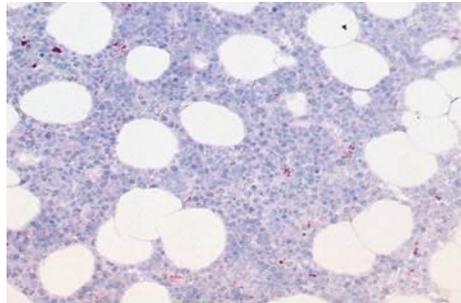


Bild A

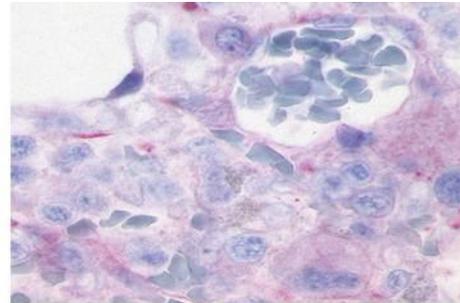


Bild B



Bild C

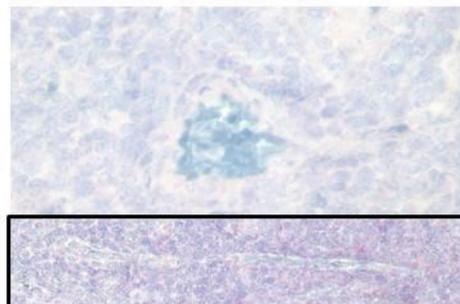


Bild D

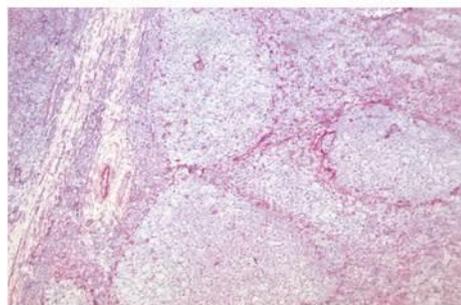


Bild E

Abbildung 6: Nachweis des ED-B FN mittels Immunhistologie in nicht-neoplastisch infiltriertem lymphatischem und haematopoetischem Gewebe.

A, B: reaktives, nicht-neoplastisches Knochenmarkbiopsat, Vergrößerung 50-fach A und 700-fach B; C, D: normaler Lymphknoten, Vergrößerung 25-fach C und 300-fach D sowie Bildeinsatz 100-fach; E: hyperplastische Tonsille, Vergrößerung 25-fach; A-E: MX1-mAk, Paraffin-eingebettetes Gewebe; sowohl im normalen Knochenmark als auch im normalen Lymphknoten konnten keine ED-B FN-positiven Gefäße gefunden werden

3 Ergebnisse

(A-D). Dies steht im Gegensatz zur hyperplastischen Tonsille (E), in der eine deutliche Rotfärbung der ED-B FN positiven Blutgefäße sichtbar ist.

3 Ergebnisse

Tabelle 2: Nachweis des ED-B FN in nicht-neoplastisch infiltrierten lymphatischen und haematopoetischen Geweben

Entitäten (MX1-mAk, Paraffin- eingebettetes Gewebe)	Prozent ED-B FN-positiver Blutgefäße, klassifiziert nach Gruppen			
	90 %	50 – 89 %	10 – 49 %	< 10 %
<i>Normales Gewebe</i>				
Normale Lymphknoten	0/10	0/10	1/10	9/10
Reaktive, nicht-neoplastische Knochenmarkbiopsate	0/9	0/9	0/9	9/9
<i>Nicht-neoplastisch verändertes Gewebe</i>				
Entzündlich veränderte Lymphknoten	5/12	6/12	0/12	1/12
- Aktinomyzeteninfektion	1/1	0/1	0/1	0/1
- HIV-assoziierte Lymphadenopathie	0/1	1/1	0/1	0/1
- EBV-assoziierte Lymphadenopathie	1/2	1/2	0/2	0/2
Hyperplastische Tonsillen	7/13	0/13	1/13	5/13
Knochenmarkbiopsat einer hämolytischen Anämie und eines nodulären B-NHL, ohne Nachweis einer medullären Infiltration	1/2	1/2	0/2	0/2

3.5 Nachweis des ED-B FN in den verschiedenen Lymphomentitäten und in EBV-assoziierten Lymphoproliferationen

In Lymphknotenbiopsaten mit unterschiedlichsten Lymphom-Entitäten konnten ED-B FN-positive Blutgefäße gefunden werden. In nodulären Lymphomen wurde ED-B FN an Blutgefäßen jeglichen Durchmessers und Lokalisation beobachtet. ED-B FN-positive Blutgefäße waren innerhalb des Lymphoms, in der Lymphomkapsel, im perineoplastischen Stroma, aber nicht am Rand einer Nekrose zu finden.

Bei Lymphominfiltraten des Knochenmarkes fand sich ED-B FN an den kleinen und mittleren Gefäßen, die aus einer endothelialen Schicht und einer umhüllenden dünnen Wand von Bindegewebe aufgebaut waren. Die Sinusoide im Bereich der originären Haematopoiese zeigten dagegen keine ED-B FN-Expression.

In den verschiedenen Entitäten des B-NHL fand sich hochsignifikant eine höhere Rate an ED-B FN-positiven Blutgefäßen als in normalen Lymphknoten ($p < 0,001$; Tabelle 8) und als in reaktiven, nicht-neoplastisch infiltrierten Knochenmarkbiopsaten ($p < 0,001$; Tabelle 8). Die hochmalignen B-NHL (DLBCL, B-ALL, FL Grad 3 a/b) besaßen signifikant mehr ED-B FN-positive Blutgefäße als die niedrigmalignen B-NHL (PM, MGL, MZL, LPL, CLL, FL Grad 1/2; $p = 0,008$; Tabelle 8). Das DLBCL wies, mit Ausnahme der plasmoblastischen und T-zellreichen Variante, eine hohe Anzahl an ED-B FN-positiven Blutgefäßen auf. Auch beim Plasmazellmyelom fand sich eine hohe Anzahl ED-B FN-positiver Blutgefäße (Tabelle 4, Abbildungen 7 und 8).

In Lymphknotenbiopsaten von Patienten mit EBV-assoziiierter Lymphoproliferation fand sich ebenfalls ein sehr hoher Anteil an ED-B FN-positiven Blutgefäßen. Diese Entität besaß eine ähnliche relative Menge an ED-B FN-positiven Blutgefäßen wie andere hochmaligne B-NHL (Tabelle 4).

Das cHL und das LPHL wiesen auch eine signifikant höhere Rate an ED-B FN-positiven Blutgefäßen auf als normale Lymphknoten ($p \leq 0,001$; Tabelle 8). Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem cHL und dem LPHL ($p = 0,609$; Tabelle 8). Die Ergebnisse zur Rate an ED-B FN-positiven Blutgefäßen im Hodgkin-Lymphom sind in Tabelle 5 und Abbildung 9 zusammengefasst.

Lymphome der T-Zellreihe (T-NHL) wiesen ebenfalls deutlich mehr ED-B FN-positive Blutgefäße auf als normale Lymphknoten ($p < 0,001$; Tabelle 8) und als reaktive, nicht-

3 Ergebnisse

neoplastisch infiltrierte Knochenmarkbiopsien ($p = 0,001$; Tabelle 8). Diese Ergebnisse sind in Tabelle 6 und Abbildung 10 zusammengestellt.

Tabelle 3: ED-B FN Nachweis in B-NHL und EBV-assoziierten Lymphoproliferationen

Entitäten (MX1-mAk, Paraffin-eingebettetes Gewebe)	Prozent ED-B FN-positiver Blutgefäße, klassifiziert nach Gruppen			
	> 90 %	50 – 89 %	10 – 49 %	< 10 %
PM	6/14	6/14	2/14	0/14
MGL	2/4	2/4	0/4	0/4
LPL	2/3	0/3	1/3	0/3
CLL	3/11	2/11	4/11	2/11
MZL	6/12	3/12	2/12	1/12
FL Grad 1/2	8/24	12/24	3/24	1/24
FL Grad 3a/b	6/6	0/6	0/6	0/6
DLBCL				
- Zentroblastisch	19/22	3/22	0/22	0/22
- Zentroimmunoblastische	4/5	1/5	0/5	0/5
- Anaplastisch	2/4	2/4	0/4	0/4
- Immunoblastisch	1/1	0/1	0/1	0/1
- Plasmoblastisch	0/3	0/3	2/3	1/3
- T-zellreich B-Zell-Lymphom	0/3	0/3	1/3	2/3
B-ALL	0/4	3/4	1/4	0/4
EBV-assoziierte Lymphoproliferation	2/3	1/3	0/3	0/3

3 Ergebnisse

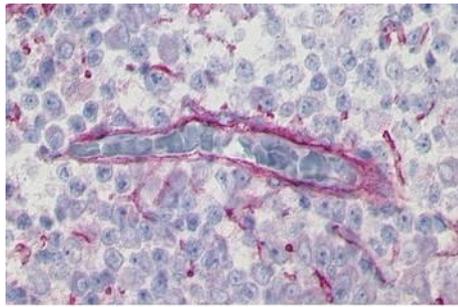


Bild A

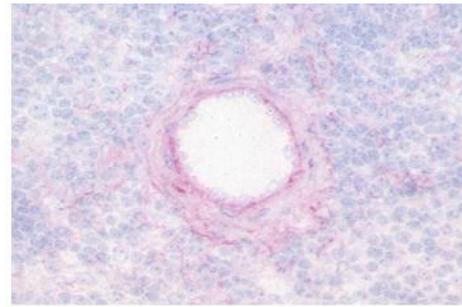


Bild B

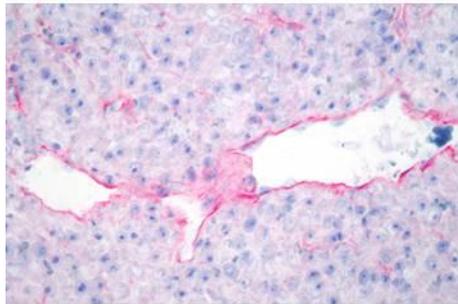


Bild C

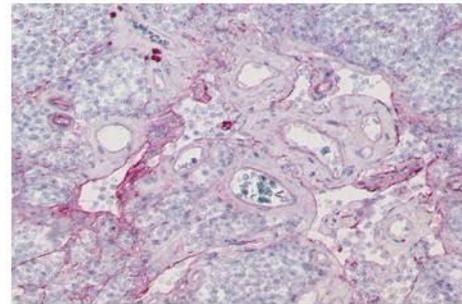


Bild D



Bild E

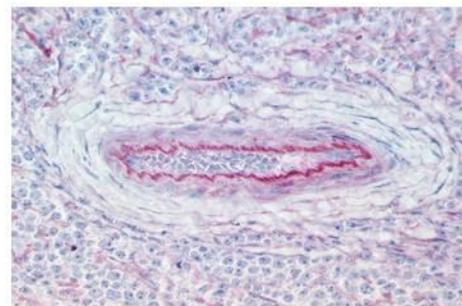


Bild F

Abbildung 7: Immunhistologischer Nachweis des ED-B FN beim B-NHL.

A: Chronische lymphatische Leukämie, Vergrößerung 300-fach; B: Mantelzell-Lymphom, Vergrößerung 200-fach; C: Plasmazellmyelom, Vergrößerung 200-fach; D: Marginalzonen-B-Zell-Lymphom, Vergrößerung 100-fach; E: Follikuläres Lymphom Grad 1/2, Vergrößerung 25-fach; F: Follikuläres Lymphom Grad 1/2, Vergrößerung 150-fach; alle ED-B FN-Färbungen wurden mit dem MX1-mAk bei in Paraffin-eingebettetem Gewebe durchgeführt. Man erkennt unterschiedlich große Blutgefäße mit deutlichem Nachweis von ED-B FN im Endothelbereich (rote Färbung).

3 Ergebnisse

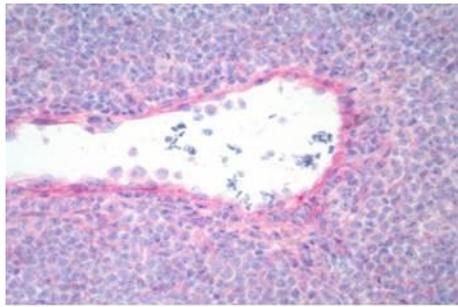


Bild A

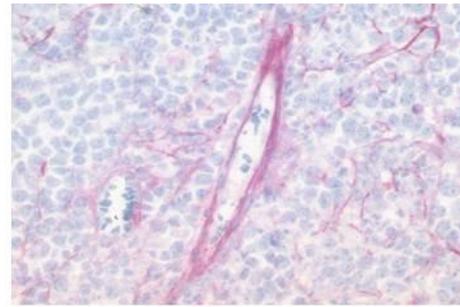


Bild B

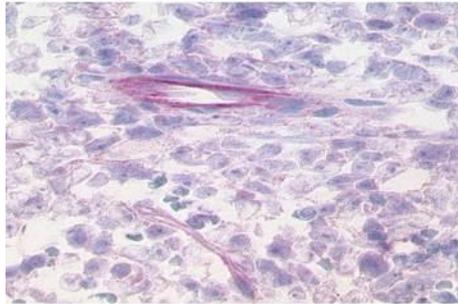


Bild C

Abbildung 8: Immunhistologischer Nachweis des ED-B FN beim B-NHL.

A: Lymphoplasmocytisches Lymphom, Vergrößerung 150-fach; B: Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, Vergrößerung 200-fach; C: Akute lymphoblastische B-Zell Lymphom, Vergrößerung: 300-fach; alle ED-B FN-Färbungen wurden mit dem MX1-mAk bei in Paraffin-eingebettetem Gewebe durchgeführt. Unterschiedlich große Gefäße mit deutlichem Nachweis von ED-B FN im Endothelbereich (rote Färbung) sind erkennbar.

Tabelle 4: Nachweis des ED-B FN beim Hodgkin-Lymphom

Entitäten (MX1-mAk, Paraffin-eingebettetes Gewebe)	Prozent ED-B FN-positiver Blutgefäße, klassifiziert nach Gruppen			
	> 90 %	50 – 89 %	10 – 49 %	< 10 %
cHL				
- cHL-MC	12/24	4/24	6/24	2/24
- cHL-NS	16/23	6/23	0/23	1/23
- cHL-LR	0/3	3/3	0/3	0/3
LPHL	3/7	3/7	0/7	1/7

3 Ergebnisse

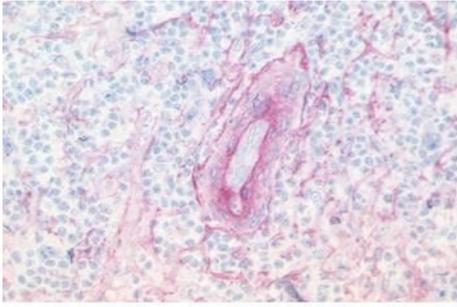


Bild A

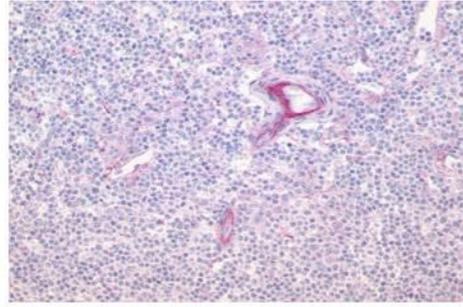


Bild B

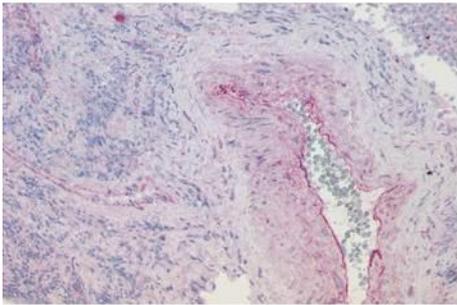


Bild C

Abbildung 9: Immunhistologischer Nachweis des ED-B FN beim Hodgkin-Lymphom.

A: Klassisches Hodgkin-Lymphom vom Mischtyp, Vergrößerung 100-fach; B: Nodulär-sklerosierendes klassisches Hodgkin-Lymphom, Vergrößerung 50-fach; C: Lymphozyten-reiches klassisches Hodgkin-Lymphom, Vergrößerung 25-fach; alle ED-B FN-Färbungen wurden mit dem MX1-mAk bei in Paraffin-eingebettetem Gewebe durchgeführt. Unterschiedlich große Gefäße mit deutlichem Nachweis von ED-B FN im Endothelbereich (rote Färbung) sind zu erkennen.

3 Ergebnisse

Tabelle 5: Nachweis des ED-B FN beim T-NHL

Entitäten (MX1-mAk, Paraffin-eingebettetes Gewebe)	Prozent ED-B FN-positiver Blutgefäße, klassifiziert nach Gruppen			
	> 90 %	50 – 89 %	10 – 49 %	<10 %
ALCL	7/14	1/14	4/14	2/14
T-NHL/NOS	4/5	0/5	1/5	0/5
T-ALL	4/7	2/7	1/7	0/7

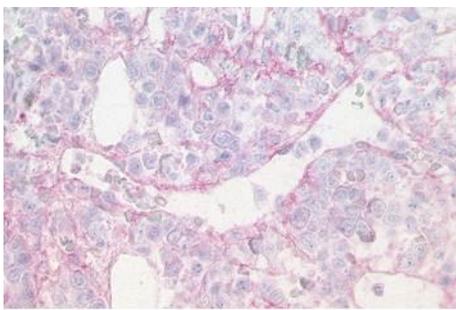


Bild A

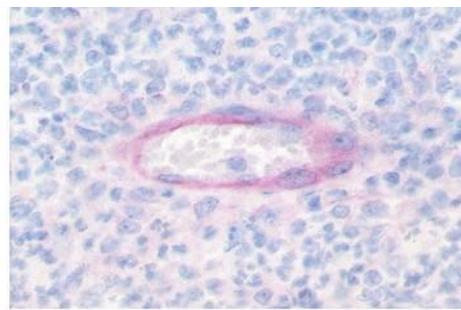


Bild B

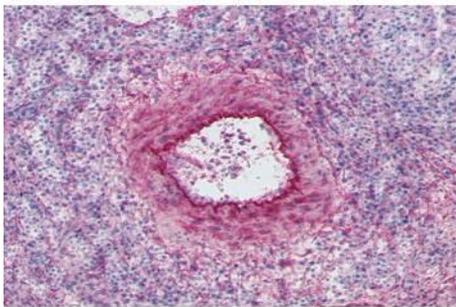


Bild C

Abbildung 10: Immunhistologischer Nachweis des ED-B FN beim T-NHL.

A: Peripheres T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom, nicht weiter spezifiziert, Vergrößerung 300-fach; B: Anaplastisch großzelliges T-Zell-Lymphom, Vergrößerung 300-fach; C: Akutes lymphoblastisches T-Zell-Lymphom, Vergrößerung 50-fach; alle ED-B FN-Färbungen wurden mit dem MX1-mAk an Paraffin-eingebettetem Gewebe durchgeführt. Unterschiedlich große Gefäße mit Nachweis von ED-B FN im Endothelbereich (rote Färbung) sind zu erkennen.

3.6 Nachweis des ED-B FN in myeloproliferativen Erkrankungen

In Biopsaten von Patienten mit akuten oder chronischen myeloproliferativen Erkrankungen fanden sich signifikant mehr ED-B FN-positive Blutgefäße im Vergleich zu den reaktiven, nicht-neoplastischen Knochenmarkbiopsien ($p < 0,001$ und $p = 0,003$). Jedoch war das Ausmaß des Vorhandenseins ED-B FN-positiver Blutgefäße bei Patienten mit myeloischen Neoplasien signifikant geringer als bei Patienten mit lymphatischen Neoplasien ($p < 0,001$; Tabelle 8). Die Sinusoide der Knochenmarkbiopsien, die von myeloproliferativen Erkrankungen infiltriert waren, wiesen kein ED-B FN auf (Tabelle 7, Abbildung 11).

Tabelle 6: Nachweis des ED-B FN bei myeloproliferativen Erkrankungen

Entitäten (MX1-mAk, Paraffin- eingebettetes Gewebe)	Prozent ED-B FN positiver-Blutgefäße, klassifiziert nach Gruppen			
	> 90 %	50 – 89 %	10 – 49 %	<10 %
AML	0/7	3/7	4/7	0/7
CML	0/5	1/5	2/5	2/5
Primäre Myelofibrose	2/4	1/4	1/4	0/4
Essentielle Thrombozythämie	0/4	0/4	2/4	2/4
Polyzythämia vera	0/4	0/4	2/4	2/4

3 Ergebnisse

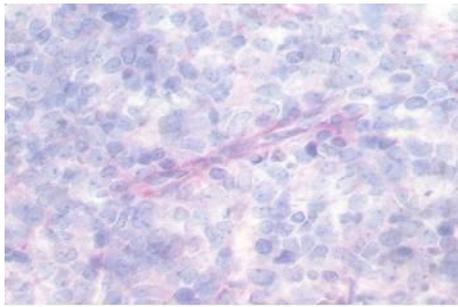


Bild A

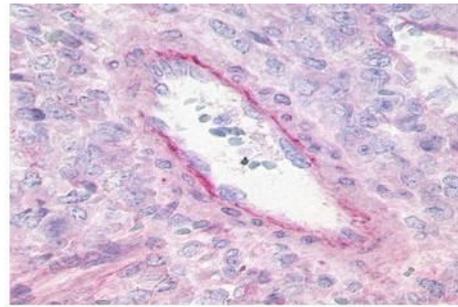


Bild B

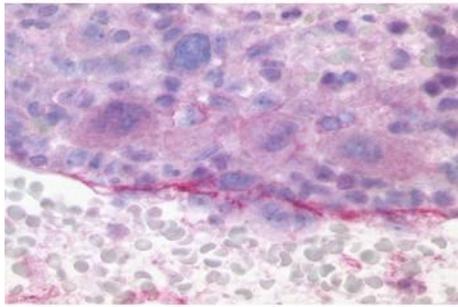


Bild C

Abbildung 11: Immunhistologischer Nachweis des ED-B FN bei myeloproliferativen Erkrankungen.

A: Akute myeloische Leukämie, Vergrößerung 300-fach; B: Chronische myeloische Leukämie, Vergrößerung 300-fach; C: Primäre Myelofibrose, Vergrößerung 500-fach; alle ED-B FN-Färbungen wurden mit dem MX1-mAk an Paraffin-eingebettetem Gewebe durchgeführt. Es finden sich Gefäße mit Nachweis von ED-B FN im Endothelbereich (rote Färbung).

3.7 Ergebnisse der statistischen Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben, weil keine Abhängigkeiten zwischen den Ergebnissen existierten und eine Normalverteilung der Proben aufgrund des geringen Probenumfangs nicht nachgewiesen werden konnte. Die Entitäten wurden in Gruppen, z. B. T-NHL, B-NHL, unterteilt, um einen statistischen Vergleich der ED-B FN-positiven Blutgefäße im Lymphomgewebe und nicht-neoplastischen lymphatischen Gewebe sowie innerhalb der haematologischen und lymphatischen Neoplasien zu erreichen.

3 Ergebnisse

Diese sind im Einzelnen: T-NHL (ALCL, T-NHL/NOS, T-ALL); cHL (cHL-MC, cHL-NS, cHL-LR); LPHL; B-NHL (PM, MZL, CLL, LPL, MGL, FL, DLBCL, B-ALL), zusätzlich unterteilt in hochmaligne Entitäten (DLBCL, B-ALL, FL 3a/b) und niedrigmaligne Entitäten (PM, MGL, MZL, CLL, LPL, FL 1/2); Myeloproliferative Erkrankungen (AML, CML, pM, PV, ET). Bei den nicht-neoplastisch veränderten Geweben wurde folgende Einteilung gewählt: normale Lymphknoten; entzündlich veränderte Lymphknoten und hyperplastische Tonsillen, reaktive, nicht-neoplastische Knochenmarkbiopsate.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 7: Zusammenfassende Darstellung der statistischen Auswertung.

Die einzelnen Tumorentitäten und Kontrollgewebe wurden in folgende Gruppen gegeneinander verglichen und nachfolgende signifikante Unterschiede in der Häufigkeit von ED-B FN-positiven Gefäßen ermittelt.

Gruppe 1	Gruppe 2	p- Wert
Normale Lymphknoten	Noduläre cHL, LPHL, T-NHL, B-NHL	< 0,001
Normale Lymphknoten	cHL	< 0,001
Normale Lymphknoten	LPHL	= 0,001
Normale Lymphknoten	Noduläre B-NHL	< 0,001
Normale Lymphknoten	Noduläre niedrigmaligne B-NHL	< 0,001
Normale Lymphknoten	Noduläre hochmaligne B-NHL	< 0,001
Normale Lymphknoten	Noduläre T-NHL	< 0,001
Normale Lymphknoten	Hyperplastische Tonsillen und entzündlich veränderte Lymphknoten	< 0,001
Reaktive, nicht-neoplastische Knochenmarksbiopsien	Medulläre T-NHL, B-NHL	< 0,001
Reaktive, nicht-neoplastische Knochenmarksbiopsien	Medulläre B-NHL	< 0,001
Reaktive, nicht-neoplastische Knochenmarksbiopsien	Medulläre T-NHL	= 0,001
Reaktive, nicht-neoplastische Knochenmarksbiopsien	AML, CML, pM, TE, PV	< 0,001
Reaktive, nicht-neoplastische Knochenmarksbiopsien	AML	< 0,001
Reaktive, nicht-neoplastische Knochenmarksbiopsien	CML, pM, TE, PV	= 0,003
Noduläre cHL, LPHL, T-NHL, B-NHL	Hyperplastische Tonsillen und entzündlich veränderte Lymphknoten	= 0,402
cHL	LPHL	= 0,609
Hochmaligne B-NHL	Niedrigmaligne B-NHL	= 0,008
AML, CML, pM, TE, PV	Medulläre T-NHL, B-NHL	< 0,001

3.8 Nachweis des ED-B FN in weiteren reaktiv oder pathologisch veränderten Geweben und einem basozellulären Karzinom

Auch bei pathologischen Gewebsveränderungen, die nicht durch Infiltration von Neoplasien verursacht wurden, konnten vermehrt ED-B FN-positive Gefäße nachgewiesen werden. So fand sich ED-B FN im posttraumatisch veränderten Milzgewebe (Zustand nach traumatischer Milzruptur) an den großen und mittleren Blutgefäßen (Tabelle 9, Abbildung 12). Die Sinusoide der Milz zeigten jedoch kein ED-B FN. In der Appendix mit geringer chronischer Entzündung (n = 4) wurde in einem Fall eine geringe Anzahl ED-B FN-positiver Blutgefäße nachgewiesen. In den anderen Appendizitis-Resektaten waren ausschließlich ED-B FN-negativ Blutgefäße nachweisbar. Die Biopsate der Brustdrüse mit Mastopathie wiesen zahlreiche ED-B FN-positive Blutgefäße auf. In der Gewebeprobe einer hyperplastischen Schilddrüse mit histologischen Entzündungszeichen (n = 1) fanden sich im Gegensatz zu den Schilddrüsenpräparaten mit Hyperplasie ohne Entzündungszeichen (n = 2) ED-B FN-positive Blutgefäße. Im Präputium bei bestehender Phimose waren keine ED-B FN-positiven Blutgefäße zu erkennen. In einer entzündlich veränderten Speicheldrüse fanden sich ED-B FN-positive Gefäße ebenso wie in dem Biopsat einer tumorfreien Speicheldrüse, die in der nahen Umgebung eines Plattenepithelkarzinoms lag. Ferner zeigten sich in einer entzündlich veränderter Hautbiopsie ED-B FN-positive Blutgefäße. Schließlich und nicht überraschend konnten in einer Hautbiopsie eines basozellulären Karzinoms ED-B FN-positive Gefäße nachgewiesen werden.

3 Ergebnisse

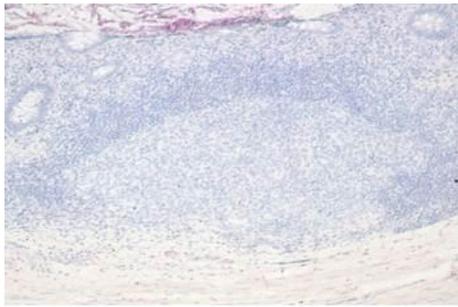


Bild A

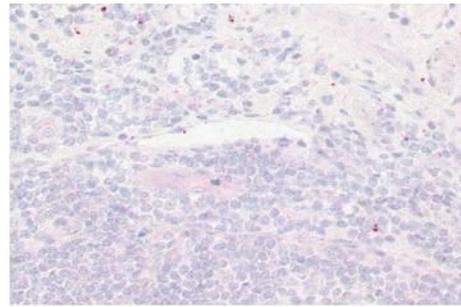


Bild B

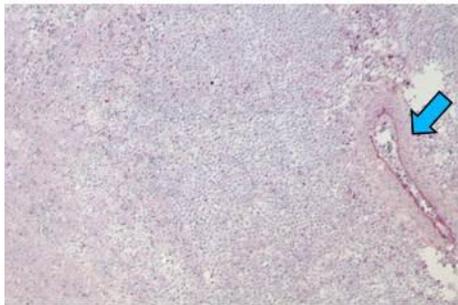


Bild C

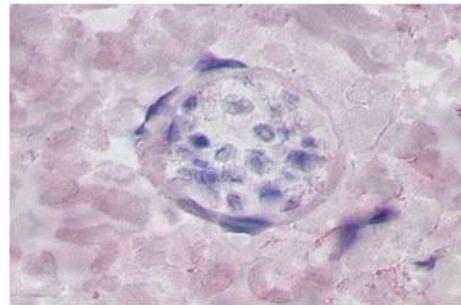


Bild D

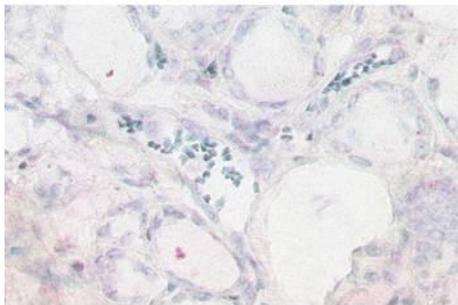


Bild E

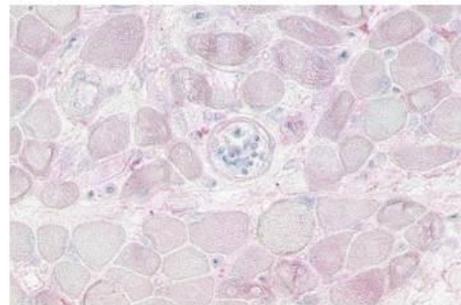


Bild F

Abbildung 12: Nachweis der ED-B FN-Expression in weiteren reaktiven/nicht-neoplastisch veränderten Geweben.

A, B: Appendizitis, Vergrößerung A 25-fach, B 100-fach; C: Milz bei Z. n. traumatischer Milzruptur, Vergrößerung 25-fach; D: Präputium mit Phimose, Vergrößerung 300-fach; E: Schilddrüse mit Hyperplasie, Vergrößerung 200-fach; F: Speicheldrüse entzündlich verändert, Vergrößerung 150-fach; die ED-B FN-Färbungen wurden mit dem MX1-mAk an in Paraffin-eingebettetem Gewebe durchgeführt. In den Appendix-Präparaten (A, B), im Präputium (D), in der Schilddrüse (E) oder der Speicheldrüse (E) stellen sich wenig oder keine ED-B FN an den Blutgefäßen dar. In dem posttraumatischen Milzpräparat

3 Ergebnisse

hingegen waren ED-B FN-positive Gefäße nachweisbar (Pfeil).

Tabelle 8: Vorkommen von ED-B FN-positiven Gefäßen bei weiteren reaktiv oder pathologisch veränderten Geweben und einem basozellulären Karzinom

Pathologisch verändertes Gewebe (MX1-mAk, Paraffin-eingebettetes Gewebe)	Prozent ED-B FN-positiver Blutgefäße, klassifiziert nach Gruppen			
	> 90 %	50 – 89 %	10 – 49 %	< 10 %
Milz nach traumatischer Milzruptur	1/1	0/1	0/1	0/1
Appendix mit Appendizitis	0/4	0/4	1/4	3/4
Präputium mit Phimose	0/2	0/2	0/2	2/2
Schilddrüse bei Schilddrüsenhyperplasie	0/3	0/3	1/3	2/3
Speicheldrüse entzündlich verändert	0/1	0/1	1/1	0/1
Speicheldrüse tumorfrei aus einem Neck- Dissektionspräparat	0/1	1/1	0/1	0/1
Mastopathie der Brustdrüse	2/2	0/2	0/2	0/2
Hautbiopsie eines basozellulärem Karzinoms	1/1	0/1	0/1	0/1
Haut mit polyklonalen T-Zellinfiltraten	1/1	0/1	0/1	0/1

3.9 Vergleichende Immunhistologie von mit CD34- und MX1-gefärbten Gewebeschnitten

Neben den haematopoetischen Stammzellen wird CD34 hauptsächlich von Endothelien der Blutgefäße exprimiert. In den immunhistologischen Färbungen fand sich in sämtlichen Präparaten unter Verwendung des CD34-Antikörpers eine nahezu komplette Darstellung aller Blutgefäße. Der Vergleich mit der Immunhistologie des mAk MX1, vor allem der neoplastischen Gewebe, zeigte eine Assoziation des ED-B FN an Blutgefäßen (Abbildung 13). Beim entzündlich veränderten Lymphknoten wurde erneut das geringere Ausmaß an ED-B FN-positiven Blutgefäßen im Vergleich zum Lymphomgewebe sichtbar. Die Anordnung der Blutgefäße im entzündlich veränderten Lymphknoten wurde durch die immunhistologische CD34-Markierung dargestellt. Das

3 Ergebnisse

innere Keimzentrum war gefäßarm, während sich in der Marginal- und Mantelzone ein Großteil der endothelialisierten Blutgefäße befand.

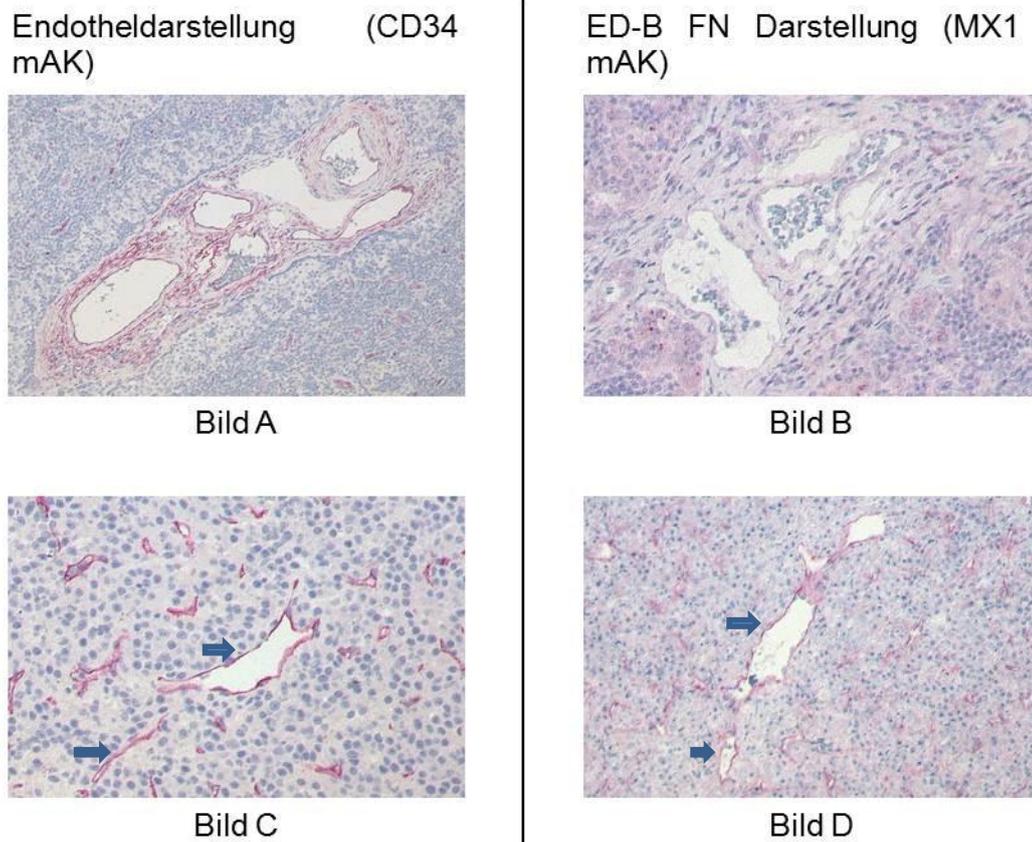


Abbildung 13: Vergleichende immunhistologische Färbungen mit den Antikörpern CD34 und MX1 an Gewebeschnitten von Lymphknoten und Plasmazellmyelom.

A, B: entzündlich veränderter Lymphknoten, Vergrößerung A 25-fach, B 50-fach; C, D: Plasmazellmyelom, Vergrößerung C 100-fach, D 50-fach; A-D: Paraffin-eingebettetes Gewebe, der erste in Paraffin-eingebettete Schnitt einer Probe wurde mit CD34-mAk (A, C) und der jeweils nachfolgende Schnitt mit dem MX1-mAk gefärbt (B, D). Beim entzündlich veränderten Lymphknoten finden sich CD34-positive, aber ED-B FN-negative Gefäße, wohingegen beim Plasmazellmyelom die Gefäße sowohl CD34- als auch ED-B FN-positiv sind. Einige der multiplen kleineren Gefäßanschnitte sind mit Pfeilen in C und D gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.10 Ko-Expressionsanalyse von CD34 und ED-B FN

Durch diese immunhistologische Untersuchung wurde es ermöglicht, an denselben histologischen Schnitten sowohl die Endothelien mit dem mAk CD34 (grüne Färbung) als auch das ED-B FN (rote Färbung) mit dem mAk MX1 darzustellen. Eine Ko-Expression wird gelb dargestellt. Die Zellkerne wurden mit TOTO3 blau gefärbt. Im Gewebe des klarzelligeren Nierenzellkarzinoms fand sich eine Ko-Lokalisation des ED-B FN- und des CD34-Epitopes im Bereich der Blutgefäßendothelien. Die Präparate des normalen Lymphknotens und des reaktiven, nicht-neoplastisch infiltrierten Knochenmarks ergaben keinen bzw. einen nur sehr geringen perivaskulären ED-B FN-Nachweis. Im entzündlich veränderten lymphatischen Gewebe fanden sich ED-B FN-positive Blutgefäße. Jedoch war der Anteil der ED-B FN-positiven Blutgefäße dort deutlich geringer als z. B. in Lymphom-infiltrierten Gewebebiopsaten (Abbildung 14). In Lymphombiopsaten konnte eine ausgeprägte Ko-Lokalisation von CD34 und ED B-FN nachgewiesen werden (Abbildung 15). Darüber hinaus konnte eine sehr geringe extravaskuläre Lokalisation von ED-B FN in der Nähe von CD34-positiven Endothelien der Gefäße in einigen Lymphom-Entitäten (DLBCL; NSHL) beobachtet werden, die aber im Gegensatz zum ED-B FN-Nachweis an den Blutgefäßen quantitativ nur von untergeordneter Bedeutung war.

3 Ergebnisse

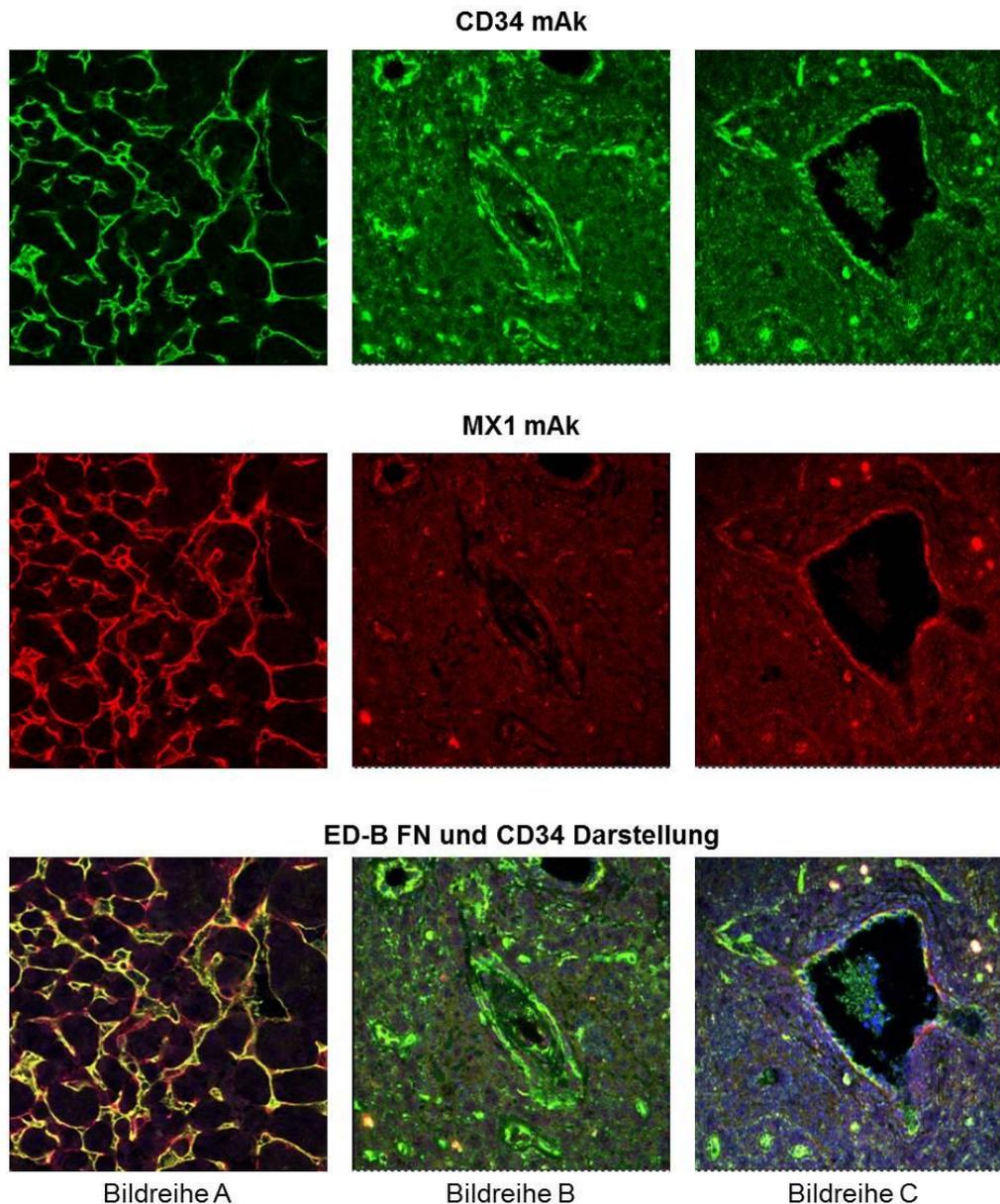


Abbildung 14: Immunfluoreszenz am Paraffinschnitt zur Darstellung der Ko-Expression von CD34 und ED-B FN im normalen und entzündlich veränderten Lymphknoten und im Nierenzellkarzinom.

A: klarzelliges Nierenzellkarzinom, Vergrößerung 50-fach; B: normaler Lymphknoten, Vergrößerung 100-fach; C: entzündlich veränderter Lymphknoten, Vergrößerung 100-fach; A-C: Paraffin-eingebettetes Gewebe; die immunhistologischen Färbungen wurden mit den MX1-mAk und CD34-mAk am gleichen, in Paraffin eingebetteten Schnitt simultan durchgeführt. Es zeigt sich eine ausgeprägte Ko-Lokalisation der CD34- und

3 Ergebnisse

ED-B FN-Epitope im Endothelbereich der Gefäße (gelbe Fluoreszenz) beim Nierenzellkarzinom (A), die beim reaktiven Lymphknoten (C) und beim normalen Lymphknoten (B) gar nicht oder nur im geringen Ausmaß nachweisbar war.

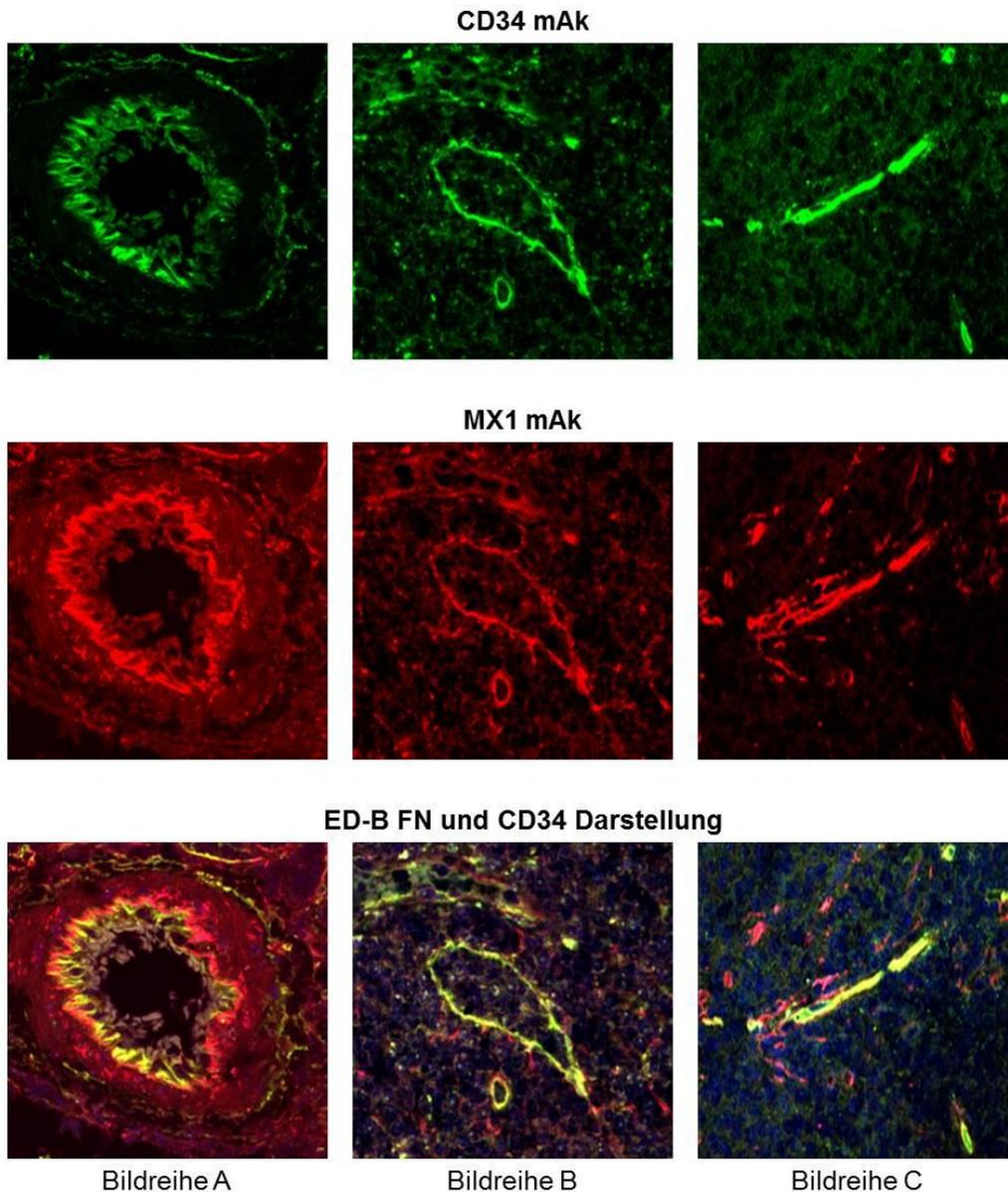


Abbildung 15: Immunfluoreszenz am Paraffinschnitt zur Darstellung der Ko-Expression von CD34 und ED-B FN bei Lymphomen.

A: DLBCL, Vergrößerung 50-fach; B: cHL-NS, Vergrößerung 150-fach; C: folliculäres

Lymphom Grad 3 a/b, Vergrößerung 150-fach; A-C: Paraffin-eingebettetes Gewebe; die immunhistologischen Färbungen wurden mit den mAk MX1 und CD34 am gleichen, in Paraffin eingebetteten Schnitt simultan durchgeführt. Eine ausgeprägte Ko-Lokalisation der CD34- und ED-B FN-Epitope ist im Endothelbereich der Gefäße (gelbe Fluoreszenz) bei den dargestellten Lymphom-Entitäten zu erkennen.

4 Diskussion

Die vorliegende Dissertation zeigt, dass die vaskuläre Zielstruktur, ED-B FN, in der überwiegenden Mehrzahl aller untersuchten Lymphombiopsate und in Biopsaten von Geweben, die von chronischen und akuten myeloproliferativen Neoplasien betroffen waren, in unterschiedlichem Ausmaß nachweisbar ist, und zwar unabhängig von dem pathologischen Subtyp der Erkrankung. Dieses Resultat legt das Fundament für potentielle ED-B FN-targetierte Antikörpertherapien gegen lympho- und myeloproliferative Neoplasien. Die Identifikation einer Zielstruktur, die bevorzugt im Tumorgewebe exprimiert wird, bildet eine der zentralen Voraussetzungen für die Entwicklung neuer und gezielter Behandlungsstrategien gegen maligne Erkrankungen, die sich durch eine deutlich höhere Wirksamkeit gegen Tumorzellen und ein wesentlich verbessertes Nebenwirkungsprofil auszeichnen sollen.

In den letzten Jahren sind einige Antikörper-basierte Therapien zur Behandlung von malignen Neoplasien in die klinische Routine eingeführt worden. Bei diesen gezielten Therapien wird unterschieden zwischen solchen, die sich gegen Tumorzell-assoziierte Antigene richten, und solchen, die gegen lösliche, von Tumorzellen gebildete Faktoren wie VEGF gerichtet sind. Als Beispiele für therapeutische Antikörper, die an Tumorzell-assoziierte Antigene binden, sind Trastuzumab (Herceptin®), Cetuximab (Erbitux®), Panitumumab (Vectibix®), Rituximab (MabThera®) und Ofatumumab (ARZERRA®) zu nennen. Dabei binden Trastuzumab an überexprimiertes HER2 auf Mammakarzinomzellen, Cetuximab und Panitumumab an den überexprimierten EGF-Rezeptor auf den Oberflächen von Karzinomzellen (kolorektale Karzinome und HNO-Karzinome) und Rituximab sowie Ofatumumab an das CD20-Antigen auf normalen und malignen B-Lymphozyten.⁸⁶ Diese Antikörper entfalten ihre zerstörende Wirkung auf Tumorzellen nach Bindung an das zellständige Epitop. Mittels Zellsignaltransduktion oder durch Fc-Rezeptor vermittelte Immunmechanismen werden die mit dem Antikörper markierten Zellen dann z. B. durch natürliche Killerzellen und Lymphozyten geschädigt.⁸⁷

Bevacizumab (Avastin®) dagegen ist ein Beispiel für einen Antikörper, der einen für das Tumorstadium wichtigen Wachstumsfaktor, den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor A (VEGF-A), bindet und so verhindert, dass dieser Faktor mit seinem Rezeptor interagiert und die Signaltransduktion zur Bildung neuer Blutgefäße im

4 Diskussion

Tumorgewebe auslöst.⁸⁸ Zur Behandlung von Krebspatienten mit Antikörpern werden typischerweise hochmolekulare Antikörperformate (meist IgG) in hohen therapeutischen Dosen und mit langen Plasmahalbwertszeiten eingesetzt.

Mit Ausnahme des Rituximab, das in Kombination mit einer Chemotherapie (R-CHOP) beim DLBCL sogar die Heilungsrate erhöht^{2, 3}, haben die genannten Antikörpertherapien jedoch ausschließlich einen schrittweisen Fortschritt bei der Behandlung von Patienten mit soliden Tumoren erbracht, der sich in einer Lebenszeitverlängerung von nur wenigen Wochen bis Monaten ausdrückt.^{4, 5, 6} Darüber hinaus binden die meisten dieser Antikörper an ein Tumorzell-assoziiertes Epitop, das lediglich auf einer bestimmten Tumorentität (z. B. CD20 nur bei B-Zell-Lymphomen) oder sogar nur auf einer kleinen Untergruppe innerhalb einer Tumorentität (z. B. HER2/neu Epitop, das bei nur ca. 25 % aller Mammakarzinome vorhanden ist) exprimiert wird. Daher können sie auch lediglich bei wenigen Tumorarten oder sogar nur bei einer kleinen Gruppe von Patienten innerhalb einer bestimmten Tumorerkrankung eingesetzt werden. So werden z. B. die EGF-Antikörper Cetuximab (Erbix[®]) und Panitumumab (Vectibix[®]) beim kolorektalen Karzinom ausschließlich bei Patienten eingesetzt, deren Tumorgewebe eine EGF-R-Expression ohne K-RAS-Mutationen aufweist.

Auch werden im therapeutischen Alltag Antikörper eingesetzt, die gegen Epitope gerichtet sind, die in großem Umfang auch auf normalen Zellen vorkommen. Ein Beispiel hierzu ist Rituximab, ein monoklonaler Antikörper, der gegen das CD20-Antigen gerichtet ist, das sowohl auf normalen B-Lymphozyten als auch auf B-Zell-Lymphomen vorkommt. So sind diese Antikörper wie z. B. Rituximab, die gegen B-Zellantigene gerichtet sind, zwar gegen mehrere verschiedene B-NHL-Entitäten einsetzbar, allerdings ist die Bindung an das neoplastisch infiltrierte Gewebe weder spezifisch noch selektiv.

Ein weiteres Problem der heute zur Verfügung stehenden hochmolekularen Antikörper besteht in der mangelhaften Erreichbarkeit der entsprechenden Tumor-assoziierten Epitope. So muss ein intravenös injizierter Antikörper wie Trastuzumab nach Erreichen der Blutgefäße im Tumor die Tumorgefäße verlassen und dann per diffusionem die einzelnen Tumorzellen erreichen, die das entsprechende Epitop, in diesem Fall den HER2/neu-Rezeptor, aufweisen, um seine Wirkung zu entfalten. Bosslet et al.⁸⁹ konnten in umfangreichen Untersuchungen zeigen, dass in soliden Tumoren eine Diffusions-

4 Diskussion

barriere vorhanden war, so dass trotz hoher Tumolvaskularisation und des Vorkommens des passenden Antigens nur wenige Antikörper die Tumorzellen direkt erreichten, so dass in vielen Bereichen des Tumors keine Antigen-Antikörper-Bindung zustande kam.

Um neue Antigene zu identifizieren, die bei einer Vielzahl von Neoplasien spezifisch oder wenigstens mit erhöhter Präferenz vorkommen, hat sich in den letzten Jahren der Blick von der Tumorzelle auf die Tumorzellumgebung (tumor-microenvironment) und hier insbesondere auf vaskuläre Strukturen des Tumorgewebes gerichtet. Dabei wurde gezeigt, dass das Tumorzell-infiltrierte Stroma zahlreiche typische Veränderungen aufweist. Durch Infiltration und Wachstum des Tumors werden Fibroblasten und Perizyten stimuliert, in deren Folge charakteristische Proteine wie die Splice-Varianten des Fibronectin sowie Laminin und Kollagen produziert werden. Darüber hinaus werden durch den Prozess der Tumordinfiltration Zytokine und Wachstumsstoffe (VEGF) von Stroma- und Tumorzellen freigesetzt, die eine überstürzte Neubildung von Blutgefäßen stimulieren. Diese Angiogenese ist für das Tumorstadium ab einer Tumorstadiumgröße von etwa 2 mm³ essenziell.²⁸ Neugebildete Blutgefäße in Tumorgeweben weisen zahlreiche typische histopathologische Veränderungen gegenüber den reifen Gefäßen auf, wie z. B. Fenestrations in den Endothelzellschichten. Diese und weitere Gefäßanomalien führen zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäße und zu Gefäß-Leckagen.^{19, 21} Dagegen tritt im ausgereiften Gewebe des gesunden, erwachsenen Menschen unter normalen Umständen eine Angiogenese nicht oder nur in einem geringeren Ausmaß und vorübergehend auf. Lediglich im Ovar und Uterus findet sich, in Abhängigkeit vom Hormonzyklus, eine charakteristische Angiogenese.²³ Allerdings wurde bei akuten oder chronisch-entzündlichen Veränderungen, wie z. B. der diabetischen Retinopathie, der Arteriosklerose und der rheumatischen Arthritis, Angiogenese im Rahmen von Gewebeumbau und Reparaturmechanismen im ausgeprägten Ausmaß festgestellt.²⁵ Das hauptsächliche Vorkommen der Angiogenese in pathologischen Prozessen, wie vor allem beim Tumorstadiumwachstum, und die fast vollständige Abwesenheit im gesunden erwachsenen Menschen zeichnen den Prozess der Angiogenese als potentiellen Ansatzpunkt für die Entwicklung einer Therapie gegen Tumorstadiumwachstum und Tumorerkrankungen aus. In den letzten Jahren ist es gelungen, vaskuläre Zielstrukturen zu identifizieren, die sich bevorzugt auf neugebildeten Blutgefäßen im Tumorstadiumgewebe

4 Diskussion

befinden. Beispiele dafür sind die Fibronectin-Splice-Varianten ED-A und ED-B sowie Tenascin C, die allesamt neu gebildete Gefäße selektiv markieren. Manche dieser neuen vaskulären Strukturen befinden sich sogar ausschließlich auf den Gefäßen einer Tumorart, wie für Lymphome gezeigt werden konnte.⁹⁰ Trotz des Vorkommens der Fibronectin-Splice-Varianten ED-A und ED-B und des Tenascin C auch bei entzündlichen Erkrankungen eignen sie sich sehr gut als Zielstrukturen für zukünftige Antikörper-basierte Medikamente.

Die Splice-Variante ED-B des Fibronectin ist eine der am besten untersuchten vaskulären Zielstrukturen. ED-B FN wird an allen neugebildeten Blutgefäßen exprimiert, also auch an Gefäßen im malignen Tumor. Jedoch war bisher wenig bekannt über die ED-B FN-Expression an neugebildeten Blutgefäßen von lymphatischen und haematopoetischen Neoplasien. Aber es wurde bisher in fast allen soliden bösartigen Erkrankungen immunhistologisch nachgewiesen. So konnte ED-B FN als Marker der Angiogenese in soliden Tumoren, wie dem klarzelligen Nierenzellkarzinom, dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom und anderen Karzinomen, im Tumorstroma wie auch an den Blutgefäßen gefunden werden. Die Expression des ED-B FN ist nicht tumorspezifisch, denn bei Vorgängen wie Wundheilung, Arteriosklerose und Entzündung wird ED-B FN als Marker der Angiogenese ebenfalls exprimiert. Allerdings konnte bereits an Patienten mit soliden Tumorerkrankungen mittels nuklearmedizinischer Methoden beobachtet werden, dass nach intravenöser Injektion von radioaktiv-markierten ED-B FN-Antikörpern (z. B. ¹³¹I-L19SIP) diese tatsächlich selektiv im Tumorgewebe aufgenommen wurden.^{91, 92}

Zusammenfassend ist es mit diesen Untersuchungen gelungen, die bevorzugte Expression des ED-B FN in Tumorgewebe als eine mögliche therapeutische Zielstruktur bei der Behandlung von Patienten mit soliden Tumorerkrankungen zu charakterisieren. Im Gegensatz dazu wurden bisher noch keine systematischen Untersuchungen über die Expression von ED-B FN bei lymphatischen und hämatologischen Neoplasien durchgeführt.

Um zu analysieren, ob eine ED-B FN-Expression auch in malignen haematopoetischen und lymphatischen Erkrankungen vorkommt, wurde diese Arbeit durchgeführt. Eine

4 Diskussion

große Anzahl von Biopsaten wurde untersucht, die von befallenen Geweben von Patienten mit haematopoetischen und lymphatischen Neoplasien entnommen wurden. Die entsprechenden Gewebeproben wurde immunhistologisch auf das Vorhandensein von ED-B FN untersucht. Grundlegend war dafür eine Pilotserie an wenigen kryopräservierten Lymphombiopsaten, die zunächst gezeigt hatte, dass das Glycoprotein ED-B FN tatsächlich in einem hohen Ausmaß an den neugebildeten Blutgefäßen im Lymphomgewebe vorhanden ist. Dabei war die Darstellbarkeit des ED-B FN an neugebildeten Blutgefäßen von Lymphomen im gefrierasservierten Gewebe gut vergleichbar mit dem von kryopräservierten Proben solider Tumorentitäten wie etwa dem klarzelligen Nierenzellkarzinom. Allerdings gibt es aufgrund der technisch aufwendigen und kostenintensiven Gewinnung von kryoasserviertem Gewebe und der schwierigen Haltbarkeit (Lagerung bei -80 °C bzw. in flüssigen Stickstoff) der Proben nur wenige Lymphomgewebebanken, die aus kryopräserviertem Material bestehen. Deshalb ist eine systematische Untersuchung der ED-B FN-Expression an einer großen Anzahl vom Lymphombiopsaten (z. B. mehr als 100) an gefrierasserviertem Material schwierig durchzuführen und sehr zeitaufwendig. Weiterhin können Untersuchungen an kryoasserviertem Material auch mit technischen Problemen behaftet sein, insbesondere dann, wenn der Prozess der Kryo-Asservierung nicht rasch genug oder unprofessionell durchgeführt wird und es somit zu einem unkontrolliertem Einfriervorgang des Probenmaterials kommt. Wegen dieser möglichen Qualitätsschwankungen bei der Gewinnung der kryopräservierten Biopsate besteht eine Restunsicherheit, insbesondere dann, wenn ED-B FN nicht nachgewiesen werden konnte (eventuell falsch negativer Befund). Im klinischen Alltag werden die gewonnenen Biopsien routinemäßig Formalinfixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die so bearbeiteten Gewebeproben können dann mittels Immunhistologie untersucht werden. Auch die Lagerung dieser Gewebeproben ist unkomplizierter und es existieren größere Serien an Lymphombiopsaten, die für eine systematische Untersuchung herangezogen werden können. Ziel dieser Arbeit war es, Lymphombiopsate zu untersuchen, die den klinischen Routinebedingungen entsprechen und somit am besten das breite Spektrum der verschiedenen Lymphomentitäten und die verschiedenen Organlokalisationen, z. B. Infiltration eines Lymphoms in das Knochenmark, repräsentieren. Daher musste zunächst eine Methode zur standardisierten Freilegung des ED-B FN Epitops erarbeitet

4 Diskussion

werden. Für die nachfolgenden immunhistologischen Untersuchungen wurde dieses Verfahren zum Nachweis des ED-B FN in Paraffin eingebetteten Gewebes angepasst und anschließend validiert.

Um eine optimale Demaskierung des ED-B FN-Epitops im Paraffinschnitt zu finden und eine Zerstörung des Epitops oder der Gewebestruktur zu vermeiden, wurde sowohl eine enzymatische Freilegung mit Proteaselösung als auch eine Vorbehandlung der Paraffinschnitte im dampfgesättigten Hochdruckkochtopf mit Citrat- und EDTA-Lösung mit unterschiedlichen Kochzeiten getestet. Nach der Epitopfreilegung wurden die Gewebeschnitte routinemäßig nach der APAAP-Methode für monoklonale Antikörper weiterbehandelt. Zur ED-B FN-Darstellung wurden zwei rekombinante monoklonale Antikörper und ein IL2-konjugiertes scFv-Antikörperfragment eingesetzt. Eine fünfminütige Vorbehandlung der Gewebeschnitte in einer 2 mM EDTA Lösung (pH 8,0) im dampfgesättigten Hochdruckkochtopf erbrachte das beste Ergebnis und die Intensität und Qualität der ED-B FN-Darstellung mit den drei Anti-ED-B FN-Reagenzien war vergleichbar mit der entsprechenden Färbung an gefrierasservierten Gewebeschnitten. Die Morphologie der Gewebe nach Vorbehandlung mit EDTA-Lösung in der Immunhistologie, aber auch nach routinemäßiger Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer, war dabei deutlich besser erhalten als im entsprechenden Gefrierschnitt. Die Epitop-Demaskierung mit Protease sowie die Vorbehandlung in Citratlösung im dampfgesättigten Hochdruckkochtopf führten zur deutlich schlechteren Nachweisbarkeit des ED-B FN sowie zu schlechteren morphologischen Ergebnissen. Sie wurden daher nicht weiterverfolgt. Bevor die Untersuchung einer großen Serie von Lymphombiopsaten durchgeführt werden konnte, war es wichtig, eine präzise Validierung der Methode vorzunehmen.

Zum Ausschluss falsch positiver und/oder falsch negativer Ergebnisse wurden gefrierasservierte und Paraffin-eingebettete Gewebeproben von verschiedenen Lymphomentitäten, vom klarzelligen Nierenzellkarzinom sowie dem murinen F9-Teratokarzinom nach der Standardmethode am Gefrierschnitt und dem modifizierten Epitopfreilegungsverfahren mit der APAAP-Methode mit den ED-B FN-Antikörpern gefärbt und anschließend kritisch miteinander verglichen. Dabei zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen dem Ausmaß der ED-B FN-Expression an neugebildeten Blutgefäßen an den unterschiedlich vorbehandelten Gewebeschnitten. Hinsichtlich der

4 Diskussion

Qualität der immunhistologischen Darstellung des ED-B FN an Blutgefäßen oder anderen Strukturen lässt sich allerdings eine deutlich bessere Beurteilbarkeit des Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitts erkennen.

Zur weiteren Validierung dieser Epitopfreilegungsprozedur wurden ED-B FN-Kompetitionsexperimente durchgeführt, die zeigen sollten, dass die Bindung der Antikörper an ED-B FN-positive Blutgefäße spezifisch ist und die Präinkubation des primären Antikörpers mit einem Überschuss an löslicher Zielstruktur, in diesem Fall rekombinantem ED-B FN, die Bindung des primären Antikörpers unterdrücken kann. Dieses Experiment wurde mit zwei Reagenzien gegen ED-B FN am kryoasservierten und im Paraffin-eingebetteten, mit der neu etablierten Epitopfreilegungsmethode vorbehandelten Gewebe durchgeführt. Ein Kontrollschnitt ohne Zugabe von rekombinantem ED-B FN wurde jeweils mitgeführt. Der Vergleich der immunhistologischen Färbung zeigte eine deutliche Inhibition der ED-B FN-Darstellung und belegt somit die Spezifität der Antikörperbindung für das ED-B FN. So konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die eingesetzte Epitopfreilegungsmethode die Darstellung des ED-B FN ermöglicht und dabei aber keine unspezifischen Bindungsergebnisse verursacht werden.

Nach erfolgreicher Validierung der Methode konnte nun die Expression des ED-B FN immunhistologisch an routinemäßig in Paraffin eingebettete Geweben bei einer großen Anzahl von Lymphompräparaten untersucht werden. Dabei wurden auch Infiltrate von Lymphomen oder Plasmazellmyelomen in Knochenmarkbiopsaten untersucht, die zuvor entkalkt werden mussten.

Diese Arbeit untersucht zum ersten Mal systematisch das Vorhandensein des ED-B FN in Tumorbiopsaten von Patienten mit bösartigen haematopoetischen und lymphatischen Neoplasien. Als Kontrollen wurden Biopsate von nicht-neoplastisch veränderten lymphatischen und haematopoetischen Geweben eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass ED-B FN ein charakteristisches Merkmal der Blutgefäße praktisch aller haematologischer und lymphatischer Neoplasien darstellt. So wurde in den Biopsaten fast aller untersuchten Lymphomentitäten ED-B FN an neugebildeten Blutgefäßen in großem, aber unterschiedlichem Ausmaß nachgewiesen. Im Vergleich dazu fand sich in normalen Lymphknoten und in nicht-neoplastischen oder reaktiv veränderten

4 Diskussion

Knochenmarkbiopsien kein oder signifikant weniger ED-B FN an Blutgefäßen als im Lymphomgewebe, und in den Sinusoiden des normalen Knochenmarkes war kein ED-B FN nachzuweisen.⁹³

Im Unterschied zu manchen soliden Karzinomen war ED-B FN bei hämatologischen und lymphatischen Neoplasien fast ausschließlich mit Blutgefäßen und nicht mit Stromalen Strukturen assoziiert. In nodalen Lymphomen wurde eine Kolo-kalisation des ED-B FN mit den Blutgefäßen jeglichen Durchmessers und jeder Lage gefunden. Auch in Knochenmarksbiopsien konnte ED-B FN in den Arealen mit Lymphominfiltraten an den kleineren bis mittleren Blutgefäßen nachgewiesen werden. Dies steht in deutlichem Unterschied zu manchen soliden Karzinomen (z. B. den Hals-Nasen-Ohren-Karzinomen), bei welchen eine zum Teil sehr starke Stromale Expression des ED-B FN beschrieben wurde. So wird z. B. beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, oralen Plattenepithelkarzinom, Nierenzellkarzinom, kolorektalen Karzinom, papillären Schilddrüsenkarzinom und beim duktalem Mammakarzinom sowohl von einer Stromalen als auch einer vaskulären ED-B FN Expression berichtet.^{94, 95, 96, 97, 98, 53}

ED-B FN stellt somit eine charakteristische vaskuläre Zielstruktur dar, die offenbar ubiquitär in allen haematopoetischen und lymphatischen Neoplasien vorkommt. Von Untersuchungen an soliden Karzinomen ist bekannt, dass sich das Gefäß-assoziierte ED-B FN an der Basalmembran unterhalb der Endothelzellen befindet.⁹⁹ Obwohl in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Methode der Lichtmikroskopie verwandt wurde, kann, in Analogie zu anderen Arbeiten von soliden Karzinomen, vermutet werden, dass ED-B FN auch bei Lymphomen und Leukämien im Bereich der subendothelialen Basalmembran angelagert wird.

Da neugebildete Blutgefäße in Tumorgeweben häufig morphologische Abnormalitäten wie Fenestrationsen in der Endothelzellschicht aufweisen, kann angenommen werden, dass der Angriffspunkt „Gefäß-assoziiertes ED-B FN“ von der Blutbahn aus einfacher erreichbar ist als etwa Tumorstroma-assoziiertes ED-B FN. So könnte ein intravenös verabreichter ED-B FN Antikörper am Gefäß-assoziierten ED-B FN eine Antigen-Antikörper-Bindung eingehen, ohne per diffusionem durch die Basalmembran gelangen zu müssen. Damit besitzt die Diffusionsbarriere des Tumors eine untergeordnete Rolle, so dass in der gesamten Tumolvaskularisation eine gleichmäßige Antigen-Antikörper-

4 Diskussion

Bindung erreicht werden könnte. Für die Antikörper-konjugierte Anti-Tumorthherapie mit radiogenen, immunotoxischen oder zytotoxischen Stoffen, z. B. IL2-konjugierter ED-B FN-Antikörper (L19-IL2), bedeutet die Gegenwart von vaskulären ED-B FN, dass das Konjugat sich gleichmäßig und gezielt in der Tumolvaskularisation anreichern und dort seine Wirkung entfalten kann. Damit könnte eine flächendeckende gleichmäßige und selektive Behandlung des gesamten Tumors möglich werden. Dies steht im Gegensatz zu Tumorzell-assoziierten Antigenen, bei denen durch die Bindungsbarriere des Tumors Areale ohne Antigen-Antikörper-Bindung vorhanden sind. Diese Gebiete sind für ein Antikörper-Konjugat nicht leicht erreichbar, so dass ein möglicherweise nur ungleichmäßiger Therapieeffekt eintreten würde.⁹⁶ Dagegen konnten in Xenotransplantanten von humanen B-NHL mit dem IL2-konjugierten ED-B FN Antikörper (L19-IL2) eine gezielte und gleichmäßige Akkumulation des Konjugates im Lymphomgewebe und eine Tumorregression gezeigt werden.¹⁰⁰ Dies verdeutlicht, dass das vaskuläre ED-B FN als Angriffspunkt ausreichen könnte, um eine gezielte und effektive Tumorthherapie durchzuführen. Auch bei soliden Tumoren zeigte die ED-B FN-targetierte Therapie mit Fusionsproteinen ermutigende therapeutische Effekte, wie in Tiermodellen, aber auch bei Patienten mit fortgeschrittener solider Tumorerkrankung beobachtet werden konnte.^{101, 102, 103} Die strenge Assoziation von ED-B FN an die Gefäße im Lymphomgewebe steht im Gegensatz zu soliden Tumoren, wo neben den Tumorgefäßen auch im Tumorstroma ED-B FN nachweisbar ist.^{107, 108, 109, 110, 111, 55} Diese Beobachtung könnte auch etwas über den Ursprung der ED-B FN-Expression vermuten lassen. So wurde bereits beschrieben, dass ED-B FN durch Endothelzellen, aber auch durch Myofibroblasten und Fibroblasten sezerniert wird.¹⁰⁴ Darüber hinaus konnte in Zelllinien von soliden Tumoren eine ED-B FN-Produktion nachgewiesen werden.^{105, 106} Dagegen wurde bei manchen Zellen des lymphatischen und blutbildenden Systems nur über eine ED-B FN-Markierung der Zelloberfläche berichtet.^{107, 108, 109} In normalen Zellen der Blutbildung konnte in dieser Arbeit kein ED-B FN nachgewiesen werden. Schließlich haben Vogel et al.¹⁰⁷ immunhistochemisch ED-B FN im Zytoplasma von Megakaryozyten gefunden. Dieses Ergebnis war jedoch mit Hilfe der Durchflusszytometrie und PCR, die beide eine höhere Sensitivität zum Nachweis von intrazellulären und zellständigen Strukturen besitzen, nicht bestätigt worden. Da diese Methoden kein eindeutiges Ergebnis zeigten, bleibt unklar, ob Megakaryozyten

4 Diskussion

tatsächlich ED-B FN produzieren und es im Zytoplasma enthalten. Wagner et al.¹⁰⁸ und Blum et al.¹⁰⁹ haben mittels Durchflusszytometrie gezeigt, dass auf CD3-positiven und IL-2-stimulierten T-Lymphozyten ED-B FN nachweisbar ist. In dieser Arbeit konnte dagegen immunhistologisch kein ED-B FN auf lymphatischen Zellen nachgewiesen werden. Jedoch besitzt die Durchflusszytometrie eine höhere Sensitivität beim Nachweis zellständiger Strukturen, als dies bei der klassischen Immunhistologie der Fall ist. Daher ist naheliegend, dass IL-2-stimulierte T-Lymphozyten möglicherweise eine geringe Menge an ED-B FN auf ihrer Zelloberfläche tragen. Jedoch zeigte sich, dass ED-B FN nicht hauptsächlich von Tumorzellen selber, sondern von deren Umgebung produziert wird. Deshalb ist bei einer Therapie mit ED-B FN-Antikörper, im Gegensatz zu therapeutischen Ansätzen gegen Zielstrukturen, die sich unmittelbar auf Tumorzellen befinden, wie z. B. Rituximab, eine reine Selektion von Antigen-negativen Tumorzellen unwahrscheinlich, da die gegen ED B-FN-gerichtete Therapie primär nicht gegen Antigen-positive Tumorzellen selektionieren kann.

ED-B FN ist ein Marker der Angiogenese, der möglicherweise bei Lymphomen und haematopoetischen Neoplasien, ähnlich wie andere Angiogenese-Messparameter, eine prognostische Bedeutung aufweisen könnte. Angiogenese, u. a. gemessen mittels der MVD (micro vessel density), wurde bereits früher auch bei einigen Lymphomen und myeloproliferativen Erkrankungen nachgewiesen. Bei vielen malignen haematopoe-tischen Erkrankungen und Lymphomen, wie z. B. dem Plasmazellmyelom und der CLL, wurde der MVD sogar eine prognostische Bedeutung zugestanden. Korrelierend zu meinen Ergebnissen wurde außerdem in hochmalignen im Vergleich zu niedrigmalignen B-Zell-Lymphomen eine höhere MVD beschrieben.³⁶ Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ED-B FN, ähnlich wie die MVD, ebenfalls eine prognostische Aussagekraft besitzt und dass die Menge an nachweisbaren ED-B FN möglicherweise mit der Proliferationsrate der Tumorzellen korreliert. So zeigten Biopsate von hochmalignen B-NHL im Vergleich zu Biopsaten von niedrigmalignen Lymphomen eine signifikant höhere Anzahl an ED-B FN-positiven Blutgefäßen ($p = 0,008$). Es fanden sich jedoch auch Ausnahmen von dieser Regel. Obwohl den hochmaligen Lymphomen zugeordnet, zeigten sich überraschenderweise in der plasmoblastischen und T-zellreichen Variante des DLBCL nur wenige ED-B FN-positive Blutgefäße. Jedoch können aufgrund

4 Diskussion

niedriger Fallzahlen keine Rückschlüsse gezogen werden, ob dies eine Besonderheit dieser beiden Varianten darstellen könnte. Zwischen den Subtypen des Hodgkin-Lymphoms konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Häufigkeit der ED-B FN-positiven Blutgefäße gefunden werden. In den Biopsaten der T-NHL fanden sich ED-B FN-positive Gefäße in sehr unterschiedlichem Ausmaß. Bei den myeloproliferativen Erkrankungen war ebenfalls eine Häufung an ED-B FN-positiven Blutgefäßen zu beobachten, jedoch fiel dessen Ausmaß signifikant geringer als bei den Lymphomen aus ($p < 0.001$).

Aufbauend auf die semiquantitativen Analysen in dieser Arbeit zum Ausmaß der ED-B FN-Expression bei haematopoetischen und lymphatischen Neoplasien erscheinen insbesondere die aggressiven Lymphome wie das DLBCL und das FL Grad 3 a/b besonders geeignet für zukünftige ED-B FN-targetierte Medikamente. Aber auch das Hodgkin-Lymphom mit seinem häufigen Vorkommen an ED-B FN-positiven Blutgefäßen ist möglicherweise für einen klinischen Therapieversuch mit L19-basierenden Konjugaten gut geeignet.

Für eine systemische und selektive Antikörper-basierte Therapie ist von großer Bedeutung, dass das Zielantigen im nichtmaligne veränderten Gewebe nicht vorhanden ist. Deshalb waren die Untersuchungen am nicht-neoplastisch veränderten haematopoetischen und lymphatischen Gewebe von so großer Relevanz.

In normalen, nichtpathologisch veränderten Lymphknoten konnte kein ED-B FN an Blutgefäßen oder im Stroma gefunden werden. Jedoch war in entzündlich veränderten Lymphknoten ED-B FN im unterschiedlichen Ausmaß vorhanden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Hertel¹¹⁰, der den Nachweis von ED-B FN in reaktiven Lymphknoten beschrieben hat. Dabei hängt das ungleiche Ausmaß der ED-B FN-Expression an Blutgefäßen in dem hyperplastischen lymphatischen Gewebe möglicherweise mit der variablen Intensität des örtlichen Entzündungsprozesses zusammen, der eventuell mit einer unterschiedlich hohen Neubildungsrate von Blutgefäßen einhergehen kann.

Dagegen konnte in der vorliegenden Arbeit kein vaskuläres oder stromales ED-B FN an reaktiven, nicht-neoplastisch infiltrierten Knochenmarkbiopsaten nachgewiesen werden. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen von Kilian et al.¹¹¹ überein, die in normalen

4 Diskussion

gefrierasservierten Knochenmarkbiopsien mittels Immunhistologie und PCR keine ED-B FN-Expression nachweisen konnten.

In zwei untersuchten Knochenmarkbiopsaten mit reaktiven Veränderungen ohne Nachweise eines Lymphoms oder einer haematopoetischen Neoplasie fanden sich ED-B FN-positive Blutgefäße. Diese Biopsate stammten von einem Patienten, der an einer hämolytischen Anämie unklarer Ursache erkrankt war, und von einem Patienten, bei dem ein auf die Therapie ansprechendes und daher in Rückbildung befindliches noduläres B-NHL vorlag. Hämolytische Anämien sind häufig mit Lymphomen assoziiert, die gelegentlich erst im weiteren klinischen Verlauf diagnostiziert werden können. Noduläre B-Zell-Lymphome, die in der Regel im fortgeschrittenen Stadium nicht heilbar sind, zeigen eine hohe Neigung, das Knochenmark fokal zu befallen. Letztlich bleibt die Ursache für die ED-B FN-Expression in diesen beiden Biopsaten ungeklärt, auch wenn die Infiltration durch lymphatische oder haematopoetische Neoplasien nicht sicher ausschließbar ist.

Aber auch in anderen krankhaft veränderten Geweben fand sich ED-B FN. So wurde in jeweils einer untersuchten Probe der Appendix und der Schilddrüse ein geringgradiger ED-B FN-Nachweis an Blutgefäßen erbracht. In beiden Geweben wurden histologisch ebenfalls Zeichen einer Entzündung beschrieben. In weiteren Gewebeproben des Appendix und der Schilddrüse konnte jedoch kein ED-B FN gefunden werden. Bei diesen Proben waren keine histologischen Entzündungsmerkmale erkennbar.

Kaczmarek et al.⁹⁷ fanden ED-B FN-positive Blutgefäße in Biopsaten von Brustdrüsen mit Mastopathie, nicht aber in normalem Brustdrüsengewebe. Ferner konnten Trachsel et al.¹¹² zeigen, dass ED-B FN auch an Blutgefäßen in entzündlich verändertem Hautgewebe vorkommt. Diese Berichte stimmen mit den hier gezeigten Ergebnissen gut überein. Außerdem wurden ED-B FN-positive Gefäße auch in normalem Gewebe gefunden, das unmittelbar an Tumorgewebe angrenzte. So waren bei der immunhistologischen Untersuchung von Gewebe einer tumorfreien Speicheldrüse, die bei einer Neck-Dissektion bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom gewonnen wurde, ED-B FN-positive Blutgefäße vorhanden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Kosmehl et al.⁹⁸ überein, die an der angrenzenden, tumorfreien Nachbarregion eines Plattenepithelkarzinoms ED-B FN an Blutgefäßen beschrieben haben.

4 Diskussion

Bei den Untersuchungen zu dieser Arbeit wurde ED-B FN auch in den Gefäßen eines Splenektomiepräparates von einem Patienten nachgewiesen, der ein Polytrauma mit Milzruptur erlitten hat. Der zeitliche Abstand zwischen Polytrauma und Operation konnte retrospektiv nicht mehr evaluiert werden. Dabei bleibt unklar, durch welchen Reiz (z. B. eintretende Wundheilung oder Gewebehypoxie) die Expression von ED-B FN in der Milz bei diesem Patienten angeregt wurde. Mit Ausnahme des Uterus und Ovars, die zyklischen Veränderungen unterliegen, lässt sich in gesunden, ausgereiften Geweben oder Organen keine ED-B FN-Expression nachweisen.⁵⁴

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass ED-B FN nicht tumorspezifisch ist, denn alle Angiogenese-induzierenden Prozesse, wie z. B. Hypoxie und Entzündung, aber auch Tumorwachstum, führen zur ED-B FN-Expression.

Aufgrund der konstant vorhandenen ED-B FN-Expression in Lymphomen, während das normale haematopoetische und lymphatische Gewebe keine ED-B FN-Expression zeigt, scheint es sinnvoll, im Hinblick auf eine zukünftige Behandlung, ED-B FN-Antikörper weiterzuentwickeln und klinisch zu testen. Durch z. B. die Konjugation von ED-B FN-Antikörpern mit Radioisotopen, Zytokinen oder zytotoxischen Substanzen kann wahrscheinlich eine Tumor-selektivere Anlagerung des Wirkstoffes erreicht werden. So könnte möglicherweise die Wirkstoffkonzentration am Tumor erhöht und die systemische Exposition normaler Organe deutlich vermindert werden, was sich wiederum in einer besseren Wirksamkeit bei verminderter Toxizität ausdrücken sollte. Auch bei dieser konjugierten targetierten Antikörpertherapie wird mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Nebenwirkungsspektrum zu erwarten sein. Jedoch kann durch die Kombination mit anderen Therapien, wie z. B. konventioneller Radio-/Chemotherapie, diese in ihrer Dosis abgesenkt und so in ihrer Toxizität vermindert werden. Manche Antikörperderivate dieser Art, die auch als „antibody-drug-conjugates“ (ADC) bezeichnet werden, zeigen erste positive Ergebnisse in der klinischen Anwendung.

So ist das ADC Gemtuzumab Ozogamicin (MylotargTM), ein humanisierter CD33-Antikörper, der an den antineoplastischen Wirkstoff Ozogamicin gekoppelt ist, zur Behandlung der AML zugelassen. Allerdings ist dessen Wirksamkeit bei dieser

4 Diskussion

Erkrankung nur sehr gering.¹¹³ Das ADC Brentuximab Vedotin (Adcetris®), ein CD30-Antikörper, der an Monomethyl-Auristatin gekoppelt ist, ist für die Behandlung von Patienten mit rezidiviertem Hodgkin-Lymphom oder mit fortgeschrittenem anaplastischem großzelligem Lymphom (ALCL) seit August 2011 von der FDA zur Behandlung zugelassen. Bei diesen Patienten führte Brentuximab Vedotin (Adcetris®) zu einem objektiven Ansprechen bei über 75 % der Patienten.¹¹⁴ TDM1 ist ein weiteres Beispiel für ein ADC, wobei hier der internalisierende HER2-Antikörper Trastuzumab an den hochtoxischen Wirkstoff Maytansin gekoppelt ist. TDM1 befindet sich in der späten klinischen Entwicklung für Patienten mit fortgeschrittenem HER-2-exprimierendem Brustkrebs.¹¹⁵

Mit der Markierung von CD20-Antikörpern durch radioaktive Isotope wie ⁹⁰Yttrium und ¹³¹Jod gelingt eine Tumor-selektive β -Bestrahlung von CD20-exprimierenden Lymphomen, insbesondere des sehr strahlenempfindlichen folliculären Lymphoms (FL). Dabei hatte der ¹³¹Jod-markierte CD20-Antikörper Tositumomab (Bexxar ®) eine deutlich größere Wirkung bei Patienten mit FL als der nichtradioaktive Antikörper (Rituximab). Ähnlich verhält sich die Situation beim ⁹⁰Yttrium-markierten CD20-Antikörper (Ibritumomab Tiuxetan; Zevalin ®).^{116, 117}

Für eine auf ED-B FN-Antikörpern basierende Therapie wurden bereits ähnliche Konzepte entworfen. Dabei wurden humane Antikörper entwickelt, die eine hohe Affinität für das ED-B FN-Epitop (mAK BC1, scFv L19, mAk MX1) aufweisen, wie Biodistributionsexperimente in Tumor-tragenden Tiermodellen zeigten.^{84, 85} In einem weiteren Schritt wurde das Format dieser Antikörper so optimiert, dass eine möglichst rasche und hohe Bindung an ED-B FN-exprimierende Blutgefäße im Tumor gelang und gleichzeitig nichtgebundene Antikörpermoleküle rasch vom Körper ausgeschieden werden (L19-SIP, dimeric scFv L19). Anschließend wurden diese optimierten Antikörperderivate an immunmodellierende Substanzen wie IL-2, TNF α , IL-12 (scFv L19-IL2, scFv L19-mTNF α) gekoppelt oder mit ¹³¹Jod markiert (¹³¹I-L19-SIP).^{118, 119, 120, 121} Dabei zeigte sich in umfangreichen Studien an tumortragenden Mäusen, dass die Targetierung des Effektormoleküls, also beispielsweise des IL-2, in der Monotherapie, aber vor allem auch in Kombination mit konventionellen Zytostatika (z. B. Gemcitabine, Dacarbazine), deutlich effektiver verlief als das freie, ungebundene Zytokin.^{84, 101} Selbst

4 Diskussion

komplette Eradikationen humaner B-Zell-Lymphome wurden mit der Kombination von Rituximab und L19-IL2 in einem Tierlymphom-Modell gezeigt, wohingegen Rituximab in Kombination mit freiem IL-2 keine entsprechende Wirkung zeigte.¹⁰⁰ Entsprechend befindet sich L19-IL2 bereits in der klinischen Entwicklung als Medikament zur Behandlung von Melanompatienten sowie von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom. Als Monotherapie wurde L19-IL2 bei Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom geprüft und konnte hier bei einigen Patienten den Krankheitszustand über einen langen Zeitraum stabilisieren.¹⁰²

Auch die Konjugation des Anti-ED-B FN-Reagenzien mit IL-12 (huBC1-IL12; L19-IL12) sowie TNF α (L19-mTNF α) zeigte einen antineoplastischen Effekt in Mäusen, die ED-B FN-positive Tumor trugen.^{118, 119, 120, 121, 122} Um die Möglichkeiten für die Nutzung einer Radioimmuntherapie von ED-B FN-positiven Tumoren zu evaluieren, wurde L19-SIP nach GMP-Richtlinien produziert und anschließend mit ¹³¹Jod markiert (I¹³¹-L19-SIP). Mäuse, die an einem ED-B FN-positiven Tumor erkrankt waren, wurde eine Dosis dieses Medikamentes verabreicht. In der nuklearmedizinischen Untersuchung wurde eine hohe Aufnahme des Medikamentes im Tumor nachgewiesen.^{123, 124} Bei Patienten mit fortgeschrittenen inkurablen Lymphomen wurde ebenfalls zunächst eine sehr kleine diagnostische Dosis dieses Medikamentes verabreicht.¹²⁵ Nach der Injektion wurden die Patienten mehrfach nuklearmedizinisch untersucht, um die Anreicherung des Medikaments im Lymphomgewebe und in normalen Organen analysieren zu können. Bei Patienten, die eine hohe Aufnahme des ¹³¹I-L19-SIP im Lymphomgewebe zeigten, wurde dann eine hohe Radioimmuntherapiedosis des ¹³¹I-L19-SIP appliziert und das Ansprechen der Lymphomgewebe auf diese Therapie mittels CT und FDG-PET-CT verfolgt. Dabei machte man sich zunutze, dass die Non-Hodgkin-Lymphome und das Hodgkin-Lymphom im Gegensatz zu den meisten soliden Karzinomen eine wesentlich höhere Strahlensensibilität aufweisen, was ein besseres Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie vermuten lässt. Bei einigen Patienten mit Hodgkin-Lymphom fand sich eine selektive Anreicherung in den infiltrierten Geweben mit messbaren Dosen von 14 bis 22 Gy sowie teilweise ein therapeutischer Effekt in Form einer partiellen Remission.^{126, 127}

Radioaktiv markierte ED-B FN-Antikörper besitzen möglicherweise auch einen diagnostischen Stellenwert. In der Immunszintigrafie konnte nach der Gabe von ¹²³Jod-

4 Diskussion

konjugierten scFv L19 (^{123}I -L19(scFv)₂) im Patienten mit soliden Tumorerkrankungen (kolorektales Karzinom, Bronchialkarzinom, Hirntumor, oropharyngeales Plattenepithelkarzinom) eine tumorspezifische Akkumulation im Primärtumor und in seinen Metastasen, u. a. in den Lymphknoten, dargestellt werden.^{91, 92} Auch bei Lymphomen konnte eine selektive Aufnahme des ^{131}I -L19SIP im Lymphomgewebe gezeigt werden¹²⁶, was möglicherweise für die Tumordiagnostik ergänzend genutzt werden könnte.

Weiterhin bekräftigen diese Beobachtungen, dass bei Menschen mit einer bösartigen Erkrankung durch Gabe des konjugierten Antikörpers das ED-B FN-positive Tumorgewebe und insbesondere die Tumolvaskularisation selektiv erreicht werden kann.

So bietet der Angiogenesemarker ED-B FN aufgrund seiner Assoziation an neugebildete Blutgefäße des Tumors eine erfolgversprechende Zielstruktur zur Entwicklung neuer Antikörper-basierter Medikamente gegen solide Tumore (z. B. bei klarzelligem Nierenzellkarzinom, Pankreaskarzinom) und, wie in dieser Arbeit erstmalig gezeigt, auch gegen eine Vielzahl von Lymphomen.¹²⁸ Somit trägt diese Studie zur Grundlage für die klinische Testung von ED-B FN-targetierten, radioaktiv-markierten Antikörpern oder Antikörper-konjugierten Medikamenten bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien und Lymphomen bei. Ein solcher Therapieansatz erscheint besonders vielversprechend bei Lymphomentitäten mit einer konstant höheren Anzahl an ED-B FN-positiven Blutgefäßen und hoher Strahlensensibilität. Dabei sind vor allem die hochmalignen B-NHL, wie z. B. das DLCBL, mit der Ausnahme der plasmoblastischen und T-Zell-reichen Variante, und das FL 3 a/b, aber auch das Hodgkin-Lymphom zu nennen.

Die bis dahin offenen, einzeln gestellten Fragen konnten im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden:

1. ED-B FN, ein Marker der Angiogenese, ist in Tumorbiopsaten von Patienten mit lymphatischen und haematologischen Neoplasien in unterschiedlichem Ausmaß an neugebildeten Blutgefäßen vorhanden.

4 Diskussion

2. Im normalen Lymphknoten und Knochenmark wurde ED-B FN weder an Blutgefäßen noch anderswo nachgewiesen. In entzündlich veränderten lymphatischen Geweben ist ED-B FN gelegentlich nachweisbar. Dort ist der Umfang an ED-B FN-positiven Blutgefäßen aber sehr inhomogen.

3. Durch die Entwicklung einer deutlich modifizierten Vorbehandlung der in Paraffin eingebetteten Biopsate war ED-B FN an neugebildeten Blutgefäßen in einer Vielzahl von Proben, u. a. auch von entkalkten Knochenmarksbiopsien, zuverlässig nachzuweisen. Dabei zeigte sich meist eine höhere Rate an ED-B FN-positiven Blutgefäßen in lymphatischen und haematologischen Neoplasien als im normalen oder reaktiv-entzündlich veränderten lymphatischen und haematopoetischen Gewebe.

4. In fast allen Lymphomen und myeloproliferativen Erkrankungen ist ED-B FN an den neugebildeten Blutgefäßen vorhanden. In hochmalignen B-NHL ist hoch signifikant ein größeres Ausmaß an ED-B FN-positiven Blutgefäßen nachweisbar als bei den niedrigmalignen Lymphomen ($p = 0,008$). Die myeloproliferativen Erkrankungen weisen signifikant weniger Blutgefäße mit einer ED-B FN Expression auf als Lymphome ($p < 0,001$).

5 Zusammenfassung

Die Standardtherapien gegen metastasierte oder fortgeschrittene bösartige Erkrankungen, wie Radio- und insbesondere Chemotherapie, sind meist nicht tumorspezifisch, weisen eine hohe Toxizität auf und führen typischerweise nicht zu einer verbesserten Heilungsrate. Neuere tumorselektive Strategien richten sich daher gegen Tumorzell-assoziierte Antigene und Signaltransduktionswege von Tumoren. Als Erfolgsbeispiele sind der CD20-Antikörper Rituximab, der HER-2-Rezeptorantikörper Trastuzumab sowie der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib zu nennen. Aufgrund der großen Heterogenität dieser bösartigen Erkrankungen sind die Indikationen dieser Medikamente jedoch auf einzelne Tumorentitäten beschränkt. Um eine Struktur zu finden, die sowohl tumorselektiv als auch in einer Vielzahl von bösartigen Erkrankungen vorhanden ist, richtet sich die Suche auf das umgebende Tumorstroma und die Tumervaskularisation. Biochemische und molekulare Marker der Angiogenese, wie z. B. VEGF/VEGFR, Integrin $\alpha_3\beta_v$ und ED-B FN, können als Zielstrukturen für eine selektive Anti-Tumorthherapie eingesetzt werden. Der VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®) und die Tyrosinkinase-Inhibitoren Sorafenib (Nexxavar®) und Sunitinib (Sutent®), die in VEGF Signaltransduktionswege eingreifen, dienen als Beispiele.

Die Extra Domain B des Fibronectin (ED-B FN) ist im gesunden, erwachsenen Menschen bis auf wenige Ausnahmen nicht vorhanden. ED-B FN wurde aber in einer Vielzahl von soliden Tumoren an neugebildeten Blutgefäßen sowie teilweise auch im Tumorstroma nachgewiesen, und die tumorselektive Anlagerung von Anti-ED-B FN-Reagenzien (z. B. ^{123}I -L19(scFv)₂, ^{131}I -L19-SIP) konnte in tumortragenden Tieren und in Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumorerkrankungen gezeigt werden. Jedoch war bisher wenig über die ED-B FN-Expression an neugebildeten Blutgefäßen von lymphatischen und haematopoetischen Neoplasien bekannt. So wurden in dieser Arbeit erstmalig lymphatische und haematopoetische bösartige Erkrankungen sowie nicht-neoplastisch veränderte lymphatische und haematopoetische Gewebe systematisch mittels Immunhistologie auf das Vorhandensein von ED-B FN-positiven Blutgefäßen untersucht. Damit eine große Anzahl von Biopsien einschließlich Knochenmarkbiopsien untersucht werden konnte, wurde für den ED-B FN-Nachweis im Paraffin-eingebetteten

Gewebe eine modifizierte Epitopfreilegungsmethode entwickelt. In einem Konkurrenzexperiment mit einem Überschuss an löslichem ED-B FN konnte bewiesen werden, dass die ED-B FN-Bindung auch nach Antigenwiederherstellung im Paraffinschnitt spezifisch und inhibierbar ist. In über 200 in Paraffin eingebetteten Proben von B-NHL, T-NHL, Hodgkin-Lymphomen und myeloproliferativen Neoplasien war ED-B FN an neugebildeten Blutgefäßen in unterschiedlichem Umfang vorhanden. In normalen Lymphknoten und im Knochenmark konnte hingegen kein ED-B FN nachgewiesen werden. ED-B FN wird in Umbau- und Proliferationsvorgängen im Rahmen der Angiogenese induziert, wie u. a. auch bei Entzündungen. Entsprechend konnten ED-B FN-positive Blutgefäße in krankhaft oder entzündlich veränderten Geweben, wie Lymphknoten, Tonsillen und Appendix, gefunden werden.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass der Angiogenesemarker ED-B FN aufgrund seiner selektiven Assoziation an neugebildete Blutgefäße im Lymphomgewebe und in Geweben, die von haematopoetischen Neoplasien infiltriert sind, als Zielstruktur zur Medikamentenentwicklung gegen haematologische Neoplasien gut geeignet ist. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde eine kleine Serie von ausbehandelten Lymphompatienten mit dem ED-B FN-bindenden Medikament ¹³¹I-L19SIP im Rahmen einer klinischen Studie behandelt. Bei einigen Patienten mit Hodgkin-Lymphom konnte selektiv im Lymphomgewebe eine therapeutisch wirksame Strahlendosis von 14-22 Gy erreicht werden, die zu einer partiellen Remission führte.^{93,}
¹²⁶ Somit wurde mit dieser Arbeit eine Grundlage für zukünftige klinische Testungen von ED-B FN-zielgerichteten radioaktiv-markierten oder Antikörper-konjugierten Medikamenten bei Patienten mit fortgeschrittenen Lymphomen oder haematologischen Neoplasien gelegt. Aufgrund der großen Anzahl ED-B FN-positiver Blutgefäße erscheinen solche Therapien besonders aussichtsreich bei hochmalignen B-NHL wie den meisten Varianten des DLBCL, dem FL 3 a/b und dem Hodgkin-Lymphom.

Literaturverzeichnis

- ¹ Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn,
www.gbe-bund.de/glossar/Todesursachenstatistik.html
- ² Coiffier B.; Standard treatment of advanced-stage diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol.* 2006 Oct;43(4):213-20. Review.
- ³ Coiffier B, Lepage E, Briere J et al., CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002 Jan 24;346(4):235-42.
- ⁴ Smith I, Procter M, Gelber RD et al., 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007 Jan 6;369(9555):29-36.
- ⁵ Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ et al., *K-ras* Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer *N Engl J Med.* 2008 Oct 23;359(17):1757-65.
- ⁶ Köhne CH, Lenz HJ. Chemotherapy with targeted agents for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Oncologist.* 2009 May;14(5):478-88. Epub 2009 May 1.
- ⁷ Lüttgau S.M., Humanisierung von Maus-Hybridomantikörpern, INAUGURAL-DISSERTATION, 2004
- ⁸ Andreas Schmiedl und Stefan Dübel, Rekombinante Antikörper & Phagen-Display, aus „Molekulare Biotechnologie“, Wiley-VCH (2004) Hrsg.: M. Wink
- ⁹ Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG et al., Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2006 Dec 7;355(23):2408-17.
- ¹⁰ Coutre P, Ottmann OG, Giles F et al., Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is active in patients with imatinib-resistant or -intolerant accelerated-phase chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 2008 Feb 15;111(4):1834-9. Epub 2007 Nov 29.
- ¹¹ Hochhaus A, Kantarjian HM, Baccarani M et al., Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood.* 2007 Mar 15;109(6):2303-9. Epub 2006 Nov 30.

- ¹² Cortes J, Rousselot P, Kim DW et al., Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood*. 2007 Apr 15;109(8):3207-13. Epub 2006 Dec 21.
- ¹³ Guilhot F, Apperley J, Kim DW et al., Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4143-50. Epub 2007 Jan 30.
- ¹⁴ Pennell NA, Lynch TJ Jr. Combined inhibition of the VEGFR and EGFR signaling pathways in the treatment of NSCLC. *Oncologist*. 2009 Apr;14(4):399-411. Epub 2009 Apr 8.
- ¹⁵ Rosell R, Perez-Roca L, Sanchez JJ et al., Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on EGFR mutations and BRCA1 mRNA expression. *PLoS One*. 2009;4(5):e5133. Epub 2009 May 5.
- ¹⁶ Joensuu H, Dematteo RP. The Management of Gastrointestinal Stromal Tumors: A Model for Targeted and Multidisciplinary Therapy of Malignancy. *Annu Rev Med*. 2011 Jan 26. [Epub ahead of print]
- ¹⁷ Blay JY. Pharmacological management of gastrointestinal stromal tumours: an update on the role of sunitinib. *Ann Oncol*. 2010 Feb;21(2):208-15. Epub 2009 Aug 12.
- ¹⁸ Chometon G, Jendrossek V. Targeting the tumour stroma to increase efficacy of chemo- and radiotherapy. *Clin Transl Oncol*. 2009 Feb;11(2):75-81.
- ¹⁹ Cohen MM Jr. Vascular update: morphogenesis, tumors, malformations, and molecular dimensions. *Am J Med Genet A*. 2006 Oct 1;140(19):2013-38. Review.
- ²⁰ Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997 Apr 17;386(6626):671-4.
- ²¹ Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):249-57. Review.
- ²² Bussolati B, Deambrosis I, Russo S et al., Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells. *FASEB J*. 2003 Jun;17(9):1159-61. Epub 2003 Apr 22.
- ²³ Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992 Jun 5;267(16):10931-4. Review.

- ²⁴ Halin C, Zardi L, Neri D. Antibody-based targeting of angiogenesis. *News Physiol Sci*. 2001 Aug;16:191-4. Review.
- ²⁵ Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995 Jan;1(1):27-31. Review.
- ²⁶ Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*. 2002 Dec;29(6 Suppl 16):15-8. Review.
- ²⁷ Folkman J, Kalluri R. Cancer without disease. *Nature*. 2004 Feb 26;427(6977):787.
- ²⁸ Eatock MM, Schätzlein A, Kaye SB. Tumour vasculature as a target for anticancer therapy. *Cancer Treat Rev*. 2000 Jun;26(3):191-204. Review.
- ²⁹ Alessi P, Ebbinghaus C, Neri D. Molecular targeting of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 4;1654(1):39-49. Review.
- ³⁰ Herbst RS. Therapeutic options to target angiogenesis in human malignancies. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2006 Nov;11(4):635-50. Review.
- ³¹ Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P et al., Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 1994 Mar;12(3):454-66.
- ³² Molica S, Vacca A, Ribatti D et al., Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Nov 1;100(9):3344-51.
- ³³ Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T et al., Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000 Sep 15;96(6):2240-5.
- ³⁴ Lundberg LG, Lerner R, Sundelin P et al., Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. *Am J Pathol*. 2000 Jul;157(1):15-9. Erratum in: *Am J Pathol* 2000 Aug;157(2):690.
- ³⁵ Hazar B, Paydas S, Zorludemir S et al., Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2003 Dec;44(12):2089-93.
- ³⁶ Tzankov A, Heiss S, Ebner S et al., Angiogenesis in nodal B cell lymphomas: a high throughput study. *J Clin Pathol*. 2007 May;60(5):476-82. Epub 2006 Jun 21.

- ³⁷ Vacca A, Ribatti D, Ruco L et al., Angiogenesis extent and macrophage density increase simultaneously with pathological progression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer*. 1999 Feb;79(5-6):965-70.
- ³⁸ Jørgensen JM, Sørensen FB, Bendix K et al., Angiogenesis in non-Hodgkin's lymphoma: clinico-pathological correlations and prognostic significance in specific subtypes. *Leuk Lymphoma*. 2007 Mar;48(3):584-95
- ³⁹ Vacca A, Ribatti D, Roncali L et al., Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1994 Jul;87(3):503-8.
- ⁴⁰ Koster A, Raemaekers JM. Angiogenesis in malignant lymphoma. *Curr Opin Oncol*. 2005 Nov;17(6):611-6. Review.
- ⁴¹ Eberhard A, Kahlert S, Goede V et al., Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res*. 2000 Mar 1;60(5):1388-93. Erratum in: *Cancer Res* 2000 Jul 1;60(13):3668.
- ⁴² Kornblihtt AR, Umezawa K, Vibe-Pedersen K et al., Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J*. 1985 Jul;4(7):1755-9.
- ⁴³ George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS et al., Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*. 1993 Dec;119(4):1079-91.
- ⁴⁴ Schwarzbauer JE. Alternative splicing of fibronectin: three variants, three functions. *Bioessays*. 1991 Oct;13(10):527-33. Review.
- ⁴⁵ Matsuura H, Hakomori S. The oncofetal domain of fibronectin defined by monoclonal antibody FDC-6: its presence in fibronectins from fetal and tumor tissues and its absence in those from normal adult tissues and plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Oct;82(19):6517-21.
- ⁴⁶ Matsuura H, Takio K, Titani K et al., The oncofetal structure of human fibronectin defined by monoclonal antibody FDC-6. Unique structural requirement for the antigenic specificity provided by a glycosylhexapeptide. *J Biol Chem*. 1988 Mar 5;263(7):3314-22.

- ⁴⁷ Zardi L, Carnemolla B, Siri A et al., Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon. *EMBO J.* 1987 Aug;6(8):2337-42.
- ⁴⁸ Fattorusso R, Pellicchia M, Viti F et al., NMR structure of the human oncofoetal fibronectin ED-B domain, a specific marker for angiogenesis. *Structure.* 1999 Apr 15;7(4):381-90.
- ⁴⁹ Fukuda T, Yoshida N, Kataoka Y et al., Mice lacking the EDB segment of fibronectin develop normally but exhibit reduced cell growth and fibronectin matrix assembly in vitro. *Cancer Res.* 2002 Oct 1;62(19):5603-10.
- ⁵⁰ Ebbinghaus C, Scheuermann J, Neri D et al., Diagnostic and therapeutic applications of recombinant antibodies: targeting the extra-domain B of fibronectin, a marker of tumor angiogenesis. *Curr Pharm Des.* 2004;10(13):1537-49. Review.
- ⁵¹ Menrad A, Menssen HD. ED-B fibronectin as a target for antibody-based cancer treatments. *Expert Opin Ther Targets.* 2005 Jun;9(3):491-500.
- ⁵² Khan ZA, Chan BM, Uniyal S et al., EDB fibronectin and angiogenesis -- a novel mechanistic pathway. *Angiogenesis.* 2005;8(3):183-96. Epub 2005 Nov 25.
- ⁵³ Serini G, Valdembri D, Bussolino F. Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Exp Cell Res.* 2006 Mar 10;312(5):651-8. Epub 2005 Dec 2.
- ⁵⁴ Carnemolla B, Balza E, Siri A et al., A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. *J Cell Biol.* 1989 Mar;108(3):1139-48.
- ⁵⁵ Lohi J, Tani T, Laitinen L et al., Tenascin and fibronectin isoforms in human renal cell carcinomas, renal cell carcinoma cell lines and xenografts in nude mice. *Int J Cancer.* 1995 Nov 3;63(3):442-9.
- ⁵⁶ Castellani P, Viale G, Dorcaratto A et al., The fibronectin isoform containing the ED-B oncofoetal domain: a marker of angiogenesis. *Int J Cancer.* 1994 Dec 1;59(5):612-8. Erratum in: *Int J Cancer* 1995 Jul 4;62(1):118.
- ⁵⁷ Van Vliet A, Baelde HJ, Vleming LJ et al., Distribution of fibronectin isoforms in human renal disease. *J Pathol.* 2001 Feb;193(2):256-62.

- ⁵⁸ Matter CM, Schuler PK, Alessi P et al., Molecular imaging of atherosclerotic plaques using a human antibody against the extra-domain B of fibronectin. *Circ Res.* 2004 Dec 10;95(12):1225-33. Epub 2004 Nov 11
- ⁵⁹ Thore Dietrich, Christin Perlitz, Kai Licha et al., ED-B fibronectin (ED-B) can be targeted using a novel single chain antibody conjugate and is associated with macrophage accumulation in atherosclerotic lesions *Basic Res Cardiol* 102:298–307 (2007)
- ⁶⁰ Kriegsmann J, Berndt A, Hansen T et al., Expression of fibronectin splice variants and oncofetal glycosylated fibronectin in the synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatol Int.* 2004 Jan;24(1):25-33. Epub 2003 Apr 24.
- ⁶¹ Brenmoehl J, Lang M, Hausmann M et al., Evidence for a differential expression of fibronectin splice forms ED-A and ED-B in Crohn's disease (CD) mucosa. *Int J Colorectal Dis.* 2007 Jun;22(6):611-23. Epub 2006 Nov 30.
- ⁶² Nicolò M, Birò A, Cardillo-Piccolino F et al., Expression of extradomain-B-containing fibronectin in subretinal choroidal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol.* 2003 Jan;135(1):7-13.
- ⁶³ Manfred Birchler, Francesca Viti, Luciano Zardi et al., Selective targeting and photocoagulation of ocular angiogenesis mediated by a phage-derived human antibody fragment *NATURE BIOTECHNOLOGY VOL 17 OCTOBER 1999*
- ⁶⁴ Ffrench-Constant C, Van de Water L, Dvorak HF et al., Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J Cell Biol.* 1989 Aug;109(2):903-14.
- ⁶⁵ Jaffe ES, Harris NL, Stein H et al., Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood.* 2008 Dec 1;112(12):4384-99.
- ⁶⁶ Fauci, Anthony S.; Kasper, Dennis; Longo, Dan L. et al.; *Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition*
- ⁶⁷ Ronald Hoffman, Edward Benz, Sanford Shattil et al., *Hematology: Basic Principles And Practice Edition 2005*
- ⁶⁸ American Cancer Society, www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/cancer-facts-and-figures-2010

- ⁶⁹ Gratzinger D, Zhao S, Marinelli RJ et al., Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Am J Pathol.* 2007 Apr;170(4):1362-9.
- ⁷⁰ Farinha P, Kyle AH, Minchinton AI et al., Vascularization predicts overall survival and risk of transformation in follicular lymphoma. *Haematologica.* 2010 Dec;95(12):2157-60. Epub 2010 Aug 16.
- ⁷¹ Chen H, Treweeke AT, West DC et al., In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2000 Nov 1;96(9):3181-7
- ⁷² Letilovic T, Vrhovac R, Verstovsek S et al., Role of angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2006 Sep 1;107(5):925-34.
- ⁷³ Kalmanti L, Dampaki K, Dimitriou H et al., A morphometric approach for the evaluation of angiogenesis in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Leuk Res.* 2005 Jun;29(6):673-7. Epub 2005 Mar 2.
- ⁷⁴ Pulè MA, Gullmann C, Dennis D et al., Increased angiogenesis in bone marrow of children with acute lymphoblastic leukaemia has no prognostic significance. *Br J Haematol.* 2002 Sep;118(4):991-8.
- ⁷⁵ Zhang W, Wang L, Zhou D et al., Expression of tumor-associated macrophages and vascular endothelial growth factor correlates with poor prognosis of peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified. *Leuk Lymphoma.* 2010 Nov 15. [Epub ahead of print]
- ⁷⁶ Borsi L, Balza E, Bestagno M et al., Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin. *Int J Cancer.* 2002 Nov 1;102(1):75-85.
- ⁷⁷ Morgan JM, Navabi H, Schmid KW et al., Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate-mediated high-temperature antigen retrieval. *J Pathol.* 1994 Dec;174(4):301-7
- ⁷⁸ Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C et al., Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol.* 1997 Sep;183(1):116-23.

- ⁷⁹ Battifora H, Kopinski M. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *J Histochem Cytochem.* 1986 Aug;34(8):1095-100.
- ⁸⁰ Cordell JL, Falini B, Erber WN et al., Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem.* 1984 Feb;32(2):219-29.
- ⁸¹ Carnemolla B, Leprini A, Allemanni G et al., The inclusion of the type III repeat ED-B in the fibronectin molecule generates conformational modifications that unmask a cryptic sequence. *J Biol Chem.* 1992 Dec 5;267(34):24689-92.
- ⁸² Viti F, Tarli L, Giovannoni L et al., Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis. *Cancer Res.* 1999 Jan 15;59(2):347-52.
- ⁸³ Pini A, Viti F, Santucci A et al, Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem.* 1998 Aug 21;273(34):21769-76.
- ⁸⁴ Carnemolla B, Borsi L, Balza E et al., Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood.* 2002 Mar 1;99(5):1659-65.
- ⁸⁵ Tarli L, Balza E, Viti F et al., A high-affinity human antibody that targets tumoral blood vessels. *Blood.* 1999 Jul 1;94(1):192-8.
- ⁸⁶ Osterborg, A. Ofatumumab, a human anti-CD20 monoclonal antibody. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2010;10(2);1-11
- ⁸⁷ Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV, Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):443-6.
- ⁸⁸ Ranieri G, Patruno R, Ruggieri E et al., Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic. *Curr Med Chem.* 2006;13(16):1845-57.
- ⁸⁹ Bosslet K, Keweloh HC, Hermentin P et al., Percolation and binding of MAB BW 494 to pancreatic carcinoma tissues during high dose immunotherapy and consequences for future therapy modalities. *Behring Inst Mitt.* 1990 Dec;(87):68-75.

- ⁹⁰ Schliemann C, Roesli C, Kamada H et al., In vivo biotinylation of the vasculature in B-cell lymphoma identifies BST-2 as a target for antibody-based therapy. *Blood*. 2010 Jan 21;115(3):736-44. Epub 2009 Nov 10.
- ⁹¹ Santimaria M, Moscatelli G, Viale GL et al., Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. *Clin Cancer Res*. 2003 Feb;9(2):571-9.
- ⁹² Manfred T. Birchler, MD, Christina Thuerl, MD , Daniel Schmid, MD et al., Immunoscintigraphy of patients with head and neck carcinomas, with an anti-angiogenetic antibody fragment *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* (2007) 136, 543-548
- ⁹³ Stefanie Sauer, Andreas Menrad, Horst Dürkop et al. Expression of ED-B fibronectin in human malignant lymphoma, Poster presented at the 97th AACR Annual Meeting, April 1-5, 2006, Washington, USA
- ⁹⁴ Khan ZA, Caurtero J, Barbin YP et al., ED-B fibronectin in non-small cell lung carcinoma. *Exp Lung Res*. 2005 Sep;31(7):701-11.
- ⁹⁵ Scarpino S, Stoppacciaro A, Pellegrini C et al., Expression of EDA/EDB isoforms of fibronectin in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol*. 1999 Jun;188(2):163-7.
- ⁹⁶ Pujuguet P, Hammann A, Moutet M et al., Expression of fibronectin ED-A+ and ED-B+ isoforms by human and experimental colorectal cancer. Contribution of cancer cells and tumor-associated myofibroblasts. *Am J Pathol*. 1996 Feb;148(2):579-92.
- ⁹⁷ Kaczmarek J, Castellani P, Nicolo G et al., Distribution of oncofetal fibronectin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J Cancer*. 1994 Oct 1;59(1):11-6
- ⁹⁸ Kosmehl H, Berndt A, Strassburger S et al., Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 1999 Nov;81(6):1071-9.
- ⁹⁹ Hauptmann S, Zardi L, Siri A et al., Extracellular matrix proteins in colorectal carcinomas. Expression of tenascin and fibronectin isoforms. *Lab Invest*. 1995 Aug;73(2):172-82

- ¹⁰⁰ Schliemann C, Palumbo A, Zuberbühler K et al., Complete eradication of human B-cell lymphoma xenografts using rituximab in combination with the immunocytokine L19-IL2. *Blood*. 2009 Mar 5;113(10):2275-83. Epub 2008 Nov 12.
- ¹⁰¹ Eigentler TK, Weide B, de Braud F et al., A Dose-Escalation and Signal-Generating Study of the Immunocytokine L19-IL2 in Combination with Dacarbazine for the Therapy of Patients with Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011 Dec 15;17(24):7732-42. Epub 2011 Oct 25.
- ¹⁰² Johannsen M, Spitaleri G, Curigliano G et al., The tumour-targeting human L19-IL2 immunocytokine: preclinical safety studies, phase I clinical trial in patients with solid tumours and expansion into patients with advanced renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2010 Nov;46(16):2926-35. Epub 2010 Aug 24.
- ¹⁰³ Wagner K, Schulz P, Scholz A et al., The targeted immunocytokine L19-IL2 efficiently inhibits the growth of orthotopic pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Aug 1;14(15):4951-60.
- ¹⁰⁴ Brouty-Boyé D, Doucet C, Clay D et al., Phenotypic diversity in human fibroblasts from myelometaplastic and non-myelometaplastic hematopoietic tissues. *Int J Cancer*. 1998 May 29;76(5):767-73.
- ¹⁰⁵ Midulla M, Verma R, Pignatelli M et al., Source of oncofetal ED-B-containing fibronectin: implications of production by both tumor and endothelial cells. *Cancer Res*. 2000 Jan 1;60(1):164-9.
- ¹⁰⁶ Castellani P, Dorcaratto A, Pau A et al., The angiogenesis marker ED-B+ fibronectin isoform in intracranial meningiomas. *Acta Neurochir* 2000;142:277-82.
- ¹⁰⁷ Vogel W, Berndt A, Müller A et al., Differential in vivo and in vitro expression of ED-B+ fibronectin in adult human hematopoiesis. *Int J Mol Med*. 2003 Dec;12(6):831-7.
- ¹⁰⁸ Wagner C, Bürger A, Radsak M et al., Fibronectin synthesis by activated T lymphocytes: up-regulation of a surface-associated isoform with signalling function. *Immunology*. 2000 Apr;99(4):532-9.
- ¹⁰⁹ Blum S, Hug F, Hänsch GM et al., Fibronectin on activated T lymphocytes is bound to gangliosides and is present in detergent insoluble microdomains. *Immunol Cell Biol*. 2005 Apr;83(2):167-74.

- ¹¹⁰ Hertel K., Verteilungsmuster von Fibronectin, Tenascin-C und Laminin sowie deren Isoformen in reaktiven Lymphknoten und folliculären Lymphomen, Dissertation veröffentlicht am 01.03.2005
- ¹¹¹ Kilian O, Dahse R, Alt V et al., Expression of EDA+ and EDB+ fibronectin splice variants in bone. *Bone*. 2004 Dec;35(6):1334-45.
- ¹¹² Trachsel E, Kaspar M, Bootz F et al., human mAb specific to oncofetal fibronectin selectively targets chronic skin inflammation in vivo. *J Invest Dermatol*. 2007 Apr;127(4):881-6. Epub 2006 Dec 21.
- ¹¹³ Stasi R. Gemtuzumab ozogamicin: an anti-CD33 immunoconjugate for the treatment of acute myeloid leukaemia. *Expert Opin Biol Ther*. 2008 Apr;8(4):527-40.
- ¹¹⁴ Katz J, Janik JE, Younes A. Brentuximab Vedotin (SGN-35). *Clin Cancer Res*. 2011 Oct 15;17(20):6428-36.
- ¹¹⁵ Müller V, Witzel I, Stickeler E. Immunological Approaches in the Treatment of Metastasized Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*. 2009;4(6):359-366. Epub 2009 Dec 16.
- ¹¹⁶ Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F et al., Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2002 May 15;20(10):2453-63.
- ¹¹⁷ Illidge T, Morschhauser F. Radioimmunotherapy in follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011 Jun;24(2):279-93. Epub 2011 May 12.
- ¹¹⁸ Borsi L, Balza E, Carnemolla B et al., Selective targeted delivery of TNFalpha to tumor blood vessels. *Blood*. 2003 Dec 15;102(13):4384-92. Epub 2003 Aug 21.
- ¹¹⁹ Mortara L, Balza E, Sassi F et al., Therapy-induced antitumor vaccination by targeting tumor necrosis factor alpha to tumor vessels in combination with melphalan. *Eur J Immunol*. 2007 Dec;37(12):3381-92.
- ¹²⁰ Halin C, Gafner V, Villani ME et al., Synergistic therapeutic effects of a tumor targeting antibody fragment, fused to interleukin 12 and to tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res*. 2003 Jun 15;63(12):3202-10.
- ¹²¹ Balza E, Mortara L, Sassi F et al., Targeted delivery of tumor necrosis factor-alpha to tumor vessels induces a therapeutic T cell-mediated immune response that protects the

host against syngeneic tumors of different histologic origin. *Clin Cancer Res.* 2006 Apr 15;12(8):2575-82.

¹²² Lo KM, Lan Y, Lauder S et al., huBC1-IL12, an immunocytokine which targets EDB-containing oncofetal fibronectin in tumors and tumor vasculature, shows potent anti-tumor activity in human tumor models. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Apr;56(4):447-57. Epub 2006 Jul 28.

¹²³ Berndorff D, Borkowski S, Sieger S et al., Radioimmunotherapy of solid tumors by targeting extra domain B fibronectin: identification of the best-suited radioimmunoconjugate. *Clin Cancer Res.* 2005 Oct 1;11(19 Pt 2):7053s-7063s.

¹²⁴ Tijink BM, Neri D, Leemans CR et al., Radioimmunotherapy of head and neck cancer xenografts using ¹³¹I-labeled antibody L19-SIP for selective targeting of tumor vasculature. *J Nucl Med.* 2006 Jul;47(7):1127-35.

¹²⁵ G. Del Conte, D. Tosi, A. Fasolo et al., A phase I trial of antifibronectin ¹³¹I-L19-small immunoprotein (L19-SIP) in solid tumors and lymphoproliferative disease *Journal of Clinical Oncology*, 2008 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 26, No 15S (May 20 Supplement), 2008: 2575

¹²⁶ Sauer S, Erba PA, Petrini M et al. Expression of the oncofetal ED-B-containing fibronectin isoform in hematologic tumors enables ED-B-targeted ¹³¹I-L19SIP radioimmunotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *BLOOD.* 2009;113:2265-74

¹²⁷ Erba PA, Sollini M, Orciuolo E, et al. Radioimmunotherapy with radretumab (¹³¹I-L19SIP) in patients with relapsed Hodgkin lymphoma and other lymphoproliferative malignancies. *Journal of Nuclear Medicine.* 2012;in press.

¹²⁸ Fowler N, Younes A. There will be blood: targeting tumor vasculature. *Blood.* 2009 Mar 5;113(10):2121-2.

Abkürzungsverzeichnis

ADC	„antibody-drug-conjugates“
AML	akute myeloische Leukämie
ALCL	anaplastisch großzelliges T-Zell-Lymphom
B-ALL	akute lymphoblastische B-Zell Leukämie/Lymphom
B-NHL	B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom
ca.	circa
cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
ECM	extrazelluläre Matrix
ED-A FN	Extra-Domäne A des Fibronectins
ED-B FN	Extra-Domäne B des Fibronectins
EGFR	epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor
ET	essentielle Thrombozythämie
FL	follikuläres Lymphom
FL 1/2	follikuläres Lymphom Grad 1/2
FL 3a	follikuläres Lymphom Grad 3a
FL 3b	follikuläres Lymphom Grad 3b
FN	Fibronectin
LPHL	lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom
cHL-LR	lymphozytenreiches klassisches Hodgkin-Lymphom
cHL-MC	klassisches Hodgkin-Lymphom vom Mischtyp
cHL-NS	nodulär-sklerosierendes klassisches Hodgkin-Lymphom
LPL	lymphoplasmozytisches Lymphom
mAk	muriner monoklonaler Antikörper
PM	Plasmazellmyelom
MNTZL	Mantelzell-Lymphom
MVD	micro vessel density

MGL	Marginalzonen-B-Zell-Lymphom
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PALS	periarteriellen lymphatischen Scheiden
pM	primäre Myelofibrose
PV	Polyzythaemia vera
sog.	sogenannt
T-ALL	akute lymphoblastische T-Zell-Leukämie
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
T-NHL	T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom
T-NHL/NOS	peripheres T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom, nicht weiter spezifiziert (not other specified)
u. a.	unter anderem
VEGF	vaskularer endothelialer Wachstumsfaktor
z. B.	zum Beispiel
Z. n.	Zustand nach

Erklärung

„Ich, Stefanie Sauer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Die Expression von ED-B Fibronectin, ein Marker der Angiogenese an Blutgefäßen von normalen und veränderten lymphatischen und haematopoetischen Geweben selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum, Unterschrift

Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1. Sauer S, Erba PA, Petrini M et al. Expression of the oncofetal ED-B-containing fibronectin isoform in hematologic tumors enables ED-B-targeted 131I-L19SIP radioimmunotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *Blood*. 2009 Mar 5;113(10):2265-74. Epub 2009 Jan 8.
2. Stefanie Sauer, Andreas Menrad, Horst Dürkop et al. Expression of ED-B fibronectin in human malignant lymphoma, Poster presented at the 97th AACR Annual Meeting, April 1-5, 2006, Washington, USA

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich in der Zeit meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Einen besonderen Dank möchte ich meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. med. H.D. Menssen aussprechen, der mich über die Jahre mit seiner Unterstützung, Beratung und Motivation begleitete. Speziell danke ich ihm auch für die Möglichkeit, auf dem ACCR-Kongress in Washington das Poster zu dieser Arbeit zu präsentieren.

An Herrn Prof. Dr. med. H. Dürkop richte ich einen herzlichen Dank für seinen unermüdlichen Einsatz und die zahllosen Stunden, die er dieser Arbeit gewidmet hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn B. Hirsch und dem Team der MTA`s, insbesondere Conny Ciluch und Heidrun Protz, bedanken, die mir mit ihrer Unterstützung wichtige praktische Hilfestellung gaben.

Auch geht mein Dank an meine Familie, insbesondere meinen Ehemann, die mich stets bestärkt und unterstützt haben.