

Aus der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie

(Prof. Dr. med. L. Trümper)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ANGIOGENESE DES BURKITT-
LYMPHOMS UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES
LYMPHOCYTE ENHANCER-BINDING FACTOR-1**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Pia Josefa Wilming

aus Ahlen

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. rer. nat. D. Kube

Ko-Referent/in: Prof. Dr. J. Wilting

Drittreferent/in: Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung : 29.11.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Untersuchungen zur Angiogenese des Burkitt-Lymphoms unter besonderer Berücksichtigung des Lymphocyte enhancer-binding factor-1" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den..... Unterschrift.....

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Maligne Lymphome	1
1.2 Burkitt-Lymphome	2
1.3 LEF1 als molekularer Marker im BL	4
1.4 Tumervaskularisierung	7
1.5 Vessel cooption	8
1.6 Ausgangslage	9
1.7 Ziel.....	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Material.....	10
2.1.1 Geräte.....	10
2.1.2 Chemikalien	11
2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien.....	13
2.1.4 Antikörper	14
2.1.5 Zelllinien.....	15
2.1.6 Software.....	15
2.2 Methoden	15
2.2.1 Zellkultur	15
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	21
2.2.3 CAM-Assay	23
2.2.4 Statistik	26
3. Ergebnisse	27
3.1 LEF1-defiziente BL-Zellen zeigen eine geringere Lymphomvaskularisierung	27

3.1.1	BL-2 als Modell-Zelllinie für das Burkitt-Lymphom	27
3.1.2	Ergebnisse der Analysen im CAM-Assay	31
3.2	Sekretierte Faktoren LEF1-positiver BL-Zelllinien stimulieren die Migration von Endothelzellen	42
4.	Diskussion	45
5.	Zusammenfassung	49
6.	Literaturverzeichnis	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: LEF1-Expression in B-Zell-Lymphomen und Tonsillen-Gewebe.	5
Abbildung 1-2: LEF1-Expression in Lymphom-Zelllinien.	6
Abbildung 2-1: Auszählung der migrierten HUVEC-Endothelzellen.	21
Abbildung 3-1: FACS-Sortierung anhand der GFP-Expression.....	28
Abbildung 3-2: Subfraktionierung der Mischzelllinie BL-2 pGIPZ LEF1 shA.	29
Abbildung 3-3: Nachweis der LEF1-Expression in BL-2 Zellen.	30
Abbildung 3-4: Tumor-Fluoreszenzaufnahmen und deren Hellfeldaufnahmen.	33
Abbildung 3-5: Übersicht der LEF1-exprimierenden Zelllinien.	34
Abbildung 3-6: Übersicht der LEF1-defizienten Zelllinien.	35
Abbildung 3-7: Lichtmikroskopische Tumoraufnahmen.	36
Abbildung 3-8: Anteil der hämorrhagischen Tumoren an der Tumorgesamtzahl.	37
Abbildung 3-9: Hämorrhagische Tumoren in Beziehung zur Tumorgroße.	38
Abbildung 3-10: Hämorrhagischer Tumor der Zelllinie BL-2 scrb 2.	39
Abbildung 3-11: Hämorrhagien der LEF1-positiven Zelllinien.	40
Abbildung 3-12: <i>Vessel cooption</i> in LEF1-KD-Tumoren.	41
Abbildung 3-13: Wachstumsfront LEF1-positiver Zellen im Tumorgewebe.	42
Abbildung 3-14: Lichtmikroskopische Aufnahmen der HUVEC-Endothelzellen. ...	43
Abbildung 3-15: Migration der HUVEC-Endothelzellen in der Boyden-Kammer. ...	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: verwendete Geräte	10
Tabelle 2-2: verwendete Verbrauchsmaterialien	11
Tabelle 2-3: verwendete Chemikalien.....	11
Tabelle 2-4: verwendete Puffer, Lösungen und Ansätze.....	13
Tabelle 2-5: verwendete Antikörper	14
Tabelle 2-6: verwendete Zelllinien	15
Tabelle 2-7: verwendete Software	15
Tabelle 2-8: verwendete Zelllinien	17
Tabelle 3-1: Verwendete Zelllinien und deren Abkürzungen.	29
Tabelle 3-2: Zusammenfassung der BL-Tumoren.	31

Abkürzungsverzeichnis

4-IPBA	<i>4-Iodophenylboronic acid</i>
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
BL	Burkitt-Lymphom
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CaCl ₂	Calcium-Chlorid
CAM	Chorion-Allantois-Membran
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CM	konditioniertes Medium
CO ₂	<i>carbon dioxide</i>
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EBM	<i>endothelial cell basal medium</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGM	<i>endothelial cell growth medium</i>
et al.	<i>et alii</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
g	Erdbeschleunigungskonstante (g = 9.80665 m/s ²)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSK-3β	Glykogensynthase-Kinase 3β
H ₂ O	Wasser

HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kalium-Chlorid
KD	<i>Knockdown</i>
LEF1	<i>lymphocyte enhancer-binding factor-1</i>
LRP	LDL-Rezeptor-ähnliches-Protein
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NaCl	Natrium-Chlorid
NCC	Nierenzellkarzinom
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NP-40	Nonidet p-40
OD ₅₉₅	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm
p	Signifikanzwert
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonylfluorid</i>
rhFGF-B	<i>recombinant human fibroblast growth factor-basic</i>
rhVEGF	<i>recombinant human vascular endothelial growth factor</i>
RIPA	<i>radio immuno percipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
scrb	<i>scrambled</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>

SDS-Page	SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
SPF	<i>specific pathogen free</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBS-T	TBS-Tween
TCF	<i>T cell factor</i>
TEMED	<i>tetramethyl-ethane-1,2-diamin</i>
ü. N.	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome sind Tumoren des lymphatischen Systems. Sie lassen sich laut „WHO-Klassifikation von lymphatischen und hämatopoietischen Neoplasien“ nach ihrer zellulären Herkunft und ihrer Ableitung von Vorläuferzellen und reifen Zellen (Campo et al. 2011) einteilen. Des Weiteren wird zwischen Hodgkin-Lymphomen (Morbus Hodgkin) und Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) unterschieden, die wiederum in niedrig- und hochmaligne Varianten eingeteilt werden können (RKI 2010). Bei beiden Lymphomarten wird lymphatisches Gewebe durch abnorme, maligne Zellen ersetzt (Dempke 2006).

Das NHL gehört zu einer heterogenen Gruppe von Neoplasien des lymphatischen Systems, die in den meisten Fällen von Vorläuferzellen der T- und B-Lymphozyten ausgehen, wobei sich die überwiegende Zahl der NHL von B-Lymphozyten ableitet (Gerok et al. 2007). Beim Morbus Hodgkin handelt es sich um ein malignes B-Zell-Lymphom, das durch den histologischen Nachweis von Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen charakterisiert und dadurch vom NHL abgegrenzt werden kann (RKI 2010).

Die Inzidenz der NHL, deren Auftreten in den letzten dreißig Jahren im Gegensatz zu den Hodgkin-Lymphomen stetig zugenommen hat, liegt in Deutschland bei 17-21:100.000 / Jahr (RKI 2010). Im Durchschnitt waren die Patienten bei Diagnosestellung zwischen 69 und 71 Jahre alt (RKI 2010). Der Anteil der NHL an malignen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter beträgt 6,5 %, wobei die Inzidenz bei 0,6:100.000 / Jahr liegt (RKI 2010). Lymphome machen insgesamt mit 11,4 % die dritthäufigste Tumorentität bei pädiatrischen Patienten unter 15 Jahren aus (RKI 2010).

Je nachdem, welches Reifungsstadium der B-Lymphozyten betroffen ist, entsteht ein aggressives Lymphom oder ein indolentes, langsam-proliferierendes Lymphom (Arastéh, et al. 2012). Beispiele für indolente NHL sind folliculäre Lymphome oder die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) (Arastéh, et al. 2012). Hauptvertreter der aggressiven NHL sind das Mantelzell-Lymphom und das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL), das mit 30 – 40 % das häufigste NHL ausmacht (Arastéh, et al. 2012). Das Burkitt-Lymphom (BL), das mit 1-2 % aller Lymphome eher selten vorkommt, gehört ebenfalls zu der Gruppe der hoch aggressiven NHL (Arastéh et al. 2012).

Neben unspezifischen Beschwerden wie Müdigkeit, Appetitlosigkeit oder erhöhter Infektanfälligkeit sind die ersten Symptome des NHL fast immer schmerzlose Lymphknotenvergrößerungen, die durch die Vermehrung von Lymphozyten oder durch die Ansammlung von lymphknotenfremden Zellen entstehen (Kompetenznetz Maligne Lymphome 2014). Durch eine Anamnese und die Palpation der Lymphknotenstationen lassen sich zwei Drittel aller Lymphome entdecken (Dempke 2006).

Die Therapiestrategie ergibt sich aus dem Krankheitsstadium, wobei zu beachten ist, dass niedrigmaligne NHL bei Diagnosestellung bereits häufig disseminiert und daher in der Regel nicht heilbar sind, oder sehr langsam fortschreiten, sodass eine frühzeitige Therapie keine Vorteile bietet (Arastéh, et al. 2012; Kompetenznetz Maligne Lymphome 2014). Bei den hochmalignen NHL ist hingegen eine Kuration auch in fortgeschrittenen Stadien noch möglich (Arastéh, et al. 2012). Sie werden umgehend mit hochdosierten Chemotherapeutika nach dem R-CHOP-Schema, bestehend aus Rituximab, Cyclophosphamid, Hydroxy-Doxorubicin, Vincristin und Prednison, behandelt (Kompetenznetz Maligne Lymphome 2017).

Auch die Behandlung der NHL des Kindes- und Jugendalters basiert auf modernen Kombinations-Chemotherapie-Protokollen im Rahmen von kontrollierten multizentrischen Therapiestudien, womit heute Überlebensraten von fast 90 % erreicht werden können (Studienzentrale-NHL-BFM 2016).

1.2 Burkitt-Lymphome

Das Burkitt-Lymphom (BL), das erstmalig im Jahre 1958 von Denis Burkitt als das häufigste Lymphom im Kindesalter beschrieben wurde, gehört zu den hochmalignen, schnell wachsenden B-NHL (Burkitt 1958; Swerdlow SH 2008; Molyneux et al. 2012). Dabei werden zwei Formen unterschieden: das endemische afrikanische BL, das sich häufig bei Kindern im Kieferbereich manifestiert und das sporadische BL, das überwiegend in westlichen Ländern vorkommt und vor allem Erwachsene im Bereich des Abdomens befällt (Dunphy und Cagle 2010).

Die endemische Variante ist in über 90 % der Fälle und die sporadische Form in bis zu 50 % der Fälle mit EBV (Epstein-Barr-Virus) assoziiert (Maruo et al. 2001). Des Weiteren kann noch eine dritte Variante beobachtet werden, die im Zusammenhang mit HIV-Infektionen oder einer therapeutisch induzierten Immunschwäche steht (Tiemann und Trümper

2001). Zu dieser Risikogruppe der Immundefizienz-assoziierten BL gehören Posttransplantations-Patienten in einem Zeitraum von vier bis fünf Jahren nach der Organtransplantation (Dunphy und Cagle 2010).

Das endemische BL, das die häufigste Art ausmacht, betrifft Kinder und Jugendliche im Alter von 2-20 Jahren, wobei der Erkrankungsgipfel zwischen dem sechsten und siebten Lebensjahr liegt und Jungen doppelt so häufig wie Mädchen erkranken (krebsgesellschaft.de: Risiko und Ursache vom Burkitt-Lymphom 2016). Bei der seltenen sporadischen Form sind die betroffenen Patienten im Durchschnitt zehn Jahre älter (krebsgesellschaft.de: Risiko und Ursache vom Burkitt-Lymphom 2016).

Das BL nimmt seinen Ursprung in entarteten B-Zellen des Keimzentrums und manifestiert sich fast ausschließlich extranodal (Stein und Hummel 2007). Diese Zellen weisen im Vergleich zu nicht transformierten B-Zellen sowohl ein verändertes Verhalten in Bezug auf Proliferation und Differenzierung als auch eine veränderte Signaltransduktion auf (Arastéh, et al. 2012). Bei 80 % der Patienten mit BL findet sich zytogenetisch eine chromosomale Translokation, die das *c-Myc* Gen auf Chromosom 8 und einen hochaktiven Immunglobulin-Genort in B-Lymphozyten auf Chromosom 14 betrifft, sodass die Translokation t(8;14) resultiert (Hecht und Aster 2000; Klein und Klein 2009). Dies hat zur Folge, dass das Protoonkogen *c-Myc*, das in physiologischen Zellen sonst eng reguliert ist, verstärkt exprimiert wird (Boxer und Dang 2001; Klein und Dalla-Favera 2008; Arastéh, et al. 2012). Neben der Überexpression von *c-Myc* trägt der Transkriptionsfaktor LEF1 (*lymphocyte enhancer-binding factor-1*) zur molekularen Signatur des BL bei (Hummel et al. 2006).

Obwohl das sporadische BL mit 40 % einen Großteil aller pädiatrischen Lymphome in der westlichen Welt repräsentiert, kommt es mit 1-2 % aller Lymphome im Erwachsenenalter eher selten vor (Dunphy und Cagle 2010).

Aufgrund der raschen Ausbreitung des BL sollte eine möglichst schnelle Behandlung erfolgen, wobei sich die Therapie vor allem nach dem Ausbreitungsgrad richtet (krebsgesellschaft.de: Therapie beim Burkitt-Lymphom, 2016).

Trotz „tumoröser“ Raumforderungen, die vor allem abdominell auftreten, ist eine operative Tumormasse-Reduktion bei Erwachsenen in der Regel nicht indiziert (Tiemann und Trümper 2001). Aufgrund der sehr schnellen Proliferation (Verdopplungszeit ca. 24 h) muss das

BL in wiederholten, sehr kurzen Therapiekursen mit hochdosierten Zytostatika behandelt werden (Burkitt 1958; Leitlinie Non-Hodgkin-Lymphome 2009). Das Ziel ist es, mit jedem Therapiekurs die maximale Tumorzytolyse zu erreichen (Leitlinie Non-Hodgkin-Lymphome 2009). Eine mögliche beträchtliche postchemotherapeutische Knochenmarksuppression wird dabei in Kauf genommen (Leitlinie Non-Hodgkin-Lymphome 2009). Bei effektiver Chemotherapie bewirkt eine zusätzliche Strahlentherapie eher keine Verbesserung der krankheitsfreien Überlebensraten, jedoch kann bei einem Lymphomprogress, einer nicht ausreichenden Tumorrückbildung oder in einer Rezidivsituation eine Strahlentherapie in Erwägung gezogen werden (Leitlinie Non-Hodgkin-Lymphome 2009).

Mit den bisherigen Therapiestrategien kann bei 85 % der Patienten eine Remission und bei ca. 70 % der Patienten ein Langzeitüberleben erreicht werden, wobei die Heilungschance bei Kindern sogar 90 % beträgt (Diviné et al. 2005; Arastéh, et al. 2012).

1.3 LEF1 als molekularer Marker im BL

Lymphocyte enhancer-binding factor-1 (LEF1) ist ein Mitglied der Familie der LEF/TCF (*T cell factor*-) Transkriptionsfaktoren und wird in prä-B- und T-Lymphozyten, jedoch nicht in späteren B-Zell-Stadien oder nicht-lymphoidem Gewebe exprimiert (Travis et al. 1991; Reya et al. 2000). Des Weiteren kodiert *LEF1* ein 48-kDa großes Protein, das zahlreiche zelluläre Funktionen wie die Regulation im Wnt-Signalweg bezüglich Proliferation, Apoptose oder Gentranskription beeinflusst, indem LEF1 mit dem Koaktivator β -Catenin interagiert (Travis et al. 1991; Qiang et al. 2003; Gao et al. 2008; Hoepfner et al. 2011; Shelton et al. 2012; Wang et al. 2013).

Normalerweise wird LEF1 in prä-B und T-Zellen exprimiert (Travis et al. 1991; Reya et al. 2000; Walther et al. 2013). Globale Genexpressionsprofile von Patienten mit B-NHL haben ergeben, dass *LEF1* neben *c-Myc* zu den 58 Genen gehört, die das BL in Abgrenzung zum DLBCL oder zum Mantelzell-Lymphom auf molekularer Ebene charakterisieren (Hummel et al. 2006). Kürzlich wurden im Rahmen einer Studie mit 157 B-Zell-Lymphomen, 32 Tumoren identifiziert, die eine LEF1-Expression aufwiesen (Walther et al. 2013). Neben 15 aus 18 BL (**Abbildung 1-1 A**) zeigten alle akuten ($n = 6$) und chronischen ($n = 6$) B-Zell-Leukämien eine nukleäre LEF1-Expression (**Abbildung 1-1 B,C**) (Walther et al. 2013). Hingegen wurde lediglich ein Tumor von 31 DLBCLs LEF1-positiv getestet (**Abbildung 1-1 D**) (Walther et al. 2013). Ebenso sind die B-Zellen des Keimzentrums, die Vorläuferzellen des BL, frei von LEF1 (**Abbildung 1-1 E,F**) (Walther et al. 2013).

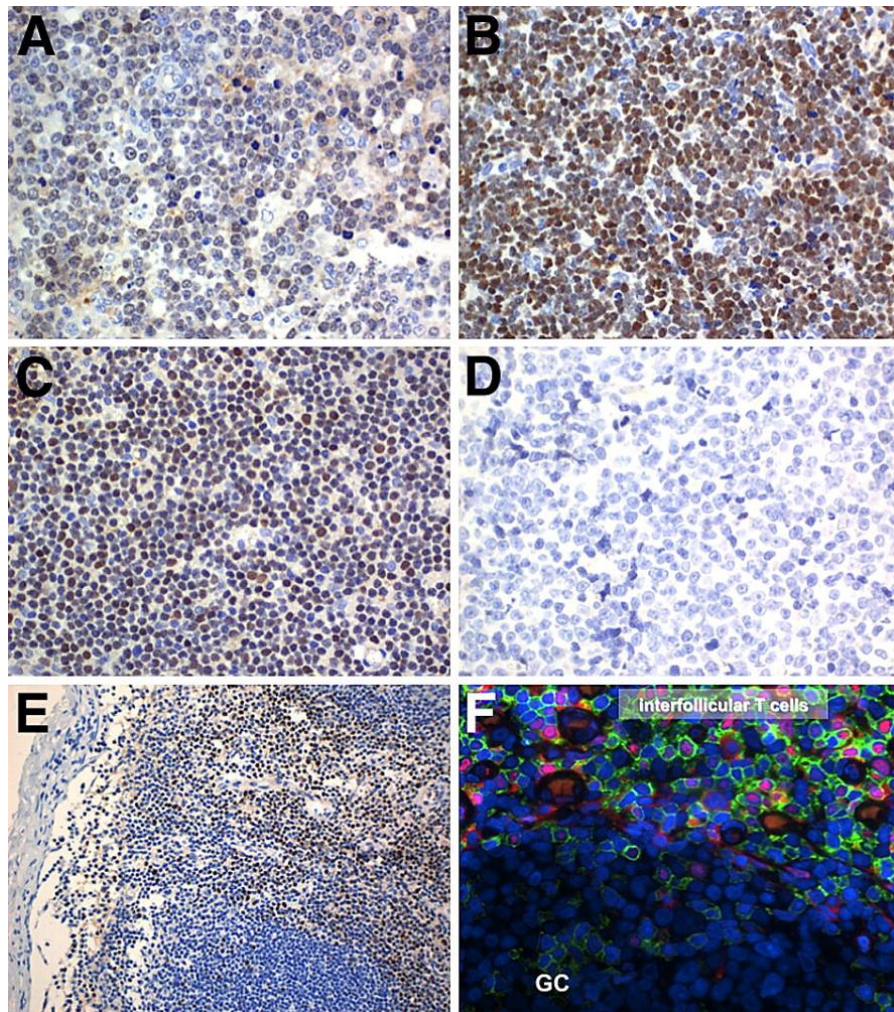


Abbildung 1-1: LEF1-Expression in B-Zell-Lymphomen und Tonsillen-Gewebe. Immunhistochemischer Nachweis von LEF1 (braun) im BL (A), in der B-Zell Akuten Lymphatischen Leukämie (B) und der Chronischen Lymphatischen Leukämie (C). Im DLBCL ist kein LEF1 nachweisbar (D). Abbildungen (E) und (F) zeigen LEF1-Expression der interfollikulären T-Zellen in der Mantelzone des Keimzentrums einer Tonsille, wobei die B-Zellen des Keimzentrums (GC) kein LEF1 aufweisen. Abbildung (F) zeigt einen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbten Tonsillenschnitt. Zellkerne (blau), CD3+ T-Zellen (grün), LEF1 (rot). (Walther et al. 2013). Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Neele Walther.

Bestätigend zeigten Immunoblotanalysen (**Abbildung 1-2**), dass sieben von sieben unterschiedlichen BL-Zelllinien eine erhöhte LEF1-Expression aufweisen (Walther et al. 2013). Hingegen ist in den DLBCL- oder Mantelzelllymphom-Zelllinien keine oder nur eine schwache LEF1-Expression nachweisbar (Walther et al. 2013). Die Expression von LEF1 im BL kann demnach als aberrant angesehen werden (Walther et al. 2013).

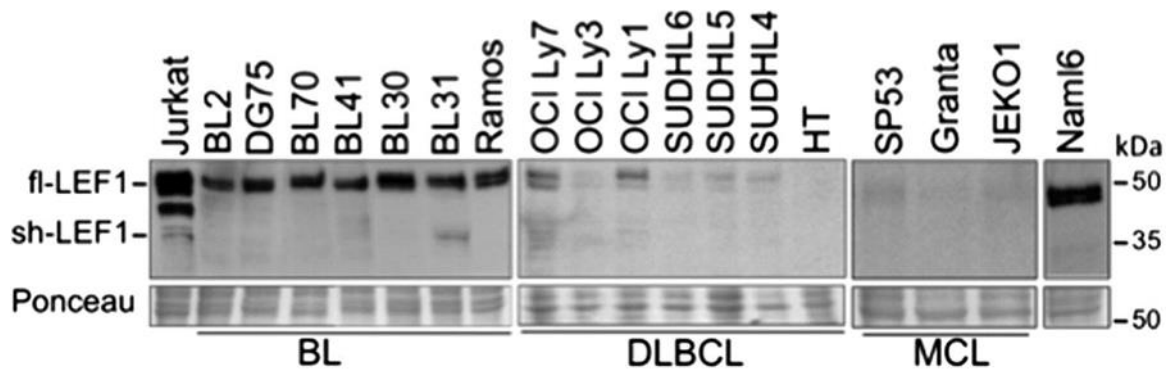


Abbildung 1-2: LEF1-Expression in Lymphom-Zelllinien. Die Immunoblotanalyse zeigt, dass alle sieben Zelllinien, die vom BL abgeleitet sind (BL2, DG75, BL70, BL30, BL31, Ramos) LEF1 exprimieren. Die DLBCL-Zelllinien (OCI Ly7, OCI Ly3, OCI Ly1, SUDHL6, SUDHL5, SUDHL4, HAT), sowie die Mantelzelllymphom-(MCL) Zelllinien (SP53, Granta, JEKO1) weisen nur eine geringe oder gar keine LEF1-Expression auf. Die Zelllinien Jurkat, eine Zelllinie der T-Zell akuten lymphatischen Leukämie und Nam16, eine humane B-Zell Vorläufer Leukämie Zelllinie, dienen als LEF1-Referenz bzw. als Ladungsreferenz. fl-LEF1, full-length LEF1; sh-LEF1, short LEF1. (aus: Walther et al. 2013). Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Neele Walther.

Nach transientem LEF1-Knockdown (LEF1-KD) in den BL-Zelllinien Ramos und BL-2 wurden anschließend mittels Microarray-Technologie neue potentielle LEF1-Zielgene identifiziert (Walther et al. 2013). Diese Zielgene betreffen Genregulation, Zell-Signalwirkung, Zellproliferation, Zellzyklus-Regulation, sowie die Metabolismus-Regulation und Antigenpräsentation (Walther et al. 2013). Andere Zielgene betreffen wiederum B-Zell-Interaktionen mit T-Zellen, B-Zell-Differenzierung oder Tumorprogression (Walther et al. 2013). Die Gene, die nach LEF1-KD weniger exprimiert wurden, sind durch LEF1 positiv reguliert und umgekehrt, was eine erste Antwort auf die Ursache der Differenzierbarkeit zwischen den verschiedenen Lymphomentitäten, insbesondere der NHL, liefert (Walther et al. 2013). Welche exakte biologische Rolle LEF1 im BL spielt, wird hingegen noch nicht ausreichend verstanden (Walther et al. 2013).

Neben der onkogenen Funktion im BL, spielt LEF1 auch bei anderen hämatopoietischen Tumoren eine entscheidende Rolle. Genexpressionsprofile von B-Lymphozyten haben gezeigt, dass *LEF1*, zusammen mit sechs weiteren Genen, in B-Lymphozyten der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL), ein signifikant überexprimiertes Gen darstellt (Gutiérrez et al. 2007). Auch hier konnte der Nachweis von LEF1 zur präzisen Abgrenzung zu anderen lymphatischen Tumoren herangezogen werden (Gutiérrez et al. 2007).

Auch bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) der B-Zellreihe und der akuten myeloischen Leukämie (AML) gehört *LEF1* zu den stark exprimierten Genen (Simon et al. 2005; Wang et al. 2005; Petropoulos et al. 2008). Im Maus-Modell konnte gezeigt werden,

dass B-Zell-lymphatische Leukämien und myeloische Leukämien durch hohe Raten an *LEF1* induziert werden (Petropoulos et al. 2008). Des Weiteren wurde in einer Studie bewiesen, dass Patienten mit B-Vorläufer-ALL, die hohe LEF1-Expressionslevel zeigten, im Gegensatz zu Leukämien mit niedrigeren Expressionsniveaus, eine geringere rezidivfreie-5-Jahres-Überlebensrate hatten (Kühnl et al. 2011).

Daneben beeinflusst die LEF1-Expression im Kolonkarzinom Infiltrationstiefe, Lymphknoten- und periphere Metastasierung und das Fortschreiten im TNM (*tumor-node-metastasis*)- Stadium (Wang et al. 2013). Eine 5-Jahres Follow-Up-Studie zeigte, dass die mediane Überlebensrate von Patienten mit LEF1-positiven Kolonkarzinomen mit 48,5 Monaten um 11,5 Monaten geringer war als bei Patienten mit LEF1-negativen Tumoren (Wang et al. 2013). Durch stabilen LEF1-KD konnten Viabilität von Kolonkarzinomzellen *in vitro* und Tumorformation und -größe *in vivo* gehemmt werden (Wang et al. 2013).

Erst kürzlich wurde von *Gao et al.* aufgezeigt, dass LEF1 im Glioblastoma multiforme (GBM), ein WHO-Grad IV eingestufte Tumor des zentralen Nervensystems, die Zellproliferation, -migration und Selbsterneuerung der GBM-Zellen aufrechterhält (Gao et al. 2014).

1.4 Tumolvaskularisierung

Tumoren können bis zu einer Größe von 1-2 mm³ wachsen, bevor sie in ihrem Wachstum durch das Fehlen der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung eingeschränkt werden (Carmeliet und Jain 2000; Carmeliet und Jain 2011). Um darüber hinauszuwachsen, müssen die Tumoren neue Blutgefäße über Vaskulogenese (Gefäßanlage) und Angiogenese (Ausbau und Erweiterung der Gefäße) aus dem umgebenen Stroma rekrutieren (Carmeliet und Jain 2000; Patan 2004). Dieser Prozess wird über die Balance zwischen pro- und antiangiogenen Molekülen reguliert und spielt vor allem in Hinblick auf die Entstehung von Krebs eine große Rolle (Carmeliet und Jain 2000).

Die Tumoriangiogenese unterscheidet sich signifikant von der physiologischen Angiogenese (Bergers und Benjamin 2003). Die Unterschiede beinhalten differente Gefäßstrukturen, Endothelzell-Perizyten-Interaktionen, Blutfluss und eine erhöhte Gefäßpermeabilität mit verzögerter Gefäßreifung (Bergers und Benjamin 2003). Der Vorgang der Angiogenese ist im normalen adulten Organismus streng reguliert, sodass es unter physiologischen Umständen nur sehr selten zu solchen Prozessen kommt (Iruela-Arispe und Dvorak 1997).

Normalerweise ist die Balance zwischen stimulierenden- und inhibierenden Faktoren ausgeglichen (Iruela-Arispe und Dvorak 1997). Zu den pro-angiogenen Faktoren werden Proteine gezählt, die während der Angiogenese präsent und an den Abläufen beteiligt sind (Folkman und Ingber 1992). Eine Inhibierung dieser Faktoren bewirkt die Hemmung der Angiogenese (Folkman und Ingber 1992). Als Gegenspieler treten anti-angiogene Faktoren auf, die die Aktivierung der Endothelzellen direkt inhibieren oder zur Hemmung bzw. Neutralisation pro-angiogener Faktoren führen (Distler et al. 2003). Zu den zahlreichen pro- als auch anti-angiogenen Faktoren, die in den letzten Jahrzehnten identifiziert wurden, gehören u.a. Proteine der VEGF (*vascular endothelial growth factor*)- oder FGF (*fibroblast growth factor*)- Familie (Distler et al. 2003).

Die Bildung neuer Kapillaren aus präexistierenden Gefäßen findet in physiologischen Situationen wie der Embryonalentwicklung, Wundheilung und Reproduktion statt (Hillen und Griffioen 2007). Sie spielt aber auch in zahlreichen pathologischen Prozessen, z.B. beim Diabetes mellitus (Martin et al. 2003), Rheumatoider Arthritis (Koch 2003), kardiovaskulärer ischämischer Komplikationen (Cao et al. 2005) oder Krebs (Carmeliet und Jain 2000) eine Rolle. Bei malignen Neoplasien bezieht sich die Sprossung neuer Gefäße aus bereits existenten nicht nur auf die Bildung von Primärtumoren, sondern auch auf die Formation und das Wachstum von Metastasen (Hanahan und Weinberg 2000). Es beginnt mit der Aktivierung von Endothelzellen durch spezifische Wachstumsfaktoren, die an ihre Rezeptoren binden (Ferrara et al. 2003). Als Ergebnis werden die extrazelluläre Matrix und die Basallamina, die die Endothelzellen umgeben, durch aktivierte Proteasen lokal degradiert (Ferrara et al. 2003). Es entsteht ein Lumen und ein neues, unreifes Blutgefäß wird gebildet (Ferrara et al. 2003). Die Stabilisierung der Gefäße wird durch das Heranziehen von Perizyten und die Generierung neuer extrazellulär Matrix gewährleistet (Jain 2003).

1.5 Vessel cooption

Lange Zeit wurde angenommen, dass die meisten Tumoren und Metastasen aus kleinen, avaskulären Anhäufungen von Tumorzellen entstehen, die zu einem späteren Zeitpunkt die Entwicklung neuer Blutgefäße induzieren (Folkman et al. 1971). Diese Ansicht der Tumorangiogenese wurde von Holash et al. modifiziert (Holash et al. 1999). Sie fanden mit Hilfe von Ratten- und Mausmodellen heraus, dass Tumorzellen in kurzer Zeit zunächst unter Hinzunahme präexistierender Blutgefäße eine gut vaskularisierte Tumormasse aufbauen

und nannten dieses Phänomen *vessel cooption* (Holash et al. 1999). Die kooptierten Gefäße unterliegen jedoch nicht sofort der Angiogenesekontrolle des Tumors und bilden sich vorerst zurück (Holash et al. 1999). Diese Regression führt zunächst zu einem Tumorzellsterben, was als Bestandteil einer Wirtsabwehr gesehen werden kann (Holash et al. 1999). Der verbliebene Tumorrest wird letztlich durch robuste Gefäße am Tumorrand versorgt und somit gesichert (Holash et al. 1999).

1.6 Ausgangslage

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor LEF1 aberrant im Burkitt-Lymphom exprimiert wird (Walther et al. 2013). Mit Hilfe eines transienten LEF1-Knockdowns in BL-2 Zellen konnten *in vitro* Zielgene des Transkriptionsfaktors beschrieben werden (Walther et al. 2013). Die biologische Funktion von LEF1 im BL *in vivo* ist jedoch noch unklar. In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnten der CAM (Chorion-Allantois-Membran)-Assay als Xenograft-Modell für die BL-2 Zelllinie etabliert werden (Becker et al. 2012). In der von Dr. Stefan Ueberdiek durchgeführten medizinischen Doktorarbeit wurden erste BL-2 LEF1-KD Zelllinien im CAM-Assay morphologisch charakterisiert (Ueberdiek 2016).

1.7 Ziel

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, inwieweit eine Reduktion der LEF1-Expression in BL-2 Zellen die Tumolvaskularisierung beeinflusst. Des Weiteren sollte analysiert werden, ob sich das Sekretom der BL-2 Zellen durch den KD verändert, sodass sich auch dementsprechend das Endothelzell-Verhalten modifiziert.

Zunächst war es das Ziel der Arbeit, die CAM-Lymphome weiterhin morphologisch zu charakterisieren. Hierzu war es notwendig die vorliegenden LEF1-defizienten Zelllinien zu subklonieren. Weiterhin sollte der Frage nach Lymphom-Einblutungen und dem so genannten Phänomen der *vessel cooption* nachgegangen werden. Anschließend konnte die Wirkung des BL-2 Sekretoms auf die Migration von Endothelzellen untersucht werden, indem *in vitro* die LEF1-abhängigen Interaktionen an HUVEC-Endothelzellen im Migrationsversuch nach Boyden überprüft wurden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2-1: verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Accu Jet	Brand, Hamburg, Deutschland
BD FACSAria™	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Boyden Kammer 48 Well Micro Chemotaxis	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Brutschrank Cytoperm	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centromat MO Schüttler	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Elektrophorese-Kammer und Wet-Blot-System	Bio-Rad GmbH, München, Deutschland
FACScan Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
GFL 3005 Schüttelapparat mit Kreisbewegung	GFL, Burgwendel, Deutschland
Glimmer-Sägeblatt 0,4 mm	Seipp, Langgöns, Deutschland
Hera freeze -80 °C freezer	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Ikamag RCT Magnetrührer/Heizplatte	IKA, Staufen, Deutschland
Inverses Durchlichtmikroskop Televal 31	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Leica DM5000 B	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica DFC290	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica M 125	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica MZ16 FA	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Luminescent Image Analyzer LAS-4000	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Microm HM 355S	MICROM, Walldorf, Deutschland
Multifuge 3 L-R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Neubauerzählkammer	LO Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland
Pinzette Dumont 5-Inox-E	Sigma, Osterode, Deutschland
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Microflow Laminar Downflow Workstation	Bioquell, UK
Varistain™ 24-4 Automatic Slide Stainer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Sunrise™ Mikrotiterplatten-Lesegerät	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Shandon Citadel 2000 tissue processor	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Shandon Histocentre™ 3	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Taumelrollmischer RM 5	Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland
Thermocycler 60 Wasserbad	Bio-med GmbH, Theres, Deutschland
Tischzentrifuge 1-15k	Sigma, Osterode, Deutschland
Ultra Low -152 °C freezer	Sanyo, München, Deutschland
Vortex Genie 2	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Waage L2200S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Köttermann Uetze/Hänigsen, Deutschland
Zeiss Axis Kop 40	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland

Tabelle 2-2: verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96-Well-Platte (Rund-/Flachboden)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Bijou Container 7 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Cellstar tissue culture dishes	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Einbettformen aus Metall	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filter Tips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filtropur S 0,2	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Leukosilk	BSN medical, Hamburg Deutschland
Nitrozellulosemembran Hybond™-C Extra	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Objektträger Super Frost®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pasteur-Plast Pipetten, steril	ratiolab®, Dreieich, Deutschland
Perfusor® Syringe 50 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Polycarbonat Membran 8µm	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Polystyrene Round-Bottom Tube 5 ml	BD Biosciences, New Jersey, USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotilabo®- Einbettkassetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filterpapier (Diethylaminoethyl-Zellulose)	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Zellkulturflaschen mit Belüftungskappe (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²) für Suspensions- und adhärenente Zellen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2-3: verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
4-IPBA (4-Iodophenylboronic acid)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
α-Thioglycerol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid 40 %	BioRad, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS) (10 % in H ₂ O)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Auto MACS™ Running Buffer	Miltenyi Biotec, Gladbach, Deutschland
BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD Biosciences, New Jersey, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Calcium-Chlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Complete™ Proteinaseinhibitor Cocktail Tablets	Roche, Basel, Schweiz
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DPX Eindeckmedium für Histologie	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
EGM™ -2MV BulettKit™	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin B	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99 %	J.T. Baker, Griesheim, Deutschland

Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Formaldehyd Lösung 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Full Range Rainbow Molecular Weight Markers RPN800E	GE Healthcare, München, Deutschland
Giemsa Stammlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kalium-Chlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Mayer's haemalaun solution	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol 99 %	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Chlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natrium dodecy sulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Desoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NP-40 Igepal (Nonidet P-40)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paralplast Plus®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Phos-Stop	Roche, Basel, Schweiz
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Pikrinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Puromycin	Invivo Gen, San Diego, USA
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ponceau S- Lösung (0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
ReBlot plus mild	Millipore, Schwalbach/Ts. Deutschland
rhVEGF ₁₆₅ (<i>recombinant human vascular endothelial growth factor</i>)	PeptoTech, New Jersey, USA
Roti®-Load (4x Probenpuffer)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Quant	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Histokit II	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RPMI-1640 mit L-Glutamin	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
SPF (specific pathogen free), befruchtete, weiße Leghorn-Eier	VALO BioMedia, Osterholz-Scharmbeck, Deutschland
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trisbase Salzlösung (TBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau 0.4 % in PBS	GIBCO BRL, Life Technologies, Eggenstein Deutschland
Trypsin / EDTA (Ethylendiamintetraacetat) Solution (10x)	Biochrom, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween-20 (T)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wasser HPLC Grad	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 2-4: verwendete Puffer, Lösungen und Ansätze

Puffer / Lösung / Ansatz	Zutaten
4x SDS Probenpuffer	500 µl Roti®Load 1 (4x) 1% gesättigte Bromphenolblau-Lösung
4 % Paraformaldehyd	4 % PFA in PBS
Blockierlösung I	5 % BSA in TBS-T 0,1 %
Blockierlösung II	5 % Milchpulver in TBS-T 0,1 %
Bouin-Fixanz (wässriges Bouin)	45 ml Formaldehyd 37 % 15 ml Pikrinsäure 3 ml Essigsäure 100 %
Einfriermedium	90 % (v/v) FCS 10 % (v/v) DMSO
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	25 mM Trisbase 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS
Lockelösung	152.45 mM NaCl 5.64 mM KCl 2.14 mM CaCl ₂
Luminol-Lösung	100 mM Tris/HCl pH 8,8 2,5 mM Luminol 4 mM 4-IPBA
MACS-Puffer	1x PBS 0.5% (w/v) BSA
Mayer's Haemalaun-Lösung	1 g Hämalan 1000 ml Aqua bidest. 0,2 g NaJO ₃ 50 g Kalialaun 50 g Chloraldehydrat 1 g Zitronensäure
RIPA (<i>radio-immunoprecipitation assay</i>)- Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM TrisHCl (pH 7,4) 1 % (v/v) NP-40 (Igepal) 0,25 % (w/v) Natriumdeoxycholat 0,1 % (w/v) SDS PMSF 10 mg/ml (10 µl/ml RIPA-Stocklösung; frisch zugeben) Complete (Proteasehemmer) 20x (40 µl/ml; frisch zugeben) Phos-Stop 20x (40 µl/ml; frisch zugeben)
Sammelgellösung (5 % Gel)	15 % (v/v) Acrylamid/Bis Solution (40 %) 125 mM Tris Base pH 6.8 0.1 % (w/v) SDS 5 mM EDTA
Sammelgel (für ein Gel)	2,5 ml Sammelgel-Mix 20 µl APS (10 %) 7,5 µl TEMED
TBS (1x)	20 mM Tris-Base pH 7,6 137 mM NaCl pH 7,6
Trypsin / EDTA Solution (10x)	0,5 % Trypsin (w/v) 0,2 % EDTA (w/v)

	In 10x PBS w/o Ca, w/o Mg gelöst in 1:10 Aqua bidest.
TBS-T	1x TBS pH 7,6 0,1 % (v/v) Tween-20
Transferpuffer (10x)	25 mM Trisbase pH 8,3 192 mM Glycin 15 % (v/v) Methanol
Trenngel-Mix (10 % Gel)	31.3 % (v/v) Acrylamid/Bis Solution (40 %) 332 mM Tris Base, pH 8.9 3.33 mM EDTA
10 % Trenngel (für 1 Gel)	5 ml Trenngel-Mix 40 µl APS (10 %) 15 µl TEMED
Trypanblau-Lösung	PBS 0,4 % (w/v) Trypanblau
Zellkultur-Medium (für BL-2 Wildtyp)	RPMI-1640 mit 4 mM L-Glutamin 10 % FCS 1 % P/S
Zellkultur-Medium	RPMI-1640 mit 4 mM L-Glutamin 10 % FCS 1 % P/S 1 µg/ml Puromycin
Zellkultur-Medium (für HUVEC)	<u>EGMTM-2MV BulettKitTM</u> 500 ml Basalmedium 25 ml FCS 0,2 ml Hydrocortison 0,5 ml Ascorbic Acid 0,5 ml rhEGF (<i>recombinant human epidermal growth factor</i>) 0,5 ml R ³ -IGF-1 (<i>insulin-like growth factor-1</i>) 2,0 ml rhFGF-B (<i>recombinant human fibroblast growth factor-basic</i>) 0,5 ml VEGF

2.1.4 Antikörper

Tabelle 2-5: verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung für Immunoblot
Goat anti-mouse IgG-HRP (D1609)	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	1:20000 in 5 % Milchpulver in T-BST 0,1 %
Goat anti-rabbit IgG-HRP (E1710)	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	1:2000 in 5 % BSA in T-BST 0,1 %
Mouse anti-GAPDH (6C5)	Abcam, Cambridge, UK	1:20000 in 5 % Milchpulver in T-BST 0,1 %
Rabbit anti-LEF1 (C18A7)	CellSignaling, Cambridge, UK	1:1000 in 5 % BSA in T-BST 0,1 %

2.1.5 Zelllinien

Tabelle 2-6: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
BL-2	B-Zelle, Burkitt Lymphom, EBV negativ, DMSZ Braunschweig (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen)	(Bertrand et al. 1981)
HUVEC (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)	Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene, Anatomie und Zellbiologie Göttingen	(Jaffe et al. 1973)

2.1.6 Software

Tabelle 2-7: verwendete Software

Software	Hersteller
FACS Diva Version 6.1.2	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Graph Pad Prism 5.04 for Windows	Graph Pad Software Inc., San Diego, USA
IC Capture 2.0	The Imaging Source, Bremen, Deutschland
Image J 1.48s (image processing and analysis in Java)	Rayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA
LAS v 3.8 Leica Application Suite	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Word, Power Point, Excel (Office 2010)	Microsoft, Redmont, USA
NIS Elements F 2.20	Nikon, Tokio, Japan

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Verwendete Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die Burkitt-Lymphom Zelllinie BL-2 und die aus der humanen Nabelschnur extrahierte Zelllinie HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) verwendet.

Die lymphatische, in Suspension wachsende BL-2 Zelllinie wurde 1979 aus dem Rückenmark eines 7-jährigen kaukasischen Patienten mit BL extrahiert und anschließend immortalisiert (Bertrand et al. 1981). Die Zellen wurden bei einer Konzentration von $0,3-1 \times 10^6$ pro ml in Zellkulturflaschen kultiviert und im Brutschrank unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Um die Zellen für Versuche zu nutzen, mussten sie eine Viabilität von mindestens 90 % aufweisen.

Die aus der Nabelschnurvene eines humanen Föten extrahierten HUVEC-Endothelzellen wurden bis zu einer Konfluenz von circa 70 % - 95 % kultiviert und anschließend in einem Verhältnis von 1:3 – 1:6 gesplittet und somit passagiert. Versuche wurden bis maximal Passage fünf durchgeführt. Zum Ablösen der adhärenen Zellen wurde 1 ml EDTA / Trypsin Lösung verwendet. Zuvor wurden die Zellen zweimalig mit 10 ml PBS gewaschen. Nach 3-minütigem Inkubieren der Zellen bei 37 °C war das Ablösen der Endothelzellen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch zu erkennen. Auf die abgelösten Zellen wurden 9 ml FCS-haltiges Medium gegeben und die Zellen bei 120 g und 21 °C für 7 min zentrifugiert und unter den oben genannten Bedingungen inkubiert.

Stabile *LEF1*-Knockdown Zelllinien

Für die Analyse von LEF1 im Xenograft-Modell wurden genetisch modifizierte BL-2 Zelllinien zur Verfügung gestellt, in denen *LEF1* mit Hilfe einer shRNA herunterreguliert wurde. Für den LEF1-KD wurde die Modelllinie BL-2 mit einem pGIPZ Konstrukt lentiviral transduziert. Der Vektor trägt den Selektionsmarker GFP (*green fluorescent protein*), eine Puromycinresistenz und ein Fragment, das eine shRNA (*small hairpin RNA*) codiert. Das DNA-Konstrukt wurde stabil in das Genom der BL-2 Zelllinie eingebaut und wird so an die Tochtergenerationen weiter vererbt. Sobald während der Transkription der Bereich von der Polymerase abgelesen wird, entsteht eine shRNA, die komplementär zur mRNA von LEF1 ist und an diese bindet. Durch diese künstlich entstandene RNA Interferenz kommt es zur Degradation der mRNA die LEF1 codiert und der Transkriptionsfaktor wird herunterreguliert.

Bei den in Tabelle 2-8 aufgeführten sechs BL Zelllinien handelt es sich neben dem nicht veränderten BL-2-Wildtyp um fünf Zelllinien, die nach dem beschriebenen Prozess lentiviral transduziert wurden. Aber nur bei drei der transduzierten Zelllinien (BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP low, BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP high und BL-2 pGIPZ LEF1 shE) bindet die entstandene shRNA komplementär an die mRNA von LEF1 und fängt das Protein ab. Die Zelllinien BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP low und BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP high wurden nachträglich aus der Zelllinie BL-2 pGIPZ LEF1 shA anhand des unterschiedlichen GFP-Expressionsniveaus der Zelllinie fraktioniert (siehe 2.2.1.4).

Als Kontrollen dienten die unabhängig voneinander etablierten *non-silencing*-Zelllinien BL-2 pGIPZ ns-control 1 und BL-2 pGIPZ ns-control 2, die eine *scrambled* shRNA experi-

mieren. Die shRNA dieser Zelllinien kann nicht an Sequenzen im humanen Genom binden und verursacht dementsprechend auch keinen LEF1-KD.

Tabelle 2-8: verwendete Zelllinien

BL-2 Wildtyp
BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP low
BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP high
BL-2 pGIPZ LEF1 shE
BL-2 pGIPZ ns-control 1
BL-2 pGIPZ ns-control 2

2.2.1.2 Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl und -viabilität wurden die Zellen resuspendiert bzw. die HUVEC auf die oben beschriebene Weise abgelöst und anschließend ein 10 µl-Aliquot entnommen, das mit Trypanblau-Lösung in einem Verhältnis von 1:1 gemischt wurde. Dabei wurden tote Zellen, deren Zellwand für diesen Farbstoff permeabel ist, blau angefärbt und konnten durchlichtmikroskopisch erkannt werden. Zur Bestimmung der Konzentration der viablen Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer wurde folgende Formel verwendet: $\text{Zellen/ml} = (\Sigma \text{ der gezählten Zellen in allen 4 Quadranten} / 4) \times 2 \times 10^4$. Durch Multiplikation der ausgerechneten Konzentration mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension wurde dann die Gesamtzahl der Zellen bestimmt. Die Viabilität errechnet sich wie folgt: $\text{Viabilität [\%]} = (\text{Anzahl der lebendigen Zellen} / \text{Anzahl aller gezählten Zellen}) \times 100$.

2.2.1.3 Auftauen und Gefrierkonservierung eukaryotischer Zelllinien

Zur Kultivierung wurden die bei -150 °C in Einfriermedium gelagerten Lymphomzellen bzw. HUVEC-Endothelzellen zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend mit 9 ml vorgewärmten Medium gemischt. Zur Bestimmung der Zellzahl und Viabilität wurde ein Aliquot entnommen und die restliche Zellsuspension bei 21 °C für 7 min bei 120 g zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde anschließend in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen / ml (BL-2) bzw. 2500-5000 Zellen / cm² (HUVEC) in frischem Kulturmedium aufgenommen und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Gefrierkonservierung der eukaryotischen Zellen für die Langzeitaufbewahrung erfolgte mittels Kryokonservierung in Einfriermedium (10 % DMSO und 90 % FCS) bei 150 °C. Pro Kryo-Tube wurden 5×10^6 Zellen (BL-2) bzw. 1×10^6 (HUVEC) in 1 ml Ein-

friermedium eingefroren. Zum kontinuierlichen Runterkühlen der Zellen (1 °C / min) wurden die Tubes in Isopropanol-Gefrierboxen bei -80 °C zwischengekühlt.

2.2.1.4 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode, die die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom zulässt. Dabei wurden ca. 2×10^6 Zellen jeder Zelllinie in einem Rundboden-Röhrchen zentrifugiert (120 g, 7 min, 21 °C) und anschließend je 1 ml MACS-Puffer hinzugegeben. Kurz vor der Messung wurden die Zellen gevortext.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse werden die zu untersuchenden Zellen einzeln durch eine Flusskammer an einem Laserstrahl vorbeigeführt. In Abhängigkeit von der Zellgröße und Granularität verursacht eine Zelle, die den Laserstrahl kreuzt, ein Streulicht, das mittels Detektoren an zwei Stellen gemessen wird: zum einen in Richtung des ursprünglichen Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und zum anderen im 90°-Winkel zur ursprünglichen Richtung des Laserstrahls (Seitwärtsstreulicht). Das Vorwärtsstreulicht hängt vor allem von der Größe der Zelle ab. Neben der Größe beeinflusst auch der Inhalt einer Zelle das Seitwärtsstreulicht und gibt daher Auskunft über deren Granularität. Die gemessenen Zellen können dann in einem Dot Plot dargestellt und die verschiedenen Charakteristika der Zellpopulationen erkannt werden.

Zudem ermöglicht die Durchflusszytometrie die Messung des Fluoreszenzlichts einer Zelle, wenn die Zellen z.B. das *green fluorescent protein* (GFP) exprimieren und mit entsprechender Wellenlänge angeregt werden. So kann die GFP-Expression einer Zellpopulation charakterisiert werden.

Zellfraktionierung

Die Zelllinie BL-2 pGIPZ LEF1 shA, die eine unterschiedliche GFP-Expression und damit einen ungleich starken LEF1-KD aufweist, wurde anhand des GFP-Niveaus in zwei unterschiedliche Zelllinien (BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP low, BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP high) am FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) -Gerät fraktioniert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Nach Reanalysen, zur Überprüfung der Stabilität der Zelllinien wurden die sortierten Zellen in Kultur gehalten und weiterhin mittels Durchflusszytometrie überprüft.

2.2.1.5 Herstellung von Konditionierten Medien

Zum Anfertigen von Konditionierten Medien (CM) wurden die BL-Zelllinien in Puromycin-freiem Medium kultiviert und auf eine Konzentration von 3×10^5 Zellen / ml eingestellt. 48 h später wurden sie bei 120 g und 21 °C für 7 min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand (Konditioniertes Medium) wurde schließlich steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

2.2.1.6 Analyse der Migration mittels Boyden-Kammer

Endothelzellen besitzen die Fähigkeit, in Richtung eines angiogenen Stimulus zu wandern. Diese Migration lässt sich mithilfe einer Boyden-Kammer untersuchen (Boyden 1962). Das Prinzip des Tests besteht in einem Zwei-Kammer-System, bei dem die beiden Kammern durch einen Membranfilter mit 8-µm-Poren (**Abbildung 2-1**, Pfeil) voneinander getrennt wurden. Die Aussaat der HUVEC-Endothelzellen erfolgte in die obere Kammer, während chemotaktische Lösungen in die untere Kammer gegeben wurden. Die Zellen migrierten von der oberen Kammer durch die mit 0,1 %iger Gelatine (Pulver-Gelatine in Aqua bidest.) beschichtete Membran in Richtung des angiogenen Stimulus, wobei sie schließlich an der Unterseite der Membran haften blieben. Die migrierten Zellen konnten im Anschluss fixiert, gefärbt und gezählt werden, sodass die Quantität der Migration bestimmt werden konnte.

Am Vortag des Versuchs wurden die HUVEC über Nacht (ü. N.) in sog. „Mangelmedium“ inkubiert. Dieses bestand aus dem Kulturmedium EGMTM-2MV (EBM-Basalmedium + Zusätze), jedoch abzüglich der Wachstumsfaktoren rhVEGF (*recombinant human vascular endothelial growth factor*) und rhFGF (*recombinant human fibroblast growth factor*). Vor dem Mediumwechsel wurden die Zellen zweimalig mit je 10 ml PBS gewaschen. Am Versuchstag wurden je 28 µl folgender Lösungen in die Vertiefungen der unteren Kammer pipettiert:

- RPMI
- RPMI + 10 ng/ml rhVEGF
- EGMTM-2MV
- CM BL-2
- CM BL-2 LEF1 sh2
- CM BL-2 LEF1 sh3
- CM BL-2 scrb 1
- CM BL-2 scrb 2

Die beschichtete Membran wurde luftblasenfrei auf die untere Kammer aufgelegt und die obere Kammer darauf fest verschraubt. Je 50 μ l à 15000 HUVEC-Zellen, resuspendiert in RPMI + 0,5 % FCS, wurden in jede Vertiefung pipettiert und die Endothelzellen in der Boyden-Kammer für 4 h im Brutschrank inkubiert. Jede Bedingung wurde sechs Mal angesetzt.

Nach der Migrationszeit wurde das Medium der oberen Kammer abgenommen und die Membran entnommen. Die obere Seite der Membran wurde mit PBS befeuchtet und mechanisch gereinigt, um überflüssiges Medium und nicht migrierte Zellen zu entfernen. Nach erneutem Waschen der oberen Membranseite mit PBS wurde die gesamte Membran in 99 % Methanol für 5 min fixiert und danach getrocknet. Anschließend wurde eine HE- (3 min in Hämatoxylin, 2 min in Eosin) bzw. Giemsa-Färbung (8 min) durchgeführt. Nach erneutem Waschen der Membran in PBS und anschließender Trocknung wurde sie mittig zerschnitten und mit Roti®-Histokit II und Deckgläsern auf zwei Objektträgern befestigt und zum Trocknen ü. N. gelagert.

Zur Auswertung und Quantifizierung der migrierten HUVEC wurden die gefärbten Zellen unter dem Lichtmikroskop fotografisch erfasst. Dafür wurden pro Bedingung 18 Fotos erstellt (drei Fotos pro Vertiefung) und die Anzahl der Zellen je Foto mit dem Programm Image J bestimmt (**Abbildung 2-1**). Aus der Anzahl der migrierten Zellen von drei Fotografien wurde ein Mittelwert gebildet. Auf diese Weise entstanden pro Bedingung / chemotaktischer Lösung sechs Mittelwerte. Anschließend wurde die Software Graph Pad verwendet, um die Migrationsrate darzustellen. Die Migration in Richtung des RPMI-Mediums ohne zusätzlichen Stimulus wurde als Referenz (= eins) gesetzt.

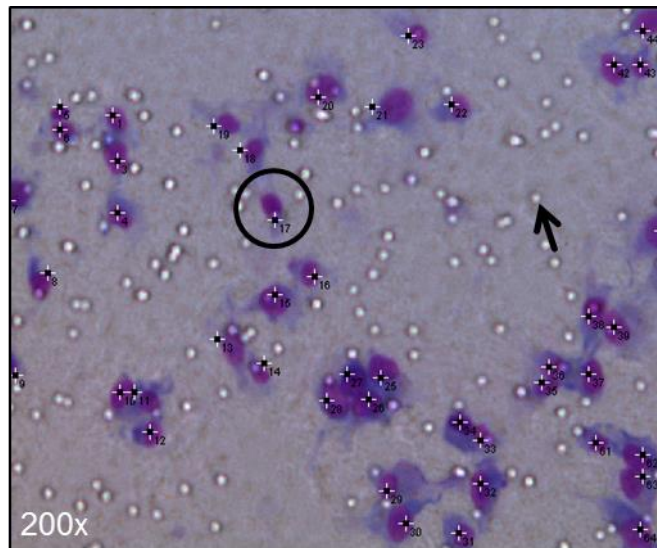


Abbildung 2-1: Auszählung der migrierten HUVEC-Endothelzellen. Bestimmung der Anzahl der migrierten HUVEC-Zellen (blau-violett angefärbt) mit dem Programm Image J (Kreis). Der Pfeil zeigt auf eine 8- μ m-Pore der Membran.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Zellyse

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden 2×10^6 Zellen jeder Zelllinie bei 21 °C für 7 min bei 120 g sedimentiert, mit je 1 ml PBS resuspendiert und anschließend bei 4 °C für 3 min bei 400 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 100 μ l RIPA-Lysepuffer resuspendiert, wodurch sich die Zellmembranen auflösten und die Proteine freigesetzt wurden. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 14500 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine enthält, wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Zellysaten erfolgte durch die Methode nach Bradford (Bradford 1976). Dabei basiert das zugrunde liegende Prinzip auf der Bindung des Säurefarbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an basische und aromatische Aminosäuren in saurer Lösung und einer daraus resultierenden Verschiebung des Farbstoff-Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm. Je höher die Proteinkonzentration einer Probe ist, desto höher ist auch die Absorption bei 595 nm.

Die Zellysate der Proben bzw. der Referenz-RIPA-Puffer für den Leerwert wurden mit destilliertem Wasser 1:40 verdünnt und jeweils 50 μ l der Verdünnung in Triplikaten in

einer 96-Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurden 200 µl der 1x Roti®Quant Lösung auf die vorgelegten Proben pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend die jeweilige OD₅₉₅ photometrisch gemessen. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Standardkurve, die zuvor mit einer BSA (*bovine serum albumin*)- Verdünnungsreihe [0 µg / ml – 100 µl / ml] bestimmt worden war.

2.2.2.3 Immunoblot-Analyse

Die Immunoblot-Analyse, auch Western Blot (WB) genannt, setzt sich aus einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran und dem anschließenden Nachweis der zu untersuchenden Proteine mittels spezifischer Antikörper zusammen.

Tris-Glycin-SDS-PAGE

Bei der hier durchgeführten Elektrophorese handelt es sich um eine diskontinuierliche Sodiumdodecylsulfat (SDS)- PAGE (Laemmli 1970; Ahn et al. 2001), bei der die Proteine zuerst in einem Sammelgel mit neutralem pH konzentriert und anschließend in einem Trenngel mit basischem pH überführt werden, wodurch die eigentliche Trennung erfolgt. Durch den Zusatz des SDS-Detergens wurden die Proteine denaturiert und zusätzlich eine negative Gesamtladung eingeführt. Die Proben wurden mit 4 x SDS-Probenpuffer vermischt, bei 95 °C für 5 min erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Je Probe wurden 25 µg Protein in eine Tasche eingesetzt. Zum Vergleich wurde ein Protein-Molekulargewicht-Standard mitgeführt. Die Elektrophorese, bei der die Proteine nach ihrem Molekulargewicht voneinander getrennt werden, erfolgte in Laufpuffer zunächst bei 20 mA für ca. 15 min. Mit Erreichen des 10 %igen Trenngels der Lauffront wurde auf 40 mA erhöht, bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreichte.

Transfer

Für den Transfer der Proteine auf ein geeignetes Trägermaterial wurden die nach Größe separierten Proteine aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der sog. Nassblot wurde in einer mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer, die mit einem Kühl-Akku versehen wurde, durchgeführt, wobei der Transfer für 1 h bei 4 °C und einer konstanten Spannung von 100 V erfolgte. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran mit dem roten

Azofarbstoff Ponceau S reversibel gefärbt. Das Ponceaubild wurde fotografisch dokumentiert und die Membran mit TBS-Tween (TBS-T) 0,1 % wieder entfärbt.

Proteindetektion mittels spezifischer Antikörper

Zunächst muss zur Prävention unspezifischer Antikörperbindungsstellen die Membran mit Blockierlösung I (1 h / RT) unter ständigem Schwenken inkubiert werden. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBST-T 0,1 % wurde sie mit dem Primärantikörper Anti-LEF1 unter leichtem Schwenken bei 4 °C ü. N. inkubiert. Am nächsten Tag wurden ungebundene Antikörper unter dreimal 10-minütigem Waschen (ebenfalls TBST-T 0,1 %) entfernt. Nachfolgend wurde die gewaschene Membran für 1 h bei RT mit der Sekundärantikörperlösung (goat anti-rabbit IgG-HRP) inkubiert. Dieser Sekundärantikörper erkennt Spezies-spezifisch den Primärantikörper und bindet an diesen. An den Sekundärantikörper ist zudem eine Peroxidase aus dem Meerrettich (Horseradish-Peroxidase, HRP) gekoppelt, die eine Chemolumineszenzreaktion katalysieren kann. Nach weiteren drei Waschschritten wie zuvor wurde die Membran in einer luminolhaltigen Peroxid-Lösung inkubiert und das dabei entstandene Licht mittels Luminescent Image Analyser (Fujifilm) detektiert.

Mehrfachfärbung der Nitrozellulosemembran

Um auf derselben Membran einen weiteren Antikörpernachweis durchzuführen, mussten die zuvor gebundenen Antikörper entfernt werden. Dazu wurde die Membran für 15 min bei RT mit 1x Re-blot plus Mild-Lösung inkubiert. Die Membran wurde dann dreimal mit TBS-T 0,1 % gewaschen. Nach erneutem Blockieren der Membran in Blockierlösung II wurde sie mit einem weiteren Primärantikörper, hier anti-GAPDH (Anti- Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), für 1 h bei RT inkubiert. Dieser Antikörper dient dem Nachweis einer korrekten Protein-Beladung (endogene Kontrolle). Die Membran wurde wiederholt gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (goat anti-mouse IgG HRP) inkubiert. Nach dem oben beschriebenen Verfahren wurde GAPDH durch die genannte Chemolumineszenzreaktion detektiert.

2.2.3 CAM-Assay

Experimentelle *in vivo*-Xenograft-Tumor-Modelle veranschaulichen systemische Krebserkrankungen, hervorgerufen durch humane Tumorzellen, die immuninkompetenten Tieren

injiziert werden (Khanna und Hunter 2005). Der CAM-Assay ist ein Verfahren, um Tumorbildung und –progress *in vivo* im Hühnchenmodell zu untersuchen.

Der embryonale Ursprung der CAM

Bis zum Zeitpunkt des Schlüpfens dauert die Entwicklung eines Hühnerembryos 21 Tage (Ribatti 2010). Die höchstens 100 µm dicke CAM, die der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Embryos dient (Deryugina und Quigley 2008), wird zwischen Tag fünf und sechs der embryonalen Entwicklung durch Fusion von Chorion (Zottenhaut) und Allantois (embryonale Harnblase) gebildet (Romanoff 1960).

Der Ablauf des Assays beinhaltet das Freilegen der CAM unter Benutzung steriler Werkzeuge, das Beimpfen der Membran mit *in vitro* kultivierten Tumorzellen und die Extraktion des entstandenen Tumors. Um sie zu untersuchen, werden die Tumoren anschließend fixiert, eingebettet, geschnitten und angefärbt.

Freilegen der CAM

Nach viertägiger Bebrütung der pathogenfreien befruchteten Hühnereier bei 37,8 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit wurde an Tag vier der Embryonalentwicklung die CAM durch ein etwa 0,75 cm² großes Fenster der obersten Eischale freigelegt. Im Anschluss daran wurden die Öffnungen mit Leukosilk verschlossen und die Eier weitere sieben Tage im Brutschrank inkubiert.

Beimpfung der CAM mit BL-Tumorzellen

An Tag elf der Hühnerentwicklung - zu diesem Zeitpunkt ist die CAM schon stark mit Blutgefäßen durchzogen - wurden Tumorzellen jeder Zelllinie auf die freigelegte CAM pipettiert. Dazu wurden die BL-Tumorzellen zuvor expandiert und ggf. zwei Tage vor der Beimpfung mit Puromycin-freiem Medium kultiviert und am Tag der Beimpfung bei 120 g, 21 °C für 7 min zentrifugiert und das Zellpellet mit BD MatrigelTM gemischt. In 20 µl Tropfen mit je 2x10⁶ Zellen wurden die Lymphomzellen schließlich auf die Membran pipettiert. Die beimpften Eier wurden verschlossen und für weitere vier Tage im Brutschrank inkubiert.

Extraktion und Fixierung der BL-Tumoren

Am 15. Tag der Embryogenese wurden die Tumoren freigelegt, geerntet und in PBS gewaschen. Weiterhin wurden die Tumoren lichtmikroskopisch analysiert. Die Lymphome der viral transduzierten Zelllinien konnten zusätzlich aufgrund des eingebauten GFP-Fragments unter dem Fluoreszenz-Mikroskop detektiert werden. Die Tumoren wurden dann für 15 min in 4 % PFA (Paraformaldehyd) und anschließend in wässriger Bouin-Lösung fixiert. Schließlich wurden sie in Schnappdeckelgläser überführt und für mindestens eine Woche bei 4 °C gelagert.

Flächenbestimmung der Tumoren

Anhand der nach der Tumorextraktion entstandenen Lichtbild-Fotografien konnten die Tumorflächen mithilfe des Programms Image J vermessen werden. Dazu wurde der Tumorrand mit der Computermaus umfahren und die Fläche, bezogen auf eine 1 cm-Skala, ausgerechnet.

Einbettung der fixierten Tumoren in Paraffin

Nach der einwöchigen Fixierung in wässriger Bouin-Lösung wurden die Tumoren für die Einbettung in Paraffin vorbereitet. Dafür wurden sie in Einbettkassetten ü. N. bei 4 °C in 70 % Ethanol inkubiert, um am nächsten Tag maschinell eingebettet zu werden. In diesem Vorgang wurden sie in einer Ethanolreihe (70 % für 3 h, 80 % für 1 h, 90 % für 1 h, 96 % für 1 h, 99 % für 2 h) belassen und danach für 1,5 h in Isopropanol inkubiert. Nach dreimaliger Inkubation in Xylol (30 min, 45 min, 45 min), härteten sie zunächst für 30 min, danach für 7 h bei 60 °C in Paraplast Plus® aus. Anschließend wurden die Tumoren in Metallschalen in Paraffin eingebettet und kühlten ü. N. aus. Danach wurden die sich in Paraffinblöcken befindlichen Tumoren mit dem Mikrotom geschnitten, um anschließend auf Objektträger überführt zu werden. Die Schnittdicke lag zwischen 3 µm und 6 µm.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach 24-stündigem Trocknen der Tumorschnitte wurden diese anschließend mit Hämatoxylin / Eosin (HE) angefärbt. Bei diesem Färbevorgang wurden die Tumorschnitte maschinell zweimalig in Xylol für jeweils 5 min entparaffiniert und anschließend für 2 min in 99 %igem Ethanol inkubiert. Danach durchliefen sie eine Ethanolreihe (96 %, 80 %, 60 %) für je 2 min und wurden 2 min in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend inku-

bierten sie 4 min lang in Mayer´s Hämalaun-Lösung und wurden danach wieder für 1 min in destilliertem Wasser gewaschen. Nach anschließendem Auswaschen (15 min) unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte für 7 min in Eosin inkubiert und erneut 1 min lang in destilliertem Wasser gewaschen. Schließlich durchliefen sie erneut eine Ethanolreihe (60 %, 80 %, 96 %) für je 1 min und wurden dann zweimalig je 2 min lang in 99 % Ethanol belassen. Zum Abschluss wurden die Tumorschnitte nochmals für 3 min in Xylol entparaffiniert. Im feuchten Zustand wurden sie schließlich mit DPX Eindeckmedium und Deckgläsern eingedeckt. Nach dem Trocknen ü. N. konnten die Schnitte lichtmikroskopisch analysiert und fotografiert werden.

Ermittlung der Hämorrhagien mittels Score

Die doppelblinde systematische Auszählung der hämorrhagischen Tumoren wurde mit Hilfe eines in der Arbeitsgruppe etablierten Punkte-Scores (0-9 Punkte) durchgeführt (Linke et al. 2016). Dabei basierte der Punkte-Index auf folgenden drei Kriterien: Erscheinungsbild der Hämorrhagie, Blutungs-Intensität und relative Fläche. Jedes der drei Kriterien konnte maximal drei Punkte erreichen, womit eine Gesamtpunktzahl von neun Punkten vergeben werden konnte (Beispiele siehe Linke et al. 2016).

2.2.4 Statistik

Die Ergebnisse der Experimente wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (Mittelwert \pm SEM) angegeben. Gruppenergebnisse wurden statistisch mittels ANOVA-Verfahren (One-way Analysis of Variance) und anschließend Dunnett post-Test verglichen. Die erforderlichen Testbedingungen, Normalverteilung und Varianzgleichheit wurden mithilfe des Kolmogorov–Smirnov Tests bzw. des F-Tests ermittelt. Das Signifikanzniveau lag bei *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$. Die Analysen wurden mit GraphPad Prism 5.04 durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 LEF1-defiziente BL-Zellen zeigen eine geringere Lymphomvaskularisierung

Um den Einfluss von LEF1 auf das Tumorzellwachstum von Burkitt-Lymphomzellen zu untersuchen, wurde ein *in vivo*-Xenograft-Modell verwendet, das zuvor durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe etabliert wurde (Becker et al. 2012). Dabei handelt es sich um die Übertragung einer aus dem Menschen etablierten Lymphom-Zelllinie auf die Chorion-Allantois-Membran eines Hühner-Embryos.

3.1.1 BL-2 als Modell-Zelllinie für das Burkitt-Lymphom

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen handelt es sich um die humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie BL-2 sowie die genetisch manipulierten BL-2 Zelllinien BL-2 pGIPZ LEF1 shA und BL-2 pGIPZ LEF1 shE, in denen LEF1 durch stabile lentivirale Transduktionen einer shRNA herunterreguliert wurde (LEF1-KD). Die Zelllinie BL-2 pGIPZ LEF1 shA, die schon in Vorarbeiten von Dr. Stefan Ueberdiek (Ueberdiek 2016) auf die CAM appliziert wurde, weist durch eine unterschiedliche GFP-Expression auf eine Mischung und damit auf einen ungleich starken LEF1-KD hin (**Abbildung 3-1 A**, **Abbildung 3-2 A**).

Daraufhin wurde die Zelllinie BL-2 pGIPZ LEF1 shA anhand des GFP-Niveaus (*low* und *high*) mittels FACS-Sortierung in zwei unterschiedliche Zelllinien fraktioniert: BL-2 pGIPZ LEF1 shA low und BL-2 pGIPZ LEF1 shA high (**Abbildung 3-2 B, C**).

Als Kontrollen dienten die unabhängig voneinander etablierten *non-silencing*-Zelllinien BL-2 pGIPZ ns-control 1 und BL-2 pGIPZ ns-control 2, die eine *scrambled* shRNA exprimieren. Mit Hilfe eines ³H-Thymidin-Inkorporations-Assays wurde im Voraus die Zellproliferation der Zelllinien getestet (Ueberdiek 2016). Nach Reanalysen zur Überprüfung der Stabilität der Zelllinien wurden die sortierten Zellen in Kultur gehalten und weiterhin mittels Durchflusszytometrie überprüft.

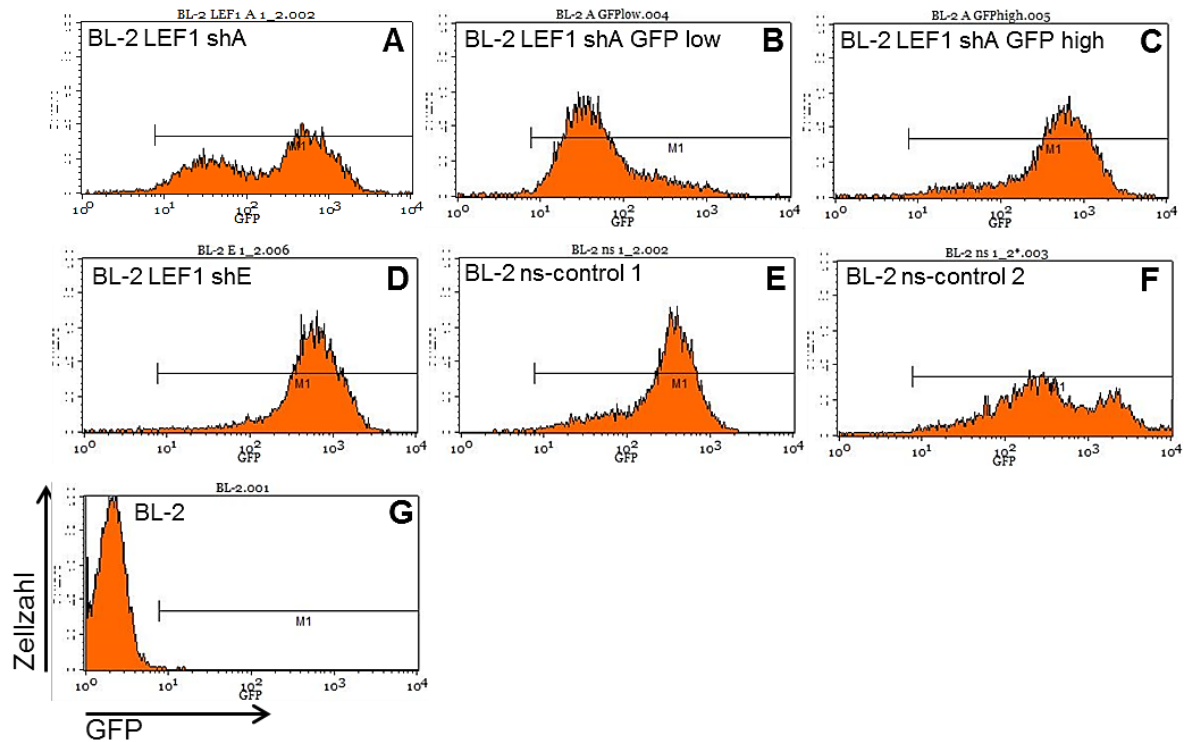


Abbildung 3-1: Durchflusszytometrische Charakterisierung der GFP-Expression in BL-2 Zellen. Die Abbildung zeigt die FACS-Sortierung der Zelllinie BL-2 pGIPZ LEF1 shA (A), in der die zwei klar unterscheidbaren Sub-Populationen der GFP-exprimierenden BL-2 Zellen nach LEF1-shRNA-Transduktion zu sehen sind. Diese Zellen wurden, wie in **Abbildung 3-2** dargestellt, sortiert. (B) BL-2 LEF1 shA Zellen mit niedriger GFP-Expression, (C) BL-2 LEF1 shA Zellen mit hoher GFP-Expression, (D) BL-2 LEF1 shE Zellen mit hoher GFP-Expression, (E/F) BL-2 ns Kontrollzellen. Die parentale BL-2 Zelllinie (G) exprimiert kein GFP.

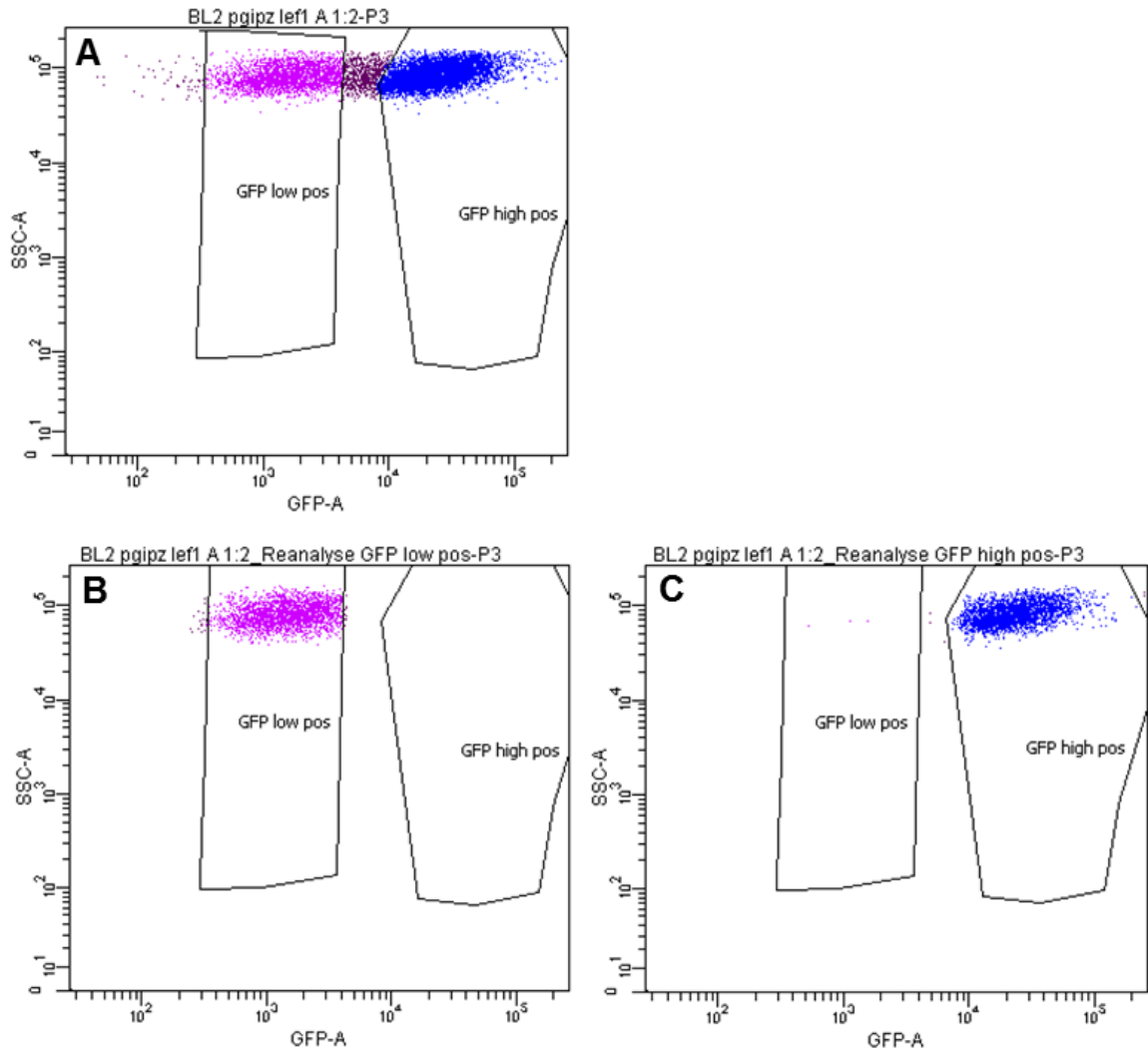


Abbildung 3-2: Subfraktionierung der Mischzelllinie BL-2 pGIPZ LEF1 shA.

Die Abbildung zeigt die Subfraktionierung der Mischzelllinie BL-2 pGIPZ LEF1 shA (A) in die Subzelllinien BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP low (B) und BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP high (C) mittels FACS-Sortierung. Die Fraktionierung wurde anhand des unterschiedlichen GFP-Expressionsniveaus (low und high) durchgeführt. GFP low-positive und GFP high-positive Zellen wurden, basierend auf Fluoreszenz (GFP-A) und Seitwärtsstreulicht (SSC-A), isoliert. (B) und (C) zeigen Reanalysen zur Überprüfung der Stabilität der Fraktionierung.

Die **Tabelle 3-1** zeigt die im Folgenden verwendeten Abkürzungen der Zelllinien.

Tabelle 3-1: verwendete Zelllinien und deren Abkürzungen.

BL-2 Wildtyp	BL-2
BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP low	BL-2 LEF1 sh1
BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP high	BL-2 LEF1 sh2
BL-2 pGIPZ LEF1 shE	BL-2 LEF1 sh3
BL-2 pGIPZ ns-control 1	BL-2 scrb 1
BL-2 pGIPZ ns-control 2	BL-2 scrb 2

Der LEF1-KD der lentiviral transduzierten Zelllinien auf Proteinebene ist in einem repräsentativen Immunoblot in **Abbildung 3-3** dargestellt. Es ist eine deutlich geringere Proteinmenge in den drei *LEF1*-shRNA exprimierenden Zelllinien BL-2 LEF1 sh1 (ursprüngliche Bezeichnung: BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP low), BL-2 LEF1 sh2 (ursprüngliche Bezeichnung: BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP high) und BL-2 LEF1 sh3 (ursprüngliche Bezeichnung: BL-2 pGIPZ LEF1 shE) zu erkennen. Dabei ist auffällig, dass BL-2 LEF1 sh1 - entsprechend der geringeren GFP-Expression (GFP low) - im Vergleich zu den anderen KD-Zelllinien noch am meisten LEF1 exprimiert. Die Kontrollen BL-2 scrb 1 (ursprüngliche Bezeichnung: BL-2 pGIPZ ns-control 1) und BL-2 scrb 2 (ursprüngliche Bezeichnung: BL-2 pGIPZ ns-control 2) weisen eine ähnliche LEF1-Proteinmenge wie die parentale BL-2 Zelllinie auf.

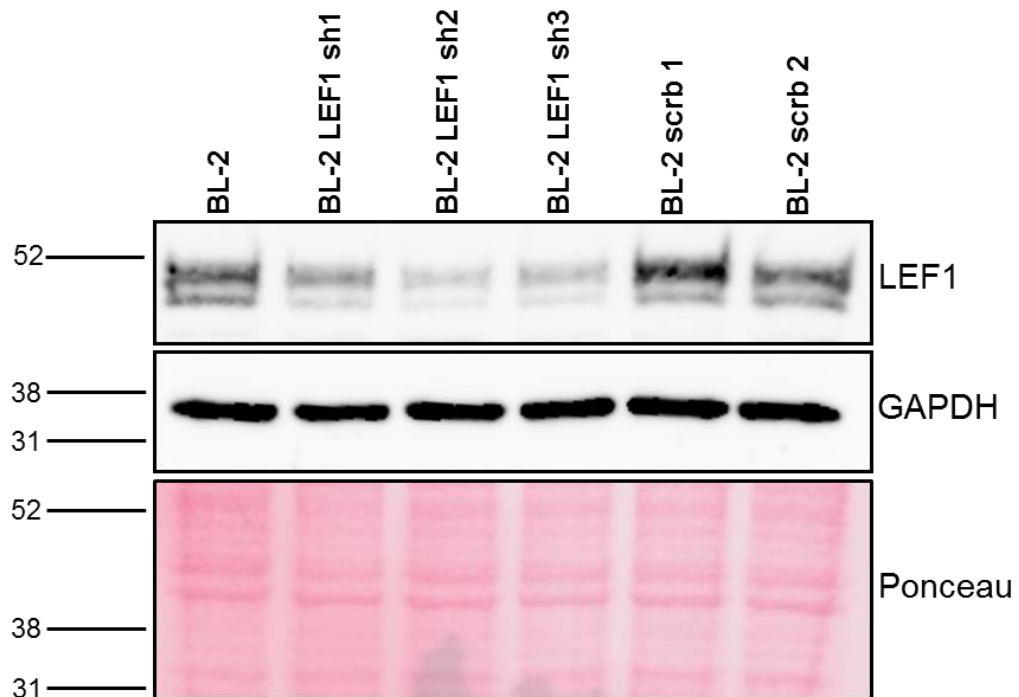


Abbildung 3-3: Nachweis der LEF1-Expression in BL-2 Zellen. Die Abbildung zeigt vergleichende Immunoblotanalysen von BL-2 Zellen in denen die LEF1-Expression mittels RNA-Interferenz gehemmt wurde. Dargestellt sind die parentale BL-2 Zelllinie, sowie die nach FACS-Sortierung separierten, *LEF1* shRNA exprimierenden BL-2-Subzelllinien BL-2 LEF1 sh1, BL-2 LEF1 sh2, und BL-2 LEF1 sh3. Die scrb-shRNA exprimierenden Kontrollzelllinien BL-2 scrb 1 und BL-2 scrb 2, die nicht an Sequenzen im humanen Genom binden können und somit auch keinen LEF1-KD verursachen, dienen dem Vergleich. Dargestellt sind die Volllängen und die Exon-6 deletierte Variante von LEF1. GAPDH und Ponceau-Färbung dienen als Beladungskontrollen. Auf der linken Seite der Abbildung sind die Proteinmarker in kDa angegeben.

3.1.2 Ergebnisse der Analysen im CAM-Assay

Im nächsten Schritt wurde das Anwachsen von Lymphomzellen der neu sortierten und unterschiedlich LEF1-exprimierenden BL-2 Zelllinien im Vergleich zur parentalen BL-2 Zelllinie untersucht.

Für die *in vivo*-Auswirkungen des LEF1-KD in BL-Zellen wurde die CAM eines Hühnerembryos mit den zuvor beschriebenen *in vitro* kultivierten Zelllinien BL-2, BL-2 scrb 1 und BL-2 scrb 2, BL-2 LEF1 sh1, BL-2 LEF1 sh2 und BL-2 LEF1 sh3 beimpft (siehe 2.2.3). Die auf der CAM gewachsenen soliden und scharf begrenzten Tumoren wurden anschließend herausgeschnitten und charakterisiert. Neben lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden auch Fluoreszenz-Fotos von Tumoren der GFP-exprimierenden BL-2 Zellen erstellt. Die Paraffinschnitte der Lymphome wurden anschließend mit HE eingefärbt und konnten lichtmikroskopisch analysiert werden.

Tabelle 3-2 fasst die Anzahl der in fünf biologischen Replikaten des CAM-Assays geernteten Tumoren pro Zelllinie und deren durchschnittliche Flächen zusammen. Die Flächen wurden anhand der lichtmikroskopischen Fotos mit dem Programm Image J bestimmt. Die Tumorfläche liegt im Mittel bei 0,25 cm² und unterscheidet sich nicht wesentlich zwischen den untersuchten Zelllinien. Die Abweichungen in der Anzahl der geernteten Tumoren innerhalb der Zelllinien sind auf Unterschiede im Anwachsen der Zellen sowie z. T. auf das Design der konkreten CAM-Runde zurückzuführen.

Tabelle 3-2: Zusammenfassung der BL-Tumoren. Die Tabelle zeigt eine Übersicht aller geernteten BL-Tumoren in fünf Replikaten und deren durchschnittliche Flächen in cm².

Zelllinie	Zahl der geernteten Tumoren pro CAM-Assay	Mittelwert der Tumorflächen [cm ²]
BL-2	5 / 5 / 4 / - / 4	0,27
BL-2 scrb 1	4 / 4 / 4 / - / -	0,28
BL-2 scrb 2	3 / 3 / 7 / 4 / 5	0,31
BL-2 LEF1 sh1	2 / 4 / 5 / - / -	0,18
BL-2 LEF1 sh2	3 / 10 / 5 / 2 / 5	0,25
BL-2 LEF1 sh3	- / 3 / 5 / - / 6	0,24

In **Abbildung 3-4** sind die fluoreszierenden Tumoren einer CAM-Runde am Tag der Ernte (**Abbildung 3-4 A-E**), sowie deren entsprechenden Hellfeldaufnahmen (**Abbildung 3-4 F-J**) dargestellt. Die Fluoreszenzintensitäten der Tumoren entsprechen den in **Abbildung 3-1** dargestellten GFP-Expressionsniveaus der durchflusszytometrischen Messung. Ein

Tumor der parentalen BL-2 Zelllinie ist nicht aufgeführt, da sie nicht viral transduziert ist und dementsprechend kein GFP aufweist. Aufgrund des hohen GFP Niveaus der BL-2 scrb 2 (s. **Abbildung 3-1 F**) fluoresziert ein Tumor dieser Zelllinie besonders stark (**Abbildung 3-4 B**). Ein Tumor der KD-Zelllinie BL-2 LEF1 sh2 (**Abbildung 3-4 D**) fluoresziert im Vergleich zu den anderen KD-Zelllinien (**Abbildung 3-4 C, E**) ebenfalls stärker. Dies ist bereits der **Abbildung 3-1 C** zu entnehmen. Blutgefäße, die den Tumor in diesem Stadium durchziehen und keine fluoreszierenden Lymphomzellen beinhalten, sind gut sichtbar, vor allem in **Abbildung 3-4 B, D**.

Einen repräsentativen Überblick über die HE-gefärbten Lymphomschnitte aller Zelllinien bieten die **Abbildung 3-5** und **Abbildung 3-6**. In den folgenden zwei Unterkapiteln werden die Auffälligkeiten, die sich in den Analysen der CAM-Assay-Replikate wiederholend zeigten, beschrieben. Dabei handelt es sich zum einen um vermehrte Einblutungen in den Tumoren der parentalen Zelllinie und scrb-Kontrollen und zum anderen um das Phänomen der *vessel cooption*, das sich nur bei den KD-Tumoren beschrieben ließ.

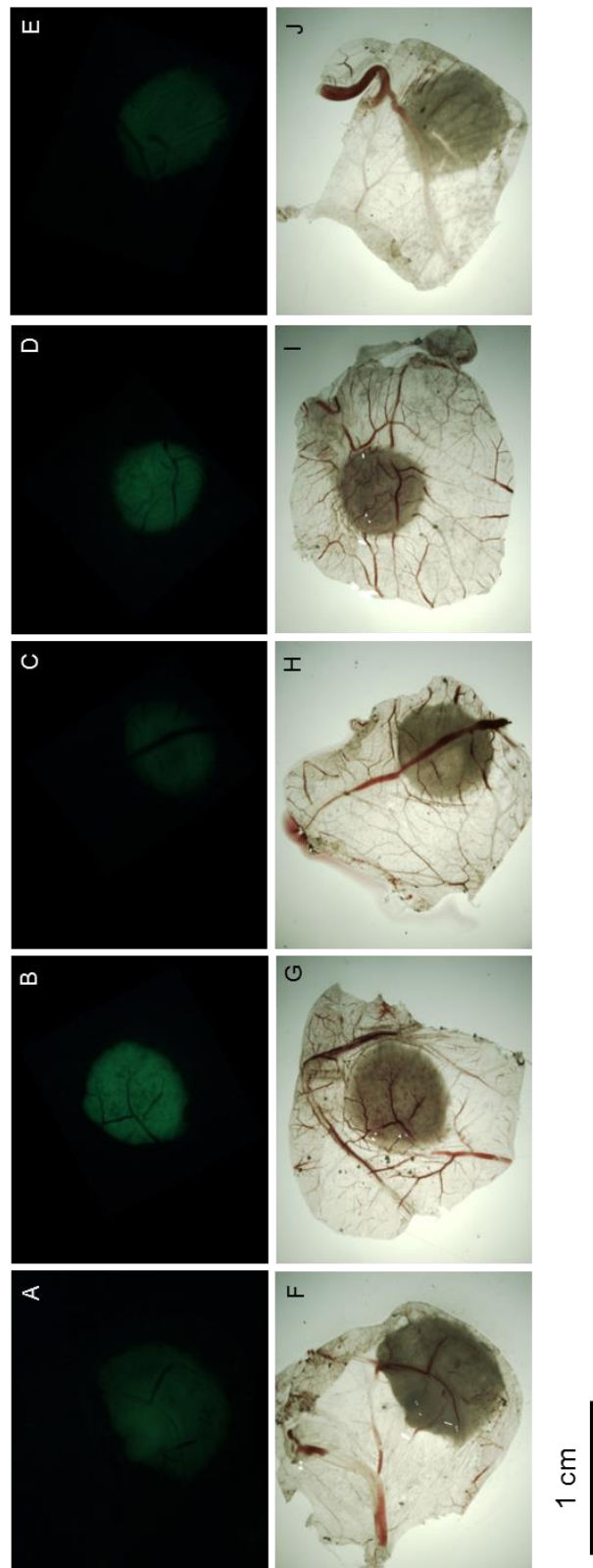


Abbildung 3-4: Mikroskopische Aufnahmen ausgewählter repräsentativer CAM-Tumoren. Die Abbildung zeigt beispielhafte Fluoreszenzaufnahmen der geernteten Tumoren (A-E) einer CAM-Assay Runde, sowie deren Hellfeldaufnahmen (F-J). Im Vergleich ist erkennbar, dass unter den Kontrollen die *scrambled*-Zelllinie BL-2 scrb 2 (B) stärker fluoresziert als BL-2 scrb 1 (A). Die Abbildungen C-E zeigen die KD-Zelllinien BL-2 LEF1 sh1 (C), BL-2 LEF1 sh2 (D) und BL-2 sh3 (E), unter denen ein Tumor der Linie BL-2 LEF1 sh2 (D) am stärksten fluoresziert.

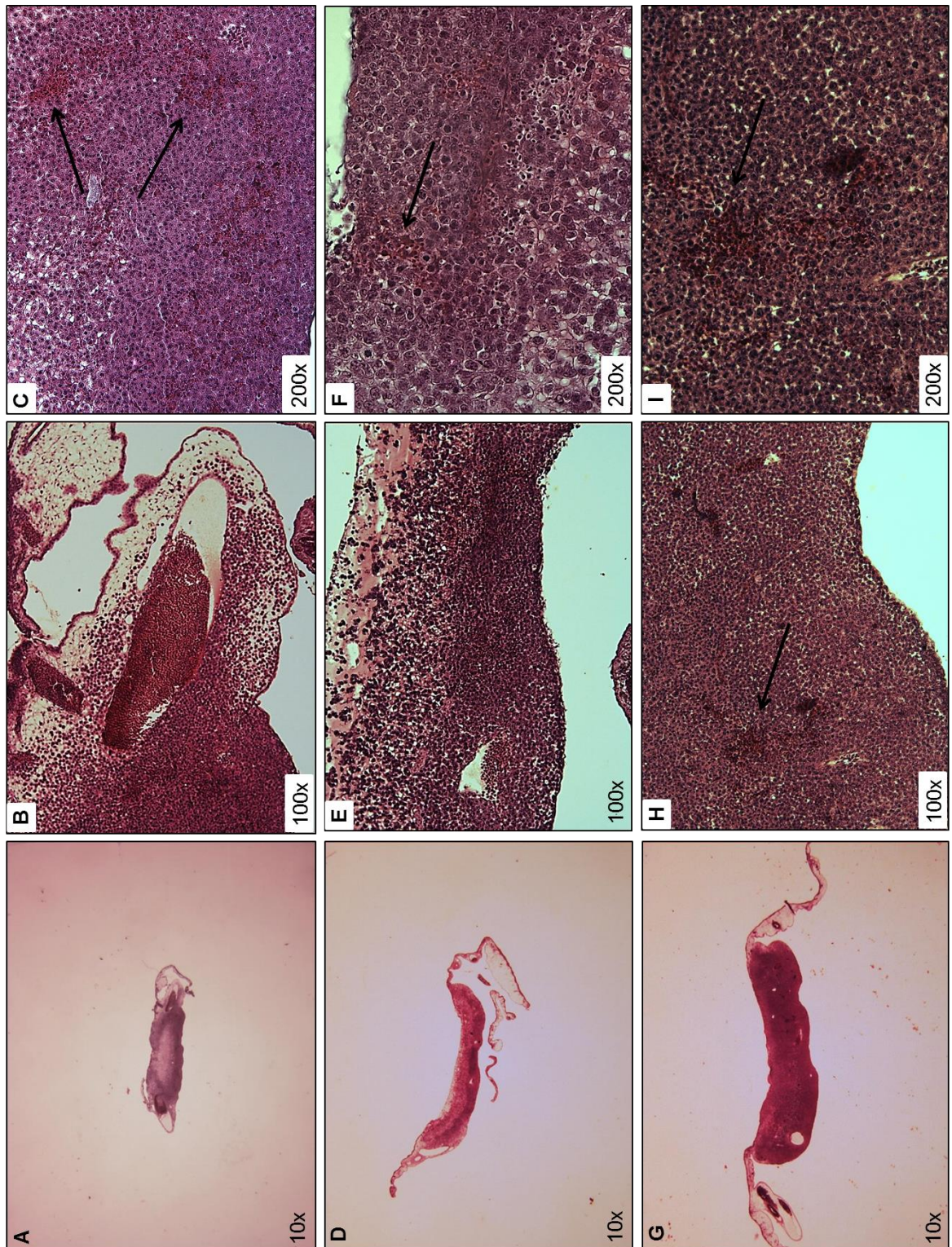


Abbildung 3-5: Übersicht der LEF1-exprimierenden Zelllinien. Die Abbildung zeigt eine HE-Übersicht der parentalen BL-2 Zelllinie (A-C) und der Kontrollzelllinien BL-2 scrb 1 (D-F) und BL-2 scrb 2 (G-I). Die eingebluteten Regionen (Pfeile) sind mikroskopisch sowohl in 100-facher, als auch in 200-facher Vergrößerung zu erkennen

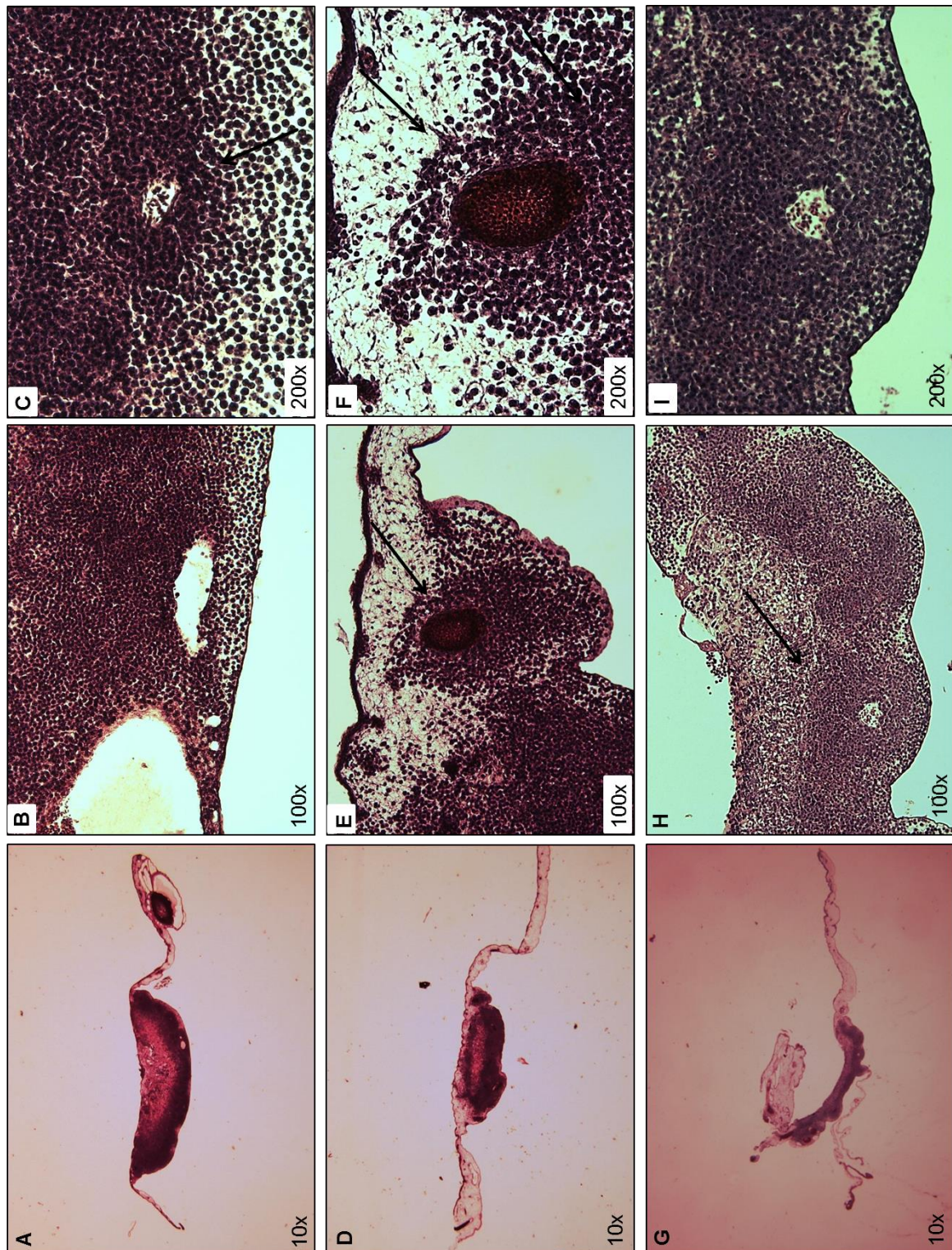


Abbildung 3-6: Übersicht der LEF1-defizienten Zelllinien.

Die HE-gefärbten Tumorschnitte zeigen eine Übersicht der Zelllinien BL-2 LEF1 sh1 (A-C), BL-2 LEF1 sh2 (D-F) und BL-2 LEF1 sh3 (G-I). Die Pfeile zeigen auf KD-Tumorzellen, die die existierenden Blutgefäße umwandern (*vessel cooption*).

3.1.2.1 LEF1-positive Tumoren zeigen häufig Hämorrhagien

Bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen der über 100 geernteten Tumoren waren bereits makroskopisch Bereiche auffällig, in denen Erythrozyten aus Blutgefäßen ins Tumorgebeude ausgetreten sind (**Abbildung 3-7 A-C**). Diese Blutung (Hämorrhagie) wurde nicht durch Gefäßverletzungen bei der Extraktion des Tumors verursacht.

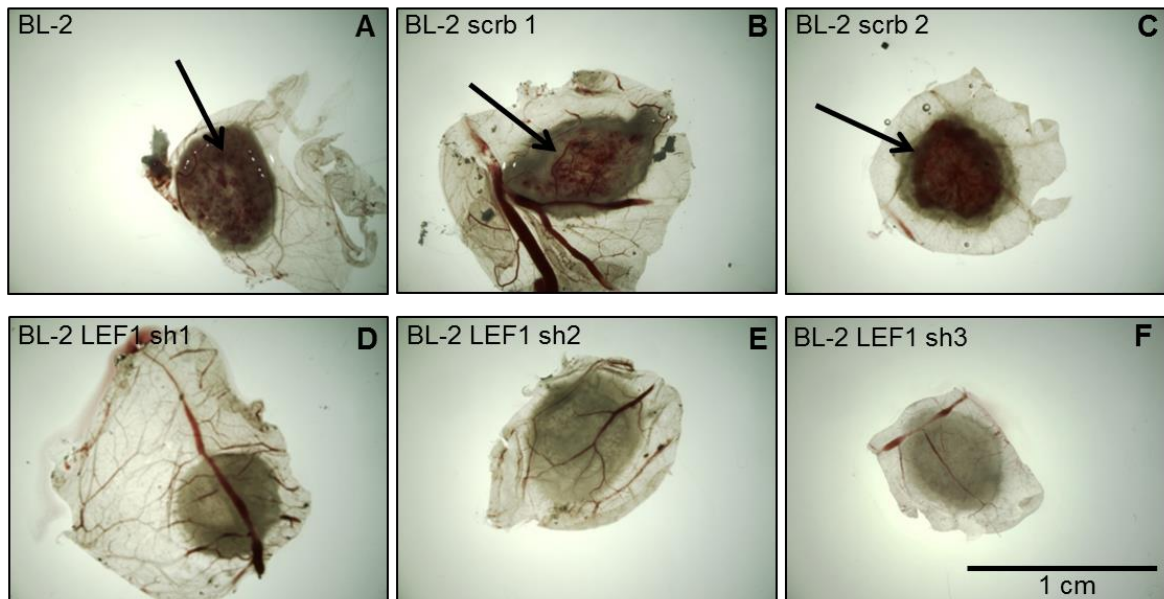


Abbildung 3-7: Lichtmikroskopische Tumoraufnahmen. Die Fotos zeigen repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Tumoren der sechs verschiedenen BL-Zelllinien. Die LEF1-exprimierenden Tumoren (A-C) zeigen häufig hämorrhagische Regionen (Pfeil). Diese Blutungen sind in den LEF1-KD Tumoren (D-F) selten nachweisbar.

Eine doppelblinde, systematische Auszählung mithilfe eines Punkte-Scores (0-9 Punkte) (Linke et al. 2016) ergab, dass die Hämorrhagien (ab einem Gesamt-Score-Wert von drei Punkten je Tumor) vor allem bei der parentalen BL-2, sowie bei der *non-silencing*-shRNA Kontrolle BL-2 scrb 2 zu beobachten waren. 31,8 % der BL-2 scrb 2- und 22,2 % der BL-2 Tumoren zeigten diese Blutungen (**Abbildung 3-8**). Bei den LEF1-KD Tumoren war dies hingegen bei nur durchschnittlich 10,7 % der Fall (**Abbildung 3-8**). Der Transkriptionsfaktor LEF1 könnte demnach in BL-Zellen Faktoren regulieren, die eine Rolle in der Endothelzellpermeabilität im Xenograft-Modell spielen.

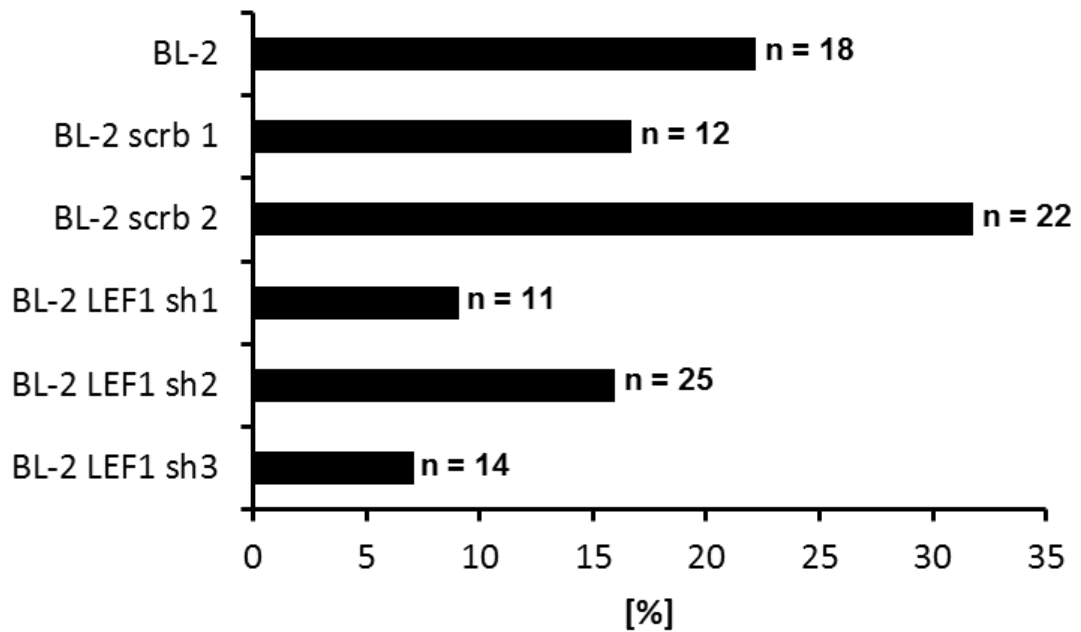


Abbildung 3-8: Anteil der hämorrhagischen Tumoren an der Tumorgesamtzahl. Die Grafik zeigt den prozentualen Anteil der hämorrhagischen Tumoren an der Gesamtzahl (n) der geernteten Tumoren aller Replikate.

Die hämorrhagischen Bereiche könnten in Zusammenhang mit der Größe der Fläche der Tumoren stehen: je größer der Tumor, desto mehr Hämorrhagien liegen vor. Diese Annahme lässt sich mit dem Analyseergebnis, das in **Abbildung 3-9** dargestellt ist, widerlegen. Die Grafik zeigt die Tumorflächen in cm^2 . Tumoren mit Blutungen sind rot dargestellt und korrelieren, mit Ausnahme der Tumoren der parentalen BL-2 Zelllinie, nicht mit den Größen der Tumorflächen. Außerdem wird bei diesem Ergebnis erneut deutlich, dass sich die Tumorflächen der verschiedenen BL-Zelllinien (im Durchschnitt circa $0,25 \text{ cm}^2$) im Mittel nicht unterscheiden.

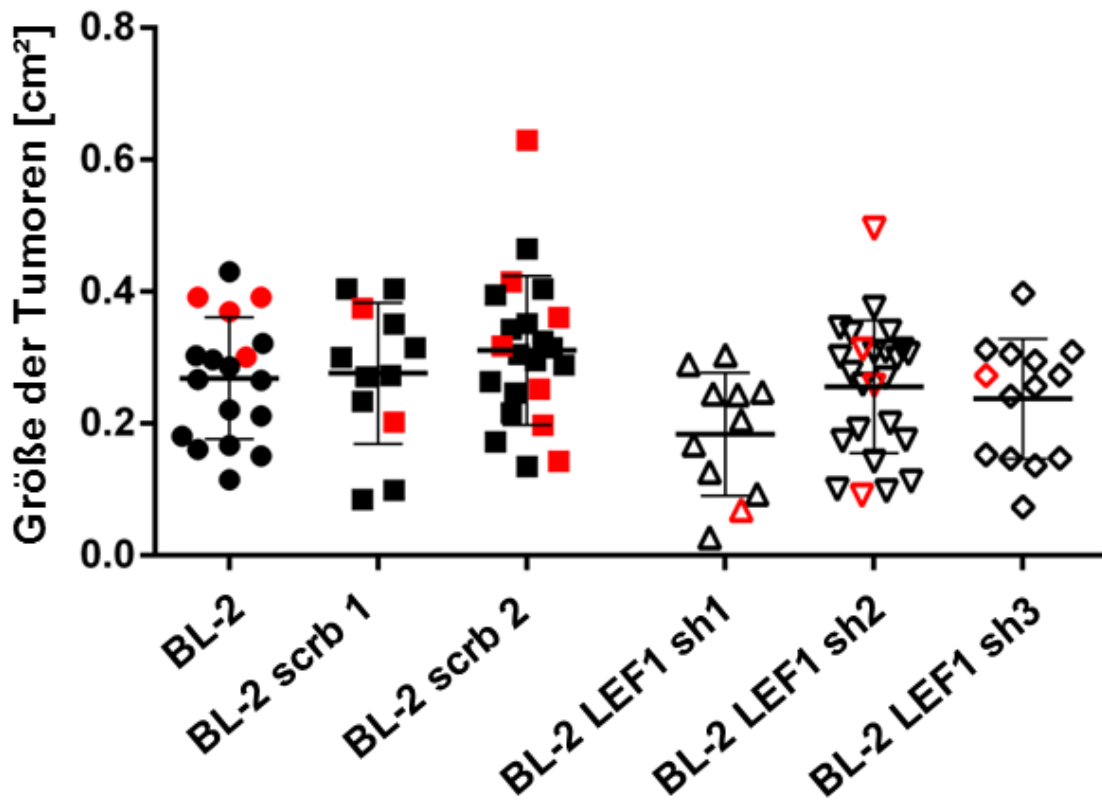


Abbildung 3-9: Hämorrhagische Tumoren (rot) in Beziehung zur Tumormgröße. Dargestellt sind alle Tumoren der unabhängig voneinander durchgeführten CAM-Assays.

Bereits in der **Übersichts-Abbildung 3-5 (A-I)** sind die mikroskopisch sichtbaren Einblutungen der parental- bzw. der *scrambled*-Kontrollzelllinien in starker Vergrößerung zu erkennen. Ein weiteres anschauliches Bild für die sowohl makroskopisch schon sichtbaren Hämorrhagien als auch die im Tumorschnitt der Zelllinie BL-2 scrb 2 nachweisbaren Einblutungen zeigt **Abbildung 3-10**. In 200-facher Vergrößerung ist ein Blutgefäß zu sehen, aus dem die Erythrozyten in den Tumor eintreten.

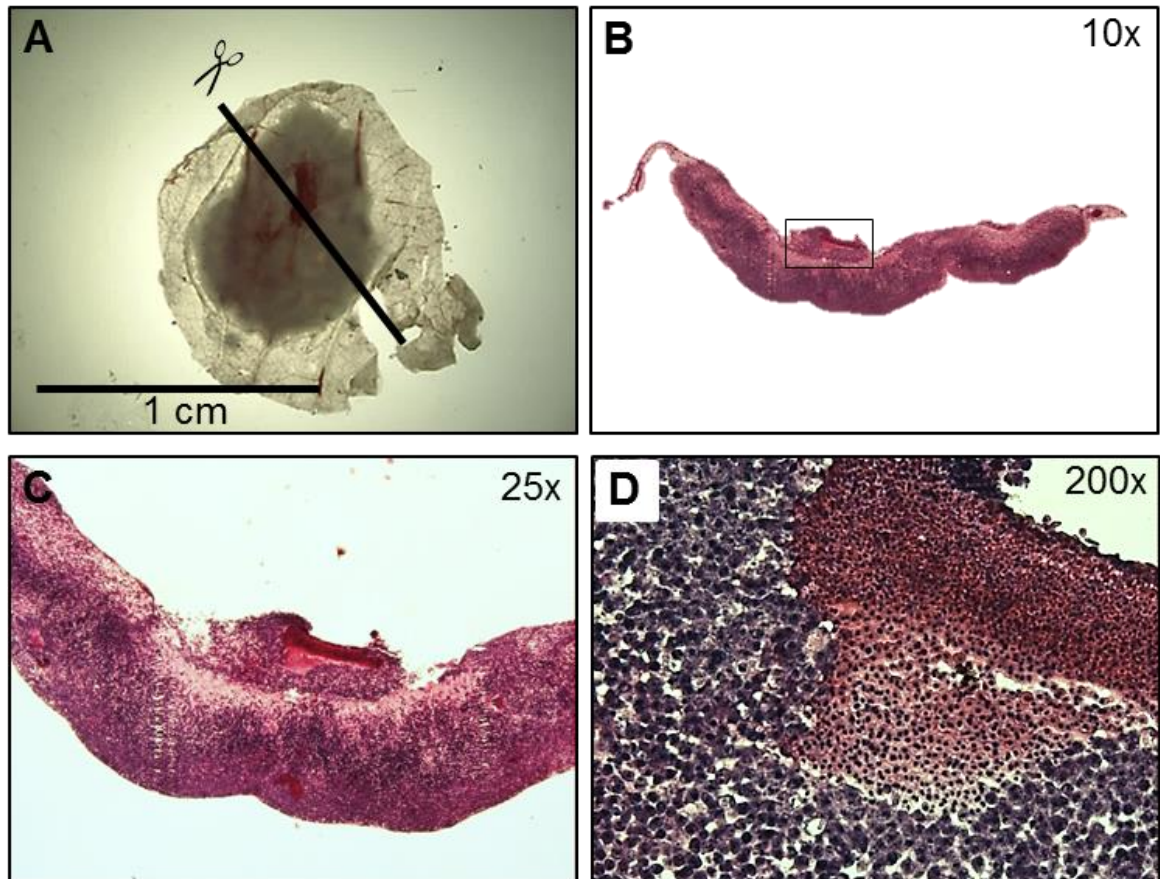


Abbildung 3-10: Hämorrhagischer Tumor der Zelllinie BL-2 scrb 2. (A) Darstellung des Lymphoms im Hellfeld von oben. Durch die Linie mit Scherensymbol ist die Schnittrichtung gezeigt, die gesetzt wurde um histologische Analysen durchzuführen. (B) HE-gefärbter Lymphomgewebeschnitt, wie in (A) gezeigt, in 10-facher Vergrößerung. Die makroskopisch sichtbare Einblutung ist im Rechteck dargestellt. Grafiken (C) und (D) zeigen jeweils einen 6 µm dicken Tumorschnitt in 25- bzw. 200-facher Vergrößerung, in dem ein Blutgefäß zu erkennen ist. Aus diesem Gefäß laufen die roten Blutkörperchen der Hühner-CAM, die im Gegensatz zu Säugetier-Erythrozyten kernhaltig sind, in das dichte Tumorgewebe aus.

Die **Abbildung 3-11** zeigt in das Tumorgewebe eingetretene Erythrozyten weiterer Tumoren der BL-2 Zelllinie (**Abbildung 3-11 A, B**) und der Kontrolle BL-2 scrb 2 (**Abbildung 3-11 C, D, E, F**). Dieses Phänomen ist sowohl makroskopisch (**Abbildung 3-11 A, E**), als auch im HE-Tumorschnitt nachweisbar (**Abbildung 3-11 B, C, D, F**). In den LEF1-KD Tumoren sind diese Hämorrhagien seltener zu beobachten.

In vivo-Lymphome der parentalen- und Kontroll-Zelllinien zeigen folglich im Vergleich zu den KD-Tumoren vermehrt Einblutungen. Diese Hämorrhagien sind weder durch mechanische Gefäßverletzungen entstanden, noch korrelieren sie mit der Größe des Tumors.

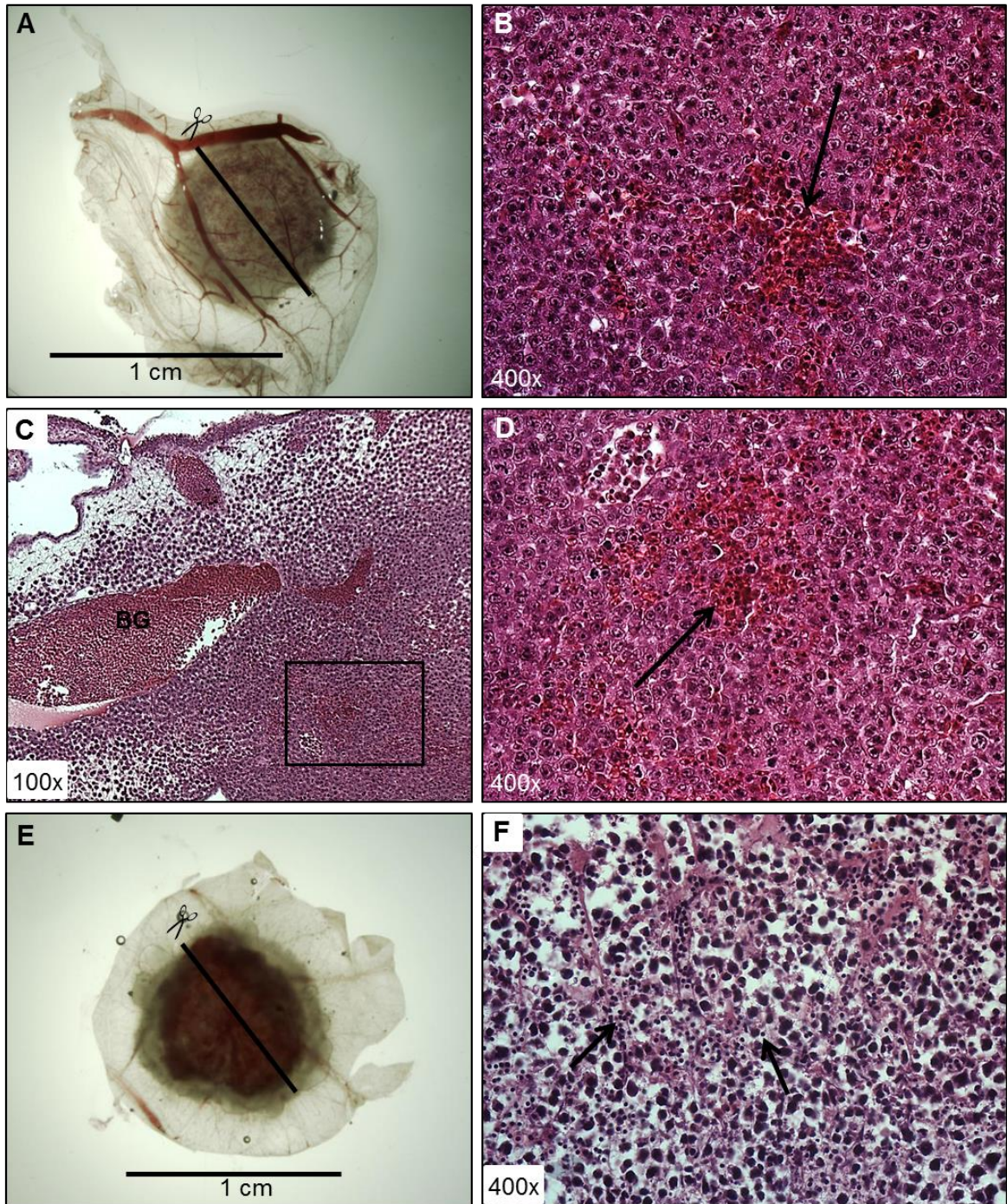


Abbildung 3-11: Hämorrhagien der LEF1-positiven Zelllinien. LEF1-positive Zelllinien weisen eingeblutete Erythrozyten in der dichten Tumorzellmasse auf. Sowohl in Tumoren der BL-2 Zelllinie ((B) zeigt einen Tumorschnitt von (A), BG = Blutgefäß), als auch der Kontrolle BL-2 scrb 2 (C, D, E, F) sind mikroskopisch kernhaltige rote Blutkörperchen (Pfeile) zwischen den Lymphomzellen zu erkennen. Die Hämorrhagien sind auch makroskopisch erkennbar (A, E). Die Grafik (F), die einen Schnitt durch den Tumor (E) zeigt, weist eine andere Morphologie auf, da bei diesem CAM-Assay die Tumorschnittdicke 3 μm betrug.

3.1.2.2 LEF1-defiziente Tumorzellen umwachsen existierende Blutgefäße

Im Gegensatz zu den Tumor-Hämorrhagien der parentalen- und der Kontroll-Zelllinien ordnen sich die Lymphomzellen in Tumoren der LEF1-KD Zelllinien um die wenigen

vorhandenen Blutgefäße kreisförmig an (**Abbildung 3-12**). Diese Erscheinung, die auch *vessel cooption* genannt wird (Holash et al. 1999), ist sowohl in Fluoreszenz-Aufnahmen (**Abbildung 3-12 A**, Pfeile) als auch in HE-gefärbten Tumorschnitten (**Abbildung 3-12 B-D**) zu erkennen. Die Zellen bilden Tumorzellstraßen bis zum nächsten Gefäß (**Abbildung 3-12 C**), um vermutlich besser von diesem mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt zu werden.

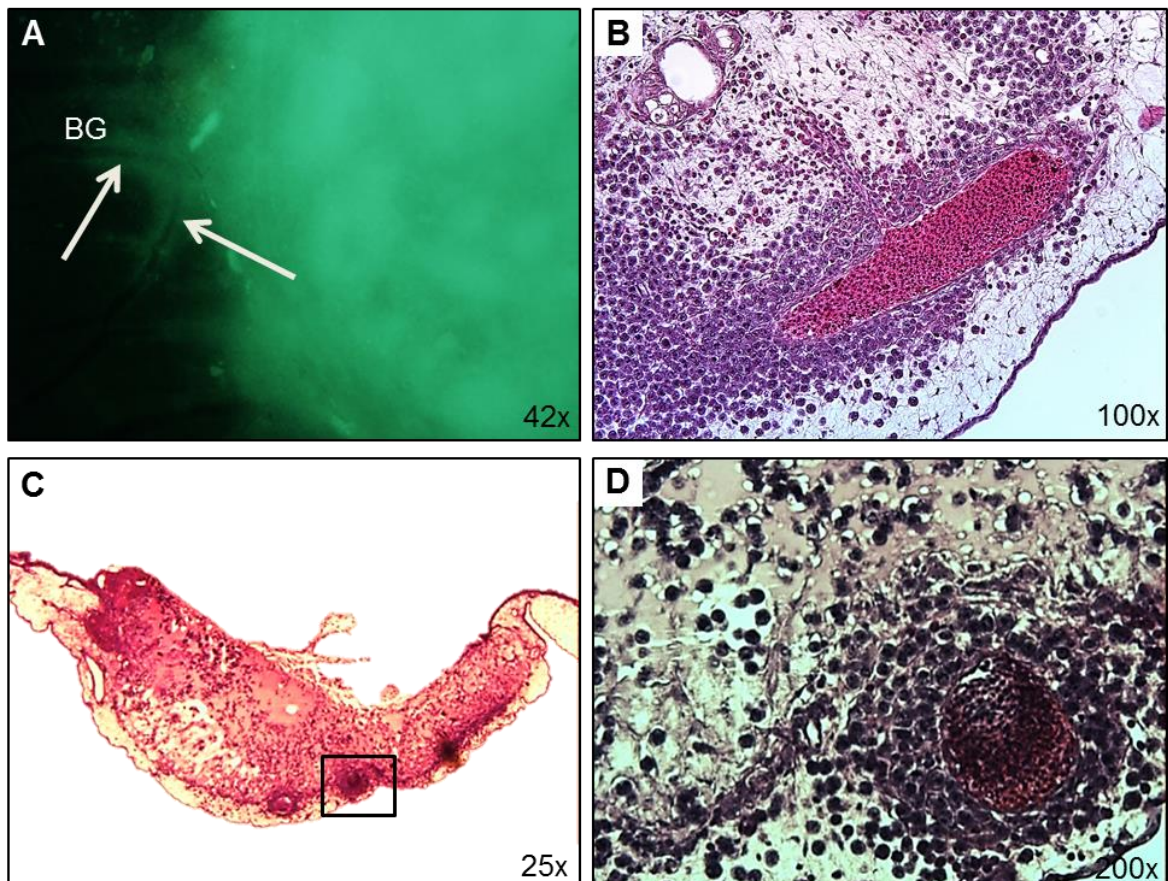


Abbildung 3-12: Vessel cooption in LEF1-KD-Tumoren. Die hier dargestellten Tumoren der transduzierten Zelllinien BL-2 LEF1 sh2 (A, B), (B zeigt einen HE-gefärbten Schnitt von dem in (A) dargestellten fluoreszierenden Tumor, BG = Blutgefäß) und BL-2 LEF1 sh1 (C, D), ((D) zeigt einen Ausschnitt aus (C)) stellen Lymphomzellen dar, die die wenigen vorhandenen Blutgefäße umwachsen.

Die LEF1-positiven Zellen der BL-2 bzw. der scrb-Kontrollen ordnen sich nicht in diesem Maße um präexistierende Blutgefäße an oder haben sich zum Erntezeitpunkt bereits über dieses Stadium hinaus entwickelt (**Abbildung 3-13**). Die Tumorzellmasse grenzt zwar an das jeweilige Gefäß, jedoch wird dieses nicht in vollem Umfang umwachsen. Die LEF1-positiven Tumorzellen proliferieren im Gegensatz zu den LEF1-KD Zellen unabhängig von der Nähe zu Blutgefäßen.

Im CAM-Assay ist demnach aufgefallen, dass die Anordnung von Tumorzellen um Blutgefäße unterschiedlich ausgeprägt ist. Die Gefäße von KD-Tumoren werden von den LEF1-defizienten Lymphomzellen „kooptiert“, um den Erhalt des Tumors zu gewährleisten.

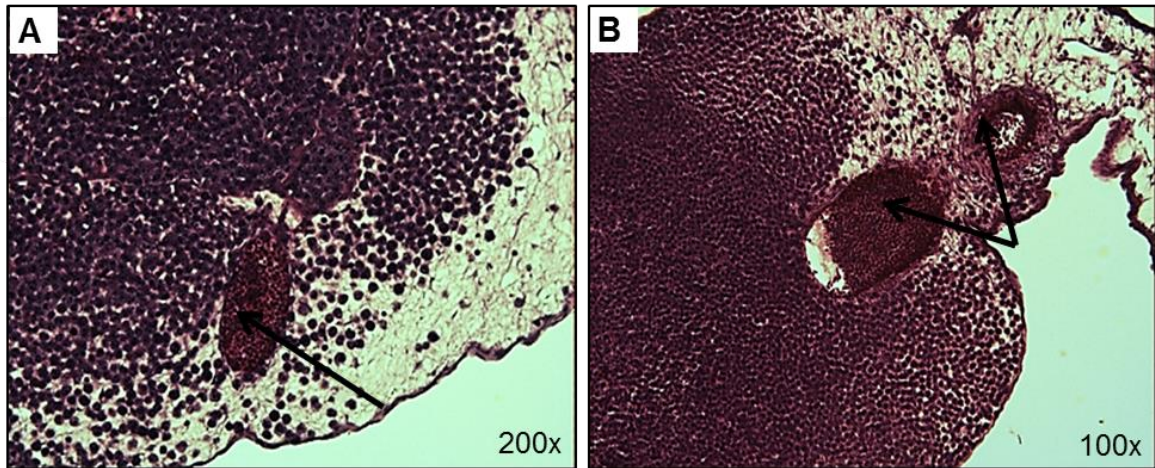


Abbildung 3-13: Wachstumsfront LEF1-positiver Zellen im Tumorgewebe. Anders als in LEF1-KD Tumoren, ordnen sich die Lymphomzellen der Zelllinien BL-2 (A) und BL-2 scrb 1 (B) nicht vollständig um die existierenden Blutgefäße (Pfeile) an. In (B) wandern die Tumorzellen beispielsweise nicht zu dem hinteren Blutgefäß.

3.2 Sekretierte Faktoren LEF1-positiver BL-Zelllinien stimulieren die Migration von Endothelzellen

Im CAM-Assay hat sich herausgestellt, dass Lymphome der LEF1-positiven Zelllinien (parentale BL-2 Zelllinie und *scrambled* Kontrollen) stärker vaskularisiert sind. Um die *in vivo* beobachteten Unterschiede weiterhin zu analysieren und den Einfluss von LEF1 auf das Microenvironment zu untersuchen, wurde der Migrationsversuch nach Boyden (Boyden 1962) durchgeführt. Untersucht wurde der Einfluss des BL-2 Sekretoms auf die Migration von Endothelzellen. Ziel dieses Versuchs war es herauszufinden, ob in den Überständen der Zelllinien Faktoren vorhanden sind, die eine *in vitro*-Migration begünstigen und somit das Migrationsverhalten der Endothelzellen beeinflussen. Damit sollte überprüft werden, ob die Lymphomzellen, abhängig von LEF1, Faktoren ins Medium sezernieren, die einen Effekt auf die Endothel-Migration ausüben.

Dazu wurden Zellkulturüberstände von zwei der drei LEF1-KD Zelllinien, der parentalen BL-2 Zelllinie und der scrb-Kontrollen nach 48 h Zellkultur geerntet. Diese zellfreien Überstände (Konditionierte Medien, CM), die in die Unterkammer des Zwei-Kammer-Systems pipettiert wurden, dienten als chemotaktische Stimuli zur Endothelzellmigration.

Als Endothelzell-Modell wurden humane Endothelzellen aus der Umbilikalvene (HUVEC-Endothelzellen) verwendet, die 24 h vor dem Versuch in Hungermedium (EBM ohne VEGF) ausgesetzt wurden. Die HUVEC-Endothelzellen wurden in die Oberkammer der Boyden-Kammer ausgesät und migrierten in Richtung der angiogenen Stimuli durch eine 8- μ m-porenhaltige Membran und konnten nach vierstündiger Migration angefärbt und anschließend mikroskopisch ausgezählt werden. Als Positivkontrolle wurde der Endothelzell-Wachstumsfaktor VEGF eingesetzt, durch den die HUVEC zur Proliferation und Migration angeregt werden. Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, wurde der Migrationsversuch nach Boyden in drei Replikaten wiederholt.

Die **Abbildung 3-14** zeigt drei repräsentative lichtmikroskopische Fotografien der angefärbten HUVEC-Endothelzellen, die nach Migration an der Membranunterseite hafteten. Hier ist bereits makroskopisch zu erkennen, dass die Migration in Richtung des CM der LEF1-KD-Zelllinie BL-2 LEF1 sh2 (**Abbildung 3-14 C**) geringer war als durch den Anreiz des Stimulus durch die Kontrolle RPMI + VEGF (**Abbildung 3-14 A**) und durch das CM der Kontroll-Zelllinie BL-2 scrb 1 (**Abbildung 3-14 B**).

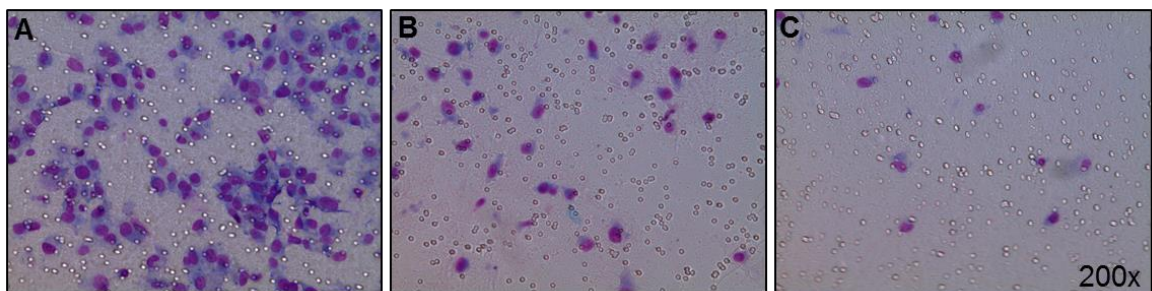


Abbildung 3-14: Lichtmikroskopische Aufnahmen der HUVEC-Endothelzellen. Die Abbildungen zeigen die durch die Membran migrierten Zellen, die an der Unterseite hafteten und schließlich fixiert und angefärbt wurden, in 200-facher Vergrößerung. Die in die untere Kammer pipettierten Lösungen der hier dargestellten Bedingungen waren RPMI + 10 ng/ml VEGF (A) und die konditionierten Medien der Zelllinien BL-2 scrb 1 (B) und BL-2 LEF1 sh2 (C). Siehe auch **Abbildung 3-15**.

Abbildung 3-15 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. Zur Überprüfung der Migrationsfähigkeit der HUVEC wurden drei technische Kontroll-Medien ausgewählt, die jeweils in die untere Kammer gegeben wurden: RPMI (Referenz, als eins gesetzt), RPMI + 10 ng/ml VEGF und Vollmedium (EBM + Zusätze). Die HUVECs migrierten, im Vergleich zu RPMI, um ein Vierfaches stärker in Richtung des VEGF-Stimulus. Auch in Richtung des Vollmediums, in dem die HUVEC unter Normalbedingungen kultiviert wurden (EBM + Zusätze), migrierten die Zellen um den Faktor 2,5 häufiger durch die Membran, jedoch geringer als in Anwesenheit von VEGF. Die Verstärkung der Migration, vor allem durch

den Endothelzell-Wachstumsfaktor VEGF, bestätigte die Fähigkeit der Zellen zur aktiven Migration.

Die Migration verringerte sich, auf etwa das 0,5 - 0,6 fache des Standards (RPMI), in Richtung der CMs der LEF1-KD-Zelllinien BL-2 LEF1 sh2 und BL-2 LEF1 sh3. Der Unterschied zwischen den KD-Zelllinien und den Kontroll-Zelllinien ist signifikant. Bei den CMs der parentalen- bzw. Kontroll-Zelllinien BL-2, BL-2 scrb 1 und BL-2 scrb 2, die untereinander nicht signifikant unterschiedlich sind, migrierten sie hingegen stärker (Faktor 1,2 - 1,5 des Standards).

Zusammenfassend lässt sich mit diesem Migrationsversuch nach Boyden beschreiben, dass die HUVEC-Endothelzellen schwächer in Richtung der CM der LEF1-defizienten Zellen migrieren, als gegen die CM der parentalen- bzw. Kontrollzelllinien.

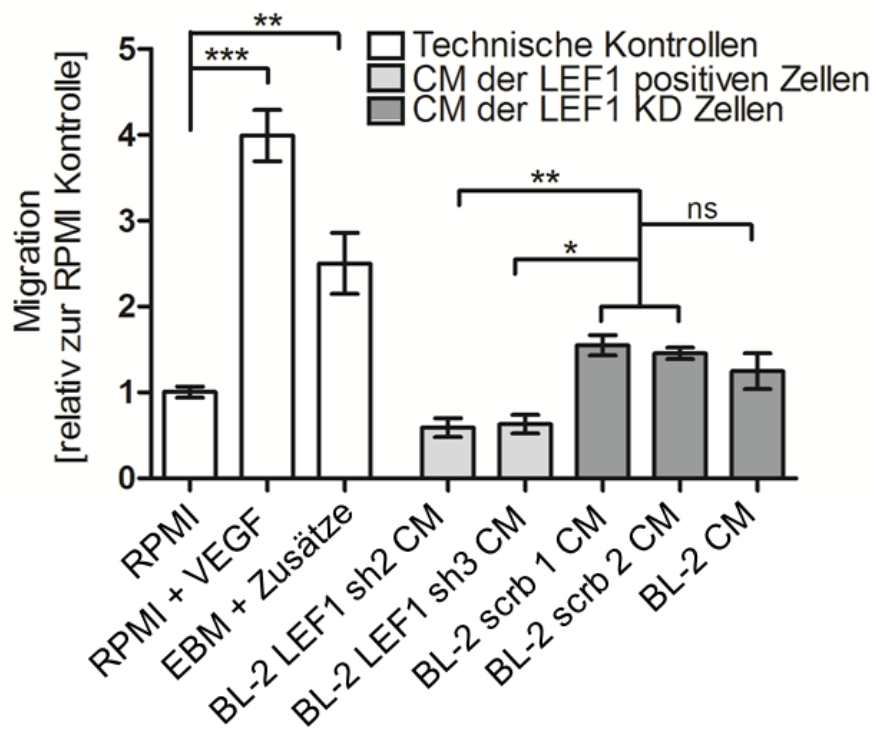


Abbildung 3-15: Migration der HUVEC-Endothelzellen in der Boyden-Kammer. Jede der acht Bedingungen wurde in sechsfacher Ausführung in die unteren Vertiefungen ausgesät. In die oberen Vertiefungen wurden je 50000 HUVEC-Zellen pipettiert, die in 4 h Migrationszeit durch die 8- μ m-Poren-Membran migrierten. Als technische Kontrollen dienten RPMI (Referenz, als eins gesetzt), RPMI + 10 ng / ml VEGF und EBM + Zusätze (Vollmedium). (Mittelwert +/- SEM, n = 3, one-way ANOVA, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ns = nicht signifikant)

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von stabil transduzierten LEF1-Knockdown-Tumorzellen der Lymphomzelllinie BL-2 herauszufinden, inwiefern der Transkriptionsfaktor LEF1 einen Einfluss auf die Tumormorphologie im Burkitt-Lymphom-Xenograft-Modell ausübt. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob sich LEF1-abhängige Wirkungen auf Prozesse der Tumorangiogenese nachweisen lassen. Dazu wurden *in vitro*-Analysen von Endothelzellen, aber auch *in vivo*-Untersuchungen auf der Chorion-Allantois-Membran des Hühnerembryos durchgeführt.

Drei wichtige Befunde konnten erhoben werden:

- I) *In vivo*-Lymphome der parentalen BL-2 Zelllinie und der Kontroll-Zelllinien zeigten eine erhöhte Gefäßpermeabilität und wiesen damit häufiger Hämorrhagien auf.
- II) Bei der Applikation von BL-Zellen mit reduzierter LEF1-Expression im CAM-Assay war, morphologisch betrachtet, die Anordnung der Lymphomzellen um Gefäße unterschiedlich ausgeprägt. Die KD-Tumoren zeigten von LEF1-defizienten Zellen kooptierte Gefäße, vermutlich auf dem Boden der *vessel cooption*.
- III) Die Zellmigration von HUVEC-Endothelzellen im Migrationsversuch fiel schwächer aus, wenn sie gegen die CM der KD-Zellen gerichtet war.

Dies lässt die Vermutung zu, dass durch LEF1 Faktoren reguliert werden, die die Gefäßpermeabilität und die Migration von Endothelzellen beeinflussen, LEF1 aber auch möglicherweise einen Einfluss auf den Metabolismus der BL-Zellen ausüben könnte. Analysen im *in vitro*-Migrationsassay mit HUVEC-Endothelzellen unterstützten diese Beobachtungen. Die Endothelzellen migrierten, je nach Stimulus, unterschiedlich stark. Hier zeigte sich, dass die konditionierten Medien der BL-Zellen mit reduzierter LEF1-Expression, im Vergleich zu den Medien der Kontrollzellen, die HUVEC-Migration weniger stimulieren konnten.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob dieses eher auf dem Boden einer Neoangiogenese im Tumor geschieht oder die Hämorrhagien auf eine Gefäßdestruktion hinweisen. Ginge man von der ersten Hypothese aus, könnte man behaupten, dass LEF1 im BL eine Neoangiogenese-fördernde Rolle spielt, während LEF1-defiziente Tumorzellen

die präexistenten Blutgefäße nutzen, indem sie die Gefäße kooptieren und dadurch, zumindest kurzfristig, versorgt werden. Inwieweit die parentalen BL-2 Zellen und die scrb Kontrollzellen am Anfang der Lymphombildung auch durch *vessel cooption* ihre Nährstoffe und Sauerstoff erhalten, müsste in zukünftigen Studien durch Zeitserien untersucht werden. Aktuell erscheint es jedoch wahrscheinlicher, dass LEF1-defiziente BL-2 Zellen durch *vessel cooption* charakterisiert sind, weil sie nicht in der Lage sind, sich ausreichend effizient aus dem Microenvironment zu versorgen. LEF1-KD-Tumoren wiesen, im Gegensatz zu den hämorrhagischen Tumoren der Kontroll-Zelllinien, weniger Gefäße auf, von denen die umliegenden Tumorzellen versorgt werden konnten. Dies lässt vermuten, dass die LEF1-defizienten Lymphomzellen einem stärkeren Zwang ausgesetzt sind, Zellstraßen bis zum nächsten Gefäß zu bilden und dieses zu umrunden, um mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt zu werden. Neben dem geringeren Einfluss der KD-Zellen auf die Endothelzell-Aktivität könnte dieses Phänomen auch darin begründet sein, dass die LEF1-defizienten Tumorzellen weniger Hypoxie-tolerabel sind, was einen nächsten Anhaltspunkt für zukünftige Studien bietet.

Im Jahr 2015 haben Cai et al. in einem mathematischen Modell den Sauerstofftransport in frühen Gliom-Tumorstadien erforscht (Cai et al. 2015). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Tumorzellen entlang der präexistierenden Blutgefäße wandern, um den durch das Tumorwachstum steigenden Sauerstoffbedarf decken zu können (Cai et al. 2015). Die Gefäßwände unreifer Gefäße konnten dem Kompressionsdruck der Tumorzellen nicht mehr standhalten und kollabierten, sodass angrenzende Tumorzellen aufgrund fehlender Versorgung zugrunde gingen (Cai et al. 2015). Trifft unsere Vermutung zu, dass die LEF1-defizienten Lymphomzellen Hypoxie-intoleranter sind, könnten weitere Arbeiten die Überprüfung der sauerstoffabhängigen Überlebensfähigkeit der KD-Zellen implizieren.

Gao et al. haben sich 2014 mit der Rolle von LEF1 im Glioblastoma multiforme, einem aggressiven, unheilbaren Gehirntumor, auseinandergesetzt. Auch sie zeigten, dass durch den KD von LEF1 sowohl die Migration der Tumorzellen als auch die tumoreigene Zellproliferation und –selbsterneuerung beeinflusst werden können (Gao et al. 2014).

Ein weiteres Beispiel einer LEF1-assoziierten Tumorprogression findet sich im Nierenzellkarzinom (NCC) (Shang et al. 2014). Hier bewiesen Shang et al., dass in den Stadien drei und vier des NCC die Menge an LEF1 signifikant erhöht ist (Shang et al. 2014). In den niedrigeren Stadien oder in physiologischem Nierengewebe, zeigte sich die LEF1-Expression als sehr gering (Shang et al. 2014).

Im Maus- und Zebrafischmodell von Phng et al. wurde deutlich, dass auch der Verlust von LEF1 in Endothelzellen zu einer Gefäßregression und -instabilität führt (Phng et al. 2009).

Die Bedeutung der Angiogenese im Wachstum von Lymphomen und der damit verbundenen Progression von Leukämien und anderen hämatologischen Erkrankungen ist seit 1994 erwiesen (Vacca et al. 1994). Eine frühzeitige Inhibition der Angiogenese, z.B. durch Angiostatin, die zur Blockierung der Endothelzellproliferation führt (O'Reilly et al. 1994), oder durch Inhibierung des VEGF-Rezeptors (Ruan et al. 2009), ist somit ein vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt in der Behandlung von Lymphomen und anderen hämatologischen Krebserkrankungen (Ribatti et al. 2013). Dies gilt auch für die Prävention von Rezidiven oder Metastasen (Bergers und Benjamin 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass die Tumoren der BL-Zellen eine verstärkte *in vivo*-Vaskularisierung und Gefäßpermeabilität aufwiesen, die in KD-Tumoren mit reduzierter LEF1-Expression verändert waren. Das auf der CAM beobachtete Phänomen wurde in einem *in vitro*-Migrationsversuch mit HUVEC-Endothelzellen weiterhin untersucht und konnte bestätigt werden. Auch die Daten von Planutiene et al. zeigen, dass LEF1 eine essentielle Komponente für die Proliferation von EAHy926 Endothelzellen, einer der HUVEC sehr ähnlichen Endothelzelllinie, darstellt (Planutiene et al. 2011). Die neu entstandenen Gefäße der LEF1-exprimierenden Tumoren könnten auf verschiedene Arten gebildet worden sein: z.B. mittels präexistierender Gefäße oder durch die Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen (Hillen und Griffioen 2007).

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Vaskularisierung der hier untersuchten Lymphome auf der CAM könnte eine Differenz in der Expression und Aktivität von Metalloproteasen im Rahmen des Gewebeumbaus sein. Dies könnte sich LEF1-abhängig ereignen. Zukünftige Studien sollten demnach die Messung einer LEF1-abhängigen Aktivität von Matrix-Metalloproteasen zum Inhalt haben.

Eine weitere Möglichkeit, die Tumolvaskularisierung zu analysieren, wäre das Auszählen der Blutgefäße oder das Anfärben von VEGF in stark vaskularisierten Lymphomen im Xenograft-Modell. Linke et al. identifizierten kürzlich, dass VEGF-A im Hodgkin-Lymphom LEF1- und β -Catenin-abhängig sezerniert wird (Linke et al. 2016). Die Frage, ob LEF1 auch einen Einfluss auf die VEGF-Sekretion im BL ausübt, müsste in weiteren Arbeiten geklärt werden.

Ferner könnten zukünftige Studien einen Transfer unserer Ergebnisse auf weitere Lymphomzelllinien oder gar auf Patienten beinhalten.

Der LEF1-abhängige Unterschied in der mittleren Größe der Tumorflächen, der im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe festgestellt wurde (Ueberdiek 2016), konnte nicht beobachtet werden. Eine Erklärung für den nicht mehr festzustellenden Unterschied könnte eine differente Matrigel-Charge, die in ihrer Zusammensetzung sehr schwankt, Schwankungen in der Qualität der gelieferten Eier oder eine Modifikation in der Tumorzell-Applikation sein. Die durch den KD von LEF1 hervorgerufene Verringerung der Tumorzelldichte, die ebenfalls im Vorfeld beobachtet wurde, konnte nur vereinzelt reproduziert werden.

Fasst man zusammen, so lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass LEF1 eine Rolle bei der Tumorangiogenese im Burkitt-Lymphom spielt und LEF1 oder ggf. LEF1-Zielgene somit zukünftig als Inhibitions-Target in der medikamentösen Lymphomtherapie angesehen werden könnten.

5. Zusammenfassung

Das Burkitt-Lymphom (BL), das seinen Ursprung in entarteten B-Zellen des Keimzentrums hat und zu den aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen gehört, ist seit seiner Beschreibung in den 50er-Jahren Forschungsgegenstand zahlreicher klinischer und wissenschaftlicher Studien.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Untersuchungen bezüglich des Angiogeneseverhaltens im BL unter besonderer Berücksichtigung des aberrant im BL exprimierten Transkriptionsfaktors LEF1 durchzuführen. Aufbauend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden dazu unter Hinzunahme der Lymphomzelllinie BL-2 sowohl *in vivo*-Beobachtungen auf der Chorion-Allantois-Membran des Hühnerembryos als auch *in vitro*-Analysen von Endothelzellen unternommen.

Dabei zeigte sich, dass die Lymphome der parentalen BL-2 Zelllinie und auch der Kontrolllinien eine erhöhte Gefäßpermeabilität und damit häufiger Hämorrhagien aufwiesen. Sie könnten somit Faktoren sezerniert haben, die vermutlich aktiv in die Tumorangio-genese eingreifen oder auch einen Einfluss auf den Metabolismus der Lymphzellen ausüben. Analysen im Migrationsassay nach Boyden mit HUVEC-Endothelzellen unterstützten diese Annahme.

Zudem konnte im Xenograft-Modell das Phänomen der *vessel cooption* bei BL-Zellen mit reduzierter LEF1-Expression nachgewiesen werden. Die KD-Zellen bildeten Tumorstraßen zum nächsten präexistierenden Blutgefäß und umrundeten dieses, um versorgt zu werden. Neben der Hypothese, dass die KD-Zellen aufgrund der weniger vorhandenen Gefäße einem stärkeren Zwang ausgesetzt sind, sich zu mobilisieren, könnte dieses Ereignis auch darin begründet sein, dass die LEF1-defizienten Zellen weniger Hypoxie-tolerabel sind. Dies bietet Anhaltspunkte für zukünftige Studien.

Mit den bisherigen Therapiestrategien kann bei 85 % der Patienten mit Burkitt-Lymphom eine Remission erreicht werden. Die Heilungsrate von Kindern, bei denen das Burkitt-Lymphom die häufigste Lymphommanifestation darstellt, beträgt sogar 90 %. Insgesamt ist es denkbar, dass durch diese Ergebnisse LEF1 als ein weiteres interessantes Zielmolekül hinsichtlich der therapeutischen Inhibition der Tumorangio-genese im Burkitt-Lymphom angesehen werden kann und die Heilungschancen der hochmalignen Erkrankung weiterhin verbessert werden können.

6. Literaturverzeichnis

- Ahn T, Yim SK, Choi HI, Yun CH (2001): Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: use of amino acids as electrolytes. *Anal Biochem* 291, 300–303
- Arastéh, K, Baenkler H-W, Bieber C: *Innere Medizin (Duale Reihe)*. 3., überarbeitete Auflage; Thieme, Stuttgart 2012
- Becker J, Covelo-Fernandez A, von Bonin F, Kube D, Wilting J (2012): Specific tumor-stroma interactions of EBV-positive Burkitt's lymphoma cells in the chick chorio-allantoic membrane. *Vasc Cell* 4, 3
- Bergers G, Benjamin LE (2003): Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3, 401–410
- Bertrand S, Berger R, Philip T, Bernheim A, Bryon PA, Bertoglio J, Doré JF, Brunat-Mentigny M, Lenoir GM (1981): Variant translocation in a non endemic case of Burkitt's lymphoma: t (8;22) in an Epstein-Barr virus negative tumour and in a derived cell line. *Eur J Cancer* 17, 577–584
- Boxer LM, Dang CV (2001): Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 20, 5595–5610
- Boyden S (1962): The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115, 453–466
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254
- Burkitt D (1958): A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* 46, 218–223
- Cai Y, Zhang J, Wu J, Li Z (2015): Oxygen Transport in a Three-Dimensional Microvascular Network Incorporated with Early Tumour Growth and Preexisting Vessel Co-option: Numerical Simulation Study. *BioMed Res Int* 2015, 10 pages
- Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES (2011): The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117, 5019–5032
- Cao Y, Hong A, Schulten H, Post MJ (2005): Update on therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Res* 65, 639–648
- Carmeliet P, Jain RK (2000): Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249–257
- Carmeliet P, Jain RK (2011): Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307
- Dempke W: *Lehrbuch Hämato-Onkologie: Hämatologie - Onkologie - Hämostaseologie*. Hans Huber, Bern 2006

- Deryugina EI, Quigley JP (2008): Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochem Cell Biol* 130, 1119–1130
- Distler JHW, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O (2003): Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 47, 149–161
- Diviné M, Casassus P, Koscielny S, Bosq J, Sebban C, Le Maignan C, Stamattoulas A, Dupriez B, Raphaël M, Pico J-L, et al. (2005): Burkitt lymphoma in adults: a prospective study of 72 patients treated with an adapted pediatric LMB protocol. *Ann Oncol* 16, 1928–1935
- Dunphy CH, Cagle PT: *Molecular Pathology of Hematolymphoid Diseases*. Springer Science & Business Media, New York 2010
- Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669–676
- Folkman J, Ingber D (1992): Inhibition of angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 3, 89–96
- Folkman J, Bach M, Rowe J, Davidoff F, Lambert P, Hirsch C, Goldberg A, Hiatt H, Glass J, Henshaw E (1971): Tumor Angiogenesis - Therapeutic Implications. *N Engl J Med* 285, 1182-
- Gao X, Wen J, Zhang L, Li X, Ning Y, Meng A, Chen Y-G (2008): Dapper1 is a nucleocytoplasmic shuttling protein that negatively modulates Wnt signaling in the nucleus. *J Biol Chem* 283, 35679–35688
- Gao X, Mi Y, Ma Y, Jin W (2014): LEF1 regulates glioblastoma cell proliferation, migration, invasion, and cancer stem-like cell self-renewal. *Tumour Biol* 35, 11505–11511
- Gerok W, Huber C, Meinertz T, Zeidler H: *Die innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*. 11. Auflage; Schattauer, Stuttgart 2007
- Gutiérrez NC, Ocio EM, de las Rivas J, Maiso P, Delgado M, Ferriñán E, Arcos MJ, Sánchez ML, Hernández JM, San Miguel JF (2007): Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenström's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. *Leukemia* 21, 541–549
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70
- Hecht JL, Aster JC (2000): Molecular Biology of Burkitt's Lymphoma. *J Clin Oncol* 18, 3707–3721
- Hillen F, Griffioen AW (2007): Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 26, 489–502
- Hoepfner LH, Secreto FJ, Razidlo DF, Whitney TJ, Westendorf JJ (2011): Lef1DeltaN binds beta-catenin and increases osteoblast activity and trabecular bone mass. *J Biol Chem* 286, 10950–10959

- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ (1999): Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284, 1994–1998
- Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TFE, Bernd H-W, Cogliatti SB, Dierlamm J, Feller AC (2006): A Biologic Definition of Burkitt's Lymphoma from Transcriptional and Genomic Profiling. *N Engl J Med* 354, 2419–2430
- Iruela-Arispe ML, Dvorak HF (1997): Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost* 78, 672–677
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52, 2745–2756
- Jain RK (2003): Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9, 685–693
- Khanna C, Hunter K (2005): Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 26, 513–523
- Klein E, Klein G (2009): Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* 19, 345–346
- Klein U, Dalla-Favera R (2008): Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8, 22–33
- Koch AE (2003): Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62 Suppl 2, ii60-67
- Kühnl A, Gökbüget N, Kaiser M, Schlee C, Stroux A, Burmeister T, Mochmann LH, Hoelzer D, Hofmann W-K, Thiel E, Baldus CD (2011): Overexpression of LEF1 predicts unfavorable outcome in adult patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 118, 6362–6367
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685
- Linke F, Zaunig S, Nietert MM, von Bonin F, Lutz S, Dullin C, Janovská P, Beissbarth T, Alves F, Klapper W, et al. (2016): WNT5A: a motility-promoting factor in Hodgkin lymphoma. *Oncogene* (im Druck)
- Martin A, Komada MR, Sane DC (2003): Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Med Res Rev* 23, 117–145
- Maruo S, Nanbo A, Takada K (2001): Replacement of the Epstein-Barr Virus Plasmid with the EBV Plasmid in Burkitt's Lymphoma Cells. *J Virol* 75, 9977–9982
- Molyneux EM, Rochford R, Griffin B, Newton R, Jackson G, Menon G, Harrison CJ, Israels T, Bailey S (2012): Burkitt's lymphoma. *Lancet* 379, 1234–1244
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J (1994): Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315–328

- Patan S (2004): Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 117, 3–32
- Petropoulos K, Arseni N, Schessl C, Stadler CR, Rawat VPS, Deshpande AJ, Heilmeier B, Hiddemann W, Quintanilla-Martinez L, Bohlander SK, et al. (2008): A novel role for Lef-1, a central transcription mediator of Wnt signaling, in leukemogenesis. *J Exp Med* 205, 515–522
- Phng L-K, Potente M, Leslie JD, Babbage J, Nyqvist D, Lobov I, Ondr JK, Rao S, Lang RA, Thurston G, Gerhardt H (2009): Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Dev Cell* 16, 70–82
- Planutiene M, Planutis K, Holcombe RF (2011): Lymphoid enhancer-binding factor 1, a representative of vertebrate-specific Lef1/Tcf1 sub-family, is a Wnt-beta-catenin pathway target gene in human endothelial cells which regulates matrix metalloproteinase-2 expression and promotes endothelial cell invasion. *Vasc Cell* 3, 28
- Qiang Y-W, Endo Y, Rubin JS, Rudikoff S (2003): Wnt signaling in B-cell neoplasia. *Oncogene* 22, 1536–1545
- Reya T, O’Riordan M, Okamura R, Devaney E, Willert K, Nusse R, Grosschedl R (2000): Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 13, 15–24
- Ribatti D: The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of angiogenesis and metastasis. Springer, Dordrecht 2010
- Ribatti D, Nico B, Ranieri G, Specchia G, Vacca A (2013): The Role of Angiogenesis in Human Non-Hodgkin Lymphomas. *Neoplasia* 15, 231–238
- Romanoff AL: The avian embryo: structural and functional development. Macmillan, New York 1960
- Ruan J, Hajjar K, Rafii S, Leonard JP (2009): Angiogenesis and antiangiogenic therapy in non-Hodgkin’s lymphoma. *Ann Oncol* 20, 413–424
- Shang D, Bi R, Han T, Wang D, Tian Y, Liu Y (2014): Expression and Proliferation-Promoting Role of Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1 in Human Clear Cell Renal Carcinoma. *Cancer Invest* 32, 368–374
- Shelton DN, Fornalik H, Neff T, Park SY, Bender D, DeGeest K, Liu X, Xie W, Meyerholz DK, Engelhardt JF, Goodheart MJ (2012): The role of LEF1 in endometrial gland formation and carcinogenesis. *PloS One* 7, e40312
- Simon M, Grandage VL, Linch DC, Khwaja A (2005): Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene* 24, 2410–2420
- Stein PDH, Hummel M (2007): Burkitt- und Burkitt-ähnliche Lymphome. *Pathologe* 28, 41–45
- Swerdlow SH: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. 4. Auflage; World Health Organization, Lyon 2008

- Tiemann M, Trümper L (2001): Pathologie, Biologie und Klassifikation maligner Non-Hodgkin-Lymphome. *Onkologe* 7, 940–959
- Travis A, Amsterdam A, Belanger C, Grosschedl R (1991): LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes Dev* 5, 880–894
- Ueberdiek S: Einfluss von LEF1 auf das Tumorwachstum im Burkitt-Lymphom-Xenograft-Modell. *Med. Diss. Göttingen* 2016
- Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, Dammacco F (1994): Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 87, 503–508
- Walther N, Ulrich A, Vockerodt M, von Bonin F, Klapper W, Meyer K, Eberth S, Pukrop T, Spang R, Trümper L (2013): Aberrant Lymphocyte Enhancer–Binding Factor 1 Expression Is Characteristic for Sporadic Burkitt’s Lymphoma. *Am J Pathol* 182, 1092–1098
- Wang W, Ji P, Steffen B, Metzger R, Schneider PM, Halfter H, Schrader M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C (2005): Alterations of Lymphoid Enhancer Factor-1 Isoform Expression in Solid Tumors and Acute Leukemias. *Acta Biochim Biophys Sin* 37, 173–180
- Wang W-J, Yao Y, Jiang L-L, Hu T-H, Ma J-Q, Liao Z-J, Yao J-T, Li D-F, Wang S-H, Nan K-J (2013): Knockdown of lymphoid enhancer factor 1 inhibits colon cancer progression in vitro and in vivo. *PloS One* 8, e76596

Internetquellen

- Kompetenznetz Maligne Lymphome 2014
<http://www.lymphome.de/InfoLymphome/NonHodgkinLymphome/Einteilung.jsp>;
Zugriff am 02.04.2014
- Kompetenznetz Maligne Lymphome 2017
<http://www.lymphome.de/InfoLymphome/NonHodgkinLymphome/TherapieAggregativ.jsp>;
Zugriff am 21.02.2017
- krebsgesellschaft.de: Therapie beim Burkitt-Lymphom 2016
<https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/burkitt-lymphom/therapie.html>;
Zugriff am 28.05.2016
- krebsgesellschaft.de: Risiko und Ursache vom Burkitt-Lymphom 2016
<https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/burkitt-lymphom/ursachen-und-risikofaktoren.html>;
Zugriff am 28.05.2016
- Leitlinie Non-Hodgkin-Lymphome 2009
<http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/025-013.html>;
Zugriff am 20.12.2016

RKI 2010

http://www.rki.de/SiteGlobals/Forms/Suche/serviceSucheForm.html?nn=2375194&resourceId=2390936&input_=2375194&pageLocale=de&searchEngineQueryString=non+hodgkin+lymphom&submit.x=0&submit.y=0; Zugriff am 20.12.2016

Studienzentrale - NHL-BFM

<https://www.uni-giessen.de/fbz/fb11/nhl-bfm/studienzentrale>; Zugriff am 28.05.2016

Danksagung

Da eine wissenschaftliche Arbeit nicht das Werk einer einzelnen Person ist, möchte ich mich im Folgenden bei allen Menschen bedanken, die mich sowohl bei der Durchführung des experimentellen Teils als auch der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Dieter Kube für sein Vertrauen und die zahlreichen Ideen und Ratschläge, die für mein Weiterkommen unabdingbar waren.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Trümper für die Möglichkeit, in seiner Abteilung zu promovieren.

Meiner Betreuerin Dr. Sonja Eberth gilt ebenfalls ein großer Dank. Ich bedanke mich für die lange und umfangreiche Unterstützung, die täglichen Tipps bei der Umsetzung unserer Ideen und das Zurseitestehen und Aufmuntern in allen Belangen.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Franziska Linke für die große Hilfe und das Engagement bis zur letzten Stunde, Dr. Stefan Ueberdiek für die hilfreiche Einarbeitungszeit im Labor und Frederike von Bonin für die Mithilfe bei der Bewältigung der CAM-Assays.

Zuletzt danke ich den Mitarbeitern des Zentrums der Anatomie Göttingen, insbesondere Prof. Dr. Wilting, Berti Manshausen und Sonja Schwoch, für die technische Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente.