Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Uniklinik Köln
Klinik und Poliklinik für innere Medizin I
Hämatologie und Onkologie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med M. Hallek

Die Bedeutung des Ang2/Tie2 Signalweges für die Interaktion von malignen B-Lymphozyten mit ihrer Mikroumgebung bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Würde eines doctor rerum medicinalium
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Birgit Pötzsch
aus Bocholt

promoviert am
04.06.2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln 2014

Dekan: Univiversitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Th. Krieg

1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Professor Dr. med. K.-A. Kreuzer

2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. B. Brachvogel

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts bekam ich freundlichste Unterstützung von Herrn Professor Dr. med. Karl-Anton Kreuzer.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 23.07.2013

Die vorliegende Arbeit sowie alle dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurde im Labor für molekulare Hämatologie und Onkologie der Klinik I für Innere Medizin des Klinikums der Universität zu Köln vom Juni 2010 bis Juli 2013 unter Betreuung von Herrn Professor Dr. med. Karl-Anton Kreuzer von mir selbst durchgeführt. Die immunphänotypischen Daten (ZAP70 und CD38), die Daten zu Binet-Stadien und der Behandlungsbedürftigkeit der Patienten wurden in anonymisierter Form vom Routinelabor für Hämatologie und Onkologie der Klinik I für Innere Medizin zur Verfügung gestellt.

Danksagung:

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Karl-Anton Kreuzer für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und einer guten Betreuung. Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Michael Hallek bedanken, für die Möglichkeit der Durchführung dieser experimentellen Doktorarbeit in der Klinik für Innere Medizin der Universität zu Köln.

Ein ganz besonderes Dankeschön verdient Dr. Iris Gehrke für die hervorragende Unterstützung, Betreuung, Kritik und Geduld auch über ihre Zeit in unserem Labor hinaus und sogar über 6715km hinweg.

Ich möchte mich auch bei meinen Kollegen Felix Erdfelder, Alexandra Filipovic, Hanna Flamme, Magdalena Hertweck, Sylvia Krallmann, Cristiano Krings-Rocha, Alexandros Liakos, Luis Mario Aguirre Palma, Julian Paesler, Lukas Peiffer, Simon Poll-Wolbeck, besonders Inka Praulich, Sylvia Krallmann, Joana Schiller, Christina Schmidt und Sabrina Uhrmacher für ein entspanntes uns sehr kollegiales Arbeiten, welches wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat, bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank dem diagnostischen Labor der Hämatologie, ganz besonders: Elena Krämer und Mirela Stecki für die tolle Unterstützung. Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. Sebastian Theurich und seinem Labor für die Unterstützung bei den Versuchen zur Hypoxie.

Außerdem möchte ich an dieser Stelle meiner Familie, ganz besonders aber meinen Eltern meinen großen Dank aussprechen, die mir mit ihrer Unterstützung das Studium und die Doktorarbeit erst ermöglicht haben.

Ein herzlichen Dank an Yvonne Schmidt und Christina Runde, die mir sowohl fachlich als auch nervlich immer gerne weitergeholfen haben. Sehr gerne möchte ich mich bei Julia Weidemann und Tina Zydra bedanken, die mir immer zuhören und mir zur Seite stehen.

Mein letzter und größter Dank gilt meinem Freund Sebastian Thielkes, der mich immer wieder motiviert hat, mir geholfen hat, meine Launen ertragen hat, sich mit mir über diese Arbeit freut und einfach immer für mich da ist. Danke.

Für Basti

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **9**

Abkürzungsverzeichnis **I**

1 Einleitung **1**

1.1 Die Chronische lymphatische Leukämie (CLL) 1

1.1.1 Charakterisierung der CLL 1

1.1.2 Diagnose der CLL 1

1.1.3 Epidemiologie 3

1.1.4 Äthiologie und Pathogenese 3

1.1.5 Klassifikation der CLL 5

1.1.6 Prognostische Faktoren in der CLL 6

1.1.7 Therapie 9

1.2 Bedeutung des Mikromilieus bei der CLL 13

1.2.1 Angiogenese im CLL Mikromilieu 14

1.2.2 Status der Zytokine der Angiogenese bei der CLL 16

1.2.3 Oxygenisierungsstatus bei der CLL 17

1.3 Angiopoietin 18

1.3.1 Physiologische Funktion der Angiopoietine 18

1.3.2 Die Rolle von Ang2 bei malignen Erkrankungen 19

1.3.3 Die Rolle von Ang2 bei leukämischen Erkrankungen 19

1.4 Tie-Rezeptoren 20

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit 21

2 Material und Methoden **23**

2.1 Material 23

2.1.1 Geräte 23

2.1.2 Zellkultur 23

2.1.3 Oligonukleotide . . . 25
2.1.4 Komplette Laborkits . . . 26
2.1.5 Antikörper und Proteine . . . 27
2.2 Methoden . . . 27
2.2.1 Durchflusszytometrie . . . 27
2.2.2 ELISA . . . 30
2.2.3 PCR . . . 31
2.2.4 Western Blot . . . 33
2.2.5 Immunfluoreszenz . . . 33
2.2.6 Phophorylierungstest . . . 34
2.2.7 Zellkultur . . . 34

3 Ergebnisse **41**
3.1 Ang2-Status bei der CLL . . . 41
3.1.1 Die Expression von Ang2 durch CLL-Zellen . . . 41
3.1.2 Sequenzierung von *ANG2* bei CLL-Patienten . . . 42
3.1.3 Quantitative Bestimmung von sezerniertem Ang2 mittels ELISA . . . 43
3.1.4 Analyse des Einflusses der Mikroumgebung auf die Expression und Sekretion von Ang2 . . . 44
3.2 Einfluss des Ang2 auf das Überleben der CLL-Zellen . . . 48
3.2.1 Überlebensvorteil durch Kokultivierung . . . 49
3.2.2 Neutralisation von Ang2 durch AMG386 . . . 50
3.3 Tie2-Status bei der CLL . . . 50
3.3.1 Die Expression von Tie2 durch CLL-Zellen . . . 51
3.3.2 Durchflusszytometrische Bestimmung von Tie2 bei der CLL . . . 51
3.4 Analyse des Einflusses der Mikroumgebung auf den Tie2-Status . . . 52
3.4.1 Einfluss hypoxischer Bedingungen während der Kultivierung . . . 53
3.4.2 Parakriner Einfluss durch Kokultivierung . . . 54
3.4.3 Einfluss durch externe Stimulanzien . . . 57
3.5 Untersuchung verschiedener Zellen des Mikromilieus der CLL-Zellen auf den Tie2 Rezeptor . . . 58

3.5.1 Granulozyten . . . 59
3.5.2 Dendritische Zellen . . . 59
3.5.3 Nurselike Zellen . . . 60
3.5.4 Knochenmark und Knochenmarksstromazellen . . . 61
3.6 Analyse möglicher anderer Ang2-bindender Rezeptoren . . . 63
3.6.1 Induktion von Rezeptortyrosinkinasen-Phosphorylierung durch rekombinantes Ang2 Protein . . . 63

4 Diskussion **65**
4.1 Vergleich der Ang2 Expression und Sekretion bei CLL-Zellen und gesunden Kontrollen unter Berücksichtigung verschiedener beeinflussender Faktoren . . . 65
4.2 Bewertung des Einflusses von Ang2 auf das Überleben der CLL-Zellen 70
4.3 Mutationsstatus von *ANG2* bei der CLL . . . 72
4.4 Vergleich der Expression von Tie2 durch CLL-Zellen und gesunden PBMC unter Einfluss verschiedener Faktoren . . . 72
4.5 Die Tie2-Expression im Mikromilieu der CLL-Zellen . . . 74
4.6 Aktivierung Angiogenese unabhängiger Signalwege durch Ang2 . . . 79
4.7 Aussicht . . . 81

5 Zusammenfassung **83**

6 Literaturverzeichnis **85**

7 Vorabveröffentlichungen **106**
7.1 Posterpräsentationen . . . 106
7.2 Paper . . . 106

8 Anhang **107**
8.1 Abbildungsverzeichnis . . . 107
8.2 Tabellenverzeichnis . . . 109

9 Lebenslauf **110**

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABL	Abelson porooncogene
Akt	Proteinkinase B
AMG386	Trebananib
AML	akute myeloische Leukämie
Ang	Angiopoietin
APC	Allophycocyanin
Bcl2	B-Zell-Lymphoma 2
Bcl-xL	B-Zell-Lymphoma extra large Protein
BCR	B-Zell-Rezeptor
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BLK	B-lymphocyte kinase
BSA	bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
cDNS	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CO_2	Kohlendioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zelllinien
Dtk	Tyrosine-protein kinase receptor
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal-growth factor receptor
ELISA	Enzym linked Immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCR	Fragment crystallizable receptor
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FGF	Fibroblast growth factor

FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor
Hb	Hämoglobin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
HGVS	Human Genome Variation Society
HIF	hypoxia-induceable factor
HLA	Human leukocyte antigen
HRP	horseradish peroxidase
HUVEC	human umbeilical veine endothelial cells
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin heavy chain
IL4	Interleukin 4
IL6	Interleukin 6
KM	Knochenmark
KMSZ	Knochenmarksstromazellen
MAF	Global minor allele frequency
MBL	monoklonale B-Lymohozytose
MCL1	Myeloid cell leukemia-1
MMP-9	Matrix Metalloproteinase-9
MCPyV	Merkel cell polyoma virus
mDC	myeloische dendritische Zellen
ml	Milliliter
μl	microliter
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
NGS	normal goat serum
NLC	Nurse like Zellen
ntc	non template control

PB	peripheres Blut
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered salin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGFR	Platelet derived growth factor Rezeptor
PE	Phycoerythrin
PerCP/Cy5.5	Peridinin chlorophyll protein-cyanine dye
pg	Picogramm
PI	Propiumiodid
PI3K	Phoshoinositol-3'Kinase
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
sdf	stromal cell derived factor-1
SLL	small lymphocytic lymphoma
SNV	single nucleotide variation
Tie2	Tyrosinkinase with immunoglobuline and epidermal growth factor homology domains 2
TNF	Tumornekrosefaktor
TSP-1	Thrombospondin-1
U	Units
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
ZAP70	zeta assoziiertes Protein 70
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

1.1.1 Charakterisierung der CLL

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) gehört gemäß Weltgesundheitsorganisation (WHO) 2008 Klassifikation zu den B-Zell Neoplasien. Sie zeichnet sich durch eine Akkumulation klonaler, morphologisch reifer, aber funktionell unreifer B-Lymphozyten aus [91]. Diese B-Lymphozyten weisen ein abnormes Oberflächenantigenmuster auf, welches aus einer Kombination gewöhnlicher B-Zellmarker, wie CD19, CD20 und CD23, mit dem T-Zell Antigen CD5, das auf gesunden B-Lymphozyten nicht zu finden ist, besteht [21, 55]. Zudem sind die Oberflächenantigene CD19, CD20 und CD79b, aber auch membranständige Immunglobuline, auf CLL B-Lymphozyten (CLL-Zellen) in geringerem Ausmaß zu finden als auf gesunden B-Lymphozyten [22, 60].
Während sich CLL-Zellen im peripheren Blut zumeist durch fehlende Apoptosefähigkeit auszeichnen [29], weisen neuere Erkenntnisse darauf hin, dass Gewebe-assoziierte CLL-Zellen in Knochenmark und Lymphknoten verschiedenen Proliferationssignalen ausgesetzt sind [22].

1.1.2 Diagnose der CLL

Um eine CLL diagnostizieren zu können, müssen mindestens $5x10^9$ klonale B-Lymphozyten pro Liter (l) im peripheren Blut vorliegen. Die WHO grenzt von der CLL das kleinzellige B-Zell-Lymphom (*small lymphocytic lymphoma*, SLL) ab. Sie liegt vor, wenn CLL-Zellen Lymphknoten oder extranodales Gewebe infiltrieren, aber der Absolutwert monoklonaler B-Zellen im peripheren Blut $5x10^9$/l nicht überschreitet [18].
Die Diagnose der CLL erfolgt häufig zufällig bei Routineuntersuchungen. Die Anzahl der zufälligen Diagnosen in den frühen symptomlosen Stadien der CLL schwankt je nach Studie zwischen 31% [48] und 80% [90]. Diese Patienten klagen für gewöhnlich

zum Diagnosezeitpunkt über keinerlei CLL-spezifische Beschwerden.
Ist die CLL keine Zufallsdiagnose, so findet man zum Diagnosezeitpunkt verschiedene unspezifische Symptome. Oft kommt es aufgrund der Lymphozytose zu einer Vergrößerung lymphatischer Organe. So treten als erste Symptome Lymphknotenschwellungen und Vergrößerung von Leber und Milz auf. Zusätzlich treten in bis zu 30% der Fälle verschiedene Hautirritationen (z.B. Juckreiz, Ekzeme, Mykosen) auf. In späteren Stadien findet man aufgrund der Lymphozytose eine gestörte Hämatopoese, was im Fall eines Erythrozytenmangels zu allgemeiner Müdigkeit, körperlicher Schwäche und verminderter Leistungsfähigkeit führt. Aufgrund einer Thrombozytopenie können vermehrt Blutungen auftreten. Weitere Symptome sind Gewichtsverlust, abdominale Schmerzen, Nachtschweiß und Infektanfälligkeit [7, 59]. Die Diagnose der CLL erfolgt nach körperlicher Untersuchung und der Erstellung eines Differentialblutbildes. Laut Kriterien des *International Workshop on CLL* kann die Diagnose CLL gestellt werden, wenn folgende Punkte zutreffen:

- Vorhandensein von mindestens $5x10^9$ klonaler B-Zellen pro Liter im peripheren Blut
- charakteristische Erscheinung kleiner, morphologisch reifer B-Zellen im Blutausstrich
- Koexpression der Oberflächenantigene CD19, CD20, CD23 und CD5.

Die Monoklonalität und das typische Oberflächenantigenmuster der B-Zellen werden üblicherweise mittels immunphänotypischer Untersuchungen nachgewiesen. Das Vorhandensein von CD19, CD5 und CD23 muss unbedingt gezeigt werden, um die CLL von anderen leukämisch verlaufenden Lymphomen wie follikuläres Lymphom, Marginalzonenlymphom, Mantelzelllymphom oder Haarzelllymphom unterscheiden zu können [6]. Die Monoklonalität wird in der Regel durch den Nachweis einer Leichtkettenrestriktion $\varkappa$ oder λ sichergestellt [60].
Mikroskopisch erscheinen die CLL-Zellen, wie oben beschrieben, als kleine und reife B-Zellen. Darüber hinaus weisen sie einen schmalen Zytoplamsasaum und einen dichten Kern mit teilweise verklumptem Chromatin ohne wahrnehmbare Nukleoli auf. Die Instabilität der CLL-Zellen führt zum Auftreten sogenannter Gumprecht-

scher Kernschatten als Artefakt der Präparation des Blutausstriches [59].
Obwohl die CLL-Zellen in das Knochenmark einwandern, ist eine zusätzliche Untersuchung des Knochenmarks nicht unbedingt erforderlich [6, 21]. Ist eine CLL diagnostiziert, werden in der Regel weitere z.B. genetische Untersuchungen durchgeführt, die zur Prognoseeinschätzung und Therapieempfehlung essentiell sind.

1.1.3 Epidemiologie

Die Inzidenz der CLL liegt bei 3/100.000/Jahr, wobei je nach Bevölkerungsgruppe starke Unterschiede auftreten. So ist die Prävalenz in der asiatischen Bevölkerung wesentlich geringer als bei Europäern oder Nordamerikanern. Insgesamt ist die CLL in dieser Bevölkerungsgruppe mit bis zu 30% aller Leukämien die häufigste Leukämieform bei Erwachsenen. Im Gegensatz dazu macht die CLL in Asien nur 3-5% aller Leukämien bei Erwachsenen aus [90, 59, 102, 4]. Das mittlere Alter bei Diagnosenstellung liegt bei 64-70 Jahren [94, 111, 59]. Nur ungefähr 20% aller Erkrankten sind jünger als 55 [90, 59]. Betrachtet man den Unterschied zwischen Männern und Frauen, so stellt man fest, dass die Inzidenz im Alter zwischen 30 und 64 bei Männern bei 3,9/100000/Jahr, bei Frauen dagegen bei 2,1/100000/Jahr liegt. Die Inzidenz steigt mit dem Alter stark an. Betrachtet man Frauen im Alter von 30-49 Jahren erkranken 0,8/100000/Jahr neu an CLL, im Alter über 75 Jahren sind es bereits 19/100000/Jahr. Bei Männern steigt sie von 1/100000/Jahr auf 36/100000/Jahr in diesen Altersklassen [140].

1.1.4 Äthiologie und Pathogenese

Äthiologie

Die Äthiologie der CLL ist nach wie vor unklar. Als sicher gilt, dass eine familiäre Disposition das Risiko einer CLL-Erkrankung erhöht. Ein Verwandter ersten Grades trägt gegenüber nicht erblich vorbelasteter Personen ein um das 6,6-fach erhöhtes Risiko zu erkranken [19]. Verschiedene erworbene Faktoren wurden ebenfalls

als Ursache der CLL untersucht. Dabei konnte z.B. UV-Strahlung ausgeschlossen werden [47]. Über den Einfluss von Viruserkrankungen gibt es bis heute keine Klarheit. Während im Besondern immer wieder das Epstein-Barr Virus (EBV) und das *Merkel cell polyoma virus* (MCPyV) als möglicher Risikofaktor in Betracht gezogen wurden [23], scheint der momentane Wissensstand allerdings, Viren als Ursache für die Erkrankung der CLL auszuschließen [112]. Oft geht einer CLL eine monoklonale B-Lymphozytose (MBL) voraus. Eine MBL besteht dann, wenn die Zahl der monoklonalen B-Zellen im Blut noch unter $5x10^9/l$ liegt und die Lymphozytose symptomlos verläuft. Studien besagen, dass etwa 1% aller MBL betroffenen pro Jahr eine CLL entwickeln [110].

Pathogenese

Trotz zahlreicher Studien, die sich mit der Frage der molekularen Pathogenese beschäftigen, steht eine eindeutige Erklärung der zellulären Herkunft der CLL bisher noch aus. Als zellulären Ursprung von CLL-Zellen werden einige verschiedene B-Lymphozyt-Vorläuferzellen in Betracht gezogen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit konnte man CD5 positive B-Zellen als eine der Vorläuferzellen der CLL-Zellen ausfindig machen [127]. Für den Verlauf der Erkrankung spielt die Mikroumgebung der CLL eine wichtige Rolle. So sind verschiedene extrazelluläre Faktoren bekannt, die die Apoptose der CLL-Zellen verhindern oder deren Proliferation fördern. Wichtigster Signalstoff, der das Zellwachstum stimuliert, ist Tumornekrosefaktorα (TNFα) [34]. Aber auch verschiedene Zytokine, im Besonderen Interleukin 2, 7, und 15 sind dafür bekannt, dass sie proliferativ auf CLL-Zellen wirken. [91]. Für eine B-Lymphozytose ist auch die fehlende Apoptosefähigkeit der CLL-Zellen verantwortlich. Durch verschiedene antiapoptotische Faktoren, die zum Teil von den CLL-Zellen selbst freigesetzt werden, wird der programmierte Zelltod verhindert. Maßgeblich daran beteiligt sind Interleukin 4, 6, 8, 10 und 13 [91, 31], sowie CD40-Ligand [120].

1.1.5 Klassifikation der CLL

Die CLL wird, wie oben beschrieben, systematisch bei den B-Zell-Neoplasien eingeordnet. Die Erkrankung verläuft sehr heterogen, so dass eine weitere Einteilung in bestimmte Krankheitsstadien erfolgt. Weltweit haben sich vor allem zwei Systeme durchgesetzt: Die Einteilung nach Binet von 1981 [5] und die nach Rai von 1975 [109]. Beide Systeme stützen sich auf das Blutbild und die Befunde der körperlichen Untersuchung.

Stadium	Kriterien	medianes Überleben
0	Lymphozytose >15000µl Blut >40% Lymphozyten im Knochenmark Thrombozyten normal	>10 Jahre
I	Lymphozytose <15000µl Blut Thrombozyten normal Lymphknotenvergößerung	7 Jahre
II	Lymphozytose <15000µl Blut Thrombozyten normal Lymphknotenvergößerung Hepato- und/oder Splenomegalie	7 Jahre
III	Lymphozytose <15000µl Blut Hb<11g/dl Thrombozyten normal und/oder Lymphknotenvergößerung und/oder Organomegalie	1,5 Jahre
IV	Lymphozytose <100000µl Blut Thrombozyten < 100000/µl Blut und/oder Hb<11g/dl und/oder Lymphknotenvergößerung und/oder Organomegalie	1,5Jahre

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Rai (1975)

Stadium	Kriterien	medianes Überleben
A	<30% Lymphozyten im Knochenmark Hb>10g/dl Thrombozyten normal < als 3 befallene Lymphknoten-regionen	>10 Jahre
B	<30% Lymphozyten im Knochenmark Hb>10g/dl und/oder Thrombozyten normal > als 3 befalleneLymphknoten-regionen	7 Jahre
C	<30% Lymphozyten im Knochenmark Hb<10g/dl Thrombozyten normal unabhängig von befallenen Lymphknoten-regionen	1,5 - 2 Jahre

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Binet (1981)

1.1.6 Prognostische Faktoren in der CLL

Da die CLL einen sehr heterogenen Verlauf aufweist, ist das mittlere Überleben der Patienten nach wie vor sehr variabel. Aufgrund dessen und, weil viele Patienten in einem sehr frühem Stadium der Erkrankung diagnostiziert werden, ist es von zentraler Wichtigkeit weitere diagnostische Parameter zu finden, die eine bessere Einschätzung der Prognose und eine dementsprechend optimierte Therapie erlauben. Einfache gegebene Parameter wie Alter oder Geschlecht scheinen bei der CLL eine untergeordnete Rolle in Bezug auf die Prognose zu spielen [93, 115] und stellen keinen unabhängigen Parameter dar. Im Folgenden werden die wichtigsten Prognosefaktoren beschrieben.

Serumparameter

Verschiedene Serumparameter wurden auf ihre prognostische Bedeutung hin untersucht. Sie haben den Vorteil, dass sie leicht zu bestimmen und im Gegensatz zu z.B. histologischer Bestimmung von Knochenmarksinfiltration unabhängig von der untersuchenden Person sind. Sie sind zudem weniger störanfällig als andere Parameter. Als prognostisch bedeutsam haben sich vor allem die Thymidinkinase und das β2-Mikroglobulin herausgestellt. Eine eher ungünstige Prognose haben Patienten mit einer Konzentration von größer 7U/l bzw. 3,5U/l [62, 63]. Darüber hinaus gelten das Auftreten von gelöstem CD23 und erhöhte Werte von Lactatdehydrogenase als Anzeichen für eine schlechtere Krankheitsprognose [77, 81].

Zytogenetik

Mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von Zellkernen in der Interphase können zytogenetische Anomalien genauestens untersucht werden. Patienten mit chromosomalen Anomalien weisen in der Regel eine schlechtere Prognose auf als Patienten mit einem normalem Karyotyp. Häufig auftretende Anomalien sind:

- Trisomie12
- 13q14 Deletion
- 11q22.3-q23.2 Deletion
- 17p-Deletion

Als einzige dieser aufgeführten Anomalien weist die 13q-Deletion als alleinige Anomalie auf eine günstigere Prognose hin. Das Vorhandensein einer 17p- oder eine 11q-Deletion kann als ungünstigster Prognosefaktor angesehen werden. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf die 17p-Deletion fallen, die ein mittleres Überleben der Patienten von nur 32 Monaten gezeigt hat. Im Vergleich dazu weisen Patienten ohne genetische Anomalien eine mediane Überlebenszeit von 111 Monaten auf [37]. Eine pathophysiologische Erklärung hierfür liefert der mit einer 17p-Deleti-

on assoziierter Verlust des p53-Tumorsuppressorgens. Spezifische Mutationen, die das p53-Gen betreffen sind ebenfalls mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert. Allerdings weisen nicht alle p53 mutierten Patienten eine 17p-Deletion auf. Ebenso haben nicht alle Patienten mit einer 17p-Deletion ein mutiertes p53-Gen [146]. Die Prognoserelevanz einer Trisomie12 ist bislang ungeklärt. Während zum Teil von einem ungünstigeren Krankheitsverlauf berichtet wird [72], zeigten andere Studien keinen signifikanten Unterschied im Überleben eines Patienten mit einer Trisomie12 im Vergleich zu einem Patienten ohne chromosomale Veränderungen [38, 37].

IgH Mutationsstatus

Eine wichtiger Schritt während der Differenzierung der B-Zellen ist die Umlagerung der Immunglobulingene. In der Prä-B-Zelle findet die Umlagerung des Ig-Schwerketten-(IgH-)Gens statt. CLL-Zellen können sowohl ein bereits mutiertes, als auch nicht mutiertes IgH-Gen aufweisen [30]. Dieser Mutationsstatus wird als unabhängiger Prognosefaktor verwendet. Patienten mit unmutierten IgH-Genen weisen einen deutlich aggressiveren Krankheitsverlauf auf, was möglicherweise auf den Ursprung dieses CLL-Typs auf ein früheres Entwicklungsstadium der B-Zelle zurückzuführen ist [30].

Sonstige Parameter

Häufig werden weitere Parameter mit schlechten Prognosen in Zusammenhang gebracht. Die Bekanntesten sind die ZAP70(zeta assoziiertes Protein 70)- und CD38-Expression. ZAP70 ist eine Tyrosinkinase, die an der Signalkaskade des T-Zellrezeptors beteiligt ist und in der CLL die Signaltransduktion des B-Zellrezeptors verstärkt [20]. ZAP70 korreliert mit verschiedenen anderen Prognoseparametern, z.B. mit β2-Mikroglobulin. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die ZAP70 Expression mit Rai Stadien korreliert. So weisen im Vergleich zu fortgeschritteneren Stadien, im Rai-Statium 0 signifikant mehr Patienten einen negativen ZAP70 Status

auf. Je fortgeschrittener das Stadium ist, desto höher ist auch die Expression von ZAP70 [129]. Zu der Korrelation der Expression von CD38 und schlechter Prognose gibt es zahlreiche Studien. Hohe CD38 Expression wird mit einem schlechteren Krankheitsverlauf, z.B. kürzerer therapiefreier Zeit, schlechterem Ansprechen auf Chemotherapie und kürzerem Überleben in Verbindung gebracht [42]. Sowohl der positive ZAP70-, als auch der CD38-Status, korrelieren mit dem IgH-Mutationsstatus [30, 64, 27].

1.1.7 Therapie

Die Behandlungsmöglichkeiten der CLL haben sich in den letzten Jahren erheblich gewandelt. Während man die CLL-Patienten früher oft ausschließlich symptomatisch therapiert hat, kann man heute auf zahlreiche verschiedene Behandlungsmöglichkeiten zurückgreifen. Es gibt einige unterschiedliche Arzneistoffe, die zur Chemo- oder Immuntherapie eingesetzt werden können. Darüber hinaus gibt es einen kurativen Ansatz: Die Hochdosistherapie mit anschließender Stammzelltransplantation. Diese Option ist jedoch nur für bestimmte Patienten verfügbar. Um die optimale Therapiemöglichkeit für einen Patienten zu finden, müssen verschiedene Aspekte berücksichtigt werden. Gerade in frühen Stadien der CLL kann es sinnvoll sein, den Patienten und seinen Krankheitsverlauf ausschließlich zu beobachten, aber nicht zu behandeln. Bei der Entscheidung, welche Therapieoption die individuell beste Möglichkeit ist, sollte auf jeden Fall das Stadium der Erkrankung, die Krankheitsaktivität anhand verschiedener Prognosefaktoren, sowie das Alter des Patienten und die damit verbundenen, eventuell vorhandenen anderen Erkrankungen berücksichtigt werden. Des Weiteren muss beachtet werden, ob der Patient zum Ersten Mal behandelt wird oder ob es ein Rezidiv ist. Durch die Therapie kann eine komplette, teilweise nur eine partielle Remission erreicht werden. [58]

Substanzen

Zur Therapie der CLL können klassische Chemotherapeutika eingesetzt werden. Zu diesen gehören die DNS-modifizierenden Alkylantien und Purinanaloga. Die Che-

motherapie ist die am häufigsten eingesetzte Form der Behandlung der CLL. Eine weitere Möglichkeit ist die Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern.

Alkylantien

Die Gruppe der Alkylantien oder auch Stickstoff-Lost-Derivate genannt, können aufgrund ihrer chemischen Struktur die Nukleinsäuren der DNS alkylieren. Durch die Alkylierung der DNS kommt es zu abnormer Basenpaarbildung und Vernetzung von zwei DNS-Strängen. Der Zellzyklus ist gestört und die Zelle kann sich nicht mehr teilen. Durch die irreparablen Schäden wird außerdem die korrekte Replikationsfähigkeit der DNS aufgehoben, was zu Apoptose der Zelle führt [98, 130]. Die Arzneistoffe aus dieser Klasse, die erfolgreich bei der Therapie der CLL eingesetzt werden, sind Chlorambucil, Bendamustin und Cyclophosphamid. Chlorambucil wird vorzugsweise bei älteren Patienten zur Palliativtherapie eingesetzt. Der klare Vorteil in dieser Substanz liegt in der möglichen oralen Verabreichung [116]. Cyclophosphamid wird in der Behandlung der CLL hauptsächlich in Kombination mit anderen Arzneimitteln bei der CLL eingesetzt [74]. Bendamustin wirkt nicht nur als DNS-alkylierendes Agens, sondern auch durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu den Purinanaloga und wird ebenso als falscher DNS-Baustein eingebaut. Bendamustin hat gegenüber den anderen Alkylantien den Vorteil, dass es weniger toxisch ist [80]. Es wurde erst kürzlich gezeigt, dass Bendamustin bei der Erstbehandlung von Patienten eine signifikant höhere Effizienz zeigt als Chlorambucil [78].

Purinanaloga

Zu den Purinanaloga, die in der CLL eingesetzt werden gehören Fludarabin und Cladribin. Diese beiden Substanzen werden in der Zelle zur aktiven Trisphosphatform umgewandelt und können so die DNS-Polymerase und Ribonucleotid-Reduktase hemmen. Außerdem werden sie als falsche Bausteine in die DNS eingebaut. Es kommt zur Apoptose der Zellen [16]. Verschiedene Studien zeigen eine bessere Wirksamkeit der Monotherapie mit Fludarabin gegenüber Chlormabucil [108]. Allerdings ist bekannt, dass Patienten mit einer 17p-Deletion bzw. mit mutiertem p53-Gen eine Resistenz gegenüber Fludarabin aufweisen [137, 36]. Cladribin weist einen ähnlich großen Vorteil in der Monotherapie gegenüber den Alkylantien

auf wie Fludarabin. Allerdings ist die Rate der kompletten Remission geringer als bei der Behandlung mit Fludarabin [114].

Monoklonale Antikörper

Immuntherapeutisch werden in der CLL zwei verschiedene Antikörper eingesetzt: Rituximab und Alemtuzumab. Rituximab ist ein chimärer humanisierter, monoklonaler Maus-Antikörper, der sich gegen den Oberflächenmarker CD20 richtet. CD20 ist vor allem auf B-Lymphozyten (normalen und malignen) vorhanden. Physiologisch ist CD20 maßgeblich an der Regulation des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung beteiligt. Die Bindung von Rituximab an CD20 führt zu einer Antikörper-vermittelten Zytotoxizitätsreaktion. Es kommt zur Apoptose der Zelle [87]. In der Monotherapie zeigt Rituximab eine gute Wirkung. In 51% der Fälle findet man ein gutes Ansprechen der Therapie [57]. Der humanisierte IgG1-$\varkappa$-Antikörper Alemtuzumab bindet spezifisch an das CD52 Glukoprotein. CD52 befindet sich hauptsächlich an der Oberfläche von B-Zellen und T-Lymphozyten. Die physiologische Funktion von CD52 auf den Lymphozyten ist weitgehend unbekannt. Durch die Bindung an CD52 wird eine zellvermittelte Zytotoxizitätsreaktion ausgelöst. Es kommt zur Lyse der Zelle [16, 58, 144]. Die Monotherapie mit Alemtuzumab zeigt vielversprechende Erfolge: Ein Ansprechen von 33-53% auf die Therapie konnte erzielt werden [58]. Sogar rezidivierende Patienten zeigen ein gutes Ansprechen auf Alemtuzumab [107]. Dieser Antikörper zeigt zudem eine gute therapeutische Wirksamkeit, bei den so schwer behandelbaren Patienten mit einer p53 Mutation bzw. einer 17p-Deletion [83, 131].

Kombinationstherapien

Zur Verbesserung der Wirksamkeit der Monotherapien, gibt es verschiedene kombinatorische Therapieansätze. Als besonders wirksam zeigt sich dabei die Kombination aus Fludarabin und Rituximab [15, 124]. Aber auch eine Dreierkombination zusätzlich mit Cyclophosphamid stellt eine gute Alternative dar [61, 74]. Werden nur klassische Chemotherapeutika kombiniert, hat sich eine Kombination von Fludarabin mit Cyclophosphamid bewährt. So kann man mit dieser Kombination signifikant mehr Remissionen und eine deutlich verlängerte progressionsfreie Zeit erreichen, als mit

Fludarabin alleine [45]. Es gibt auch aktuelle Phase-II-Studien zu der Wirksamkeit der Kombination von Bendmustin mit Rituximab der deutschen CLL Studiengruppe, die auf ein sehr gutes Ansprechen dieser Kombination hoffen lassen [49]. Die hier erwähnten Kombinationen sind bekannte Beispiele für Kombinationstherapien. Darüber hinaus gibt es viele weitere verschiedene Kombinationsmöglichkeiten, die getestet werden oder wurden.

Stammzelltransplantation

Die Stammzelltransplantation ist die einzige Möglichkeit die CLL kurativ zu behandeln. Man unterscheidet zwischen der autologen und allogenen Stammzelltransplantation. Bei der autologen Stammzelltransplantation werden dem Patienten vor der Hochdosischemotherapie hämatopoetische Stammzellen entnommen. Diese werden dem Patienten nach Beendigung der Chemotherapie wieder autolog rücktransplantiert. Diese Art der Stammzelltransplantation ist vorteilhaft, weil sie weniger toxisch ist und keine Anti-Transplantat Immunreaktion hervorrufen kann. Allerdings ist die Rate der Rezidive relativ hoch, da die Trennung von malignem Material nicht immer 100-prozentig verläuft. Es hat sich jedoch in Studien gezeigt, dass die autologe Stammzelltransplantation keinen Vorteil in Bezug auf das Gesamtüberleben des Patienten gegenüber der klassischen Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika bietet [41, 84]. Die Gesamtmortalität der autologen Stammzelltransplantation liegt bei unter 10% [139]. Zusammenfassend ist der klinische Nutzen der autologen Stammzelltransplantation fraglich.
Bei der allogenen Stammzelltransplantation wird nach einem geeigneten Fremdspender gesucht. Weil hier nur sehr selten Rezidive auftreten, beweist sich diese Methode als einzig mögliche kurative Behandlungsmöglichkeit der CLL [84]. Durch verbesserte Auswahl der Spender mittels Human Leukocyte Antigen (HLA) Kompatibilität ist das Risiko der Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion deutlich gesunken. Ebenso konnte die akute Toxizität der Konditionierung durch Dosisreduktion und somit die Mortalität erheblich gesenkt werden. So kann die allogene Stammzelltransplantation nun auch bei jüngeren komorbiden oder älteren Patienten, für diese Therapieopti-

on bisher nicht in Frage kam, angewendet werden [84]. Wegen der dennoch nicht unerheblichen toxischen Nebenwirkungen, vornehmlich durch die Hochdosischemotherapie verursacht, wird die allogene Stammzelltransplantation trotzdem nur bei Patienten mit besonders risikoreichem Krankheitsverlauf empfohlen [40].

1.2 Bedeutung des Mikromilieus bei der CLL

CLL-Zellen kennzeichnen sich in der Regel durch eine erhöhte Apoptoseresistenz aus. Dieser Effekt geht *in vitro* jedoch sehr schnell verloren [65], weshalb man davon ausgehen kann, dass das *in vivo* Mikromilieu eine erhebliche Rolle bei der Pathogenese der Erkrankung spielt. Daher ist es wichtig, dass man CLL-Zellen nicht isoliert, sondern immer im Kontext mit ihrer spezifischen Mikroumgebung betrachten sollte. Die Mikroumgebung beinhaltet eine Vielzahl von Zelltypen, die mit CLL-Zellen interagieren: Dazu gehören T-Zellen, Stromazellen [17], *Nurselike*-Zellen (NLC) und follikuläre dendritische Zellen [3]. NLCs entstehen durch Interaktion von CLL-Zellen mit CD14 positiven Monozyten und sie schützen die CLL-Zellen vor Apoptose [136]. Besonders komplex ist die Interaktion der CLL-Zellen mit Knochenmarksstromazellen (KMSZ): Über verschiedene Integrine auf den Zelloberflächen können KMSZ mit den CLL-Zellen interagieren und so einen überlebensfördernden Effekt auf diese auslösen. Zudem findet eine Interaktion über Proteinsekretion statt. Vor allem sezernieren KMSZs und NLCs den *stromal cell derived factor-1* (SDF-1), der die CLL-Zellen durch Aktivierung des Chemokinrezeptors CXCR4 vor Apoptose schützt. Dieser Mechanismus funktioniert auch *in vitro* über Zell-Zell-Kontakte [13]. Darüber hinaus sezernieren KMSZs den vaskulären endothelen Wachstumsfaktor (VEGF), der physiologisch für die Angiogenese sehr wichtig ist und bei der CLL einen antiapoptotischen Effekt auf die malignen Zellen ausübt [53].
Weitere wichtige Zytokine, auf die in dieser Arbeit besonders eingegangen werden soll, sind der CD40-Ligand und Interleukin 4 (IL4). CD40-Ligand, auch bekannt als CD154, ist der physiologische Ligand von CD40, ein Rezeptor der Tumornekrosefaktor(TNF)-Familie. Die Stimulation von CD40 resultiert in B-Zell Differenzierung und im Überleben der Zelle. CD40-Ligand ist einTNFα ähnliches Protein, dass von

CD4 positiven T-Zellen produziert wird. CD40-Ligand ist einer der bedeutendsten Botenstoffe für die Interaktion zwischen B- und T-Zellen [120]. Der antiapoptotische Effekt der Stimulierung von CD40 begründet sich durch die Aktivierung von *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NFκB). Dadurch kommt es zur Transkription von dem antiapoptotischen Protein *B-Zell-Lympohma extra-large-Protein* (BCL-XL). Es gehört zu der Familie der *B-Zell-Lymphoma-2* (Bcl-2) Proteine [120]. Interleukin 4 (IL4) ist dafür bekannt, dass es CLL-Zellen vor Apoptose schützt. Der antiapoptotische Effekt beruht auf eine Erhöhung der Expression von Bcl-2 Protein und den Signalwegen, die durch Bcl-2 aktiviert werden. Bcl-2 ist ein Protoonkogen, dass direkten positiven Einfluss auf das Überleben der Zellen hat [31]. Auf das Wachstum der CLL-Zellen zeigt IL4 jedoch keinen Einfluss [39]. Allerdings ist ein positiver Effekt auf die CD40-Expression beschrieben worden [24].

1.2.1 Angiogenese im CLL Mikromilieu

Die Angiogenese ist ein komplexer physiologischer Vorgang, unter dem man im Allgemeinen die Neubildung und das Wachstum von Blutgefäßen, meist aus bereits bestehenden Gefäßen versteht. Es sind viele verschiedene Mediatoren an der Angiogenese beteiligt. Physiologisch herrscht in der Regel ein Gleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren, so dass sich die Gefäße in einem Ruhezustand befinden. Im gesunden Menschen spielt die Angiogenese hauptsächlich beim Wachstum des Körpers, bei der Wundheilung und in der Schwangerschaft eine Rolle.
Aus pathologischer Sicht ist die Angiogenese bei verschiedenen malignen Erkrankungen, vor allem bei soliden Tumoren präsent. Das Gleichgewicht der Angiogenese ist in soliden Tumorzellen in Richtung proangiogenetischer Faktoren verschoben. Dadurch wird der Tumor über neue Blutgefäßbildung in das vaskuläre Netzwerk des Körpers einbezogen [50].
Es ist aber mittlerweile bekannt, dass nicht nur solide Tumore, sondern auch maligne hämatologische Erkrankungen eine erhöhte Angiogenese aufweisen. Verschiedene proangiogenetische Faktoren werden bei leukämischen Erkrankungen von den malignen Zellen sezerniert. Im Fall der CLL konnte ebenfalls eine erhöhte Angio-

genese, sowohl im Knochenmark als auch in den Lymphknoten festgestellt werden [103, 85, 92]. Die erhöhte Gefäßdichte im Knochenmark korreliert mit höheren Plasmaleveln der proangiogenetischen Faktoren VEGF und Angiopoietin-2 (Ang2) [85]. Neben Ang2 und VEGF konnten im Vergleich zur gesunden Kontrolle weitere angiogenetische Faktoren in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden. Dazu gehören *Basic fibroblast growth factor* (bFGF), *Platelet derived growth factor* (PDGF) und die extrazelluläre Proteinase *Matrix-Metalloproteinase-9* (MMP-9). Der antiangiogenetische Faktor Thrombospondin-1 (TSP-1) ist bei der CLL herunterreguliert [52].

Viele Studien zeigen, dass Serumlevel angiogenetischer Faktoren entweder mit anderen Prognosefaktoren oder direkt mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf korrelieren. So ist z.B. für VEGF Serumlevel bekannt, dass diese positiv mit hohen β2-Mikoglobulin Werten korrelieren. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Blutgefäßdichte im Knochenmark mit fortschreitendem Krankheitsverlauf zunimmt. Während bei soliden Tumoren eine erhöhte Angiogenese einen direkten Einfluss auf die Versorgung der Tumormasse und damit des Tumorwachstums hat, ist ein solcher Zusammenhang bei hämatologischen malignen Erkrankungen nicht gegeben, so dass bei diesen die Rolle der gesteigerten Angiogenese unklar ist. Es konnte gezeigt werden, dass proangiogenetische Mitogene Endothelzellen im Knochenmark dazu stimulieren verschiedene hämatopoetische Wachstumsfaktoren, darunter der *Granulocyte-colony-stimulating-factor* (G-CSF), der *Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor* (GM-CSF), der *stem cell factor* und Interleukin 6 (IL6), freizusetzen [82]. Auch Stromazellen produzieren unter dem Einfluss von proangiogenetischen Faktoren hämatologische Wachstumsfaktoren [32]. Es kann demnach von einem Angiogenese-unabhängigen Effekt der auf der Wachstumsförderung und gleichzeitiger Unterdrückung von Zelltod beruht, geschlossen werden. In vielen soliden Tumoren ist die Angiogenese schon als möglicher Angriffspunkt für Therapien identifiziert worden. Auch zur Behandlung der CLL stellt sie einen interessanten therapeutischen Angriffspunkt dar. So gibt es Studien zur Wirksamkeit von Thalidomid, welches die Synthese von verschiedenen Zytokinen, darunter IL6, TNFα und dem proangiogenetischen VEGF verhindert. Thalidomid wird unter anderem auch in

Kombination mit Fludarabin getestet und weist auf einen recht vielversprechenden Therapieerfolg hin [54]. Getestet wird auch ein anti-VEGF Antiköper: Bevacizumab [82]. Angiogenetische Faktoren und ihre Wirkmechanismen bei der Angiogenese, vor allem aber bei angiogenese-unabhängigen Prozessen sind bisher noch nicht ausreichend beschrieben und stellen einen vielversprechenden Angriffspunkt für neue Therapieoptionen bei der CLL dar.

1.2.2 Status der Zytokine der Angiogenese bei der CLL

Sekretion von Zytokinen ist eine wichtige Art der Zell-Zell Interaktion und spielt bei der Angiogenese eine entscheidende Rolle. Viele verschiedene Zytokine, darunter klassische pro- und antiangiogenetische Faktoren, aber auch integrale Membranproteine und extrezelluläre Proteasen, beeinflussen die Angiogenese.
Der wichtigste sezernierte Faktor bei der Angiogenese ist VEGF. VEGF wird auch von CLL-Zellen in hoher Konzentration sezerniert und zählt wohl zu den bekanntesten proangiogenetischen Faktoren bei dieser Erkrankung. VEFG werden grundsätzlich drei Hauptfunktionen zugeschrieben: Induktion der verstärkten Angiogenese im Knochenmark, Vermittlung überlebensfördernder Signale und Stimulation der Migration der CLL-Zellen [99, 145]. Der antiapoptotische Effekt von VEGF erfolgt durch die Aktivierung von zwei antiapoptotischen Genen: dem *Myeloid cell leukemia-1* (MCL1) und dem *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) [145]. Lange Zeit wurde eine VEGF-basierte Induktion des bei der CLL stark überexprimierten anti-apoptotischen Bcl2 als Ursache des überlebensfördernden Effekts vermutet. Dies konnte jedoch mittlerweile widerlegt werden [142].
Der Hauptvertreter der Familie der *Fibroblast growth factors* (FGF) bFGF ist ein weiterer proangiogenetischer Faktor, der im Serum von CLL-Patienten erhöht ist. bFGF induziert parakrin die Proliferation von Epithelzellen und Fibroblasten. Über einen autokrinen Mechanismus kommt es zu einer Apoptoseresistenz. Darüber hinaus steht bFGF im Verdacht den p53-Tumorsupressor Signalweg zu unterdrücken [145].
Auch der *Platelet derived growth factor* (PDGF) und sein Rezeptor sind bei der

CLL vermehrt exprimiert. PDGF steuert als Mitogen die Interaktionen zwischen CLL-Zellen und Stromazellen steuert. Sowohl VEGF als auch PDGF sind bekannte Liganden des PDGF-Rezeptors (PDGFR), wobei aber hauptsächlich der PDGF-PDGFR Komplex für die Aktivierung der mesencyhmalen Stromazellen verantwortlich ist [35].
Ein weiterer Angiogenese-relevanter Faktor, der bei der CLL hochreguliert ist, ist die extrazelluläre Protease MMP-9. MMP-9 wird mit Gewebeinvasion und Remodelling von CLL-Zellen in Verbindung gebracht [73].

1.2.3 Oxygenisierungsstatus bei der CLL

Das schnelle Zellwachstum in soliden Tumoren führt zu einem Gefälle des Sauerstoffpartialdrucks. Die im Inneren des Tumors vorhandene Hypoxie führt zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors *hypoxia-induceable factor-1*α (HIF-1α), welcher wiederum über Stimulation der Expression von VEGF die Angiogenese induziert [128]. Die neu gebildeten Blutgefäße tragen über Vaskularisierung zur Sauerstoffversorgung des wachsenden Tumors bei. Man findet nicht nur in soliden Tumoren hypoxische Umgebungen, sondern auch bei leukämischen Erkrankungen. So konnte man anhand von Rattenmodellen, die an akuter myeloischer Leukämie (AML) erkrankt sind, ein Sauerstoffmangel in der Mikroumgebung der leukämischen Zellen, vor allem im Knochenmark nachweisen [96].
Da bei der CLL gezeigt werden konnte, dass HIF-1α von CLL-Zellen aus dem Knochenmark sezerniert wird [52], lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass im Mikromilieu des infiltrierten Knochenmarks bei der CLL hypoxische Bedingungen vorliegen. Jedoch könnte auch ein Defekt der für die HIF-1α-Expression verantwortlichen Signalwege beteiligt sein. Auch Ang2 wird als möglicher Mediator in der hypoxieinduzierten Angiogenese angesehen [104].

1.3 Angiopoietin

1.3.1 Physiologische Funktion der Angiopoietine

Die Familie der Angiopoietine umfasst vier verschiedene Mitglieder: Ang1, Ang2, Ang3 und Ang4. Über Ang3 und Ang4 ist relativ wenig bekannt. Sie stellen orthologe Proteine dar, wobei Ang3 bei Mäusen und Ang4 beim Menschen gefunden wurde. Strukturell unterscheiden sie sich relativ stark, da nur 54% der Aminosäuren identisch sind. Die Gene wurden jedoch auf denselben Genabschnitten gefunden, so dass man von einer Orthologie ausgeht. Auch in ihrer Funktion scheinen sie recht verschieden zu sein. Ang3 wurde bei Mäusen in Niere und Hoden nachgewiesen. Der Rezeptor der Angiopoietine ist der *Tyrosinekinase with immunoglobuline and epidermal growth factor homology domains 2* (Tie2). An diesem zeigt Ang3 eine antagonistische Wirkung. Ang4 dagegen konnte hauptsächlich in der menschlichen Lunge nachgewiesen werden und agiert als Tie2-Agonist [138].
In Bezug auf die Angiogenese spielen Ang1 und Ang2 eine wichtige Rolle. Beide konnten mit Hilfe von Maus-knock-out-Studien als essentiell für die Bildung reifer Blutgefäße beschrieben werden [134]. Diese sind bekannte Gegenspieler an ihrem Rezeptor Tie2. Je nach Mikroumgebung können die Angiopoietine sowohl proangiogenetische als auch antiangiogenetische Wirkungen zeigen. Erstmals konnte 1996 gezeigt werden, dass Ang1 ein Agonist am Tie2-Rezeptor ist und dessen Autophosphorylierung und Dimerisierung induziert [33]. Die Signalweiterleitung erfolgt hauptsächlich über die Phoshoinositol-3'Kinase (PiK). Die Aktivierung des Tie2-Rezeptors resultiert in einer Aufrechterhaltung des Ruhezustands der Endothelzellen und schützt das Endothel vor ungewollter Aktivierung durch Zytokine. Ang2 dagegen löst keine Autophosphorylierung des Tie2-Rezeptors aus. Ang2 ist hauptsächlich in Geweben mit hoher Gefäßneu- und -umbildung exprimiert, was darauf schließen lässt, dass es daran maßgeblich beteiligt ist. Ang2 zeigt keine spezifische Funktion, es stört vielmehr die Ang1/Tie2 vermittelte Signaltransduktion und die damit verbundenen gefäßstabilisierenden Effekte. Die Gefäße werden in Anwesenheit von Ang2 sensibler gegenüber anderen angiogenetischen Faktoren [46].
Darüber hinaus ist die Funktion von Ang2 abhängig von VEGF. In Anwesenheit

von VEGF kommt es zur Destabilisierung von bereits bestehenden Gefäßen sowie zur Entwicklung neuer Gefäße. In Abwesenheit von VEGF wirkt Ang2 antiangiogenetisch, was zur Regression von Gefäßen führt [67]. Vermutlich ist Ang2 auch an der T-Zell-Regulation beteiligt [25].

1.3.2 Die Rolle von Ang2 bei malignen Erkrankungen

Unter physiologischen Bedingungen verläuft die Angioenese kontrolliert: Ang2 bindet an seinen Rezeptor Tie2 und bewirkt in Anwesenheit von VEGF die Auflockerung und Destabilierung der Gefäße. Es findet Migration, Proliferation und Neubildung von Gefäßen statt. Die neuen Gefäße werden durch Ang1/Tie2 Interaktion geschützt. Es ist ein feines Zusammenspiel, dessen empfindliches Gleichgewicht bei Tumoren zugunsten des Ang2 verschoben ist. Dieses Ungleichgewicht zur Angiogenese in Tumoren nennt man den *angiogenic switch*. Ab etwa 3mm Größe kann eine Tumormasse nicht mehr ausschließlich über Diffusion mit Sauerstoff versorgt werden und bedarf einer verbesserten Vaskularisierung [145]. Um dies zu erreichen, sezernieren die Tumorzellen selbst verschiedene proangiogenetische Faktoren, darunter auch Ang2. Ang2 konnte bei vielen verschiedenen Tumoren in erhöhter Konzentration gefunden werden. Eine erhöhte Ang2 Expression ist z.B. beim Glioblastom [79], beim Mammakarzinom [132, 117], beim kleinzelligen Nierenkarzinom [28], Leberzellkarzinom [95] und nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom [66] beschrieben. In verschiedenen Studien findet man Korrelationen zwischen Metastasenbildung und hohen Ang2-Konzentrationen [125, 69]. Oft wird ein ungünstiger Krankheitsverlauf, z.B. schnelles Tumorwachstum und kürzere Überlebenszeit der Patienten mit hohen Ang2-Leveln assoziiert [68].

1.3.3 Die Rolle von Ang2 bei leukämischen Erkrankungen

Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Ang2 in mehreren leukämischen Erkrankung, darunter die AML [123], das multiple Myolom [71] und die CLL

[141] vermehrt exprimiert wird. Bei der AML konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung mit Tie2-blockierenden Antikörpern in der Kokultur von AML-Zellen mit Endothelzellen eine wachstumsinhibierende Wirkung besitzt [113]. Bei der CLL wurden Korrelationen zwischen hohen Plasma-Konzentrationen von Ang2 und verschiedenen anderen Prognosefaktoren beschrieben [141, 86]. Dazu gehören hohe β2-Mikroglobulin-Werte, ein ungünstiger IgH-Mutationsstatus, sowie schlechte zytogenetische Risikofaktoren. Gleichzeitig werden mit hohen Ang2-Konzentrationen im Plasma von CLL-Patienten eine kürzere Zeit bis zur Erstbehandlung und ein generell kürzeres Gesamtüberleben assoziiert [85]. Funktionell könnte das Ang2/Tie2-System eine wichtige Rolle in der Kommunikation zwischen den CLL-Zellen und den Endothelzellen im Knochenmark darstellen. Der enge Kontakt der CLL-Zellen mit den Endothelzellen und die erhöhte Mikrogefäßdichte im von CLL-Zellen infiltriertem Knochenmark lassen auf eine Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen in diesem Mikromilieu schließen [12]. Die Rolle des Ang2 als prognostischer Faktor auf der einen, sowie die mögliche Bedeutung in Bezug auf die Pathogenese und die Angiogenese auf der anderen Seite, machen dieses Protein zu einem interessanten Gegenstand aktueller Forschung.

1.4 Tie-Rezeptoren

Es sind bisher zwei verschiedene Rezeptoren der Tie-Familie bekannt: Tie1 und Tie2 [119, 89]. Diese beiden Rezeptoren weisen eine starke strukturelle Ähnlichkeit auf. Trotz dieser großen Homologie gibt es einen wichtigen Unterschied zwischen den Rezeptoren: Im Gegensatz zum Tie2-Rezeptor, dessen Liganden die Angiopoietine darstellen, hat man bisher keine Proteine identifizieren können, die am Tie1-Rezeptor binden, so dass seine Funktion weitgehend unbekannt ist. Es wird jedoch trotzdem von einer Beteiligung bei der Vaskulogenese ausgegangen [106, 119].
Tie2 ist maßgeblich an der embryonalen Gefäßentwicklung beteiligt [121, 105, 44]. Außerhalb der vaskulären Komponente konnte Tie2 auf hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden [70]. Die Tie2 exprimierenden hämatopoetische Stammzellen bilden eine Subpopulation, die sich im Ruhezustand befindet und an Osteo-

blasten angelagert ist. Dieser Ruhezustand und die Adhäsion an die Osteoblasten werden durch Tie2 und Ang1 gefördert, sowie aufrechterhalten [2].
Die bekannteste Funktion des Tie2-Rezeptors ist die Angiogenese im Zusammenhang mit seinen Liganden Ang1 und Ang2. In diesem Kontext findet man häufig eine vermehrte Expression von Tie2 in verschiedenen Tumoren, z.B. beim Mammakarzinom und verschiedene Leukämien [89]. In leukämischen Erkrankungen konnte eine vermehrte Expression von Tie2 bereits in verschiedenen AML- und CML-Zelllinien, sowie auch an einzelnen Patienten nachgewiesen werden [97, 122]. Im Zusammenhang mit CLL konnte bisher kein Tie2 nachgewiesen werden. Da eine erhöhte Menge von Ang2-Protein im Plasma von CLL-Patienten nachgewiesen wurde, ist es ein interessanter Ansatz neben der prognostischen Bedeutung auch die funktionelle Rolle dieses Proteins gerade im Zusammenhang mit dem Tie2-Rezeptor aufzuklären.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Zusammenhang mit der CLL wurde Ang2 in bisherigen Arbeiten ausschließlich quantitativ untersucht. Es konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nur gezeigt werden, dass CLL-Patienten mit hohen Ang2-Konzentrationen im Plasma eine schlechteren Krankheitsverlauf aufweisen, als Patienten mit geringeren Ang2-Leveln. Es ist noch nichts über die Funktionsweise des Proteins in Zusammenhang mit dem ungünstigeren Krankheitsverlauf bekannt. So soll im Rahmen dieser Arbeit der Wirkort und die Wirkweise des Ang2 näher eingegrenzt werden. Eine wichtige Frage ist, warum CLL-Patienten mit hohen Ang2-Leveln ein kürzeres Gesamtüberleben aufweisen. Ein möglicher Zusammenhang wäre ein Ang2 vermittelter positiver Effekt auf das Überleben der CLL-Zellen. Generell zeichnen sich maligne B-Lymphozyten durch eine fehlende Apoptose aus. Es gibt verschiedene Faktoren, die überlebensfördernd, bzw. antiapoptotische Effekte auf die CLL-Zellen haben. So ist z.B. VEGF ein bekannter proangiogenetischer Faktor, der bei der CLL angiogeneseunabhängig das Überleben der CLL-Zellen fördert. Ein Aspekt dieser wird Arbeit sein, zu untersuchen, in wieweit Ang2 das Überleben der CLL-Zellen beeinflusst. Falls Ang2 das Überleben der CLL-Zellen fördert, stellt sich die Frage, ob dies nun in direktem Zu-

sammenhang mit der schlechteren Prognose der Patienten steht. Falls Ang2 keinen Einfluss auf das Überleben der CLL-Zellen aufweist, sollte nach anderen Mechanismen gesucht werden, über die Ang2 Einfluss auf das Krankheitsgeschehen nehmen kann. In diesem Zusammenhang ist es interessant den Tie2-Rezeptor auf den CLL-Zellen oder auf Zellen des Mikromilieus der malignen B-Zellen, zu identifizieren, um so nach Angriffspunkten des Ang2 zu suchen. Zu Tie2 ist in Zusammenhang mit der CLL bisher nichts bekannt.
Ziel dieser Arbeit soll also sein, die Funktion des Ang2 in der CLL zu charakterisieren und seine Bedeutung für die Interaktion mit dem Mikromilieu unter der Berücksichtigung des Tie2 Rezeptors herauszustellen. Dazu sollen verschiedene mechanistische Einflüsse aus der Mikroumgebung in diesem Zusammenhang untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav	Varioclav Typ 400, H+P, Labortechnik GmbH
Durchflusszytometer	FacsCanto, BD
	Facs Galios, Beckmann&Coulter
Filmentwickler	Curix 60 Agfa
Absorptionsmesser	µQuant, Biotek Instruments
Immunoblot	Peqlab
Kapillarelektrophorese	QIAcxel, QIAgen
Sterilbänke	HLB 2448, Heraeus
PCR Block	Thermocycler T3000,biometra Peqstar, Peqlab
Mastercycler	eppendorf

2.1.2 Zellkultur

Zelllinien

HUVEC, PromoCell

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) sind primäre Zellen, die aus der Nabelschnurvene des Menschen gewonnen werden. In dieser Arbeit wurden HUVECs eines einzelnen Spenders verwendet. HUVECs weisen eine begrenzte Teilungsrate auf. Im Laufe dieser Arbeit wurden keine HUVECs höher Passage 12 verwendet. Die Zellen exprimieren Tie2.

K562, DSMZ Nummer (Nr.):ACC 10

K-562 entsprechen Zellen der chronisch myeloischen Leukämie. Sie wurden einer 53-jährigen Frau mit chronischer myeloischer Leukämie im Stadium der Blastenkrise aus dem Pleuraerguss entnommen.

HL60, DSMZ, Nr.:ACC 3

HL-60 sind humane Zellen der akuten myeloischen Leukämie. Sie wurden einer 35-jährigen Frau mit diagnostizierter akuter myeloischer Leukämie aus dem peripheren Blut entnommen.

NB4, DSMZ, Nr.: ACC 207

NB-4 sind humane Zellen der akuten promyeloischen Leukämie. Sie wurden aus dem Knochenmark einer 23-jährigen Frau mit akuter promyeloischer Leukämie während des zweiten Rezidivs gewonnen.

HS5, ATCC, Nr.: CRL-11882

HS-5 sind humane Knochenmarksstromazellen. Morphologisch entsprechen sie Fibroblasten. Die Zellen entstammen einem 30-jährigen Mann.

KUSA-A1, Quelle unbekannt

KUSA sind murine Zellen aus dem Knochenmark. Die Zellen sind histologisch den Osteoblasten zuzuordnen.

NK_{tert}, Riken Zellbank, Nr.:RCB 2350

NK_{tert} sind humane Stroma-Zellen aus dem Knochenmark.

Primäre Zellen

Primäre CLL-Zellen wurden aus den anonymisierten Resten des Blutes von Routineuntersuchungen von CLL-Patienten gewonnen. Gesunde mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden aus den anonymisierten Resten gesunder Blutspender isoliert. Knochenmarkszellen wurden aus anonymisierten Resten der Knochenmarksproben aus Routineuntersuchungen gewonnen. Alle Spender haben ihr Einverständnis dazu gegeben, dass ihr Blut zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden darf.

Nährmedien

Endothelial Cell Growth Medium (Ready-to-use), PromoCell

Dieses Medium wurde für HUVEC benutzt.

RPMI 1640, PAA

Dem RPMI Medium wurden grundsätzlich fetales Kälberserum (FCS) in einer Endkonzentration von 10% (V/V), N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure(HEPES)-Puffer (Endkonzentration 10mM), Streptomycin (Endkonzentration 10µM) und Penicillin (Endkonzentration 100U/ml) zugefügt. Dieses Medium wurde für alle anderen Zellen und Zelllinien verwendet.

2.1.3 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von Tib MOLBIOL bezogen. Sie wurden zu einer Konzentration von 100µM gelöst und bei -20°C gelagert.

Für die Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurden folgende Oligonucleotide als Primer verwendet:

Ang2:

Vorwärts: 5' GACGCGCCGCTCGAATACGA

Rückwärts: 5' TCCGCGTTTGCTCCGCTGTT

Tie2:

Vorwärts: 5' CGAGTTCGAGGAGAGGCAAT

Rückwärts: 5' TCAGGTACTTCATGCCGG

Zur Sequenzierung von Ang2 wurden folgende Primer eingesetzt:

Primer 1

Vorwärts: 5'GTAGCAGCCCTGCGTTTTAG3'

Rückwärts: 5'CCATTTCTTTCTTCATGTTGTCC 3'

Primer 2

Vorwärts: 5'GCAAGTGCTGGAGAACATCA3'

Rückwärts: 5'TGATGTGCTTGTCTTCCATAGC3'

Primer 3

Vorwärts: 5'GATTTTGGACCAGACCAGTGA3'

Rückwärts: 5'AGTTTGATGTGGACATCATAGTCA3'

Primer 4

Vorwärts: Isoform 1 5'CTATGATGTCCACATCAAACTCAG3'
Isoform 2 5'ACTATGATGTCCACATCAAACTCTA3'

Rückwärts: 5'TTGGCTGATGCTGCTTATTTT3'

Primer 5

Vorwärts: 5'TGAGGCTTACTCATTGTATGAACA3'

Rückwärts: 5'GAGACAGTTCCTCAGGTGGAC3'

2.1.4 Komplette Laborkits

Ray biotech Human RTK Phophorylation AB array	Ray Biotech
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAgen
Quantikine Human Angiopoietin-2	R&D Systems
RNeasy Plus MiniKit	QIAgen

Rossettesep B Cell Enrichment Kit	Stem cell Technologies
Receptor TyrKinase Phospho AbArray	Ray-Bio
AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit	BD
Big Dye Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystmes

2.1.5 Antikörper und Proteine

Monoclonal Anti-human Tie-2 Phycoerythrin	R&D Systems
APC anti-human CD45	BioLegend
PE Mouse IgG1, $\varkappa$ Isotype Control	BioLegend
PerCP/Cy5.5 anti-human CD19	BioLegend
FITC anti-human CD5	BioLegend
Pacific blue anti-human CD 19	BioLegend
Tie2 (AB33) Mouse mAB	Cell Signaling
Biotin anti Phosphotyrosine	BioLegend
βAktin	Sigma-Aldrich
HRP goat anti mouse	BioLegend
Tie-2 (A-14): sc-31268	Santa Cruz
AMG 386	AMGEN
IL4	PeproTech
CD40-Ligand	PeproTech

2.2 Methoden

2.2.1 Durchflusszytometrie

Qualitative Bestimmung von Tie2

Zur Bestimmung des Tie2-Proteins auf der Oberfläche von Zellen wurden 50µl Vollblut einer Probe mit *Phosphate buffered salin* (PBS) + 0.5% boviner Serum Albumin(BSA)-Lösung gewaschen. Wenn statt Vollblut eine Suspension von Zellen

verwendet wurde, so betrug die Zellzahl 2x10^6. Anschließend wurden durch Zugabe von *Fragment crystallizable receptor* (FCR) Block die unspezifischen Bindestellen blockiert. Dann wurden nach folgendem Schema die Antikörper hinzugefügt:

FITC CD5	10µl
PerCP/Cy5.5 CD19	5µl
APC CD45	5µl
PE-Tie2-Antikörper	5µl oder PE Isokontrolle 2,5µl

Es erfolgte eine Inkubation von 45 Minuten bei 8°C. Bei den Proben aus dem Vollblut wurden im Anschluss die Erythrozyten lysiert. Dieser Schritt wurde bei den Zellsuspensionen nicht durchgeführt. Für beide Proben erfolgten 2-3 Waschschritte mit PBS. Dann erfolgte die Messung am FACS Canto. Die Auwertung erfolgte mittels Cyflogic Software. Im Vorwärts-/Seitwärtslichtstrahl Bild erfolgte eine erste ungefähre Selektion der Lymphocyten (Population 1) aus dem Vollblut aufgrund ihrer Größe und Granularität (siehe Abb. 1 A). Die Population wurde großzügig bestimmt. Diese gewählte Population wurde in einem Diagramm Fluorescein (FITC) gegen *Peridinin chlorophyll protein-cyanine dye* (PerCP/Cy5.5) betrachtet (siehe Abb. 1 B). Die kombinierte Färbung durch CD5 und CD19 Antikörper lässt eine eindeutige Identifizierung maligner CLL- B-Zellen, die beide Oberflächenantigene besitzen, zu. Nicht maligne B-Zellen dagegen sind CD5 positiv, aber CD19 negativ und sind somit in der oberen linken Ecke zu finden. Der CD45 Antikörper wurde ausschließlich verwendet, um in einem uneindeutigem Fall die T- und B-Zellen voneinander unterscheiden zu können, da die T-Zellen CD45 negativ und die B-Zellen CD45 positiv sind. Für die Bestimmung des Tie2-Status der Granulozyten wurden diese aufgrund ihrer großen Größe und starken Granularität direkt aus dem Vorwärts-/Seitwärtslichtstrahl Bild herausgefiltert und anschließend einzeln im Phycoerythrin(PE)-Filter auf Tie2 analysiert. Die Detektion von Tie2 erfolgte mit Hilfe des PE gelabelten Anti-human Tie2-Antikörpers. Die herausgefilterten CLL- bzw. B-Zellen wurden im PE-Filter auf ihre Fluoreszenzintensität getestet und mit der Isokontrolle im Überlappungsdiagramm verglichen (siehe Abb. 1 C und D).

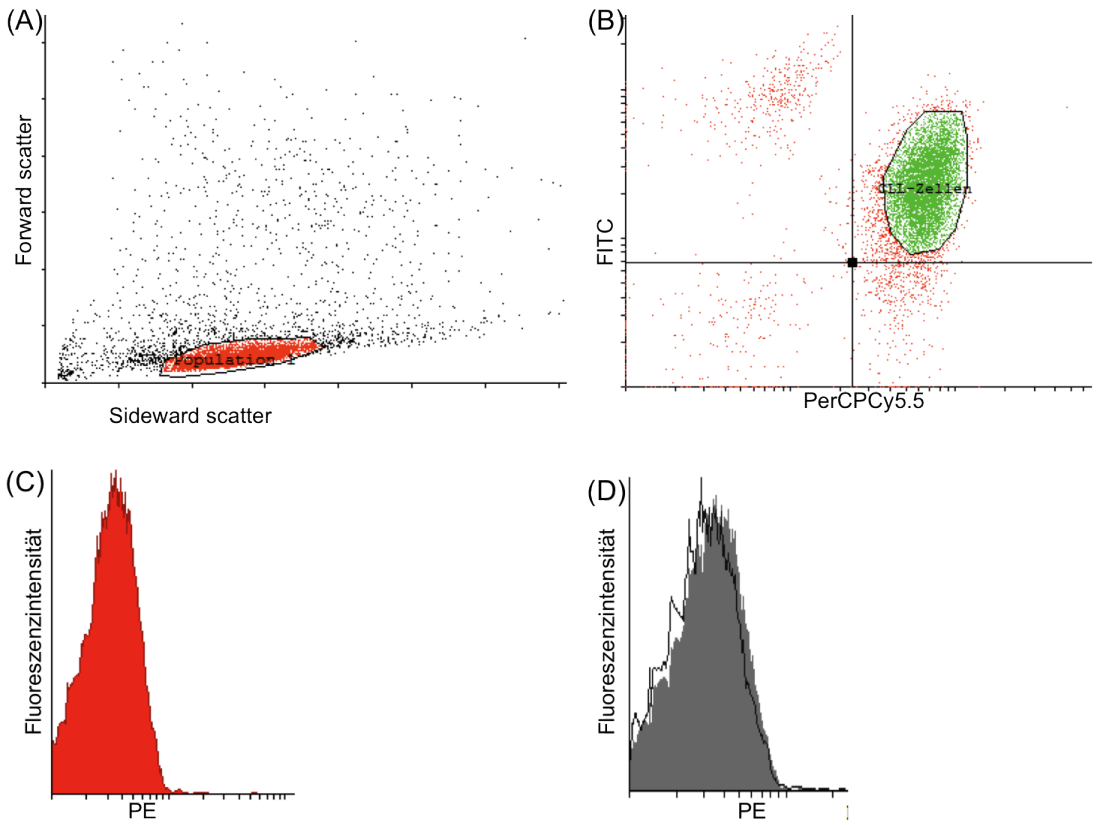

Abbildung 1: Beispiel für eine Tie2-Auswertung am Durchflusszytometer, (A) Vorwärts/Seitwärtslichstrahl mit ausgewählter Population 1 (B) Betrachtung der Population 1 im FITC/PerCPCy5.5 Diagramm und genaue Identifizierung der CLL-Zellen (C) Histogramm der CLL-Zellen mit PE-Filter (D) Überlappungsdiagramm von Tie2-Antikörper und Isokontrolle behandelten CLL-Zellen

Bestimmung Anzahl lebender Zellen

Dazu wurde das AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit verwendet. Die Durchführung fand laut Protokoll des Herstellers statt.
Die doppelt negativen Zellen sammeln sich im ersten Quadrant und stellen die lebende Population dar. Die Zellen im zweiten Quadrant sind apoptotisch, aber noch nicht tot, da sie noch in der Lage sind, Propiumiodid (PI) als Zellgift zu identifi-

zieren und aus der Zelle hinaustransportieren. Die Zellen im dritten Quadrant sind doppelt positiv und stellen den toten Anteil dar (siehe Abb. 2). In den Kokulturen mit Suspensionszellen wurde zusätzlich 5µl Pacificblue CD19 Antikörper hinzugefügt, um die CLL-Zellen im Durchflusszytometer von der Zelllinie unterscheiden zu können.

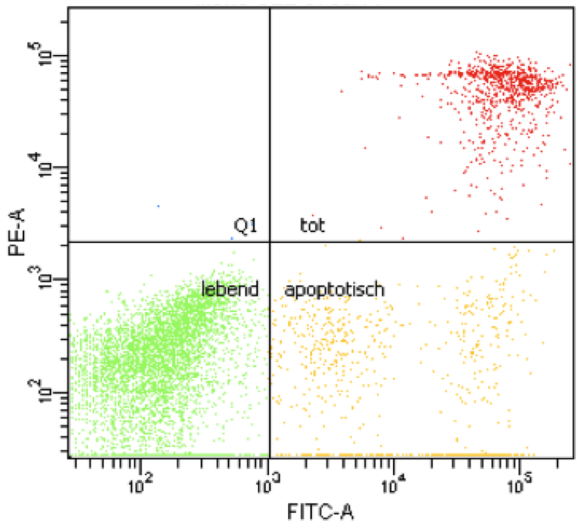

Abbildung 2: Beispiel für eine Auswertung der Annexin-V-FITC PI Färbung

2.2.2 ELISA

Für den Enzyme-linkes Immunosorbent Assay (ELISA) zur quantitativen Bestimmung von Ang2 wurde das Kit Quantikine Human Angiopoietin-2 verwendet.
Das Plasma, in dem die Ang2-Konzentration bestimmt wurde, wurde durch Zentrifugation des Vollblutes bei 400g für 10Min. gewonnen.
Nach Isolierung der CLL-Zellen bzw. PBMC bei gesunden Proben wurden diese für 24 Stunden mit einer Konzentration von $4x10^6$ Zellen pro Milliliter Medium kultiviert. Nach den 24 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand ebenfalls zur quantitativen Bestimmung des Ang2 Gehalts verwendet.

2.2.3 PCR

Herstellung von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNS):
Zur Isolierung von messenger Ribunukleinsäure (mRNS) wurde das RNeasy Plus Mini Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben. Es wurden je $1x10^7$ Zellen verwendet.
Aus der isolierten mRNS wurde nach dem Protokoll der Reversen Transkriptase cDNS hergestellt. Als Haushaltsgen wurde das Gen der Tyrosinkinase Abelson protooncogene (ABL) verwendet. Die PCR erfolgte im Anschluss unter folgenden Bedingungen:

Ang2:	95°C	5Min.
	95°C	20Sek.
	65°C	20Sek.
	72°C	20Sek.
Tie2:	95°C	5Min.
	95°C	20Sek.
	55°C	20Sek.
	72°C	20Sek.
ABL:	95°C	5Min.
	95°C	20Sek.
	60°C	20Sek.
	72°C	20Sek.

Die letzten drei Temperaturschritte wurden jeweils 40 Mal wiederholt, dann wurde das Produkt auf 8°C herabgekühlt.

Für die PCRs wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Primer vorwärts	0,8µl
Primer rückwärts	0,8µl
Fast Start PCR Master, Roche	4µl
Wasser	12,4µl
cDNS	2µl

Sequenzierungs-PCR

Zur Sequenzierung der Ang2 DNS in CLL-Patienten wurde das Kit Big Dye Terminator v 1.1 Cycle Sequencing verwendet. Die Sequenzierung erfolgte nach der Methode von Sanger. Die Touchdown PCR zur Vervielfältigung der DNS fand unter folgenden Bedingungen statt:

95°C	4Min
95°C	20Sek.
60°C	20Sek. (bei jedem Zyklus minus 0,5°C)
72°C	1Min.
10 Zyklen	

Dann:

95°C	20Sek.
55°C	20Sek
72°C	1Min.
30 Zyklen	

Diese PCR wurde mit jedem Primerpaar durchgeführt. Das PCR Produkt des zweiten Primerpaares wurde auf ein 2%iges Agarose Gel aufgetragen und bei 100V 1Stunde aufgetrennt, um die zwei möglichen Isoformen von 215 Basenpaaren und 371 Basenpaaren zu unterscheiden. Anschließend wurde das Produkt mit der Größe

von 371 Basenpaaren ausgeschnitten. Mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit wurde daraus die DNS isoliert.
Alle restlichen Produkte wurden mit ExoSap gereinigt. Im Anschluss erfolgte die Vervielfältigung der PCR Produkte für die Sequenzierung mit je einem Primer unter folgenden Bedingungen:

95°C	1Min.
95°C	20Sek.
55°C	20Sek.
60°C	3Min.
40Zyklen	

2.2.4 Western Blot

Der Western Blot wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Die Antikörper wurden in den vom Hersteller empfohlenen Verdünnungen eingesetzt. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Als Gel wurde ein NuPage 4-12% Bi Tris Gel verwendet.

2.2.5 Immunfluoreszenz

Die Zellen, die für die Immunfluoreszenz verwendet wurden, waren adhärente Zellen, die auf Deckgläsern gewachsen sind. Für den Versuch wurden die Zellen 20 Minuten mit Paraformaldehyd 4% fixiert. Anschließend wurden sie mit PBS und PBS/0,1% Triton X gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einer Lösung aus PBS/0,4% Gelatine/10% Ziegenserum (normal goat serum, NGS)/1% FCR Block geblockt. Im Anschluss wurde der Antikörper Tie2-Dylight-488 hinzugegeben. Die Färbung wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

2.2.6 Phophorylierungstest

Zur Überprüfung der Fähigkeit von Ang2 andere Tyrosinkinasen zu phosphorylieren wurde das *Ray biotech Human RTK Phophorylation AB array* verwendet. Es ist ein breitgefächerter Phosphorylierungstest, mit dem der Phosphorylierungsgrad von Tyrosinkinasen bei CLL-Zellen bestimmt werden konnte. Die eine Hälfte der Zellen wurde mit rekombinantem Ang2 behandelt, der zweite Teil war unbehandelt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ. Dazu wurde für jede Bande die Signalintensität bestimmt. So konnten Unterschiede in der Intensität der Phosphorylierung der verschiedenen Tyrosinkinasen zwischen den behandelten Zellen und den unbehandelten Proben festgestellt werden. Der relative Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten wurde hier durch Bildung des Quotienten ermittelt.

2.2.7 Zellkultur

Gewinnung von Probenmaterial

CLL-Zellen:
Die CLL-Zellen wurden mit Hilfe des *Rossettesep B Cell Enrichment Kit* gewonnen. Dazu wurde Vollblut mit 40µl pro Milliliter Rossette Sep® versetzt und 20 Min. inkubiert. Die Antikörpermischung des Rossette Sep® verbindet, mit Ausnahme der B- und CLL-Zellen, alle Zellen mit Erythrozyten. Durch die Zugabe von *Lymphocyte* Medium können die Zellen in einer Zentrifugation voneinander abgetrennt werden. Die CLL- und B-Zellen verbleiben am Dichtegradienten und können so abpipettiert werden.

Gesunde PBMC:
Als Kontrolle wurden gesunde PBMC isoliert. Das Verfahren entspricht dem oben beschriebenen der CLL-Zellen. Allerdings kann der erste Schritt, die Zugabe von Rossette Sep® entfallen.

Knochenmark:

Die Isolation von B-Zellen aus dem Knochenmark erfolgt analog zu der Gewinnung aus dem Vollblut.

Knochenmarkstromazellen:
Um Knochenmarkstromazellen gewinnen zu können, wurden CLL-Zellen aus dem Knochenmark in einer Dichte von $1x10^7$/ml in RPMI kultiviert. Nach 48 Stunden wurde das Medium, sowie alle nicht adhärenten Zellen abgenommen und frisches Medium dazugegeben. Dann wurden die Zellen für zwei bis drei Wochen kultiviert. Das Medium wurde nicht gewechselt, aber ungefähr drei Mal in der Zwischenzeit etwas aufgefüllt. Nach zwei bis drei Wochen entwickelten sich adhärente Knochenmarksstromazellen.

Dendritische Zellen:
Zur Gewinnung von unreifen myeloischen dendritischen Zellen wurden durch Kultivierung von $CD14^+$ angereicherten PBMC gesunder Spender gewonnen. Dem Medium wurde GM-CSF in einer Endkonzentration von 20ng/ml und Interleukin 4 (IL4) in einer Konzentration von 10ng/ml hinzugefügt. Es entwickeln sich unreife myeloische dentritische Zellen. Zur Reifung dieser Zellen kann nach etwa sieben Tagen zusätzlich CD40-Ligand in einer Konzentration von 1µ/ml in die Kultur gegeben werden. In dieser Arbeit wurden nur unreife myeloische dentritische Zellen getestet.

Nurse like Zellen:
Nurse like Zellen wurden durch die Kultivierung von PBMC mit einem Anteil von 4-5% Monozyten von CLL-Patienten gewonnen. Die isolierten PBMC wurden dazu in einer Dichte von $1x10^7$/ml in einer 6-Well-Platte ausgesät. Hier ist es wichtig, dass die nicht adhärenten Zellen nicht entfernt werden. Nach etwa einer Woche wurde frisches Medium hinzugefügt. Die NLC entwickeln sich nach ca. 21 Tagen.

Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung untern normoxischen Bedingungen fand in einem Brutschrank bei 37°C und Wasserdampfgesättigter Luft mit 5% Kohlendioxid (CO_2) statt. Sofern nicht explizit andere Bedingungen erwähnt werden, wurde unter diesen Vorraussetzungen die Kultivierung vorgenommen. Alle offenen Arbeiten mit zu kultivierenden

Zellen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.
Die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen fand in einem Brutschrank in Stickstoff gesättigter Luft mit einem Anteil von 1% Sauerstoff und 5% CO_2 statt. Das Medium was zur Kultivierung der Zellen benutzt wurde, wurde schon 24h vor der Kultivierung unter diesen Bedingungen inkubiert.

Primäre Zellen:

HUVEC:
HUVECs wurden sowohl als Positivkontrolle für Tie2 und Ang2, als auch zur Kokultivierung mit CLL-Zellen verwendet. Als adhärente Zellen wurden sie in einer Zellkulturflasche liegend mit speziellem Endothelzellmedium in einer Dichte von ca. 10000 Zellen pro cm^2 kultiviert. Ungefähr alle 48-72 Stunden wurde das Medium ausgetauscht und wenn notwendig die Zellen geteilt. Zum Ablösen der Zellen wurden diese zunächst 2-3 Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2-5ml einer Lösung aus zwei millimolarer (mM) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in PBS versetzt. Diese wurde für ca. fünf Min. inkubiert. Falls nicht alle Zellen abgelöst waren, wurden sie mit einem Zellschaber mechanisch gelöst. Die Zellen wurden so aufgeteilt, dass sie mit einer Dichte von ca. 5000 Zellen/cm^2 wieder in Kultur genommen werden konnten. Da es sich um primäre Zellen handelt, die sich nicht unbegrenzt teilen können wurden in dieser Arbeit nur Zellen bis zur Passage 12 verwendet.

Zelllinien:

HL60:
HL60 wurden zur Kokultiverung mit CLL-Zellen verwendet. Als Suspensionszellen wurden sie in einer Zellkulturflasche stehend kultiviert. Alle 2-3 Tage wurden sie in dem Verhältnis 1:2 bis 1:5 geteilt. Die maximale Konzentration betrug $2x10^6$ Zellen/ml. Zum Teilen wurden die Zellen abzentrifugiert und anschließend wieder neu gelöst.

HS5:

HS5 Zellen wurden zur Kokultivierung mit CLL-Zellen genutzt. Es handelt sich um adhärente Zellen, so dass sie in einer Zellkulturflasche liegend kultiviert wurden. Bei einer Dichte von ca. 1x10^5 Zellen/cm^2 wurden die Zellen 3 Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5ml 2mM EDTA Lösung in PBS abgelöst und in dem Verhältnis 1:5 bis 1:10 verdünnt.

K562:
K562 wurden zur Kokultivierung mit CLL-Zellen verwendet. Diese Suspensionszellen wurden in einer Flasche stehend kultiviert. Alle 3 Tage wurden die Zellen in dem Verhältnis 1:3 bis 1:5 geteilt. Die maximale Dichte betrug 1,5x10^6/ml Medium. Zum Teilen wurden die Zellen abzentrifugiert und anschließend wieder neu ausgesät.

KUSA:
KUSA wurden zur Kokultivierung von CLL-Zellen verwendet. Es handelt sich um eine adhärente Zelllinie, so dass sie in einer Flasche liegend kultiviert wurden. Die Zellen wurden bei einer Konzentration von 1x10^5 Zellen/cm^2 wurden die Zellen 3 Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5ml 2mM EDTA Lösung in PBS abgelöst und in dem Verhältnis 1:5 bis 1:10 verdünnt. Die Zellen, die nicht benötigt wurden, wurden entsorgt

NB4:
NB4 wurden zur Kokultivierung von CLL-Zellen verwendet. Diese Suspensionszellen wurden in einer Flasche stehend kultiviert. Die maximale Dichte betrug 2x10^6 Zellen/ml Medium. Alle 2-3 Tage wurden sie in dem Verhältnis 1:2 bis 1:3 geteilt. Dazu wurden sie abzentrifugiert und wieder neu in Medium suspendiert.

NK_{tert}:
Diese adährente Zelllinie wurde ebenfalls zur Kokultivierung von CLL-Zellen verwendet. Sie wurden in einer Zellkulturflasche liegend kultiviert und einmal pro Woche in dem Verhältnis 1:5 bis 1:10 geteilt. Dazu wurden die Zellen mit 3 Mal mit PBS gewaschen und mit Hilfe von 5ml 2mM EDTA Lösung in PBS abgelöst. Die maximale Dichte betrug 1x10^6 Zellen/cm^2.

Bestimmung der Zellzahl:
Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50µl Zellsuspension mit 50µl Trypanblau versetzt, so dass man tote von lebenden Zellen unterscheiden kann. Dann wurden in einer Neugebauer Zählkammer die Zellen gezählt.

Auftauen von Zellen:
Die Zellen wurden schnell aufgetaut und anschließend direkt in einem Falcon mit 15ml Medium (je nach Zelllinie RPMI oder Endothelzellmedium) verdünnt. Danach wurden sie abzentrifuiert und 2 Mal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden sie, in der laut Hersteller Angaben entsprechenden Dichte, ausgesät.

Kryokonservierung von Zellen:
Zur Konservierung von Zellen werden diese mit 10% (V/V) Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und in der laut Herstellerangaben entsprechenden Anzahl in einem Kryoröhrchen zunächst langsam auf -80°C heruntergekühlt und dann in einem Stickstofftank eingefroren.

Stimulation mit IL4 und CD40-Ligand

Zur Beeinflussung der CLL-Zellen wurden bei der Kultivierung IL4 und/oder CD40-Ligand hinzugefügt. IL4 wurde dabei in einer Konzentration von 5ng/ml eingesetzt. CD40-Ligand wurde in einer Endkonzentration von 10µg/ml verwendet [56].

Neutralisation von Ang2

Um Ang2 im Überstand der Zellkultur zu neutralisieren, wurde das Peptid-Fc-Fusionsprotein, ein sogenannter *Peptibody*, Trebananib (AMG386) verwendet. Ein *Peptibody* ist ein biologisch aktives Peptid, was an eine FC Domäne geheftet ist und therapeutisch eine Alternative zu monoklonalen Antikörpern darstellt. AMG386 bindet sowohl an Ang1, als auch an Ang2 und kann die Wechselwirkung der Angiopoietine mit ihrem Rezeptor Tie2 verhindern. Die hier gewählte Konzentration von

10µg/ml beruht auf der von Oliner *et al.* verwendeten Konzentration von 100nM, was einer Menge von 6,35µg/l entspricht [100].

3 Ergebnisse

3.1 Ang2-Status bei der CLL

Ziel dieser Arbeit war, die Rolle des Proteins Ang2 in der CLL näher zu charakterisieren. Dazu wurde zunächst überprüft, ob und in welchem Ausmaß Ang2 von den CLL-Zellen produziert wird.

3.1.1 Die Expression von Ang2 durch CLL-Zellen

Um sicherzustellen, dass Ang2 von malignen B-Zellen exprimiert wird, wurde eine PCR durchgeführt. Mit Hilfe der PCR sollte die Transkription des *ANG2* Gens nachgewiesen werden. Die PCR wurde mit cDNS von vier gesunden PBMC-Proben und neun Proben von CLL-Zellen durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde die cDNS von HUVECs verwendet. Die Negativkontrolle enthielt keine cDNS und ist in der Abbildung als *non template conrol* (ntc) gekennzeichnet.

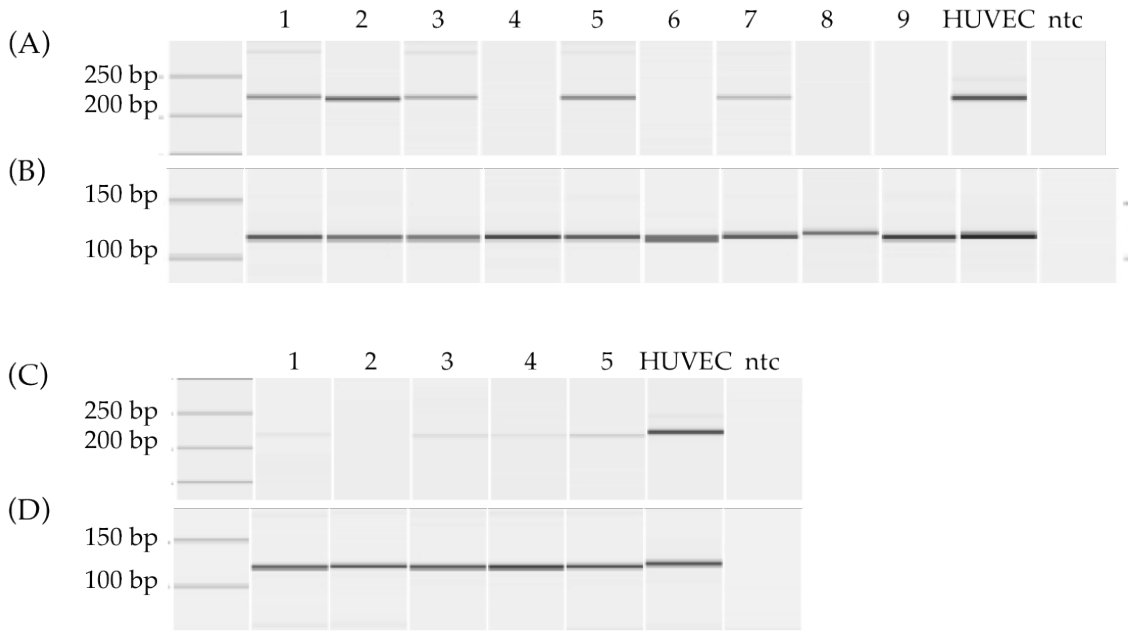

Abbildung 3: Ang2- (A) und ABL-Expression (B) von CLL-Zellen, bzw. Ang2- (C) und ABL-Expression (D) von gesunden PBMC, ntc = non template control

Die Abbildungen (Abb.) 3 A und C zeigen, dass sowohl gesunde PBMC als auch CLL-Zellen Ang2 exprimieren. Die Banden der gesunden PBMC sind allerdings viel schwächer als die der CLL-Zellen, was darauf schließen lässt, dass in CLL-Zellen Ang2 in höherem Maß exprimiert wird. Auffällig ist auch, dass fast die Hälfte der CLL-Patienten gar kein Ang2 exprimieren. Das Haushaltsgen, das zur Kontrolle benutzt wurde ist ABL, welches in allen Proben gleich stark vorhanden ist.

3.1.2 Sequenzierung von *ANG2* bei CLL-Patienten

Um eine grundsätzliche Funktionalität von Ang2 in CLL nachzuweisen, wurden funktionsinhibierende Mutationen per Sequenzanalyse analysiert. Die Sequenzierung des *ANG2* Gens wurde exemplarisch für drei verschiedenen Patienten und HUVEC durchgeführt. In Tab. 3 sind zusammenfassend alle gefundenen genetischen Veränderungen dargestellt. HUVEC zeigten keine Mutationen. Von den drei Patienten, deren *ANG2* sequenziert wurde, wies einer eine Veränderung auf, einer vier und einer gar keine. Die genetischen Veränderungen traten sowohl homo- als auch heterozygot auf. Hier wurden ausschließlich Veränderungen vom Typ *Single nucleotide variation* (SNV), der den Austausch einzelner Basen bezeichnet, gefunden. Dieser Variationstyp führt zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz. Alle auftretenden Mutationen sind bereits beschriebene Veränderungen, so dass jeweils die Referenznummer angegeben ist. Darüber hinaus ist der *Global minor allele frequency*

Referenz-nummer	Variations-typ	HGVS: NM_001147.2	MAF	Patienten-nummer
rs6559167	SNV	c.408G>T	A=0,4583	P1, P2
rs55633437	SNV	c.714G>T	A=0,0751	P1
rs3020221	SNV	c.735G>A	T=0,304	P1
rs1961222	SNV	c.882G>A	T=0,1749	P1

Tabelle 3: Punktmutationen bei *ANG2*, (SNV = single nucleotide variation, HGVS = Human Genome Variation Society, MAF = Global minor allele frequency)

(MAF) angegeben, der die Häufigkeit eines Allels innerhalb der gesunden Bevölkerung angibt. Um diesen näher zu erläutern, sei als Beispiel der MAF der ersten angegebenen Mutation herausgenommen: Das A bedeutet, dass diese Aminosäure, also hier Adenin das weniger häufige Allel darstellt. Die 0,4583 steht für die relative Häufigkeit des am wenigsten vorkommenden Allels und ist mit 45,83% in der gesunden Bevölkerung vertreten. Die Sequenzierung von *ANG2* bei dem Patienten 3 ist nicht komplett erfolgt, da aufgrund von Materialmangel ein Bereich von 20 Basenpaaren im Exon 4 nicht abgedeckt werden konnte. Allerdings ist in dieser Genregion keine genetische Veränderung zu erwarten, da keine in der Ensembl-Datenbank beschrieben sind (Referenz: ENST00000325203).

3.1.3 Quantitative Bestimmung von sezerniertem Ang2 mittels ELISA

Hier wird im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen Ang2 nicht auf Genebene, sondern als Protein nachgewiesen. Die Konzentration von Ang2 wurde im Plasma von 9 CLL-Patienten, sowie von 4 gesunden Spendern bestimmt. Dazu wurde das Blut abzentrifugiert und kleine Mengen des Plasmas entnommen. Da die Konzentration von Ang2 im Plasma keinen Rückschluss darüber zulässt, in wieweit dieses gefundene Ang2 von den CLL-Zellen sezerniert wird, wurde die Konzentration von Ang2 zusätzlich im Überstand von CLL-Zellen, bzw. PBMC nach 24-stündiger Kultivierung bestimmt. Hierzu wurden die CLL-Zellen aus dem Blut isoliert und $4x10^6$ CLL-Zellen für 24 Stunden kultiviert. Der Überstand wurde mittels ELISA auf den Ang2 Gehalt getestet.
Abb. 4 zeigt, dass bei CLL-Patienten im Durchschnitt 2529pg Ang2 pro ml Plasma zu finden war. Im Plasma gesunder Probanden dagegen war mit 1267pg/ml nur ungefähr die Hälfte von Ang2 vorhanden. Im Überstand der Zellen nach 24 Stunden Kultivierung war der Unterschied noch deutlicher: 116,1pg/ml bei CLL-Patienten und 26,34pg/ml bei gesunden Kontrollen. In beiden Fällen war die Ang2-Konzentration bei den Erkrankten signifikant höher als bei den gesunden Kontrollen.

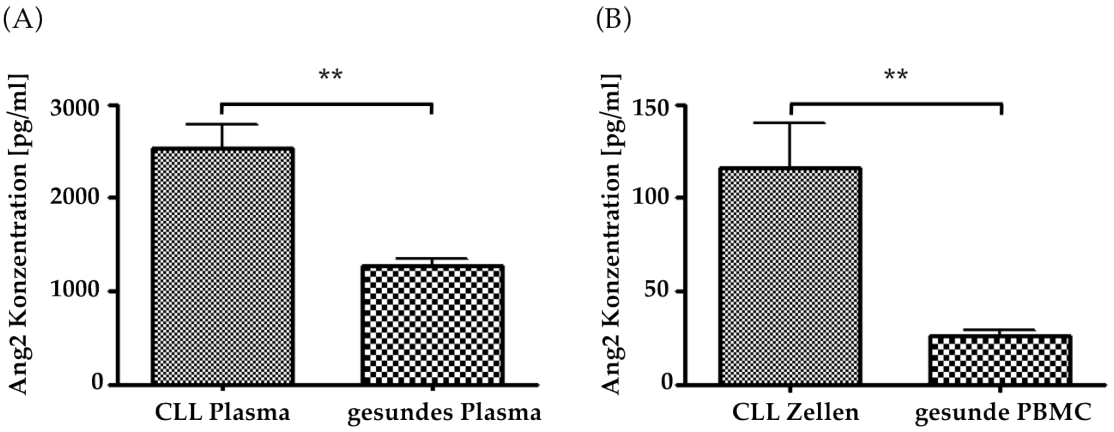

Abbildung 4: Ang2-Konzentration (A) im Plasma und (B) im Überstand nach 24 Stunden (CLL: n=9, gesund: n=4, Mann-Withney U-Test: **p<0.01)

3.1.4 Analyse des Einflusses der Mikroumgebung auf die Expression und Sekretion von Ang2

Bei der Expression- und Sekretionsstatusanalyse isolierter CLL-Zellen wird der Einfluss der Mikroumgebung nicht berücksichtigt. CLL-Zellen sind *in vivo* einer großen Anzahl externer Einflüsse ausgesetzt. Dazu gehören sezernierte Faktoren als auch direkte Zell-Zell-Kontakte. Um diese *in vivo*-Situation zu simulieren wurden CLL-Zellen verschiedener Stimuli, wie sie *in vivo* zu finden sind, ausgesetzt. Hierzu gehören die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen, die Kokultivierung mit in der Mikroumgebung vorkommenden Zelltypen und Stimulation durch externe Zugabe von in der Mikroumgebung vorhandener Stimulanzien.

Einfluss hypoxischer Bedingungen während der Kultivierung

Zunächst wurden die CLL-Zellen und die Zelllinie HS5 für 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Dann wurde der Überstand abgenommen und in diesem die Konzentration von Ang2 bestimmt. Hypoxie konnte einen signifikanten Anstieg der Ang2-Sekretion von nahezu 100% (im Mittel von 197,8pg/ml auf 394pg/ml) nach 24h in der CLL-Zellkultur induzieren, während HS5-Zellen ein Sau-

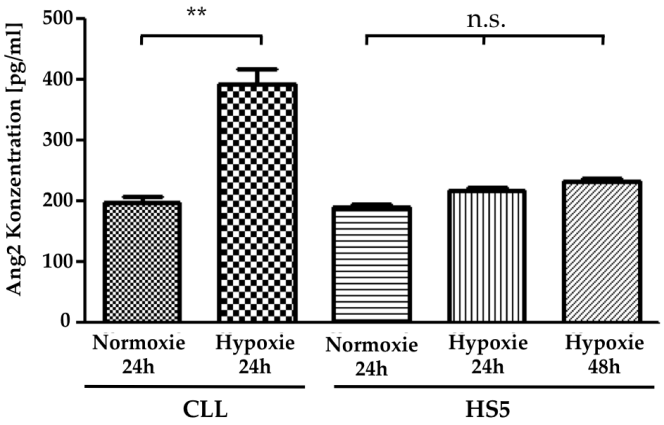

Abbildung 5: Vergleich der Ang2-Konzentration im Überstand von CLL-Patienten und HS5-Zellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen (CLL: n=5 Mann-Withney U-Test: **$p<0.01$, HS5: n=2 Kruskal-Wallis-Test: n.s. = nicht signifikant $p>0.05$)

erstoffmangel die Ang2-Sekretion nicht signifikant beeinflusste.

Parakriner Einfluss durch Kokultivierung

Um die parakrinen Einflussfaktoren der Zellen aus der Mikroumgebung der CLL-Zellen zu simulieren, wurden Experimente mit Kokulturen durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Zelllinien, die im natürlichen Milieu vorkommenden Zellen ähnlich sind, ausgewählt. Die Zelllinien HS5 und NK_{tert} sind humane Knochenmarks-Stromazellen und können mit der Mikroumgebung im Knochenmark verglichen werden. KUSA sind murine Knochenmarkszellen. HUVEC wurden zur Kokultivierung verwendet, weil diese in hohem Maß sowohl Ang2 als auch Tie2 exprimieren. Betrachtet man die Ang2-Konzentration im Überstand der Zelllinien, so wird deutlich, dass diese bei KUSA und NK_{tert} zwischen 200pg/ml und 250pg/ml lag. HS5 Zellen sezernierten etwas weniger Ang2. Die Konzentration von Ang2 im Überstand der HS5 Zellen lag bei 186pg/ml. Im Überstand der HUVEC fand sich mit 1129pg/ml die höchste Ang2-Konzentration. Die Konzentrationen in den Kokulturen lagen mit 212pg/ml für KUSA, 190pg/ml für NK_{tert} und 197pg/ml für HS5 alle im gleichen

Bereich. Der Unterschied von kokultivierten CLL-Zellen zu den monokultivierten CLL-Zellen war bei HS5 und NK_{tert} nicht signifikant. Die Ang2-Konzentration im Überstand der mit KUSA kokultivierten CLL-Zellen war signifikant höher als die der monokultivierten CLL-Zellen. Die Kokultur mit HUVEC zeigte eine sehr hohe Ang2-Konzentration mit Werten von 1134pg/ml. Hier ist der Unterschied zwischen den Mono- und kokultivierten CLL-Zellen signifikant. Es war kein Unterschied bezüglich der Ang2-Konzentration in der Kokultur zwischen den stark Tie2-exprimierenden und schwach Tie2-exprimierenden Zelllinien festzustellen.

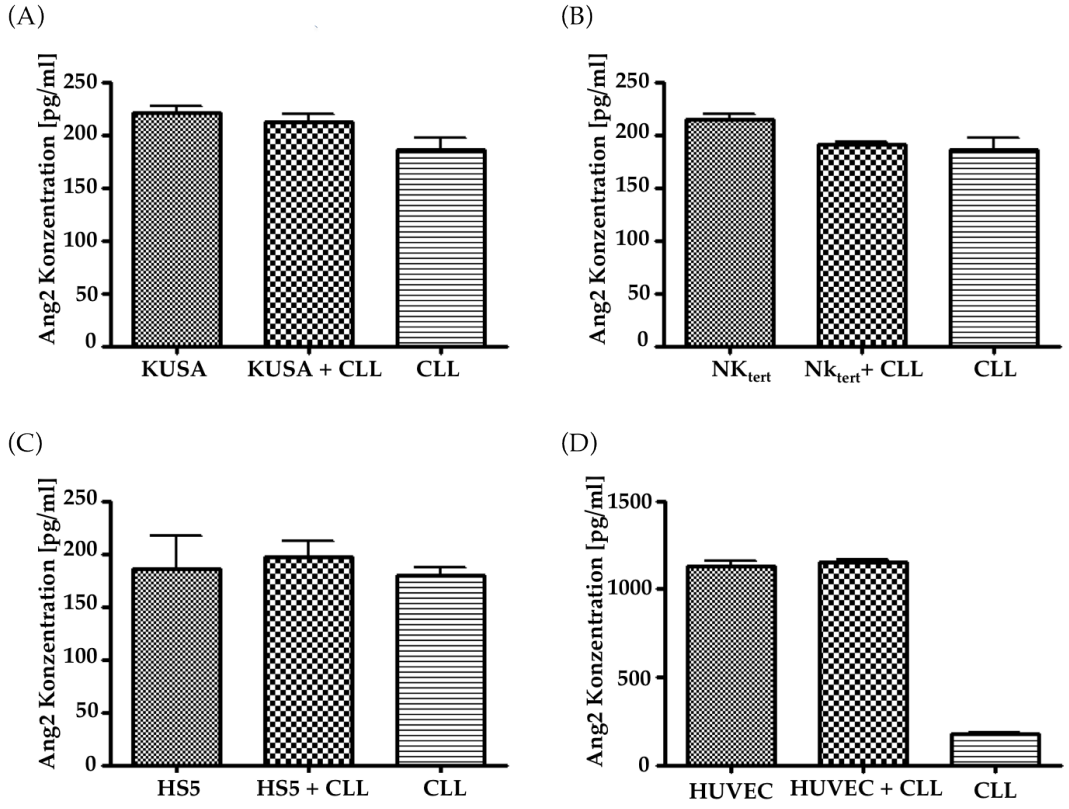

Abbildung 6: Vergleich der Ang2-Konzentrationen im Überstand von Zelllinien, monokultivierten CLL-Zellen und kokultivierten CLL-Zellen mit (A) KUSA (KUSA: n=2, CLL+KUSA: n=9, CLL mono: n=9), (B) NK_{tert} (NK_{tert}: n=2, CLL+NK_{tert}: n=9, CLL mono: n=9), (C) HS5 (HS5: n=2, CLL+HS5: n=9, CLL mono: n=9)und (D) HUVEC (HUVEC: n=2, CLL+HUVEC: n=4, CLL mono: n=9)

Einfluss durch externe Stimulanzien

IL4 und CD40-Ligand sind typische physiologische Zytokine, die im Mikromilieu der CLL-Zellen vorkommen. Es konnte gezeigt werden, dass diese das Überleben der CLL-Zellen fördern. Auch *in vitro* werden diese Proteine eingesetzt, um das Überleben der CLL-Zellen zu verbessern.

Überlebensvorteil der CLL-Zellen durch Stimulanzien

Um zu zeigen, dass die eingesetzten Substanzen eine in diesem Versuchsaufbau eine überlebensfördernde Wirkung zeigen, wurden nach 24Stunden die Zahl der überlebenden CLL-Zellen mit und ohne IL4 und/oder CD40-Ligand bestimmt. Die Abb. 7

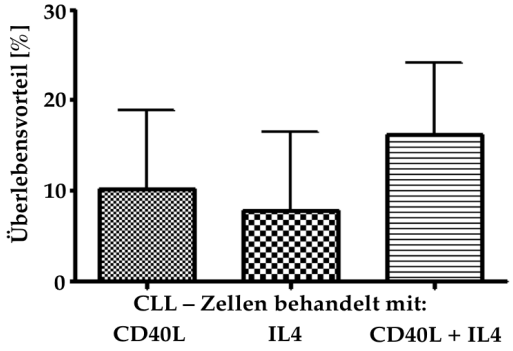

Abbildung 7: Überlebensvorteil durch Stimulation mit CD40-Ligand und IL4 gegenüber unbehandelten CLL-Zellen, n=4

zeigt den erwarteten Überlebensvorteil der behandelten CLL-Zellen gegenüber den unbehandelten. Es ist ein leichter Vorteil der mit CD40-Ligand und/oder IL4 behandelten Zellen gegenüber den unbehandelten zu erkennen, jedoch ist dieser Überlebensvorteil starken Schwankungen unterworfen. Es zeigte sich aber ganz klar eine Beeinflussung der CLL-Zellen. Mit dem folgenden Versuch sollte über prüft werden, ob diese Stimulanzien einen Einfluss auf die Ang2-Sekretion der CLL-Zellen haben.

Einfluss durch externe Stimulatien auf die Ang2-Sekretion

In diesem Versuch wurden die CLL-Zellen mit den bekannten Stimulanzien CD40-Ligand und IL4 behandelt. Wie schon in Kapitel 1.2 erwähnt, fördern diese physiologisch das Überleben der CLL-Zellen. Hier wurde der Einfluss auf die Sekretion von Ang2 untersucht. Die CLL-Zellen wurden nach Standard kultiviert. Entweder wurde die Kultur mit CD40-Ligand in einer Endkonzentration von 10µg/ml, mit IL4 in einer Endkonzentration von 5ng/ml oder mit einer Kombination beider versetzt [56]. Die Kontrolle blieb grundsätzlich unbehandelt. Nach 24h wurde der Überstand abgenommen und die Ang2-Konzentration bestimmt. Keine der Stimulationen führte zu einer signifikanten Zunahme der Ang2-Sekretion (siehe Abb. 8).

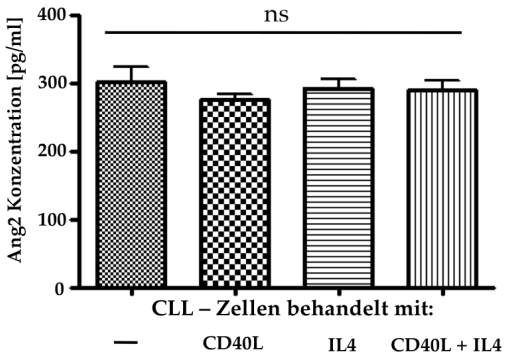

Abbildung 8: Ang2-Konzentration im Überstand nach Stimulierung mit IL4 und CD40-Ligand (unbehandelt: n=8, CD40-Ligand: n= 6, IL4: n=4, CD40-Ligand+IL4: n=4, ns = nicht signifikant, berechnet mit Mann-Withney UTest)

3.2 Einfluss des Ang2 auf das Überleben der CLL-Zellen

Ein möglicher Einfluss von sezerniertem Ang2 auf das Überleben der CLL-Zellen wurde untersucht. Dazu wurde Ang2 mit Hilfe von AMG386 neutralisiert und die CLL-Viabilität per AnnexinV PI Färbung im Durchflusszytometer bestimmt. Die Ang2 Neutralisationsversuche wurden sowohl mit mono- als auch mit kokultivierten CLL-Zellen durchgeführt.

3.2.1 Überlebensvorteil durch Kokultivierung

Eine Kokultivierung mit im natürlichen Mikromilieu der CLL-Zellen vorkommenden Zellen, kann den Verlust der Apoptoseresistenz der isolierten CLL-Zellen teilweise wieder herstellen und stellt damit eine Option dar, die *in vivo*-Situation experimentell nachzustellen. CLL-Zellen wurden für je 24 Stunden mit der humanen Knochenmarkstromazelllinie HS5, einer der myeloischen Zelllinien K563, HL60 und NB4 oder mit der endothelialen Zelllinie HUVEC kultiviert. Letztere wurde aufgrund ihres stark positiven Ang2- und Tie2-Status verwendet. Die myeloischen Zelllinien wurden aufgrund der Tie2-Positivität von Zellen aus der myeloischen Reihe (Granulozyten) ausgewählt. Zunächst sollte der positive Effekt für jede Zelllinie genau bestimmt werden. Dazu wurden die CLL-Zellen für je 24 Stunden der entsprechenden Zelllinie kokultiviert und die CLL-Viabilität mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Abb. 9 zeigt den Überlebensvorteil für CLL-Zellen in den verschiedenen

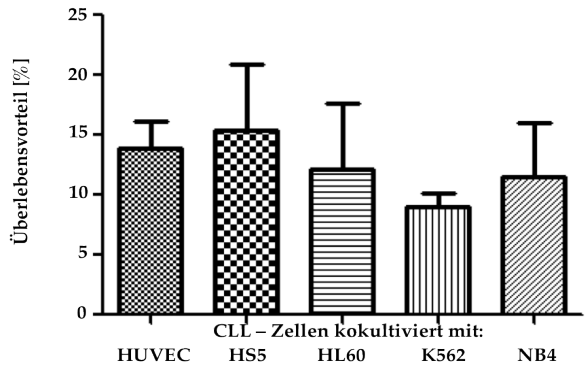

Abbildung 9: Überlebensvorteil durch Kokultivierung mit verschiedenen Zelllinien (CLL-Zellen kokultiviert mit HUVEC: n=7, HS5: n=7, HL60: n=8, K562:n=8, NB4: n=8)

Kokulturen. Der Überlebensvorteil berechnet sich aus der Differenz der monokultivierten und den Kokultivierten CLL-Zellen und lag für alle Kokulturen zwischen 9 und 15,4%. Die stark Ang2-sezernierenden HUVEC Zellen führten zu keinem signifikant unterschiedlichen Überlebensvorteil im Vergleich zu den Knochenmarkstromazellen HS5, die deutlich geringere Ang2 Mengen sezernieren. Auch das durch

Kokultivierung mit myeloischen Zelllinien verbesserte Überleben unterschied sich nicht von dem durch Knochenmarkstromazellen hervorgerufenen Überlebensvorteil.

3.2.2 Neutralisation von Ang2 durch AMG386

Um einen eventuell vorhandenen Effekt von Ang2 auf das Überleben der CLL-Zellen zu untersuchen, wurde Ang2 durch AMG386 neutralisiert. AMG386 wurde hier in einer Konzentration von 0,1µg/ml eingesetzt [100]. Betrachtet man den Überlebensvorteil, den die CLL-Zellen durch die Kokultivierung bekommen und vergleicht diesen mit den AMG386 behandelten Zellen, erkennt man, dass dieser Vorteil in jeder Kokultur etwa gleich bleibt (siehe Abb. 10). Würde Ang2 einen positiven Einfluss auf das Überleben der CLL-Zellen haben, sollte der Überlebensvorteil in den mit AMG386 behandelten Proben geringer sein. Um einen möglichen Einfluss auf das Überleben auch in der Monokultur erkennen zu können, ist in Abb. 11 das Gesamtüberleben der CLL-Zellen dargestellt. In dieser Darstellung ist zu sehen, dass das Gesamtüberleben der CLL Zellen in Abwesenheit von Ang2, also die mit AMG386 behandelten Proben, in der Monokultur und in fast allen Kokulturen etwas geringer war. Allerdings waren diese Ergebnisse statistisch nicht signifikant.

3.3 Tie2-Status bei der CLL

Eine erhöhte Expression und Sekretion von Ang2 in der CLL und die Korrelation eines erhöhten Plasma Ang2-Spiegels mit einer grundsätzlich schlechteren Prognose und fortgeschrittenem Krankheitsstadium, lässt die Vermutung zu, dass Ang2 bei der CLL eine funktionelle, pathophysiologisch relevante Rolle spielt. Der Ang2-Rezeptor Tie2 wurde bisher in der CLL noch nicht untersucht. Zudem ist der Tie2-Status des CLL-Mikromilieus nicht bekannt. Der Tie2-Status in CLL-Zellen und verschiedener in der *in vivo* Mikroumgebung der CLL vorhandenen Zelltypen wird im Folgenden beschrieben.

3.3.1 Die Expression von Tie2 durch CLL-Zellen

Zur Bestimmung des Tie2-Expressionsstatus bei der CLL wurden die cDNS der CLL-Zellen von neun Patienten und die cDNS der PBMC von fünf gesunden Kontrollen auf Tie2 mittels PCR untersucht. Als Positivkontrolle wurden HUVEC verwendet. Wie man in Abb. 12 erkennen kann exprimierten gesunde PBMC den Tie2-Rezeptor in ganz geringem Ausmaß, die CLL-Zellen dagegen wiesen keine Tie2 mRNS auf.

3.3.2 Durchflusszytometrische Bestimmung von Tie2 bei der CLL

Membranständiges Tie2 wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dazu wurde Vollblut verwendet. Blutzelltypen wurden mit Hilfe spezifischer Oberflächenmarker-

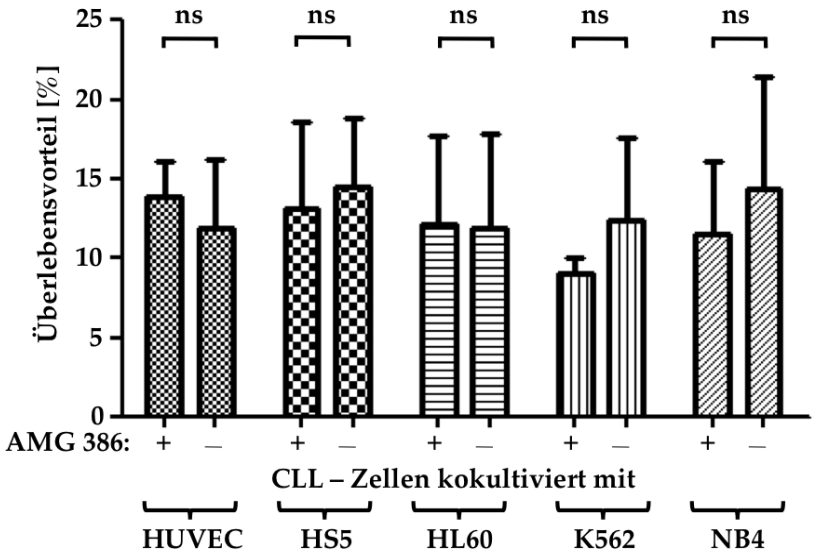

Abbildung 10: Vergleich der Überlebensvorteile der CLL-Zellen in Kokulturen unbehandelt und mit AMG386 behandelt (Kokultur mit HUVEC: n=7, Kokultur mit HS5: n=10, Kokultur mit HL60: n=8, Kokultur mit K562: n=8 und Kokultur mit NB4: n=8, ns=nicht signifikant berechnet mit Mann-Withney U Test)

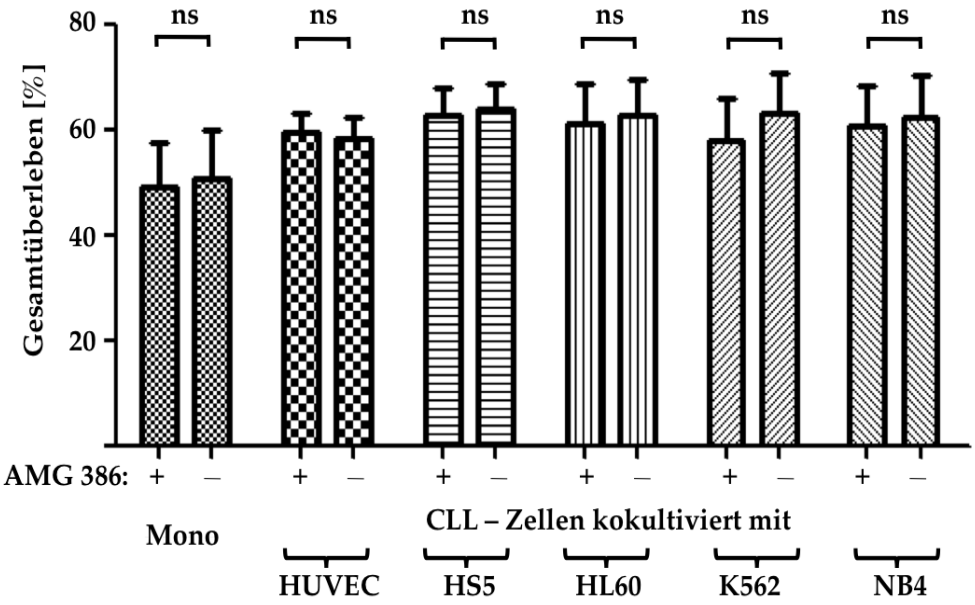

Abbildung 11: Gesamtüberleben der CLL-Zellen in Mono- und Kokultur, behandelt mit AMG386 und unbehandelt (CLL Monokultur: n=8, Kokultur mit HUVEC: n=7, Kokultur mit HS5: n=10, Kokultur mit HL60: n=8, Kokultur mit K562: n=8 und Kokultur mit NB4: n=8, ns=nicht signifikant berechnet mit Mann-Withney U Test)

färbung identifiziert. Ein direkt Fluoreszent-markierter Phycoerythrin(PE)-Tie2-Antikörper wurde verwendet. HUVECs fungieren als Tie2-Positivkontrolle. Wie in Abb. 13 ersichtlich ist, wiesen weder CLL-Zellen noch gesunde PBMCs Tie2 auf.

3.4 Analyse des Einflusses der Mikroumgebung auf den Tie2-Status

Da CLL-Zellen sehr stark von ihrer Mikroumgebung beeinflusst werden, soll ausgeschlossen werden, dass CLL-Zellen ausschließlich aufgrund der nicht physiologischen Umgebung verhindert sind, Tie2 zu exprimieren. Deshalb wurden verschiedene Faktoren während der Kultivierung der CLL-Zellen verändert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Hilfe eines PE-markiertem Tie2 Antiköper im Durchflusszytometer auf Tie2 getestet.

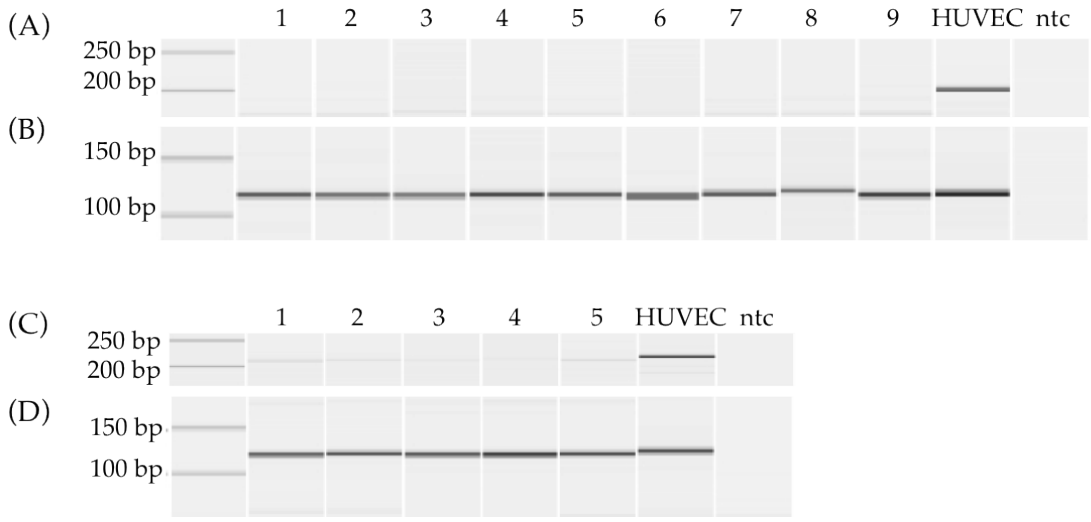

Abbildung 12: Tie2- (A) und ABL-Expression (B) von CLL-Zellen bzw. Tie2- (C) und ABL-Expression (D) von gesunden PBMC

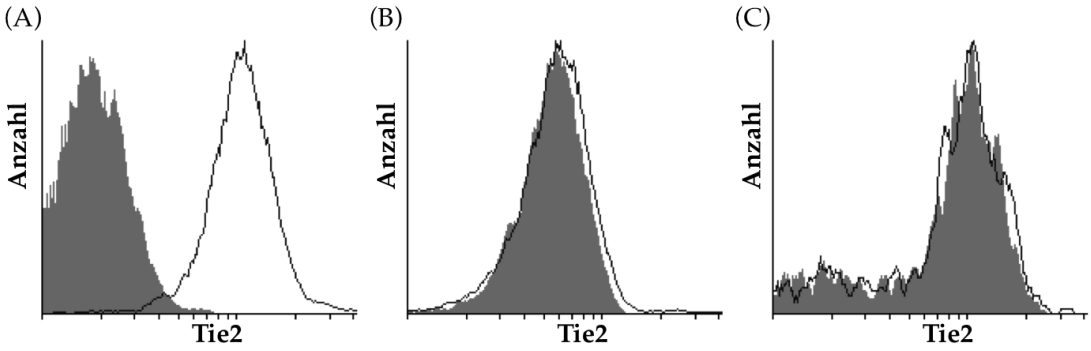

Abbildung 13: Tie2 auf der Oberfläche von (A) HUVEC, (B) CLL-Zellen und (C) gesunden B-Zellen bestimmt mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen

3.4.1 Einfluss hypoxischer Bedingungen während der Kultivierung

Auch hier sollte der Einfluss hypoxischer Bedingungen, wie sie zum Beispiel im Knochenmark vorherrschen, auf die Expression von Tie2 untersucht werden. Eine weitere Rationale für die Hypothese einer Induktion der Tie2-Expression in hypoxischen Bedingungen ist die bewiesene Stimulation von Angiogenese-relevanten Prozessen. Wie

in Abb. 14 ersichtlich induzierte eine Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen für 24h in CLL-Zellen jedoch keine Tie2 Expression.

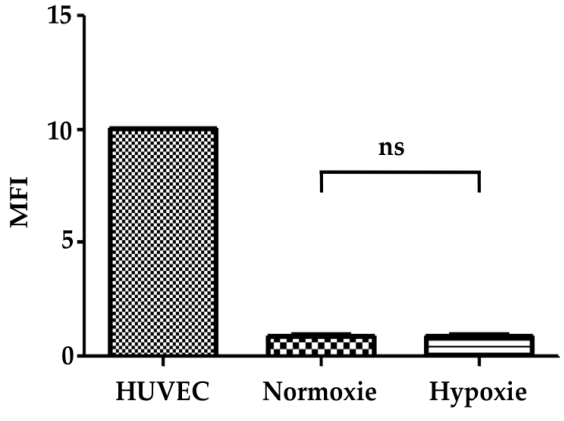

Abbildung 14: Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität von normoxisch (n=5) und hypoxisch (n=5) kultivierten CLL-Zellen, Positivkontrolle HUVEC (ns=nicht signifikant, bestimmt mit Mann-Withney U Test)

3.4.2 Parakriner Einfluss durch Kokultivierung

Auch hier wurden die Knochenmarkzelllinien NK_{tert}, KUSA und HS5, repräsentativ für in der Mikroumgebung der CLL-Zellen vorkommende Zellen zur Kokultivierung mit CLL-Zellen verwendet. NK_{tert} und HS5 sind humane, KUSA murine Knochenmarksstromazellen. HUVECs fungierten als Kontrolle. Zunächst wurden die Zelllinien selbst auf Tie2 untersucht. Wie in Abb. 15 gezeigt, wiesen alle Zelllinien Tie2 an ihrer Oberfläche auf. Allerdings kann man erkennen, dass die Verschiebung des PE Maximus bei HUVEC am größten war und diese somit die höchste Tie2-Dichte an der Zelloberfläche aufwiesen.

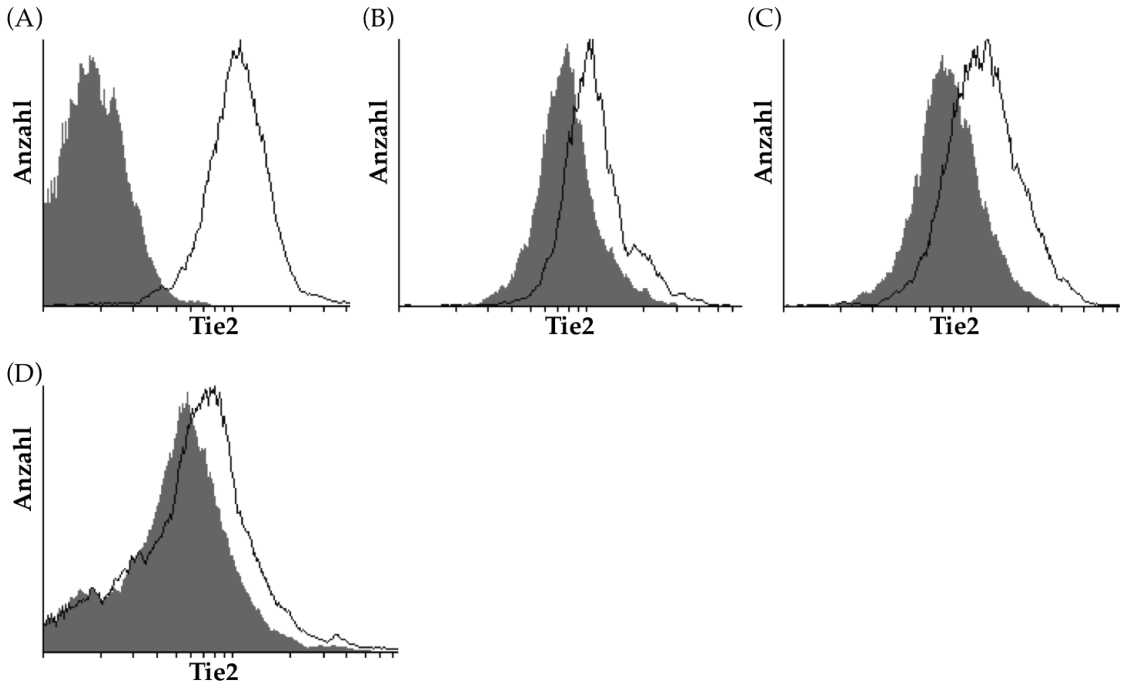

Abbildung 15: Tie2 auf der Oberfläche von (A) HUVEC, (B) NK_{tert}, (C) KUSA und (D) HS5 bestimmt mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen

Zur Kokultivierung wurden die Zelllinien in einer Dichte von $4x10^5$/ml ausgesät. Da es sich um Adhäsionszellen handelte, wurden diese für etwa 20 Stunden kultiviert, bevor die CLL- Zellen in einer 10fach höheren Konzentration hinzugefügt wurden. Anschließend wurden sie für 24 Stunden zusammen kultiviert. Nach 24h wurde der Überstand mit den suspendierten CLL-Zellen abgenommen. Diese wurden dann mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf Tie2 untersucht. Abb. 16 und 17 zeigen, dass die untersuchten Kokultivierungen keinen Einfluss auf die Tie2-Expression in CLL-Zellen hatten.

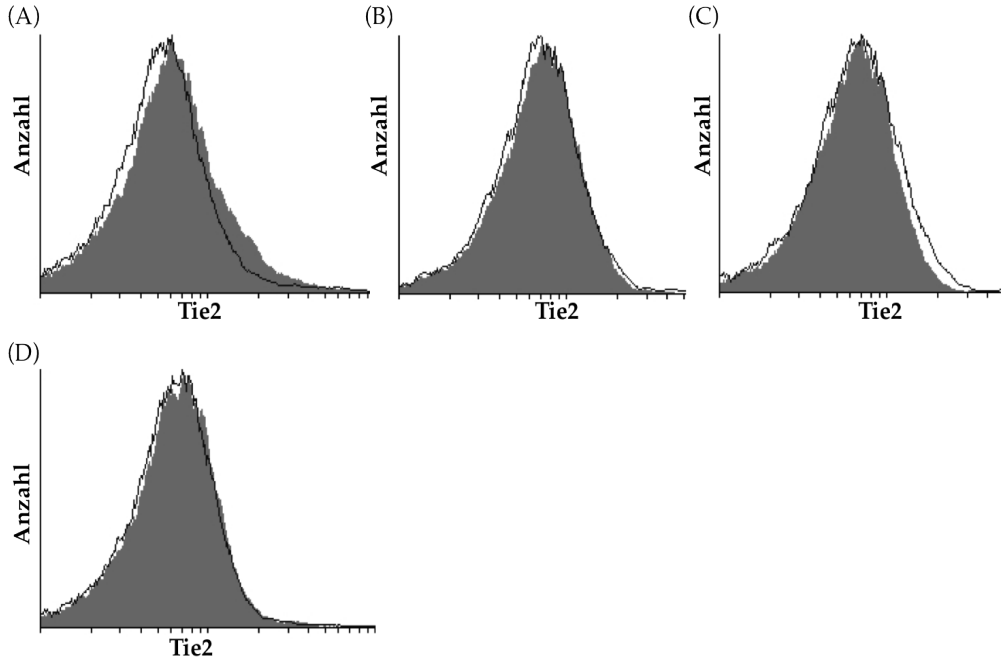

Abbildung 16: Tie2 auf der Oberfläche von CLL-Zellen kokultiviert mit (A) HUVEC, (B) NK_{tert}, (C) KUSA und (D) HS5 bestimmt mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen

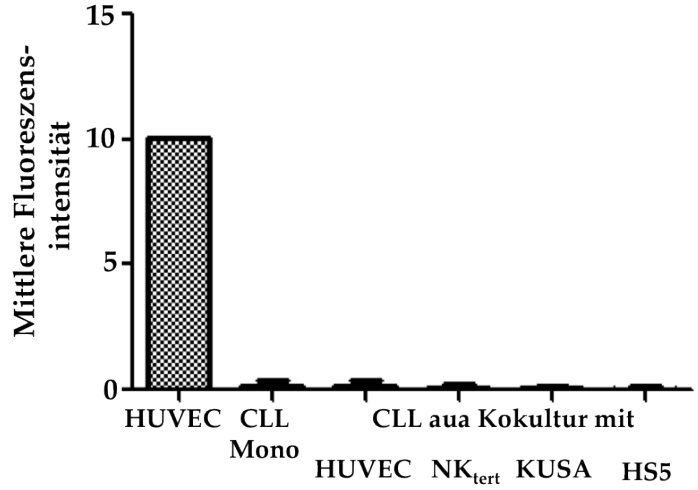

Abbildung 17: Mittlere Fluoreszenzintensität der kokultivierten CLL-Zellen im Vergleich zu monokultivierten CLL-Zellen und der Positivkontrolle HUVEC (CLL Monokultur: n=6, Kokultur HUVEC: n=2 Kokultur NK_{tert}: n=6, Kokultur KUSA: n=5, Kokultur HS5: n=6)

3.4.3 Einfluss durch externe Stimulanzien

Wie in der Literatur beschrieben und in dieser Arbeit überprüft kann die Zugabe externer Stimulanzien wie CD40-Ligand und IL4 die pathophysiologische Resistenz von CLL-Zellen gegenüber Apoptose teilweise wiederherstellen. Das verbesserte *in vitro*-Überleben durch Stimulation mit CD40L oder IL4 oder einer gemeinsamen Stimulation führte wie in Abbildungen 18 und 19 ersichtlich nicht zu einer Induktion der Tie2-Expression.

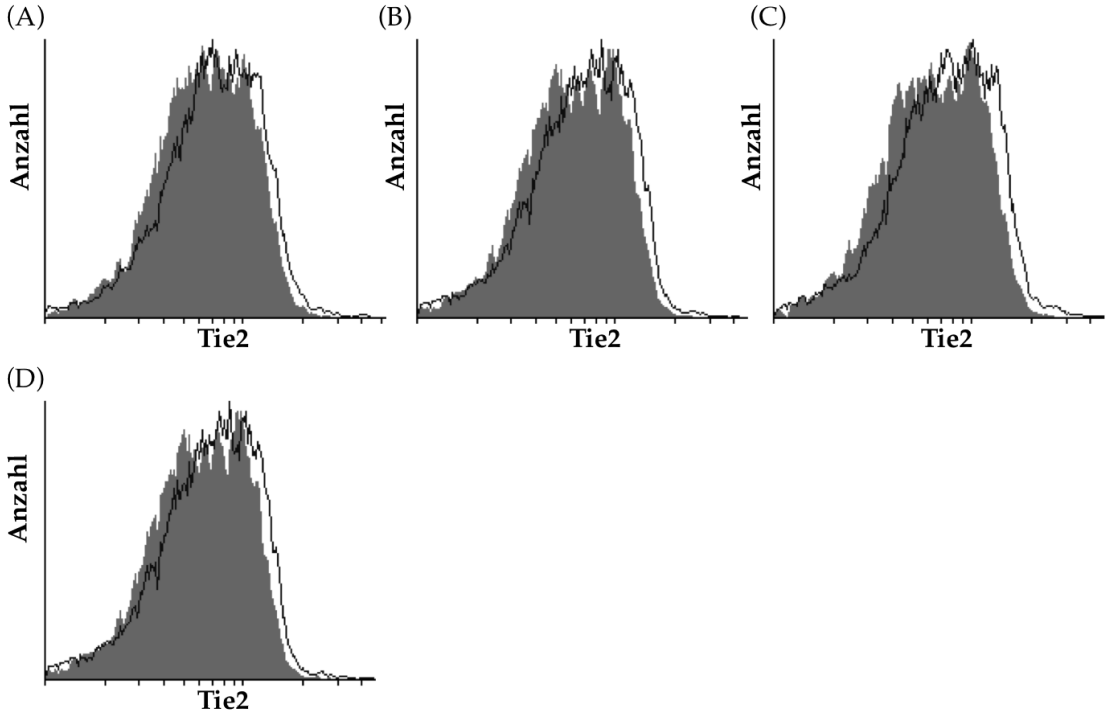

Abbildung 18: Tie2 auf der Oberfläche von CLL-Zellen (A) ohne Stimulanzien und nach Stimulation mit (B) CD40-Ligand, (C) IL4 und (D) CD40-Ligand und IL4

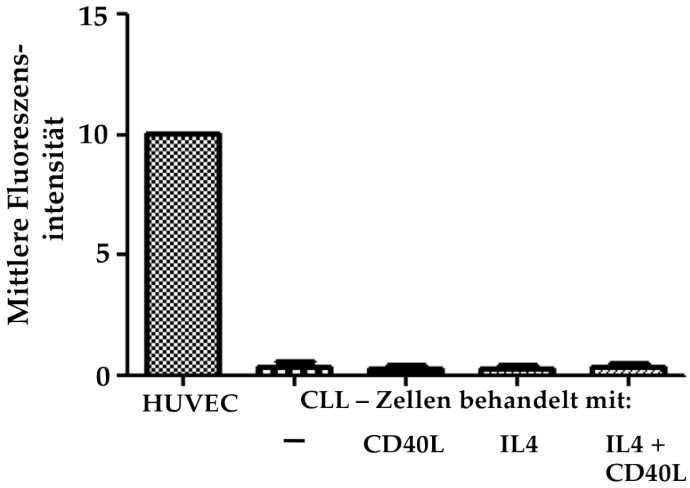

Abbildung 19: Mittlere Fluoreszenzintensität der stimulierten CLL-Zellen (unbehandelt: n=3, mit CD40L behandelt: n=4, mit IL4 behandelt: n=4, mit CD40L und IL4 behandelt: n=4)

3.5 Untersuchung verschiedener Zellen des Mikromilieus der CLL-Zellen auf den Tie2 Rezeptor

Da keine der untersuchten Bedingungen zu einer Induktion von Tie2 auf der CLL-Zelloberfläche geführt hat, sollte nun der Tie2-Status bei Zellen, die in der natürlichen Mikroumgebung der CLL-Zellen vorkommen, untersucht werden. Tie2-positive Zellen könnten als Interaktionspartner für parakrine Effekte des von CLL-Zellen sezerniertem Ang2 fungieren. Es wurden Granulozyten als mögliche Interaktionspartner über die Ang2/Tie2 Achse im peripheren Blut untersucht. Zudem wurden primäre Knochenmarkstromazellen (KMSZ) und Knochenmark-assoziierte CLL-Zellen aus Knochenmarksaspiraten von CLL-Patienten isoliert und kultiviert. Myeloisch dendritische und *Nurse like* Zellen (NLC) wurden *in vitro* aus Knochenmarkaspiraten (dendritische Zellen) oder aus peripherem Blut (NLC) differenziert. Der Tie2-Status wurde hier mittels PCR, Immunofluoreszenz oder Western Blotting untersucht.

3.5.1 Granulozyten

Wie die Abb. 20 zeigt, waren sowohl die Granulozyten der CLL-Patienten als auch gesunder Spender Tie2-positiv. CLL-Zellen jedoch wiesen eine höhere Fluoreszenzintensität auf als gesunde PBMCs.

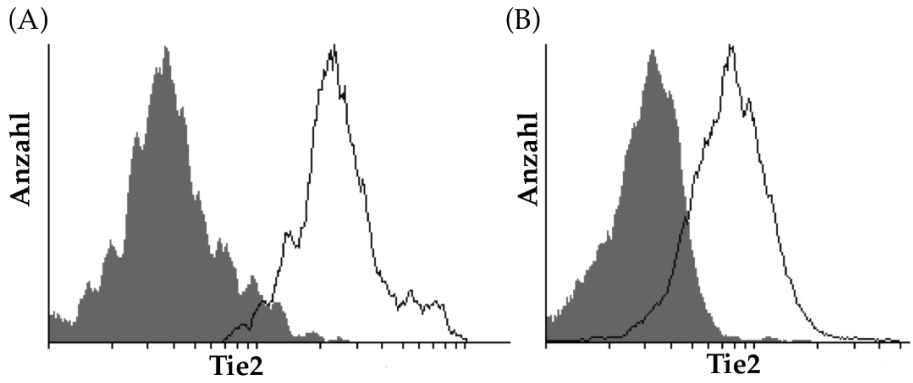

Abbildung 20: Tie2 auf der Oberfläche von (A) Granulozyten von CLL-Patienten und (B) Granulozyten gesunder Spender

3.5.2 Dendritische Zellen

Unter der Bezeichnung dendritische Zellen werden verschiedene antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems zusammengefasst, die sich physiologisch aus Monozyten oder Vorläufern der T-Zellen entwickeln. Als Immunzellen gehören sie zum natürlichen Mikromilieu der CLL-Zellen. *Ex vivo* generiert man dendritische Zellen durch Kultivierung von PBMC angereichert mit CD14 positiven Zellen. Zu dem normalen RPMI-Medium werden *Granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) und IL 4 gegeben. Hier entwickelten sich nach ca. 7 Tagen myeloische dendritische Zellen, die mit Hilfe der Giemsa-Färbung in Abb. 21 A sichtbar gemacht wurden. Außerdem wurden diese per Immunfluoreszenz auf Tie2 untersucht. Wie in Abb. 21 zu erkennen , zeigten dendritische Zellen eine positive Färbung für Tie2. Sie stellen neben den Granulozyten einen weiteren Zelltypen im Mikromilieu der CLL-Zellen dar, die den Tie2-Rezeptor tragen.

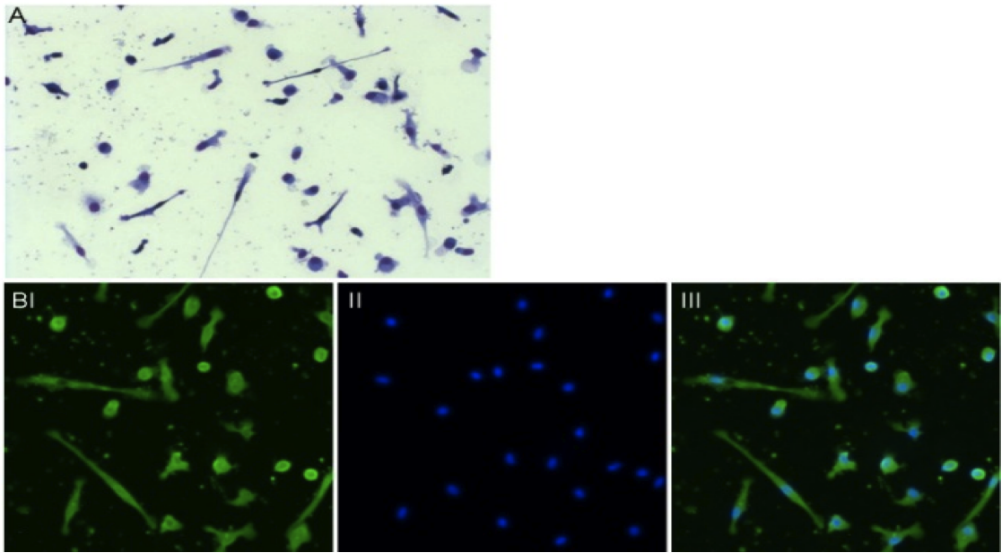

Abbildung 21: Myeloische dendritische Zellen sichtbar in der (A) Giemsa-Färbung und (B) die Immunfluoreszenz auf Tie2 der dendritischen Zellen (B-I: Tie2-Dylight488-Färbung, B-II: 4',6-Diamidin-2-phenylindol(DAPI)-Färbung, B-III: Mischung Tie2 und DAPI)

3.5.3 Nurselike Zellen

Nurse like Zellen entstehen physiologisch wie schon in Kapitel 1.2 erwähnt durch Interaktion von CLL-Zellen mit CD14 positiven Monozyten und schützen die CLL-Zellen vor Apoptose. Als wichtige Zellen der Mikroumgebung von CLL-Zellen sollten diese auf ihren Tie2-Status überprüft werden. Außerdem sollte ihr Einfluss auf die Tie2-Expression in der Kokultur mit CLL-Zellen getestet werden. Die Kokultur von CLL-Zellen mit einem primären, in der Mikroumgebung *in vivo* präsentem, Zelltyp stellt eine verbesserte Situation der eigentlichen *in vivo* Situation dar, als eine Kokultur mit immortalisierten Zelllinien.
Weder NLC noch mit NLCs kokultivierte CLL-Zellen wiesen Tie2 auf.

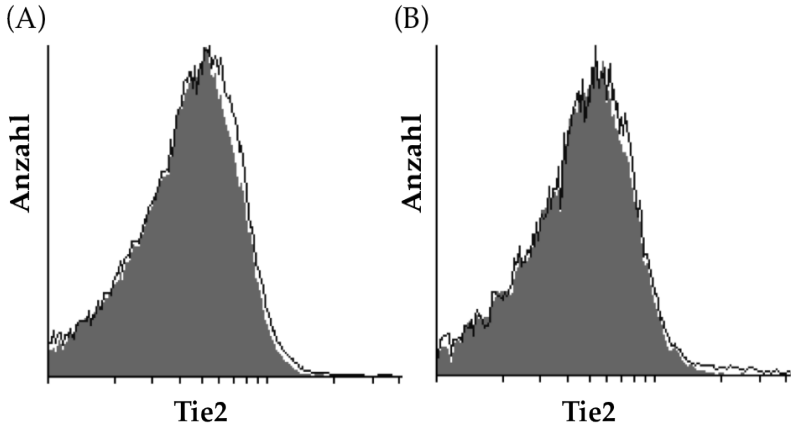

Abbildung 22: Tie2 auf der Oberfläche von (A) Nurselike Zellen und (B) CLL-Zellen kokultiviert mit Nurselike Zellen ermittelt mit Hilfe der Durchflusszytometrie

3.5.4 Knochenmark und Knochenmarksstromazellen

Der Tie2-Status Knochenmark-assoziierter CLL-Zellen ist in den untersuchten Patienten sehr heterogen. Drei der vier untersuchten Knochenmarkaspirate wiesen eine deutlich erhöhte Tie2-Fluoreszenzintensität auf (siehe Abb. 23). Da sich die durchflusszytometrische Bestimmung des Tie2-Status der Knochenmarks- CLL-Zellen als relativ schwierig gestaltete, wurde von weiteren fünf Patienten die cDNS der isolier-

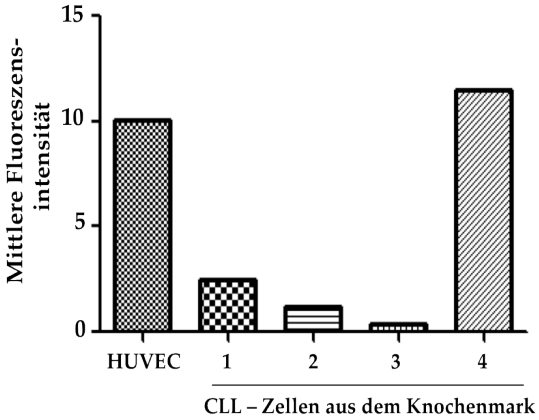

Abbildung 23: Mittleren Fluoreszenzintensität von CLL-Zellen aus dem Knochenmark

ten CLL-Zellen auf Tie2 getestet. Von vier dieser Patienten stand noch genügend Material für einen Western Blot zur Verfügung. Die PCR-Ergebnisse sind in Abb. 24 dargestellt.

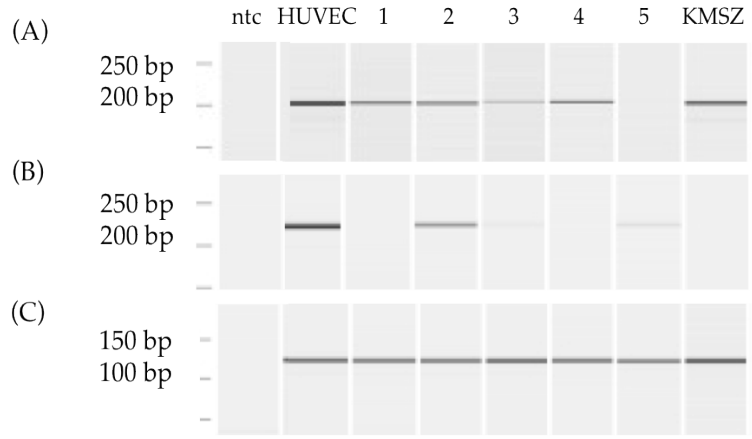

Abbildung 24: Expression von (A) Tie2, (B) Ang2 und als Kontrolle (C) ABL durch B-Zellen aus dem Knochenmark von CLL-Patienten, wobei HUVEC als Positivkontrolle diente. 1-5 sind die verschiedenen Patienten. (ntc = non template control, KMSC = Knochenmarksstromazellen)

Bei vier von fünf getesteten Patienten konnte mRNS für Tie2 in den B-Zellen des Knochenmarks nachgewiesen werden. Ebenso die aus den Zellen des Knochenmarks *in vitro* gezüchteten Knochenmarksstromazellen wiesenTie2-mRNS auf. Interessanterweise zeigte nur einer der fünf Patienten die Präsenz von cDNS für Ang2.
Schaut man sich die Patienten 1-4 im Western Blot in Abb. 25 an, um Tie2 auch auf Proteinebene nachweisen zu können, so stellt man fest, dass zwar bei der Positivkontrolle Tie2 nachgewiesen werden konnte, nicht aber beim den CLL-Zellen aus dem Knochenmark. Als Negativkontrolle wurden CLL-Zellen aus dem peripheren Blut verwendet.

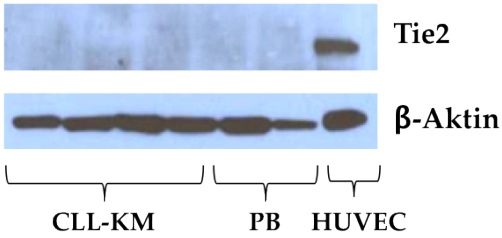

Abbildung 25: Western Blot zum Nachweis von Tie2 auf Proteinebene. CLL-KM = CLL-Zellen des Knochenmarks, CLL-PB = CLL-Zellen aus dem peripheren Blut, HUVEC als Positivkontrolle

3.6 Analyse möglicher anderer Ang2-bindender Rezeptoren

3.6.1 Induktion von Rezeptortyrosinkinasen-Phosphorylierung durch rekombinantes Ang2 Protein

Ein Westernblot-basierter Immun-Array wurde verwendet, um den Phosphorylierungsstatus Leukämie-relevanter Rezeptortyrosinkinasen (RTK) vor und nach der Stimulation mit rekombinantem Ang2 Protein zu untersuchen. Dazu wurden die entsprechenden Lysate auf einer mit verschiedenen RTK-spezifischen Antikörpern beschichteten Membran inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Proteinlysat erfolgte eine weitere Inkubation mit einem biotiniliertem Antiphosphotyrosin Antikörper. Dieser konnte mit *horseradish peroxidase* (HRP) konjugiertem Streptavidin sichtbar gemacht werden. Der Bereich der Antiköper, die Proteinlysat gebunden haben, färbten sich auf einem Film dunkel. Parallel wurde dieser Versuch mit einer unbehandelten Probe durchgeführt. Eine densitometrische Auswertung lässt Schlussfolgerung über den relativen Phosphorylierungsstatus der RTKs zu.
Abb. 26 zeigt die relative Signalintensität der Phosphorylierung der untersuchten RTKs. Diese errechnet sich nach Korrektur des Hintergrundrauschens aus dem Quotient des behandelten und unbehandelten Zelllysats. In der Abbildung ist die Phosphorylierung stärker, je grüner die Farbe ist. Somit sind z.B. der *Epidermal growth factor receptor* (EGFR), der Insulin Rezeptor, die *B lymphocyte kinase* (Blk) und der *Tyrosine-protein kinase receptor* (Dtk) mit am stärksten phosphoryliert.

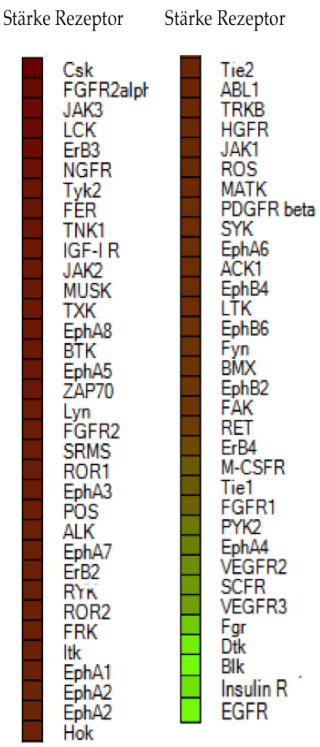

Abbildung 26: Relativer Stärke der Phosphorylierung verschiedener Rezeptoren durch Ang2 bei CLL-Zellen, rot = nicht phosphoryliert, grün= phosphoryliert

4 Diskussion

4.1 Vergleich der Ang2 Expression und Sekretion bei CLL-Zellen und gesunden Kontrollen unter Berücksichtigung verschiedener beeinflussender Faktoren

Die Expression von Ang2 wurde an neun verschiedenen CLL-Patienten untersucht und zeigte eine ausgeprägte Heterogenität. Fünf der untersuchten mRNS-Proben zeigten einen positiven Ang2-Status. Es konnte eine Korrelation des Ang2-Status auf mRNS-Ebene und den beiden prognostischen Markern ZAP70 und CD38 festgestellt werden, was in der Tabelle 4 dargestellt ist. Definitionsgemäß ist eine Expres-

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ZAP70	39%	10%	52%	1,2%	30%	23%	22%	9%	1,2%
CD38	23%	63%	12%	0,1%	13%	2,7%	44%	0,2%	0,1%
PCR	+	+	+	-	+	-	+	-	-

Tabelle 4: ZAP70 und CD38 Status der Patienten

sion von ZAP70 durch weniger als 20% der malignen Zellen und eine Expression von CD38 durch weniger als 30% der CLL-Zellen als negativ zu betrachten. So gesehen waren hier folgende Patienten ZAP70- und CD38-negativ: Patient 4, Patient 8 und Patient 9. Gleichzeitig waren diese Patienten Ang2-negativ. In diesen Versuchen wich ein Patient von dieser Korrelation ab: Patient 6 exprimierte kein Ang2, war aber nicht ZAP70 und CD38 doppelt negativ. In diesem Fall war aber die ZAP70-Expression mit 23% nur schwach positiv. Die CD38-Expression war mit 2,7% sehr gering. Dieser Zusammenhang bestätigt die Ergebnisse von Maffei *et al.*, die auf Proteinbasis eine Korrelation zwischen hohen Ang2-Konzentration und positiven ZAP70- und CD38-Werten nachweisen konnten [86].

Neben der Bestimmung und des Vergleichs von Ang2 auf mRNS-Ebene wurde hier auch die Konzentration des Proteins im Plasma von CLL-Patienten, sowie im Überstand von CLL-Zellen nach 24 Stunden ermittelt. Dabei wird deutlich, dass die Ang2-Konzentration in beiden Fällen bei den CLL-Proben signifikant höher war, als bei gesunden Kontrollen. Auch in der Literatur wird von hohen Ang2-Konzentra-

tionen sowohl im Plasma von CLL-Patienten, als auch im Überstand von CLL-Zellen berichtet [85], allerdings fehlte bisher der Vergleich der Ang2-Konzentrationen im Überstand der CLL-Zellen zu dem Überstand gesunder Zellen, so wie es hier gezeigt werden konnte.

Die im Überstand der CLL-Zellen gemessenen Ang2-Konzentrationen der Literatur liegen bei 13-29pg/ml [85]. Die verwendete Zellkonzentration lag bei $2x10^6$ Zellen pro ml. Die hier in der Arbeit gefundenen Konzentrationen lagen im Mittel bei 116,1pg/ml bei den CLL-Zellen und bei 26,3pg/ml bei den gesunden PBMC. In dieser Arbeit wurden die Zellen in einer Dichte von $4x10^6$/ml verwendet. Die höhere Anzahl und Dichte der Zellen ist eine mögliche Erklärung für die höheren Ang2-Konzentrationen dieser Arbeit im Vergleich zu der Literatur. Durch die höhere Dichte hatten die CLL-Zellen einen engeren Zell-Zell-Kontakt, der zu einer Stimulation der Ang2-Sekretion beitragen könnte. Um diese Theorie zu bestätigen, müssen jedoch weitere Versuche folgen.

Die Ang2-Konzentrationen im Plasma dagegen waren deutlich höher als die im Überstand. Die im Plasma gemessenen Werte dieser Arbeit sind mit den Werten der Literatur vergleichbar: Der Median lag in dieser Arbeit bei 2175pg/ml, der von Maffei *et al.* angegebene Wert ist 2061pg/ml. Betrachtet man die gemessenen Ang2-Konzentrationen aus dem Plasma im einzelnen, so schwanken die Werte zwischen 1544,13pg/ml und 3824,98pg/ml. Auch diese Heterogenität ist mit den von Maffei *et al.* veröffentlichten Ergebnissen vergleichbar. Maffei *et al.* geben in ihrer Veröffentlichung Ang2-Konzentrationen von 972pg/ml - 17281pg/ml im Plasma von CLL-Patienten an [86]. Die Arbeitsgruppe wählte auch einen *Cut-off-Level*, der mit Hilfe einer Grenzwertoptimierungskurve bestimmt wurde. Die Konzentration, die die Patienten in Gruppen mit hohen und niedrigen Ang2-Werten aufteilt liegt bei 2458pg/ml. Tabelle 5 zeigt die hier gemessenen Patienten und teilt diese nach dem

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PCR	+	+	+	-	+	-	+	-	-
Ang2	+	+	+	-	+	-	-	-	-

Tabelle 5: Ang2-Status laut *Cut-off-Level* von 2458pg/ml

Cut-off-Level in Ang2-positive und Ang2-negative Patienten ein. Auffällig ist, dass sich diese Einteilung nahezu mit den Ergebnissen der PCR deckt. Im Plasma der Patienten, die in der PCR negativ für Ang2 sind, ist die Konzentration des Proteins also so gering, dass diese als Ang2-negativ gewertet werden. Patient 7 stellt eine Ausnahme dar. Die Ang2-Konzentration ist gering und der Patient wird als Ang2-negativ gewertet, obwohl die PCR positiv war. Schaut man sich die Intensität der Banden der PCR in Abb. 3 an, so wird deutlich, dass dieser Patient Ang2 am schwächsten exprimiert. So erscheint die geringe Konzentration des Ang2 im Plasma plausibel. Der bereits in der Literatur beschriebene Wert zur Einteilung in Ang2-positive und Ang2-negative Patienten kann durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigt werden.
Da die Ang2-Konzentration im Plasma von CLL-Patienten deutlich höher war, als die, die von CLL-Zellen *in vitro* sezerniert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass weitere Zellen zum Plasma-Ang2 beitragen. Außerdem konnte auch eine geringe Menge Ang2 im Überstand gesunder PBMCs nachgewiesen werden, so dass nicht CLL-Zellen alleine für die Ang2-Sekretion verantwortlich sein können.

Einfluss der Mikroumgebung

Die Diskrepanz zwischen Plasma-Ang2 und sezerniertem Ang2 im CLL-Zell-Überstand lässt die Vermutung zu, dass Mikroumgebung-assoziierte Faktoren an der Ang2-Sekretion beteiligt sind. Dabei kann sowohl die Ang2-Sekretion eines anderen Zelltyps, als auch eine Mikroumgebung-induzierte Stimulation der CLL-Zellen zur verstärkten Ang2-Produktion und -Sekretion eine Rolle spielen. Um diesen Zusammenhang weiter zu beschreiben, wurde mit den nachfolgenden Experimenten versucht die Ang2-Sekretion auf unterschiedliche Art und Weise zu beeinflussen. Dazu wurden bei der Kultivierung der CLL-Zellen folgende Bedingungen angewandt: Hypoxie, Kokultivierung mit anderen Zellen und Stimulation durch IL4 und CD40-Ligand.
Zunächst wurde der Einfluss der Sauerstoffkonzentration in der Umgebung auf die Ang2-Sekretion der CLL-Zellen getestet. Auf Proteinebene konnte gezeigt werden,

dass sich die Ang2-Konzentration nach 24h Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zur Kultivierung in normoxischer Umgebung im Überstand nahezu verdoppelte (zwischen 78% und 120%, siehe Abb. 5). Dieser Wert übersteigt den bereits in der Literatur beschriebenen Einfluss hypoxischer Bedingungen auf die Sekretion von Ang2 [85]. Es wird von einer Steigerung zwischen 14 und 88% nach 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen berichtet. Bezieht man diese *in vitro* Ergebnisse auf die *in vivo* Situation, so würde man erwarten, dass die Ang2-Konzentration im Knochenmark, das hypoxische Bedingungen bietet, viel höher ist, als die Ang-Konzentration im peripheren Blut. In einer Veröffentlichung von Maffei *et al.* konnte allerdings im Knochenmark wesentlich weniger Ang2-Protein nachgewiesen werden, als im peripheren Blut [86].

Betrachtet man die Expression von Ang2-mRNS durch CLL-Zellen unter hypoxischen Bedingungen, decken sich dagegen die *in vivo* und *in vitro* gefundenen Ergebnisse: In dieser Arbeit wurden Ang2-mRNS-Level mittels PCR von CLL-Knochenmarkszellen von fünf verschiedenen Patienten untersucht (siehe Abb. 24). Vier dieser Proben, also 80%, waren Ang2-negativ. Maffei *et al.* untersuchten mittels quantitativer PCR die Unterschiede in der Expression von Ang2-mRNS zwischen hypoxisch und normoxisch kultivierten CLL-Zellen *in vitro* und konnten dort keine Steigerung unter Sauerstoffentzug feststellen. Die Expression von Ang2 ist folglich nicht von der Sauerstoffkonzentration in der Umgebung abhängig. Ist aber eine Expression von Ang2 und somit auch das Protein vorhanden, lässt sich die Sekretion des Ang2 durch Hypoxie als Stimulans steigern.

Um einen möglichen Einfluss von Zellen aus der Mikroumgebung der CLL-Zellen *in vivo* nachzustellen, wurden die CLL-Zellen mit verschiedenen Zelllinien kokultiviert. Die Zelllinie HUVEC weist eine sehr hohe Sekretion von Ang2 auf. Alle anderen verwendeten Zelllinien sezernieren Ang2 in einer mit der von CLL-Zellen vergleichbaren Konzentration. Interessanterweise wiesen die Kokulturen keine Steigerung der Ang2-Konzentration auf. Es würde zumindest ein additiver Effekt erwartet, so dass die Ang2-Konzentration etwa doppelt so hoch wäre wie bei den monokultivierten CLL-Zellen.

Der nicht vorhandene additive Effekt kann ein Resultat der gegenseitigen Einfluss-

nahme sein. Eine quantitative Aussage über den Anteil der Gesamt-Ang2-Konzentration der zwei Zelltypen in der Kokultur ist nicht möglich. Betrachtet man die Kokultur mit den HUVEC, sieht man, dass die Ang2-Konzentration etwa auf dem Level der Monokultur der HUVEC blieb, so dass man in diesem Fall vermuten kann, dass die CLL-Zellen ihre Ang2-Produktion erniedrigt haben. Wenn man davon ausgeht, dass die CLL-Zellen in der Kokultur weniger Ang2 produzieren als in der Monokultur, so kann man auf eine Art negativer Rückkopplung schließen, die die Ang2-Sekretion herunter reguliert, sobald im Mikromilieu hohe Konzentrationen des Proteins vorhanden sind. Diese Vermutungen sind jedoch sehr vage und bedürfen weiterer Untersuchungen zur Validierung. In der Literatur sind bisher keine Effekte derart beschrieben.

Die Kokultur bietet eine komplexe Situation über sezernierte Faktoren und direkte Zell-Zell-Interaktionen. Zur gezielteren Untersuchung möglicher Stimulationen der Ang2-Sekretion, wurde ihn dieser Arbeit der Einfluss klassischer Stimulanzien, die das Überleben der CLL-Zellen fördern (IL4 und CD40-Ligand), auf die Ang2-Sekretion untersucht. Eine Zugabe von IL4 oder CD40-Ligand und eine Kombination beider führte erwartungsgemäß zu einem verbessertem Überleben isolierter CLL-Zellen *in vitro* (siehe Abb. 7), jedoch konnte kein Einfluss auf die Ang2-Konzentration im Überstand festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei CLL-Patienten Ang2 in signifikant höheren Konzentrationen im Plasma zu finden ist, als bei gesunden und dieses zu einem Teil von den CLL-Zellen selbst sezerniert wird. Die Sekretion des Ang2 lässt sich ausschließlich durch Hypoxie beeinflussen, andere Faktoren zeigen keine Veränderung der Ang2-Konzentration. Der Sauerstoffentzug hat jedoch keinen Einfluss auf die Expression der Ang2-mRNS.

4.2 Bewertung des Einflusses von Ang2 auf das Überleben der CLL-Zellen

Da bisher ausschließlich quantitative Untersuchungen zu Ang2 und die Korrelation zwischen hohen Konzentrationen dieses Proteins mit anderen Krankheitsparametern existieren, sollten im Rahmen dieser Arbeit funktionelle Aspekte von Ang2 untersucht werden. Hohe Ang2-Level konnten mit einem ungünstigem Krankheitsverlauf, kürzerer Zeit bis zur Erstbehandlung und kürzerem Gesamtüberleben assoziiert werden [86]. Dies sind jedoch rein beschreibende Daten und es gibt keine Informationen bezüglich eines funktionellen Zusammenhangs. Darüber hinaus ist bekannt, dass andere proangiogenetische Faktoren, z.B. VEGF das Überleben der CLL-Zellen *in vitro* verbessern können [53, 101]. Deshalb wurde getestet, ob Ang2 ebenfalls einen Einfluss auf das Überleben der CLL-Zellen *in vitro* hat.
Die in dieser Arbeit verwendeten Feederzellen zur Kokultur sind dafür bekannt das Gesamtüberleben der CLL-Zellen *in vitro* zu verbessern, bzw. die Rate der Spontanapoptose zu verringern. Um Herauszufinden, ob eine Sekretion von Ang2 hierbei eine Rolle spielt, wurde das Ang2-Protein mit Hilfe des *Peptibodies* AMG386 neutralisiert. Falls Ang2 einen positiven Einfluss auf das Überleben der CLL-Zellen zeigt, würde der Überlebensvorteil der durch die Feeder-Zellen gegeben ist, durch die Behandlung mit AMG386 und der daraus resultierenden Neutralisation von Ang2 abnehmen. In Abb. 10 wird gezeigt, dass der gegebene Überlebensvorteil der Kokultur gegenüber der Monokultur sich nicht durch die Zugabe von AMG386 verändern ließ. Um einen möglichen autokrinen Einfluss von Ang2 auf das Überleben der CLL-Zellen *in vitro* zu untersuchen, wurde der Ang2-neutralisierende *Peptibody* AMG386 auch in CLL-Monokulturen verwendet. Wie in Abb. 11 ersichtlich, hatte die Neutralisation von Ang2 durch AMG386 keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben monokultivierter CLL-Zellen. Bei diesen Untersuchungen war eine ausgeprägte Heterogenität der Ergebnisse auffällig. Während bei CLL-Zellen einiger Patienten die Neutralisierung von Ang2 durch AMG386 zu einem leicht verschlechterten Überleben führte, konnte bei anderen sogar ein verbessertes Überleben festgestellt werden. Diese Heterogenität wird in Abb. 27 noch einmal verdeutlicht. Es sind die Ergebnisse

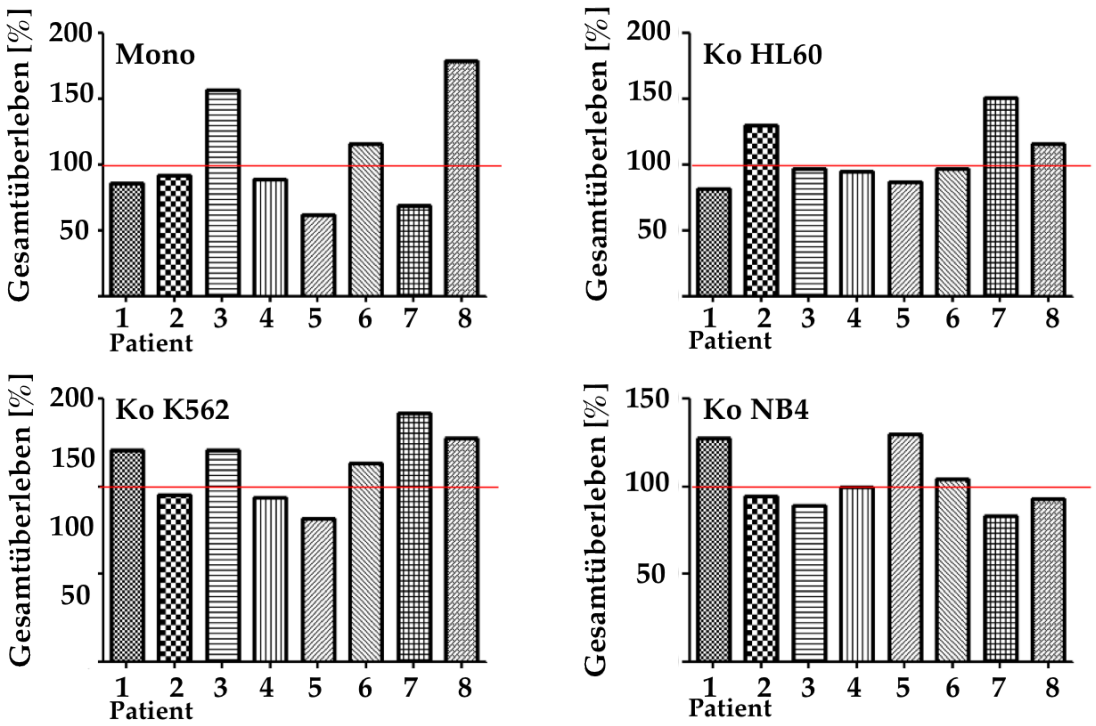

Abbildung 27: Prozentales Überleben der AMG386 behandelten CLL-Zellen der einzelnen Patienten in der Mono- und den verschiedenen Kokulturen bezogen auf die unbehandelten Proben (100%)

für jeden Patienten einzeln dargestellt. Dabei ist auf der Y-Achse das Gesamtüberleben der AMG386-behandelten Zellen prozentual dargestellt. Das Überleben bezieht sich auf die unbehandelten Zellen, die als 100% Gesamtüberleben definiert werden, was graphisch durch die rote Markierung verdeutlicht wird. Falls Ang2 einen Überlebensvorteil bieten würde, so wäre die Anzahl der überlebenden Zellen nach der Behandlung mit AMG386 wesentlich geringer, was in der Abbildung daran zu erkennen wäre, dass alle Balken deutlich unterhalb der 100%-Markierung wären. Der heterogene Effekt der Ang2-Neutralisation in diesem Versuch konnte nicht mit Parametern wie Krankheitsstadium, ungünstige Prognose, Geschlecht oder Alter korreliert werden. Aufgrund dieser Versuche kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass Ang2 einen positiven Einfluss auf das Überleben der CLL-Zellen ausübt.

4.3 Mutationsstatus von *ANG2* bei der CLL

Die Sequenzierung von *ANG2* bei verschiedenen CLL-Patienten sollte bestätigen, dass keine unbekannte, möglicherweise funktionell relevante, genetische Veränderung des *ANG2* bei der CLL vorliegt. Innerhalb der kleinen hier getesteten Patientenpopulation konnte gezeigt werden, dass keine Mutationen bei *ANG2* bei der CLL vorliegen. Die bekannten SNVs waren jedoch detektierbar. Diese sind in in Tab. 3 mit der entsprechenden Referenznummer gekennzeichnet mit der sie auf der BLAST Datenbank eingesehen werden können. Diese Mutationen betreffen in fast allen Fällen die dritte Base des Tripletts, so dass es nicht zu einem Austausch der kodierten Aminosäure im Protein kommt und eine funktionelle Relevanz damit ausgeschlossen werden kann.

4.4 Vergleich der Expression von Tie2 durch CLL-Zellen und gesunden PBMC unter Einfluss verschiedener Faktoren

Ein natürlicher Rezeptor für Ang2 während des Prozesses der Angiogenese ist Tie2. Zur weiteren Untersuchung einer möglichen funktionellen Rolle von Ang2 bei der CLL wurde in dieser Arbeit dieser physiologisch relevante Rezeptor untersucht. Die Präsenz und mögliche funktionelle Relevanz von Tie2 wurde bisher in der CLL noch nicht beschrieben.

Zunächst wurde die cDNS von CLL-Zellen auf Tie2-mRNS untersucht. Während CLL-Zellen keine Tie2-mRNS aufwiesen, konnte für gesunde PBMCs eine schwache Expression detektiert werden. Da für diesen Vergleich allerdings nicht die cDNS aus reinen B-Zellen verwendet wurde, sondern die cDNS von gesunden PBMC, kann die Expression nicht eindeutig den gesunden B-Zellen zugeordnet werden.

Diese Ergebnisse sollten im Folgenden anhand von durchflusszytometrischen Messungen auf Proteinebene genauer untersucht werden. Sowohl die CLL-Zellen, als auch gesunde B-Zellen wurden auf das Vorhandensein des Tie2-Rezeptors auf ihrer Oberfläche getestet. Anhand der Überschneidungsdiagramme in Abb. 13 erkennt man, dass HUVEC eindeutig Tie2-positiv waren, so dass ein methodischer Fehler

ausgeschlossen werden kann. Betrachtet man dagegen die Diagramme der gesunden B-Zellen und der CLL-Zellen, so erkennt man dass es hier keine Verschiebung gab. Sowohl die gesunden B-Zellen, als auch dei CLL-Zellen waren Tie2-negativ. Das positive Ergebnis der mRNS-Analyse gesunder PBMCs ist demnach vermutlich durch nicht-B-Zell Populationen, wie T-Zellen oder Monozyten, verursacht worden. Da Tie2 weder auf mRNS-Ebene noch auf Proteinebene in malignen B-Zellen detektierbar war, kann davon ausgegangen werden, dass B-Zellen des peripheren Bluts eindeutig Tie2-negativ sind. So kann ausgeschlossen werden, dass Ang2 über autokrine Mechanismen die CLL-Zellen beeinflusst.

Da CLL-Zellen sehr stark von ihrer Mikroumgebung abhängig sind und viele Wechselwirkungen mit den Zellen in der Nachbarschaft eingehen, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob CLL-Zellen innerhalb ihres natürlichen Mikromilieus Tie2 aufweisen. Dazu wurden verschiedene Faktoren bei der Kultivierung der CLL-Zellen verändert, um die natürliche Umgebung so weit wie möglich nachzustellen. Zunächst wurden die CLL-Zellen für 24h mit unterschiedlichen Zelllinien kokultiviert und dann mit Hilfe der Durchflusszytometrie erneut auf den Tie2-Rezeptor untersucht. Die zur Kokultivierung verwendeten Zelllinien allein zeigen sich im Durchflusszytometer leicht positiv für Tie2 (siehe Abb. 15). Keine der Kokultivierung führte zu einem positiven Tie2-Signal bei der durchflusszytometrischen Untersuchung. Als nächstes sollte der Einfluss hypoxischer Bedingungen auf den Tie2-Status getestet werden. Dazu wurden die CLL-Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert und nach 24 Stunden durchflusszytometrisch auf Tie2 untersucht. Das Überlagerungsdiagramm der durchflusszytometrischen Untersuchung, sowie die Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensitäten ergaben, dass hypoxische Bedingungen nicht zur Induktion der Expression von Tie2 auf der Oberfläche der Zellen beitragen. In der Literatur dagegen wird von einer gesteigerten Expression von Tie2-mRNS nach 24h Hypoxie berichtet [143]. Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass hier auf Proteinebene nach dem Rezeptor gesucht wurde. Es kann hier sehr sinnvoll sein, den Versuch mit einer längeren Inkubationszeit zu wiederholen, bzw. Tie2-mRNS in den Zellen mit Hilfe der PCR nachzuweisen. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit aufgrund begrenzter Möglichkeiten unter hypoxischen Bedingungen zu arbeiten nicht möglich

diese Versuche auszuweiten.
Keine der hier untersuchten Methoden zur Herstellung einer *in vivo*-ähnlichen Mikroumgebung führte zur Induktion von Tie2 auf CLL-Zellen. Aufgrund dessen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass CLL-Zellen des peripheren Bluts als Zielzelle des Ang2 über den Tie2-Rezeptor vermutlich nicht in Frage kommen.

4.5 Die Tie2-Expression im Mikromilieu der CLL-Zellen

Wie im vorherigen Abschnitt geschlussfolgert, stellen CLL-Zellen des peripheren Bluts aufgrund ihres negativen Tie2-Status vermutlich keine Zielzelle des sezernierten Ang2 dar. Um den potentiellen Wirkort von sezerniertem Ang2 zu identifizieren, wurden verschiedene Zelltypen aus der Mikroumgebung der CLL-Zellen auf Tie2 untersucht. Dazu gehören zum einen andere Zellen aus dem peripheren Blut z.B. die Granulozyten. Eine weitere wichtige Mikroumgebung der CLL-Zellen ist das Knochenmark. Hier wurden die malignen B-Zellen des Knochenmarks selbst, sowie typische Zellen der Knochenmarksumgebung auf Tie2 getestet. Das dritte Mikromilieu, welches eine große Rolle bei der CLL spielt, sind die Lymphknoten. Dazu wurden myeloische DC generiert.
Die durchflusszytometrische Analyse des peripheren Bluts ergab, dass sowohl gesunde Granulozyten, als auch Granulozyten der CLL-Patienten ein positives Signal für Tie2 aufwiesen, wodurch sie potentiell als Zielzelle von sezerniertem Ang2 in Frage kämen. Die bekannte Rolle des Ang/Tie2 Systems bei Granulozyten beruht vor allem auf Induktion der Chemotaxis von Neutrophilen, was eine wichtige Komponente bei Entzündungsprozessen ist [9]. Die Rolle des Ang2/Tie2-Systems bei Entzündungen ist in Abb. 28 gezeigt. Vor allem ist bekannt, dass durch den proinflammatorischen Faktor TNFα und durch die hypoxischen Bedingungen bei einer Entzündungsreaktion Ang2 vermehrt sezerniert wird [75, 88]. So kann es zum Teil Ang1 von Tie2 verdrängen und den Ruhezustand unterbrechen. Da durch die mangelnde intrinsische Aktivität des Ang2 die intrazelluläre Signalkaskade geschwächt wird, wird die Blockade des Transkriptionsfaktors *Forkhead-Box-Protein O1* (FOXO1) aufgehoben. FOXO1 ist ein bekannter Transkriptionsfaktor von Ang2. So wird in der Zelle

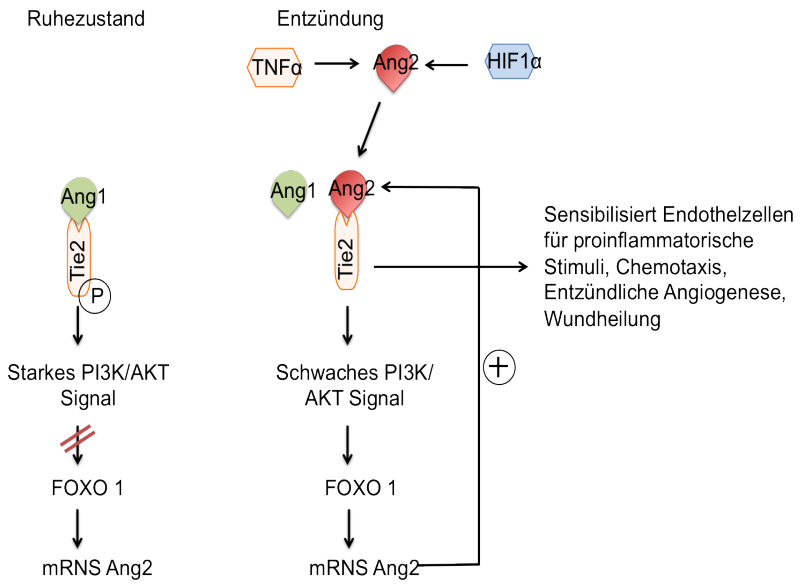

Abbildung 28: Vorkommen und Funktion des Ang2/Tie2-Systems bei Entzündungsreaktionen (PI3K=Phosphoinositid-3-Kinase, AKT=Proteinkinase B, P=phopsphoryliert, FOXO1=Forkhead-Box-Protein O1)

die Expression des *ANG2*-Gens gesteigert. Das von der Zelle freigesetzte Ang2 kann autokrin oder juxtakrin eine positive Rückkopplung geben und so das Signal verstärken. Außerdem führt eine Dephosphorylierung des Tie2-Rezeptors und der damit verbundenen Unterbindung der Signalweiterleitung zu einer erhöhten Empfindsamkeit der Endothelzellen gegenüber proinflammatorischer Faktoren [135]. Darüber hinaus sind die Angiopoietine in engem Zusammenspiel mit Interleukin 8 mit verantwortlich für die Migration der Eosinophilen [9]. In kürzlich veröffentlichen Studien wird allerdings hauptsächlich Ang1 für die Induktion der Chemotaxis verantwortlich gemacht [43]. IL8 ist ein bekannter proangiogenetischer Faktor [133], der auch bei der CLL in erhöhtem Ausmaß gefunden wird [51]. Bei der CLL ist IL8 vor allem für den Schutz vor Apoptose bekannt [91]. Die Abb. 29 verdeutlicht diese Zusammenhänge graphisch. Das Vorkommen von Tie2 auf der Zelloberfläche der Granulozyten ist also bekannt, so dass diese eine potentielles Ziel des durch CLL-Zellen sezerniertem Ang2 darstellen könnten. Um eine genauere Aussage treffen zu können, müsste dieser Zusammenhang in weiteren Versuchen überprüft werden.

Myeloische DC sind Antigen präsentierende Zellen, die in vielen lymphatischen Or-

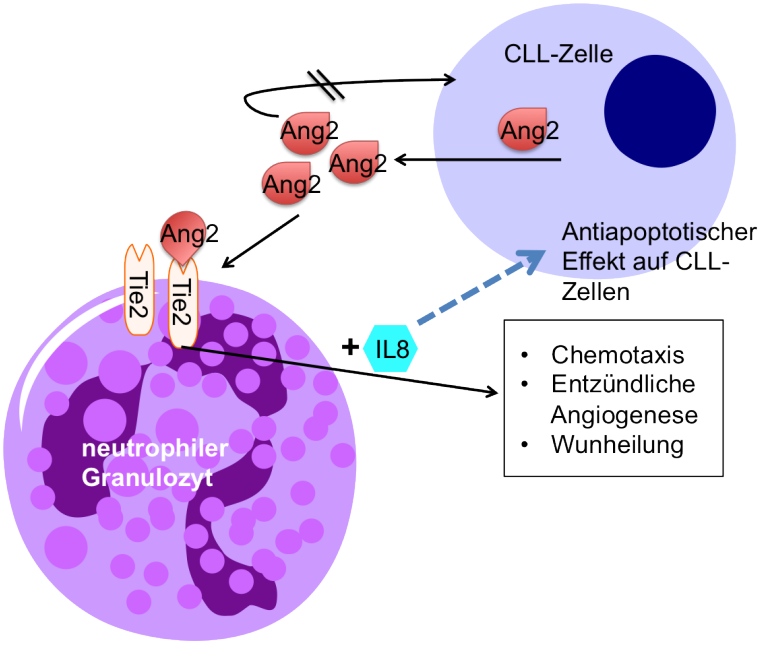

Abbildung 29: Vorkommen und Funktion des Tie2-Rezeptors in der Mikroumgebung der CLL-Zellen im peripheren Blut

ganen vorkommen. Myeloischen DC wurden aus einer gesunden Blutprobe generiert und mit Hilfe der Immunfluoreszenz auf Tie2 untersucht. Die myeloischen DC waren allerdings noch unreif, aber dennoch schienen sie positiv für Tie2 zu sein (siehe Abb. 21). Hier sollten noch weitere Versuche folgen, die auch reife myeloische DC auf Tie2 testet. Da eine gesteigerte Angiogenese in den Lymphknoten bei CLL-Patienten bekannt ist [52], sind hierzu funktionelle Analysen ebenfalls sinnvoll. Darüber hinaus könnten diese als Feeder Zellen für Kokulturen mit CLL-Zellen genutzt werden, da diese primäre Zellen aus der natürlichen Mikroumgebung darstellen, die Tie2 positiv sind.

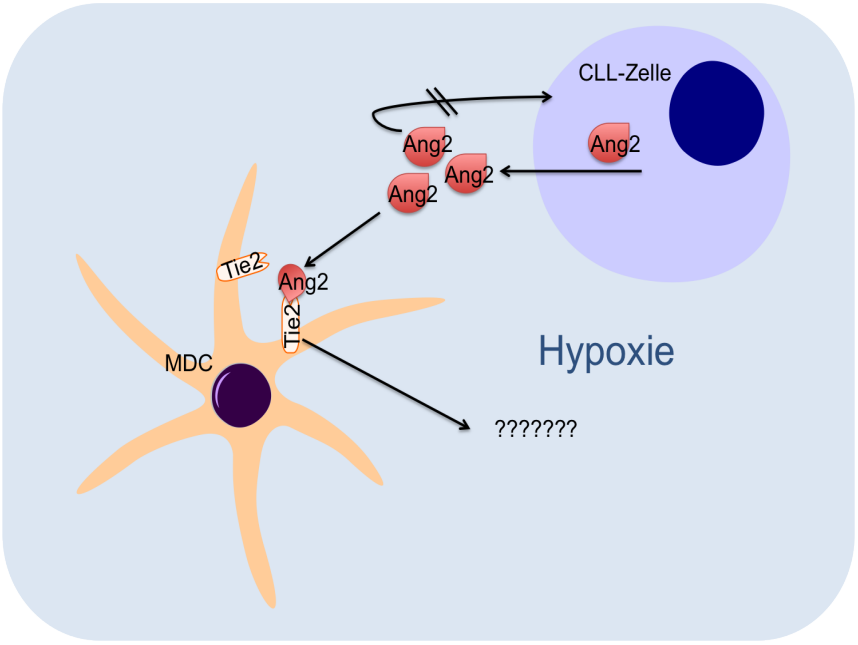

Abbildung 30: Vorkommen und Funktion des Tie2-Rezeptors in der Mikroumgebung der CLL-Zellen im Lymphknoten (MDC=myeloische dentritische Zelle)

Die Abb. 30 zeigt zusammenfassend die Mikroumgebung der CLL-Zellen im Lymphknoten. Neben dem peripheren Blut und den Lymphknoten gibt es eine weitere interessante Mikroumgebung, die bei der CLL eine essentielle Rolle spielt: das Knochenmark. Es gibt viele spezielle Zellen im Knochenmark, die einen erheblichen Einfluss auf die CLL-Zellen aufweisen. Diese heterogene Population formt ein komplexes Netzwerk aus Zellen mit gegenseitigen Wechselwirkungen und hohen Konzentrationen verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Unter besonderem Fokus stehen in diesem Zusammenhang NLC und KMSZ. Diese zwei Zelltypen wurden *in vitro* generiert und anschließend mit verschiedenen Methoden auf Tie2 untersucht.
NLC wurden von zwei verschiedenen Patienten generiert. Sie wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf Tie2 getestet. Anhand der Abb. 22 kann man erkennen, dass dieser Zelltyp kein Tie2-Rezeptor auf der Zelloberfläche aufwies (siehe Abb. 31). In der Mikroumgebung spielen sie zwar eine wichtige Rolle für das Überleben der CLL-Zellen, diese scheint aber unabhängig von Tie2 und Ang2 zu sein. Sie können als Zielzelle des Ang2 ausgeschlossen werden.
Außerdem wurden KMSZ durch Kultivierung von mononukleären Zellen aus dem

Knochenmark von einem CLL Patienten gewonnen und anschließend mit Hilfe der PCR auf Tie2-Expression überprüft. Betrachtet man Abb. 24 so erkennt man eindeutig, dass diese Zellen Tie2 exprimieren. Die Bande war sogar in etwa so intensiv wie die der Positivkontrolle. Auf Proteinebene wurden die KMSZ nicht auf den Tie2-Rezeptor untersucht, so dass hierzu noch Versuche folgen sollten. Die CLL-Zellen

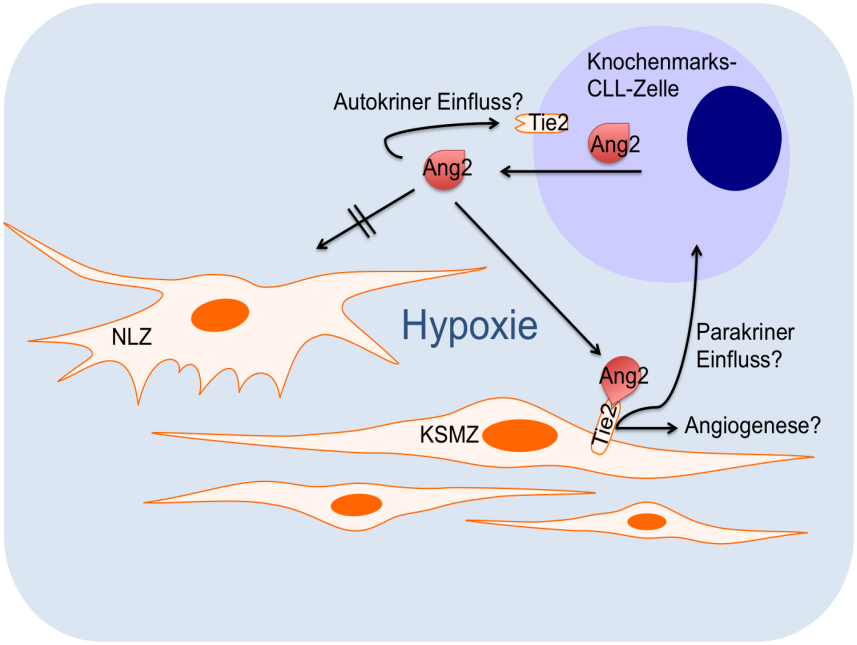

Abbildung 31: Vorkommen und Funktion des Tie2-Rezeptors in der Mikroumgebung der CLL-Zellen im Knochenmark (KMSZ = Knochenmarksstromazellen, NLZ = *Nurse like Zellen*)

aus dem Knochenmark wurden sowohl im Durchflusszytometer auf den Tie2-Rezeptor untersucht, als auch auf mRNS-Ebene mit Hilfe der PCR auf Tie2-Expression getestet. Abb. 24 zeigt dass fast alle Proben (vier von fünf) Tie2 exprimierten. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigten zusätzlich das Vorhandensein des Tie2 -Rezeptors auf der Zelloberfläche der CLL-Zellen des Knochenmarks. Die Mittlere Fluoreszenzintensität war sehr heterogen. Bei drei von vier Proben war die Mittlere Fluoreszenzintensität der malignen B-Zellen Knochenmarks höher als die der peripheren CLL-Zellen (siehe Abb. 23). Bei diesen drei Patienten konnten keine Korrelationen zu Krankheitsparametern, Krankheitsfortschritt oder ähnlichem festgestellt werden. Da es sich aber um eine sehr kleinen Stichprobenumfang handelt, ist

es sinnvoll diese Versuche mit einer größeren Patientenpopulation zu wiederholen. Um den positiven Tie2-Status mit einer zweiten Methode abzusichern, wurden die Zellen zusätzlich per Western Blot auf den Rezeptor untersucht. Die Abb. 25 zeigt jedoch kein Tie2 Protein Signal in den untersuchten CLL-Zellen. HUVEC Proteinlysat fungierte hier als Positivkontrolle und schließt einen methodischen Fehler aus. Die Durchflusszytometrie ist verglichen mit dem Western Blot eine viel empfindlichere Methode und kann somit auch viel kleinere Mengen des Proteins nachweisen. Vermutlich war die Proteinmenge für einen Western Bot zu gering, so dass diese unterhalb der Nachweisgrenze lag. Es gab leider nicht genügend Probenmaterial, um den Versuch mit einem Proteinlysat aus einer größeren Menge an Zellen zu wiederholen.
Die Expression von Tie2 im Knochenmark von CLL-Zellen wurde in dieser Arbeit erstmals beschrieben. Eine erhöhte Knochenmarksangiogenese, einhergehend mit vermehrter Expression der proangiognetischen Faktoren VEGF und Ang2 wird, wie bereits erwähnt, mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und einer grundsätzlich schlechteren Prognose beschrieben [76]. Die Beschreibung der Präsenz von Tie2 auf Knochenmark-lokalisierten malignen B-Zellen in der CLL könnte entscheidend zur Aufklärung der funktionellen Hintergründe angiogenese-assoziierter Faktoren bei der Pathophysiologie der CLL beitragen.

4.6 Aktivierung Angiogenese unabhängiger Signalwege durch Ang2

Neben der Suche nach dem Tie2-Rezeptor auf Zellen des Mikromilieus der malignen B-Lymphozyten, ist es notwendig zu überprüfen, ob Ang2 in der Lage ist, über andere Signaltransduktionswege die Zelle zu beeinflusst. Es wurde mit Hilfe eines Tyrosinkinase-Phosphorylierungsarrays untersucht, ob Ang2 neben Tie2 möglicherweise zur Phosphorylierung andere Tyrosinkinasen beiträgt. Die einzelnen Banden sind in Abb. **??** zu erkennen. Die aus den Intensitäten errechneten Werte sind in den Abb. **??** und Abb. 26 dargestellt. Dabei führte die Stimulation mit Ang2 zu einer besonders starken Phosphorylierung des *Epidermal growth factor receptor* (EGFR). Über diesen ist in Bezug auf die CLL noch nichts bekannt. Weitere Rezeptoren, die

eine starke Phosphorylierung aufwiesen, sind der Insulin-Rezeptor, Die *B-lymphocyte kinase* BLK und der *Tyrosine-protein kinase receptor* Dtk. Der Insulin-Rezeptor ist schon in das Interesse der CLL Forschung gerückt. So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer 11q-Deletion eine erhöhte Expression des Insulin-Rezeptors aufweisen. Dies wurde darüber hinaus wurde mit einer schlechteren klinischen Prognose in Zusammenhang gebracht [118, 11]. Ob Ang2 in irgendeiner Weise an diesen Vorgängen beteiligt ist, ist bisher nicht bekannt.

BLK gehört zur src-Familie und ist ein nicht-membranständiger Rezeptor der direkt den B-Zell Rezeptor (BCR) bindet. BLK trägt zur Signalweiterleitung nach BCR-Aktivierung in B-Zellen, speziell beim Übergang vom Pro- zum Prä-B-Zellstadium, bei [1, 8, 14]. BLK wurde auch mit BCR-assoziierter Induktion von Apoptose in Verbindung gebracht [26]. Die Stimulationsfähigkeit des BCR und die Signalweiterleitungskapazität sind entscheidende Faktoren in der Pathogenese der CLL und sind stark assoziiert mit negativen Prognosefaktoren, wie ZAP70 oder einem unmutierten IgVH-Status [126]. Eine durch Ang2 stimulierte Aktivierung von BLK könnte demnach zu einer verstärkten BCR-induzierten Signalweiterleitung führen und zu einem beschleunigten Krankheitsverlauf oder Entwicklung von Therapieresistenzen beitragen. Die Phosphorylierung von Dtk, auch als SKY oder Tyro3 bekannt, ist ein membranständiger Tyrosinkinase Rezeptor, welcher an physiologischen Prozessen wie Zellüberleben, Migration und Differenzierung beteiligt ist. Dtk führt zur Aktivierung von Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und verstärkt Proteinkinase B(AKT)-vermitteltes Zellüberleben, Signaltransduktionswege, die einen entscheidenden Einfluss auf die Biologie der CLL-Zellen besitzen [10]. Ang2 könnte somit auch über die Aktivierung von Dtk einen funktionellen Einfluss auf die Pathogenese der CLL haben.

Da dieser Versuch und die Auswertung ausschließlich auf der optischen Intensität der Banden beruhen, sollten die hier erzielten Ergebnisse als erste Orientierung angesehen werden und bedürfen weiterer Untersuchungen. Alle drei nach Ang2-Stimulierung am stärksten phosphorylierten Tyrosinkinasen, Insulin-Rezeptor, Blk und Dtk, besitzen B-Zell und CLL-Zell relevante Funktionen, was weitere Untersuchungen eines möglichen funktionellen Aspekts der erhöhten Ang2-Level in CLL-Pati-

enten über Aktivierung dieser Tyrosinkinasen rechtfertigt.

4.7 Aussicht

Der proangiogenetische Faktor Ang2 ist bei CLL-Patienten im Plasma im Vergleich zu gesunden Kontrollen in signifikant höheren Leveln vorhanden. In dieser Arbeit konnten diese Erkenntnisse bestätigt und erweitert werden. Als ein stimulierender Faktor der Ang2-Sekretion bei der CLL ist die Hypoxie identifiziert worden. Es konnte eine Steigerung der Ang2-Sekretion durch periphere CLL-Zellen unter hypoxischen Bedingungen gezeigt werden. Ergänzend dazu wäre ein Vergleich mit gesunden PBMC bzw. B-Zellen interessant.
Einige Zellen aus der Mikroumgebung der CLL-Zellen konnten als Stimulus für die Ang2-Sekretion ausgeschlossen werden. Es konnte in der vorliegenden Arbeit keine Erklärung für den nicht vorhandenen additiven Effekt bei der Ang2-Sekretion in der Kokultur von CLL-Zellen mit verschiedenen Zelllinien gefunden werden. Hier könnten weitere Versuche folgen, um eine eventuelle gegenseitige Einflussnahme zeigen zu können.
Die Versuche mit externen Stimulanzien die Ang2-Sekretion zu steigern kann mit anderen Stimulanzien ergänzt werden. Dazu kommen z.B. TNFα und IL8 in Frage. TNFα ist im Allgemeinen als Stimulus für Ang2 bekannt, es gibt aber noch keine Erkenntnisse in Bezug auf die CLL. IL8 ist ein Entzündungsmediator, der bei der CLL hochreguliert ist. Außerdem ist Ang1 dafür bekannt die IL8-Synthese anzuregen. In Bezug auf die CLL gibt es noch keine Daten, die einen Zusammenhang sowohl mit Ang1, als auch mit Ang2 beschreiben.
Die, durch Kokultivierung der CLL-Zellen mit verschiednen Zellen des natürlichen Mikromilieus, erreichte Verbesserung des Überlebens konnte in dieser Arbeit nicht mit Ang2 in Verbindung gebracht werden. Um einen generellen Einfluss von Ang2 auf das Überleben der CLL-Zellen zu untersuchen, könnten Versuche in Mono- und Kokultur mit rekombinantem Ang2 durchgeführt werden.
Ein weiteres Forschungsthema für die Zukunft ist die Fokussierung auf den Tie2-Rezeptor bei der CLL. Dieser konnte bei einigen Zellen in der Mikroumgebung der

CLL-Zellen nachgeweisen werden. Da die CLL-Zellen des Knochenmarks positiv auf Tie2 getestet wurden, sollte erneut versucht werden die peripheren CLL-Zellen hypoxisch zur Expression dieses Rezeptors zu stimulieren. Der hier gewählte Zeitraum von 24h war sehr kurz, so dass ein Effekt nach einem längerem Aussetzen der Zellen von Sauerstoffmangel überprüft werden sollte. Die Ursache, warum die malignen B-Zellen im Knochenmark im Gegensatz zu den peripheren CLL-Zellen Tie2 exprimieren, sollte ebenfalls im Interesse bleiben. Ein weiterer Zusammenhang der genauer untersucht werden sollte, ist die erhöhte Angiogenese im Knochenmark, bzw. in den Lymphknoten und die erhöhte Konzentration von Ang2 im Plasma mit fortschreitender Erkrankung. Liegt dort ein Zusammenhang vor, so kann sich eine neue Möglichkeit bieten, die CLL zu behandeln. Spielt die Angiogenese im Verlauf der Erkrankung eine wichtige und essentielle Rolle, so kann sie wie bei soliden Tumoren schon üblich, als Target für Arzneistoffe genutzt werden. Daher sollten *in vitro* verschiedene Angiogenesehemmstoffe und ihre Wirkung auf das Knochenmark bzw. die Lymphknoten getestet werden. Darüber hinaus wäre es interessant herauszufinden, ob die Tumorlast sinkt, wenn man die Angiogenese im Knochenmark blockiert. Außerdem könnten weitere Versuche folgen, um die Tie2-unabhängige Rolle des Ang2 vertiefend zu erforschen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Ang2 und dem Insulin-Rezeptor ist zu untersuchen. In Bezug auf den BLK-Rezeptor ist es interessant, einen Zusammenhang zwischen Aktivierung dieses Rezeptors durch Ang2 und einem schlechteren Krankheitsverlauf bzw. dem Auftreten von Therapieresistenzen zu untersuchen. Auch die Aktivierung der Tyrosinkinase Dtk und ein damit verbundener Einfluss auf das Überleben der Zellen sollte genauer überprüft werden.

5 Zusammenfassung

Die über das Ang/Tie2-System gesteuerte Angiogenese hat eine wichtige Bedeutung bei vielen soliden Tumorerkrankungen. Auch bei verschiedenen leukämischen Erkrankungen ist die Bedeutung von Ang2/Tie2 ins Interesse der Forschung gerückt. Diese Arbeit analysiert umfassend eine mögliche Bedeutung des Ang2/Tie2-Systems bei der CLL. Dabei wurde vor allem ein Schwerpunkt auf die Rolle der An2/Tie2-Achse in Bezug auf die Interaktionen von malignen B-Lymphozyten mit ihrer Mikroumgebung gelegt. Es ist bekannt, dass Ang2 bei der CLL in erhöhten Konzentrationen im Plasma gefunden wird. Eine hohe Konzentration von Ang2 im Plasma wird mit einem schlechteren Krankheitsverlauf assoziiert. Ergänzend dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass CLL-Zellen *in vitro* Ang2 stärker sezernieren als gesunde PBMC. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass zwar periphere CLL-Zellen, nicht aber CLL-Zellen im Knochenmark Ang2 exprimieren. Dieses Ergebnis zeigt deutlich den erheblichen Einfluss der Mikroumgebung auf die CLL-Zellen. Außerdem wurden verschiedene Faktoren der Mikroumgebung auf ihren Einfluss auf die Ang2-Sekretion getestet. Dabei hat sich gezeigt, dass durch die Kokultivierung mit verschiedenen in der natürlichen Mikroumgebung der CLL-Zellen vorkommenden Zellen keinen Einfluss auf die Ang2-Sekretion zu erreichen ist. Ebenso zeigte die Zugabe von IL4 und/oder CD40-Ligand keinen Einfluss auf die Ang2-Konzentration im Überstand von CLL-Zellen nach 24 Stunden. Der Entzug von Sauerstoff dagegen bewirkte *in vitro* eine Steigerung der Ang2-Sekretion durch periphere maligne B-Zellen. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die durch Kokultivierung mit verschiedenen im natürlichen Mikromilieu der CLL- Zellen vorkommenden Zelltypen erzielte Verbesserung des Gesamtüberlebens unabhängig von Ang2 ist. Da die CLL-Zellen Tie2-negativ waren und mit keiner Stimulation (Kokultivierung, Hypoxie, CD40-Ligand und IL4) eine Änderung diesbezüglich zu erreichen war, wurden Zellen der natürlichen Mikroumgebung auf Tie2 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass myeloische DC, Knochenmarksstromazellen (KMSZ) und Granulozyten Tie2-positiv sind. Auch bei CLL-Zellen aus dem Knochenmark konnte eine Tie2-Expression nachgewiesen werden. Durch den Nachweis des Tie2-Rezeptors in der Mikroumgebung konnte ein wichtiger Teil des

funktionellen Aspekts von Ang2 aufgeklärt werden. Um neben Tie2 mögliche andere Angriffspunkte für Ang2 zu zeigen, wurde ein Phophorylierungsassay durchgeführt. Dieses zeigte erste Hinweise auf eine mögliche Interaktion mit den Tyrosinkinasen EGFR, BLK und Dtk, über die Ang2 einen Einfluss auf die CLL nehmen könnte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Ang2/Tie2-System bei der CLL eine wichtige Rolle in Bezug auf die Pathogenese spielt und deshalb zukünftig auch als therapeutischer Angriffspunkt für Angiogenesehemmstoffe getestet werden sollte.

6 Literaturverzeichnis

[1] Y Aoki, J Kurt, and B J Cherayil. Tyrosine phosphorylation of Blk and Fyn Src homology 2 domain- binding proteins occurs in response to antigen-receptor ligation in B cells and constitutively in pre-B cells. *Immunology*, 91(May):4204–4208, 1994.

[2] F Arai, A Hirao, M Ohmura, H Sato, S Matsuoka, K Takubo, K Ito, G Y Koh, and T Suda. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118(2):149–61, July 2004.

[3] V Audrito, T Vaisitti, S Serra, C Bologna, D Brusa, F Malavasi, and S Deaglio. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia offers novel therapeutic options. *Cancer letters*, 328(1):27–35, January 2013.

[4] F Bhayat, E Das-Gupta, C Smith, T McKeever, and R Hubbard. The incidence of and mortality from leukaemias in the UK: a general population-based study. *BMC cancer*, 9:252, January 2009.

[5] J L Binet, A Auquier, G Dighiero, C Chastang, H Piguet, J Goasguen, G Vaugier, P Porton, F Colona, F Oberling, M Thomas, G Tchernia, C Jacquillat, P Boivin, C Lesty, M T Duault, M Monconduit, S Belabbes, and F Gremy. A new procnostic classification of chornic lymphocytic leukemia derived from a multivariate analysis. *Cancer*, 285:198–204, 1981.

[6] J-L Binet, F Caligaris-Cappio, D Catovsky, B Cheson, T Davis, G Dighiero, H Döhner, M Hallek, P Hillmen, M Keating, E Montserrat, T Kipps, and K Rai. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 107(3):859–61, February 2006.

[7] D R Boggs, SA Soffermann, M M Wintrobe, and G E Cartwright. Facors influencing the duration of Patients with Chronic lymphocytic leukemia. *Amer J Med*, 40:243–254, 1965.

[8] R S Boyd, P J Adam, S Patel, J a Loader, J Berry, N T Redpath, H R Poyser, G C Fletcher, N a Burgess, a C Stamps, L Hudson, P Smith, M Griffiths, T G Willis, E L Karran, D G Oscier, D Catovsky, J a Terrett, and M J S

Dyer. Proteomic analysis of the cell-surface membrane in chronic lymphocytic leukemia: identification of two novel proteins, BCNP1 and MIG2B. *Leukemia*, 17(8):1605–12, August 2003.

[9] A Brkovic, M Pelletier, D Girard, and M G Sirois. Angiopoietin chemotactic activities on neutrophils are regulated by PI-3K activation. *Journal of leukocyte biology*, 81(4):1093–101, April 2007.

[10] J E Brown, M Krodel, M Pazos, C Lai, and A L Prieto. Cross-phosphorylation, signaling and proliferative functions of the Tyro3 and Axl receptors in Rat2 cells. *PloS one*, 7(5):e36800, January 2012.

[11] JR Brown. Insulin receptor activation in deletion 11q chronic lymphocytic leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(9):2605–7, May 2011.

[12] J A Burger. Angiopoietin-2 in CLL. *Blood*, 116(4):508–9, July 2010.

[13] J A Burger and T J Kipps. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia & lymphoma*, 43(3):461–6, March 2002.

[14] L Burkhardt, M Brunswick, J B Bolen, and J J Mond. Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates src-related protein-tyrosine kinases. *Immunology*, 88(16):7410–4, August 1991.

[15] J C Byrd, K Rai, B L Peterson, F R Appelbaum, V A Morrison, J E Kolitz, L Shepherd, J D Hines, C A Schiffer, and R A Larson. Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011. *Blood*, 105(1):49–53, January 2005.

[16] J C Byrd, S Stilgenbauer, and I W Flinn. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, (Cll):163–83, January 2004.

[17] F Caligaris-Cappio and P Ghia. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(27):4497–503, September 2008.

[18] E Campo, S H Swerdlow, N L Harris, S Pileri, H Stein, and E S Jaffe. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117(19):5019–32, May 2011.

[19] E T Chang, K Ekström Smedby, H Hjalgrim, A Porwit-MacDonald, G Roos, B Glimelius, and H-O Adami. Family history of hematopoietic malignancy and risk of lymphoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(19):1466–74, October 2005.

[20] L Chen, G Widhopf, L Huynh, L Rassenti, K R Rai, A Weiss, and T J Kipps. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100(13):4609–14, December 2002.

[21] B D Cheson, J M Bennett, M Grever, N Kay, M J Keating, S O'Brien, and K R Rai. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, 87(12):4990–7, June 1996.

[22] N Chiorazzi, K R Rai, and M Ferrarini. Chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 352(8):804–15, February 2005.

[23] P Cimino, DW Bahler, and EJ Duncavage. Detection of Merkel Cell Polyomavirus in Chronic Lymphocytic Leukemia T-cells. *Experimental and Molecular ...*, 30, 2012.

[24] E A Clark, G L Shu, B Luscher, K E Draves, J Banchereau, J A Ledbetter, and M A Valentine. Comparison of the Signal Transduced by IL-4 to Four Different Competence. *The Journal of Immunology*, 143(12):3873–3880, 1989.

[25] S B Coffelt, Y-Y Chen, M Muthana, A F Welford, A O Tal, A Scholz, K H Plate, Y Reiss, C Murdoch, M De Palma, and C E Lewis. Angiopoietin 2 stimulates TIE2-expressing monocytes to suppress T cell activation and to

promote regulatory T cell expansion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(7):4183–90, April 2011.

[26] L Coultas, P Bouillet, E G Stanley, T C Brodnicki, J M Adams, and A Strasser. Proapoptotic BH3-Only Bcl-2 Family Member Bik / Blk / Nbk Is Expressed in Hemopoietic and Endothelial Cells but Is Redundant for Their Programmed Death. *Molecular and cellular biology*, 24(4):1570–1581, 2004.

[27] M Crespo, F Bosch, N Villamor, B Bellosillo, D Colomer, M Rozman, S Marcé, A López-Guillermo, E Campo, and E Montserrat. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 348(18):1764–75, May 2003.

[28] M J Currie, S P Gunningham, K Turner, C Han, P E Scott, B Robinson, W Chong, A L Harris, and S B Fox. Expression of the angiopoietins and their receptor Tie2 in human renal clear cell carcinomas; regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia. *The Journal of pathology*, 198(4):502–10, December 2002.

[29] W Dameshek. Chronic lymphocytic leukemia–an accumulative disease of immunologically incometent lymphocytes. *Blood*, 29:566–584, 1967.

[30] Rajendra N Damle, Tarun Wasil, Franco Fais, Fabio Ghiotto, Angelo Valetto, Steven L Allen, Daniel Budman, Klaus Dittmar, Jonathan Kolitz, Stuart M Lichtman, Philip Schulman, Vincent P Vinciguerra, Kanti R Rai, Manlio Ferrarini, N Chiorazzi, B Rajendra, N Da, G Fabio, A Valetto, A Buchbinder, D Bud, K Dittm, S M Lichtm, P Schulm, and M Ferrarini. Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia : Presented in part at the 40th Annual Meeting of The American Society of Hematology, held in Miami Beach, FL, December 4-8, 1998. *Blood*, 94:1840–1847, 1999.

[31] M Dancescu, M Rubio-Trujillo, G Biron, D Bron, G Delespesse, and M Sarfati. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death

by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *The Journal of experimental medicine*, 176(5):1319–26, November 1992.

[32] B Dankbar, T Padro, R Leo, B Feldmann, M Kropff, R M Mesters, W E Berdel, J Kienast, and H Serve. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood*, 95(8):2630–2636, 2000.

[33] S Davis, T H Aldrich, P F Jones, a Acheson, D L Compton, V Jain, T E Ryan, J Bruno, C Radziejewski, P C Maisonpierre, and G D Yancopoulos. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, 87(7):1161–9, December 1996.

[34] W Digel, M Stefanic, W Schöniger, C Buck, a Raghavachar, N Frickhofen, H Heimpel, and F Porzsolt. Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 73(5):1242–6, April 1989.

[35] W Ding, T R Knox, R C Tschumper, W Wu, S M Schwager, J C Boysen, D F Jelinek, and N E Kay. Platelet-derived growth factor (PDGF)-PDGF receptor interaction activates bone marrow-derived mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch. *Blood*, 116(16):2984–93, October 2010.

[36] H Döhner, K Fischer, M Bentz, K Hansen, a Benner, G Cabot, D Diehl, R Schlenk, J Coy, and S Stilgenbauer. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*, 85(6):1580–9, March 1995.

[37] H Döhner, S Stilgenbauer, a Benner, E Leupolt, a Kröber, L Bullinger, K Döhner, M Bentz, and P Lichter. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 343(26):1910–6, December 2000.

[38] H Döhner, S Stilgenbauer, K Döhner, M Bentz, and P Lichter. Chromoso-

me aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 77(2):266–81, March 1999.

[39] R S Douglas, R J Capocasale, R J Lamb, P C Nowell, J S Moore, and B R S Douglas. Effects of Transforming Growth Factor- b. *blood*, 89:941–947, 1997.

[40] P Dreger, H Döhner, M Ritgen, S Böttcher, R Busch, S Dietrich, D Bunjes, S Cohen, J Schubert, U Hegenbart, D Beelen, M Zeis, M Stadler, J Hasenkamp, L Uharek, C Scheid, A Humpe, T Zenz, D Winkler, M Hallek, M Kneba, N Schmitz, and S Stilgenbauer. Allogeneic stem cell transplantation provides durable disease control in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: long-term clinical and MRD results of the German CLL Study Group CLL3X trial. *Blood*, 116(14):2438–47, October 2010.

[41] Peter Dreger, Hartmut Döhner, Fabienne McClanahan, Raymonde Busch, M Ritgen, H Greinix, A-M Fink, W Knauf, M Stadler, M Pfreundschuh, U Dührsen, G Brittinger, M Hensel, J Schetelig, D Winkler, A Bühler, M Kneba, N Schmitz, M Hallek, and S Stilgenbauer. Early autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: long-term follow-up of the German CLL Study Group CLL3 trial. *Blood*, 119(21):4851–9, May 2012.

[42] J Du. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, 16:30–35, 2002.

[43] E Dumas, C Martel, P-E Neagoe, A Bonnefoy, and M G Sirois. Angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 promotes neutrophil viability: Role of interleukin-8 and platelet-activating factor. *Biochimica et biophysica acta*, 1823(2):358–67, February 2012.

[44] D J Dumont, G Gradwohl, G H Fong, M C Puri, M Gertsenstein, a Auerbach, and M L Breitman. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes & Development*, 8(16):1897–1909, August 1994.

[45] B F Eichhorst, R Busch, G Hopfinger, R Pasold, M Hensel, C Steinbrecher,

S Siehl, U Ja, M Bergmann, S Stilgenbauer, C Schweighofer, C M Wendtner, and H Do. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 107(3):885–891, 2006.

[46] L Eklund and B R Olsen. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Experimental cell research*, 312(5):630–41, March 2006.

[47] K Ekström Smedby, H Hjalgrim, M Melbye, A Torrang, K Rostgaard, L Munksgaard, J Adami, M Hansen, A Porwit-MacDonald, B A Jensen, G Roos, B B Pedersen, C Sundström, B Glimelius, and H-O Adami. Ultraviolet radiation exposure and risk of malignant lymphomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(3):199–209, February 2005.

[48] M. Engelhard, G. Brittinger, R. Heinz, H. Theml, H. Bartels, T. Binder, H. H. Fülle, H. Gerhartz, U. Gunzer, F. Ludwig, W. D. Ludwig, L. Nowicki, J. Oertel, H. W. Pees, H. Pralle, U. Rühl, Ch. Schilling, W. Spann, U. Szeimies, H. J. Wetzel, T. Zwingers, a. C. Feller, H. Stein, and K. Lennert. Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL) and Immunocytoma (LP-IC): Clinical and Prognostic Relevance of this Distinction. *Leukemia and Lymphoma*, 5:161–173, 1991.

[49] K Fischer, P Cramer, R Busch, S Böttcher, J Bahlo, J Schubert, K H Pflüger, S Schott, V Goede, S Isfort, J von Tresckow, A-M Fink, A Bühler, D Winkler, K-A Kreuzer, P Staib, M Ritgen, M Kneba, H Döhner, B F Eichhorst, M Hallek, S Stilgenbauer, and C-M Wendtner. Bendamustine in Combination With Rituximab for Previously Untreated Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia: A Multicenter Phase II Trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(26):3209–16, September 2012.

[50] J Folkman. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *New England Journal of Medicine*, 285:1182–1186, 1971.

[51] P Francia di Celle, S Mariani, L Riera, a Stacchini, G Reato, and R Foa.

Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. *Blood*, 87(10):4382–9, May 1996.

[52] J L Frater, N E Kay, C L Goolsby, S E Crawford, G W Dewald, and L C Peterson. Dysregulated angiogenesis in B-chronic lymphocytic leukemia: morphologic, immunohistochemical, and flow cytometric evidence. *Diagnostic pathology*, 3:16, January 2008.

[53] I Gehrke, R K Gandhirajan, S J Poll-Wolbeck, M Hallek, and K-A Kreuzer. Bone marrow stromal cell-derived vascular endothelial growth factor (VEGF) rather than chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell-derived VEGF is essential for the apoptotic resistance of cultured CLL cells. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 17(7-8):619–27, January 2011.

[54] K Giannopoulos, a Dmoszynska, M Kowal, E Wasik-Szczepanek, a Bojarska-Junak, J Rolinski, H Döhner, S Stilgenbauer, and L Bullinger. Thalidomide exerts distinct molecular antileukemic effects and combined thalidomide/fludarabine therapy is clinically effective in high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 23(10):1771–8, October 2009.

[55] L Ginaldi, M de Martinis, and E Matutes. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *Journal of clinical pathology*, 51:364–369, 1998.

[56] M Grdisa. Influence of CD40 ligation on survival and apoptosis of B-CLL cells in vitro. *Leukemia Research*, 27(10):951–956, October 2003.

[57] J D Hainsworth, S Litchy, J H Barton, G A Houston, R C Hermann, J E Bradof, and F A Greco. Single-agent rituximab as first-line and maintenance treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(9):1746–51, May 2003.

[58] M Hallek. Chronic lymphocytic leukemia (CLL): first-line treatment. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, (Cll):285–91, January 2005.

[59] M Hallek, M Bergmann, and B Emmerich. Chronic lymphocytic leukaemia: up-dated recommendations on diagnosis and treatment. *Onkologie*, 27(1):97–104, February 2004.

[60] M Hallek, B D Cheson, D Catovsky, F Caligaris-Cappio, G Dighiero, H Döhner, P Hillmen, M J Keating, E Montserrat, K R Rai, and T J Kipps. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111(12):5446–56, June 2008.

[61] M Hallek, K Fischer, G Fingerle-Rowson, a M Fink, R Busch, J Mayer, M Hensel, G Hopfinger, G Hess, U von Grünhagen, M Bergmann, J Catalano, P L Zinzani, F Caligaris-Cappio, J F Seymour, a Berrebi, U Jäger, B Cazin, M Trneny, a Westermann, C M Wendtner, B F Eichhorst, P Staib, a Bühler, D Winkler, T Zenz, S Böttcher, M Ritgen, M Mendila, M Kneba, H Döhner, and S Stilgenbauer. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 376(9747):1164–74, October 2010.

[62] M Hallek, I Langenmayer, C Nerl, W Knauf, H Dietzfelbinger, D Adorf, M Ostwald, R Busch, I Kuhn-Hallek, E Thiel, and B Emmerich. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 93(5):1732–7, March 1999.

[63] M Hallek, L Wanders, M Ostwald, R Busch, R Senekowitsch, S Stern, H D Schick, I Kuhn-Hallek, and B Emmerich. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival

in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leukemia & lymphoma*, 22(5-6):439–47, August 1996.

[64] T J Hamblin, J A Orchard, A Gardiner, D G Oscier, Z Davis, and F K Stevenson. Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL To the editor :. *blood*, 95(7):2455–2457, 2000.

[65] E Hamilton, L Pearce, L Morgan, S Robinson, V Ware, P Brennan, N S B Thomas, D Yallop, S Devereux, C Fegan, A G S Buggins, and C Pepper. Mimicking the tumour microenvironment: three different co-culture systems induce a similar phenotype but distinct proliferative signals in primary chronic lymphocytic leukaemia cells. *British journal of haematology*, 158(5):589–99, September 2012.

[66] H Hatanaka, Y Abe, M Naruke, and T Tokunaga. Significant Correlation between Interleukin 10 Expression and Vascularization through Angiopoietin / TIE2 Networks in Non-small Cell Lung Cancer Significant Correlation between Interleukin 10 Expression and Vascularization through Angiopoietin / TIE2 Netw. *Clinical Cancer Research*, 7:1287–1292, 2001.

[67] J. Holash. Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF. *Science*, 284(5422):1994–1998, June 1999.

[68] B Hu and S-Y Cheng. NIH Public Access. *Curr Oncol Rep*, 11(2):111–116, 2009.

[69] Y Imanishi, B Hu, G Xiao, X Yao, and S-Y Cheng. Angiopoietin-2, an angiogenic regulator, promotes initial growth and survival of breast cancer metastases to the lung through the integrin-linked kinase (ILK)-AKT-B cell lymphoma 2 (Bcl-2) pathway. *The Journal of biological chemistry*, 286(33):29249–60, August 2011.

[70] A Iwama, I Hamaguchi, M Hashiyama, Y Murayama, K Yasunaga, and T Sudal. Molecular cloning and characterization of mouse Tie and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 195(1):301–309, 1993.

[71] S Joshi, R Khan, M Sharma, L Kumar, and A Sharma. Angiopoietin-2: a potential novel diagnostic marker in multiple myeloma. *Clinical biochemistry*, 44(8-9):590–5, June 2011.

[72] G Juliusson, G David, M D Oscier, M Fitchett, F M Ross, G Stockdill, M J Mackie, A C Parker, G L Castoldi, A Cuneo, S Knuutila, E Elonen, and G Gahrton. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytc leukemia defined by spicific chromosomal abnormalities. *The New England journal of medicine*, 323(11):720–724, 1990.

[73] A S Kamiguti, E S Lee, K J Till, R J Harris, M A Glenn, K Lin, H J Chen, M Zuzel, and J C Cawley. The role of matrix metalloproteinase 9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*, 125(2):128–40, April 2004.

[74] M J Keating, S O'Brien, M Albitar, S Lerner, W Plunkett, F Giles, M Andreeff, J Cortes, S Faderl, D Thomas, C Koller, W Wierda, M A Detry, A Lynn, and H Kantarjian. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(18):4079–88, July 2005.

[75] I Kim, J H Kim, Y S Ryu, M Liu, and G Y Koh. Tumor necrosis factor-alpha upregulates angiopoietin-2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 269(2):361–5, March 2000.

[76] A R Kini, N E Kay, and L C Peterson. Increased bone marrow angiogenesis in b cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia (08876924)*, 14(8):1414, 2000.

[77] W U Knauf, I Langenmayer, B Ehlers, B Mohr, D Adorf, C H Nerl, M Hallek, T H Zwingers, B Emmerich, and E Thiel. Serum levels of soluble CD23, but not soluble CD25, predict disease progression in early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 27(5-6):523–32, November 1997.

[78] W U Knauf, T Lissitchkov, A Aldaoud, A M Liberati, J Loscertales, R Herbrecht, G Juliusson, G Postner, L Gercheva, S Goranov, M Becker, H-J Fricke, F Huguet, I Del Giudice, P Klein, K Merkle, and M Montillo. Bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia: updated results of a randomized phase III trial. *British journal of haematology*, 159(1):67–77, October 2012.

[79] K Koga, T Todaka, M Morioka, J Hamada, Y Kai, S Yano, a Okamura, N Takakura, T Suda, and Y Ushio. Expression of angiopoietin-2 in human glioma cells and its role for angiogenesis. *Cancer research*, 61(16):6248–54, August 2001.

[80] A Korycka-Wolowiec and T Robak. Pharmacokinetic evaluation and therapeutic activity of bendamustine in B-cell lymphoid malignancies. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 8(11):1455–68, November 2012.

[81] J S Lee, D O Dixon, H M Kantarjian, M J Keating, and M Talpaz. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood*, 69(3):929–36, March 1987.

[82] T Letilovic, R Vrhovac, S Verstovsek, B Jaksic, and A Ferrajoli. Role of angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 107(5):925–34, September 2006.

[83] G Lozanski, N A Heerema, I W Flinn, L Smith, J Harbison, J Webb, M Moran, M Lucas, T Lin, M L Hackbarth, J H Proffitt, D Lucas, M R Grever, and J C Byrd. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood*, 103(9):3278–81, May 2004.

[84] K Lu and X Wang. Therapeutic advancement of chronic lymphocytic leukemia. *Journal of hematology & oncology*, 5:55, January 2012.

[85] R Maffei, S Martinelli, I Castelli, R Santachiara, P Zucchini, M Fontana, S Fiorcari, G Bonacorsi, F Ilariucci, G Torelli, and R Marasca. Increased angiogenesis induced by chronic lymphocytic leukemia B cells is mediated by

leukemia-derived Ang2 and VEGF. *Leukemia research*, 34(3):312–21, March 2010.

[86] R Maffei, S Martinelli, R Santachiara, D Rossi, C Guarnotta, E Sozzi, A Zucchetto, G M Rigolin, S Fiorcari, I Castelli, M Fontana, V Coluccio, G Leonardi, P Zucchini, C Tripodo, A Cuneo, V Gattei, G Del Poeta, F Forconi, G Gaidano, G Torelli, and R Marasca. Angiopoietin-2 plasma dosage predicts time to first treatment and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 116(4):584–92, July 2010.

[87] D G Maloney, A J Grillo-lópez, C A White, D Bodkin, R J Schilder, A Neidhart, N Janakiraman, K A Foon, T M Liles, B K Dallaire, K Wey, T Davis, R Levy, B D G Maloney, A J Grillo-lo, J A Neidhart, and I Royston. IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*, 90(6):2188–2195, 1997.

[88] S. J. Mandriota and M. S. Pepper. Regulation of Angiopoietin-2 mRNA Levels in Bovine Microvascular Endothelial Cells by Cytokines and Hypoxia. *Circulation Research*, 83(8):852–859, October 1998.

[89] V Martin, D Liu, J Fueyo, and C Gomez-Manzano. Tie2: a journey from normal angiogenesis to cancer and beyond. *Histology and histopathology*, 23(6):773–80, June 2008.

[90] F R Mauro, R Foa, D Giannarelli, I Cordone, S Crescenzi, E Pescarmona, R Sala, R Cerretti, and F Mandelli. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood*, 94(2):448–54, July 1999.

[91] G Meinhardt, C M Wendtner, and M Hallek. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 77(2):282–93, February 1999.

[92] S Molica. Angiogenesis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: methods of

study, clinical significance and prognostic implications. *Leukemia & lymphoma*, 42(4):603–7, August 2001.

[93] E Montserrat, F Gomis, and T Vallespi. Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in younger adults. *Blood*, 78:1545–1551, 1991.

[94] C Montserrat, E; Rozman. Review Chronic lymphocytic leukemia : Present status. *Annals of Oncology*, 6:219–235, 1995.

[95] W S Moon, K H Rhyu, M J Kang, D G Lee, H C Yu, J H Yeum, G Y Koh, and A S Tarnawski. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 16(6):552–7, June 2003.

[96] B T Mortensen, P O Jensen, N Helledie, P O Iversen, E Ralfkiaer, J K Larsen, and M T Madsen. Changing bone marrow micro-environment during development of acute myeloid leukaemia in rats. *British journal of haematology*, 102(2):458–64, July 1998.

[97] A Mueller, K Lange, T Gaiser, M Hofmann, H Bartels, A C Feller, and H Merz. Expression of angiopoietin-1 and its receptor TEK in hematopoietic cells from patients with myeloid leukemia. *Leukemia research*, 26(2):163–8, February 2002.

[98] E Mutschler, G Geisslinger, H K Kroemer, and M Schaefer-Korting. *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2001.

[99] J E Nör, J Christensen, D J Mooney, and P J Polverini. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *The American journal of pathology*, 154(2):375–84, February 1999.

[100] J Oliner, H Min, J Leal, D Yu, S Rao, E You, X Tang, H Kim, S Meyer, S J Han, N Hawkins, R Rosenfeld, E Davy, K Graham, F Jacobsen, S Stevenson, J Ho, Q Chen, T Hartmann, M Michaels, M Kelley, L Li, K Sitney, F Martin,

J-R Sun, N Zhang, J Lu, J Estrada, R Kumar, A Coxon, S Kaufman, J Pretorius, S Scully, R Cattley, M Payton, S Coats, L Nguyen, B Desilva, A Ndifor, I Hayward, R Radinsky, T Boone, and R Kendall. Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer cell*, 6(5):507–16, November 2004.

[101] J Paesler, I Gehrke, R K Gandhirajan, A Filipovich, M Hertweck, F Erdfelder, S Uhrmacher, S J Poll-Wolbeck, M Hallek, and K-A Kreuzer. The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors vatalanib and pazopanib potently induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro and in vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(13):3390–8, July 2010.

[102] A Panovska, M Doubek, Y Brychtova, and J Mayer. Chronic lymphocytic leukemia and focusing on epidemiology and management in everyday hematologic practice: recent data from the Czech Leukemia Study Group for Life (CELL). *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, 10(4):297–300, August 2010.

[103] L. Peterson. Angiogenesis is increased in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 97(8):2529–2530, April 2001.

[104] P Pichiule, J C Chavez, and J C LaManna. Hypoxic regulation of angiopoietin-2 expression in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 279(13):12171–80, March 2004.

[105] M C Puri, J Partanen, J Rossant, and a Bernstein. Interaction of the TEK and TIE receptor tyrosine kinases during cardiovascular development. *Development (Cambridge, England)*, 126(20):4569–80, October 1999.

[106] M C Puri, J Rossant, K Alitalo, a Bernstein, and J Partanen. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *The EMBO journal*, 14(23):5884–91, December 1995.

[107] K R Rai, C E Freter, R J Mercier, M R Cooper, B S Mitchell, E A Stadtmauer, P Santabarbara, B Wacker, and L Brettman. Alemtuzumab in previously trea-

ted chronic lymphocytic leukemia patients who also had received fludarabine. *Journal of Clinical Oncology*, 20(18):3891–3897, September 2002.

[108] K R Rai, B L Peterson, F R Applebaum, J Kolitz, L Elias, L Shepherd, J Hines, G A Threatte, R Larson, B D Cheson, and C A Schiffer. Fludarabine compared with Chlorambucil as primary therapy for chroniclymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 343(24):1749–1757, 2000.

[109] K R Rai, a Sawitsky, E P Cronkite, a D Chanana, R N Levy, and B S Pasternack. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46(2):219–34, August 1975.

[110] A C Rawstron, C S Mulligan, M E Thomas, and S P Mulligan. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 359(19):2065–6; author reply 2066, November 2008.

[111] A Redaelli, B L Laskin, J M Stephens, M F Botteman, and C L Pashos. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *European journal of cancer care*, 13(3):279–87, July 2004.

[112] N Rego, S Bianchi, P Moreno, H Persson, A Kvist, A Pena, P Oppezzo, H Naya, C Rovira, G Dighiero, and O Pritsch. Search for an aetiological virus candidate in chronic lymphocytic leukaemia by extensive transcriptome analysis. *British journal of haematology*, 157(6):709–17, June 2012.

[113] H Reikvam, K J Hatfield, P Lassalle, A O Kittang, E Ersvaer, and O Bruserud. Targeting the angiopoietin (Ang)/Tie-2 pathway in the crosstalk between acute myeloid leukaemia and endothelial cells: studies of Tie-2 blocking antibodies, exogenous Ang-2 and inhibition of constitutive agonistic Ang-1 release. *Expert opinion on investigational drugs*, 19(2):169–83, February 2010.

[114] T Robak, J Z Blonski, M Kasznicki, M Blasinska-Morawiec, E Krykowski, A Dmoszynska, H Mrugala-Spiewak, A B Skotnicki, W Nowak, B Ceglarek, S Maj, J Dwilewicz-trojaczek, A Hellmann, I Urasinski, B Zdziarska, S Kotlarek-haus, S Potoczek, P Grieb, W Dc, and J Z Blon. Cladribine with prednisone versus chlorambucil with prednisone as first-line therapy in chronic

lymphocytic leukemia : report of a Cladribine with prednisone versus chlorambucil with prednisone as first-line therapy in chronic lymphocytic leukemia : repor. *blood*, 96(8):2723–2729, 2000.

[115] C Rozman, E Feliu, A Granena, P Marin, and B Nomdedeu. analysis of 150 cases. *blood*, 59(5):1001–1005, 1982.

[116] E. Rozman, C; Montserrat. Chronic lymphocytik leukemia. *The New England journal of medicine*, 333(16):1052–1057, 1995.

[117] J Rykala, K Przybylowska, I Majsterek, G Pasz-Walczak, A Sygut, A Dziki, and J Kruk-Jeromin. Angiogenesis markers quantification in breast cancer and their correlation with clinicopathological prognostic variables. *Pathology oncology research : POR*, 17(4):809–17, December 2011.

[118] K Saiya-Cork, R Collins, B Parkin, P Ouillette, E Kuizon, L Kujawski, H Erba, E Campagnaro, K Shedden, M Kaminski, and S N Malek. A pathobiological role of the insulin receptor in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(9):2679–92, May 2011.

[119] T N Sato, Y Qin, C a Kozak, and K L Audus. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(20):9355–8, October 1993.

[120] E J Schattner. CD40 ligand in CLL pathogenesis and therapy. *Leukemia & lymphoma*, 37(5-6):461–72, May 2000.

[121] T M Schlaeger, S Bartunkova, J a Lawitts, G Teichmann, W Risau, U Deutsch, and T N Sato. Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7):3058–63, April 1997.

[122] C Schliemann, R Bieker, T Padro, T Kessler, H Hintelmann, T Buchner, W E Berdel, and R M Mesters. Expression of angiopoietins and their receptor Tie2

in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 91(9):1203–11, September 2006.

[123] C Schliemann, R Bieker, N Thoennissen, J Gerss, R Liersch, T Kessler, T Büchner, W E Berdel, and R M Mesters. Circulating angiopoietin-2 is a strong prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 21(9):1901–6, September 2007.

[124] H Schulz, S K Klein, U Rehwald, M Reiser, A Hinke, W-U Knauf, W Aulitzky, M Hensel, M Herold, D Huhn, M Hallek, V Diehl, A Engert, and German Cll Study Group. Phase 2 study of a combined immunochemotherapy using rituximab and fludarabine in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100(9):3115–3120, 2002.

[125] P Schulz, C Fischer, K M Detjen, S Rieke, G Hilfenhaus, Z von Marschall, M Böhmig, I Koch, J Kehrberger, P Hauff, K H Thierauch, F Alves, B Wiedenmann, and A Scholz. Angiopoietin-2 drives lymphatic metastasis of pancreatic cancer. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(10):3325–35, October 2011.

[126] M T Scupoli and G Pizzolo. Signaling pathways activated by the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia. *Expert review of hematology*, 5(3):341–8, June 2012.

[127] M Seifert, L Sellmann, J Bloehdorn, F Wein, S Stilgenbauer, J Dürig, and R Küppers. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*, 209(12):2183–2198, October 2012.

[128] I Shachar, S Cohen, A Marom, and S Becker-Herman. Regulation of CLL survival by hypoxia-inducible factor and its target genes. *FEBS letters*, 586(18):2906–10, August 2012.

[129] V Solji, R B Perak, K Vukojevi, M Saraga-Babi, P Bubalo, D Karan, J To-

dorovi, and D Batini. ZAP-70 expression and proliferative activity in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, (October):1–6, October 2012.

[130] D Steinhilber, M Schubert-Zsilavecz, and H J Roth. *Medizinische Chemie, Targets und Arzneistoffe*. Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, 2005.

[131] S Stilgenbauer and H Döhner. Campth-1H-induced complete Remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistanca to chemotherapy. *The New England journal of medicine*, 347(6):443–5; author reply 443–5, August 2002.

[132] A Stratmann, T Acker, A M Burger, K Amann, W Risau, and K H Plate. Differential inhibition of tumor angiogenesis by tie2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 dominant-negative receptor mutants. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 91(3):273–82, February 2001.

[133] R M Strieter, P J Polverini, S L Kunkel, D a Arenberg, M D Burdick, J Kasper, J Dzuiba, J Van Damme, a Walz, and D Marriott. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 270(45):27348–57, November 1995.

[134] G Thurston. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell and tissue research*, 314(1):61–8, October 2003.

[135] G Thurston and Ch Daly. The complex role of angiopoietin-2 in the angiopoietin-tie signaling pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(9):a006550, September 2012.

[136] N. Tsukada, J.A. Burger, J Zvaifler, and T.J. Kipps. Distinctive features of "nurselike"cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 99(3):1030–1037, February 2002.

[137] B Turgut, O Vural, F S Pala, G E Pamuk, K Tabakcioglu, M Demir, S Ongören, T Soysal, and C Algünes. 17p Deletion is associated with resistance of B-cell

chronic lymphocytic leukemia cells to in vitro fludarabine-induced apoptosis. *Leukemia & lymphoma*, 48(2):311–20, February 2007.

[138] DM Valenzuela, JA Griffith, J Rojas, TH Aldrich, PF Jones, H Zhou, and J et al McClain. Angiopoietins 3 and 4 : Diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(March):1904–1909, 1999.

[139] K van Besien, B Keralavarma, S Devine, and W Stock. Allogeneic and autologous transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 15(9):1317–25, September 2001.

[140] E C van den Broek, a P Kater, S a M van de Schans, H E Karim-Kos, M L G Janssen-Heijnen, W G Peters, P T G a Nooijen, J W W Coebergh, and E F M Posthuma. Chronic lymphocytic leukaemia in the Netherlands: trends in incidence, treatment and survival, 1989-2008. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 48(6):889–95, April 2012.

[141] F Vrbacky, L Smolej, V Vroblova, S Pekova, M Hrudkova, M Cervinka, M Pecka, J Krejsek, and J Maly. Angiopoietin-2 mRNA expression is increased in chronic lymphocytic leukemia patients with poor prognostic features. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 15(4):210–4, August 2010.

[142] L Wang, J E Coad, J M Fortney, and L F Gibson. VEGF-induced survival of chronic lymphocytic leukemia is independent of Bcl-2 phosphorylation. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 19(8):1486–7, August 2005.

[143] C. Willam, P. Koehne, J. S. Jurgensen, M. Grafe, K. D. Wagner, S. Bachmann, U. Frei, and K.-U. Eckardt. Tie2 Receptor Expression Is Stimulated by Hypoxia and Proinflammatory Cytokines in Human Endothelial Cells. *Circulation Research*, 87(5):370–377, September 2000.

[144] M Q Xia, G Hale, M R Lifely, M a Ferguson, D Campbell, L Packman, and H Waldmann. Structure of the CAMPATH-1 antigen, a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein which is an exceptionally

good target for complement lysis. *The Biochemical journal*, 293 (Pt 3:633–40, August 1993.

[145] Y Xia, R-N Lu, and J Li. Angiogenic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia research*, 36(10):1211–7, October 2012.

[146] T Zenz, S Häbe, T Denzel, J Mohr, D Winkler, A Bühler, A Sarno, S Groner, D Mertens, R Busch, M Hallek, H Döhner, and S Stilgenbauer. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood*, 114(13):2589–97, September 2009.

7 Vorabveröffentlichungen

7.1 Posterpräsentationen

- DGHO 2011 mit dem Titel: Intercation of CLL cells and bone marrow stromal cells via the angiopoietin(Ang)2/Tie2 axis
- ISH 2012 mit dem Titel: Interaction of CLL cells and the microenvironment via the angiopoietin(Ang)2/Tie2 axis

7.2 Paper

Titel: Angiopoietin-2/Tie2 signaling in the microenvironment of chronic lymphocytic leukemia (CLL)
veröffentlicht in *Cancer and Research* im April 2014

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Tie2 Auswertung am Durchflusszytometer 29
Abb. 2: Annexin V-FITC PI Färbung 30
Abb. 3: Ang2 Expression 41
Abb. 4: Ang2-Konzentration im Plasma und Überstand 44
Abb. 5: Ang2-Konzentration Normoxie und Hypoxie 45
Abb. 6: Ang2-Konzentration in Kokulturen 46
Abb. 7: Überlebensvorteil durch Stimulanzien 47
Abb. 8: Ang2-Konzentration nach Stimulierung 48
Abb. 9: Überlebensvorteil durch Kokultur 49
Abb. 10: Überlebensvorteil in Kokulturen behandelt mit AMG386 51
Abb. 11: Gesamtüberleben in Mono- und Kokultur behandelt mit AMG386 . 52
Abb. 12: Tie2-Expression 53
Abb. 13: Tie2 auf der Zelloberfläche 53
Abb. 14: Mittlere Fluoreszenzintensität der CLL-Zellen, Normoxie versus Hypoxie 54
Abb. 15: Tie2-Status verschiedener Zelllinien 55
Abb. 16: Tie2-Status kokultivierter CLL-Zellen 56
Abb. 17: Mittlere Fluoreszenzintensität der kokultivierten CLL-Zellen 56
Abb. 18: Tie2 nach Stimulation 57
Abb. 19: Mittlere Fluoreszenzintensität der stimulierten CLL-Zellen 58
Abb. 20: Tie2-Status von Granulozyten 59
Abb. 21: Tie2-Status von dendritischen Zellen 60
Abb. 22: Tie2-Status von Nurselike Zellen 61
Abb. 23: Mittlere Fluoreszenzintensität von CLL-Zellen aus dem Knochenmark von vier verschiedenen CLL-Patienten 61
Abb. 24: Expression von Ang2 und Tie2 im BM 62
Abb. 25: Tie2-Status auf Proteinebene bestimmt mit Western Blot 63

Abb. 26: Relative Stärke der Phosphorylierung der Rezeptoren 64
Abb. 27: Gesamtüberleben der einzelnen Patienten 71
Abb. 28: Ang2 bei der Entzündungsreaktion 75
Abb. 29: Tie2 in der Mikroumgebung peripheres Blut 76
Abb. 30: Tie2 in der Mikroumgebung Lymphknoten 77
Abb. 31: Tie2 in der Mikroumgebung Knochenmark 78

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Stadieneinteilung nach Rai (1975) 5
Tab. 2: Stadieneinteilung nach Binet (1981) 6
Tab. 3: Punktmutation bei *ANG2* 42
Tab. 4: ZAP70 und CD38 Status der Patienten 65
Tab. 5: Ang2-Status laut *Cut-off-Level* von 2458pg/ml 66