

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der Immunsuppression auf die Angiogenese
und Lymphangiogenese von epithelialen Hauttumoren
und deren Vorstufen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Isabelle Schmitter

aus Siegen

Datum der Promotion: 11.12.2015

"Everybody's free to wear sunscreen..."

Mary Schmich

Meinen Eltern und Calle

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
Zusammenfassung.....	6
1 Einleitung.....	8
1.1 Epitheliale Hauttumoren und deren Vorstufen	8
1.2 Ätiologie und allgemeine Risikofaktoren	9
1.3 Risikofaktor Organtransplantation.....	11
1.3.1 Langzeitkomplikationen.....	12
1.3.2 Einfluss der Immunsuppression auf die Tumorgenese.....	13
1.4 Tumorgenese - Kennzeichen von Tumorzellen	17
1.4.1 Angiogenese.....	18
1.4.2 Lymphangiogenese.....	22
1.4.3 Messmethoden der Angiogenese und Lymphangiogenese.....	22
1.4.4 Bedeutung der Angiogenese und Lymphangiogenese bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Haut.....	25
1.5 Zielsetzung	26
2 Material und Methode.....	27
2.1 Patientenkollektiv und Herkunft des Gewebes	27
2.1.1 Histologische Klassifikation	27
2.1.2 Gewebegewinnung.....	27
2.1.3 Datenerfassung.....	29
2.2 Immunhistochemische Färbung	29
2.2.1 Vorbereitung der Proben	29
2.2.2 LSAB-2-HRP-Methode	31
2.3 Auswertung.....	33
2.3.1 Computergestützte morphometrische Bildanalyse der Gefäße	33
2.3.2 Statistik und Datenverarbeitung.....	40
2.4 Übersicht der verwendeten Materialien und Geräte	42
3 Ergebnisse.....	45
3.1 Charakteristika der eingeschlossenen Patienten und deren Tumoren	45
3.2 Statistische Auswertung der morphometrischen Gefäßanalyse.....	47
3.2.1 Vaskuläre Parameter der epithelialen Hauttumoren und deren Vorstufen in der CD31- Färbung.....	49

3.2.2	Lymphgefäßparameter der epithelialen Hauttumoren und deren Vorstufen in der D2-40-Färbung	53
3.2.3	Multivariate Regressionsanalyse für die MVD (CD31) und LVD (D2-40)	57
4	Diskussion	59
4.1	Computergestützte Bildanalyse zur Quantifizierung der Gefäße und deren Anwendbarkeit bei epithelialen Hauttumoren	60
4.2	Vergleich der Vaskularisierung der epithelialen Hauttumoren und deren Vorstufen	63
4.2.1	Vergleich des <i>Angiogenic switch</i> innerhalb der Gruppe der Immunsupprimierten und der Nicht-Immunsupprimierten anhand der CD31-Färbung.....	63
4.2.2	Vergleich zwischen den Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten hinsichtlich der Unterschiede in der Vaskularisierung anhand der CD31-Färbung	65
4.2.3	Einfluss der einzelnen Risikofaktoren unter Immunsuppression auf die Angiogenese der SCCs	66
4.2.4	Vergleich der Lymphvaskularisierung zwischen den Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten anhand der D2-40-Färbung	72
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick für Organtransplantierte	73
5	Literaturverzeichnis	75
6	Abbildungsverzeichnis.....	89
7	Tabellenverzeichnis	91
	Eidesstattliche Versicherung	93
	Lebenslauf.....	94
	Danksagung.....	95

Abkürzungsverzeichnis

95% CI	95%-Konfidenzintervall
AK	Aktinische Keratose
AK I	Aktinische Keratose Grad I, mild
AK II	Aktinische Keratose Grad II, moderat
AK III	Aktinische Keratose Grad III, schwer
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
BCC	<i>Basal cell carcinoma</i> , Basalzellkarzinom, Basaliom
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CsA	Cyclosporin A
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPV	Humane Papillomaviren
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
Hs	Hotspot
HTX	Herztransplantierte Patienten
ipm	IPLab Mac
ICC	Intraklassenkorrelationskoeffizient
IQR	<i>Interquartilsrange</i>
KTX	Knochenmarktransplantierte Patienten
LSAB	<i>Labeled Streptavidin-Biotin</i>
LTX	Lebertransplantierte Patienten
LVD	<i>Lymphatic vessel density</i>
LYVE-1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1</i>
MB	Morbus Bowen, <i>Bowen's disease</i>
MMF	Mykophenolatmofetil
mTor	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MVD	<i>Microvessel density</i>
NMSC	<i>Non melanoma skin cancer</i> , Nicht-melanozytärer Hautkrebs
NTX	Nierentransplantierte Patienten
OTX	Mit unbekanntem Organ transplantierte Patienten
pH	Pondus Hydrogenii

pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ROI	<i>Region of interest</i>
SCC	<i>Squamous cell carcinoma</i> , Plattenepithelkarzinom
SCC <i>in situ</i>	Plattenepithelkarzinom <i>in situ</i>
SCC invasiv	Invasives Plattenepithelkarzinom, Spinaliom, Stachelzellkarzinom
SIR	<i>Standard incidence ratio</i>
SRL	Sirolimus
TRL	Tacrolimus
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
Tie	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains</i>
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
TSP	Thrombospondin
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor</i> -Rezeptor
WHO	World Health Organization
Zeit: TX-Biopsie	Zeitspanne von der Transplantation bis zur Biopsie

Zusammenfassung

Zielsetzung: Ziel war es, Unterschiede der Angiogenese von Blut- und Lymphgefäßen von Plattenepithelkarzinomen (*squamous cell carcinoma*, SCC) der Haut und deren Vorstufen, der aktinischen Keratose (AK III) und Morbus Bowen (MB), bei Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten aufzudecken und Korrelationen zwischen Angiogenese, Immunsuppression sowie prognostisch bedeutsamen klinischen Charakteristika zu analysieren.

Methodik: Retrospektiv wurden 94 Patienten (60 Immun- vs. 34 Nicht-Immunsupprimierte) mit histologisch gesichertem SCC (*in situ* oder invasiv) untersucht. SCC *in situ* bestanden aus AK III und MB. Folgende vaskuläre Parameter wurden anhand immunhistochemisch markierter Gefäße (CD31, D2-40) mittels computergestützter Bildanalyse (Software *ivision-Mac*TM 4.5.0) gemessen: Gefäßdichte (*Microvessel density* [MVD] oder *Lymphatic vessel density* [LVD]), Gesamtfläche der Gefäße, mittlere Gefäßgröße und relative Gefäßfläche (flächenmäßiger Anteil der Gefäße im Untersuchungsareal). Abschließend erfolgte die Korrelationsuntersuchung der erhobenen Gefäßdichten (MVD und LVD) mit den klinischen Charakteristika.

Ergebnisse: Bei Immunsupprimierten kam es bezüglich der MVD zwischen AK III und invasivem SCC zu einem Anstieg um 32 % ($p = 0.003$). Bei Nicht-Immunsupprimierten war die MVD zwischen AK III und invasivem SCC um 12 % höher ($p > 0.05$). Bei den SCCs *in situ* zeigte sich bei den Immunsupprimierten im Vergleich zu den Nicht-Immunsupprimierten eine um 29 % verringerte MVD ($p < 0.0006$), eine um 32 % kleinere Gesamtfläche der Gefäße ($p < 0.0006$), eine um 29 % kleinere relative Gefäßfläche ($p = 0.001$) und eine um 9 % kleinere mittlere Gefäßgröße ($p > 0.05$). Bei den invasiven SCCs ließ sich ebenfalls eine Tendenz zu je kleineren CD31-Gefäßparametern bei Immunsupprimierten erkennen. Die AK III von Immunsupprimierten wiesen eine um 32 % kleinere MVD auf ($p = 0.001$) als die Nicht-Immunsupprimierten, während die weiteren Gefäßparameter keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. In Bezug auf sämtliche D2-40-Lymphgefäßparameter zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. In der multivariaten Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass neben der Immunsuppression ($p < 0.001$), auch das Geschlecht ($p = 0.006$) und die Tumorklasse (*in situ* vs. invasiv, $p = 0.007$) die MVD signifikant beeinflussen.

Schlussfolgerung: Die mit der Tumorgenese einhergehende Angiogenese (*Angiogenic switch*) zwischen AK III und invasivem SCC findet bei Immunsupprimierten deutlicher statt. Interessanterweise ist die MVD bei den SCCs *in situ* von Immunsupprimierten signifikant niedriger als die von Nicht-Immunsupprimierten. Zukünftige Untersuchungen sind notwendig, ob der *Angiogenic switch* bei Immunsupprimierten möglicherweise als therapeutischer Ansatz dienen könnte.

Abstract

Objective: To investigate the difference in the angiogenesis of blood and lymphatic vessels in squamous cell carcinomas (SCCs) of the skin between immunosuppressed and immunocompetent patients and to determine whether there is a potential correlation among angiogenesis, immunosuppression, and further clinical characteristics.

Methods: We retrospectively evaluated 94 patients (60 immunosuppressed vs. 34 immunocompetent) with histologically diagnosed SCCs (*in situ* or invasive). SCCs *in situ* consisted of actinic keratoses (AK III) and Bowen's diseases (MB). Angiogenesis was measured by immunohistochemical stained vessels (CD31, D2-40) for vascular parameters: microvessel density (MVD), lymphatic vessel density (LVD), total vessel area, average vessel size, and relative vascular area (relative tissue area occupied by vessels). Subsequently, microvessels were assessed by computer-assisted morphometric analysis (software iVISION-MacTM 4.5.0). Finally, we investigated the correlation of the MVD and the LVD with clinical characteristics.

Results: The MVD of immunosuppressed patients increased from AK III to invasive SCC by 32 % ($p = 0.003$). The MVD of immunocompetent patients increased from AK III to invasive SCC by 12 % ($p > 0.05$). SCCs *in situ* of immunosuppressed patients compared to those of immunocompetent patients had 29 % significantly smaller MVDs ($p < 0.0006$), 32% smaller total vessel areas ($p < 0.0006$), and 9 % smaller relative vascular areas ($p = 0.001$) but not average vessel sizes (9 % smaller; $p > 0.05$). The invasive SCCs of immunosuppressed patients tended to have lower vascular parameters (CD31) than immunocompetent patients. The MVD for AK III of immunosuppressed patients was lower at 32 % ($p = 0.001$) compared to immunocompetent patients; however, there was no further significant difference for the remaining vascular parameters. There were no significant differences in any lymphatic parameters between immunosuppressed and immunocompetent patients. In a multivariate regression analysis, immunosuppression ($p < 0.001$), sex ($p = 0.006$), and tumor classification (*in situ* vs. invasive, $p = 0.007$) were significant markers for MVD.

Conclusion: As one of the hallmarks of cancer, the angiogenic switch between AK III and invasive SCC occurs more strongly with immunosuppressed than with immunocompetent patients. Interestingly, the MVD of SCCs *in situ* of immunosuppressed patients is significantly lower than the MVD of immunocompetent patients. Further studies are needed to investigate whether the angiogenic switch might be the checkpoint of tumorigenesis, which could serve as a target for therapy.

1 Einleitung

1.1 Epitheliale Hauttumoren und deren Vorstufen

Zu den malignen epithelialen Tumoren, auch als nicht-melanozytärer Hautkrebs oder *non melanoma skin cancer* (NMSC) bezeichnet, gehören die *in-situ*-spinozellulären Karzinome (Synonym: SCC *in situ*), die verrukösen Karzinome, die Keratoakanthome, das invasive spinozelluläre Karzinom (Synonyme: invasives SCC, Plattenepithelkarzinom, Spinaliom, Stachelzellkarzinom, squamos cell carcinoma), das Basalzellkarzinom (Synonym: BCC, Basaliom, *basal cell carcinoma*) und die kutanen Metastasen. Die SCCs *in situ* gliedern sich auf in die aktinischen Keratosen (AK) und die Sonderformen Morbus Bowen (MB), Erythroplasie Queyrat und Cornu cutaneum [1]. Die häufigsten Vertreter des NMSCs sind das Basalzellkarzinom (BCC) und das Plattenepithelkarzinom (SCC).

Die AK lassen sich in drei Grade, je nach Ausmaß der Invasion von atypischen Keratinozyten in der Epidermis, in mild (AK I), moderat (AK II) und schwer (AK III) einteilen [2]. Der Morbus Bowen (MB) bildet eine eigenständige Entität und zeichnet sich durch das Vorhandensein atypischer Keratinozyten in allen Schichten bei intakter Basalmembran aus, gleichzeitig ist die epidermale Struktur aufgehoben [1]. Der MB und die AK gehören beide zu der Gruppe der Plattenepithelkarzinome *in situ* (SCC *in situ*) [2]. SCCs *in situ* haben die Basalmembran noch nicht überschritten und werden auch als "Tumor an Ort und Stelle" bezeichnet. Dieser Gruppe gegenüber steht das invasive SCC (SCC invasiv), hier haben die atypischen Keratinozyten die Basalmembran durchbrochen und wachsen invasiv in die Dermis. Das invasive SCC wächst destruktiv und ca. 5 % metastasieren [3]. Die SCCs *in situ* können in ein invasives SCC übergehen, die Wahrscheinlichkeit der Progression wird derzeit diskutiert [4]. Marks *et al.* untersuchten 1.689 Patienten über einen Zeitraum von 5 Jahren und berechneten eine Progressionsrate von AK zu invasivem SCC von weniger als 1 : 1000 [5]. In dem systematischen Review von Werner *et al.* wurde eine Ein-Jahres-Progressionsrate von AK zu SCCs zwischen 0–0,53% ermittelt [4]. Lambert *et al.* analysierten mittels Transkriptom-Profilierung Unterschiede zwischen den Genen von SCC *in situ* und invasivem SCC und entdeckten den *Mitogen activated protein kinase pathway* als möglichen genetischen Schlüsselunterschied zwischen SCC *in situ* und invasivem SCC [6].

Ein weiterer wichtiger Punkt in der Tumorgenese der SCCs ist die Feldkanzerisierung. Slaughter *et al.* entwickelten dieses Konzept 1953 bei der Untersuchung des umgebenden

Gewebes von oralen SCCs [7]. Die Feldkanzerisierung besagt, dass in dem umgebenden Gewebe eines Tumors genetische Veränderungen der Zellen stattgefunden haben, aus denen sich der nächste Tumor entwickeln kann [8]. Als Feldkanzerisierung der Haut bezeichnet man ein Ultraviolett (UV)-geschädigtes Feld, auf dem sich multiple, disseminierte AK in unterschiedlichen Stadien finden lassen. Dazu gehören auch Stadien, die klinisch nicht erfassbar sind. Dieses Feld birgt ein Risiko, dass sich aus verschiedenen Arealen ein SCC *in situ* entwickeln kann. Auf dermatohistopathologischer Ebene lassen sich im umgebenden Gewebe auch prä-maligne Veränderungen, wie z. B. Fokusse von atypischen Keratinozyten, finden [9].

Die Inzidenz der NMSCs ist schwierig zu ermitteln, da sich bisher weder national noch international ein zuverlässiges Registrierungssystem etabliert hat [10], was möglicherweise auf die geringe Mortalität der NMSCs zurückzuführen ist. Im Jahr 2000 wurde in Deutschland abhängig von der Region die Inzidenz für NMSCs mit 75–100 pro 100.000 für Männer und 45–85 pro 100.000 für Frauen angegeben [11]. Die systematische Review von Lomas *et al.* zeigte, dass die Inzidenz geographischen Schwankungen unterliegt mit der höchsten Inzidenz in Australien (im Jahr 2002) für SCCs mit 387 pro 100.000 im Jahr und für BCCs mit 884 pro 100.000 [12]. In Deutschland wird die Prävalenz der AK mit 1,7 Millionen pro Jahr angegeben mit steigender Inzidenz in Abhängigkeit vom Alter [13].

1.2 Ätiologie und allgemeine Risikofaktoren

Mehrere Risikofaktoren sind für die Tumorgenese (Synonym: Karzinogenese) verantwortlich. Als wichtiger Risikofaktor für das Entstehen der NMSCs ist die UV-Strahlung bekannt [14]. Die UV-Strahlung lässt sich in UVA (320–400 nm), UVB (280–320 nm) und UVC (40–280 nm) unterteilen [1]. UVB dringt bis in die Basalzellschicht der Epidermis und verursacht direkt DNA-Mutationen. UVA dringt bis in die Dermis und schädigt die DNA indirekt über die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies. UVC-Strahlung verfügt über die höchste Energie, wird aber durch die Ozonschicht der Atmosphäre komplett absorbiert. Insbesondere die UVB-Strahlung ist ein bekannter Hauptrisikofaktor für die Entstehung von NMSC [15, 16]. Dazu gehören auch die UV-Dosis auf die Lebenszeit bezogen (= *Total sun burden*), die Anzahl an Sonnenbränden und ein heller, kaukasischer Hauttyp (Fitzpatrick I-II) [17–19]. Dies erklärt die höchste Inzidenz von NMSC in Australien (hohe UV-Jahresdosis). Des Weiteren unterstreicht die karzinogene Rolle der UV-Strahlung auch das Vorkommen der NMSC vor allem entlang der UV-exponierten "Sonnenterrassen", wie Stirn, Schläfe, Kopfhaut mit

wenigen Haaren, Nase, Hals, Wange, Unterlippe, Ohrmuschel, Arme und Handrücken. Die UVB-Strahlung schädigt auf drei Arten:

- Zum einen verursacht sie DNA-Schäden in den Keratinozyten (Pyrimidin-Dimere).
- Außerdem kann sie Mutationen im p53-Gen verursachen: Der DNA-Reparaturmechanismus wird gestört und die Funktion des p53-Gens als Tumorsuppressor, Apoptose bei stark geschädigten Zellen zu induzieren, wird verhindert. Als Folge kann sich die geschädigte Zelle ungehemmt teilen.
- Zum anderen bewirkt sie generell eine Immunsuppression, welche die Überwachungsfunktion beeinträchtigt und somit die Proliferation geschädigter Zellen erlaubt [15, 20].

Verschiedene durch UVB induzierte Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 finden sich in mehr als 90 % der SCCs und der AK im Gegensatz zu gesunder Haut [21]. Le Pelletier *et al.* zeigten, dass keine Assoziation zwischen der Anzahl an p53-positiven Flecken (*Patches*) und der Anzahl an NMSCs besteht [22]. Es wird diskutiert, inwiefern die Entstehung von NMSC mit Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 verbunden ist [23]. Da sich die p53-positiven *Patches* 100.000 mal häufiger in der gesamten Haut finden lassen als Tumoren anzutreffen sind, ist anzunehmen, dass von den meisten p53-positiven *Patches* ausgehend, sich kein NMSC entwickeln wird [22, 24]. Quinn *et al.* stellten bei SCCs häufig einen Verlust der Heterozygotie fest [25]. Gemäß der Knudson Hypothese (*multiple-hit hypothesis*) sind mehrere Mutationen in der DNA notwendig, bevor es zur Entartung der Zelle kommt [26]. Beim Verlust der Heterozygotie müssen zwei Mutationen nacheinander stattfinden: Zuerst eine Punktmutation des Tumorsuppressorgens auf einem Arm des Chromosoms. Darauf muss die Deletion des gesunden Tumorsuppressorgens auf dem homologen Arm des Chromosoms folgen. Dies führt zur alleinigen Funktion des mutierten Tumorsuppressorgens. Quinn *et al.* konnten bei SCCs häufig eine Deletion des 9p-, 13q-, 17p-, 17q- und 3p-Arms nachweisen, was mutierte Gene, die zur Tumorentstehung beitragen, auf einem der homologen Arme vermuten lässt [25]. Manche SCCs haben eine Deletion auf dem Chromosom 15, was zu einem Thrombospondin-1 (TSP-1)-Mangel (Angiogeneseinhibitor) führt und somit die Tumorentstehung fördert [27]. Die UVA-Strahlung verursacht oxidativen Stress, welcher die Expression spezieller Gene verändert, zelluläre Signalwege beeinträchtigt (Notch/CLS), die DNA schädigt und letztendlich zur Feldkanzerisierung und Tumorgenese führt [28, 29].

Die humanen Papillomaviren (HPV) werden in der Entstehung des SCCs als Kokarzinogen betrachtet [30]. Der genaue Mechanismus ist derzeit noch Gegenstand der Forschung. Da die Tumoren v. a. an sonnenexponierten Arealen auftreten und sich bei den SCCs vermehrt HPV

nachweisen lassen, wird vermutet, dass die HPV, im Speziellen das virale E6-Protein, über einen antiapoptotischen Effekt verfügen, welcher sie persistieren und das Wachstum eines durch UV-Schaden induzierten Tumors fördern lässt [31]. Zusätzlich wurde beschrieben, dass das E6-Protein von HPV 5 und HPV 18 in der Lage ist, die Reparatur des durch UV-Licht entstandenen DNA-Schadens (Thymin Dimere) zu behindern [32].

1.3 Risikofaktor Organtransplantation

Eine besondere Risikogruppe bilden die Organtransplantierten. Im Jahr 2012 wurden in Deutschland insgesamt 2.912 Organe transplantiert [33]. In diese Angabe eingeschlossen waren folgende Organe (in absteigender Häufigkeit): Niere (1.441), Leber (802), Lunge (271), Herz (266), Pankreas (126) und Dünndarm (6). Die Organtransplantation gilt als lebensrettende Maßnahme, die exakt vom Überleben des Transplantates abhängt [34]. In Studien, die das Ergebnis von Nierentransplantierten der letzten 20 Jahre analysiert haben, blieb trotz Anstieg der Kurzzeitüberlebensrate (*short term survival*), bisher ein Erfolg in der Langzeitüberlebensrate (*long term survival*) aus: Es zeigte sich in den USA ein diskreter Trend zur Verbesserung der Langzeitüberlebensrate von Nierentransplantierten, welcher vor allem auf einen signifikanten Fortschritt der Ein-Jahres-Organ-Funktionsraten zurück zu führen war [35]. In Australien und Neuseeland hat sich die Funktion und die Überlebensrate der Nierentransplantate insgesamt verbessert, dennoch blieb die Langzeitüberlebensrate der Patienten unverändert [36]. In den USA konnte dieses Phänomen für andere Organe (Leber, Lunge, Herz, Dünndarm, Pankreas) bestätigt werden [37]. Der Anstieg der Kurzzeitüberlebensrate ist vor allem auf die Verbesserungen der chirurgischen Technik und der Immuntherapie zurückzuführen [38]. Der ausbleibende Erfolg in der Langzeitüberlebensrate ist auf die chronische Abnutzungsrate des Organs (*attrition rate*) und die Langzeitnebenwirkungen der Immunsuppression, wie z. B. die Nephrotoxizität der Calcineurin-Inhibitoren, Infektionen und Neoplasien, zurückzuführen [38].

Damit das eigene Immunsystem das fremde Organ nicht angreift, was letztendlich zur Abstoßung führen kann, ist eine kontinuierliche Einnahme verschiedener Medikamente notwendig, die zur Klasse der Immunsuppressiva gehören. Die immunsuppressiven Regime variieren abhängig vom transplantierten Organ und von der Phase der Therapie (Induktionstherapie, Initialtherapie, Erhaltungstherapie). Das Regime kann sich zusammensetzen aus Glukokortikosteroiden, Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin A [CsA] und Tacrolimus [TRL]), Antime-

taboliten (Azathioprin, Mykophenolatmofetil [MMF]), spezifischen Antikörpern, mTor-Inhibitoren (Sirolimus [SRL] und Everolimus) und andere [39]. Zunächst wird eine gezielte Immuntherapie eingesetzt, welche im weiteren Verlauf modifiziert und reduziert wird um die Nebenwirkungen zu minimieren. In den letzten Jahren zeigt sich ein Trend weg vom Einsatz des Glukokortikosteroids und des CsAs hin zum Einsatz von TRL sowie der Anwendung spezifischer Antikörper zur Induktionstherapie vor der Transplantation [39]. Eine Organtransplantation dient dem Überleben des Patienten, gleichzeitig nimmt man aber mit der dauerhaft notwendigen Immunsuppression Risiken in Kauf.

1.3.1 Langzeitkomplikationen

Eine wichtige Langzeitkomplikation ist die erhöhte Inzidenz sowie die erhöhte Rezidivrate von Karzinomen. Die *Standard incidence ratio* (SIR) aller Tumoren bei Organtransplantierten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung rangiert von 2,1 in den USA [40], 3,3 bei Nierentransplantierten in Australien und Neuseeland [41] bis zu 4,6 bei Nierentransplantierten in Nordeuropa [42]. Miao *et al.* zeigten, dass *De-novo*-Karzinome (i.e. Kleinzelliger Lungenkrebs, Mamma-, Prostata-, Blasen-, Nierenkarzinom, Malignes Melanom) bei Transplantierten aggressiver waren und ein schlechteres Ergebnis hatten [43]. In der Gruppe der Karzinome spielen die epithelialen Hauttumoren (NMSCs) eine wichtige Rolle [44]. Häufig finden sich bei den NMSCs der Organtransplantierten multiple Läsionen im Sinne der Feldkanzerisierung [45]. Bei Immunsupprimierten war die SIR von NMSC im Vergleich zur Normalbevölkerung 13 mal höher in England (SIR 16,6) [46] und 20 mal höher in Amerika [47]. Bei über der Hälfte der Transplantierten wurde ein NMSC innerhalb von 20 Jahren diagnostiziert [48, 49]. In Australien waren nach 20 Jahren sogar bei 82 % ein Hauttumor aufgetreten [48]. Das SCC ist der häufigste Hauttumor bei Transplantierten. Hartevelt *et al.* zeigten ein 250fach erhöhtes Risiko für SCCs und ein 10fach erhöhtes Risiko für BCC bei Nierentransplantierten in den Niederlanden [50]. Die NMSCs traten früher auf und wuchsen aggressiver [49, 51, 52]. Das Verhältnis von SCC zu BCC ist umgekehrt (In Australien SCC : BCC ohne Transplantat vs. mit Transplantat: 1 : 4 vs. 2 : 1) [48]. Die Metastasierungsrate eines SCCs bei Immunsupprimierten liegt bei ca. 2–3 %, da bei Immunsupprimierten aber multiple SCCs auftreten, steigt die Gesamtmetastasierungsrate auf 12,9 % [53]. Die SCCs der Immunsupprimierten metastasieren häufiger [52] und bedingen bei Immunsupprimierten eine höhere Mortalität als bei Immunkompetenten [54].

1.3.2 Einfluss der Immunsuppression auf die Tumorgenese

Die Immunsuppression beeinflusst die Tumorgenese auf mehreren Wegen: Zum einen bedingt sie eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen z. B. mit HPV. Im Unterschied zu Immunkompetenten ließ sich bei den SCCs von Nierentransplantierten vermehrt HPV-DNA nachweisen [55–57] und die HPV persistierten in der Haut über lange Zeit [56]. Zusätzlich erleichtert die Immunsuppression die Replikation der Viren.

Zum anderen sind die Dauer und die Art der Immunsuppression weitere Einflussfaktoren. So konnte gezeigt werden, dass mit der Dauer der Immunsuppression die Inzidenz von NMSC steigt [58, 59]. Der immunsuppressive Effekt entsteht dabei durch die eingeschränkte Überwachungsfunktion von T-Zellen, natürlichen Killerzellen sowie dendritischen Zellen, was wiederum das Tumorwachstum erleichtert [16]. Es konnte gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen (T_{reg}) die Entwicklung von NMSC in lichtgeschädigten Mäusen kontrollieren [60]. Die Tumoren entstehen einerseits durch die herabgesetzte Überwachungsfunktion des Immunsystems, aber auch durch den spezifischen Wirkmechanismus des Immunsuppressivums selbst. Generell führen zwar alle Immunsuppressiva abhängig von Dosis und Kombination zu einem erhöhten Auftreten von NMSC [44, 61], für folgende Immunsuppressiva konnte ein erhöhtes Risiko nachgewiesen werden: CsA und TRL (Calcineurin-Inhibitoren), Azathioprin (Antimetabolit) und Glukokortikosteroid. SRL und Everolimus (mTor-Inhibitoren) vermögen im Vergleich zu CsA, MMF (Antimetabolit) und Azathioprin das Risiko eines NMSC zu senken [44, 61]. Keller *et al.* konnten keinen spezifischen Wirkstoff (CsA, TRL, Azathioprin, SRL, MMF) als einen signifikanten Risikofaktor für NMSCs identifizieren, jedoch Prednison als leicht signifikanten Risikofaktor [62].

CsA, ein Calcineurin-Inhibitor, fördert das Wachstum und die Ausbreitung von Tumorzellen. Einerseits durch Unterdrückung des Immunsystems, andererseits führt die verhinderte Apoptose von geschädigten Zellen zur Akkumulation von DNA-Mutationen. Außerdem bewirkt CsA eine Transformation von wenig aggressiven Krebszellen in aggressive Krebszellen [63]. Eine Halbierung der CsA-Dosis bei Nierentransplantierten hatte eine Reduktion der NMSCs zur Folge, ging aber auch mit einer höheren Abstoßungsrate der transplantierten Niere einher [64]. Azathioprin erhöht die Empfindlichkeit der Haut gegenüber UVA-Strahlung. Zusätzlich wird Azathioprin in seine intrazellulär aktive Form 6-Thioguanine Nucleotid metabolisiert, welche in die DNA eingebaut wird und so die chemische Tumorgenese der Haut fördert [65, 66]. mTor-Inhibitoren (SRL, Everolimus), hemmen das *Mammalian*

target of rapamycin, ein Molekül, das mehrfach in tumorfördernde, intrazelluläre Signalwege (Tumorwachstum, Tumorüberleben, Tumorzellteilung, Angiogenese) eingebaut ist und somit über einen hemmenden Effekt auf das Tumorwachstum verfügen [67]. Immunsuppression mit SRL bei Nierentransplantierten, unabhängig ob von Beginn an eingesetzt oder ob im Verlauf zu SRL gewechselt wurde, konnte die Inzidenz der NMSCs signifikant senken und eine Regression der NMSCs bewirken [68, 69]. Der Wechsel von CsA und/oder TRL zu SRL zeigte einen präventiven Effekt bei Nierentransplantierten bezüglich der Verhinderung von Rezidiven eines SCCs [17, 70]. Dieser präventive Effekt ließ sich allerdings in einer ähnlich angelegten Studie von Hoogendijk-van den Akker *et al.* nicht signifikant bestätigen [71]. In retrospektiven Analysen von Nierentransplantierten über 14 Jahre (Spanien) bis 27 Jahre (Deutschland) konnte kein Immunsuppressivum als signifikanter Benefit identifiziert werden, dennoch zeigte sich ein niedrigeres Risiko für mTor-Inhibitoren. Die nicht nachweisbare Signifikanz führten beide Untersucher auf die geringe Anzahl an Transplantierten unter mTor-Inhibitoren zurück [17, 72].

Mit zunehmender Invasivität des SCC *in situ* fand sich eine Assoziation zur steigenden Akkumulation von p53-Mutationen bei Transplantierten, welche sich in ähnlichem, aber geringerem Maße auch bei Immunkompetenten fand [55, 73]. Die DNA-Reparatur unter Azathioprin war signifikant vermindert in humanen Keratinozyten, folglich konnten p53-Mutationen leichter stattfinden [74]. Unter SRL wurden im experimentellen Mausmodell weniger p53-Mutationen nachgewiesen [75].

Für Azathioprin und Cyclophosphamid konnten im experimentellen Mausmodell eine erhöhte UV-induzierte Hauttumorgenese festgestellt werden, nicht aber für Prednisolon [76]. Weder für SRL noch für MMF konnte im experimentellen Mausmodell ein beschleunigter Effekt auf die UV-induzierte Hauttumorgenese nachgewiesen werden [75]. Wulff *et al.* und Duncan *et al.* kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen im experimentellen Mausmodell bei UVB-induzierten Hauttumoren unter Einsatz von SRL und CsA sowie deren Kombination: CsA führte zu mehr [77] oder weniger [78] Tumorwachstum als bei den Kontrollen, bei Zugabe von SRL oder SRL alleine wuchsen weniger [77] oder signifikant mehr [78] Tumoren als bei den Kontrollen. Der Unterschied in den Ergebnissen wird auf die unterschiedliche Dauer der UVB-Strahlung zurückgeführt.

Die Immunsuppressiva hemmen das Immunsystem über verschiedene Wege. Es ist bekannt, dass das Immunsystem in seiner Überwachungsfunktion defekte Zellen eliminiert und somit

die Tumorgenese verhindert. Auch bei immunkompromittierten HIV-Patienten (Humanes Immundefizienz Virus) war eine erhöhte Inzidenz an Tumoren nachweisbar, so dass die Immunschwäche unabhängig davon, ob diese iatrogen (z. B. bei Organtransplantation) oder infektiös durch das HIV bedingt ist, für die Tumorgenese verantwortlich zu sein scheint [79, 80]. Die erhöhte Inzidenz virusassoziierter Tumoren bei Immunsupprimierten würde sich durch die herabgesetzte Kontrollfunktion des Immunsystems erklären lassen, welches nicht mehr in der Lage ist, die virusinfizierten Zellen zu eliminieren. Aber auch bei den über 80 % der nicht virusassozierten Tumoren muss das Immunsystem eine Rolle spielen. Bei Mäusen mit künstlichen Immundefekten für verschiedene Immunzellen ($CD8^+$ zytotoxische T-Zellen, $CD4^+$ Th_1 -Helfer-Zellen, Natürliche Killerzellen oder die Kombination von zweien) traten mehr Tumoren auf als bei immunkompetenten Mäusen [80]. Hier kommt der Begriff *Immunoediting* ins Spiel. Damit gemeint ist auf Molekularebene die Mutation und Selektion von den Tumorzellen, die dem Immunsystem entgehen. Beweis fand diese Hypothese im experimentellen Mausmodell: Tumoren, die auf immunsupprimierten Mäusen gewachsen sind, wurden, nachdem man sie auf immunkompetente Mäuse transplantierte, schnell eliminiert. Denn Tumoren, die in immunsupprimierten *Knockout*-Mäusen entstanden waren, unterlagen keinem hohen Selektionsdruck durch ein funktionierendes Immunsystem. UV-induzierten Hauttumoren konnte eine hohe Antigenität nachgewiesen werden, sie wuchsen auf der Haut von immunsupprimierten Mäusen, aber nicht wenn sie auf immunkompetente Mäuse transplantiert wurden [81].

Bei Immunkompetenten bilden sich die AK häufiger spontan zurück als dass sie in ein invasives SCC übergehen [4]. Bei Immunsupprimierten wird hingegen seltener eine Regression von AK und gleichzeitig eine beschleunigte Progression von AK zum invasiven SCC beobachtet [82]. Dies deutet daraufhin, dass Tumorantigene der AK bei Immunkompetenten vom Immunsystem erkannt werden, jedoch unter Immunsuppression diese Immunantwort unterdrückt bzw. verzögert wird. Tumoren, die sich unter Immunsuppression entwickeln, weisen eine höhere Immunogenität auf. Die SCCs *in situ* mit hoher Immunogenität werden von Immunkompetenten lange Zeit gut bekämpft. Hingegen können diese Tumoren bei Immunsupprimierten eine relevante Aggressivität erreichen, da die tumorinduzierte Immunsuppression additiv mit der generellen Immunsuppression die Tumorgenese fördert [82].

Des Weiteren bestehen Unterschiede in der Inzidenz der NMSC abhängig vom transplantierten Organ. Herz- und Lungentransplantierte haben aufgrund des intensiveren immunsuppressiven Regimes und dem fortgeschrittenem Alter zum Zeitpunkt der Transplantation ein höhe-

res Risiko ein SCC zu entwickeln [59, 83–85]. Nach einer Lebertransplantation ist eine geringer dosierte Immunsuppression notwendig, daher besteht ein geringeres Risiko für NMSC [49]. Nierentransplantierte wiesen im Vergleich zu Herztransplantierten eine höhere Inzidenz für ein weiteres SCC auf. Als Grund wird die längere Dauer der Immunsuppression vermutet, da Nierentransplantierte zum Zeitpunkt der Transplantation durchschnittlich jünger sind [84].

Nach einem Erstereignis besteht ein erhöhtes Risiko an einem weiteren SCC (*in situ* oder invasiv) zu erkranken [68]. Wenn vor der Transplantation schon SCCs *in situ* bestanden, konnte ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von invasiven SCCs nachgewiesen werden [58].

Weitere Risikofaktoren für SCCs unter Immunsuppression sind ein hohes Alter zum Zeitpunkt der Transplantation, Dialyse vor der Nierentransplantation [86], männliches Geschlecht [17, 59] sowie Nikotinkonsum [52, 87]. Außerdem zeigte eine aktuelle Studie, dass möglicherweise die Einnahme von Thiaziddiuretika mit einem erhöhten Risiko für SCCs einhergeht [19]. Einen Überblick aller bekannten Risikofaktoren für die Entstehung der SCCs bietet Tabelle 1.

Tabelle 1 - Risikofaktoren für die Entstehung der SCCs

Allgemein	Speziell auf Immunsuppression bezogen
<ul style="list-style-type: none"> • UVB-Strahlung <ul style="list-style-type: none"> - Anzahl an Sonnenbränden - Chronisch kumulative UV-Dosis • UVA-Strahlung • UVC-Strahlung • Humane Papillomaviren • Mutation des Tumorsuppressorgens p53 • Heller Hauttyp (Fitzpatrick I-II) • Männliches Geschlecht • Immunsuppression <ul style="list-style-type: none"> - AIDS - Iatrogen (z. B. bei Organtransplantation) • Röntgenstrahlung • Chemische Kanzerogene <ul style="list-style-type: none"> - Arsen - Teer 	<ul style="list-style-type: none"> • Höheres Alter bei Transplantation • Art der Transplantation <ul style="list-style-type: none"> - Herztransplantation - Lungentransplantation • Lange Dauer der Immunsuppression • Art der Immunsuppression <ul style="list-style-type: none"> - Cyclosporin A - Azathioprin - Tacrolimus - Glukokortikosteroid • CD4-Lymphozytopenie • SCC in der Vorgeschichte (1. Ereignis) • Dialyse vor Nierentransplantation • Nikotinkonsum • Einnahme von Thiaziddiuretika

Tabelle 1. Überblick über die Risikofaktoren für SCCs geordnet nach allgemeinen und speziell für Immunsuppression.

1.4 Tumorgenese - Kennzeichen von Tumorzellen

Es stellt sich die Frage warum die SCCs unter Immunsuppression häufiger entstehen sowie schneller und aggressiver wachsen. Hanahan und Weinberg verfassten im Jahre 2000 eine häufig zitierte Übersichtsarbeit, die sie 11 Jahre später um vier neue Faktoren ergänzten: Ein mehrstufiges Tumorigenesemodell, welches die möglichen Kennzeichen (*hallmark*) eines Tumors beschreibt, unabhängig davon, ob jede Tumorzelle alle Kennzeichen erwirbt [80]. Tumorzellen entstehen aus gesunden Zellen, unterscheiden sich aber in folgenden Kennzeichen, die in Tabelle 2 dargestellt werden. Lazebnik merkte an, dass fünf von den im Jahr 2000 veröffentlichten Kennzeichen genauso bei benignen Tumoren vorzufinden sind, und allein die Fähigkeit zur Metastasierung und Invasion spreche für Malignität [88]. Die für diese Arbeit relevanten Kennzeichen werden anschließend genauer erläutert.

Tabelle 2 - Kennzeichen von Tumorzellen

<ol style="list-style-type: none"> 1) Anhaltende unabhängige Bildung von wachstumsfördernden Signalen 2) Umgehen von Tumorsuppressorgenen 3) Ausbleiben des programmierten Zelltod 4) Unbegrenzte Zellteilung 5) Induktion von Angiogenese 6) Infiltrierendes Wachstum und Metastasierung 7) Abnormer Energiehaushalt der Zelle* 8) Dem Angriff des Immunsystem entkommen* 9) Chronisch lokale Entzündung (<i>tumor microenvironment</i>) 10) Genominstabilität und Mutationen 	<p><i>Tabelle 2.</i> Überblick über die insgesamt 10 Kennzeichen von Tumorzellen nach Hanahan und Weinberg [80]. Noch keine "Core hallmarks" sind mit einem Stern gekennzeichnet.</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Anmerkungen:

Zu 1): Die Tumorzellen sind in der Lage, sich ungehemmt zu teilen durch anhaltende Produktion von Wachstumssignalen.

Zu 2): Die Tumorzellen können wachstumshemmenden Signalen, wie denen von Tumorsuppressorgenen, ausweichen oder diese blockieren.

Zu 3): Gesunde Zellen können die eigene Apoptose induzieren, wenn sie einen Fehler in der DNA bemerken, um sich selbst zu eliminieren. Tumorzellen vermeiden dies.

Zu 4): Gesunde Zellen haben eine begrenzte Teilungskapazität, abhängig von der Länge der Telomere. Es wird angenommen, dass Tumorzellen in der Lage sind die Telomere zu schützen, was eine unendliche Zellteilung ermöglicht.

Zu 5): Tumorzellen sind in der Lage, ihren erhöhten Bedarf an Nährstoffen und Sauerstoff für die Proliferation über die Ausbildung neuer Blutgefäße zu gewährleisten.

Zu 6): Tumorzellen können in fremdes Gewebe einwachsen und über Blut- und Lymphgefäße weite Wege in fremde Gewebe überwinden (Streuen, Metastasen).

Zu 7)*: Tumorzellen sind fähig, den Energiehaushalt umzustellen, z.B. von aeroben auf anaeroben Energiegewinn, der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt.

Zu 8)*: Tumorzellen entgehen einer Elimination durch T-, B-Zellen, Natürliche Killerzellen und Makrophagen. Der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt.

Zu 9): Das umliegende Gewebe von Tumoren weist chronisch entzündliche Prozesse auf, mit verschiedenen Zelltypen, welche die Proliferation des Tumors fördern können.

Zu 10): In gesunden Zellen gibt es Kontrollsysteme, welche die spontane Mutationsrate gering halten. In Tumorzellen ist diese Rate erhöht [80, 89].

1.4.1 Angiogenese

Gefäße bestehen aus zwei Zelltypen: Endothelzellen, die innere Schicht der Gefäße, und Perizyten, die äußere Schicht der Gefäße. Die Bildung von Blutgefäßen kann über zwei verschiedene Wege ablaufen. Während der Embryonalzeit entstehen *de novo*-Gefäße aus endothelialen undifferenzierten Vorläuferzellen (Angioblasten). Dieser Vorgang wird Vaskulogenese genannt [90]. Vaskulogenese kann auch im Erwachsenenalter durch vom Knochenmark stammende Stammzellen stattfinden, vorrangig bilden sich aber im Erwachsenenalter neue Gefäße entweder durch Aussprossung oder durch Aufspaltung (Intussuszeption) bereits bestehender Gefäße; diese zwei Vorgänge werden als Angiogenese zusammengefasst [91] (siehe Abbildung 1). Bei der Intussuszeption entstehen aus einem großen Gefäß mehrere kleinere durch das Einfügen endothelialer Trennschichten in das Lumen [92]. Während der Angiogenese müssen die Endothelzellen, um ein neues Gefäß zu bilden, folgende Schritte durchlaufen: Penetration der Basalmembran, Migration, Proliferation und Differenzierung [93]. Die Angiogenese kann als physiologischer (Embryogenese, Ovulation, Wundheilung) sowie als pathologischer Prozess (Arthritis, Psoriasis, Tumor) ablaufen [94]. Tumorwachstum, -invasion und -metastasierung sind abhängig von der Angiogenese, sie geht dem Tumorwachstum voraus [95]. Wenn der Tumor über die Grenzen seiner ursprünglichen Blutversorgung hinaus wachsen will, d. h. einen Durchmesser von über 2–3 mm erreicht, braucht er neue Gefäße. Sonst ist die Diffusionsstrecke für den Austausch von Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid, Nährstoffen etc.

zu lang [96] und der Tumor verweilt in einem Ruhezustand (*Tumor dormancy*) [95]. Während des Tumorruhezustandes besteht ein stabiles Gleichgewicht zwischen Angiogeneseinhibitoren und Angiogeneseaktivatoren [97]. In diesem Zustand ist der *Angiogenic switch* (Angiogenese-Schalter) "off" (aus). Wenn der *Angiogenic switch* "on" ist (angeschaltet wird), beginnt der Übergang vom avaskulären zum vaskulären Zustand. Die Angiogeneseaktivatoren nehmen Überhand [93]. Beim physiologischen Prozess, z. B. bei der Wundheilung, wird der *Angiogenic switch* nur vorübergehend angeschaltet, im Gegensatz zum pathologischen Prozess, z. B. beim Tumorwachstum, hier bleibt der *Angiogenic switch* dauerhaft angeschaltet [80]. Das Anschalten des *Angiogenic switch* kann zu jedem Stadium der Tumorentwicklung geschehen [98]. Hanahan und Weinberg schrieben, dass die Angiogenese schon überraschend früh bei verschiedenen Tumoren im Übergang vom *in situ*- zum invasiven Karzinom induziert wird [80]. Mögliche Auslöser für die Hochregulation der Angiogeneseaktivatoren sind [96]:

- Metabolischer Stress (z. B. niedriges pO₂, niedriger pH-Wert, Hypoglykämie)
- Mechanischer Stress (z. B. durch proliferierende Zellen generierter Druck)
- Entzündungsantwort (z. B. Entzündungszellen, die das Gewebe infiltriert haben)
- Genmutationen (z. B. Aktivierung von Onkogenen oder Deletion von Tumorsuppressorgenen, welche die Produktion von Angiogeneseaktivatoren oder -inhibitoren regeln)

Der bekannteste Angiogeneseaktivator ist der *Vascular endothelial growth factor-A* (VEGF-A) und einer der bekanntesten endogenen Angiogeneseinhibitoren der Haut ist Thrombospondin-1 (TSP-1) [99, 100].

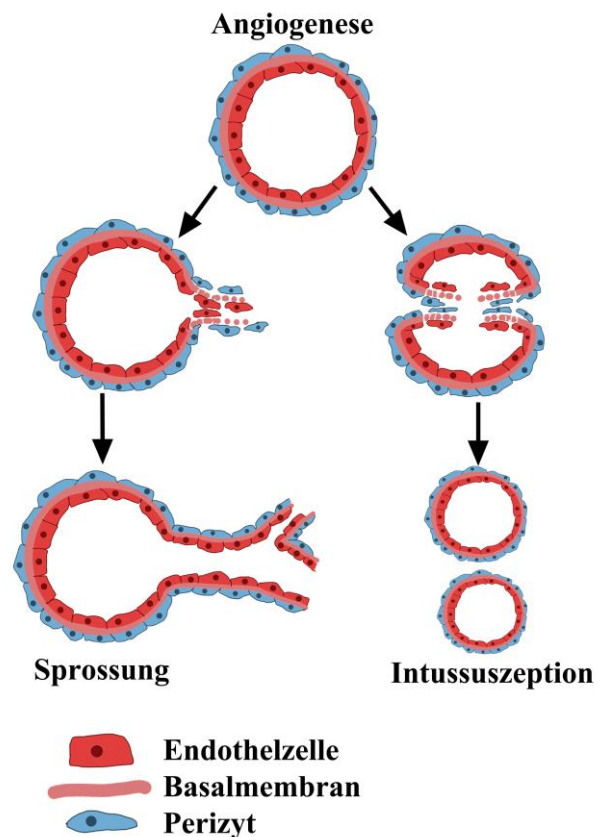


Abb. 1. Blutgefäßneubildung im Rahmen der Angiogenese. Die neuen Gefäße entwickeln sich aus bereits bestehenden Gefäßen, entweder durch Sprossung oder Bilden von Septen (= Intussuszeption), modifiziert nach Krukemeyer 2006: S. 113 [91]

Angiogeneseaktivatoren

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist eine Gruppe die sich aus VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und *Placental growth factor* zusammensetzt. Der wichtigste Vertreter ist VEGF-A und wird häufig nur als VEGF oder *Vascular permeability factor* bezeichnet. VEGF-A wurde als spezifischer Wachstumsfaktor für Endothelzellen und als vaskulärer Permeabilitätsfaktor entdeckt [101]. Die VEGF-A-Signalübertragung wird über drei Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (VEGFR-1, -2, -3) auf verschiedenen Ebenen reguliert. VEGF-A bindet an den VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1) und den VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2), welche auf Endothelzellen exprimiert werden [102].

Vom Knochenmark abstammende Zellen, wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Mastzellen und myeloische Vorläufer, infiltrieren *in situ*- und invasive Karzinome und sammeln sich im Randbereich an. Diese peritumoralen Entzündungszellen aktivieren, in diesem zuvor stillen Randbereich den *Angiogenic switch* in Richtung pro Angiogenese und unterstützen bereits laufende Angiogenese durch eine vereinfachte lokale Invasion [80]. Die neuen Gefäße, die in Tumoren durch Angiogenese entstehen, sehen abnormal aus: frühreife Kapillarsprossungen, verwundene und exzessive Äste, deformierte und vergrößerte Gefäße, schwankender Blutdurchfluss, *Lecks*, abnorme Level der Endothelzellproliferation und -apoptose [80].

Angiogeneseinhibitoren

Zu den bekanntesten physiologischen Angiogeneseinhibitoren gehören Angiostatin [103], Endostatin [104] und Thrombospondine (TSP-1, TSP-2) [100, 105]. Mindestens 27 verschiedene Angiogeneseinhibitoren sind bekannt. Sie können von der extrazellulären Matrix abstammen oder Fragmente von Metaboliten von Hormonen (Wachstumsfaktoren), Proteine des Immunsystems o. ä. sein. Die genauen Wirkmechanismen der Angiogeneseinhibitoren bedürfen noch weiterer Forschung.

1971 postulierte Folkman erstmals die Idee einer zielgerichteten Krebstherapie durch Hemmung der Angiogenese [95]. Im Jahr 2004 hielten synthetisch hergestellte, antiangiogene, monoklonale Antikörper in die onkologische Therapie Einzug. Die Antikörper wurden zugelassen für die Therapie fortgeschrittener metastasierter Karzinome. Die Antikörper fangen zirkulierendes VEGF ab, blockieren die Angiogenese und führen zunächst zur Hypoxie und schließlich zur Apoptose der Tumorzellen. Des Weiteren wurden kleinmolekulare Inhibitoren der Tyrosinkinase entwickelt, die intrazelluläre Signalwege blockieren (v. a. VEGFR-2) und

durch die Hemmung der Angiogenese die Proliferation der Tumorzellen inhibieren und deren Apoptose fördern. Zum Beispiel der Wirkstoff Bevacizumab (Avastin®) mit der Zielstruktur VEGF-A erhielt die Zulassung für das fortgeschrittene Kolon- und Rektumkarzinom und konnte in Kombination mit Chemotherapie signifikant das Überleben um 4,5 Monate verlängern im Vergleich zur Chemotherapie allein [106]. Es konnte ein synergistischer Effekt durch die Kombination von antiangiogenen und zytotoxischen Wirkstoffen erreicht werden. Bisher ermöglichten die therapeutischen Angiogeneseinhibitoren eine längere progressionsfreie Überlebenszeit (Dimension: Monate), haben aber nur einen geringen oder keinen Effekt auf das Langzeitüberleben [107]. Keine der antiangiogenen Therapien erreicht einen langfristigen Effekt wie das Schrumpfen des Tumors oder *Tumor dormancy*, ein sogenanntes Stadium der *stable disease* [108]. Im Gegenteil: In klinischen Studien wurde unter Therapie mit Angiogeneseinhibitoren im Verlauf ein aggressiveres und invasiveres Wachstumsverhalten der Tumorzellen beobachtet [109]. Der progressionsfreien Überlebenszeit folgt nach einer Adaptationsphase des Tumors eine erneute Progressionsphase, in welcher die Hemmung der Angiogenese als treibende Kraft zu einem aggressiveren Wachstumsverhalten führt: vermehrte Invasion in das umliegende Gewebe und in manchen Fällen eine erhöhte Lymphgefäßinvasion und Fernmetastasierung. Dieses Verhalten wird als *evasive resistance* bezeichnet, eine Umgehungsstrategie des Tumors, welche durch Hochregulation von alternativen Angiogeneseaktivatoren (z. B. *Fibroblast growth factor*) oder durch genetische Modifikation initiiert wird [108, 110]. Von der Annahme ausgehend, dass die durch Tumorangiogenese generierten Endothelzellen ein anderes genetisches Signalprofil aufweisen würden als die physiologischen Endothelzellen, erwartete man eine zielgerichtete Blockade der Tumorangiogenese [107]. Doch VEGF spielt auch eine Schlüsselrolle in physiologischen Prozessen, so dass nicht von einer zielgerichteten Hemmung der Tumorangiogenese gesprochen werden kann. Mit dem gleichzeitigen Eingriff in physiologische Prozesse resultieren häufig (1/10) unerwünschte Nebenwirkungen wie z. B. Hypertonie, aufgrund der verringerten Produktion von Stickstoffmonoxid [111]. Des Weiteren wird die Wundheilung beeinträchtigt, so dass in der Fachinformation der Einsatz von Bevacizumab (Avastin®) erst nach völliger Abheilung der Operationswunde empfohlen wird, da schwere Komplikationen an Anastomosen mit tödlichem Ausgang berichtet worden sind. Zielführend wäre die Wirkung und Verträglichkeit der Angiogeneseinhibitoren in allen Stadien der Tumorerkrankung zu testen, da sich die Zulassung bisher auf das fortgeschrittene metastasierte Tumorstadium beschränkt, während sich die präklinisch experimentellen Modelle auf das primäre lokalisierte Tumorstadium beziehen [110].

1.4.2 Lymphangiogenese

Die Lymphgefäße sind, wie die Blutgefäße, mit einer Endothelzellschicht ausgekleidet, aber es fehlt eine kontinuierliche Basalmembran und häufig auch die *Tight Junctions* zwischen den Endothelzellen. Die Endothelzellen sind über Verankerungsfilamente fest mit dem Bindegewebe verbunden, was ihre Kontraktionsfähigkeit ausmacht. Lymphgefäße sind nicht von Perizyten oder Muskelzellen umgeben [112].

Lymphangiogenese bedeutet die Neubildung von Lymphgefäßen. Früher nahm man an, dass Metastasierung nur über schon bestehende Lymphgefäße, die als Tunnel fungieren, abläuft. Heute weiß man, dass die Lymphangiogenese ein aktiver Prozess ist, welche durch verschiedene Faktoren reguliert wird. Physiologische Lymphangiogenese läuft während der Embryogenese ab, die pathologische Lymphangiogenese findet bei akut und chronischen Entzündungsprozessen, bei der Wundheilung und bei der Metastasierung von Tumoren statt [113]. Lymphknotenmetastasen sind meist das erste Zeichen des Fortschreitens eines epithelialen Tumors. Maligne Zellen, die sich in einem Lymphgefäß verteilen, können sogenannte *In-transit-* oder Satelliten-Metastasen ausbilden [114]. Während der pathologischen Lymphangiogenese bilden sich neue Lymphgefäße durch Aussprossung aus bereits bestehenden, den Tumor umgebenden Lymphgefäßen [115]. Die Neubildung wird durch VEGF-C und VEGF-D induziert, welche an den VEGF-Rezeptor-3 (VEGFR-3) auf den lymphatischen Endothelzellen binden. VEGF-C soll selektiv die Lymphangiogenese initiieren und keinen Effekt auf die Angiogenese haben [115]. Erhöhtes VEGF-C konnte bei verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden [114, 116, 117]. Tumorzellen oder tumorassoziierte Entzündungszellen (z. B. Makrophagen) sezernieren VEGF-C und -D. VEGF-C ist auch für die Dilatation der peritumoralen Lymphgefäße verantwortlich [118], welche das Eindringen von Tumorzellen ermöglicht [115].

1.4.3 Messmethoden der Angiogenese und Lymphangiogenese

Von der Voraussetzung ausgehend, dass Tumorwachstum abhängig von Angiogenese ist, begann die Suche nach einer Methode Angiogenese zu messen. Eine weit verbreitete Methode ist die *Microvessel density* (MVD) nach Weidner auf histologischen Schnitten des Tumors zu bestimmen [119]. Bei dieser Methode werden spezifische immunhistochemische Marker verwendet, die Gefäße im histologischen Schnitt sichtbar machen (z. B. CD31). Im histologi-

schen Schnitt wird dann in niedriger Auflösung nach den gefäßreichsten Arealen gesucht (sog. "Hotspots") und anschließend werden die Gefäße in hoher Auflösung am Mikroskop mit dem Auge gezählt. Der Hotspot hat eine feste Größe (bei Weidner $0,74 \text{ mm}^2$), welche mit einem okularen Mikrometer gemessen wird [119, 120]. Der Mittelwert aus den einzelnen Gefäßzählungen in den Hotspots (mindestens 3) wird berechnet. Diese Methode fand Anwendung bei zahlreichen Tumoren, um eine Aussage zur Aggressivität des Tumorwachstumsverhaltens zu gewinnen (für die entsprechenden Tumoren Einzelverweise bei [120]). Sie hat sich als morphologischer Goldstandard etabliert [94, 121]. Basierend auf dieser Methode wurde eine positive Korrelation zwischen MVD und Aggressivität des Wachstumsverhaltens einiger Tumoren postuliert [120]. Die MVD konnte auch in multivariaten Analysen als unabhängiger prognostischer Marker bestätigt werden. Gemeint sind im Einzelnen eine positive Korrelation der MVD mit fortgeschrittenem Stadium, höherer Inzidenz an Metastasen, hoher Rezidivrate und höherer Mortalität [120]. Die Hotspots zu identifizieren ist wichtig, da die Angiogeneseaktivität und somit die Anzahl der Gefäße innerhalb eines Tumors heterogen verteilt sind [119, 120].

Mit dem Fokus auf die Metastasierung und die dadurch bedingte Mortalität sowie der Entdeckung eines spezifischen Lymphgefäßmarkers, übertrug man die MVD-Methode auf die Lymphangiogenese und zählte in gleicher Weise Lymphgefäße. Man spricht dann von der *Lymphatic vessel density* (LVD). Je höher die LVD, desto höher die Metastasierungswahrscheinlichkeit des Tumors in Lymphknoten und ferne Organe [117, 122]. Für invasive Plattenepithelkarzinome von Kopf- und Halsbereich, das maligne Melanom und das Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass eine hohe LVD mit einer hohen Metastasierungswahrscheinlichkeit und kürzerem Überleben einhergeht [123–125].

Ein weitere Methode zur Bestimmung der Angiogenese ist der *Chalkley count* [126]. Der *Chalkley count* misst auch die absolute Gefäßanzahl in Hotspots. Es wird ein Gitternetz mit 25 Punkten über den Hotspot gelegt und so lange gedreht bis die Position gefunden ist, bei der sich die meisten Punkte des Gitternetzes mit Gefäßen schneiden [126]. Durch das Gitternetz soll dem Untersucher die Entscheidung, ob ein Gefäß wirklich ein Gefäß oder zwei einzelne Gefäße ist, genommen werden. Der vom Untersucher abhängigste Schritt, die Entscheidung für einen Hotspot, ist auch Teil der Chalkley-Methode. Eine Überlegenheit der Chalkley-Methode gegenüber der MVD-Methode wird kritisch diskutiert [127, 128]. Es gibt deutlich mehr veröffentlichte Studien, die die MVD-Methode angewandt haben [121].

Beide Methoden finden ihren Ursprung vor Einzug der Computertechnik in die Histologie, denn das Zählen der Gefäße findet manuell am Mikroskop statt. Mit fortgeschrittener Technologie und rasant angestiegener Rechenleistung von Prozessoren in den späten 1990er Jahren wurde versucht, ein standardisiertes System für die Messung der Angiogenese zu entwickeln. Mittlerweile sind *Whole scan slide*-Systeme auf dem Markt [129, 130], die den Tumor als Ganzes schneiden, färben und scannen. Der Vorgang ist vollautomatisiert und die Angiogenese des Tumors wird algorithmisch durch ein standardisiertes Auszählverfahren erfasst.

Durch Computersoftware lassen sich neben der MVD auch weitere Gefäßparameter berechnen, wie z. B. das Gefäßvolumen, die mittlere Gefäßgröße und die eingenommene Gefäßfläche im Verhältnis zum Hotspot, die sog. relative Gefäßfläche. Es gibt sowohl käuflich verfügbare als auch freie Software von verschiedenen Anbietern [130]. Die *ivision-Mac*TM 4.5.0 (Biovision Technologies, Inc., Exton, PA, USA) fand in der computergestützten Bildanalyse der MVD und weiteren vaskulären Parametern, wie mittlere Gefäßgröße und Gesamtfläche der Gefäße, bei verschiedenen Tumoren [105, 123, 131] und Entzündungsreaktionen [132] Anwendung.

Immunhistochemische Marker für die Gefäßdarstellung

Immunhistochemische Färbungen helfen spezielle Strukturen sichtbar zu machen, z. B. Gefäße. Man benutzt Antikörper die spezifisch an Antigene binden, und macht den Antigen-Antikörperkomplex durch eine Farbreaktion sichtbar.

CD31 (= *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*) ist ein transmembranöses Glykoprotein, welches auf Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert wird [133]. CD31 bildet während der Aussprossung im Rahmen der Angiogenese notwendige Interzellularverbindungen von Endothelzellen [133, 134], so dass der gegen CD31 gerichtete monoklonale Antikörper spezifisch mit Endothelzellen von Blut- und Lymphgefäßen reagiert [135]. Nebenbei kann CD31 auch Entzündungszellen und gelegentlich Plasmazellen anfärben [136].

D2-40 ist ein monoklonaler Antikörper, der selektiv an Podoplanin bindet, ein Oberflächen-glykoprotein lymphatischer Endothelzellen [137]. Lymphgefäße werden spezifisch durch D2-40 gefärbt, aber keine Blutgefäße [138]. Daher wird D2-40 zur Unterscheidung von Blut- und Lymphgefäßen eingesetzt. Es wurde beobachtet, dass D2-40 auch die Basalzellschicht der Epidermis anfärben kann [139].

1.4.4 Bedeutung der Angiogenese und Lymphangiogenese bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Haut

In gesunder Haut ruht die Angiogenese infolge der dominierenden endogenen Angiogeneseinhibitoren. Auch bei der Haut hängt die Tumorgenese vom *Angiogenic switch* ab. Hypoxie reguliert die Bildung von VEGF-A in den Keratinozyten und die Expression von VEGFR an Gefäßen [140]. VEGF-A ist der wichtigste Angiogeneseaktivator bei Hauttumoren und stimuliert die Angiogenese in der Dermis [140]. TSP-1 und TSP-2 agieren als wichtigste Angiogeneseinhibitoren in der Haut [141]. TSP-2 ist in der dermatoepidermalen Junktionszone lokalisiert [142] und wirkt als Funktionsbarriere zwischen der nicht vaskularisierten Epidermis und der vaskularisierten Dermis.

Table 3 - Mehrstufiger Prozess der Angiogenese

1. Induktion der Hyperpermeabilität der Gefäße
2. Enzymatische Degradation der Basalmembran und des Bindegewebes
3. Migration der Endothelzellen
4. Proliferation der Endothelzellen
5. Reifung zu Blutgefäßen

Table 3. Überblick über den mehrstufigen Prozess der Angiogenese nach Detmar [140].

VEGF-A spielt eine wichtige Rolle beim invasivem Wachstum von SCCs: Eine alleinige Überexpression an VEGF-A war ausreichend um *in vivo* das invasive Wachstum zu induzieren [131]. Wenn man experimentell im Maustumormodell VEGFR-2 durch einen Antikörper blockierte, behinderte dies die Angiogenese und verhinderte das invasive Wachstum des SCCs, ohne aber die Tumorzellteilungsrate zu beeinflussen [143]. Es gibt verschiedene Ergebnisse zur Frage, wann der *Angiogenic switch* bei SCCs stattfindet. Darauf wird in der Diskussion ausführlich eingegangen.

D2-40 konnte in der Mehrzahl der Lymphgefäße von invasiven SCCs nachgewiesen werden [139]. Im transgenen Mausmodell mit chemisch induzierten invasiven SCCs konnte eine signifikant erhöhte Expression von VEGF-C und VEGF-A nachgewiesen werden, diese führte jedoch zu keiner signifikant erhöhten LVD. Zur immunhistochemischen Markierung der Lymphgefäße wurde hier LYVE-1 verwendet [144, 145]. Bei einer retrospektiven Analyse von invasiven SCCs des Kopf- und Halsbereichs korrelierte eine hohe intratumorale LVD signifikant mit Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnose, Lymphgefäßbefall und mit kürzerem Überleben [124].

1.5 Zielsetzung

Die vorliegende retrospektive Arbeit hatte zum Ziel aufzudecken, ob Unterschiede der Angiogenese und der Lymphangiogenese der SCCs nach immunhistochemischer Gefäßmarkierung in verschiedenen vaskulären Parametern mittels computergestützter Bildanalyse zwischen Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten messbar sind, welche einen Hinweis auf eine veränderte Tumorgenese von Immunsupprimierten geben. Ziel war es, folgende Fragen im Einzelnen zu klären:

1. Ob die Vaskularisierung zwischen AK III und invasivem SCC gemäß der Hypothese des Angiogenic switch zunimmt. Sowohl bei Immunsupprimierten als auch bei Nicht-Immunsupprimierten.
2. Ob es Unterschiede hinsichtlich der Vaskularisierung der epithelialen Hauttumoren und deren Vorstufen gibt zwischen den Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten.
3. Ob es Unterschiede hinsichtlich der Lymphvaskularisierung der epithelialen Hauttumoren und deren Vorstufen gibt zwischen den Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten.
4. Sollten Unterschiede hinsichtlich der Vaskularisierung oder Lymphvaskularisierung gefunden werden: Gibt es unabhängige Einflussfaktoren für die Vaskularisierung, wie z. B. Immunstatus, Geschlecht, Alter, Tumorklasse etc.?
5. Ist anhand der Ergebnisse ein Angiogeneseinhibitor als mögliche therapeutische Option denkbar und ermutigen die Ergebnisse eine prospektive Studie durchzuführen?

2 Material und Methode

2.1 Patientenkollektiv und Herkunft des Gewebes

Nach der Zustimmung der zuständigen Ethikkommission der Charité (Votum EA1/003/12) wurden retrospektiv die Gewebeproben von 94 Patienten weiterverarbeitet, die in Form einer Biopsie oder Exzision während der klinischen Diagnostik und Therapie in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité Berlin gewonnen wurden. Die Patienten wurden direkt oder durch Überweisung des niedergelassenen Dermatologen bzw. Hausarztes in der Poliklinik und anschließend im Hauttumorzentrum Charité Berlin zur Hautkrebsvorsorge oder zur Abklärung eines unklaren klinischen Hautbefundes und zum Ausschluss eines invasiven Plattenepithelkarzinoms (SCC invasiv) oder eines Bowen-Karzinoms vorstellig. Die Diagnose erfolgte routinemäßig durch einen Dermatohistopathologen der Hautklinik.

2.1.1 Histologische Klassifikation

Die Einteilung der Vorstufen der SCCs erfolgte nach der von Röver-Huber publizierten Klassifikation, die die aktinischen Keratosen (AK) rein histologisch in „Early *in situ* SCC Type I“, „Early *in situ* SCC Type II“ und „*In situ* SCC Type III“ einteilt. *In situ* SCC Type AK III (AK III) bezeichnet AK bei denen atypische Keratinozyten schon mehr als zwei Drittel der Epidermis einnehmen [2]. Bei invasiven SCCs haben die atypischen Keratinozyten die Basalmembran der Epidermis durchbrochen und infiltrieren mindestens die Dermis. Der Morbus Bowen (MB) ist histologisch durch eine verbreitete Epidermis (Akanthose) mit atypischen Keratinozyten charakterisiert, die die Basalmembran noch nicht überschreiten [1].

2.1.2 Gewebegewinnung

Zu Beginn dieser retrospektiven Untersuchung wurde auf die vorhandenen, in Paraffin eingebetteten, Gewebeproben der Gewebebank der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité Berlin aus dem Jahr 2000 bis einschließlich dem Jahr 2010 zurückgegriffen. Die Tumordatenbank der dermatohistopathologischen Abteilung des Hauttumorzentrum Charité Berlin - Campus Mitte wurde nach geeigneten Patienten durchgesehen. Es wurde nach allen Gewebeproben von Patienten gesucht, die zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme unter einer Immunsuppression bei Zustand nach Organtransplantation standen.

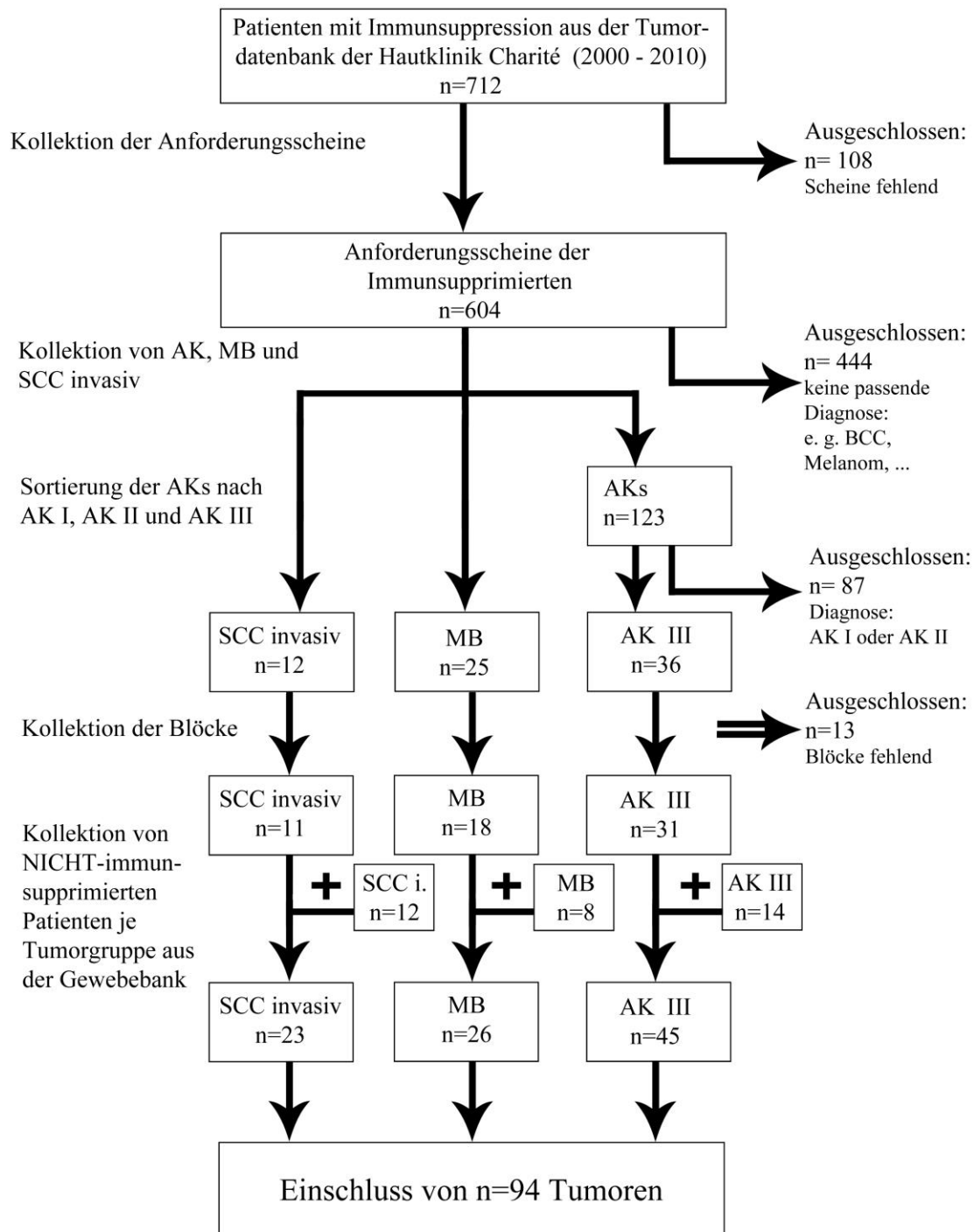


Abb. 2. Screening der Untersuchungsgruppe

Anhand der erstellten Listen der histologischen Datenbank wurden die Anforderungsscheine im Archiv herausgesucht. Nach Durchsicht der histologischen Befundtexte konnten 444 Patienten ausgeschlossen werden, die nicht die Diagnose AK III, MB oder invasives SCC aufwiesen.

sen. Daraufhin wurde von 73 Patienten nach den Gewebeblöcken gesucht, von denen 13 zu diesem Zeitpunkt im Archiv fehlten bzw. in einer anderen Studie eingebunden waren. Nachdem die Anzahl der immunsupprimierten Patienten feststand, wurde mit dem gleichen methodischen Vorgehen nach einer Vergleichsgruppe von nicht-immunsupprimierten Patienten für eine der drei Diagnosen gesucht. Letztendlich konnten 94 Patienten in die Untersuchung eingeschlossen werden, die sich aus einer Gruppe von 60 Immunsupprimierten und einer Gruppe von 34 Nicht-Immunsupprimierten zusammensetzten.

2.1.3 Datenerfassung

Die beschreibenden Daten der Patientenpopulation wurden aus den Anforderungsscheinen zur histologischen Untersuchung erhoben. Fehlende Angaben wurden mit Hilfe der Suchfunktion der Krankenhaussoftware SAP (SAP Netware, SAP AG, Walldorf) ergänzt. Folgende Daten wurden erfasst: Alter, Geschlecht, Diagnose, Zeitpunkt der Biopsie (Jahr), Exzisionsstelle, Immunsuppression, Art der Transplantation und Zeitpunkt der Transplantation. Die Art, Dosis und Dauer der Immunsuppressiva zum Zeitpunkt der Exzision war in wenigen Fällen auf dem histologischen Anforderungsschein dokumentiert und diese Information war auch nicht über die Kliniksoftware SAP Netware (SAP AG, Walldorf) recherchierbar, so dass keine validen Rückschlüsse auf Unterschiede der eingesetzten Immunsuppressiva zu ziehen waren.

2.2 Immunhistochemische Färbung

Zum Vergleich der Gefäßsituation zwischen SCC *in situ* und invasivem SCC von Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten wurden immunhistochemische Färbungen mit einem panvaskulären Gefäßmarker (CD31) und einem Lymphgefäßmarker (D2-40) durchgeführt. Diese zwei Marker wurden in unserem Labor regelmäßig erfolgreich angewandt.

2.2.1 Vorbereitung der Proben

Anfertigung von Gewebsschnitten

Die immunhistochemischen Färbungen wurden am formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe durchgeführt. Zunächst wurden die mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger (Super-frost-Plus-Objektträger, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmen-

dingen) mit der jeweiligen Präparatnummer beschriftet. Vom Paraffinblock wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Microm, Reichert-Jung, Wetzlar) 4 µm dicke Schnitte in Serie angefertigt. Diese wurden überführt in ein 40 °C warmes Wasserbad (GFL, Burgwedel), auf die Objektträger aufgezogen und für 45 Minuten in einem Brutschrank (Memmert, Schwabach) bei 56 °C getrocknet.

Entparaffinierung

Vor der Anwendung der Immunhistochemie wurde das Paraffin aus den Schnitten durch Xylolersatzmittel (Pro Taqs Clear, Quartett, Immundiagnostika und Biotechnologie, Berlin) entfernt. Anschließend folgte die Rehydrierung über eine absteigende Ethanolreihe bis ins Leitungswasser. Um das Austrocknen zu verhindern, wurden die Objektträger in TRIS Puffer (TBS; ProTaqs, BIOCYC Gesellschaft für Biotechnologie und Recycling mbH & Co.KG, Luckenwalde) zwischengelagert.

Die Entparaffinierung der Gewebsschnitte erfolgte automatisiert in der Maschine "OMNIBUS" (Quartett, Immundiagnostika und Biotechnologie, Berlin) nach folgendem Schema:

- 2 x 10 Minuten Xylolersatz
- 1 x 10 Minuten Absoluter Alkohol
- 1 x 10 Minuten 200 ml absoluter Alkohol + 20 ml H₂O₂ 3 %
- 1 x 2 Minuten Leitungswasser
- 1 x 5 Minuten TRIS Puffer

Antigendemaskierung durch Hitzevorbehandlung (heat-induced epitope retrieval)

Die Objektträger wurden in die vorgewärmte, für den Antikörper entsprechende, kommerzielle Target-Retrieval Solution (S1699 oder S2376, DakoCytomation GmbH, Hamburg) überführt. Zur Vorbereitung der Proben wurden die Schnitte in der Lösung 20 Minuten lang im Dampfgerar (Braun, Kronberg/Taunus) gekocht. Hierdurch wurden die Epitope hitzeinduziert freigelegt und waren für die Antikörper zugänglich [146]. Anschließend kühlten die Schnitte unter Zugabe von Aqua Dest für 25 Minuten ab und wurden für weitere 5 Minuten in TBS umgesetzt. Nachdem die einzelnen Schnitte manuell von der restlichen Flüssigkeit befreit wurden, folgte die Einkreisung des Gewebes auf dem Objektträger mit einem speziellen Stift (Liquid-repellent Slide Marker Pen, Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt).

2.2.2 LSAB-2-HRP-Methode

Die *Labeled Streptavidin-Biotin* (LSAB)-Methode ist eine indirekte, zweistufige Färbemethode. Hierbei bindet im ersten Schritt ein unkonjugierter primärer Antikörper an das Antigen. Im folgenden Schritt bindet ein mehrfach biotinylierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Darauf bindet Streptavidin, welches mit dem Enzym *Horseradish Peroxidase* (HRP) konjugiert ist, an das Biotin des Sekundärantikörpers (auch sog. Brückenantikörper). Jedes Biotinmolekül steht als Bindungspartner zur Verfügung, so dass eine Amplifikation erreicht wird [147]. Durch Zugabe von farblosem Chromogen kommt es zur Farbentwicklung im Sinne einer Enzym-Substrat-Reaktion.

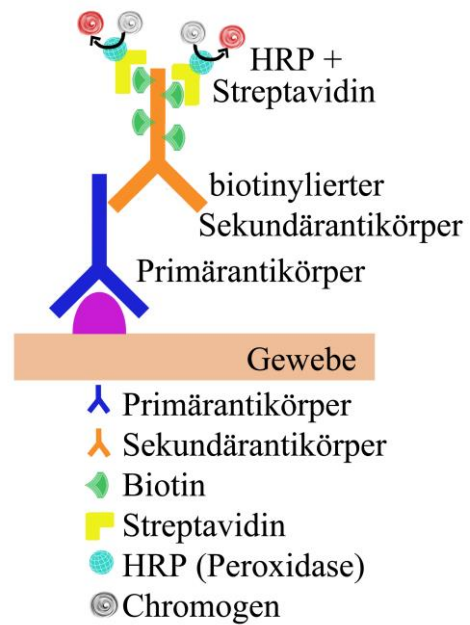


Abb. 3. Schema der LSAB-2-HRP-Methode

Durchführung der LSAB-2-HRP-Methode

Die Primärantikörper wurden für den Gebrauch mit Antibody Diluent (S3022, DakoCytomation GmbH, Hamburg) verdünnt und sind in der Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4 - Primärantikörper für die Immunhistochemie

Anti-körper	Färbung für	Spezies, Klonalität	Gebrauchsverdünnung	Demaskierung (pH)	Hersteller	Produkt-nummer
CD31	Blut- und Lymphgefäße, panvaskulär	Maus, monoklonal	1: 50	6,1	DakoCytomation GmbH, Hamburg	M0823
D2-40	Lymphgefäße	Maus, monoklonal	1: 200	9,0	Covance Inc., Princeton, NJ, USA	SIG-3730

Tabelle 4. Primärantikörper (CD31 und D2-40) und ihre Eigenschaften (Färbung für Spezies, Klonalität, Gebrauchsverdünnung, Demaskierung [pH], Hersteller, Produktnummer)

Ablauf - Übersicht

- 30 Minuten 100 µl Primärantikörper (CD31 oder D2-40) pro Schnitt. Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.
- 5 Minuten In TBS spülen.
- 20 Minuten Zugabe von 1–2 Tropfen biotinylierter Brückenantikörper pro Schnitt. Es folgt die Inkubation in der Kammer.
- 5 Minuten In TBS spülen.
- 20 Minuten 1–2 Tropfen Streptavidin-HRP pro Schnitt. Inkubation in der Kammer.
- 5 Minuten In TBS spülen.
- 20 Minuten 1–2 Tropfen AEC Substrate-Chromogen pro Schnitt. Inkubation in der Kammer.
- 5 Minuten In TBS und in Aqua Dest ausspülen.
- 3 Minuten In filtrierte Mayers Hämalaunlösung stellen.
- 15 Minuten In Leitungswasser bläuen.

Die Kontrollen reagierten alle adäquat. Für die Negativkontrolle wurde nur Diluent statt Antikörper aufgetragen. Es wurden 100 µl Primärantikörper (CD31 oder D2-40) auf jeden Gewebeschnitt pipettiert. Es folgte die Inkubation über 30 Minuten in einer feuchten Kammer (Shandon Lipshaw, Pittsburgh, PA, USA) bei Raumtemperatur, um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten in TBS gespült und manuell von der Flüssigkeit befreit. Auf jeden Schnitt wurden 1–2 Tropfen biotinylierter Brücken-AK (K0675 1, Dako Deutschland GmbH, Hamburg) gegeben und erneut in der Kammer für 20 Minuten inkubiert. Danach wurden die Objektträger in TBS umgesetzt, für 5min gespült und schließlich abgetupft. Es folgte die Zugabe von je 1–2 Tropfen Streptavidin-HRP (K0675 2, Dako Deutschland GmbH, Hamburg) und die Inkubation für weitere 20 Minuten. Nach der fünfminütigen Spülung in TBS und Aqua Dest sowie der Trocknung, wurden 1-2 Tropfen AEC Substrate-Chromogen (K3469 AEC + Highsensitivity, Dako Deutschland GmbH, Hamburg) pro Schnitt zugegeben und für 20 Minuten inkubiert. Darauf wurde ein weiteres Mal in TBS fünf Minuten lang gespült, um sie danach in die filtrierte Mayers Hämalaunlösung (Merck KGaA, Darmstadt) für 3 Minuten umzusetzen. Diese dient der Kerngegenfärbung. Zum Schluss wurden die Schnitte über 15 Minuten in Leitungswasser gebläut. Nachdem die Schnitte an der Luft getrocknet waren, wurden sie mit Aquatex (Merck KGaA, Darmstadt) und einem Deckglas (Menzel-Gläser, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) eingedeckt.

2.3 Auswertung

Bei Präparaten, bei denen in der Anfärbung keine Gefäße zu erkennen waren, wurde der Färbegang wiederholt und bei erneutem Negativergebnis wurde das Präparat mit "0" in die Auswertung eingeschlossen. Somit gingen alle 188 gefärbten Präparate der 94 Patienten in die Auswertung mit ein. In den mit D2-40 gefärbten Schnitten lässt sich in manchen Präparaten eine bei D2-40 bekannte basale Anfärbung von Drüsen erkennen, welche keinen Einfluss auf die weitere Analyse hatte.

2.3.1 Computergestützte morphometrische Bildanalyse der Gefäße

Die Auswertung der Gewebsschnitte erfolgte angelehnt an die MVD-Methode nach Weidner [119] kombiniert mit einer computergestützten Methode: Zusätzlich wurden die am Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) identifizierten Hotspots durch eine Kamera (Micropublisher 3.3, QImaging, Surrey, BC, Canada) in Form eines Farbfotos digital festgehalten. Die Gefäße wurden mit einem Stift auf einem Tablett (Intuos4, Wacom, Krefeld) nachgezeichnet, und anschließend wurden mit der Computersoftware ivision-MacTM 4.5.0 (Biovision Technologies, Inc., Exton, PA, USA) Berechnungen angestellt (siehe Abbildung 4).

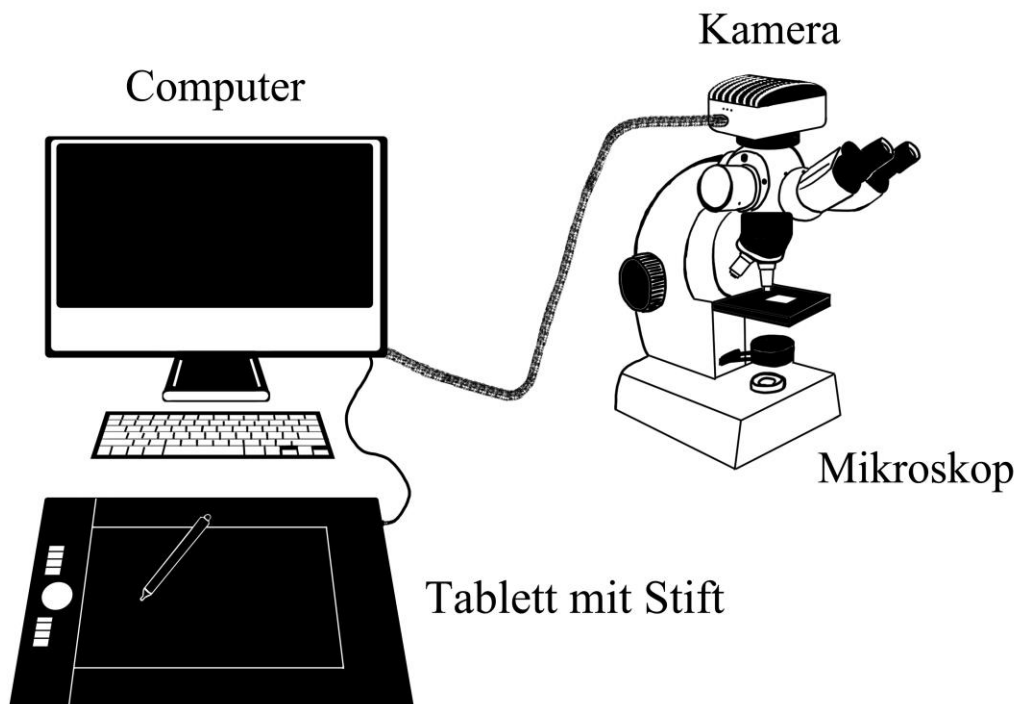


Abb. 4. Skizze des computergestützten Messaufbaus

Tabelle 5 - Wesentliche Begriffe zum Verständnis der Gefäßanalyse

Begriff	Erklärung	Einheit
Hotspot	Stelle im Gewebsschnitt mit der höchsten Gefäßdichte, definiert als Gesichtsfeld mit einer Fläche von $0,37\text{mm}^2$	$0,37\text{ mm}^2$
<i>Microvessel density</i> (MVD)	Absolute Anzahl der Gefäße in einem Hotspot	$n/0,37\text{ mm}^2$
<i>Lymphatic vessel density</i> (LVD)	Absolute Anzahl der Lymphgefäße in einem Hotspot	$n/0,37\text{ mm}^2$
<i>Region of interest</i> (ROI)	Der Ausschnitt des Hotspots, der die peri- und/oder tumorale Fläche einschließt, unter ggf. Ausschluss von vorher festgelegten Strukturen	μm^2
Gesamtfläche der Gefäße (<i>vascular area</i>)	Summe aller umrandeten Gefäßquer- und -längsschnitte in einem Hotspot	$\mu\text{m}^2/0,37\text{ mm}^2$
Mittlere Gefäßgröße (<i>average vessel size</i>)	Gesamtfläche der Gefäße dividiert durch die MVD oder LVD	μm^2
Relative Gefäßfläche (<i>relative vascular area</i>)	Gesamtfläche der Gefäße dividiert durch ROI	%

Tabelle 5. Erklärung wesentlicher Begriffe für die Gefäßanalyse (*Hotspot*, *Microvessel density*, *Lymphatic vessel density*, *Region of interest*, Gesamtfläche der Gefäße, Mittlere Gefäßgröße und relative Gefäßfläche)

Regeln zur Einzeichnung

Nach Ablauf des ersten Messdurchgangs wurden vom Untersucher Regeln zur Einzeichnung festgelegt mit dem Ziel den Vorgang zu standardisieren.

1. Sind Gefäße von der *Region of interest* (ROI) angeschnitten so werden die Gefäße bis zur ROI eingezeichnet.

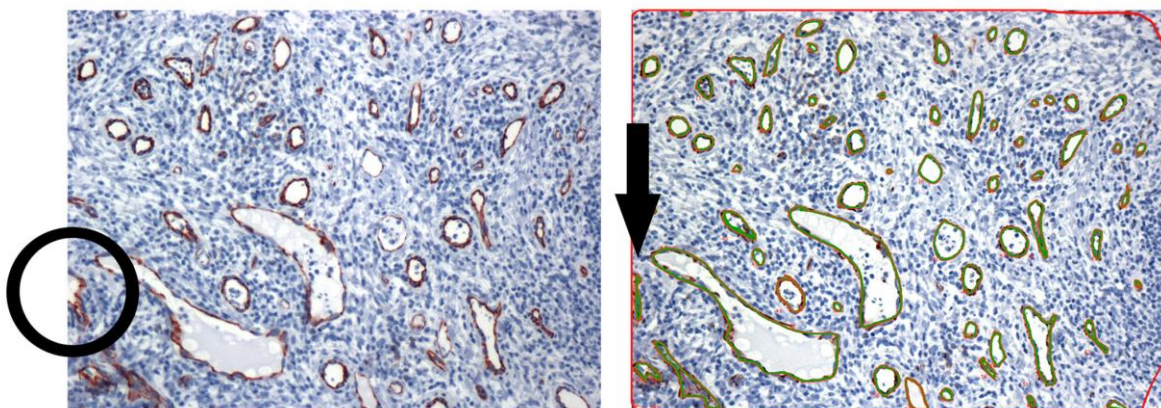


Abb. 5. Regel Nr. 1 - Einzeichnung bis zur ROI. Gezeigt sind Gefäße mit CD31 angefärbt von einem Hotspot einer AK III. Der Kreis umschließt ein angeschnittenes Gefäß; der Pfeil zeigt auf das mit grüner Farbe nachgezeichnete Gefäß. Die rote Linie zeichnet die ROI nach.

2. Gefäße brauchen kein sichtbares Lumen.

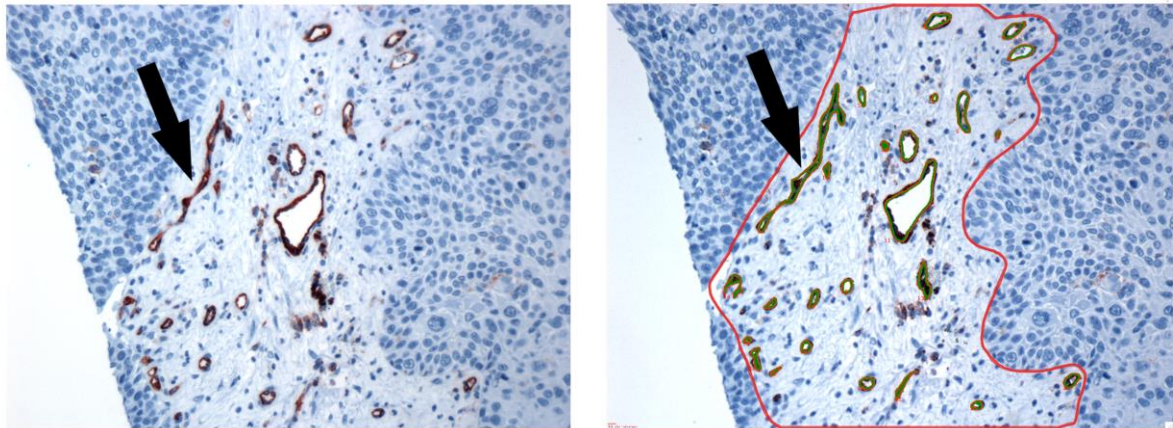


Abb. 6. Regel Nr. 2 - Gefäß ohne Lumen. Gezeigt sind Gefäße mit CD31 angefärbt von einem Hotspot einer AK III. Der Pfeil zeigt auf das Gefäß, anschließend auf das mit grüner Farbe nachgezeichnete Gefäß. Die rote Linie zeichnet die ROI nach.

3. Von der ROI ausgeschlossen werden die Epidermis sowie Talg- und Schweißdrüsen, Hornperlen, Haare und Fettzellen welche, wenn zentral liegend, als eine "Insel mit Stiel" auszuschließen sind.

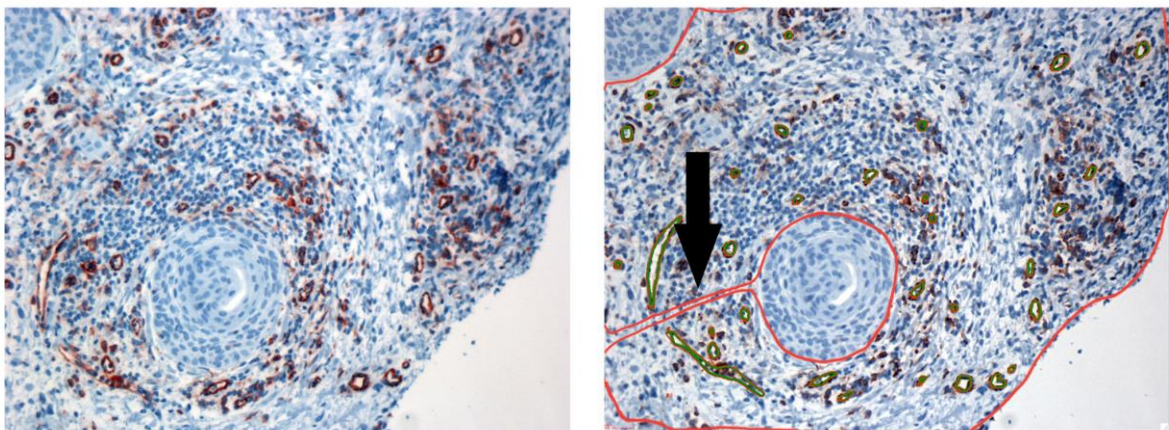


Abb. 7. Regel Nr. 3 - Beispiel für "Insel mit Stiel". Gezeigt sind Gefäße mit CD31 angefärbt von einem Hotspot einer AK III. Der Pfeil zeigt auf den Stiel der auszuschließenden Struktur.

4. Ein längs angeschnittenes Gefäß wird als ein Gefäß in seiner gesamten Größe eingezeichnet.

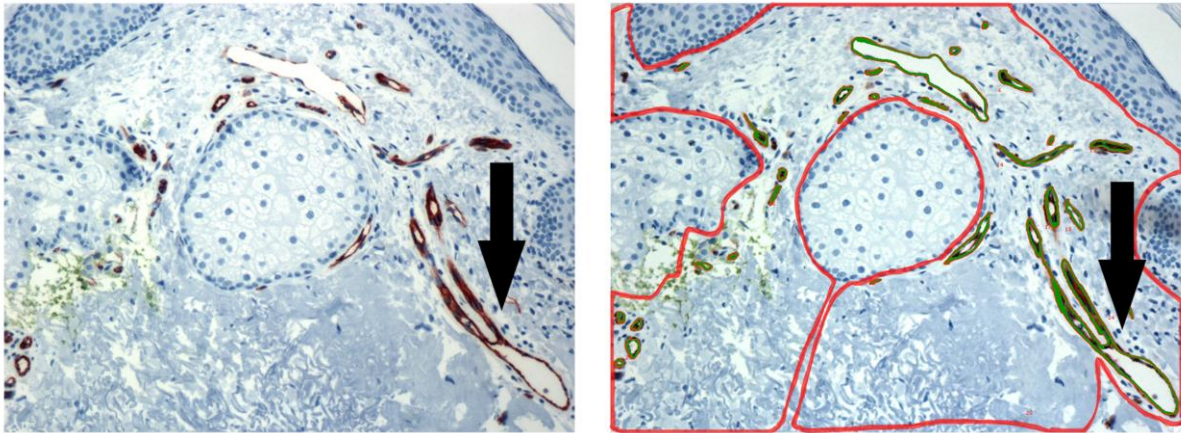


Abb. 8. Regel Nr. 4 - Großes Gefäß. Gezeigt sind Gefäße mit CD31 angefärbt von einem Hotspot einer AK III. Der Pfeil zeigt auf das gesamte Gefäß, anschließend auf das mit grüner Farbe nachgezeichnete Gefäß. Die rote Linie zeichnet die ROI nach.

Zu Beginn der computergestützten morphometrischen Analyse wurde die an das Mikroskop angebaute Q-Imaging-Kamera bei einem Objektiv mit 10facher Vergrößerung mit Hilfe eines Messobjektträgers (Zeiss, Oberkochen) geeicht (1 Pixel = 0,341 μm).

Zunächst wurde der gesamte mit CD31 gefärbte Schnitt bei 40facher Vergrößerung (10 x Okular, 4 x Objektiv des Lichtmikroskops) vom Untersucher betrachtet. Von den drei gefäßreichsten Stellen im Schnitt (sog. "Hotspots") wurden je ein Bild, das die drei Farbkanäle verwendet (color (RGB), high resolution, Exposure: 0,05 Sekunden) bei 10facher Vergrößerung aufgenommen. Die MicroPublisher 3.3 RTV-Kamera nimmt Bilder mit einer Pixelgröße von 3,4 μm x 3,4 μm auf (Auflösung: 2048 Pixel x 1536 Pixel, Bildgröße: W: 699 μm , H: 524 μm). Somit hat jedes Bild eines Hotspots die Größe von 0,37 mm^2 . Der Fokus wurde hierbei manuell eingestellt, um das schärfstmögliche Bild zu erhalten. Die Bilder wurden direkt auf den mit der Kamera verbundenen Macintosh Computer geladen. Sie konnten an diesem mit der Computer-Software ivision-MacTM 4.5.0 (Biovision Technologies, Inc., Exton, PA, USA) in deren Format (*.ipm) gespeichert und zur weiteren Analyse verwendet werden. Jeder Hotspot bildet einen eindeutigen Ausschnitt ab, es kommt zu keiner doppelten Abbildung von Gewebeabschnitten innerhalb der drei Hotspots. Da beim Betrachten der D2-40 gefärbten Schnitte keine Hotspots eindeutig zu identifizieren waren, wurden im Vergleich mit der geöffneten Bilddatei der CD31-gefärbten Hotspots am Computer dieselben drei Hotspots

am D2-40 gefärbten Schnitt mit dem Mikroskop aufgesucht und in gleicher Weise fotografiert (Abbildung 9). Von jedem Tumor wurden somit maximal sechs Hotspot-Bilder pro Messdurchgang gespeichert. Es wurde versucht drei Hotspots zu identifizieren, jedoch ergab die Gefäßanzahl in 34 der 188 Präparate nur maximal zwei Hotspots (≤ 2).

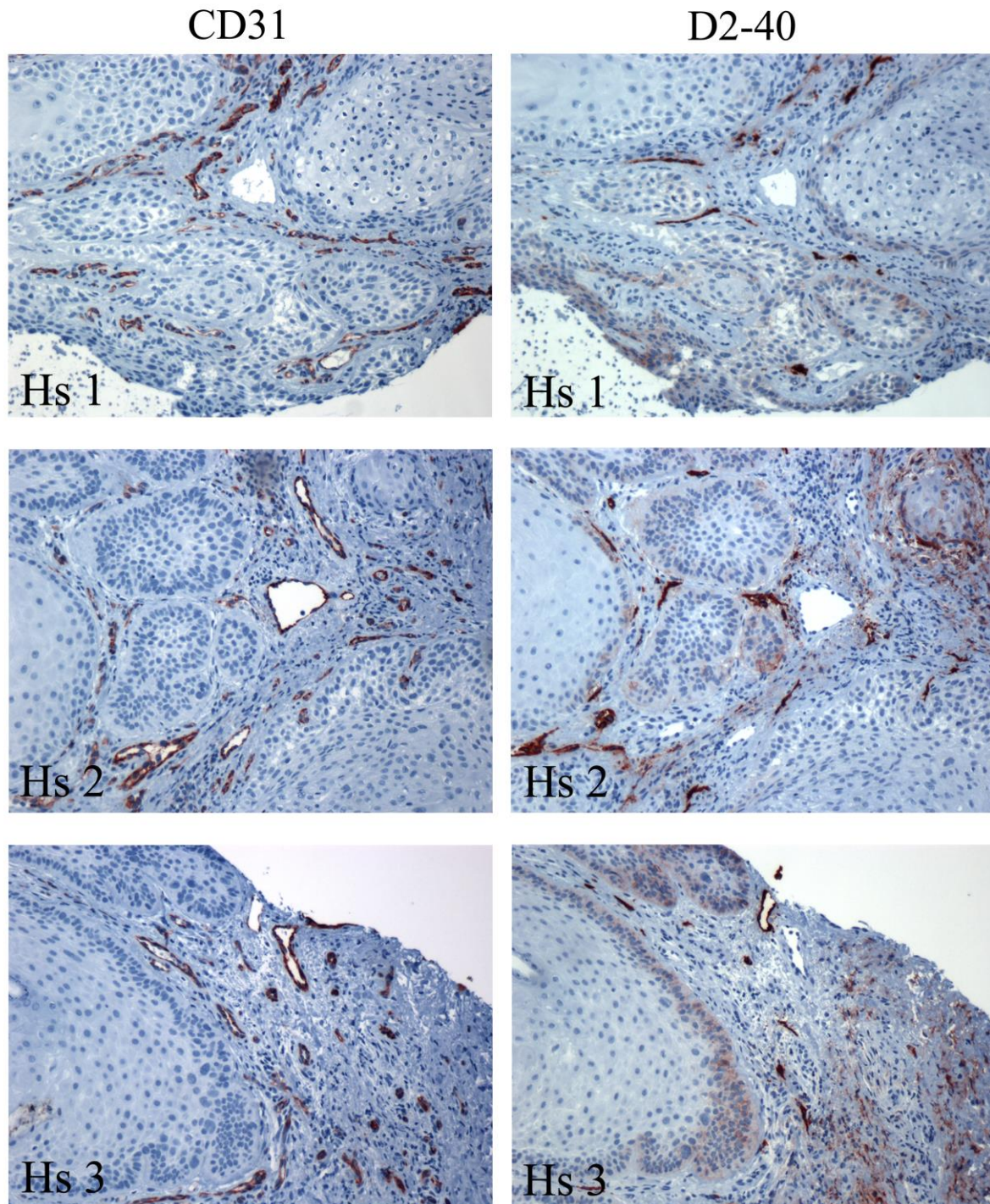


Abb. 9. Hotspots (Hs) CD31 vs. D2-40. Gezeigt sind die Gefäße, angefärbt mit CD31 und mit D2-40 in den je drei Hotspots einer AK III. Es wurden die gleichen Stellen im D2-40-gefärbten Schnitt aufgesucht, die im CD31 gefärbten Schnitt als Hotspot identifiziert wurden.

Auf jedem Bild wurden mit Hilfe des Stift-Tabletts zunächst alle Gefäße manuell vom Untersucher in grüner Farbe nachgezeichnet und anschließend die ROI nach o. g. Regeln für die Berechnung der relativen Gefäßfläche markiert (Abbildung 10 für CD31 und Abbildung 11 für D2-40). Darauf folgte die automatisierte morphometrische Analyse der Gefäßsituation.

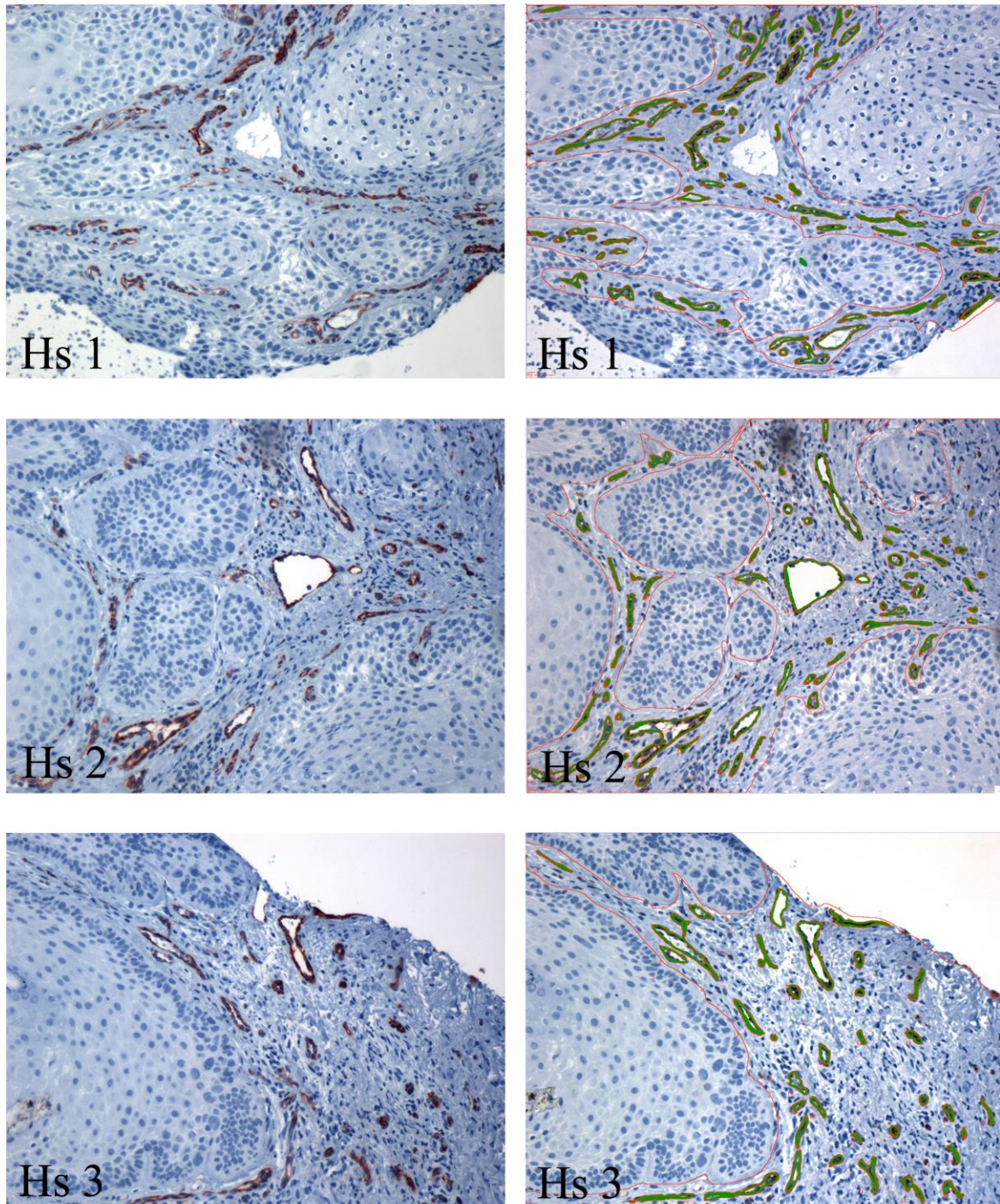


Abb. 10. Einzeichnung der Gefäße und der ROI. Gezeigt sind die Gefäße, angefärbt mit CD31 in den drei Hotspots einer AK III. Die Gefäße sind mit grüner Farbe nachgezeichnet, die ROI mit roter Farbe.

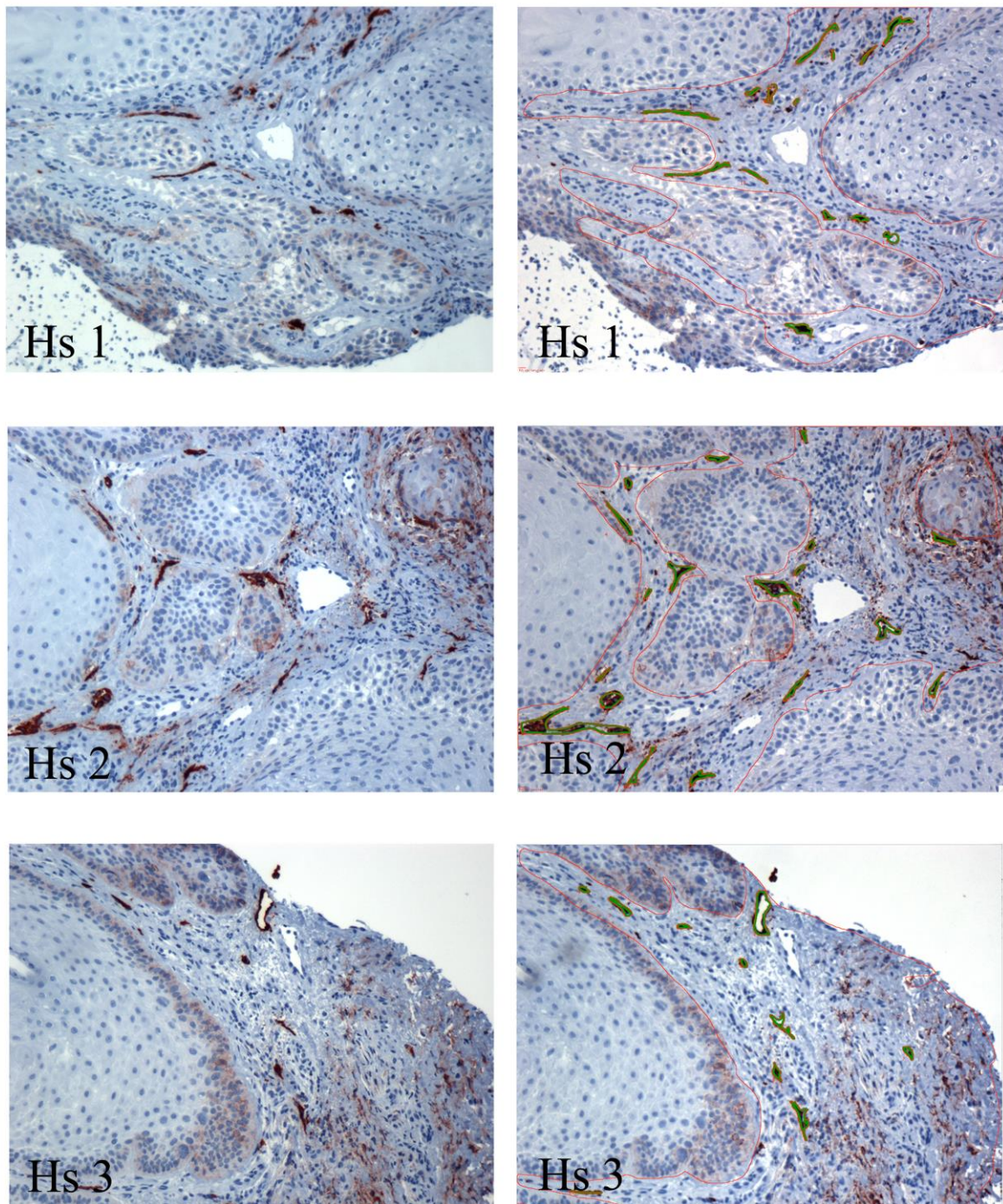


Abb. 11. Einzeichnung der Lymphgefäße und der ROI. Gezeigt sind die Gefäße, angefärbt mit D2-40 in den drei Hotspots einer AK III. Die Gefäße sind mit grüner Farbe nachgezeichnet, die ROI mit roter Farbe.

Letztendlich wurden an insgesamt 1500 Bildern (3 Messdurchgänge x 2 Hotspots x 34 Präparate + 3 Messdurchgänge x 3 Hotspots x (188-34-10) Präparate); bei 10:"0") folgende vaskuläre Parameter mit dem Programm "ivision-Mac™ 4.5.0" gemessen:

Tabelle 6 - Vaskuläre Parameter

Parameter	Bezeichnung in der Software "ivision-MacTM 4.5.0"	Einheit
Hotspot	*.ipm	0,37 mm ²
<i>Microvessel density</i> (MVD)	Segment totals count	n/0,37 mm ²
<i>Lymphatic vessel density</i> (LVD)	Segment totals count	n/0,37 mm ²
Gesamtfläche der Gefäße	Total Area	µm ² /0,37 mm ²
Mittlere Gefäßgröße	Average Area	µm ²
Region of interest	ROI Area	µm ²
Relative Gefäßfläche	% of ROI	%

Tabelle 6. Vaskuläre Parameter mit ihrer Bezeichnung in der Software ivision-MacTM 4.5.0 und deren Einheit.

Der Mittelwert von gezählten Gefäßen pro Hotspot (hier mit einer Fläche von 0,37 mm², maximal drei Hotspots pro Tumor) entspricht der in Forschungsarbeiten oft verwendeten MVD [119] bzw. bei Anfärbung der Lymphgefäße der LVD und wird in dieser Arbeit fortan so bezeichnet. Die Gesamtfläche der Gefäße beschreibt die Summe der von allen Kreisen eingeschlossenen Flächen in einem Hotspot, obgleich das Gefäß quer oder längs angeschnitten wurde. Die mittlere Gefäßgröße berechnet sich aus der Gesamtfläche der Gefäße dividiert durch die MVD bzw. LVD. Die relative Gefäßfläche ergibt sich aus der Gesamtfläche der Gefäße geteilt durch die ROI.

Die gewonnenen Zahlen wurden in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) übertragen. Zusätzlich wurde die Anzahl der gefundenen Hotspots vermerkt. Abschließend wurde ein Screenshot zur Sicherung der Einzeichnungen gemacht.

2.3.2 Statistik und Datenverarbeitung

Die Datenverarbeitung und statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung von Microsoft Excel, SPSS Statistical Software (IBM Deutschland GmbH, Ehningen) und R version 2.14.0 (The R Foundation for Statistical Computing, Wien). Es wurde je der arithmetische Mittelwert des Gefäßparameters aus den Hotspots pro Präparat berechnet. Zur graphischen Darstellung wurden die Softwareprogramme SPSS Statistical Software (IBM Deutschland GmbH, Ehningen) und Photoshop CS5 (Adobe Systems GmbH, München) verwendet.

Zuverlässigkeit der Methode in den Messdurchgängen (Intrarater-Reliability, Retest-Reliability)

Zur Bewertung, ob ein Messverfahren zuverlässig ist, wird die Retest-Reliabilität anhand des Intraklassenkorrelationskoeffizient (ICC) berechnet. Es wird eine Messung an der gleichen Stichprobe mit der gleichen Methode zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt. Die Ergebnisse dieser Messungen werden durch eine Varianzanalyse verglichen. Die Retest-Reliabilität beschreibt, inwiefern die Messwerte zu unterschiedlichen Messzeitpunkten variieren. Der ICC kann einen Wert von 0 bis 1 annehmen, wobei sich die Zuverlässigkeit einer Methode durch einen hohen ICC auszeichnet [148]. Jedes der Präparate wurde durch den gleichen Untersucher drei Mal analysiert: Der erste Durchgang diente der Erprobung der Untersuchungsmethode, um anschließend nach Regeln, die durch Messdurchgang eins ermittelt wurden, bei Messdurchgang zwei und Messdurchgang drei vorzugehen, wobei sich die Durchgänge zwei und drei nicht signifikant voneinander unterscheiden (Intraklassen Korrelationsanalyse, siehe Tabelle 7). Für die weitere Auswertung wurden die Mittelwerte der Messdurchgänge zwei und drei verwendet.

Tabelle 7 - Intraklassenkorrelation

Mess-durchgang	MVD/LVD ICC (95% CI)	Gesamtfläche der Gefäße ICC (95% CI)	ROI ICC (95% CI)
1 vs. 2	0.9 (0.88–0.91)	0.95 (0.95–0.96)	0.78 (0.75–0.81)
1 vs. 3	0.9 (0.88–0.91)	0.96 (0.96–0.97)	0.77 (0.74–0.81)
2 vs. 3	0.93 (0.92–0.94)*	0.97 (0.97–0.98)*	0.93 (0.92–0.94)*

Tabelle 7. Vergleich der Messdurchgänge (1,2,3) in Bezug auf die primär gemessenen vaskulären Parameter (MVD/LVD, Gesamtfläche der Gefäße und der ROI). Gezeigt sind für die MVD/LVD, die Gesamtfläche der Gefäße und die ROI der ICC und das dazugehörige 95%-Konfidenzintervall. Statistische Testung auf Übereinstimmung erfolgte mittels Intraklassenkorrelationsanalyse. Eine hohe Übereinstimmung ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Auswertung der morphometrischen Gefäßanalyse

Um einen Unterschied in der Angiogenese bei zunehmender Aggressivität der Tumoren festzustellen, wurden, als Maß für die Aggressivität, die AK III mit den MB zunächst zusammengefasst als Gruppe der SCC *in situ* und mit der Gruppe der invasiven SCC verglichen. Vergleich der Häufigkeitsverteilung zwischen den Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test bei zwei nominalen Merkmalen (Ge-

schlecht, Tumorklasse) und mittels exaktem Test nach Fisher bei mehr als zwei nominalen Merkmalen (Tumor, Tumorlokalisierung). Des Weiteren wurde auf statistische Unterschiede zwischen Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten mittels Student t-Test bei pseudo-Normalverteilung (Alter) getestet. Außerdem wurde die Häufigkeitsverteilung zwischen den unterschiedlichen Immunsupprimierten (Herztransplantierte [HTX], Knochenmarktransplantierte [KTX], Lebertransplantierte [LTX], Nierentransplantierte [NTX] und mit unbekanntem Organ Transplantierte [OTX]) mittels exaktem Test nach Fisher bei mehr als zwei nominalen Merkmalen (Tumor, Tumorklasse) und mittels Varianzanalyse (ANOVA) bei mehr als zwei parametrischen Merkmalen (Alter bei Biopsie, Alter bei TX, Zeit: TX-Biopsie) durchgeführt. Für alle Signifikanzprüfungen lag hier das Signifikanzniveau bei $p < 0.05$.

Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Tumoren innerhalb einer Gruppe sowie zwischen den Gruppen (unabhängige Stichproben) erfolgte mittels Student t-Test. Bei multip-len Testen ($n = 80, 12+12+12+12+16+16$) wurde die Bonferronikorrektur vorgenommen [149, 150]. Das Signifikanzniveau lag unter Bonferronikorrektur zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen bei weniger als 0.000625 ($p < 0.05/80 = p < 0.000625$).

Zur Untersuchung, von welchen Einflussfaktoren die MVD bzw. LVD abhängt und ob die gefundenen signifikanten Unterschiede auch unabhängig von beeinflussenden Störgrößen bestehen, wurde eine multivariate Regressionsanalyse durchgeführt.

2.4 Übersicht der verwendeten Materialien und Geräte

Tabelle 8 - Allgemeine Lösungen und Chemikalien

Lösung/Chemikalie	Hersteller
Formalin Solution 10 %, REF 3933	J.T. Baker, Center Valley, PA , USA
Pro Taqs Clear (Xylol-Ersatz)	Quartett, Immunodiagnostika und Biotechnologie Vertriebs-GmbH, Berlin
Ethanol absolut	Herbeta Arzneimittel, Berlin
H ₂ O ₂	Merck KGaA, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan, (TRIS-Kochsalz-Puffer-Konzentrat) 0,05 M pH 7,6, 50x	ProTaqs, BIOCYC Gesellschaft für Biotechnologie und Recycling mbH & Co.KG, Luckenwalde

Tabelle 9 - Lösungen und Chemikalien für die Immunhistochemie (LSAB)

Lösung/Chemikalie	Hersteller
Stammlösung TRIS-Puffer 0,05 M pH 7,6 1:20	ProTaq, BIOCYC Gesellschaft für Bio- technologie und Recycling mbH & Co.KG, Luckenwalde
Target Retrieval Lösung (CD31) pH 6,1; S1699, 10x Concentrate 1:10	DakoCytomation GmbH, Hamburg
Target Retrieval Lösung (D2-40) pH 9,0; S2367, 10x Concentrate 1:10	DakoCytomation GmbH, Hamburg
Antikörper Lösung 1 Antibody Diluent S3022	DakoCytomation GmbH, Hamburg
Brücken-AK (K0675 1+2)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Substrat Chromogen (K3469 AEC + Highsensitivity)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg

Tabelle 10 - Geräte und Materialien für die Immunhistochemie (LSAB)

Gerät/Material	Hersteller
Mikrotom	Microm, Reichert-Jung, Wetzlar
Wasserbad (45 °C)	GFL, Burgwedel
Super-frost-Plus-Objektträger	R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Omnibus (Entparaffinierungsmaschine)	Quartett, Immunodiagnostika und Biotech- nologie Vertriebs-GmbH, Berlin
Dampfgarer	Braun, Kronberg/Taunus
Kammer (Humidity Chamber)	Shandon Lipshaw, Pittsburgh, PA, USA
Liquid-repellent Slide Marker Pen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg
Mayers Häkalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Deckgläser	Menzel Gläser, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Wässriges Eindeckmittel (Aquatex)	Merck KGaA, Darmstadt

Gerät/Programm	Hersteller
Computer Charité Inv.-Nr: 000003098619	Fujitsu Technology Solutions GmbH,
SAP Netware	SAP AG, Walldorf

Tabelle 11 - Geräte und Materialien für die computergestützte Analyse

Gerät/Programm	Hersteller
Mikroskop Axiotech Charité Inv.-Nr. 000003091890	Zeiss, Oberkochen
Kamera, MicroPublisher 3.3 Model: MP3.3-RTV-CLR-10 Charité Inv.-Nr. 000003111153	QImaging, Surrey, BC, Canada
QCapture™ Suite	QImaging, Surrey, BC, Canada
Objektträger mit Mikrometer	Zeiss, Oberkochen
iMac	Apple Inc., Cupertino, CA, USA
Stift tablet, intuos4	Wacom, Krefeld
Photoshop CS5	Adobe Systems GmbH, München
ivision-Mac™ 4.5.0 (scientific Image Processing)	BioVision Technologies, Inc., Inc., Exton, PA, USA
Microsoft Excel 14.2.3	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
SPSSStatistics 20.0.0 Statistical Software	IBM Deutschland GmbH, Ehningen
R version 2.14.0	The R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika der eingeschlossenen Patienten und deren Tumoren

Von den 94 eingeschlossenen Patienten konnten alle in die Datenanalyse einbezogen werden. Es lagen insgesamt 23 invasive Plattenepithelkarzinome (SCC invasiv) sowie 71 Plattenepithelkarzinome *in situ* (SCC *in situ*) vor, welche sich in 45 aktinische Keratosen Grad III (AK III) und 26 Morbus Bowen (MB) aufgliederten. Die Stichprobe setzte sich aus 34 nicht-immunsupprimierten und 60 immunsupprimierten Patienten zusammen. Diese Gruppen unterschieden sich signifikant hinsichtlich ihres Alters (Student t-test, $p < 0.001$) und der Tumorklassifikation (Exakter Test nach Fisher, $p = 0.04$). Nicht signifikant hingegen waren die Unterschiede in Bezug auf das Geschlecht (Chi-Quadrat, $p = 0.65$), die Tumorklasse (SCC invasiv und SCC *in situ*; Chi-Quadrat, $p = 0.07$) und die einzelnen Tumoren (SCC invasiv, AK III und MB; Chi-Quadrat, $p = 0.19$, siehe Tabelle 12).

Tabelle 12 - Charakteristika der Patientenpopulation

		Immunsupprimiert		p-Wert
		nein	ja	
Gesamt	[n]	34	60	-
Alter	Jahre			< 0.001*
	Mean (95%-CI)	72 (68-76)	63 (61-66)	
Geschlecht	[n]			0.65
m		29	49	
w		5	11	
Tumorklasse	[n]			0.07
SCC <i>in situ</i>		22	49	
SCC invasiv		12	11	
Tumor	[n]			0.19
AK III		14	31	
MB		8	18	
SCC invasiv		12	11	
Tumorlokalisation	[n]			0.04*
Kopf		16	40	
Oberkörper		15	12	
Unterkörper		3	3	
keine Angabe		0	5	

Tabelle 12. Vergleich nicht-immunsupprimierter und immunsupprimierter Patienten hinsichtlich Alter, Geschlecht, Tumorklasse, Tumor und Tumorlokalisation. Gezeigt sind für Geschlecht, Tumorklasse, Tumor und Tumorlokalisation die absoluten Anzahlen der Patienten, und für die Altersverteilung der Mittelwert mit zugehörigen 95% Konfidenzintervall. Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte für das Geschlecht sowie die Tumorklasse, mittels Chi-Quadrat-Test, für den Tumor und die Tumorlokalisation (ohne „keine Angabe“) anhand des Exakten Test nach Fisher und für das Alter durch den Student t-Test. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

An den lichtexponierten Arealen, wie Kopf und Oberkörper fanden sich, unabhängig ob von Immunsupprimierten oder nicht-Immunsupprimierten, 93 % der Tumoren. Die restlichen 7 % entstanden im Bereich der Beine und Füße (Unterkörper). Zwischen den einzelnen Tumorgruppen bestand kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Tumorlokalisation (Exakter Test nach Fisher, $p = 0.67$, siehe Tabelle 13).

Tabelle 13 - Lokalisation der Tumoren

	SCC <i>in situ</i>		SCC invasiv	Gesamt
	AK III	MB		
Kopf	29	13	14	56
Oberkörper	11	10	6	27
Unterkörper	2	2	2	6
keine Angabe	3	1	1	5
Gesamt	45	26	23	94

Tabelle 13. Vergleich der SCC *in situ* (AK III und MB) und der SCC invasiv in Bezug auf die Tumorlokalisation (Kopf, Oberkörper, Unterkörper, keine Angabe). Gezeigt sind für AK III, MB und SCC invasiv die absoluten Anzahlen, sowie zusammenfassend die Gesamtanzahl aller Tumoren. Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte für die Tumorlokalisation (ohne „keine Angabe“) anhand des Exakten Test nach Fisher. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Gruppe der immunsupprimierten Patienten ($n = 60$) folgte die dauerhafte Einnahme der Immunsuppression aufgrund einer Organtransplantation, wobei 57 % nieren-, 27 % herz-, 13 % leber- und 2 % knochenmarkstransplantiert waren. Bei 2 % fehlte die Angabe des transplantierten Organs. Zwischen den Patienten der verschiedenen Transplantationsgruppen zeigten sich signifikante Unterschiede in Bezug auf die Verteilung der Tumoren, in Bezug auf das Alter bei der Biopsie, in Bezug auf das Alter bei der Transplantation und in Bezug auf die Dauer der Immunsuppression (Exakter Test nach Fisher, $p = 0.02$ ["Tumor"]; ANOVA, $p = 0.001$ ["Alter bei Biopsie"], $p < 0.001$ [Alter bei TX] und $p = 0.002$ ["Zeit: TX-Biopsie"]). Im Hinblick auf die Tumorklasse unterschieden sich die Transplantationsgruppen nicht signifikant (Exakter Test nach Fisher, $p = 0.06$ ["Tumorklasse"], siehe Tabelle 14).

Tabelle 14 - Charakteristika der Immunsupprimierten (n = 60)

Art der Transplantation	HTX	KTX	LTX	NTX	OTX	p-Wert
[n]	16	1	8	34	1	-
Tumorklasse						0.06
SCC <i>in situ</i>	11	1	6	31	0	
SCC invasiv	5	0	2	3	1	
Tumor						0.02*
AK III	10	0	4	17	0	
MB	1	1	2	14	0	
SCC invasiv	5	0	2	3	1	
Alter bei Biopsie in Jahren						0.001*
Mean (95%-CI)	66 (63–69)	48	63 (56–70)	62 (58–66)	77	
Alter bei TX in Jahren						< 0.001*
Mean (95%-CI)	58 (56–60)	46	58 (52–64)	53 (48–58)	-	
Zeit: TX–Biopsie in Jahren						0.002*
Mean (95%-CI)	8 (6–11)	2	5 (2– 8)	9 (7–12)	-	

Tabelle 14. Vergleich der Immunsupprimierten (Herztransplantierte [HTX], Knochenmarktransplantierte [KTX], Lebertransplantierte [LTX], Nierentransplantierte [NTX] und mit unbekanntem Organ Transplantierte [OTX]) hinsichtlich der Tumorklasse, des Tumors, des Alters bei Biopsie, des Alters zum Zeitpunkt der Transplantation [Alter bei TX] sowie der Zeitspanne von der Transplantation bis zur Biopsie [Zeit: TX-Biopsie]. Gezeigt sind für Tumorklasse und Tumor die absoluten Anzahlen der Patienten; für Alter bei Biopsie, "Alter bei TX" und "Zeit: TX-Biopsie" der Mittelwert mit zugehörigen 95% Konfidenzintervall. Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte für die Tumorklasse und den Tumor mittels Exakter Test nach Fisher und für Alter bei Biopsie, "Alter bei TX" und "Zeit: TX-Biopsie" mittels ANOVA. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

3.2 Statistische Auswertung der morphometrischen Gefäßanalyse

Eine Erklärung der wesentlichen Begriffe zum Verständnis der Gefäßanalyse findet sich im Methodenteil (Tabelle 5, Seite 34). Bei allen Präparaten der 94 eingeschlossenen Patienten, jeweils angefärbt mit einem allgemeinen Gefäßmarker (CD31) sowie mit einem spezifischen Lymphgefäßmarker (D2-40), konnten die MVD, die LVD, die Gesamtfläche der Gefäße und die ROI manuell erhoben werden, um im Weiteren die mittlere Gefäßgröße und die relative Gefäßfläche automatisch durch die Software (ivision-Mac™ 4.5.0) berechnen zu lassen. Diese erhobenen Werte stimmten im zweiten und dritten Messdurchgang in hohem Maße überein und es wurden für die weitere Auswertung die Mittelwerte des zweiten und dritten Messdurchganges verwendet (Intraklassenkorrelationsanalyse: MVD/LVD [0.93], Gesamtfläche der Gefäße [0.97], ROI [0.93]).

Vorab untersuchten wir, ob sich innerhalb der Gruppe der Immunsupprimierten oder der Nicht-Immunsupprimierten ein Unterschied der Vaskularisierung zwischen AK III und invasivem SCC (Krankheitskontinuum) messen lässt. Wir verzichteten bewusst auf die Entität der MB, um die Ergebnisse besser mit denen der Literatur vergleichen zu können. Bei den Immunsupprimierten wiesen die invasiven SCCs um 32 % signifikant mehr Gefäße pro Hotspot ($0,37 \text{ mm}^2$) auf als die AK III ($p = 0.003$). Unter Bonferronikorrektur war diese Zunahme nicht signifikant. Des Weiteren war bei den Immunsupprimierten die Gesamtfläche der Gefäße bei den invasiven SCCs um 45 % signifikant größer als bei den AK III ($p < 0.000625$). Bei der mittleren Gefäßgröße und bei der relativen Gefäßfläche kam es je zu einer signifikanten Zunahme von AK III zu invasiven SCCs, diese hielten aber nicht unter Bonferronikorrektur stand (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15 - Vaskularisierung der AK III und invasiven SCCs bei Immunsupprimierten in der CD31-Färbung

Tumor	[n]	MVD in $n/0,37 \text{ mm}^2$ Mean (95%-CI)	Gesamtfläche der Gefäße in $\mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$ Mean (95%-CI)	Mittlere Gefäßgröße in μm^2 Mean (95%-CI)	Relative Gefäßfläche in % Mean (95%-CI)
AK III	31	20,5 (17,8–23,3)	9707 (8303–11 111)	507 (440–575)	5,02 (4,19–5,86)
SCC invasiv	11	30,2 (22,5–37,7)	17 767 (12 749–22 785)	656 (529–782)	7,41 (6,01–8,81)
p-Wert		0.003**	< 0.000625***	0.030*	0.004**

Tabelle 15. Vergleich der AK III und invasiven SCC von Immunsupprimierten hinsichtlich der MVD, der Gesamtfläche der Gefäße, der mittleren Gefäßgröße und der relativen Gefäßfläche in der CD31-Färbung. Gezeigt sind die Mittelwerte mit zugehörigen 95% Konfidenzintervall der MVD ($n/0,37 \text{ mm}^2$), der Gesamtfläche der Gefäße (μm^2), der mittleren Gefäßgröße ($\mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$) und der relativen Gefäßfläche (%). Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels Student t-Test. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen sind mit *, hoch signifikante ($p < 0.01$) mit ** und höchst signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) mit *** gekennzeichnet. Der hier gekennzeichnete höchst signifikante Unterschied (***) war auch unter Bonferronikorrektur ($p < 0.000625$) signifikant.

Innerhalb der Nicht-Immunsupprimierten ließ sich bei keinem der vaskulären Parameter zwischen AK III und invasivem SCC ein signifikanter Unterschied unter Bonferronikorrektur ($p < 0.000625$) nachweisen, es zeigte sich jedoch eine tendenzielle Zunahme aller vaskulären Parameter von AK III zu invasivem SCC (siehe Tabelle 16).

In der D2-40-Färbung konnte weder bei den Immunsupprimierten noch bei den Nicht-Immunsupprimierten zwischen AK III und invasiven SCC ein signifikanter Unterschied gemessen werden. Die Lymphgefäßparameter der AK III lagen diskret unter denen der invasiven SCCs (je $p > 0.05$), so dass auf eine Darstellung der Tabellen verzichtet wurde.

Tabelle 16 - Vaskularisierung der AK III und invasiven SCCs bei Nicht-Immunsupprimierten in der CD31-Färbung

Tumor	[n]	MVD in n/0,37 mm ² Mean (95%-CI)	Gesamtfläche der Gefäße in µm ² /0,37 mm ² Mean (95%-CI)	Mittlere Gefäßgröße in µm ² Mean (95%-CI)	Relative Gefäßfläche in % Mean (95%-CI)
AK III	14	30,3 (25,1–35,5)	14 871 (11 911–17 831)	501 (410–592)	8,48 (6,16–10,80)
SCC invasiv	12	34,4 (29,0–39,7)	21 638 (17 780–25 497)	634 (529–738)	8,97 (7,80–10,15)
p-Wert		0.27	0.005**	0.053	0.71

Tabelle 16. Vergleich der AK III und invasiven SCC von Nicht-Immunsupprimierten hinsichtlich der MVD, der Gesamtfläche der Gefäße, der mittleren Gefäßgröße und der relativen Gefäßfläche in der CD31-Färbung. Gezeigt sind die Mittelwerte mit zugehörigen 95% Konfidenzintervall der MVD (n/0,37 mm²), der Gesamtfläche der Gefäße (µm²), der mittleren Gefäßgröße (µm²/0,37 mm²) und der relativen Gefäßfläche (%). Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels Student t-Test. Hoch signifikante Unterschiede ($p < 0.01$) zwischen den Gruppen sind mit ** gekennzeichnet. Der hier gekennzeichnete hoch signifikante Unterschied (**) war unter Bonferronikorrektur ($p < 0.000625$) nicht signifikant.

3.2.1 Vaskuläre Parameter der epithelialen Hauttumoren und deren Vorstufen in der CD31-Färbung

Zunächst wurden mit Blick auf die Aggressivität die AK III und MB als Gruppe der SCC *in situ* zusammengefasst zum Vergleich mit den invasiven SCCs. Die MVD der SCCs *in situ* bei den Patienten mit Immunsuppression wies einen um 29 % signifikant niedrigeren Mittelwert von $21,3 \pm 10,4$ Gefäßen pro Hotspot (0,37 mm²) auf als die Patienten ohne Immunsuppression mit $30,1 \pm 11,5$ Gefäßen/0,37 mm² (t-Test, $p < 0.000625$). Dieser Unterschied blieb auch unter Bonferronikorrektur signifikant. Die MVD der invasiven SCCs war bei den Immunsupprimierten ($30,2 \pm 17,1/0,37$ mm²) um 12 % niedriger als die der Nicht-Immunsupprimierten ($34,4 \pm 12,6/0,37$ mm²). Dieser Unterschied war nicht signifikant (t-Test, $p = 0.344$). Die MVD der AK III war bei den Patienten mit Immunsuppression mit einem Mittelwert von $20,5 \pm 10,8/0,37$ mm² um 30 % signifikant niedriger als bei denen ohne Immunsuppression mit $30,3 \pm 13,4/0,37$ mm² (t-Test, $p = 0.001$), jedoch hielt dieser p-Wert nicht unter

Bonferronikorrektur stand. Hinsichtlich der MVD der MB zeigten die Immunsupprimierten einen um 24 % signifikant niedrigeren Mittelwert von $22,6 \pm 9,7/0,7 \text{ mm}^2$ als die Nicht-Immunsupprimierten mit einem Mittelwert von $29,7 \pm 7,6/0,37 \text{ mm}^2$ (t-Test, $p = 0.013$). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant unter Bonferronikorrektur.

Die Gesamtfläche der Gefäße der SCCs *in situ* bei Patienten mit Immunsuppression ($11\,129 \pm 6717 \text{ } \mu\text{m}^2$ pro Hotspot) war um 32 % signifikant kleiner als bei den Patienten ohne Immunsuppression ($16\,305 \pm 8012 \text{ } \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$, t-Test, $p < 0.000625$), auch unter Bonferronikorrektur. In Bezug auf die Gesamtfläche der Gefäße der invasiven SCCs zeigte sich bei den Immunsupprimierten eine um 18 % kleinere Fläche ($17\,767 \pm 11\,318 \text{ } \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$) als bei den Nicht-Immunsupprimierten ($21\,683 \pm 9137 \text{ } \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$, t-Test, $p = 0.207$). Bei der Gesamtfläche der Gefäße der AK III ließ sich bei den Immunsupprimierten eine um 34 % signifikant kleinere Fläche ($9707 \pm 5528 \text{ } \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$) als bei den Nicht-Immunsupprimierten messen ($14\,871 \pm 7633 \text{ } \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$, t-Test, $p = 0.003$). Ebenso waren bei der Gesamtfläche der Gefäße der MB bei den Immunsupprimierten um 28 % signifikant kleinere Flächen ($13\,577 \pm 7867 \text{ } \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$) messbar im Vergleich zu den Nicht-Immunsupprimierten ($18\,816 \pm 8282 \text{ } \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$, t-Test, $p = 0.034$). Die Gesamtflächen der Gefäße der AK III, MB und invasiven SCCs unterschieden sich zwischen den Vergleichsgruppen unter Bonferronikorrektur jedoch nicht signifikant.

Im Hinblick auf die mittlere Gefäßgröße zeigte sich für alle Tumoren kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit Immunsuppression und denen ohne Immunsuppression (jeweils t-Test, alle $p > 0.05$). Jedoch sind bei der mittleren Gefäßgröße der SCCs *in situ* und MB bei Immunsupprimierten eine Tendenz in Richtung kleinere (SCC *in situ*: $552 \pm 280 \text{ } \mu\text{m}^2$ vs. $570 \pm 312 \text{ } \mu\text{m}^2$; MB: $629 \pm 289 \text{ } \mu\text{m}^2$ vs. $691 \pm 395 \text{ } \mu\text{m}^2$) und bei invasiven SCCs und AK III bei Immunsupprimierten eine Tendenz in Richtung größere Werte erkennbar (SCC invasiv: $656 \pm 286 \text{ } \mu\text{m}^2$ vs. $634 \pm 248 \text{ } \mu\text{m}^2$; AK III: $507 \pm 266 \text{ } \mu\text{m}^2$ vs. $501 \pm 234 \text{ } \mu\text{m}^2$).

Die relative Gefäßfläche der SCC *in situ* war bei Patienten mit Immunsuppression im Mittel um 2,4 % signifikant niedriger als bei Patienten ohne Immunsuppression (t-Test, $p = 0.001$). Dieser p-Wert hielt unter Bonferronikorrektur nicht stand. Die relative Gefäßfläche der invasiven SCCs war bei Immunsupprimierten um 1,6 % geringer als bei den Nicht-Immunsupprimierten (t-Test, $p = 0.083$). Bei der relativen Gefäßfläche der AK III zeigten die Patienten mit Immunsuppression um 3,5 % signifikant niedrigere Werte (t-Test, $p = 0.007$), dieser Unterschied war unter Bonferronikorrektur nicht mehr signifikant. Bei der relativen

Gefäßfläche der MB bei Immunsupprimierten zeigten sich niedrigere Werte als bei Patienten ohne Immunsuppression ($p = 0.519$).

Die einzelnen vaskulären Parameter sind für Tumorklassen (Abbildung 12a-d) und Tumoren (Abbildung 13a-d) der Vergleichsgruppen in den folgenden Boxplots für CD31 dargestellt.

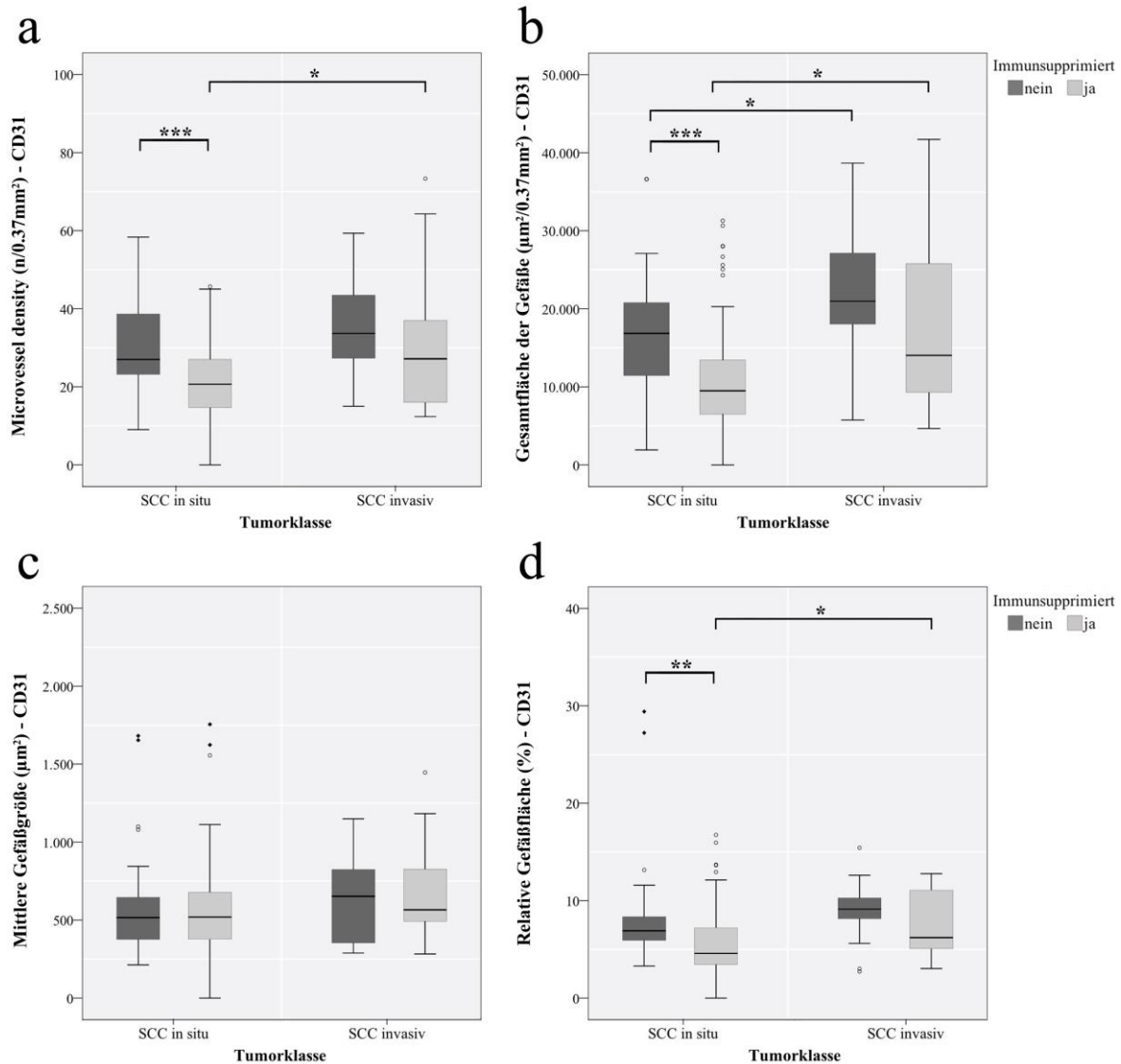


Abb. 12a-d. Vergleich nicht-immunsupprimierter und immunsupprimierter Patienten hinsichtlich der *Microvessel density* (a), der Gesamtfläche der Gefäße (b), der mittleren Gefäßgröße (c) und der relativen Gefäßfläche (d) der Tumorklassen (SCC *in situ*, SCC invasiv) in der CD31-Färbung. Gezeigt sind die Mittelwerte der *Microvessel density* (n/0,37 mm²), der Gesamtfläche der Gefäße (µm²/0,37 mm²), der mittleren Gefäßgröße (µm²) und der relativen Gefäßfläche (%) in gruppierten Boxplots (Nicht-Immunsupprimiert vs. Immunsupprimiert). Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels Student t-Test. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen erfolgte mittels Student t-Test. Signifikante Unterschiede ($p < 0.01$) mit zwei (**) und höchst signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) mit drei Sternen (***) gekennzeichnet. Die hier gekennzeichneten höchst signifikanten Unterschiede (***) waren auch unter Bonferronikorrektur ($p < 0.000625$) signifikant.

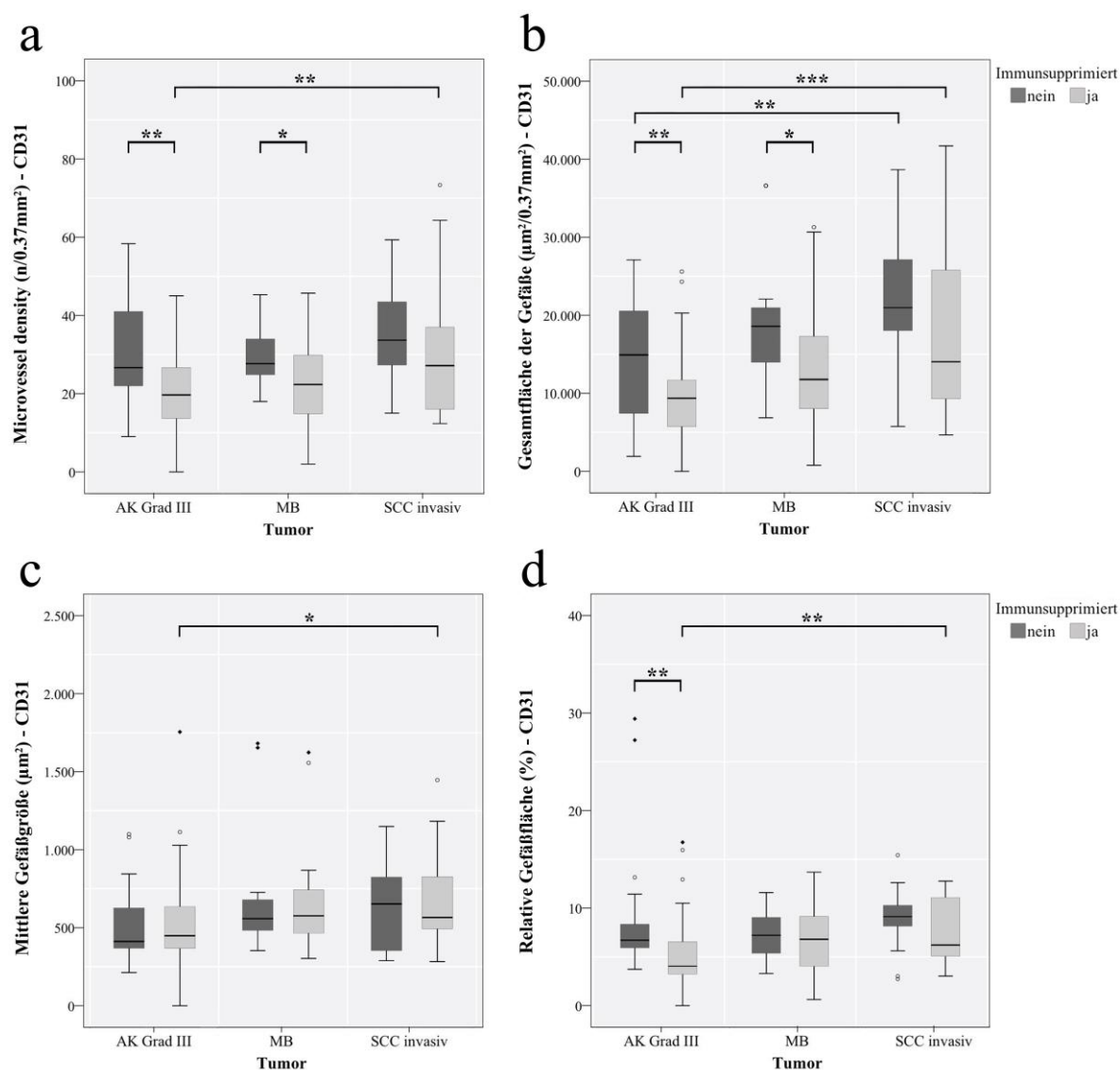


Abb. 13a-d. Vergleich nicht-immunsupprimierter und immunsupprimierter Patienten hinsichtlich der *Microvessel density* (a), der Gesamtfläche der Gefäße (b), der mittleren Gefäßgröße (c) und der relativen Gefäßfläche (d) der einzelnen Tumoren (AK III, MB, SCC invasiv) in der CD31-Färbung. Gezeigt sind die Mittelwerte der *Microvessel density* (n/0,37 mm²), der Gesamtfläche der Gefäße (µm²/0,37 mm²), der mittleren Gefäßgröße (µm²) und der relativen Gefäßfläche (%) in gruppierten Boxplots (Nicht-Immunsupprimiert vs. Immunsupprimiert). Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels Student t-Test. Ausreißer sind mit einem weißen Kreis gekennzeichnet, Extremwerte mit einer schwarzen Raute. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen sind mit einem Stern (*), hoch signifikante ($p < 0.01$) mit zwei (**) und höchst signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) mit drei Sternen (***) gekennzeichnet. Der hier gekennzeichnete höchst signifikante Unterschied (***) war auch unter Bonferronikorrektur ($p < 0.000625$) signifikant.

3.2.2 Lymphgefäßparameter der epithelialen Hauttumoren und deren Vorstufen in der D2-40-Färbung

Unter Anfärbung mit dem Lymphgefäßmarker D2-40 zeigte sich die LVD der SCCs *in situ* von immunsupprimierten Patienten mit einem Mittelwert von $5,1 \pm 2,8$ Gefäßen pro Hotspot um 12 % niedriger als bei denen ohne Immunsuppression mit $5,8 \pm 3/0,37 \text{ mm}^2$ (t-test, $p = 0.191$). Hingegen war die LVD der invasiven SCCs von Immunsupprimierten um 8 % höher ($6 \pm 2,5/0,37 \text{ mm}^2$) als die von Nicht-Immunsupprimierten ($5,5 \pm 2,1/0,37 \text{ mm}^2$, t-Test, $p = 0.405$). Bei der LVD der AK III fanden sich um 6 % niedrigere und bei der LVD der MB um 20 % signifikant niedrigere Werte bei den Immunsupprimierten als bei den Nicht-Immunsupprimierten (AK III: $4,9 \pm 3,1/0,37 \text{ mm}^2$ vs. $5,2 \pm 3,4/0,37 \text{ mm}^2$, t-Test, $p = 0.686$; MB: $5,4 \pm 2,1/0,37 \text{ mm}^2$ vs. $6,8 \pm 2/0,37 \text{ mm}^2$, t-Test, $p = 0.033$). Die Unterschiede hinsichtlich der LVD zwischen den Immunsupprimierten und den Nicht-Immunsupprimierten waren unter Bonferronikorrektur nicht signifikant.

In Bezug auf die Gesamtfläche der Gefäße wiesen die SCCs *in situ* bei Patienten mit Immunsuppression eine um 26 % signifikant kleinere Fläche ($3676 \pm 3115 \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$) auf als bei den Patienten ohne Immunsuppression ($4968 \pm 3224 \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$, t-test, $p = 0.025$). Die Gesamtfläche der Gefäße der invasiven SCCs bei Immunsupprimierten zeigte einen um 38 % kleineren Mittelwert von $3656 \pm 2156 \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$ als bei Nicht-Immunsupprimierten ($5849 \pm 4927 \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$, t-test, $p = 0.056$). Ebenfalls war die Gesamtfläche der Gefäße der AK III von Patienten mit Immunsuppression ($3134 \pm 2504 \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$) um 27 % signifikant kleiner als bei Patienten ohne Immunsuppression ($4267 \pm 2510 \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$, t-test, $p = 0.05$). Auch die Gesamtfläche der Gefäße der MB von Immunsupprimierten hatte einen um 26% kleineren Mittelwert ($4610 \pm 3815 \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$) als von Nicht-Immunsupprimierten ($6195 \pm 3991 \mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$, t-test, $p = 0.179$). Diese Unterschiede zwischen den Immunsupprimierten und den Nicht-Immunsupprimierten in Bezug auf die Gesamtfläche der Gefäße erreichten jedoch keine statistische Signifikanz unter Bonferronikorrektur.

Hinsichtlich der mittleren Gefäßgröße der SCCs *in situ* wurde bei den Immunsupprimierten ein um 26 % niedrigerer Mittelwert von $760 \pm 715 \mu\text{m}^2$ als bei den Nicht-Immunsupprimierten ($1024 \pm 793 \mu\text{m}^2$) gemessen (t-test, $p = 0.051$). Die mittlere Gefäßgröße der invasiven SCCs war von Patienten mit Immunsuppression im Mittel um 40 % signifikant niedriger ($708 \pm 364 \mu\text{m}^2$) als von Patienten ohne Immunsuppression ($1177 \pm 888 \mu\text{m}^2$, t-test, $p = 0.024$). Auch bei der mittleren Gefäßgröße der AK III zeichnete sich ein um 32 % niedrigerer Mittel-

wert bei den Immunsupprimierten ($692 \pm 744 \mu\text{m}^2$) im Vergleich zu den Nicht-Immunsupprimierten ($1016 \pm 833 \mu\text{m}^2$, t-test, $p = 0.068$) ab. Die mittlere Gefäßgröße der MB war um 15 % niedriger bei den Patienten mit Immunsuppression ($878 \pm 655 \mu\text{m}^2$) als bei den Patienten ohne Immunsuppression ($1039 \pm 745 \mu\text{m}^2$, t-test, $p = 0.437$). Trotz der sich abzeichnenden Tendenz von niedrigeren Werten bei den Immunsupprimierten unterschieden sich alle mittleren Gefäßgrößen zwischen den Immunsupprimierten und den Nicht-Immunsupprimierten nicht signifikant unter Bonferronikorrektur.

Im Hinblick auf die relative Gefäßfläche der SCCs *in situ* der Patienten mit Immunsuppression zeigte sich ein um 0,3% niedrigerer Mittelwert als bei den Patienten ohne Immunsuppression (t-Test, $p = 0.362$). Die relative Gefäßfläche der invasiven SCCs der Immunsupprimierten zeigte einen um 1,09 % signifikant kleineren Mittelwert als die von Nicht-Immunsupprimierten mit $2.7 \pm 2,07$ % (t-Test, $p = 0.025$). Dieser Unterschied erreichte keine statistische Signifikanz unter Bonferronikorrektur. Bei der relativen Gefäßfläche der AK III ließ sich ein um 0,37 % kleinerer Mittelwert bei den Patienten mit Immunsuppression im Vergleich zu den Patienten ohne Immunsuppression nachweisen. Dieser Unterschied war nicht signifikant (t-Test, $p = 0.407$). Die relative Gefäßfläche der MB der Immunsupprimierten unterschied sich um 0,19 % von den Nicht-Immunsupprimierten (t-Test, $p = 0.693$).

Für D2-40 sind die einzelnen vaskulären Parameter für Tumorklassen (Abbildung 14a-d) und Tumoren (Abbildung 15a-d) in den folgenden Boxplots dargestellt.

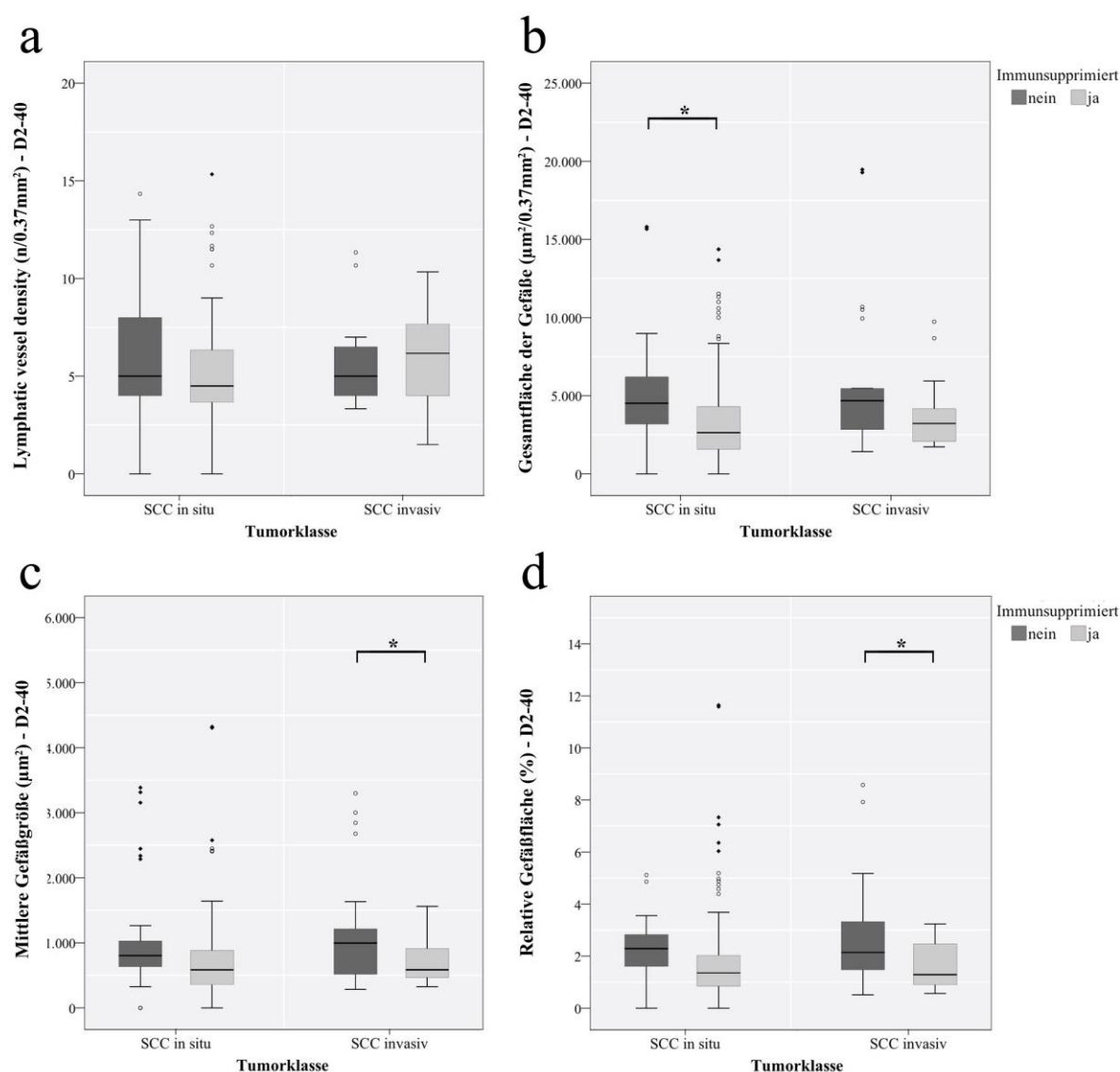


Abb. 14a-d. Vergleich nicht-immunsupprimierter und immunsupprimierter Patienten hinsichtlich der *Lymphatic vessel density* (a), der Gesamtfläche der Gefäße (b), der mittleren Gefäßgröße (c) und der relativen Gefäßfläche (d) der Tumorklassen (SCC *in situ*, SCC invasiv) in der D2-40-Färbung. Gezeigt sind die Mittelwerte der *Lymphatic vessel density* ($n/0,37\text{mm}^2$), der Gesamtfläche der Gefäße ($\mu\text{m}^2/0,37\text{mm}^2$), der mittleren Gefäßgröße (μm^2) und der relativen Gefäßfläche (%) in gruppierten Boxplots (Nicht-Immunsupprimiert vs. Immunsupprimiert). Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels Student t-Test. Ausreißer sind mit einem weißen Kreis gekennzeichnet, Extremwerte mit einer schwarzen Raute. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen sind einem Stern (*) gekennzeichnet. Die hier gekennzeichneten signifikanten Ergebnisse (*) waren unter Bonferronikorrektur ($p < 0.000625$) nicht signifikant.

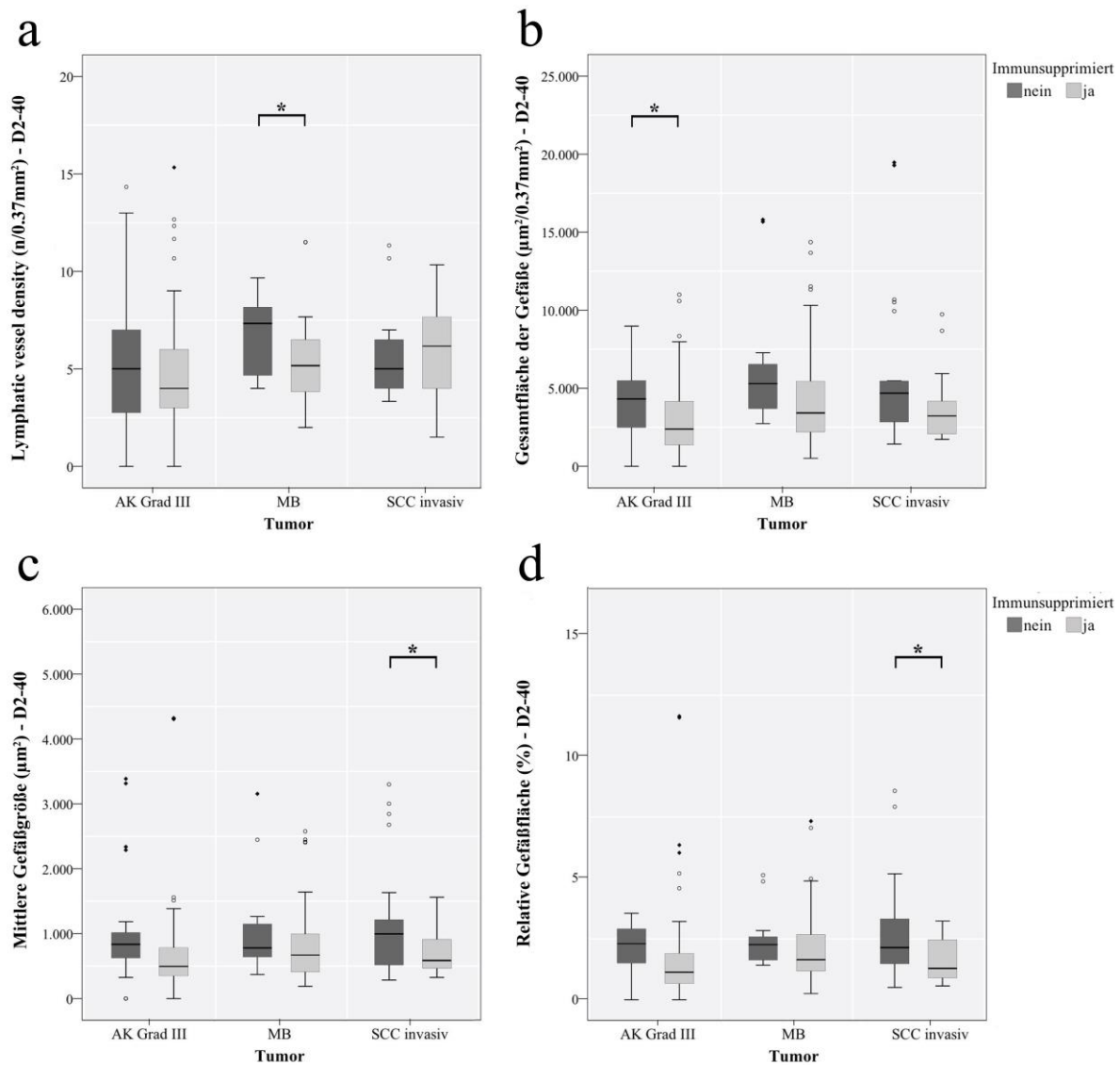


Abb. 15a-d. Vergleich nicht-immunosupprimierter und immunosupprimierter Patienten hinsichtlich der *Lymphatic vessel density* (a), der Gesamtfläche der Gefäße (b), der mittleren Gefäßgröße (c) und der relativen Gefäßfläche (d) der einzelnen Tumoren (AK III, MB, SCC invasiv) in der D2-40-Färbung. Gezeigt sind die Mittelwerte der *Lymphatic vessel density* ($n/0.37\text{mm}^2$), der Gesamtfläche der Gefäße (μm^2), der mittleren Gefäßgröße ($\mu\text{m}^2/0.37\text{mm}^2$) und der relativen Gefäßfläche (%) in gruppierten Boxplots (Nicht-Immunsupprimiert vs. Immunsupprimiert). Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels Student t-Test. Ausreißer sind mit einem weißen Kreis gekennzeichnet, Extremwerte mit einer schwarzen Raute. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die hier gekennzeichneten signifikanten Ergebnisse (*) waren unter Bonferronikorrektur ($p < 0.000625$) nicht signifikant.

3.2.3 Multivariate Regressionsanalyse für die MVD (CD31) und LVD (D2-40)

Da die MVD bzw. LVD etablierte, verlässliche Parameter in der Angiogeneseforschung sind [94, 121], sollten im nächsten Schritt für die MVD bzw. LVD unabhängige Einflussfaktoren determiniert werden. In einer multivariaten Regressionsanalyse wurde untersucht von welchen Einflussfaktoren die MVD bzw. LVD abhängen. Es stellte sich die Frage, ob die gefundenen signifikanten Unterschiede der MVD bzw. LVD zwischen den immunsupprimierten und nicht-immunsupprimierten Patienten auch unabhängig von beeinflussenden Störgrößen wie Gruppenunterschiede in Alter, Geschlecht, Tumorklasse, Tumor oder Tumorlokalisierung bestehen.

Die multivariate Regressionsanalyse identifizierte die Immunsuppression, das Geschlecht und die Tumorklasse (*in situ* oder invasives SCC) als signifikanten Einflussfaktor auf die MVD (CD31-Färbung). Das Alter, die unterschiedlichen Tumoren innerhalb der Klasse und die Exzisionsstelle nahmen keinen signifikanten Einfluss auf die MVD. Auf die LVD (D2-40-Färbung) ließ sich überhaupt kein signifikanter Einfluss durch die untersuchten klinischen Charakteristika nachweisen. Tabelle 17 zeigt den Einfluss der einzelnen klinischen Charakteristika des Patientenkollektives auf die Größe der MVD oder LVD.

Tabelle 17 - Abhängigkeiten der MVD und LVD - Multivariate Regressionsanalyse

Charakteristika	[n]	MVD (CD31)		LVD (D2-40)	
		n/0,37 mm ²	p-Wert	n/0,37 mm ²	p-Wert
Gesamt	94				
Immunsupprimiert			< 0.001*		0.35
nein	34	31,6		5,65	
ja	60	22,9		5,24	
Alter (Jahre)			0.47		0.81
36–45	2	50,2		7,33	
46–55	16	19,6		5,34	
56–65	18	23,9		4,63	
66–75	41	27,3		5,67	
76–85	15	26,3		5,42	
86–95	2	45,3		4,67	
Geschlecht			0.006*		0.67
m	78	27,5		5,40	
w	16	19,3		5,32	
Tumorklasse			0.007*		0.47
SCC <i>in situ</i>	71	24,0		5,28	
SCC invasiv	23	32,4		5,73	
Tumor			0.27		0.07
AK III	45	23,6		4,98	
MB	26	24,8		5,80	
SCC invasiv	23	32,4		5,73	
Tumorlokalisation			0.30		0.21
Kopf	56	25,0		5,05	
OK	27	29,6		6,06	
UK	6	25,7		5,53	
keine Angabe	5	19,7		5,45	

Tabelle 17. Untersuchung der Einflussgrößen auf die MVD (CD31) und auf die LVD (D2-40) hinsichtlich des Status der Immunsuppression, Alter, Geschlecht, Tumorklasse, Tumor und Tumorlokalisation. Gezeigt sind für Geschlecht, Alter (nach Einteilung in Klassen), Tumorklasse, Tumor und Tumorlokalisation die absoluten Anzahlen der Patienten und jeweils der zugehörige Mittelwert der MVD (n/0,37 mm²) und der LVD (n/0,37 mm²). Statistische Testung auf die Stärke des Einflusses für die MVD und die LVD erfolgte für den Status der Immunsuppression, die Altersklassen, das Geschlecht, die Tumorklasse, die einzelnen Tumoren sowie die Tumorlokalisation (ohne „keine Angabe“) mittels multivariater Regressionsanalyse. Signifikante Unterschiede (p < 0.05) zwischen den Gruppen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

4 Diskussion

Immunsupprimierte weisen im Vergleich mit Nicht-Immunsupprimierten eine 65-200fach höhere Inzidenz an Plattenepithelkarzinomen (SCCs) auf [50, 85]. Die SCCs von Immunsupprimierten weisen ein schnelles und aggressives Wachstumsverhalten auf [49, 51, 52]. Diese Arbeit hatte zum Ziel zu beschreiben, ob Unterschiede in der Vaskularisierung, speziell auch der Lymphgefäße, im Rahmen der Tumorgenese der SCCs zwischen Patienten mit Immunsuppression und ohne Immunsuppression messbar sind, welche einen Hinweis auf eine veränderte Tumorgenese von Immunsupprimierten geben.

Zusammensetzung der Patientenkollektivs

60 SCCs von Immunsupprimierten wurden mit 34 SCCs von Nicht-Immunsupprimierten verglichen. Die statistische Testung auf Unterschiede zeigte, dass die Gruppen homogen und vergleichbar sind, da keine Unterschiede in Bezug auf Geschlecht, Tumorklasse und Tumoren bestehen (Tabelle 13). Jede Vergleichsgruppe weist mehr Männer als Frauen auf. Mit Blick auf SCCs ist das männliche Geschlecht ein bekannter Risikofaktor [59], hierfür sind der unterschiedliche Kopfbehaarungstyp und die höhere Sonnenlichtexposition im beruflichen und privaten Bereich verantwortlich [18]. Hinzu kommt, dass generell mehr Männer ein Transplantat empfangen [151]. Die Immunsupprimierten waren um 9 Jahre signifikant jünger als die Nicht-Immunsupprimierten. Das Risiko unter Immunsuppression früher an einem SCC zu erkranken, deckt sich mit den Angaben in der Literatur [49, 51, 52]. Abhängig vom Alter zum Zeitpunkt der Transplantation tritt ein Hauttumor im Alter von 40 Jahren nach 8 Jahren auf, hingegen bei über 60-Jährigen schon nach 3 Jahren [49]. Bei den Herztransplantierten in unserer Studie (n = 16) traten die SCCs (*in situ* oder invasiv) nach 6–11 Jahren auf. In der Literatur finden sich Angaben, dass sich das erste SCC im Mittel 2,5 Jahre nach der Herztransplantation ereignet [51]. Bedingt vergleichbar sind die Daten, da in unserem retrospektivem Studiendesign nicht erfassbar war, ob es sich um ein Erstereignis des SCCs handelt. Der signifikante Unterschied zwischen den Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten im Hinblick auf die Tumorlokalisation ist möglicherweise auf die ungleiche Gruppengröße zurückzuführen. Die einzelnen Tumoren zeigten unabhängig von der Immunsuppression eine für die SCCs typische Verteilung entlang der Sonnenterrassen [45, 49].

Unter den Immunsupprimierten sind die Nierentransplantierten am stärksten vertreten, vergleichbar mit den Zahlen der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) aus dem Jahr 2012 [33]. In der Literatur bilden die Nierentransplantierten die häufigste Untersuchungsgruppe ab, da mit der Dauer der Immunsuppression und der Sonnenexposition das Risiko für ein SCC ansteigt und die Nierentransplantierten lange genug leben um ein SCC zu entwickeln [53]. Aufgrund der ungleichen Gruppengrößen der verschiedenen Transplantationsgruppen bietet sich lediglich ein Vergleich zwischen Nieren- und Herztransplantierten an. Die Gruppenzahl der Leber- und Knochenmarktransplantierten ist zu klein. Der signifikante Unterschied zwischen den Transplantationsgruppen bezüglich der "Tumoren" ist auf die unverhältnismäßig hohe Anzahl der Morbus Bowen (MB) bei den Nierentransplantierten zurückzuführen. In dieser Studie traten die invasiven SCCs am häufigsten bei den Herztransplantierten auf, was sich durch das intensivere immunsuppressive Regime erklären lässt [49, 83–85].

4.1 Computergestützte Bildanalyse zur Quantifizierung der Gefäße und deren Anwendbarkeit bei epithelialen Hauttumoren

Evaluation der Methode zur Quantifizierung der Vaskularisierung und deren Anwendbarkeit bei SCCs der Haut

Wir entschieden uns für die MVD-Methode, da diese Methode sich als morphologischer Goldstandard [94, 121] für die Messung der Angiogenese bei zahlreichen Tumoren etabliert hat [120]. Generell gibt es bei der MVD-Methode zwei subjektive Schritte, die stark vom Untersucher abhängen: Erstens die Auswahl der Hotspots und zweitens die Entscheidung, ob es sich um ein zusammenhängendes oder zwei einzelne Gefäße handelt [127]. Der zweite Schritt, die Entscheidung, ob es sich um ein oder zwei Gefäße handelt, wird bei der Chalkley-Methode vermieden. In der Literaturrecherche finden sich etwa 50 mal so viele Arbeiten, die original oder in einer computergestützten Form die MVD-Methode [119] angewendet haben als Arbeiten, die die Chalkley-Methode [126] verwendet haben. Das beweist nicht die Richtigkeit der MVD-Methode, ist aber ein Beweis für deren Praktikabilität. Wäre das Chalkley-Gitternetz (für das Okular oder den Computer) frei verfügbar, würde die Methode nicht nur in der Forschung, sondern auch in der alltäglichen Routinediagnostik möglicherweise mehr Anwendung finden. Die Übertragung des Chalkley-Okular-Gitternetzes auf den Computer zeigt die computergestützte Weiterentwicklung dieser Methode [152]. Zukunftsweisend wäre eine computergestützte Methode mit einem standardisierten Algorithmus in Verbindung mit

Wholescan-slide-Automaten, welche derzeit aufgrund vergleichsweise unwirtschaftlicher Kosten in der Forschungspraxis scheitert [129]. Ein *Wholescan-slide*-Automat würde die Angiogenese des gesamten Tumors erfassen und nicht nur die Angiogenese in einem histologischen Schnitt. In der eigenen Studie ließ sich die komplett automatische Quantifizierung der Gefäße durch die Software nicht umsetzen, da der Grenzbereich zwischen nicht-endothelialen Strukturen und Endothelzellen nicht eindeutig genug war, so dass eine manuelle Korrektur notwendig gewesen wäre.

Der erste subjektive Schritt, den beide Methoden (MVD, Chalkley) gemeinsam haben, ist die Auswahl des Hotspots im histologischen Schnitt. Klinisch kann die aktinische Feldkanzerisierung auch durch Teleangiektasien und ein flächiges Erythem imponieren [153]. Bei den AK III müsste man sich im Sinne der aktinischen Feldkanzerisierung [7] bei der Anwendung der MVD-Methode fragen, inwiefern die Angiogenese lokal und tumorgebunden an der AK III auftritt oder ob sich Hotspots in der gesamten aktinisch geschädigten Haut finden lassen würden. Das Zählen der identifizierten Gefäße kann durch den Menschen (Fehlerquelle) oder in unserer computergestützten Methode nach manueller Markierung automatisch durch den Computer erfolgen.

Auswahl der immunhistochemischen Marker

Welcher der geeignetste immunhistochemische Marker zur Darstellung der Gefäße ist, wird kontrovers diskutiert [154]. Unsere Forschungsgruppe hatte gute Erfahrungen mit den Markern CD31 und D2-40 gemacht, diese waren zu Beginn der Studie in unserem Labor verfügbar. In der eigenen Studie zeigten CD31 und D2-40 ein exzellentes Ergebnis mit positiver Anfärbung der Zielstruktur ohne unspezifische Hintergrundfärbung, welches die Durchführung der computergestützten Bildanalyse der Gefäße ermöglichte. Das weit verwendete CD31 ist ein spezifischer und sensitiver Marker für Endothelzellen, der in zahlreichen Arbeiten bei der Durchführung der MVD-Methode erfolgreich eingesetzt wurde [155–158]. Mittlerweile wird dem neueren anti-CD105 Antikörper (Endoglin) eine größere Aussagekraft für aktiv proliferierendes Endothelgewebe [121] in der Tumorneoangiogenese zugesprochen [159]. CD105 ist ein homodimeres Membranglykoprotein auf Endothelzellen, welches ein zusätzlicher Rezeptor für *Transforming growth factor- β* (TGF- β) ist [160]. Es gibt neuere Arbeiten, die den Quotienten aus der MVD von CD105 zu CD31 bestimmen: Pastushenko *et al.* maßen bei Patienten ohne Immunsuppression signifikant mehr Gefäße bei SCCs im Vergleich zu

BCCs (CD31 und CD105; je Chalkley), aber die SCCs wiesen einen geringeren Anteil an proliferierenden Gefäßen (Quotient CD105/CD31) auf. Sie formulierten daher die Hypothese einer Angiogenese der SCCs per Intussuszeption, welche nicht von proliferierenden Endothelzellen abhängt und dadurch schneller und ökonomischer sei als die Aussprossung [161].

Validität des Messverfahrens für die Fläche eines Gefäßes (2D- vs. 3D-Verfahren)

Es stellt sich die Frage, inwiefern man in einem histologischen Schnitt mit einem 2D-Verfahren eine differenzierte Aussage zur einnehmenden Fläche der Gefäße eines Tumors treffen kann. Anhand der Gefäßfläche, der mittleren Gefäßgröße und der relativen Gefäßfläche möchte man eine vergleichbare Zahl zur Qualität der Gefäße (Größe, Form, Volumen) erhalten, die in ihrer Validität her fraglich sind. In einer 3D-Analyse wäre das Gefäß mit seinem Volumen als Ganzes erfassbar, und somit wären diese Parameter (Gesamtfläche der Gefäße, mittlere Gefäßgröße, relative Gefäßfläche) verlässlicher zu vergleichen. Der Winkel, in dem das Gefäß in seinem verzweigten Verlauf geschnitten wird, ist variabel. Wenn ein sich verzweigendes Gefäß so geschnitten wird, dass es als ein ganzes wahrgenommen wird, trifft man falsche Aussagen zum Durchmesser. Dies betrifft zwar jeden Schnitt, so dass der Fehler bei jedem Schnitt in gleichem Maße begangen wurde, dennoch sind viele Variablen im Prozess, die nicht kontrollierbar sind. Um beim multiplen Testen die *Family wise error rate* zu kontrollieren, fand die Bonferronikorrektur [149, 150] Anwendung und führte zur Senkung des Signifikanzniveaus ($p < 0.05/80$ durchgeführte Tests = $p < 0.0006125$). Somit war die Gefahr fälschlich signifikant bezeichneter Ergebnisse (inflationär viele signifikante Unterschiede) an die Anzahl der durchgeführten Tests ($n = 80$) adjustiert. Die Gesamtfläche der Gefäße ist ein Parameter, der feine morphologische Unterschiede der Gefäße bei gleichbleibender Anzahl früh detektieren kann. Abhängig davon, wie das Gewebe in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurde, können die Gefäße unterschiedlich stark komprimiert sein. Außerdem besteht eine Differenz in der Fläche von längs- zu querschnittenen Gefäßen. Das Verhältnis von längs- zu querschnittenen Gefäßen in der Verteilung ist kein Kriterium bei der Auswahl der Hotspots. In die Berechnung der mittleren Gefäßgröße und der relativen Gefäßfläche geht die Gesamtfläche ein. Daher sind auch die mittlere Gesamtgröße und die relative Gefäßfläche in ihrer Aussagekraft fraglich. Da eine Manipulation der Ergebnisdarstellung vermieden werden sollte, wurden alle Parameter im Ergebnisteil gezeigt und die Bonferronikorrektur durchgeführt.

4.2 Vergleich der Vaskularisierung der epithelialen Hauttumoren und deren Vorstufen

In der weiteren Diskussion wird der Fokus vor allem auf die MVD und LVD gelegt, da diese etablierte, verlässliche Parameter in der Angiogeneseforschung sind [94, 121]. Bei der MVD geht die absolute Anzahl der Gefäße ein ohne Einfluss der variablen Morphe von Gefäßen. Eine hohe MVD beim Mamma-, Prostata-, nicht kleinzelligen Lungen-, Ovarial-, Zervix-, Endometrium-, Blasen-, Nieren-, Gallenblasenkarzinom, malignen Melanom, multiplen Myelom, hepatozellulären und hepatobiliären Karzinom sowie bei SCCs von Kopf- und Halsbereich, ZNS-Tumoren, gastrointestinalen Tumoren und testikulären Keimzelltumoren korreliert mit einem beschleunigten, aggressiven Tumorwachstum, welches zu einem kürzeren rezidivfreiem Überleben und kürzerem Gesamtüberleben führt [120]. Dennoch gibt es auch Arbeiten die zu widersprüchlichen Ergebnissen kamen. Herbst *et al.* fanden bei Nierenzellkarzinomen mit einer computergestützten MVD-Methode (CD31, Weidner) heraus, dass eine niedrige MVD mit einem hohem Malignitätsgrad (ansteigendem *nuclear grade* und proliferativer Aktivität), verkürztem rezidivfreiem Überleben und hoher Metastasierung korrelierte [162].

4.2.1 Vergleich des *Angiogenic switch* innerhalb der Gruppe der Immunsupprimierten und der Nicht-Immunsupprimierten anhand der CD31-Färbung (ad Ziel 1)

Der *Angiogenic switch*, im eigentlichen Sinne der Übergang von einem avaskulären zu einem vaskularisierten Tumor, wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Tumorgenese (während zunehmender Invasionstiefe und Tumordicke) des SCCs vermutet [93, 158, 159, 163–165]. Wenn wir von einem Krankheitskontinuum von AK I über AK II über AK III zum invasiven SCC ausgehen, zeigten unsere Ergebnisse, dass der *Angiogenic switch* bei Immunsupprimierten zwischen AK III und invasivem SCC stattfindet: Es kommt zu einer Zunahme von im Mittel 32 % mehr Gefäßen pro Hotspot ($p = 0.003$, nicht signifikant unter Bonferronikorrektur) und zu einer signifikanten Zunahme der Gesamtfläche der Gefäße um 45 % ($p < 0.000625$), was sich mit den Ergebnissen bei Nicht-Immunsupprimierten deckt [93, 163–165]. Florence *et al.* maßen mit der Chalkley-Methode die Angiogenese (CD105) von gesunder Haut und AK, der Beschreibung nach vergleichbar mit AK III, und invasivem SCC, diese wurden weiter unterteilt in "oberflächlich invasive" und "invasive" SCCs. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass der *Angiogenic switch* früh, im Übergang von AK III zu invasivem SCC, stattfindet [159]. Auch Nijsten *et al.* konnten einen signifikanten Zuwachs an Gefäßen zwischen AK und

invasiven SCCs messen (CD 34, Chalkley) [164]. Hanahan und Folkman beschrieben im experimentellen Mausmodell für Dysplasien des Zervixepithels, einem Plattenepithel ähnlich der Haut, dass eine erhöhte Anzahl von Gefäßen bereits unterhalb der Basalmembran des dysplastischen Epithels vorzufinden war, bevor das invasive Wachstum begonnen hatte und befürworteten einen "frühen" *Angiogenic switch* [93]. Auch Smith-McCune *et al.* befürworteten nach Untersuchung der Tumorgenese der SCCs im transgenen Mausmodell einen frühen *Angiogenic switch* vor Eintritt des Invasionsstadiums [163]. Coussen *et al.* konnten im transgenen Mausmodell ein prominentes dermales Stroma-*Remodeling* bereits im prämaligen Stadium nachweisen, welches möglicherweise die Invasion sowie die Angiogenese begünstigt [165].

Hingegen nimmt in der eigenen durchgeführten Studie bei Nicht-Immunsupprimierten die MVD von AK III zu invasiven SCCs nur um 12 % (ca. 4 Gefäße pro $0,37 \text{ mm}^2$, $p = 0.273$) nicht signifikant zu, dieser Unterschied steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der o.g. Studien [93, 159, 163–165], entspricht aber den Ergebnissen von Strieth *et al.* [158]. Strieth *et al.* maßen bei Nicht-Immunsupprimierten die MVD (CD31, Weidner) von normaler Haut, den verschiedenen Stufen von AK (vor der Einführung der Klassifikation in AK I–III) und invasiven SCCs, unterteilt in *early* (< 2 mm Tumordicke, bis in die Unterhaut) und *late* (> 2 mm Tumordicke, bis ins Fettgewebe). Aufgrund der signifikanten Zunahme der MVD zwischen *early* und *late* invasiven SCCs kamen sie zu dem Schluss, dass der *Angiogenic switch* spät (zwischen *early* und *late* invasiven SCCs) stattfindet. Im Vergleich zu normaler Haut und den "frühen" AK war die MVD bei "fortgeschrittenen" AK nur leicht erhöht [158]. Entsprechend den Ergebnissen von Strieth *et al.* maßen Florence *et al.* (Chalkley, CD105) neben der signifikanten Zunahme zwischen AK und "oberflächlich invasiven" SCC, auch zwischen den "oberflächlich invasiven" und "invasiven" SCCs eine signifikante Zunahme an Gefäßen [159]. Im Vergleich mit den eigenen Ergebnissen ist anzumerken, dass in unserer Studie die Tumordicken der invasiven SCCs nicht differenziert betrachtet wurden. Die invasiven SCCs der Immunsupprimierten sind vermutlich vergleichbar mit den *early* invasiven SCCs bei Strieth *et al.*, da die Haut von Immunsupprimierten engmaschigen klinischen Kontrollen unterliegt. Hier liegt möglicherweise in der von uns durchgeführten Studie ein Selektionsbias bei der Auswahl der Patienten vor. Organtransplantierte werden angehalten, sich regelmäßig (jährlich), vor allem nach Erstereignis (alle 3 Monate in den ersten 2 Jahren), beim Dermatologen zur Nachsorge vorzustellen [3]. Die invasiven SCCs werden in der Regel früher entdeckt als die von Nicht-Immunsupprimierten, die im Rahmen des höchstens 2-jährlichen Hautkrebs-

screenings vorstellig werden, sofern dieses in Anspruch genommen wird. Somit wird der bei Strieth *et al.* gefundene signifikante Unterschied in der Vaskularisierung zwischen *early* und *late* invasiven SCCs in unserer Studie nicht abgebildet. Bei Strieth *et al.* zeigte sich bei Nicht-Immunsupprimierten wie in unserer Studie keine signifikante Zunahme von AK III zu invasiven SCCs [158]. Jedoch kommt es bei den Immunsupprimierten hinsichtlich der MVD zu einer 32 %igen Zunahme von AK III zu invasivem SCC ($p = 0.003$, hoch signifikant ohne Bonferronikorrektur). Da sich alle vaskulären Parameter der invasiven SCCs zwischen Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten nicht unterscheiden, bleibt offen, ob die invasiven SCCs bei Immunsupprimierten mit zunehmender Tumordicke (*early*: < 2 mm vs. *late*: > 2 mm) noch einmal einen signifikanten Zuwachs an Gefäßen erfahren und ob dieser Zuwachs dann vergleichbar mit dem Zuwachs bei Nicht-Immunsupprimierten ist.

Vergleicht man die Zunahme der MVD zwischen Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten, kommt es innerhalb der Gruppe der Immunsupprimierten zu einem größeren Zuwachs der MVD, welcher als Maß für eine höhere Aggressivität des Tumors herangezogen werden könnte (mehr Gefäße von AK III zu invasivem SCC). Die Tumorklasse als Maß für die Aggressivität (SCC *in situ* vs. invasiv) war eine signifikante Einflussgröße auf die MVD ($p = 0.007$).

4.2.2 Vergleich zwischen den Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten hinsichtlich der Unterschiede in der Vaskularisierung anhand der CD31-Färbung (ad Ziel 2)

Hinsichtlich der MVD und der Gesamtfläche der Gefäße der SCC *in situ* zeigten sich im Vergleich von Immunsupprimierten mit Nicht-Immunsupprimierten signifikante Unterschiede (je $p < 0.000625$). Bei der MVD und der Gesamtfläche der Gefäße der AK III zeigten sich im Vergleich von Immunsupprimierten zu Nicht-Immunsupprimierten signifikante kleinere Werte (MVD: $p = 0.001$, Gesamtfläche der Gefäße: $p = 0.003$). Diese p-Werte hielten zwar unter Bonferronikorrektur nicht stand, es zeigt sich eine deutliche Tendenz zu kleineren Werten. Bei den MB und invasiven SCCs konnte kein solcher Unterschied der Vaskularisierung festgestellt werden. Die signifikanten Unterschiede bestanden folglich bevor der Tumor die Basalmembran durchbrochen (SCC *in situ*) und das invasive Wachstum begonnen hatte. Rückblickend wäre noch interessant, inwiefern sich die MVD bei normaler Haut, AK I und AK II von Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten unterscheidet. Dies war aufgrund des

retrospektiven Studiendesigns nicht möglich, da die Hautproben im Rahmen der Diagnostik und Therapie entnommen worden waren. Im Rahmen einer prospektiven wissenschaftlichen Studie hätte zum Vergleich parallel eine Probe aus gesunder Haut entnommen werden müssen. Finden sich bei Immunsupprimierten in den SCCs *in situ* mehr Gefäße als in nicht betroffener Haut? Der Randbereich war nicht bei allen Schnitten mit abgebildet und eine Methode zum standardisierten Zählen der Gefäße im Randbereich war in der Planung der Studie nicht mitangelegt. Da sich die Hotspotmethode bei den Schnitten anwenden ließ, lässt sich rückwirkend sagen, dass die Gefäßverteilung heterogen innerhalb des Schnittes war. Bei Durchsicht der Präparate ließ sich im Randbereich beim Übergang zur gesunden Haut zwischen Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten kein offensichtlicher Unterschied erkennen. Offen bleibt die Frage, ob bei Immunsupprimierten generell weniger Gefäße in der Haut zu messen sind oder ob dieser Unterschied lokal an maligne veränderter Haut besteht.

Zusammenfassend für SCCs lässt sich vor dem Hintergrund der Literatur und den Ergebnissen der eigenen Studie vermuten, dass bei Immunsupprimierten der *Angiogenic switch* zwischen AK III und invasivem SCC früh stattfindet, aber letztendlich nach Erreichen eines invasiven Tumorstadiums die MVD keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten aufweist. Wenn einmal die Tumorgenese vollzogen und das invasive SCC entstanden ist, besteht vermutlich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Gefäße. Insgesamt ist die Vergleichbarkeit durch die Unterschiede in der Methodik der durchgeführten Studien schwierig: Unterschiedliche Techniken (MVD vs. Chalkley), verschiedene immunhistochemische Marker (CD31, CD34, CD105, Faktor-VIII) und die nicht einheitliche histologische Klassifikation der SCCs sind hier die wichtigsten Gründe.

4.2.3 Einfluss der einzelnen Risikofaktoren unter Immunsuppression auf die Angiogenese der SCCs (ad Ziel 4)

Interessanterweise haben die SCCs *in situ* der Immunsupprimierten, die dafür bekannt sind, schneller und aggressiver zu wachsen [49, 51, 52], jeweils signifikant weniger Gefäße als die von Nicht-Immunsupprimierten. Wie hoch ist die Relevanz der Angiogenese bei der Tumorgenese von Immunsupprimierten? Sind die Zeit (plötzlicher *Angiogenic switch* mit konsekutiver Angiogenese) oder andere Kennzeichen von Tumorzellen kausal für die Aggressivität der Tumoren bei Immunsupprimierten? Es wird vermutet, dass die Immunsuppressiva der entscheidende Antreiber der Tumorgenese sind [44, 61, 166]. In der multivariaten Regressions-

analyse konnte die Immunsuppression ($p < 0.001$) für die Höhe der MVD bei SCCs *in situ* und invasiven SCCs als eine unabhängige, signifikante Einflussgröße bestimmt werden. Die Hypothese, dass bei Transplantierten die Immunsuppressiva für die hohe Inzidenz von Tumoren verantwortlich sind, wird auch durch die hohe Inzidenz von Tumoren bei Patienten, die aus anderen Gründen (z. B. systemischer Lupus Erythematoses) Immunsuppressiva einnehmen müssen, bekräftigt [167].

Einflüsse der einzelnen Immunsuppressiva auf die Angiogenese der SCCs

Im Folgenden werden zunächst die bekannten Zusammenhänge der einzelnen Immunsuppressiva auf die Angiogenese beleuchtet, im Weiteren wird die allgemeine Wirkung der Immunsuppressiva auf die Angiogenese dargestellt mit dem Ziel einen möglichen Erklärungsansatz für die signifikant niedrigere MVD bei SCCs *in situ* der Immunsupprimierten zu finden.

Guba *et al.* maßen im experimentellen Mausmodell (Rückenhautkammer) die MVD (CD31, Weidner) von Leberzellkarzinomen unter CsA und unter SRL. Sie zeigten unter CsA eine signifikant höhere MVD, hingegen unter SRL eine signifikant niedrigere MVD je im Vergleich zu den nicht-immunsupprimierten Kontrollen [168]. Duncan *et al.* untersuchten im experimentellen Mausmodell bei UVB-induzierten Hauttumoren den Einfluss verschiedener Immunsuppressiva allein (CsA, MMF, TRL, SRL) und in Zweierkombinationen (CsA+MMF, CsA+SRL, TRL+MMF, TRL+SRL) in Hinblick auf Tumorgröße, Entzündungsreaktion und Angiogenese. Mäuse, die allein mit CsA behandelt wurden, zeigten eine signifikant höhere MVD als die nicht-immunsupprimierten Kontrollen. Wenn CsA in Kombination mit MMF gegeben wurde, wiesen die Tumoren eine signifikant niedrigere MVD auf als die nicht-immunsupprimierten Kontrollen. Es entwickelten sich unter SRL allein und unter SRL in Kombination mit CsA (SRL+CsA) oder TRL (SRL+TRL) am meisten Tumoren, jedoch wiesen die Tumoren unter SRL eine signifikant niedrigere MVD (CD31, Weidner) auf im Vergleich zu den nicht-immunsupprimierten Kontrollen [78].

CsA fördert die Zellteilung der Tumorzellen und die Angiogenese durch eine erhöhte Expression an VEGF-A [16, 169]. Der angiogenesefördernde Effekt von CsA wird wie folgt vermutet: CsA erhöht die VEGF-A-Expression über die Sekretion von TGF- β , einem Angiogeneseaktivator. Basu *et al.* konnten im experimentellen Mausmodell bei Nierenkarzinomen unter CsA eine signifikant höhere Expression an VEGF-A und eine signifikant erhöhte MVD (CD31) messen [169]. Die signifikant erhöhte MVD (CD31) unter CsA bestätigt die Ergeb-

nisse für Leberzellkarzinome von Guba *et al.* und für Hauttumoren von Duncan *et al.* im experimentellen Mausmodell [78, 168], und entspricht unter der Annahme, dass unsere Patienten CsA in Kombination mit einem weiteren Immunsuppressivum einnahmen, den eigenen Ergebnissen.

Für MMF konnte *in vitro* eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums und der Angiogenese nachgewiesen werden. Allerdings konnten diese Effekte experimentell im Mausmodell bei Magenkarzinom-, Kolonkarzinom- und Melanomzellen nicht nachgewiesen werden, vermutlich aufgrund der schwankenden Verfügbarkeit des MMFs [170].

Die präventive Wirkung von mTor-Inhibitoren (SRL) in der Tumorgenese wird diskutiert. Ein präventiver Effekt (antiangiogen und tumorwachstumshemmend) konnte prospektiv nachgewiesen werden [17, 67, 70], obwohl er sich in einer ähnlich angelegten Studie nicht signifikant bestätigen ließ [71]. Unter SRL war die Inzidenz von NMSC im Gegensatz zu Patienten unter Calcineurin-Inhibitoren signifikant gesunken [68, 69, 171, 172]. SCCs, die sich bei Organtransplantierten nach einem Wechsel von Calcineurin-Inhibitoren zu SRL entwickelten, verfügten über eine geringere peritumorale Vaskularisation und Dicke, höhere Wachstumsfraktion und Dichte von T_{reg} [173]. Die Wahrscheinlichkeit für ein *De-novo*-Karzinom oder ein Rezidiv kann durch SRL über eine Reduktion der VEGF-A Produktion gesenkt werden, so dass der Einsatz von SRL bei Hochrisikopatienten als Alternative zu CsA empfohlen wird [70, 168, 173]. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen im experimentellen Mausmodell von Duncan *et al.*, denn hier entwickelten sich mehr Tumoren unter SRL allein oder unter SRL in Kombination mit CsA oder TRL, trotz niedrigerer MVD (CD31) und kleiner Tumorgröße. Jedoch war die Mehrheit der unter SRL entstandenen Tumoren benigne Papillome [78]. Möglicherweise liegt der Unterschied zum Einem am Versuchsaufbau (Hautprobenanalyse vs. experimentelles Mausmodell) und zum Anderen in der unterschiedlichen Beobachtungsdauer von mehreren Jahren bei den verschiedenen Analysen von Hautproben [68, 69, 171, 172] zu Wochen [78].

Der Einfluss von Glukokortikosteroiden auf die Angiogenese konnte in der Vergangenheit bei der Therapie infantiler Hämangiome gezeigt werden. Infantile Hämangiome sind benigne, vaskuläre, proliferative Tumoren im Säuglings- und Kindesalter. Die Ätiopathogenese ist bis heute nicht eindeutig aufgeklärt. VEGF-A wird eine wichtige Rolle in der Proliferation zugesprochen: Einerseits eine VEGF-A-Hochregulation bei Gewebshypoxie und andererseits VEGF-A-Überstimulierbarkeit der Endothelvorläuferzellen [1]. Neben Propranolol als Thera-

pieoption bei Hämangiomen werden systemische Glukokortikosteroide als Therapie der Wahl bei aggressiv wachsenden Hämangiomen, die Vitalfunktionen bedrohen, benannt [1, 174]. Im experimentellen Mausmodell bei Hämangiomen führte systemisch verabreichtes Dexamethason über eine verminderte VEGF-A-Expression zur Hemmung der Vaskulogenese. Je höher die eingesetzte Dosis von Dexamethason, desto signifikant niedriger war jeweils die MVD (CD31) im Vergleich zur Kontrollgruppe [175]. Ein systemisches Glukokortikosteroid ist oft Teil der Kombinationstherapie des immunsuppressiven Regimes. So könnte auch dieses Medikament zur signifikant niedrigeren MVD bei SCCs *in situ* beitragen.

Wenn man annimmt, dass die Mehrheit der Immunsupprimierten der untersuchten Stichprobe verschiedene Kombinationen von Immunsuppressiva zum Zeitpunkt des Auftretens des Tumors einnahmen und darunter zumindest SRL und/oder ein Glukokortikosteroid eingesetzt wurde, würden sich durch die antiangiogenen Effekte dieser beiden Medikamente (SRL und Glukokortikosteroid) eine mögliche Erklärung für die signifikant niedrigere MVD der SCCs *in situ* bieten. Auch die Kombination von CsA mit MMF bewirkte eine signifikant niedrigere MVD [78]. Bei der retrospektiven Erhebung der Daten waren nur in wenigen Fällen Angaben zu den einzelnen aktuellen immunsuppressiven Medikamenten, Dauer der Einnahme und Dosierung auf den histologischen Anforderungszetteln angegeben und auch nicht über Recherche der SAP-Datenbank (Krankenhausinformationssystem der Charité) zu finden, so dass diese Information zu Vergleichszwecken nicht vorlag. Unabhängig von der Wirkung auf die Angiogenese wurde für alle Immunsuppressiva eine erhöhte Inzidenz an Tumoren nachgewiesen, wenn auch in unterschiedlich starker Ausprägung [61, 70].

Unter Immunsuppression ist die DNA-Reparatur beeinträchtigt, so dass Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 leichter stattfinden können [74]. Es wird vermutet, dass frühe Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen einen immunologischen Vorteil für die Tumorgenese bieten, weil die für UV-induzierte Tumoren typische hohe Antigenität verloren geht [176]. Neben dem immunologischen Vorteil, können die p53-Mutationen auch Angiogenese induzieren: TSP-1 (Angiogeneseinhibitor) wird weniger exprimiert und die Transkription von VEGF-A hochreguliert [177]. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der eigenen Studie, da p53-Mutationen der Tumorgenese vorausgehen sollen [178]. Offen bleibt, welche Rolle die p53-Mutationen in der Tumorgenese und als indirekter Angiogeneseaktivator (quantitativ und qualitativ) bei den SCCs einnehmen [23]. Insbesondere weil die Anzahl der p53-Mutationen in der Haut 100.000mal höher als tatsächlich vorhandene Tumoren ist [22, 24].

Einfluss der defekten Immunüberwachung auf die Angiogenese der SCCs

Ein funktionierendes Immunsystem ist nicht nur in der Lage, Tumorwachstum zu hemmen, sondern auch zu fördern. Einerseits eliminiert das Immunsystem fehlerhafte Zellen, andererseits können die Entzündungszellen (Tie2⁺-Monozyten, Myeloide Suppressorzellen, Neutrophile Granulozyten, regulatorische B-Zellen, T_{reg}, natürliche Killer T-Zellen, dendritische Zellen und tumorassoziierte Makrophagen) durch Induktion des *Angiogenic switch* zur Angiogenese und somit zum Tumorwachstum führen [179]. Lin *et al.* fanden im experimentellen Mausmodell heraus, dass Makrophagen den *Angiogenic switch* des Mammakarzinoms regulieren. Durch Hemmung der Makrophageninfiltration verzögerte sich der *Angiogenic switch* [180]. Bei Immunsupprimierten sind vor allem die B- und T-Zellen reduziert [80]. Wenn Entzündungszellen normalerweise Angiogenese induzieren können [80], diese aber durch Immunsuppressiva in ihrer Anzahl reduziert oder in ihrer Funktion gehemmt sind, könnte dies die niedrigere MVD bei SCCs *in situ* der Immunsupprimierten erklären.

Einfluss des UV-Lichts und der HPV unter Immunsuppression auf die Angiogenese der SCCs

UV-Licht allein kann eine generelle Immunsuppression bewirken [15], möglicherweise ist hier ein additiver Effekt mit der iatrogen durch Medikamente bedingten Immunsuppression denkbar. Im experimentellen Maustumormodell ließ sich jedoch nach chronischer UVB-Exposition eine signifikant höhere MVD (CD31) im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Die Epidermis der chronisch UVB-exponierten Haut wies eine hohe VEGF-A Expression auf, jedoch nicht die Dermis [181]. In Zusammenschau mit den eigenen Ergebnissen lässt sich vermuten, dass bei den SCC *in situ* der Immunsupprimierten die UVB-induzierte VEGF-A Sekretion beeinträchtigt ist.

Welche Rolle die HPV bei SCCs generell in der Tumorgenese und speziell in der Angiogenese einnehmen und ob die HPV direkt karzinogen sind oder einen Beitrag zur Tumorgenese leisten (Kokarzinogen) oder keine relevante Rolle spielen, wird diskutiert [182]. Chen *et al.* konnten zeigen, dass HPV-Proteine (HPV 16 E6 und E7) in physiologischer Konzentration ausreichen, um Keratinozyten der männlichen Vorhaut vermehrt angiogenesefördernde Faktoren bilden zu lassen, welche die Endothelzellen beeinflussen. Eine Infektion mit HPV kann einen *Angiogenic switch* bewirken [183]. Zusammenfassend würde man entgegen den Ergebnissen der eigenen Studie eine durch HPV geförderte, erhöhte Angiogenese (MVD) bei den

Immunsupprimierten erwarten. Als mögliche Erklärung für die signifikant niedrigere MVD käme die passagere Rolle der HPV während der Tumorgenese [184] in Betracht.

Einfluss des Geschlechts, des Alters und der Lokalisation der SCCs auf die Angiogenese der SCCs

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass das Geschlecht einen signifikanten Beitrag zur Höhe der MVD leisten kann. Fraglich ist, inwiefern das Geschlecht, als unterschiedliche genetische Information, Einfluss auf die Angiogenese der SCCs nimmt, und welcher molekulare Mechanismus dahinter steckt. Es finden sich bisher keine Studien, die diesen Zusammenhang untersucht haben. Für das Alter und die Lokalisation der SCCs konnten in der multivariaten Regressionsanalyse kein prognostischer Einfluss für die Höhe der MVD nachgewiesen werden.

Die eigenen Ergebnisse in Zusammenschau mit der Literatur deuten an, dass die Aggressivität der SCCs durch die Angiogenese mit bedingt sein dürfte. Offen bleibt die Frage, welche anderen Wirkmechanismen für das schnelle, aggressive Wachstum verantwortlich sein könnten. Möglicherweise spielt bei der Tumorgenese der Immunsupprimierten die fehlende Immunantwort, und die damit einhergehende Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Zellteilung und Apoptose eine größere Rolle als die tumorinduzierte Angiogenese. Warum wachsen mehr Tumoren trotz gebremster Angiogenese? Man könnte postulieren, dass unter der Behandlung mit Immunsuppressiva die bewusst in Kauf genommene defekte Immunüberwachung die Aggressivität und somit die beschleunigte Tumorgenese bedingt und letztendlich die Angiogenese fördert. Ohne bisher das genaue Zusammenspiel der einzelnen Immunsuppressiva verstanden zu haben, ist bis dato die effektivste Methode die Reduktion der Gesamtdosis [61]. Von besonderem Interesse sollten vor allem die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Immunsuppressiva sein, da bisherige Untersuchungen gezeigt haben, dass die Kombination verschiedener Immunsuppressiva im Vergleich zur Einzelsubstanz zu gegensätzlichen Ergebnissen geführt hat [77, 78].

4.2.4 Vergleich der Lymphvaskularisierung zwischen den Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten anhand der D2-40-Färbung (ad Ziel 3 und 4)

Lymphgefäße unterstützen die lymphogene Metastasierung, aber nicht notwendigerweise das Tumorwachstum oder Vergrößerung der Tumormasse, daher können feine Unterschiede in der LVD bereits prognostischen Wert erreichen, wenn sie detektiert werden [122]. In Bezug auf die LVD, die Gesamtfläche der Gefäße, die mittlere Gefäßgröße und die relative Gefäßfläche bei den Plattenepithelkarzinomen (SCCs) traten zwischen den Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten keine signifikanten Unterschiede auf. Dies stimmt mit den experimentellen Ergebnisse von Koranda *et al.* überein: Sie konnten im Mausmodell bei UVB-induzierten SCCs unter Azathioprin und oder Prednisolon keine Metastasierung feststellen [185]. Die erhöhte Metastasierungsrate der SCCs bei Immunsupprimierten von bei 2 %–13 % [53] lässt sich durch die eigenen Ergebnisse nicht eindeutig belegen. In der vorliegenden Arbeit zeichnete sich meist eine Tendenz zu geringeren Werten der Lymphgefäßparameter bei den Immunsupprimierten im Vergleich zu den Immunkompetenten ab. Im experimentellen Maustumormodell bei subkutanen Tumoren [186] und in einer retrospektiven Analyse von SCCs bei Immunsupprimierten [173] konnte gezeigt werden, dass auch SRL durch geringere Expression von VEGF-C zu einer signifikanten Verminderung der LVD (Lymphgefäßmarkierung erfolgte mit dem Faktor LYVE-1) und potentiell verminderten Lymphknotenmetastasierung führte. Auch UVB-Exposition führte zu erniedrigtem VEGF-C und beeinträchtigte die Lymphangiogenese [187]. Bei Untersuchung der Einflussstärke der Immunsuppression auf die LVD zeigte sich keine signifikante Einflussstärke ($p = 0.35$). Auch für alle weiteren Faktoren ließ sich kein signifikanter Einfluss nachweisen. Kritisch anzumerken ist, dass sich bei Anwendung der LVD-Methode bei den SCCs keine eindeutigen Hotspots identifizieren ließen, so dass man sich an den Hotspots von CD31 orientierte. Die Messung der LVD beinhaltet, grundsätzlich wie die Messung der MVD die Selektion von Hotspots [188]. Hotspots seien repräsentativ für biologisch relevante Bereiche, in denen durch veränderte Sauerstoffbedingungen freigesetzte Wachstumsfaktoren die Angiogenese der Blutgefäße induzieren [189]. Shields *et al.* entschieden sich für die Erhebung der LVD im gesamten Schnitt des Melanoms ohne Auswahl von Hotspots und argumentierten, dass die Angiogenese von Lymphgefäßen im Gegensatz zu derjenigen von Blutgefäßen nicht durch Hypoxie reguliert wird [189]. Außerdem kamen verschiedene Forschungsgruppen bei der LVD des Melanoms mit Auswahl von Hotspots zu gegensätzlichen Ergebnisse [123, 189, 190]. Möglicherweise ist die fehlende Sichtbarkeit von Hotspots bei den SCCs *in situ* durch eine noch nicht begonnene Rekrutie-

rung von Lymphgefäßen zu erklären, bei den invasiven SCCs waren die Gefäße bei Immunsupprimierten und Nicht-Immunsupprimierten meist homogen im gesamten Schnitt erhöht vorzufinden. Moussai *et al.* konnten bei invasiven SCCs von Immunkompetenten im Vergleich zu normaler Haut eine erhöhte LVD (LYVE-1) und peritumoral eine erhöhte, wahrscheinlich auf Makrophagen zurückzuführende Expression von VEGF-C, nachweisen [191]. In der eigenen Studie war auch bei der Messung der LVD kein Vergleich zwischen gesunder Haut und den SCCs geplant, so diese Ergebnisse nicht vorliegen. Die SCCs metastasieren bei Immunsupprimierten häufiger [52, 53], so dass man eine erhöhte LVD bei den Immunsupprimierten erwartet hätte, dies zeichnet sich möglicherweise aufgrund der kleinen Gruppengröße (11 vs. 12 invasive SCCs) nicht ab. Ein Unterschied wäre vielleicht bei Immunsupprimierten mit multiplen rezidivierenden SCCs zu finden und bei SCCs mit einer Tumordicke von > 2 mm [3].

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick für Organtransplantierte (ad Ziel 5)

In Bezug auf den häufigsten malignen Tumor nach Organtransplantation kommt dem besseren Verständnis der Tumorgenese der SCCs ein hoher Stellenwert zu. Nach den Ergebnissen dieser Studie korreliert bei Immunsupprimierten die Angiogenese mit der Aggressivität, da im Übergang von AK III zu invasivem SCC sich eine deutlichere Zunahme an Gefäßen im Sinne des *Angiogenic switch* zeigt als bei Nicht-Immunsupprimierten. Bei den in dieser Studie untersuchten invasiven SCCs ist die Angiogenese auf einem ähnlichen Level wie von den Nicht-Immunsupprimierten messbar. Interessanterweise ist die MVD bei SCCs *in situ* von Immunsupprimierten signifikant niedriger als die von Nicht-Immunsupprimierten. Hier scheinen, nach Studium der Literatur, die Immunsuppressiva eine Rolle zu spielen. In der Lymphangiogenese zeigten sich keine Unterschiede, welche vermutlich eher bei fortgeschrittenen invasiven SCCs zu erwarten wären.

Zukünftige antiangiogene Therapie?

Unbeantwortet bleibt die Frage, wie schnell (gerechnet in Wochen, Monaten, Jahren) die Angiogenese abläuft, wenn das Invasionsstadium eingeleitet ist, und was bei Immunsupprimierten plötzlich zum *Angiogenic switch* führt. Möglicherweise ist der *Angiogenic switch* ein Kontrollpunkt der Tumorgenese, der als therapeutischer Ansatz dienen könnte. Es finden sich

Angiogeneseinhibitoren in der klinischen Anwendung, welche in der Zukunft potentiell bei immunsupprimierten Hochrisikopatienten mit rezidivierenden SCCs zum Einsatz kommen könnten. Abzuwägen und derzeit noch zu untersuchen blieben Wechselwirkungen mit den Immunsuppressiva und dem Transplantat (insbesondere Gefäßversorgung), die gegebenenfalls eine Dosisreduktion erfordern sowie die noch zu ermittelnde effektivste Dosis. In den Fachinformationen des VEGF-A-Inhibitors Bevacizumab (Avastin®) und des Tyrosinkinaseinhibitors Sunitinib (Sutent®) wird auf eine erhöhte Inzidenz von Infektionen, Neutropenie und febrile Neutropenie vor allem in Kombination mit Zytostatika hingewiesen. Hier wäre ein additiver Effekt zu der schon durch die Immunsuppressiva bestehende Neutropenie zu erwarten. Es konnte gezeigt werden, dass Angiogeneseinhibitoren vor allem die unreifen, pathologischen Gefäße treffen und die regulären physiologischen Gefäße nicht beeinträchtigt werden [192–194].

Dennoch vermag die Hemmung der Angiogenese allein keinen Tumor eliminieren, sondern es Bedarf vermutlich einer Kombination aus Angiogeneseinhibitor und Zytostatika [193], welche dem SCC des hoch invasiven metastasierenden Phänotyps entgegenwirken könnte [108]. Diese Kombination bietet nicht nur einen additiven, sondern auch einen funktionellen Vorteil. Bei der Anwendung von VEGF-Inhibitoren geht man statt von einer kompletten Blockierung der Angiogenese, von einer Normalisierung der Gefäße aus, welche zu einer Optimierung der Tumoroxygenierung, und somit auch zu einer effizienteren Verteilung von Chemotherapeutika führt [109]. Hier wäre der Benefit der Synchronisation von Gefäßnormalisierung und zeitgleicher Gabe von Chemotherapie zu untersuchen [109]. Eine solche Kombination wird derzeit in einer randomisierten Phase-III-Studie (E1305) bei rezidivierenden oder metastasierten SCCs von Kopf- und Halsbereich untersucht. Die Ergebnisse sind noch abzuwarten [195].

Abschließend für die sich in dieser Arbeit abzeichnende Tendenz der erniedrigten Vaskularisierung der SCC *in situ* und dem deutlicheren *Angiogenic switch* bei Immunsupprimierten bedarf es jedoch zukünftig weiterer prospektiver Studien. Um eine noch differenziertere Aussage zum Grund der schnellen Progredienz der SCCs von Immunsupprimierten treffen zu können, könnte in einem prospektiven Studiendesign eine stärkere Kontrolle der Confounder anlegt werden, wie z. B. Proliferationsindex (z. B. Ki-67), Tumordicke (bei den invasiven SCCs), Korrelation mit klinischem Bild, stärkere Unterscheidung der Lokalisation (z. B. Gesicht vs. Capillitium). Für die Messung der Angiogenese, wie auch der Lymphangiogenese, sind einheitliche standardisierte Messverfahren gefordert, so dass in Zukunft Ergebnisse vergleichbarer werden und die prognostische Relevanz gegeben sein könnte [127, 128, 154, 188].

5 Literaturverzeichnis

1. Sterry W, Stockfleth E. Maligne epitheliale Tumoren. In: Plewig G, Landthaler M, Burgdorf W, eds. *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. 6th ed. Berlin: Springer, 2012:1645–1671.
2. Röwert-Huber J, Patel MJ, Forschner T et al. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *Br J Dermatol* 2007; 156:8–12.
3. Breuninger H, Bootz F, Hauschild A et al. Short German guidelines: Squamous cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008; 6:5–8.
4. Werner R, Sammain A, Erdmann R et al. The natural history of actinic keratosis: a systematic review. *Br J Dermatol* 2013; 169(3):502–518.
5. Marks R, Rennie G, Selwood TS. Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma. *Lancet* 1988; 1(8589):795–797.
6. Lambert SR, Mladkova N, Gulati A et al. Key differences identified between actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma by transcriptome profiling. *Br J Cancer* 2014; 110(2):520–529.
7. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953; 6(5):963–968.
8. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA et al. A Genetic Explanation of Slaughter's Concept of Field Cancerization Evidence and Clinical Implications. *Cancer Res* 2003; 63(8):1727–1730.
9. Torezan LAR, Festa-Neto C. Cutaneous field cancerization: clinical, histopathological and therapeutic aspects. *An Bras Dermatol* 2013; 88(5):775–786.
10. WHO, Health effects of UV radiation. (Accessed December 26, 2013, at http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html)
11. Breitbart E, Wende A, Mohr P. RKI - GBE Booklets and Focus Reports - Publication 22 “Skin cancer,” Berlin: Robert Koch Institut, 2004.
12. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2012; 166(5):1069–1080.
13. Schaefer I, Augustin M, Spehr C et al. Prevalence and risk factors of actinic keratoses in Germany – analysis of multisource data. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; 28(3):309–313.
14. Forbes PD, Davies RE, Urbach F. Experimental ultraviolet photocarcinogenesis: wavelength interactions and time-dose relationships. *Natl Cancer Inst Monogr* 1978; (50):31–38.

15. Anwar J, Wrone DA, Kimyai-Asadi A, Alam M. The development of actinic keratosis into invasive squamous cell carcinoma: Evidence and evolving classification schemes. *Clin Dermatol* 2004; 22(3):189–196.
16. Athar M, Walsh SB, Kopelovich L, Elmetts CA. Pathogenesis of nonmelanoma skin cancers in organ transplant recipients. *Arch Biochem Biophys* 2011; 508(2):159–163.
17. Bernat García J, Morales Suárez-Varela M, Vilata JJ et al. Risk factors for non-melanoma skin cancer in kidney transplant patients in a Spanish population in the Mediterranean region. *Acta Derm Venereol* 2013; 93(4):422–427.
18. Stockfleth E, Terhorst D, Hauschild A et al. Aktinische Keratosen. *J Dtsch Dermatol Ges* 2012; 10(7):1–23.
19. De Vries E, Trakatelli M, Kalabalikis D et al. Known and potential new risk factors for skin cancer in European populations: a multicentre case–control study. *Br J Dermatol* 2012; 167:1–13.
20. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(22):10124–10128.
21. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 1994; 372(6508):773–776.
22. Le Pelletier F, Soufir N, de La Salmoniere P et al. p53 Patches are Not Increased in Patients with Multiple Nonmelanoma Skin Cancers. *J Invest Dermatol* 2001; 117(5):1324–1325.
23. Brash DE. Sunlight and the onset of skin cancer. *Trends Genet* 1997; 13(10):410–414.
24. Ren ZP, Ahmadian A, Ponten F et al. Benign clonal keratinocyte patches with p53 mutations show no genetic link to synchronous squamous cell precancer or cancer in human skin. *Am J Pathol* 1997; 150(5):1791–1803.
25. Quinn AG, Sikkink S, Rees JL. Basal Cell Carcinomas and Squamous Cell Carcinomas of Human Skin Show Distinct Patterns of Chromosome Loss. *Cancer Res* 1994; 54(17):4756–4759.
26. Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68(4):820–823.
27. Bleuel K, Popp S, Fusenig NE et al. Tumor suppression in human skin carcinoma cells by chromosome 15 transfer or thrombospondin-1 overexpression through halted tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(5):2065–2070.
28. Ridley AJ, Whiteside JR, McMillan TJ, Allinson SL. Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. *Int J Radiat Biol* 2009; 85(3):177–195.

29. Hu B, Castillo E, Harewood L et al. Multifocal Epithelial Tumors and Field Cancerization from Loss of Mesenchymal CSL Signaling. *Cell* 2012; 149(6):1207–1220.
30. Stockfleth E, Nindl I, Sterry W et al. Human Papillomaviruses in Transplant-Associated Skin Cancers. *Dermatol Surg* 2004; 30(4):604–609.
31. Jackson S, Storey A. E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 2000; 19(4):592–598.
32. Giampieri S, Storey A. Repair of UV-induced thymine dimers is compromised in cells expressing the E6 protein from human papillomaviruses types 5 and 18. *Br J Cancer* 2004; 90(11):2203–2209.
33. DSO: Home. (Accessed October 18, 2013, at <http://www.dso.de/>)
34. Kaplan B, Meier-Kriesche H-Ui. Death After Graft Loss: An Important Late Study Endpoint in Kidney Transplantation. *Am J Transplant* 2002; 2(10):970.
35. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche H-U. Long-Term Renal Allograft Survival in the United States: A Critical Reappraisal. *Am J Transplant* 2011; 11(3):450–462.
36. Chang SH, Russ GR, Chadban SJ et al. Trends in kidney transplantation in Australia and New Zealand, 1993-2004. *Transplantation* 2007; 84(5):611–618.
37. Lodhi SA, Meier-Kriesche H-U. Kidney allograft survival: the long and short of it. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26(1):15–17.
38. Lodhi SA, Lamb KE, Meier-Kriesche HU. Solid Organ Allograft Survival Improvement in the United States: The Long-Term Does Not Mirror the Dramatic Short-Term Success. *Am J Transplant* 2011; 11(6):1226–1235.
39. Meier-Kriesche H-U, Li S, Gruessner RWG et al. Immunosuppression: Evolution in Practice and Trends, 1994–2004. *Am J Transplant* 2006; 6(5):1111–1131.
40. Engels EA, Pfeiffer R, Fraumeni JF. Spectrum of cancer risk among us solid organ transplant recipients. *JAMA* 2011; 306(17):1891–1901.
41. Vajdic C, McDonald SP, McCredie ME, et al. Cancer incidence before and after kidney transplantation. *JAMA* 2006; 296(23):2823–2831.
42. Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU et al. Cancer risk after renal transplantation in the nordic countries, 1964–1986. *Int J Cancer* 1995; 60(2):183–189.
43. Miao Y, Everly JJ, Gross TG et al. De Novo Cancers Arising in Organ Transplant Recipients are Associated With Adverse Outcomes Compared With the General Population. *Transplantation* 2009; 87(9):1347–1359.
44. Tessari G, Girolomoni G. Nonmelanoma Skin Cancer in Solid Organ Transplant Recipients: Update on Epidemiology, Risk Factors, and Management. *Dermatol Surg* 2012; 38(10):1622–1630.

45. Ulrich C, Kanitakis J, Stockfleth E, Euvrard S. Skin Cancer in Organ Transplant Recipients-Where Do We Stand Today? *Am J Transplant* 2008; 8(11):2192–2198.
46. Collett D, Mumford L, Banner NR et al. Comparison of the Incidence of Malignancy in Recipients of Different Types of Organ: A UK Registry Audit. *Am J Transplant* 2010; 10(8):1889–1896.
47. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT, Wang C. Cancer after Kidney Transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2004; 4(6):905–913.
48. Ramsay H, Fryer A, Hawley C et al. Non-melanoma skin cancer risk in the Queensland renal transplant population. *Br J Dermatol* 2002; 147(5):950–956.
49. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin Cancers after Organ Transplantation. *N Engl J Med* 2003; 348(17):1681–1691.
50. Hartevelt MM, Bavinck JN, Kootte AM et al. Incidence of skin cancer after renal transplantation in The Netherlands. *Transplantation* 1990; 49(3):506–509.
51. Adamson R, Obispo E, Dychter S et al. High incidence and clinical course of aggressive skin cancer in heart transplant patients: a single-center study. *Transplant Proc* 1998; 30(4):1124–1126.
52. Pollard JD, Hanasono MM, Mikulec AA et al. Head and Neck Cancer in Cardiothoracic Transplant Recipients. *Laryngoscope* 2000; 110(8):1257–1261.
53. Rowe DE, Carroll RJ, Day Jr. CL. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip: Implications for treatment modality selection. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26(6):976–990.
54. Martinez J, Otley CC, Stasko T, et al. Defining the clinical course of metastatic skin cancer in organ transplant recipients: A multicenter collaborative study. *Arch Dermatol* 2003; 139(3):301–306.
55. Arends MJ, Benton EC, McLaren KM et al. Renal allograft recipients with high susceptibility to cutaneous malignancy have an increased prevalence of human papillomavirus DNA in skin tumours and a greater risk of anogenital malignancy. *Br J Cancer* 1997; 75(5):722–728.
56. Berkhout RJM, Bavinck JNB, Schegget J ter. Persistence of Human Papillomavirus DNA in Benign and (Pre)malignant Skin Lesions from Renal Transplant Recipients. *J Clin Microbiol* 2000; 38(6):2087–2096.
57. Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM et al. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* 2000; 61(3):289–297.
58. Bouwes J, Bavinck N, Hardie D et al. The risk of skin cancer in renal transplant recipients in Queensland, Australia. A follow-up study. *Transplantation* 1996; 61(5):715–721.

59. Mudigonda T, Levender MM, O'Neill JL et al. Incidence, Risk Factors, and Preventative Management of Skin Cancers in Organ Transplant Recipients: A Review of Single- and Multicenter Retrospective Studies from 2006 to 2010. *Dermatol Surg* 2013; 39(3):345–364.
60. Fisher MS, Kripke ML. Suppressor T lymphocytes control the development of primary skin cancers in ultraviolet-irradiated mice. *Science* 1982; 216(4550):1133–1134.
61. Hofbauer G. Immunosuppressive therapy after transplantation. Dermatologic relevance and pathomechanisms. *Hautarzt* 2010; 61(3):214–219.
62. Keller B, Braathen LR, Marti H-P, Hunger RE. Skin cancers in renal transplant recipients: a description of the renal transplant cohort in Bern. *Swiss Med Wkly* 2010; 140:13036.
63. André N, Roquelaure B, Conrath J. Molecular effects of cyclosporine and oncogenesis: a new model. *Med Hypotheses* 2004; 63(4):647–652.
64. Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D et al. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 1998; 351(9103):623–628.
65. Lennard L, Thomas S, Harrington C i., Maddocks J I. Skin cancer in renal transplant recipients is associated with increased concentrations of 6-thioguanine nucleotide in red blood cells. *Br J Dermatol* 1985; 113(6):723–729.
66. O'Donovan P, Perrett CM, Zhang X et al. Azathioprine and UVA Light Generate Mutagenic Oxidative DNA Damage. *Science* 2005; 309(5742):1871–1874.
67. Rini BI. Temsirolimus, an Inhibitor of Mammalian Target of Rapamycin. *Clin Cancer Res* 2008; 14(5):1286–1290.
68. Kauffman HM, Cherikh WS, Cheng Y et al. Maintenance Immunosuppression with Target-of-Rapamycin Inhibitors is Associated with a Reduced Incidence of De Novo Malignancies. *Transplantation* 2005; 80(7):883–889.
69. Salgo R, Gossman J, Schöfer H et al. Switch to a Sirolimus-Based Immunosuppression in Long-Term Renal Transplant Recipients: Reduced Rate of (Pre-)Malignancies and Nonmelanoma Skin Cancer in a Prospective, Randomized, Assessor-Blinded, Controlled Clinical Trial. *Am J Transplant* 2010; 10(6):1385–1393.
70. Euvrard S, Morelon E, Rostaing L et al. Sirolimus and Secondary Skin-Cancer Prevention in Kidney Transplantation. *N Engl J Med* 2012; 367(4):329–339.
71. Hoogendijk-van den Akker JM, Harden PN, Hoitsma AJ et al. Two-Year Randomized Controlled Prospective Trial Converting Treatment of Stable Renal Transplant Recipients With Cutaneous Invasive Squamous Cell Carcinomas to Sirolimus. *J Clin Oncol* 2013; 31(10):1317–1323.

72. Wimmer CD, Rentsch M, Crispin A et al. The janus face of immunosuppression – de novo malignancy after renal transplantation: the experience of the Transplantation Center Munich. *Kidney Int* 2007; 71(12):1271–1278.
73. Stark LA, Arends MJ, McLaren KM et al. Accumulation of p53 is associated with tumour progression in cutaneous lesions of renal allograft recipients. *Br J Cancer* 1994; 70(4):662–667.
74. De Graaf YGL, Rebel H, Elghalbzouri A et al. More epidermal p53 patches adjacent to skin carcinomas in renal transplant recipients than in immunocompetent patients: the role of azathioprine. *Exp Dermatol* 2008; 17(4):349–355.
75. De Grujil FR, Koehl GE, Voskamp P et al. Early and late effects of the immunosuppressants rapamycin and mycophenolate mofetil on UV carcinogenesis. *Int J Cancer* 2010; 127(4):796–804.
76. Kelly GE, Meikle W, Sheil AG. Effects of immunosuppressive therapy on the induction of skin tumors by ultraviolet irradiation in hairless mice. *Transplantation* 1987; 44(3):429–434.
77. Wulff BC, Kusewitt DF, VanBuskirk AM et al. Sirolimus Reduces the Incidence and Progression of UVB-Induced Skin Cancer in SKH Mice even with Co-administration of Cyclosporine A. *J Invest Dermatol* 2008; 128(10):2467–2473.
78. Duncan FJ, Wulff BC, Tober KL et al. Clinically Relevant Immunosuppressants Influence UVB-Induced Tumor Size Through Effects on Inflammation and Angiogenesis. *Am J Transplant* 2007; 7(12):2693–2703.
79. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 2007; 370(9581):59–67.
80. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011; 144(5):646–674.
81. Kripke ML. Antigenicity of Murine Skin Tumors Induced by Ultraviolet Light. *JNCI J Natl Cancer Inst* 1974; 53(5):1333–1336.
82. Ulrich C, Bichel J, Euvrard S et al. Topical immunomodulation under systemic immunosuppression: results of a multicentre, randomized, placebo-controlled safety and efficacy study of imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratoses in kidney, heart, and liver transplant patients. *Br J Dermatol* 2007; 157(Suppl 2):25–31.
83. Euvrard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C et al. Comparative epidemiologic study of premalignant and malignant epithelial cutaneous lesions developing after kidney and heart transplantation. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33(2):222–229.
84. Euvrard S, Kanitakis J, Decullier E et al. Subsequent Skin Cancers in Kidney and Heart Transplant Recipients after the First Squamous Cell Carcinoma. *Transplantation* 2006; 81(8):1093–1100.

85. Jensen P, Hansen S, Møller B et al. Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40(2):177–186.
86. Hiesse C, Rieu P, Kriaa F et al. Malignancy after renal transplantation: Analysis of incidence and risk factors in 1700 patients followed during a 25-Year period. *Transplant Proc* 1997; 29(1–2):831–833.
87. De Hertog SAE, Wensveen CAH, Bastiaens MT et al. Relation Between Smoking and Skin Cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19(1):231–238.
88. Lazebnik Y. What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer* 2010; 10(4):232–233.
89. Krebsentstehung. (Accessed February 14, 2014, at <https://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsentstehung.php>)
90. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11(1):73–91.
91. Krukemeyer MG. *Chirurgische Forschung*, 1st ed. Stuttgart: Thieme, 2006:112–113.
92. Burri PH, Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat. Rec.* 1990; 228(1):35–45.
93. Hanahan D, Folkman J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3):353–364.
94. Ribatti D. History of Research on Angiogenesis. In: Marone G, Granata F, eds. *Angiogenesis, Lymphangiogenesis and Clinical Implications*. Basel, Schweiz: Karger, 2014; 99:1–14.
95. Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med* 1971; 285(21):1182–1186.
96. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407(6801):249–257.
97. Almog N. Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. *Cancer Lett* 2010; 294(2):139–146.
98. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:401–410.
99. Detmar M, Yeo K-T, Nagy JA et al. Keratinocyte-Derived Vascular Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth Factor) Is a Potent Mitogen for Dermal Microvascular Endothelial Cells. *J Invest Dermatol* 1995; 105(1):44–50.
100. Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F et al. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(17):6624–6628.

101. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989; 84(5):1470–1478.
102. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255(5047):989–991.
103. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y et al. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79(2):315–328.
104. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y et al. Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* 1997; 88(2):277–285.
105. Streit M, Riccardi L, Velasco P et al. Thrombospondin-2: A potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(26):14888–14893.
106. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *N Eng J Med* 2004; 350(23):2335–2342.
107. Verheul HMW, Pinedo HM. Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(6):475–485.
108. Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J et al. Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis. *Cancer Cell* 2009; 15(3):220–231.
109. Leite de Oliveira R, Hamm A, Mazzone M. Growing tumor vessels: More than one way to skin a cat – Implications for angiogenesis targeted cancer therapies. *Mol Aspects Med* 2011; 32(2):71–87.
110. Ebos JML, Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8(4):210–221.
111. Shahneh FZ, Baradaran B, Zamani F, Aghebati-Maleki L. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapies. *Hum Antibodies* 2013; 22(1):15–19.
112. Skobe M, Detmar M. Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000; 5:14–19.
113. Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med* 2011; 17(11):1371–1380.
114. Alitalo A, Detmar M. Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. *Oncogene* 2012; 31(42):4499–4508.
115. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001; 61(5):1786–1790.

116. Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T et al. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol* 2001; 159(3):893–903.
117. Rinderknecht M, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis and melanoma metastasis. *J Cell Physiol* 2008; 216(2):347–354.
118. He Y, Rajantie I, Pajusola K et al. Vascular Endothelial Cell Growth Factor Receptor 3–Mediated Activation of Lymphatic Endothelium Is Crucial for Tumor Cell Entry and Spread via Lymphatic Vessels. *Cancer Res* 2005; 65(11):4739–4746.
119. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis–correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324(1):1–8.
120. Weidner N. Measuring Intratumoral Microvessel Density. *Methods Enzymol* 2008(444):305–323.
121. Nico B, Benagiano V, Mangieri D et al. Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 2008; 23(5):601–607.
122. Ran S, Volk L, Hall K, Flister MJ. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology* 2010; 17(4):229–251.
123. Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P et al. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod. Pathol.* 2005; 18(9):1232–1242.
124. Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A et al. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2005; 206(2):170–177.
125. Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(8):455–460.
126. Chalkley HW. Method for the quantitative Morphologic Analysis of Tissues. *J Natl Cancer Inst* 1943:47–53.
127. Vermeulen PB. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002; 1(2):1–12.
128. Offersen BV, Borre M, Overgaard J. Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density. *Eur J Cancer* 2003; 39(7):881–890.
129. Rojo MG, García GB, Mateos CP et al. Critical comparison of 31 commercially available digital slide systems in pathology. *Int J Surg Pathol* 2006; 14(4):285–305.
130. Mulrane L, Rexhepaj E, Penney S et al. Automated image analysis in histopathology: a valuable tool in medical diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8(6):707–725.

131. Detmar M, Velasco P, Richard L et al. Expression of vascular endothelial growth factor induces an invasive phenotype in human squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 2000; 156(1):159–167.
132. Lange-Asschenfeldt B, Weninger W, Velasco P et al.. Increased and prolonged inflammation and angiogenesis in delayed-type hypersensitivity reactions elicited in the skin of thrombospondin-2-deficient mice. *Blood* 2002; 99(2):538–545.
133. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 1997; 151(3):671–677.
134. Lutzky VP, Carnevale RP, Alvarez MJ et al. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) recycles and induces cell growth inhibition on human tumor cell lines. *J Cell Biochem* 2006; 98(5):1334–1350.
135. Parums DV, Cordell JL, Micklem K et al. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1990; 43(9):752–757.
136. Horak ER, Klenk N, Leek R et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340(8828):1120–1124.
137. Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A et al. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 1997; 151(4):1141.
138. Kahn HJ, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* 2002; 15(4):434–440.
139. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA et al. Up-Regulation of the Lymphatic Marker Podoplanin, a Mucin-Type Transmembrane Glycoprotein, in Human Squamous Cell Carcinomas and Germ Cell Tumors. *Am J Pathol* 2005; 166(3):913–921.
140. Detmar M. The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. *J Dermatol Sci* 2000; 24:78–84.
141. Hawighorst T, Velasco P, Streit M et al. Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism. *EMBO J* 2001; 20(11):2631–2640.
142. Wight TN, Raugi GJ, Mumby SM, Bornstein P. Light microscopic immunolocalization of thrombospondin in human tissues. *J Histochem Cytochem* 1985; 33(4):295–302.
143. Skobe M, Rockwell P, Goldstein N et al. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat Med* 1997; 3(11):1222–1227.
144. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R et al. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* 2005; 201(7):1089–1099.

145. Hirakawa S, Brown LF, Kodama S et al. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood* 2006; 109(3):1010–1017.
146. Kutzner H, Palmedo G. Immunhistologische Techniken. In: Kerl H, Garbe C, Cerroni L, Wolff H, eds. *Histopathologie der Haut*. 1st ed. Berlin: Springer, 2003:118.
147. Lang G. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 1st ed. Wien, Österreich: Springer, 2006:281.
148. Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass Correlations: Uses in Assessing Rater Reliability. *Psychol Bull* 1979; 86(2):420–428.
149. Dunn OJ. Estimation of the Means of Dependent Variables. *Ann Math Stat* 1958; 29(4):1095–1111.
150. Bauer P. Multiple testing in clinical trials. *Stat Med* 1991; 10(6):871–890.
151. OPTN: Organ Procurement and Transplantation Network. (Accessed April 2, 2014, at <http://optn.transplant.hrsa.gov/latestData/rptData.asp>)
152. Karslıoğlu Y, Yiğit N, Öngürü Ö. Chalkley method in the angiogenesis research and its automation via computer simulation. *Pathol Res Pract* 2014; 210(3):161–168.
153. Szeimies R m., Torezan L, Niwa A et al. Clinical, histopathological and immunohistochemical assessment of human skin field cancerization before and after photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 2012; 167(1):150–159.
154. Sprindzuk M, Dmitruk A, Kovalev V et al. Computer-aided Image Processing of Angiogenic Histological Samples in Ovarian Cancer. *J Clin Med Res* 2011; 1(5):249–261.
155. Doeden K, Ma Z, Narasimhan B et al. Lymphatic invasion in cutaneous melanoma is associated with sentinel lymph node metastasis. *J Cutan Pathol* 2009; 36(7):772–780.
156. Kaira K, Endo M, Abe M et al. Biologic Correlation of 2-[18F]-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Uptake on Positron Emission Tomography in Thymic Epithelial Tumors. *J Clin Oncol* 2010; 28(23):3746–3753.
157. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret G-Y. Microvessel Density as a Prognostic Factor in Women with Breast Cancer A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. *Cancer Res* 2004; 64(9):2941–2955.
158. Strieth S, Hartschuh W, Pilz L, Fusenig NE. Angiogenic switch occurs late in squamous cell carcinomas of human skin. *Br J Cancer* 2000; 82(3):591.
159. Florence MEB, Massuda JY, Bröcker E-B et al. Angiogenesis in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study of endothelial markers. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66(3):465–468.

160. Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW et al. Endoglin (CD105): A Review of its Role in Angiogenesis and Tumor Diagnosis, Progression and Therapy. *Anticancer Res* 2011; 31(6):2283–2290.
161. Pastushenko I, Gracia-Cazana T, Vicente-Arregui S et al. Squamous Cell Carcinomas of the Skin Explore Angiogenesis-Independent Mechanisms of Tumour Vascularization. *J Skin Cancer* 2014;2014:651501. doi:10.1155/2014/651501. (Accessed March 14, 2015, at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4033430/>)
162. Herbst C, Kosmehl H, Stiller KJ et al. Evaluation of microvessel density by computerised image analysis in human renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124(3):141–147.
163. Smith-McCune K, Zhu YH, Hanahan D, Arbeit J. Cross-species comparison of angiogenesis during the premalignant stages of squamous carcinogenesis in the human cervix and K14-HPV16 transgenic mice. *Cancer res* 1997; 57(7):1294–1300.
164. Nijsten T, Colpaert CG, Vermeulen PB et al. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases. *Br J Dermatol* 2004; 151(4):837–845.
165. Coussens LM, Hanahan D, Arbeit JM. Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *Am J Pathol* 1996; 149(6):1899–1917.
166. Hampton T. Skin cancer's ranks rise. *JAMA* 2005; 294(12):1476–1480.
167. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007; 121(1):1–14.
168. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002; 8(2):128–135.
169. Basu A, Contreras AG, Datta D et al. Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor and the Development of Post-Transplantation Cancer. *Cancer Res* 2008; 68(14):5689–5698.
170. Koehl G, Wagner F, Stoeltzing O et al. Mycophenolate Mofetil Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis In Vitro but Has Variable Antitumor Effects In Vivo, Possibly Related to Bioavailability. *Transplantation* March 15, 2007 2007; 83(5):607–614.
171. Campistol JM, Eris J, Oberbauer R et al. Sirolimus Therapy after Early Cyclosporine Withdrawal Reduces the Risk for Cancer in Adult Renal Transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(2):581–589.
172. Campbell SB, Walker R, Tai SS et al. Randomized Controlled Trial of Sirolimus for Renal Transplant Recipients at High Risk for Nonmelanoma Skin Cancer. *Am J Transplant* 2012; 12(5):1146–1156.

173. Rival-Tringali A-L, Euvrard S, Decullier E et al. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus reduces vascularization and thickness of post-transplant cutaneous squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 2009; 29(6):1927–1932.
174. Bennett M, Fleischer A, Chamlin S et al. Oral corticosteroid use is effective for cutaneous hemangiomas: An evidence-based evaluation. *Arch Dermatol* 2001; 137(9):1208–1213.
175. Greenberger S, Boscolo E, Adini I et al. Corticosteroid Suppression of VEGF-A in Infantile Hemangioma-Derived Stem Cells. *N Engl J Med* 2010; 362(11):1005–1013.
176. Remenyik É, Wikonkál NM, Zhang W et al. Antigen-specific immunity does not mediate acute regression of UVB-induced p53-mutant clones. *Oncogene* 2003; 22(41):6369–6376.
177. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(10):727–739.
178. Berg RJ, Kranen HJ van, Rebel HG et al. Early p53 alterations in mouse skin carcinogenesis by UVB radiation: immunohistochemical detection of mutant p53 protein in clusters of preneoplastic epidermal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(1):274–278.
179. Motz GT, Coukos G. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(10):702–711.
180. Lin EY, Li J-F, Gnatovskiy L et al. Macrophages Regulate the Angiogenic Switch in a Mouse Model of Breast Cancer. *Cancer Res* 2006; 66(23):11238–11246.
181. Yano K, Oura H, Detmar M. Targeted Overexpression of the Angiogenesis Inhibitor Thrombospondin-1 in the Epidermis of Transgenic Mice Prevents Ultraviolet-B-Induced Angiogenesis and Cutaneous Photo-Damage. *J Invest Dermatol* 2002; 118(5):800–805.
182. Grose S. HPV researchers set sights on preventing skin cancers. *Nat Med* 2009; 15(1):5–5.
183. Chen W, Li F, Mead L et al. Human papillomavirus causes an angiogenic switch in keratinocytes which is sufficient to alter endothelial cell behavior. *Virology* 2007; 367(1):168–174.
184. Weissenborn SJ, Nindl I, Purdie K et al. Human Papillomavirus-DNA Loads in Actinic Keratoses Exceed those in Non-Melanoma Skin Cancers. *J Invest Dermatol* 2005; 125(1):93–97.
185. Koranda FC, Loeffler RT, Koranda DM, Penn I. Accelerated induction of skin cancers by ultraviolet radiation in hairless mice treated with immunosuppressive agents. *Surg Forum* 1975; 26:145–146.

186. Kobayashi S, Kishimoto T, Kamata S et al. Rapamycin, a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin, suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Sci* 2007; 98(5):726–733.
187. Kajiya K, Sawane M, Huggenberger R, Detmar M. Activation of the VEGFR-3 Pathway by VEGF-C Attenuates UVB-Induced Edema Formation and Skin Inflammation by Promoting Lymphangiogenesis. *J Invest Dermatol* 2008; 129(5):1292–1298.
188. Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer* 2006; 95(12):1611–1625.
189. Shields JD, Borsetti M, Rigby H et al. Lymphatic density and metastatic spread in human malignant melanoma. *Br J Cancer* 2004; 90(3):693–700.
190. Straume O, Jackson DG, Akslen LA. Independent Prognostic Impact of Lymphatic Vessel Density and Presence of Low-Grade Lymphangiogenesis in Cutaneous Melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(1):250–256.
191. Moussai D, Mitsui H, Pettersen JS et al. The human cutaneous squamous cell carcinoma microenvironment is characterized by increased lymphatic density and enhanced expression of macrophage-derived VEGF-C. *J Invest Dermatol* 2010; 131(1):229–236.
192. 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; 60(5):1388–1393.
193. Felcht M, Thomas M. Angiogenese beim malignen Melanom. *J Dtsch Dermatol Ges* 2015; 13(2):125–136.
194. Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Streit M et al. The Angiogenesis Inhibitor Vasostatin does not Impair Wound Healing at Tumor-Inhibiting Doses. *J Invest Dermatol* 2001; 117(5):1036–1041.
195. Vassilakopoulou M, Psyrri A, Argiris A. Targeting angiogenesis in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2015; 51(5):409–415.

6 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1</i>	19
Blutgefäßneubildung im Rahmen der Angiogenese. Die neuen Gefäße entwickeln sich aus bereits bestehenden Gefäßen, entweder durch Sprossung oder Bilden von Septen (= Intussuszeption), modifiziert nach Krukemeyer 2006: S. 113 [91]	
<i>Abbildung 2</i>	28
Screening der Untersuchungsgruppe	
<i>Abbildung 3</i>	31
Schema der LSAB-2-HRP-Methode	
<i>Abbildung 4</i>	33
Skizze des computergestützten Messaufbaus	
<i>Abbildung 5</i>	34
Regel Nr. 1 - Einzeichnung bis zur ROI. Gezeigt sind Gefäße mit CD31 angefärbt von einem Hotspot einer AK III. Der Kreis umschließt ein angeschnittenes Gefäß; der Pfeil zeigt auf das mit grüner Farbe nachgezeichnete Gefäß. Die rote Linie zeichnet die ROI nach.	
<i>Abbildung 6</i>	35
Regel Nr. 2 - Gefäß ohne Lumen. Gezeigt sind Gefäße mit CD31 angefärbt von einem Hotspot einer AK III. Der Pfeil zeigt auf das Gefäß, anschließend auf das mit grüner Farbe nachgezeichnete Gefäß. Die rote Linie zeichnet die ROI nach.	
<i>Abbildung 7</i>	35
Regel Nr. 3 - Beispiel für "Insel mit Stiel". Gezeigt sind Gefäße mit CD31 angefärbt von einem Hotspot einer AK III. Der Pfeil zeigt auf den Stiel der auszuschließenden Struktur.	
<i>Abbildung 8</i>	36
Regel Nr. 4 - Großes Gefäß. Gezeigt sind Gefäße mit CD31 angefärbt von einem Hotspot einer AK III. Der Pfeil zeigt auf das gesamte Gefäß, anschließend auf das mit grüner Farbe nachgezeichnete Gefäß. Die rote Linie zeichnet die ROI nach.	
<i>Abbildung 9</i>	37
Hotspots (Hs) CD31 vs. D2-40. Gezeigt sind die Gefäße, angefärbt mit CD31 und mit D2-40 in den je drei Hotspots einer AK III. Es wurden die gleichen Stellen im D2-40-gefärbten Schnitt aufgesucht, die im CD31 gefärbten Schnitt als Hotspot identifiziert wurden.	
<i>Abbildung 10</i>	38
Einzeichnung der Gefäße und der ROI. Gezeigt sind die Gefäße, angefärbt mit CD31 in den drei Hotspots einer AK III. Die Gefäße sind mit grüner Farbe nachgezeichnet, die ROI mit roter Farbe.	
<i>Abbildung 11</i>	39
Einzeichnung der Lymphgefäße und der ROI. Gezeigt sind die Gefäße, angefärbt mit D2-40 in den drei Hotspots einer AK III. Die Gefäße sind mit grüner Farbe nachgezeichnet, die ROI mit roter Farbe.	

- Abbildung 12* 51
 Vergleich nicht-immunsupprimierter und immunsupprimierter Patienten hinsichtlich der *Microvessel density* (a), der Gesamtfläche der Gefäße (b), der mittleren Gefäßgröße (c) und der relativen Gefäßfläche (d) der Tumorklassen (SCC *in situ*, SCC invasiv) in der CD31-Färbung. Gezeigt sind die Mittelwerte der *Microvessel density* ($n/0,37 \text{ mm}^2$), der Gesamtfläche der Gefäße ($\mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$), der mittleren Gefäßgröße (μm^2) und der relativen Gefäßfläche (%) in gruppierten Boxplots (Nicht-Immunsupprimiert vs. Immunsupprimiert). Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels Student t-Test. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen sind mit einem Stern (*), hoch signifikante ($p < 0.01$) mit zwei (**) und höchst signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) mit drei Sternen (***) gekennzeichnet. Die hier gekennzeichneten höchst signifikanten Unterschiede (***) waren auch unter Bonferronikorrektur ($p < 0.000625$) signifikant.
- Abbildung 13a-d* 52
 Vergleich nicht-immunsupprimierter und immunsupprimierter Patienten hinsichtlich der *Microvessel density* (a), der Gesamtfläche der Gefäße (b), der mittleren Gefäßgröße (c) und der relativen Gefäßfläche (d) der einzelnen Tumoren (AK III, MB, SCC invasiv) in der CD31-Färbung. Gezeigt sind die Mittelwerte der *Microvessel density* ($n/0,37 \text{ mm}^2$), der Gesamtfläche der Gefäße ($\mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$), der mittleren Gefäßgröße (μm^2) und der relativen Gefäßfläche (%) in gruppierten Boxplots (Nicht-Immunsupprimiert vs. Immunsupprimiert). Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels Student t-Test. Ausreißer sind mit einem weißen Kreis gekennzeichnet, Extremwerte mit einer schwarzen Raute. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen sind mit einem Stern (*), hoch signifikante ($p < 0.01$) mit zwei (**) und höchst signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) mit drei Sternen (***) gekennzeichnet. Der hier gekennzeichnete höchst signifikante Unterschied (***) war auch unter Bonferronikorrektur ($p < 0.000625$) signifikant.
- Abbildung 14a-d* 55
 Vergleich nicht-immunsupprimierter und immunsupprimierter Patienten hinsichtlich der *Lymphatic vessel density* (a), der Gesamtfläche der Gefäße (b), der mittleren Gefäßgröße (c) und der relativen Gefäßfläche (d) der Tumorklassen (SCC *in situ*, SCC invasiv) in der D2-40-Färbung. Gezeigt sind die Mittelwerte der *Lymphatic vessel density* ($n/0,37 \text{ mm}^2$), der Gesamtfläche der Gefäße ($\mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$), der mittleren Gefäßgröße (μm^2) und der relativen Gefäßfläche (%) in gruppierten Boxplots (Nicht-Immunsupprimiert vs. Immunsupprimiert). Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels Student t-Test. Ausreißer sind mit einem weißen Kreis gekennzeichnet, Extremwerte mit einer schwarzen Raute. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen sind einem Stern (*) gekennzeichnet. Die hier gekennzeichneten signifikanten Ergebnisse (*) waren unter Bonferronikorrektur ($p < 0.000625$) nicht signifikant.
- Abbildung 15a-d* 56
 Vergleich nicht-immunsupprimierter und immunsupprimierter Patienten hinsichtlich der *Lymphatic vessel density* (a), der Gesamtfläche der Gefäße (b), der mittleren Gefäßgröße (c) und der relativen Gefäßfläche (d) der einzelnen Tumoren (AK III, MB, SCC invasiv) in der D2-40-Färbung. Gezeigt sind die Mittelwerte der *Lymphatic vessel density* ($n/0,37 \text{ mm}^2$), der Gesamtfläche der Gefäße (μm^2), der mittleren Gefäßgröße ($\mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$) und der relativen Gefäßfläche (%) in gruppierten Boxplots (Nicht-Immunsupprimiert vs. Immunsupprimiert). Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels Student t-Test. Ausreißer sind mit einem weißen Kreis gekennzeichnet, Extremwerte mit einer schwarzen Raute. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die hier gekennzeichneten signifikanten Ergebnisse (*) waren unter Bonferronikorrektur ($p < 0.000625$) nicht signifikant.

7 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1</i>	16
Risikofaktoren für die Entstehung der SCCs	
Überblick über die Risikofaktoren für SCCs geordnet nach allgemeinen und speziell für Immunsuppression.	
<i>Tabelle 2</i>	17
Kennzeichen von Tumorzellen	
Überblick über die insgesamt 10 Kennzeichen von Tumorzellen nach Hanahan und Weinberg [80]. Noch keine "Core hallmarks" sind mit einem Stern gekennzeichnet.	
<i>Tabelle 3</i>	25
Mehrstufiger Prozess der Angiogenese	
Überblick über den mehrstufigen Prozess der Angiogenese nach Detmar [140].	
<i>Tabelle 4</i>	31
Primärantikörper für die Immunhistochemie	
Primärantikörper (CD31 und D2-40) und ihre Eigenschaften (Färbung für, Spezies, Klonalität, Gebrauchsverdünnung, Demaskierung [pH], Hersteller, Produktnummer)	
<i>Tabelle 5</i>	34
Wesentliche Begriffe zum Verständnis der Gefäßanalyse	
Erklärung wesentlicher Begriffe für die Gefäßanalyse (Hotspot, <i>Microvessel density</i> , <i>Lymphatic vessel density</i> , <i>Region of interest</i> , Gesamtfläche der Gefäße, Mittlere Gefäßgröße und relative Gefäßfläche)	
<i>Tabelle 6</i>	40
Vaskuläre Parameter	
Vaskuläre Parameter mit ihrer Bezeichnung in der Software <i>ivision-Mac</i> ™ 4.5.0 und deren Einheit.	
<i>Tabelle 7</i>	41
Intraklassenkorrelation	
Vergleich der Messdurchgänge (1,2,3) in Bezug auf die primär gemessenen vaskulären Parameter (MVD/LVD, Gesamtfläche der Gefäße und der ROI). Gezeigt sind für die MVD/LVD, die Gesamtfläche der Gefäße und die ROI der ICC und das dazugehörige 95%-Konfidenzintervall. Statistische Testung auf Übereinstimmung erfolgte mittels Intraklassenkorrelationsanalyse. Eine hohe Übereinstimmung ist mit einem Stern gekennzeichnet.	
<i>Tabelle 8</i>	42
Allgemeine Lösungen und Chemikalien	
<i>Tabelle 9</i>	43
Lösungen und Chemikalien für die Immunhistochemie (LSAB)	
<i>Tabelle 10</i>	43
Geräte und Materialien für die Immunhistochemie (LSAB)	
<i>Tabelle 11</i>	44
Geräte und Materialien für die computergestützte Analyse	
<i>Tabelle 12</i>	45
Charakteristika der Patientenpopulation	
Vergleich nicht-immun-supprimierter und immunsupprimierter Patienten hinsichtlich Alter, Geschlecht, Tumorklasse, Tumor und Tumorlokalisierung. Gezeigt sind für Geschlecht, Tumorklasse, Tumor und Tumorlokalisierung die absoluten Anzahlen der Patienten, und für die Altersverteilung der Mittelwert mit zugehörigen 95% Konfidenzintervall. Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte für das Geschlecht sowie die Tumorklasse, mittels Chi-Quadrat-Test, für den Tumor und die Tumorlokalisierung (ohne „keine Angabe“) anhand des Exakten Test nach Fisher und für das Alter durch den Student t-Test. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.	

Tabelle 13 46

Lokalisation der Tumoren

Vergleich der SCC *in situ* (AK III und MB) und der SCC invasiv in Bezug auf die Tumorlokalisierung (Kopf, Oberkörper, Unterkörper, keine Angabe). Gezeigt sind für AK III, MB und SCC invasiv die absoluten Anzahlen, sowie zusammenfassend die Gesamtanzahl aller Tumoren. Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte für die Tumorlokalisierung (ohne „keine Angabe“) anhand des Exakten Test nach Fisher. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 14 47

Charakteristika der Immunsupprimierten (n = 60)

Vergleich der Immunsupprimierten (Herztransplantierte [HTX], Knochenmarktransplantierte [KTX], Lebertransplantierte [LTX], Nierentransplantierte [NTX] und mit unbekanntem Organ Transplantierte [OTX]) hinsichtlich der Tumorklasse, des Tumors, des Alters bei Biopsie, des Alters zum Zeitpunkt der Transplantation [Alter bei TX] sowie der Zeitspanne von der Transplantation bis zur Biopsie [Zeit: TX-Biopsie]. Gezeigt sind für Tumorklasse und Tumor die absoluten Anzahlen der Patienten; für Alter bei Biopsie, "Alter bei TX" und "Zeit: TX-Biopsie" der Mittelwert mit zugehörigen 95% Konfidenzintervall. Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte für die Tumorklasse und den Tumor mittels Exakter Test nach Fisher und für Alter bei Biopsie, "Alter bei TX" und "Zeit: TX-Biopsie" mittels ANOVA. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Tabelle 15 48

Vaskularisierung der AK III und invasiven SCCs bei Immunsupprimierten in der CD31-Färbung

Vergleich der AK III und invasiven SCC von Immunsupprimierten hinsichtlich der MVD, der Gesamtfläche der Gefäße, der mittleren Gefäßgröße und der relativen Gefäßfläche in der CD31-Färbung. Gezeigt sind die Mittelwerte mit zugehörigen 95% Konfidenzintervall der MVD ($n/0,37 \text{ mm}^2$), der Gesamtfläche der Gefäße (μm^2), der mittleren Gefäßgröße ($\mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$) und der relativen Gefäßfläche (%). Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels Student t-Test. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen sind mit *, hoch signifikante ($p < 0.01$) mit ** und höchst signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) mit *** gekennzeichnet. Der hier gekennzeichnete höchst signifikante Unterschied (***) war auch unter Bonferronikorrektur ($p < 0.000625$) signifikant.

Tabelle 16 49

Vaskularisierung der AK III und invasiven SCCs bei Nicht-Immunsupprimierten in der CD31-Färbung

Vergleich der AK III und invasiven SCC von Nicht-Immunsupprimierten hinsichtlich der MVD, der Gesamtfläche der Gefäße, der mittleren Gefäßgröße und der relativen Gefäßfläche in der CD31-Färbung. Gezeigt sind die Mittelwerte mit zugehörigen 95% Konfidenzintervall der MVD ($n/0,37 \text{ mm}^2$), der Gesamtfläche der Gefäße (μm^2), der mittleren Gefäßgröße ($\mu\text{m}^2/0,37 \text{ mm}^2$) und der relativen Gefäßfläche (%). Statistische Testung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels Student t-Test. Hoch signifikante Unterschiede ($p < 0.01$) zwischen den Gruppen sind mit ** gekennzeichnet. Der hier gekennzeichnete hoch signifikante Unterschied (**) war unter Bonferronikorrektur ($p < 0.000625$) nicht signifikant.

Tabelle 17 58

Abhängigkeiten der MVD und LVD - Multivariate Regressionsanalyse

Untersuchung der Einflussgrößen auf die MVD (CD31) und auf die LVD (D2-40) hinsichtlich des Status der Immunsuppression, Alter, Geschlecht, Tumorklasse, Tumor und Tumorlokalisierung. Gezeigt sind für Geschlecht, Alter (nach Einteilung in Klassen), Tumorklasse, Tumor und Tumorlokalisierung die absoluten Anzahlen der Patienten und jeweils der zugehörige Mittelwert der MVD ($n/0,37 \text{ mm}^2$) und der LVD ($n/0,37 \text{ mm}^2$). Statistische Testung auf die Stärke des Einflusses für die MVD und die LVD erfolgte für den Status der Immunsuppression, die Altersklassen, das Geschlecht, die Tumorklasse, die einzelnen Tumoren sowie die Tumorlokalisierung (ohne „keine Angabe“) mittels multivariater Regressionsanalyse. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julia Isabelle Schmitter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Einfluss der Immunsuppression auf die Angiogenese und Lymphangiogenese von epithelialen Hauttumoren und deren Vorstufen" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer un-wahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Sterry und Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Torsten Zuberbier danke ich für die Möglichkeit an der Abteilung zu promovieren. Besonders möchte ich meinem Doktorvater Herrn Primarius Priv.-Doz. Dr. med. Bernhard Lange-Asschenfeldt danken für seine Unterstützung, sein großes Engagement und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit auch über Ländergrenzen hinweg. Durch seine Kompetenz, seinen Enthusiasmus und seine Geduld war er mir ein wertvoller Berater in jeder Phase dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Eggert Stockfleth danke ich für zahlreiche wissenschaftliche Hilfestellungen und sein besonderes Engagement während der Entstehung dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. med. Joachim Röwert-Huber danken für die intensive Anleitung zu Beginn dieser Arbeit und seine stets verlässliche Hilfe bei histologischen Fragen. Frau Johanna Kunz-Roy danke ich für die hervorragende Einarbeitung in die histologischen Techniken und die nette Zusammenarbeit im Labor. Besonderer Dank für die wertvolle Kritik und die fachliche Diskussion gilt auch Prof. Dr. med. Michael Weichenthal, Dr. med. Adel Sammain, Dr. med. Thomas Kornek und meinem Vater, Dr. med. Nikolaus Schmitter. Meiner Schwester Caroline Ishiguro, Master of Engineering, und meiner Mutter, Dr. rer. nat. Ane Schmitter, danke ich für die Hilfe bei statistischen Fragen.

Abschließend bedanke ich mich bei allen, die mich im Rahmen meiner Dissertation unterstützt haben.