

Aus der Medizinischen Klinik m.S. Hämatologie, Onkologie
und Tumorimmunologie, Campus Virchow Klinikum,
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss von Anti-Thymozyten-Globulin und Defibrotid auf die
Proliferation, Migration und angiogene Aktivität von
Endothelzellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Hannah Lena Hamelmann
aus Kiel

Datum der Promotion: 21.06.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	5
Zusammenfassung.....	6
Abstract.....	8
1 Einleitung.....	10
1.1 Hämatopoietische Stammzelltransplantation (HSCT).....	10
1.1.1 Definition.....	10
1.1.2 Einsatz der HSCT.....	10
1.1.3 Verschiedene Formen der HSCT.....	10
1.1.4 Allo-HSCT.....	11
1.1.5 Komplikationen.....	12
1.2 Die Rolle des Endothels bei allo-HSCT-assoziierten Komplikationen.....	12
1.3 Graft-versus-Host Disease (GVHD).....	14
1.3.1 Definition und Klassifikation.....	14
1.3.2 Epidemiologie.....	14
1.3.3 Klinische Manifestation.....	15
1.3.4 Pathophysiologie/Rolle des Endothels.....	16
1.3.5 Medikamentöse Therapie.....	19
1.3.6 Prävention.....	19
1.4 Anti-Thymozyten-Globulin (ATG).....	20
1.4.1 Definition und Indikation.....	20
1.4.2 ATG-Präparate.....	20
1.4.3 Wirkungsweisen.....	21
1.4.4 Effekt auf Endothelzellen.....	22
1.5 Veno-occlusive Disease/Sinusoidal Obstruction Syndrome (VOD/SOS).....	22
1.5.1 Definition und klinische Manifestation.....	22

1.5.2	Epidemiologie.....	23
1.5.3	Pathophysiologie/Rolle des Endothels	23
1.5.4	Therapie	25
1.5.5	Prävention	26
1.6	Defibrotid	27
1.6.1	Definition	27
1.6.2	Indikation/Anwendung	27
1.6.3	Wirkungsweisen	27
1.6.4	Effekt auf Endothelzellen.....	28
1.7	Fragestellungen	29
2	Material und Methoden.....	30
2.1	Zelllinien.....	30
2.2	Anti-Thymozyten-Globulin.....	32
2.3	Defibrotid	32
2.4	Scratch Assay	32
2.5	MTT Assay.....	34
2.6	Tube Formation Assay	35
2.7	Statistische Analysen.....	36
2.8	Reagenzien und Geräte.....	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Versuche mit ATG-F	38
3.1.1	ATG-F inhibiert die Zellmigration und -proliferation signifikant im Scratch Assay	38
3.1.2	ATG-F bewirkt eine signifikante dosisabhängige Inhibierung der Zellproliferationsrate im MTT Assay	40
3.1.3	ATG-F zeigt keinen signifikanten Effekt auf die angiogene Aktivität der HUVECS im Tube Formation Assay.....	44
3.2	Versuche mit DF	49

3.2.1	DF zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Zellmigration und Zellproliferation im Scratch Assay	49
3.2.2	DF inhibiert die Zellproliferationsrate der HUVECS im MTT Assay in dosisabhängiger Form.....	50
3.2.3	DF inhibiert die angiogene Aktivität von HUVECS im Tube Formation Assay in dosisabhängiger Form	53
4	Diskussion	58
4.1	Versuche mit ATG-F	59
4.1.1	ATG-F hemmt in hohen Konzentrationen die Migration und Proliferation der HUVECS im Scratch Assay	59
4.1.2	ATG-F zeigt eine dosisabhängige Hemmung der Proliferationsrate im MTT Assay	60
4.1.3	ATG-F zeigt keine Wirkung auf die angiogene Aktivität von HUVECS im Tube Formation Assay	61
4.1.4	Schlussfolgerungen	61
4.2	Versuche mit DF	64
4.2.1	DF zeigt keine Wirkung auf die endotheliale Migration und Proliferation im Scratch Assay.....	64
4.2.2	DF zeigt eine dosisabhängige Hemmung der Proliferationsrate im MTT Assay	65
4.2.3	DF hemmt dosisabhängig die angiogene Aktivität der HUVECS im Tube Formation Assay	65
4.2.4	Schlussfolgerungen	67
4.3	Limitationen	68
4.4	Ausblick	69
5	Literaturverzeichnis	72
	Eidesstattliche Versicherung	80
	Lebenslauf.....	81
	Danksagungen	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.....	17
Abbildung 2.....	24
Abbildung 3.....	31
Abbildung 4.....	33
Abbildung 5.....	35
Abbildung 6.....	39
Abbildung 7.....	40
Abbildung 8.....	42
Abbildung 9.....	43
Abbildung 10.....	44
Abbildung 11.....	45
Abbildung 12.....	46
Abbildung 13.....	48
Abbildung 14.....	50
Abbildung 15.....	51
Abbildung 16.....	52
Abbildung 17.....	53
Abbildung 18.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.....	15
Tabelle 2.....	36
Tabelle 3.....	36
Tabelle 4.....	37

Zusammenfassung

Einleitung: Die allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation (*hematopoietic stem cell transplantation*, allo-HSCT) ist eine Standardtherapie zur Behandlung von akuten Leukämien und anderen hämatologischen Neoplasien. Wesentliche Komplikationen der allo-HSCT sind Graft-versus-Host-Disease (GVHD) und Venooclusive Disease/Sinusoidal Obstruction Syndrome (VOD/SOS). Bei diesen beiden Erkrankungen kommt es initial zu einer multifaktoriellen Schädigung der Endothelzellen mit einer nachfolgenden endothelialen Entzündungsreaktion, die letztendlich zu Organschädigungen führen kann. Der polyklonale Antikörper Anti-Thymozyten-Globulin-Fresenius (ATG-F) wird zur Prophylaxe der GVHD eingesetzt und das endothelprotektive Medikament Defibrotid (DF) wird zur Prophylaxe der VOD/SOS eingesetzt. Die Wirkung dieser beiden Standardmedikamente der allo-HSCT auf Endothelzellen ist bisher noch nicht ausreichend experimentell untersucht worden. In dieser Arbeit soll die Hypothese getestet werden, dass ATG-F endotheliale Funktionen hemmen und somit die Neovaskularisierung beeinträchtigen kann. Als zweite Hypothese soll getestet werden, dass DF endotheliale Funktionen fördern und dadurch die endotheliale Regeneration unterstützen kann.

Methodik: Mithilfe von drei *in vitro* Assays habe ich den Effekt von ATG-F und DF auf Funktionen von humanen Endothelzellen, die aus der Nabelschnurvene isoliert werden (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVECS), beobachtet: 1) den Scratch Assay, der die Proliferation und Migration misst; 2) den MTT Assay, der die Proliferationsrate misst; und 3) den Tube Formation Assay, der die angiogene Aktivität misst.

Ergebnisse: ATG-F hemmt die Migration und Proliferation von Endothelzellen im Scratch Assay signifikant und bewirkt eine signifikante dosisabhängige Inhibierung der Zellproliferationsrate im MTT Assay. ATG-F hat jedoch keinen signifikanten Effekt auf die angiogene Aktivität der HUVECS im Tube Formation Assay. DF hemmt signifikant die Zellproliferationsrate im MTT Assay und die angiogene Aktivität der HUVECS im Tube Formation Assay in dosisabhängiger Form. DF hat jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Zellmigration und -proliferation im Scratch Assay.

Schlussfolgerung: Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit bisher unbekannte Wirkungen von ATG-F und DF, zwei in der Transplantationsmedizin häufig verwendete Medikamente, auf die Endothelfunktion nachgewiesen werden. Beide getesteten

Medikamente hemmen die Funktion von Endothelzellen in dosisabhängiger Beziehung. Dies hat potentiell wichtige klinische Implikationen. In der frühen Phase nach einer allo-HSCT könnte sowohl durch ATG-F als auch durch DF ein positiver Effekt vermittelt werden. Die GVHD-assoziierte pathologische Neovaskularisierung könnte gehemmt werden, was zur Reduktion des Schweregrads der akuten GVHD führen würde. In der späten Phase nach einer allo-HSCT sind hingegen eher negative Effekte durch die Hemmung der Endothelfunktion zu erwarten. Die Reparatur von Endothelschäden und die physiologische Endothelregeneration könnte gehemmt werden und potentiell zur Verstärkung von Endothel-assoziierten Komplikationen nach allo-HSCT, wie beispielsweise Mikroangiopathie, chronische GVHD und VOD/SOS, führen.

Abstract

Introduction: The allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a standard form of therapy used in acute leukaemia and other hematological neoplasia. Important complications are graft-versus-host-disease (GVHD) and veno-occlusive disease/sinusoidal obstruction syndrome (VOD/SOS). Both diseases are marked by a multifactorial damage of endothelial cells that leads to endothelial inflammatory reactions and thus organ damage. The polyclonal antibody anti-thymocyte-globulin-Fresenius (ATG-F) is used as prophylaxis against GVHD, while Defibrotide (DF) is used as prophylaxis against VOD/SOS. The effects of ATG-F and DF on endothelial cells have yet not been experimentally tested to a sufficient extent. In this work the hypothesis that ATG-F can inhibit endothelial functions and thus impair neovascularization was tested. Secondly, the hypothesis that DF can stimulate endothelial functions and thus promote endothelial regeneration was tested.

Methods: Three *in vitro* assays were used to test the effects of ATG-F and DF on human umbilical vein endothelial cells (HUVECS): 1) the scratch assay measures endothelial proliferation and migration; 2) the MTT assay measures endothelial proliferation rates; and 3) the tube formation assay measures the angiogenic activity of endothelial cells.

Results: ATG-F can significantly inhibit endothelial proliferation and migration in the scratch assay and can dose-dependently inhibit proliferation rates in the MTT assay. ATG-F showed no significant effects on the angiogenic activity in the tube formation assay. DF can significantly inhibit proliferation rates in the MTT assay and the angiogenic activity in the tube formation assay, both dose-dependently. DF showed no effects on endothelial proliferation and migration in the scratch assay.

Conclusion: Our findings demonstrate previously unknown effects of ATG-F and DF, two standard drugs used in the field of allo-HSCT, on endothelial cells. Both tested drugs show inhibitory effects on the function of endothelial cells in a dose-dependent manner. These findings may have implications for therapies targeting the endothelium. In the early phases after allo-HSCT, both ATG-F and DF could have a positive effect by inhibiting the pathological GVHD-associated neovascularization, and thus leading to a reduced severity of acute GVHD. However, in later phases after allo-HSCT, the inhibitory effects of ATG-F and DF on endothelial functions may impair endothelial regeneration and thus

promote endothelial damage. This might lead to in an increase of endothelium-associated complications after allo-HSCT, such as microangiopathy, chronic GVHD, and VOD/SOS.

1 Einleitung

1.1 Hämatopoietische Stammzelltransplantation (HSCT)

1.1.1 Definition

Die hämatopoietische Stammzelltransplantation (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) ist eine Form der Therapie, bei der einem Patienten hämatopoietische Stamm- und/oder Progenitorzellen als Infusion verabreicht werden. Die HSCT wird vor allem verwendet, um maligne Erkrankungen (z.B. akute und chronische Leukämien und Lymphome) sowie nicht-maligne Erkrankungen des blutbildenden Apparates (z.B. Aplastische Anämie und Thalassämie major) zu behandeln (1-3).

1.1.2 Einsatz der HSCT

Die Anzahl an Patienten, die mit einer HSCT behandelt werden, nimmt jedes Jahr kontinuierlich und stetig zu. Im Jahr 2014 wurden laut der *European Society of Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) allein in Europa 40.829 HSCT durchgeführt. Das sind 22% mehr als im Jahr 2010 und sogar 80% mehr als im Jahr 2000 (2).

Zu den häufigsten Indikationen für eine HSCT zählen in Europa die lymphoiden Neoplasien wie Plasmazellerkrankungen und Non-Hodgkin-Lymphome (57% aller HSCT im Jahr 2014) sowie die akuten Leukämien (33% aller HSCT im Jahr 2014) (2).

In den letzten Jahrzehnten wurde das HSCT-Verfahren ständig optimiert: durch eine verbesserte Spender- und Patientenauswahl, durch die Einführung und Anpassung der Konditionierungstherapie und durch moderne supportive Therapien zur Prävention von Infektionen und Komplikationen. Hierdurch konnte über die letzten 20 Jahre hinweg die Gesamtmortalität sowie die Rate an HSCT-assoziiierter Mortalität deutlich gebessert werden, sodass die HSCT heute eine Standardform der Therapie für die genannten Indikationen darstellt (1, 2, 4).

1.1.3 Verschiedene Formen der HSCT

Es gibt grundsätzlich drei Formen der HSCT: die autologe, die syngene und die allogene HSCT. Bei der autologen HSCT stammen die infundierten Stamm- und Progenitorzellen

vom Patienten selbst. Handelt es sich bei Spender und Empfänger um genetisch identische Personen (eineiige Zwillinge), wird dies als syngene HSCT bezeichnet. Werden die transplantierten Stamm- und Progenitorzellen jedoch von einem genetisch differenten Spender gewonnen, handelt es sich um eine allogene HSCT (allo-HSCT) (2, 3, 5).

1.1.4 Allo-HSCT

Die allo-HSCT kommt vor allem bei Krankheiten zum Einsatz, bei denen das Knochenmark des Patienten direkt von der Grunderkrankung betroffen ist, wie beispielsweise bei einer Leukämie (2, 3, 5, 6). Zurzeit werden die Spenderzellen aus dem Knochenmark oder, nach Vorbehandlung mit dem Granulozyten-Koloniestimulierendem-Faktor (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*, G-CSF), aus dem peripheren Blut eines Spenders gewonnen. Weniger häufig werden auch Stammzellen aus dem Nabelschnurblut Neugeborener für eine allo-HSCT verwendet (2, 7). Die Auswahl der Spenderzellenquelle hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie zum Beispiel vom Alter, der spezifischen Erkrankung und dem Allgemeinzustand des Empfängers (2, 7, 8).

Der Empfänger erhält vor einer allo-HSCT eine Konditionierungsbehandlung, die üblicherweise aus einer kombinierten Chemo- und Bestrahlungstherapie besteht. Klassischerweise hat die Konditionierungstherapie zum Ziel, maligne Tumorzellen im Patienten zu eliminieren, durch eine sogenannte Myeloablation im Knochenmark „Platz“ für die infundierten Spenderzellen zu schaffen und durch eine Immunsuppression des Empfängers die Abstoßung (*graft rejection*) zu verhindern und so das Anwachsen der infundierten Spenderzellen, auch *Engraftment* genannt, zu ermöglichen (3, 9).

Bei einer allo-HSCT ist das Transplantat reich an hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen sowie reifen T-Zellen des Spenders. Die reifen Spenderzellen begünstigen das Anwachsen der Spender-Stammzellen im Knochenmark des Empfängers, ersetzen die durch die Konditionierung zerstörte Immunfunktion des Empfängers und vermitteln zusätzlich einen potentiell vorteilhaften Graft-versus-Tumor(GVT)-Effekt (3). Im Rahmen des GVT-Effekts werden möglicherweise verbliebene Tumorzellen im Empfänger durch immunologische Maßnahmen der reifen Spenderzellen eliminiert (10).

Zusätzlich spielen die reifen T-Zellen des Spenders auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von allo-HSCT-assoziierten Komplikationen wie zum Beispiel der Graft-versus-Host-Reaktion (*graft-versus-host disease*, GVHD), welche eine häufige Ursache für Morbidität und Mortalität bei Patienten nach einer allo-HSCT darstellt (3, 11, 12).

1.1.5 Komplikationen

Im Rahmen einer allo-HSCT kann es zu verschiedenen lebensbedrohlichen Komplikationen kommen (13-15). Bedingt durch die Myeloablation im Rahmen der Konditionierungstherapie ist das Infektionsrisiko in den ersten Wochen sehr hoch (15, 16). Vor allem virale Infektionen, insbesondere *de novo* Infektionen oder Reaktivierungen des Cytomegalie-Virus, Epstein-Barr-Virus oder Herpes-simplex-Virus, stellen eine häufige Komplikation nach einer allo-HSCT dar (14, 15). Auch die Toxizität der Konditionierungstherapie kann vor allem Organe schädigen, bei denen regelhaft eine schnelle Zellteilung stattfindet, sodass beispielsweise die Stomatitis sowie die hämorrhagische Zystitis häufige Komplikationen darstellen (17).

Die GVHD ist eine häufige und gefürchtete Komplikation der allo-HSCT, die zu erheblicher Mortalität und Morbidität führen kann (4, 6, 12). In dieser Arbeit wird auf diese Erkrankung später genauer eingegangen.

Zusätzlich kann es zur Manifestation eines vaskulären Endothelsyndroms kommen, zu dem beispielsweise die Transplantations-assoziierte thrombotische Mikroangiopathie (TA-TMA), die Venöse okklusive Lebererkrankung (*veno-occlusive disease*, VOD, auch bekannt als *sinusoidal obstruction syndrome*, SOS), sowie das Idiopathische Pneumonie Syndrom (IPS) zählen. Diese Gruppe von Erkrankungen beruht größtenteils auf einer multifaktoriellen Schädigung von Endothelzellen, sodass sie sich in ihrer klinischen Manifestation oft überlappen und schwer zu unterscheiden sind (18). Auf die VOD/SOS wird in dieser Arbeit später ausführlicher eingegangen.

1.2 Die Rolle des Endothels bei allo-HSCT-assoziierten Komplikationen

Die Endothelzellen, die eine aktive Grenzfläche zwischen dem Blut und allen anderen Geweben darstellen und unter anderem für die hämostatische Balance und für inflammatorische Reaktionen verantwortlich sind, spielen eine wichtige Rolle in der

Pathophysiologie von vielen allo-HSCT-assoziierten Komplikationen und Erkrankungen (18, 19).

Im Rahmen einer allo-HSCT kann es zu einer multifaktoriellen endothelialen Aktivierung kommen, beispielsweise durch die Konditionierungstherapie, durch freigesetzte Zytokine aus geschädigtem Gewebe, durch Mikroorganismen, durch die prophylaktische Gabe von Medikamenten wie Calcineurininhibitoren und durch alloreaktive Immunreaktionen (18). All diese Faktoren können zu einer physiologischen Aktivierung der Endothelzellen führen. Ist diese Aktivierung jedoch anhaltend und ungebremst, kann es zu einer Schädigung der Endothelzellen kommen, die letztendlich zu Komplikationen wie der GVHD oder der VOD/SOS führen kann (18).

Die endothelialen Zellen reagieren auf die initiale Schädigung durch die Konditionierungstherapie mit einer erhöhten Expression von Zytokinen (z.B. Tumornekrosefaktor- α [TNF α], Interleukin 1 [IL-1], Interleukin 6 [IL-6]), sowie Chemokinen (z.B. Interleukin 8 [IL-8], *Monocyte Chemoattractant Protein 1* [MCP-1]) und Leukozyten-Adhäsionsmolekülen (z.B. E-selectin, Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 [*intercellular adhesion molecule 1*; ICAM-1], Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül [*vascular cell adhesion molecule 1*; VCAM-1]) (20-22). Die Durchlässigkeit bzw. Permeabilität des Endothels wird hierdurch erhöht und Zellen, die durch die Chemo- und Zytokine angelockt und aktiviert werden, können das Gewebe infiltrieren und zu entzündlichen Organschäden führen (18).

Nach einer allo-HSCT kommt es im weiteren Verlauf zu einer Infiltration der entzündeten Gewebe mit alloreaktiven Spenderzellen, die durch immunologische Aktivierung und Mediatorenfreisetzung zusätzlich zur Gewebeschädigung beitragen können. Dies spiegelt sich in der Tatsache wider, dass die Rate an endothelialen Komplikationen wie GVHD, VOD/SOS oder TA-TMA nach einer allo-HSCT deutlich höher ist als nach einer autologen HSCT trotz ähnlicher Intensität der verwendeten Konditionierungstherapien (18, 23, 24).

1.3 Graft-versus-Host Disease (GVHD)

1.3.1 Definition und Klassifikation

Die GVHD ist eine systemisch-entzündliche Erkrankung, die als Komplikation nach einer allo-HSCT auftreten kann (25-27). Hierbei erkennen allogene Spenderzellen die Gewebsantigene des Empfängers als fremd und attackieren spezifisch Organe, die solche Gewebsantigene stark exprimieren, insbesondere also die Haut, die Leber und den Magen-Darm-Trakt (25, 26, 28).

Traditionell wurde die GVHD in eine akute und eine chronische Phase unterteilt, abhängig von der Zeitspanne zwischen der allo-HSCT und dem Beginn der ersten Symptome. Dabei stellten 100 Tage bis zum Symptombeginn die Grenze zwischen akuter und chronischer GVHD dar (29). Die heutzutage allgemein akzeptierte Klassifikation unterscheidet die akute und die chronische GVHD jedoch anhand klinischer Kriterien und unterteilt sie in zwei verschiedene Erkrankungen mit unterschiedlichen klinischen und histopathologischen Befunden (25-27, 29, 30).

1.3.2 Epidemiologie

Die GVHD ist eine der größten Herausforderungen und eine häufige Ursache für Morbidität und Mortalität nach einer allo-HSCT (25, 26, 31). Die akute GVHD tritt bei 30-60% aller Patienten auf und geht mit einer Mortalitätsrate von bis zu 30% einher (25-27, 30). Die Inzidenz der akuten GVHD korreliert stark mit dem Grad der Kompatibilität der Humanen Leukozytenantigene (HLA) sowie dem Grad an Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger. In einer HLA-kompatiblen Situation (10/10 Gewebemerkmale passend) mit einem verwandten Spender kann die GVHD bei 35-40% der Patienten auftreten, während sie in einer HLA-inkompatiblen Situation mit einem nicht verwandten Spender sogar bei 60-80% der Patienten auftreten kann (30). Zu den weiteren Risikofaktoren für die Entwicklung einer GVHD zählen beispielsweise ein hohes Empfänger- oder Spenderalter, eine weibliche Spenderin für einen männlichen Empfänger, vorausgegangene Infektionen des Spenders sowie die Transplantation von Stammzellen, die aus dem peripheren Blut gewonnen wurden (27, 32).

1.3.3 Klinische Manifestation

Die GVHD präsentiert sich klinisch als eine Schädigung von vorwiegend epithelialen Geweben (33). Bei der akuten GVHD sind die klinischen Hauptmanifestationsstellen im Körper die Haut, die Leber und der Magen-Darm-Trakt (26, 27, 30). Dabei ist die Haut meist das Organ, das als erstes betroffen ist und dessen Schädigung oft mit dem Zeitpunkt des *Engraftments* zusammenfällt (26, 30). Der Schweregrad der akuten GVHD wird anhand des Ausmaßes der Schädigung der drei Hauptzielorgane bestimmt und in vier Grade nach Glucksberg eingeteilt (34, 35) (Tab. 1).

Tab. 1: Stadien- und Gradeinteilung der akuten GVHD, modifiziert nach Glucksberg.

	Stadium 1	Stadium 2	Stadium 3	Stadium 4
Haut	Makulopapulöses Erythem <25% der KOF	Makulopapulöses Erythem 25-50% der KOF	Generalisierte Erythrodermie >50% der KOF	Generalisierte Erythrodermie mit bullösen Formationen und evtl. Desquamation
Leber	Bilirubin 2.0-3.0 mg/dl; AST 150-750 IU	Bilirubin 3.1-6.0 mg/dl	Bilirubin 6.1-15.0 mg/dl	Bilirubin > 15.0 mg/dl
Darm	Diarrhoe >30 ml/kg oder > 500 ml/Tag	Diarrhoe >60 ml/kg oder > 1000 ml/Tag	Diarrhoe >90 mL/kg oder > 1500 mL/Tag	Diarrhoe >90 ml/kg oder > 2000 ml/Tag; starke abdominelle Schmerzen, evtl. mit Ileus

KOF: Körperoberfläche / AST: Aspartat-Aminotransferase

Grad (nach Glucksberg)	Haut Stadium	Leber Stadium	Darm Stadium
I (leicht)	1-2	0	0
	0	0-1	0-1
II (moderat)	3	0	0
	1-3	1	0-1
	0	0-1	1
III (schwer)	2-3	2-3	2-3
IV (lebensbedrohlich)	2-4	2-4	2-4

Die chronische GVHD kann jedes Organ befallen und präsentiert sich daher mit einer ähnlichen Symptomatik wie Autoimmunerkrankungen. Zu den am häufigsten betroffenen Organen gehören die Haut und Schleimhäute, Augen, Speicheldrüsen, Darm, Leber und Lunge (25, 30, 36). Die chronische GVHD kann entweder anschließend an eine akute GVHD oder *de novo* auftreten. Maßnahmen, die die Entwicklung einer akuten GVHD

vorbeugen, können potentiell auch das Risiko für die Entwicklung einer chronischen GVHD senken (25, 30).

1.3.4 Pathophysiologie/Rolle des Endothels

Da sich die GVHD klinisch als Schädigung von epithelialen Zellen präsentiert, wurde sie traditionell als Zytokin-induzierte epitheliale Erkrankung betrachtet. Allerdings konnten mehrere Studien aufdecken, dass auch eine Schädigung und Aktivierung des Endothels bei der GVHD auftritt (29, 33). So konnten Dumler et al. beispielsweise mithilfe mikroskopischer Auswertungen vaskuläre Veränderungen und Schädigungen an Hautbiopsaten von Patienten mit akuter GVHD nachweisen (37).

Die Beteiligung des Endothels bei der Entstehung von GVHD lässt sich in drei Phasen einteilen (33):

- I) die Konditionierungsbehandlung schädigt das Endothel des Empfängers;
- II) die endotheliale Schädigung führt zur Rekrutierung von Entzündungszellen, einer verstärkten Neovaskularisierung und der Entwicklung einer akuten GVHD;
- III) in späteren Stadien attackieren alloreaktive Spenderzellen die endothelialen Zellen des Empfängers, was zu einer Fibrosierung und Atrophie von Blutgefäßen führt und sich klinisch als chronische GVHD präsentiert (Abb. 1).

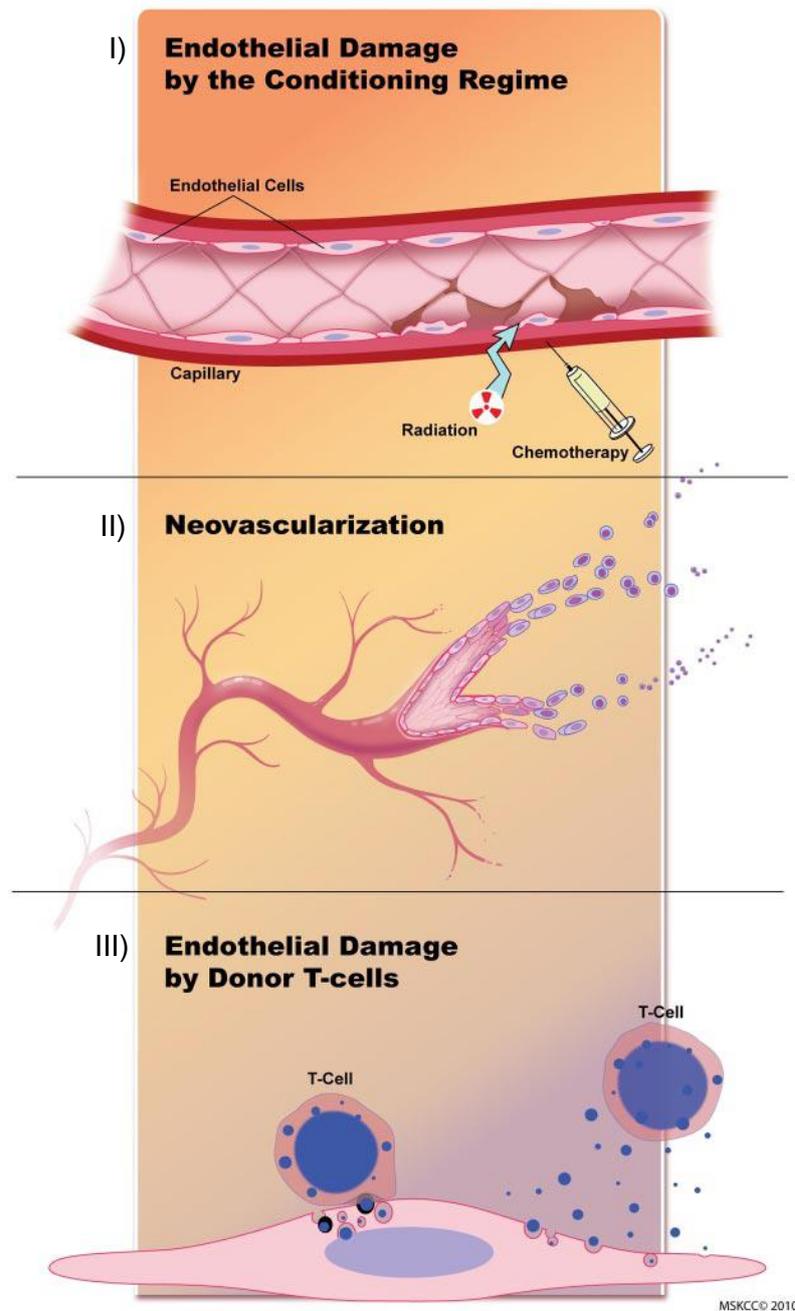


Abb. 1: Die Rolle des Endothels bei der GVHD. Initial kann die Konditionierungstherapie das Endothel schädigen (I). Während der akuten entzündlichen Phase kann es zur verstärkten Neovaskularisierung und zur Rekrutierung und Infiltration von Entzündungszellen kommen (II). Im weiteren Verlauf kann das Endothel durch alloreaktive Spender-T-Zellen weiter zerstört werden (III). (Aus: Penack O. et al. *Blood* 2011; 117: 4181 (33). Entworfen von T. Helms (MSKCC) und O. Penack).

Während der ersten Phase kann die Endothelschädigung, verursacht durch die Konditionierungsbehandlung, zu einer endothelialen Aktivierung führen mit einer erhöhten Produktion und Expression von sogenannten *danger signals*, zu denen proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle zählen (30, 33).

Diese *danger signals* führen zu einer Aktivierung von Antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) des Empfängers, wodurch T-Lymphozyten und Antikörper rekrutiert werden und nachfolgend eine lokale Gewebeentzündung eintreten kann (vgl. Kapitel 1.2).

Während der zweiten Phase steht die Neovaskularisierung im Vordergrund. In mehreren Studien konnte eine erhöhte Dichte an Gefäßen in GVHD-erkrankten Organen, zum Beispiel in Mausmodellen und in menschlichen Hautbiopsaten, nachgewiesen werden (33, 37-39). Riesner et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Neovaskularisierung vor allem während der ersten Tage nach einer allo-HCST stattfindet (d+1 bis d+2) (40). Die durch den Endothelschaden rekrutierten Immunzellen können nun aufgrund der verstärkten Neovaskularisierung einfacher in die betroffenen Organe migrieren und diese weiter schädigen (33).

In der dritten Phase der GVHD kommt es durch immunologische Reaktionen zu einer weiteren Endothelschädigung. Reife, alloreaktive T-Zellen und Natürliche Killerzellen des Spenders können aufgrund der vorausgegangenen Neovaskularisierung die Organe des Empfängers infiltrieren (ab d+7), und durch immunologische Reaktionen die Empfängergewebe als fremdartig erkennen und daraufhin angreifen (14, 40). Diese Reaktion wird zum Beispiel durch Unterschiede im Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) zwischen Spender und Empfänger, also vor allem in einer HLA-inkompatiblen Situation, ausgelöst. In einer HLA-inkompatiblen Situation können die alloreaktiven Spenderzellen alle MHC-I-positiven Gewebe erkennen und schädigen. Doch auch in einer HLA-kompatiblen Situation (10/10 Gewebemerkmale passend) kann eine GVHD auftreten, wenn die alloreaktiven Spenderzellen Minor Histokompatibilitätsantigene (miHAs) des Empfängers erkennen. MiHAs sind kleine Peptide, die an den MHC gebunden sind und von Proteinprodukten des Empfängers stammen (3, 30, 41). Da die Alloantigene, die durch die alloreaktiven Spenderzellen erkannt werden können, ubiquitär im Empfänger vorkommen, kann die GVHD, insbesondere in der chronischen Form, stark einer chronischen viralen Infektion mit vielfältigen Manifestationen ähneln (3, 30).

Zusammengefasst ist die GVHD assoziiert mit Endothelschaden, verstärkter Neovaskularisierung und Gewebeerstörung durch alloreaktive Spenderzellen.

1.3.5 Medikamentöse Therapie

Zur Primärtherapie der akuten GVHD gehören Steroiden sowie supportive Maßnahmen. Abhängig von der jeweiligen Organmanifestation und vom Schweregrad der Erkrankung können die Steroide sowohl topisch, beispielsweise bei der isolierten Haut-GVHD, oder systemisch und in unterschiedlicher Dosierung verabreicht werden (27). Die Zweitlinientherapie bei Nichtansprechen auf die systemischen Steroide umfasst zahlreiche weitere Optionen. Neben einer Intensivierung der Erstlinientherapie gehören die extrakorporale Photopherese (*extracorporeal photopheresis*, ECP), bei der Leukozyten-angereichertes Plasma des Patienten einer kontrollierten UV-A-Bestrahlung ausgesetzt wird, und die Immunsuppression durch Mycophenolat-Mofetil (MMF) zu den am häufigsten angewendeten Zweitlinientherapien (27).

Die Therapie der chronischen GVHD erfolgt je nach Schweregrad und Organmanifestation. Bei der milden Form der chronischen GVHD kommen vor allem topische Maßnahmen sowie niedrig-dosierte systemische Steroide zum Einsatz. Die moderate und schwere Erkrankungsform wird mit systemischen Steroiden behandelt, gegebenenfalls auch in Kombination mit anderen Immunsuppressiva wie Cyclosporin A (CsA) oder Tacrolimus. Je nach Organmanifestation bestehen zudem zahlreiche weitere supportive Therapieoptionen (36).

1.3.6 Prävention

Um die Entwicklung einer GVHD nach einer allo-HSCT zu verhindern, gibt es mehrere Präventionsmöglichkeiten.

Die T-Zelldepletion (*t-cell depletion*, TCD) stellt dabei die effektivste Methode dar, um das Risiko einer GVHD zu senken (1). Bei der TCD werden die alloreaktiven Spenderzellen, die in der Pathogenese der GVDH eine wichtige Rolle spielen, *in vitro* oder *in vivo* eliminiert oder in ihrer Funktion gehemmt (24). Bei der TCD *in vitro* werden die reifen Spender-T-Zellen durch verschiedene Mechanismen selektiert und aus der Stammzelltransfusionslösung entfernt, bevor der Empfänger sie im Rahmen der allo-HSCT erhält. Die TCD *in vivo* besteht aus der medikamentösen Gabe von Antikörpern wie Anti-Thymozyten-Globulinen (ATG) oder Alemtuzumab (monoklonaler Antikörper gegen das Glykoprotein CD52 auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten), die durch

immunologische Maßnahmen wie Komplementaktivierung oder zellvermittelte Zytotoxizität die Spender-T-Zellen eliminieren können (3, 30, 41). Eine weitere *in vivo* Möglichkeit zur Prävention der GVHD ist die Gabe von Immunsuppressiva wie beispielsweise MMF, Methotrexat (MTX), CsA oder Tacrolimus, die die Funktion der alloreaktiven Spenderzellen hemmen können (24).

1.4 Anti-Thymozyten-Globulin (ATG)

1.4.1 Definition und Indikation

Anti-Thymozyten-Globuline (ATG) sind polyklonale IgG-Antikörper, die durch die Immunisierung von Kaninchen oder Pferd mit humanen Thymozyten, T-Zellen oder T-Zelllinien gewonnen werden.

Ursprünglich wurde ATG zur Prävention und Therapie von akuten Abstoßungsreaktionen bei solider Organtransplantation entwickelt und ist hierfür seit vielen Jahren zugelassen (42).

Im Rahmen einer allo-HSCT ist ATG zur Prophylaxe der GVHD zugelassen und ist vor allem bei Patienten, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer schweren GVHD haben, indiziert (30, 31, 43). Die prophylaktische Gabe erfolgt üblicherweise einige Tage vor der allo-HSCT (d-3 bis d-1), um bereits zum Zeitpunkt der Infusion eine ausreichend hohe Serumkonzentration aufzuweisen (42-44).

1.4.2 ATG-Präparate

Es gibt drei verschiedene ATG-Präparate, die häufig zur Prophylaxe der GVHD verwendet. Das erste Präparat, ATG-Pharmacia (Atgam; USA), wird durch Immunisierung von Pferden gewonnen und enthält Antikörper gegen Thymozyten. Die anderen beiden ATG-Präparate, Thymoglobulin (USA) und ATG-Fresenius (ATG-F; Deutschland), werden durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen. Thymoglobulin enthält Antikörper gegen humane Thymozyten während ATG-F Antikörper gegen die T-Zell-leukämische Jurkat-Zelllinie enthält (45).

Durch die Gabe von ATG-F und Thymoglobulin kann die Inzidenz von akuter und chronischer GVHD gesenkt werden (43, 46). Die Gabe von Atgam hat sich bisher nur in der Behandlung der Aplastischen Anämie bewährt (47).

Beim Vergleich der beiden Kaninchen-ATGs zeigte sich, dass Thymoglobulin die Rate an akuter GVHD in hohen Dosierungen senken konnte und mit einer erhöhten Rate an letalen Infektionen und verspäteter hämatopoietischer Rekonstitution einherging (31, 48). Auf der anderen Seite zeigte ATG-F eine reduzierte Rate an akuter GVHD ohne ein signifikant erhöhtes Infektions- oder Malignomrezidivrisiko (46).

1.4.3 Wirkungsweisen

Die genauen immunologischen Wirkmechanismen der ATG-Präparate sind bisher noch nicht vollständig bekannt. Zu den Hauptmechanismen des ATG-F zählt die Depletion von T-Zellen und Natürlichen Killerzellen, also eine Inaktivierung der alloreaktiven Spenderzellen, die für die Entwicklung einer GVHD entscheidend sind (41). Die Zell-Depletion findet hauptsächlich über eine Komplement-Aktivierung sowie über die Induktion einer Apoptose statt (45, 49).

In den letzten Jahren wurde in Studien festgestellt, dass die Wirkung des ATG-F nicht nur auf der Zell-Depletion beruht, sondern noch viele weitere immunologische Reaktionen umfasst. ATG-F enthält als Gemisch polyklonaler IgG-Antikörper nicht nur Antikörper, die an T-Zellen binden, sondern auch Antikörper mit Bindungsaffinität zu anderen Zellen wie Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Natürliche Killerzellen und B-Zellen (31, 45, 50). Darüber hinaus kann ATG-F die Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokin-Rezeptoren und die Aktivität regulatorischer T-Zellen modulieren (45, 48, 49). So konnte in Studien gezeigt werden, dass ATG-F dosisabhängig die Expression der Adhäsionsmoleküle CD11b, CD18 und CD62L auf Lymphozyten und Neutrophilen reduziert und somit dessen Interaktion mit Endothelzellen beeinflussen kann (45, 50). Zusätzlich kann ATG-F die Apoptose von B-Zellen induzieren und durch eine Aktivierung von regulatorischen T-Zellen die Anzahl und Aktivität von APC vermindern und somit zu einer Reduktion der Spender-spezifischen Antikörper führen (45, 51, 52).

1.4.4 Effekt auf Endothelzellen

Da die Rolle der Endothelien in einer allo-HSCT-Situation in den letzten Jahren mehr an Bedeutung gewonnen hat, wurde auch die Interaktion von ATG-Präparaten mit Endothelzellen in einigen Studien untersucht. Wie bereits oben erwähnt, kann ATG-F durch Modulation der Leukozyten dessen Interaktion mit Endothelien beeinflussen (45, 50). Kanzler et al. konnten zusätzlich zeigen, dass ATG-F an Endothelzellen binden kann und dadurch die endotheliale-leukozytäre Interaktion auch von Seiten der Endothelzellen beeinflussen kann (53, 54).

Die Bindung von ATG-F an Endothelzellen geschieht über endotheliale Oberflächenrezeptoren wie die IgG-bindenden Brambell-Rezeptoren (FcRn), ICAM-1 (CD54) und E-selectin (CD62E), die vor allem von aktivierten Endothelzellen exprimiert werden (53). Die endotheliale Bindung von ATG-F führt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer verminderten endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM und reduziert dadurch die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen, wodurch weniger proinflammatorische Moleküle freigesetzt werden können (44, 50, 53, 55). Zudem verhindert die „Umhüllung“ der Endothelzellen mit ATG-F, dass diese als APC fungieren können, wodurch weniger Antikörper-produzierende B-Zellen aktiviert werden können (49).

Durch eine verminderte Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten kann ATG-F also die Entzündungsreaktion, die im Rahmen einer allo-HSCT stattfindet, eindämmen.

1.5 Veno-occlusive Disease/Sinusoidal Obstruction Syndrome (VOD/SOS)

1.5.1 Definition und klinische Manifestation

Die Venöse Okklusive Leberkrankheit (*veno-occlusive disease, VOD*), auch *sinusoidal obstruction syndrome (SOS)* genannt, ist eine obliterative Entzündung der terminalen hepatischen Venolen und gehört zusammen mit der GVHD zu einer der lebensbedrohlichsten Komplikationen nach einer allo-HSCT (56, 57). Von den zahlreichen Erkrankungen, die zum vaskulären Endothelsyndrom zählen, ist die VOD/SOS bisher am besten charakterisiert.

Die VOD/SOS manifestiert sich klinisch durch Zeichen der Leberschädigung wie Hyperbilirubinämie, Hepatomegalie und Gewichtszunahme aufgrund von

Flüssigkeitsakkumulation (58, 59). Seit den 1980ern werden die Baltimore- und die Seattle-Kriterien zur Diagnostik der VOD/SOS verwendet (60). Im Jahr 2016 hat die *European Society for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) neue Kriterien definiert, die nun auch eine *late onset VOD/SOS* bei Erwachsenen mit Erkrankungsbeginn nach dem 21. Tag berücksichtigen (61). Da bis zu 20% aller Kinder erst nach dem 30. Tag an VOD/SOS erkranken und etwa ein Drittel der Patienten keine Hyperbilirubinämie aufweisen, hat die EBMT zusätzlich eigene diagnostische Kriterien für Kinder definiert (60).

1.5.2 Epidemiologie

Die VOD/SOS tritt bei bis zu 5% aller Patienten nach einer autologen HSCT und bei ca. 5-15% aller Patienten nach einer allo-HSCT auf (62). Einige Autoren beschreiben deutlich höhere Inzidenzraten, was möglicherweise auf die Verwendung verschiedener Studiendesigns und Einschlusskriterien sowie uneinheitlicher diagnostischer Kriterien zurückzuführen ist (60, 63, 64). So beträgt die Gesamtinzidenz bei Kindern mit hohem Risiko bis zu ca. 30% (65, 66). Zu den Risikofaktoren zählen insbesondere vorbestehende Lebererkrankungen, systemische Entzündungen, eine allogene HSCT sowie hohe Dosierungen der konditionierenden Bestrahlungs- und Chemotherapie (57, 63). Die Gesamtinzidenz der VOD/SOS ist in den letzten Jahren deutlich gesunken, unter anderem aufgrund des Einführens einer intensitätsreduzierten Konditionierungstherapie sowie hochauflösender HLA-Typisierungsmethoden (18, 64).

Trotz der relativ geringen Gesamtinzidenz stellt die VOD/SOS eine bedeutende Komplikation der HSCT dar, da ein Fortschreiten der Erkrankung mit Multiorganversagen zu einer Mortalitätsrate von bis zu 90% führt (24, 67, 68).

1.5.3 Pathophysiologie/Rolle des Endothels

Bei der VOD/SOS kommt es durch die konditionierende Chemo- und Bestrahlungstherapie zu einer initialen Schädigung der sinusoidalen Endothelzellen der Lebervenen. Aufgrund der anfallenden Metabolite der Chemotherapeutika kann es zu einem Verbrauch der Antioxidantien kommen, die die Leberzellen vor freien Radikalen schützen können. Zusätzlich kommt es durch die Bestrahlungstherapie zu einer vermehrten

endothelialen Bildung von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 , was die kapillare Permeabilität erhöht und toxisch auf die Sinusendothelzellen wirkt und somit zu dessen Dysfunktion beiträgt (69-71). Durch eine verstärkte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 an der Oberfläche der geschädigten Sinusendothelzellen, kommt es zur Aktivierung von Leukozyten, die zusätzlich proinflammatorische Zytokine freisetzen und zur weiteren Schädigung der Sinusendothelzellen beitragen können (72, 73). Diese lösen sich voneinander ab und formen sich rund, sodass es zu einem Verlust der physiologisch engen endothelialen Fenestration mit großen Lücken in der Sinuswand kommt. Erythrozyten und Leukozyten können in den Disse-Raum, der die Sinusendothelzellen von den Hepatozyten trennt und der Ort des Stoffaustauschs ist, gelangen und die Zellen der Sinuswand weiter ablösen. Letztendlich können die abgelösten Zellen (Sinusendothelzellen, Kupffer-Zellen, Ito-Zellen) innerhalb des Sinuslumens embolisieren und zu einer Obstruktion der nachgeschalteten hepatischen Zentralvene mit vermindertem Blutfluss führen. Durch ein subintimales Ödem der hepatischen Zentralvene wird dessen Obstruktion weiterhin verstärkt. (18, 69, 72, 74, 75) (Abb. 2).

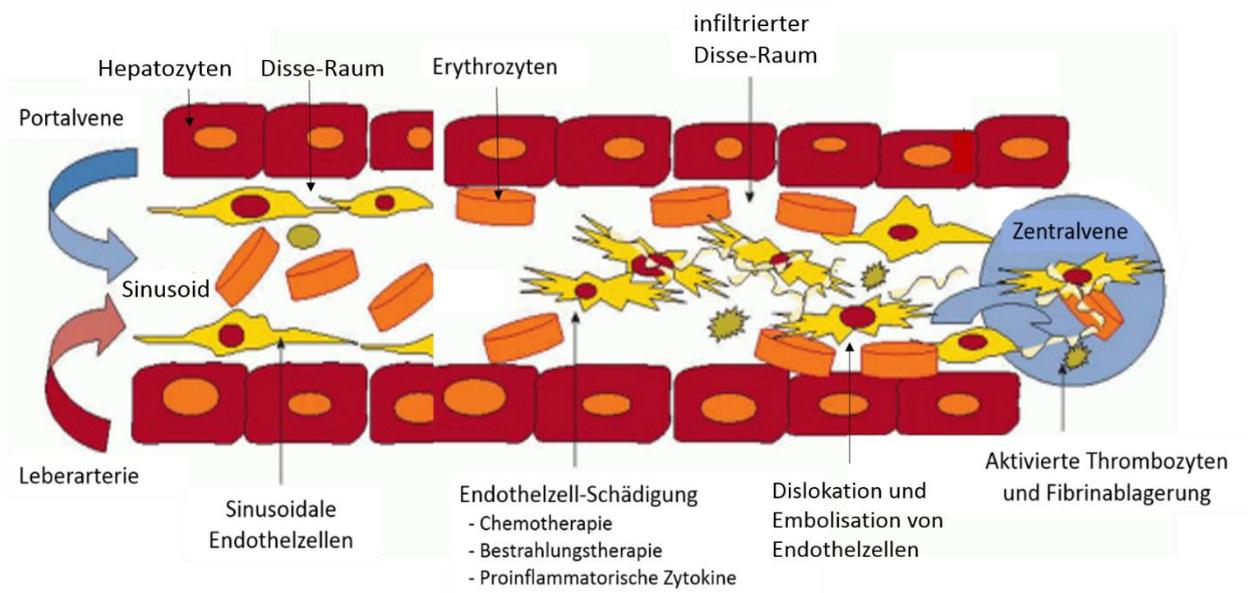


Abb. 2: Pathomechanismus der VOD/SOS. Die Konditionierungstherapie und proinflammatorische Zytokine schädigen Endothelzellen der Lebersinusotide, die sich voneinander lösen. Erythrozyten und Leukozyten gelangen in den Disse-Raum und führen zu einer verstärkten endothelialen Dislokation. Die abgelösten Zellen embolisieren innerhalb des Sinuslumens und führen zu einer Obstruktion der nachgeschalteten hepatischen Zentralvene. Zusätzlich kann es im Rahmen der sinusoidalen Schädigung zu einer prokoagulatorischen Situation mit Aktivierung der Thrombozyten und Fibrinablagerung kommen. (Modifiziert nach Nadir und Brenner (76)).

Bei Patienten mit VOD/SOS lassen sich erhöhte Werte für prokoagulatorische Parameter wie das Gewebethromboplastin (*tissue factor*, TF), der Gewebespezifische Plasminogenaktivator (*tissue plasminogen activator*, t-PA) und Prothrombinfragmente bei gleichzeitig erniedrigten Werten für antikoagulatorische Parameter wie Antithrombin III und Protein C nachweisen, was insgesamt auf eine prokoagulatorische Situation hinweist (75). Nach heutigen Kenntnissen ist die Hyperkoagulabilität in der Pathophysiologie der VOD/SOS jedoch höchstwahrscheinlich ein sekundäres Epiphenomen aufgrund der weitläufigen lobulären Schädigung und nicht die Ursache der Schädigung, wie ursprünglich angenommen (75). Die sinusoidale Schädigung kann dabei zu einer Freisetzung von prokoagulatorischen Faktoren und zu einer Initiierung der Gerinnungskaskade mit verminderter Fibrinolyse führen (56, 72, 75). Zusätzlich kann die Freisetzung von Zytokinen und des von-Willebrand-Faktors die Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion stimulieren (72). Es kann also zu einer prokoagulatorischen Situation mit einer vermehrten Bildung und einem verringerten Abbau von Thromben kommen, die zur weiteren Obstruktion der Lebersinusoide beitragen kann (73).

Im weiteren Verlauf der VOD/SOS über mehrere Tage und Wochen hinweg, kommt es durch Aktivierung der Ito-Zellen zu einer progressiven Obliteration der hepatischen Sinusoide und Zentralvenen durch intra- und perivaskuläre Kollagenablagerung sowie weitläufige Fibrosierung, was nachfolgend zur Entwicklung einer Leberinsuffizienz bis hin zum lebensbedrohlichen Multiorganversagen führen kann (57, 75).

Da ein okklusiver bzw. fibrotischer Verschluss der Lebervenen keine zwingende Voraussetzung für die klinische Manifestation der VOD/SOS ist, sondern nach heutigen Kenntnissen eher als eine nachfolgende Läsion gilt, und die toxische Schädigung der sinusoidalen Endothelzellen die fundamentale Läsion darstellt, wurde die Erkrankung von *Veno-occlusive Disease* (VOD) zu *Sinusoidal obstruction syndrome* (SOS) bzw. zur Kombination VOD/SOS umbenannt (57).

1.5.4 Therapie

Die Therapie der VOD/SOS konzentriert sich auf die symptomatische Behandlung. Hierzu zählen die Überwachung des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts, eine adäquate Oxygenierung, sowie das Vermeiden von weiteren Leber- und Nierenschädigungen (57).

Vor allem Patienten mit einer schweren VOD/SOS benötigen eine über die symptomatische Therapie hinausgehende pharmakologische Behandlung (57). Die pharmakologischen Optionen sind heutzutage jedoch noch sehr eingeschränkt.

Eine antikoagulatorische und fibrinolytische Therapie durch die Gabe von gewebsspezifischem Plasminogenaktivator und Heparin zeigte sich ineffektiv hinsichtlich des Gesamtüberlebens und geht zudem mit signifikanten Blutungskomplikationen einher (67, 75). Sie wird deswegen in den Europäischen Leitlinien zur Therapie der VOD/SOS nicht mehr empfohlen (56). Eine immunsuppressive Therapie durch die Gabe von Methylprednisolon kann zwar das Gesamtüberleben erhöhen, geht jedoch mit einer erhöhten Infektionsgefahr einher (67).

Die Gabe von Defibrotid (DF) stellt die einzige kausale Therapieform der VOD/SOS dar (56). DF verbessert sowohl die klinische Symptomatik als auch das Gesamtüberleben und ist aufgrund seines geringen Nebenwirkungsspektrums auch das einzige in Europa zugelassene pharmakologische Mittel zur Therapie der VOD/SOS (56, 57).

1.5.5 Prävention

Da es heutzutage noch keine hocheffektiven Möglichkeiten zur Therapie der VOD/SOS gibt, stellt die Prävention eine wichtige und auch effektive Maßnahme dar.

Bereits vor der allo-HSCT sollten vorhandene und potentielle Risikofaktoren vermieden und minimiert werden. Dazu gehört zum Beispiel das Vermeiden von hepatotoxischen Medikamenten sowie die Behandlung von akuten Lebererkrankungen (62). Auch die Wahl einer Konditionierungstherapie mit reduzierter Strahlenintensität (*reduced intensity conditioning*, RIC) sowie die Gabe von T-Zell-depletierten Stammzellinfusionen kann die Entwicklung einer VOD/SOS vorbeugen (57, 62).

Zudem gibt es auch pharmakologische Möglichkeiten zur Prävention der VOD/SOS. Die Gabe von Heparin oder Antithrombin zur Behandlung der prokoagulatorischen Situation zeigte widersprüchliche Daten hinsichtlich der Effektivität und wird aufgrund des hohen Blutungsrisikos heutzutage nicht mehr standardmäßig empfohlen (56, 62, 77). Die Gabe von Ursodesoxycholsäure, welches zur Behandlung einiger anderer Lebererkrankungen wirksam ist, kann die Inzidenz sowie die Mortalität der VOD/SOS senken (67). In

klinischen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass die Gabe von DF die Inzidenz von VOD/SOS in bestimmten Situationen signifikant senken kann (78).

1.6 Defibrotid

1.6.1 Definition

Defibrotid (DF) ist eine Mischung aus 90% einzelsträngigen und 10% doppelsträngigen Nukleinsäurepolymeren. Es wird aus der Depolymerisation von DNA der Darmschleimhaut von Schweinen gewonnen (22, 79).

1.6.2 Indikation/Anwendung

Im Jahr 2004 wurde DF aufgrund der geringen Prävalenz von VOD/SOS zunächst als Arzneimittel für seltene Leiden bzw. *orphan drug* ausgewiesen. Seit 2013 ist DF nun zur Therapie der schweren VOD/SOS nach einer allo-HSCT bei Kindern (>1 Monat), Jugendlichen und Erwachsenen in Europa zugelassen und ist aufgrund seiner geringen Nebenwirkungsrate sehr gut verträglich (21, 62, 80). Die Gabe erfolgt intravenös ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung in einer Dosierung von 25mg/kgKG/d über mindestens 21 Tage (80).

Zur Prophylaxe der VOD/SOS ist DF in Europa bisher nicht zugelassen. In einer Phase-III-Studie mit pädiatrischen Patienten (≤ 18 Jahre) konnten Corbacioglu et al. jedoch zeigen, dass die Inzidenz von VOD/SOS nach HSCT signifikant gesenkt werden konnte durch die Gabe von DF ab dem Zeitpunkt der Konditionierungstherapie (78).

1.6.3 Wirkungsweisen

Die genauen Wirkmechanismen des DF sind komplex und nach heutigem Kenntnissstand noch ungewiss. Zu den zwei wichtigsten Wirkmechanismen im Hinblick auf die VOD/SOS zählen die Schutzfunktion gegenüber Endothelzellen sowie die Wiederherstellung der thrombotisch-fibrinolytischen Balance (73).

Bezüglich der hämostatischen Balance wurden schon einige Eigenschaften des DF in Studien beschrieben. DF kann das fibrinolytische System aktivieren, indem es eine

erhöhte Funktion des Gewebespezifischen Plasminogenaktivators (*tissue plasminogen activator*, t-PA) bei gleichzeitig reduzierter Aktivität des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) bewirkt (20, 81). Zusätzlich kann DF zu einer reduzierten Synthese des Gewebethromboplastins (*tissue factor*, TF) und des von-Willebrand-Faktors (vWF) führen, während die Expression des Thrombomodulins und des TF-Inhibitors erhöht sein kann (21, 81, 82). Darüber hinaus kann DF die Produktion von Prostaglandin-I₂ und -E₂ hemmen, wodurch eine verminderte Thrombozytenaggregation entsteht (79, 83). Zusammengefasst bewirkt DF also eine anti-thrombotische, profibrinolytische Situation.

Zudem werden DF auch anti-tumoröse Eigenschaften zugeschrieben, da es sowohl das Tumorwachstum hemmen als auch die anti-tumorösen Eigenschaften einiger Chemotherapeutika steigern kann (84, 85).

1.6.4 Effekt auf Endothelzellen

DF gilt als endothelschützendes Medikament mit anti-inflammatorischen, anti-apoptotischen sowie anti-ischämischen Eigenschaften in Bezug auf Endothelzellen (20-22, 73).

Über einige Oberflächenrezeptoren wie die Adenosinrezeptoren-A1 und -A2 sowie die Rezeptoren ICAM-1 und LFA-1 kann DF an Endothelzellen binden (20, 86, 87). Die Bindung von DF an die Oberfläche von Endothelzellen bewirkt eine verminderte Expression von Oberflächen-Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1, eine verminderte Expression des vWF, sowie eine gehemmte Aktivierung von proinflammatorischen Signalwegen wie p38MAPK (20, 21, 85). Zusätzlich kann es zu einer erhöhten Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) und einer gesteigerten Aktivität der NO-Synthase kommen (85). Außerdem konnte in Studien gezeigt werden, dass DF endotheliale Zellen vor TNF α -vermittelter Zytotoxizität und Fludarabine-medierter Apoptose schützen kann (88).

Durch diese anti-inflammatorischen, anti-oxidativen und anti-apoptotischen Eigenschaften kann DF das Endothel vor Entzündungsreaktionen, oxidativem Stress und Zelltod schützen und somit als endothelialer Beschützer eine potentielle Gewebsschädigung verhindern (20, 21, 85).

1.7 Fragestellungen

Aus der vorhandenen Literatur lässt sich ableiten, dass ATG-F und DF mit Endothelzellen interagieren und die Expression von zahlreichen Oberflächenrezeptoren sowie die endotheliale Interaktion mit Leukozyten beeinflussen können.

Über die Wirkung von ATG-F und DF auf endotheliale Funktionen ist jedoch bisher nur wenig oder widersprüchliches Wissen bekannt.

Insbesondere die Wirkung von ATG-F auf die Neovaskularisierung, die einen wichtigen Mechanismus in der Pathogenese der GVHD ausmacht, ist noch ungewiss. Diese Arbeit beruht daher auf der Hypothese, dass ATG-F *in vitro* endotheliale Funktionen hemmen und somit die Neovaskularisierung beeinträchtigen kann. Folgende Fragestellung soll bearbeitet werden:

Kann ATG-F durch die Hemmung endothelialer Funktionen wie Proliferation, Migration und Angiogenese die Neovaskularisierung hemmen und zu einer verminderten Rate an GVHD führen?

DF soll als zweite Substanz in dieser Arbeit behandelt werden. DF gilt als Protektor/Beschützer der Endothelzellen, da es an sie binden kann und anti-inflammatorische, anti-oxidative sowie anti-apoptotische Eigenschaften besitzt. Die genauen Wirkmechanismen auf endotheliale Funktionen wie die Proliferation, Migration und Angiogenese werden nach heutigem Kenntnisstand jedoch widersprüchlich diskutiert und gelten als ungesichert. Die zweite Hypothese dieser Arbeit besagt, dass DF als endothelprotektives Medikament *in vitro* endotheliale Funktionen fördern und dadurch die endotheliale Regeneration unterstützen kann. Folgende Fragestellung soll hierzu untersucht werden:

Kann DF durch die Verbesserung endothelialer Funktionen wie Proliferation, Migration und Angiogenese die Endothelregeneration nach initialer Schädigung fördern und somit zu einer verminderten Rate an Endothel-assoziierten Erkrankungen wie VOD/SOS, TA-TMA und GVHD führen?

2 Material und Methoden

Mithilfe von drei *in vitro* Assays habe ich den Effekt von ATG-F bzw. DF auf endotheliale Funktionen beobachtet, um meine Fragestellungen zu beantworten. Hierzu verwendete ich drei *in vitro*-Assays, die unterschiedliche Funktionen endothelialer Zellen beschreiben:

- 1) Der Scratch Assay, der die endotheliale Proliferation und Migration misst;
- 2) Der MTT Assay, der die Proliferationsrate von Endothelzellen misst;
- 3) Der Tube Formation Assay, der die angiogene Aktivität von Endothelzellen misst.

2.1 Zelllinien

Für alle Versuche verwendete ich humane Endothelzellen, die aus der Nabelschnurvene isoliert werden (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVECS). Die HUVECS wurden mir freundlicherweise von Prof. Verena Stangl (Center for Cardiovascular Research, Berlin) bereitgestellt. Ich erhielt die HUVECS in einem gefrorenen Zustand und bewahrte sie in einem Tank mit flüssigem Stickstoff auf. Je nach Bedarf taute ich etwa eine Woche vor den geplanten Assays neue HUVECS auf.

Für die Kultivierung der HUVECS in T-75 Zellkulturflaschen mit Standard-Wachstumsoberfläche für adhärente Zellen (Sarstedt, Nümbrecht, D) verwendete ich das *Endothelial Growth Medium 2* (EGM-2; Lonza, Walkersville, USA; angereichert mit dem *EGM-2-SingleQuots™ Kit: human epidermal growth factor* (hEGF), Hydrokortison, GA-1000 (Gentamicin + Amphotericin-B), 2% *fetal bovine serum* (FBS), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *human fibroblast growth factor B* (hFGF-B), *recombinant insulin-like growth factor 1* (R3-IGF-1), Ascorbinsäure und Heparin). Das Wachstum der HUVECS kontrollierte ich jeden Tag mikroskopisch und prüfte die Zellkulturen auf Kontamination. Das EGM-2-Medium wechselte ich alle 3-4 Tage.

Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100% und einem CO₂-Gehalt von 5% im CO₂-Inkubator (Modell C170, Binder, Tuttlingen, D) gehalten. Zur Passagierung von konfluenten Zellkulturen wurden die HUVECS mit *phosphate buffered saline* (PBS; gibco®, Carlsbad, USA) gewaschen und anschließend für 3-4 Minuten mit Trypsin enzymatisch von der Zellkulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht, D) abgelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die gelösten HUVECS in EGM-2-

Medium resuspendiert und jeweils ca. 1×10^6 Zellen in neue T-75 Zellkulturflaschen überführt. Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

Da HUVECS kontaktinhibiert sind, wird die weitere Vermehrung der Zellen bei vollständiger Konfluenz eingestellt. Deswegen wurden für alle drei Assays HUVECS aus Zellkulturflaschen verwendet, die eine Konfluenz von ca. 60-70% erreicht hatten, um optimale Wachstumsbedingungen sicherzustellen (Abb. 3).

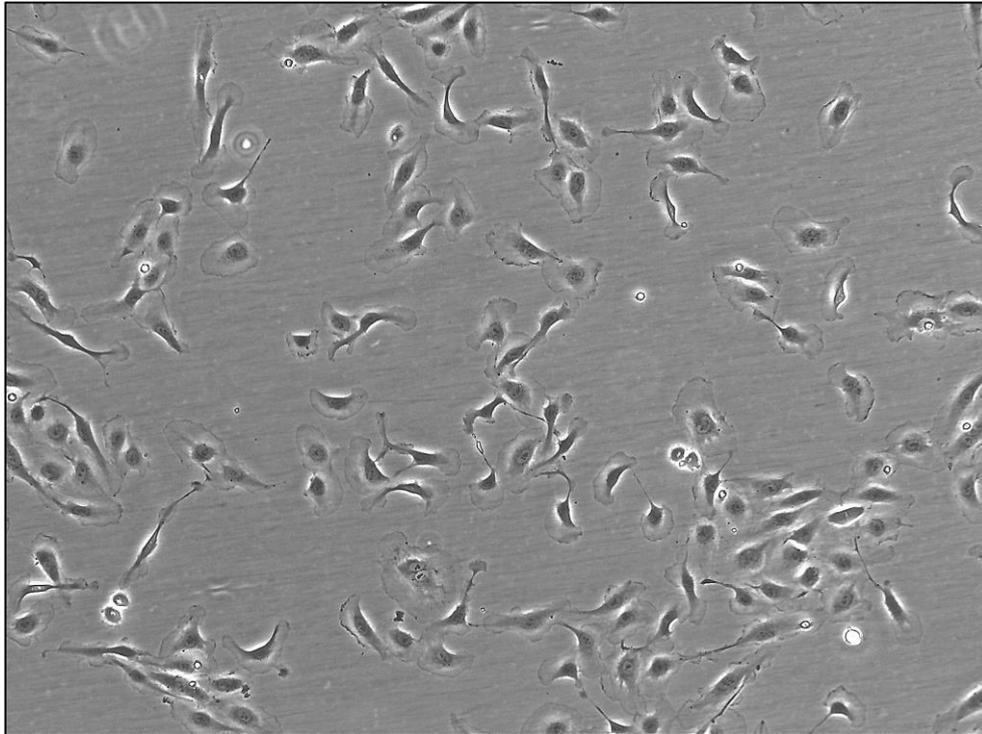


Abb. 3: Mikroskopische Aufnahme von HUVECS mit ca. 60-70% Konfluenz in einer T75-Zellkulturflasche bei 10-facher Vergrößerung.

Für jeden neuen Versuch taute ich neue HUVECS auf und verwendete sie für den jeweiligen Assay zwischen Passage 2 und 4. Übriggebliebene Zellen, die nicht für die Versuche verwendet wurden, wurden entweder verworfen oder erneut eingefroren in einem Medium aus 70% RPMI-Medium, 20% FBS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO).

Alle Arbeiten mit den HUVECS erfolgten unter sterilen Bedingungen an der Sicherheitswerkbank Safe 2020 (Thermo Scientific).

2.2 Anti-Thymozyten-Globulin

Für alle Versuche verwendete ich den polyklonalen Antikörper ATG-Fresenius (ATG-F; Neovii Biotech, Gräfelfing, Deutschland), der durch Immunisierung von Kaninchen mit der humanen Jurkat T-lymphoblastischen Zelllinie gewonnen wird.

In allen Versuchsreihen verwendete ich vier verschiedene Konzentrationen von ATG-F: 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml. Diese Konzentrationen liegen innerhalb der Reichweite von 10-350 µg/ml, die typischerweise während einer Behandlung mit ATG-F in der üblichen Gesamtdosis von 60 mg/kg Körpergewicht im Serum nachgewiesen werden können (89).

Alle Versuche mit ATG-F wurden in Quadruplikaten durchgeführt. Zusätzlich wurde jeder Versuch ein- bis dreimal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

2.3 Defibrotid

Alle drei Assays führte ich zusätzlich auch mit Defibrotid (DF; Difetelio®, Gentium Spa, Villa Guardia, IT) durch. DF ist eine komplexe Mischung aus Oligodesoxyribonukleotiden, die aus der Darmschleimhaut von Schweinen gewonnen wird.

In meinen Versuchen setzte ich drei verschiedene Konzentrationen von DF ein: 10 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml.

Alle Versuche mit DF wurden in Quadruplikaten durchgeführt. Zusätzlich wiederholte ich jeden Assay ein- oder zweimal, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu demonstrieren.

2.4 Scratch Assay

Der Scratch Assay ist ein Versuch, der die Untersuchung der Migration und Proliferation von Endothelzellen ermöglicht. Die Zellmigration und -proliferation sind zwei wichtige Schritte in der Neovaskularisierung.

Für den Scratch Assay habe ich HUVECS in EGM-2-Medium in eine 12-Well-Zellkulturplatte (Sarstedt, Nümbrecht, D) in einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Well

überführt. Als die Zellen eine Konfluenz von ca. 70% erreicht hatten, habe ich mithilfe einer sterilen 10-100 µl Pipettenspitze einen kreuzförmigen Defekt, *scratch* genannt, in den Zellenrasen eines jeden Wells gekratzt. Dabei habe ich die Pipettenspitze mit möglichst konstantem Druck und gleichbleibender Geschwindigkeit im 90°-Winkel über den Zellrasen gekratzt. Nach dem *scratch* wurde das EGM-2-Medium entfernt und die Zellen mit frischem, warmem EGM-2-Medium einmal gewaschen, um die toten Zellen zu entfernen. Anschließend wurde das Testmedium (ATG-F oder DF, gelöst in EGM-2-Medium) auf die Zellen gegeben. Als Positivkontrolle diente EGM-2-Medium ohne die Testsubstanz und als Negativkontrolle das *Endothelial Basal Medium 2* (EBM-2; Lonza, Walkersville, USA), welches keine zusätzlichen Wachstumsfaktoren enthält.

Unmittelbar nach dem *scratch* (0h) sowie nach einer Inkubationszeit von 21 Stunden (+21h) bei 37°C und 5% CO₂ machte ich eine mikroskopische Aufnahme jedes Wells in 4-facher Vergrößerung, beide Male möglichst von derselben Stelle des *scratches*.

Anschließend habe ich mithilfe des Programms Image J (90) die Fläche des *scratches* bestimmt. Die Flächenwerte von 0h und +21h habe ich miteinander verglichen, um den prozentualen Anteil der Zellmigration festzustellen (Abb. 4). Hierfür verwendete ich folgende Formel:

$$\% \text{ Wundheilung} = 100 - \left[\left(\frac{\text{Flächenwert (+21h)}}{\text{Flächenwert (0h)}} \right) \times 100 \right].$$

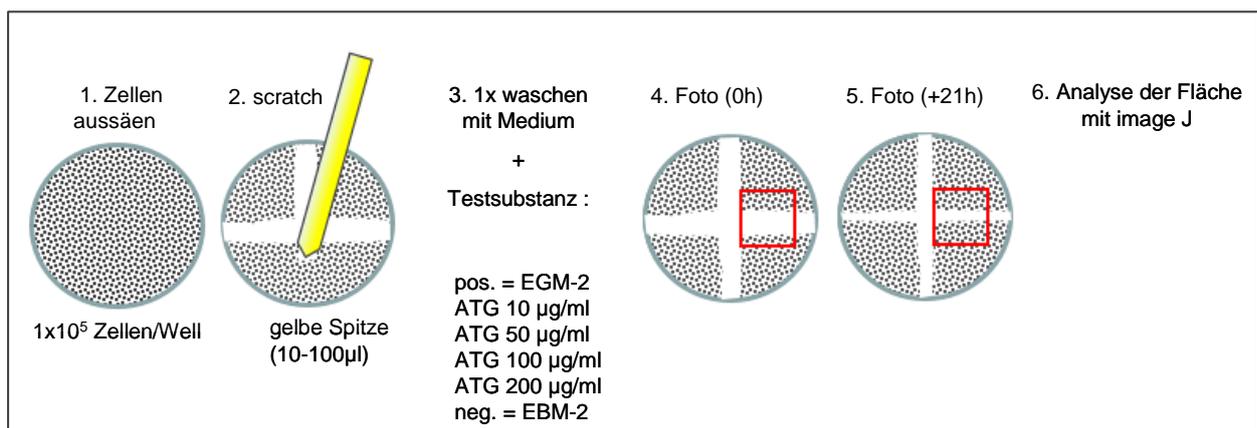


Abb. 4: Schematische Darstellung des Ablaufs eines Scratch Assays, beispielhaft mit ATG-F. Nach dem Aussäen der Zellen in eine 12-Well-Zellkulturplatte (1.) wird mithilfe einer Pipettenspitze ein kreuzförmiger Defekt, *scratch* genannt, in den Zellrasen gekratzt (2.). Anschließend werden die Testsubstanzen (Positivkontrolle, Negativkontrolle, z.B. ATG-F 10, 50, 100 und 200 µg/ml) auf die Zellen gegeben und die Platte inkubiert (3.). Jeweils direkt nach dem *scratch* (0h) sowie nach einer Inkubationszeit von 21 Stunden (+21h) wird ein mikroskopisches Foto von möglichst derselben Stelle

jedes *scratches* gemacht (4. und 5.). Anschließend werden die Flächenwerte der *scratches* mithilfe des Programms Image J bestimmt und miteinander verglichen, um den prozentualen Anteil der Zellmigration festzustellen.

2.5 MTT Assay

Der MTT Assay misst die Proliferationsrate von Zellen.

Für den Proliferationsversuch habe ich den *MTT Cell Proliferation Assay* (ATCC®, Manassas, USA) verwendet. Die HUVECS wurden in drei 96-Well-Mikrotiterplatten (Sarstedt, Nümbrecht, D) in einer Konzentration von $1-2 \cdot 10^4$ Zellen pro Well überführt. Die Platten wurden für jeweils 24 Stunden (D+1), 48 Stunden (D+2) oder 72 Stunden (D+3) mit ATG-F oder DF in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Als Positivkontrolle verwendete ich EGM-2-Medium und als Negativkontrolle EBM-2-Medium. Nach der jeweiligen Inkubationszeit habe ich 10 µl *MTT Reagent* (ATCC®, Manassas, USA) in jedes Well pipettiert. Durch die mitochondriale Reduktase der HUVECS wird das gelbliche *MTT Reagent* zu violetten Formazan-Kristallen reduziert (Abb. 5). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 3 Stunden habe ich jeweils 100 µl *Detergent Reagent* (ATCC®, Manassas, USA) in jedes Well gegeben und die Platte für mindestens 3 Stunden oder über Nacht inkubiert, bis alle Formazan-Präzipitate, die sich durch Zugabe des *MTT Reagent* gebildet hatten, aufgelöst waren. Die optische Dichte habe ich mit einem Spektrophotometer (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, San Francisco, CA, USA) bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

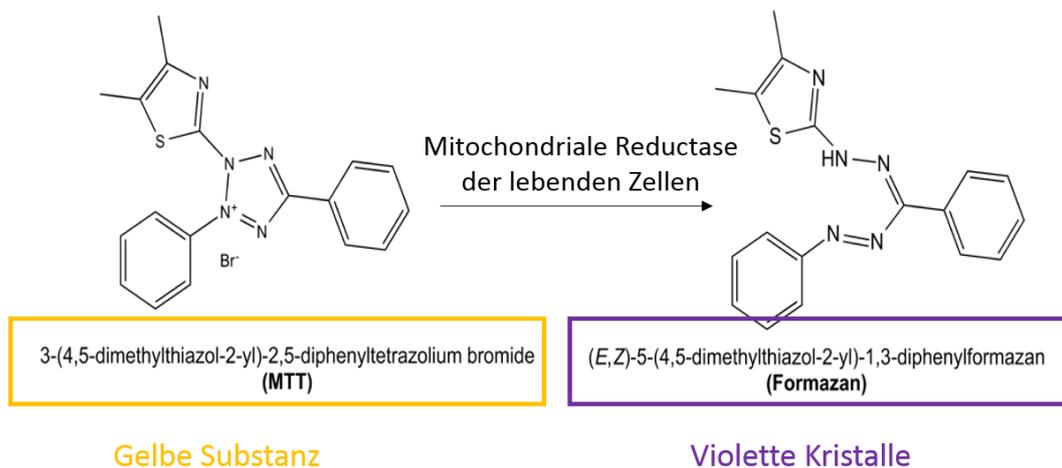


Abb. 5: Prinzip des MTT Assays. Nach Hinzufügen des gelblichen *MTT Reagents* im MTT Assay wird dieses durch die mitochondriale Reduktase der HUVECS zu violetten Formazan-Kristallen reduziert. Diese werden durch die Zugabe des *Detergent Reagents* aufgelöst und anschließend kann die optische Dichte mit einem Spektrophotometer bestimmt werden.

2.6 Tube Formation Assay

Der Tube Formation Assay misst die Fähigkeit von Endothelzellen, kapillarähnliche Strukturen, sogenannte *tubes*, zu bilden. Er ist somit ein Versuch, der für die Bestimmung der angiogenen Aktivität von Endothelzellen verwendet wird.

Für den Tube Formation Assay habe ich mithilfe einer abgeschnittenen 10-100 µl Pipettenspitze jeweils 40 µl aufgetautes Matrigel® (Corning, NY, USA) in Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Sarstedt, Nümbrecht, D) gegeben. Die Platte wurde für 30-45 Minuten bis zum Erstarren des Matrigels inkubiert.

Vorsichtig, um das Matrigel nicht zu schädigen, habe ich jeweils $1 \cdot 10^4$ HUVECS in 100 µl EGM-2-Medium, angereichert mit den entsprechenden Testsubstanzen (ATG-F oder DF), in die Wells gegeben. Nach 6 Stunden wurden stichprobenartig 3-5 mikroskopische Bilder pro Well gemacht, die anschließend mit dem Programm Image J (90) und dem entsprechenden Skript „Angiogenesis Analyzer“, programmiert und bereitgestellt von Gilles Carpentier (91), ausgewertet wurden.

2.7 Statistische Analysen

Die statistischen Berechnungen wurden mithilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism, (Version 7.0 für Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) durchgeführt.

Für den Tube Formation Assay und den MTT Assay sind die Werte an die Positivkontrolle angeglichen und in Prozentzahlen angegeben; dabei stellt die Positivkontrolle den Wert 100% dar.

Alle Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Für die statistische Analyse wurde der einfaktorielle ANOVA-Test und anschließend der Dunnett-Test angewendet, welcher ein multipler Vergleichstest zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden zwischen den Mittelwerten einer einzelnen Kontrollgruppe und den verbleibenden Behandlungsgruppen ist. Statistische Signifikanzen werden folgendermaßen dargestellt: ns = nicht signifikant, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$.

2.8 Reagenzien und Geräte

Tabelle 2: Reagenzien

ATG-Fresenius	Neovii Biotech
Defibrotid	Gentium SpA
EBM-2	Lonza
Matrigel® Basement Membrane Mix	Corning
PBS	gibco
Trypsin	gibco

Tabelle 3: Kits

EGM-2-SingleQuots™ Kit	Lonza
MTT Cell Proliferation Assay	ATCC

Tabelle 4: Geräte und Sonstiges

CO ₂ -Inkubator C170	Binder
Inversmikroskop AE31 Trinokular	Motic
Mikroskopkamera Moticom 3.0 MP	Motic
Pipetboy	Integra Biosciences
Pipettenspitzen (2µl, 10µl, 100µl, 1000µl)	Sarstedt, Eppendorf
Pipettierhilfe	Eppendorf
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Scientific
Spektrophotometer SpectraMax Plus 384	Molecular Devices
T75 Zellkulturflaschen	Sarstedt
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge Megafuge® 1.0 R	Heraeus
12-Well-Platte	Sarstedt
96-Well-Platte	Sarstedt

3 Ergebnisse

3.1 Versuche mit ATG-F

3.1.1 ATG-F inhibiert die Zellmigration und -proliferation signifikant im Scratch Assay

Aufbauend auf den oben aufgeführten Überlegungen, dass ATG-F die Neovaskularisierung inhibieren könnte, wurde der Einfluss von ATG-F auf die Funktion von Endothelzellen mithilfe des Scratch Assays untersucht. Der Scratch Assay misst die Zellmigration und -proliferation, die zwei wichtige Schritte im Prozess der Neovaskularisierung darstellen.

Die HUVECS wurden in einer 12-Well-Zellkulturplatte ausgesät und zu einem Monolayer wachsen gelassen. Mithilfe einer Pipettenspitze wurde ein kreuzförmiger Defekt, *scratch* genannt, in den Monolayer gekratzt. Unmittelbar danach wurde ATG-F in unterschiedlichen Konzentrationen (10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml) auf die Zellen gegeben und die Platte daraufhin inkubiert. Direkt nach dem *scratch* sowie nach 21 Stunden Inkubationszeit wurde dieselbe Stelle eines jeden *scratches* fotografiert und die Flächenwerte mithilfe des Programms ImageJ (90) jeweils miteinander verglichen (Abb. 6).

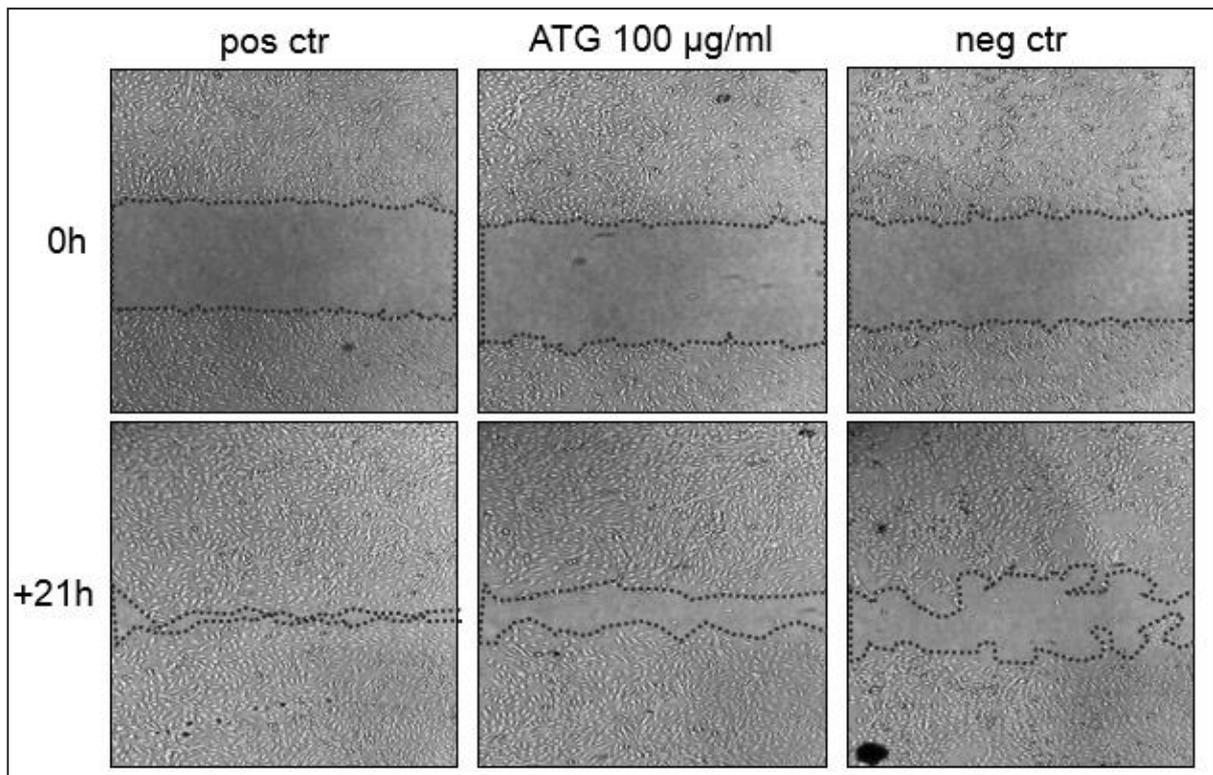


Abb. 6: Mikroskopische Aufnahmen von HUVECS im Scratch Assay, exemplarisch mit folgenden Testsubstanzen: Positivkontrolle (pos ctr), ATG-F 100 µg/ml und Negativkontrolle (neg ctr). Die Fläche des *scratches* ist jeweils umrandet (schwarz gestrichelte Linie). Die obere Reihe zeigt die Fotos direkt nach dem *scratch* (0h). Die untere Reihe zeigt die Fotos nach 21 Stunden Inkubationszeit (+21h). Die Fläche des *scratches* ist nach 21 Stunden Inkubationszeit mit 100 µg/ml ATG-F größer als die *scratch*-Fläche der Positivkontrolle, was auf eine hemmende Wirkung des ATG-F auf die Zellmigration hindeutet.

Die Hinzugabe von ATG-F während der 21-stündigen Inkubationszeit nach dem *scratch* zeigte eine reduzierte Zellmigration und -proliferation. Es zeigte sich bei der kombinierten Auswertung aller drei Versuchsreihen im Vergleich zur Positivkontrolle eine signifikante Minderung der Zellmigration und -proliferation bei der Gabe von 100 µg/ml ATG-F (77% vs. 57%, *** $p < 0.0003$) und 200 µg/ml ATG-F (77% vs. 61%, ** $p = 0.0048$). Nach der Inkubation mit 50 µg/ml ATG-F zeigte sich im Vergleich zur Positivkontrolle keine Änderung der Zellmigration und -proliferation (77% vs. 78%, $p = 0.99$). Ebenso zeigte sich bei der Dosis von 10 µg/ml ATG-F keine signifikante Änderung (77% vs. 84%, $p = 0.47$). (Abb. 7).

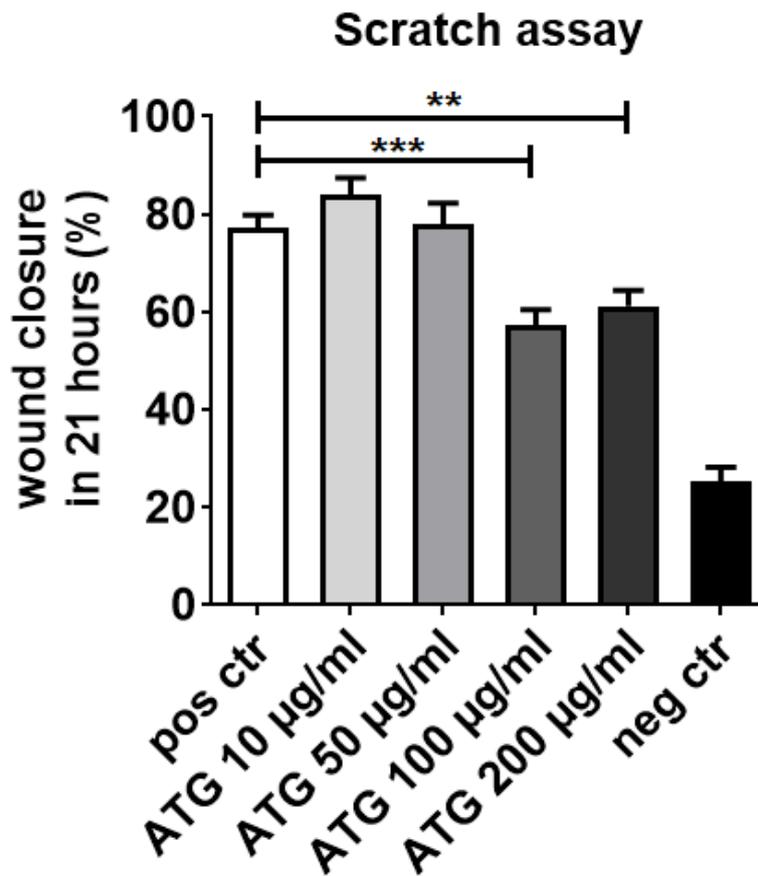


Abb. 7: Graphische Auswertung des Scratch Assays: HUVECS wurden für 21 Stunden mit ATG-F inkubiert (10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml supplementiert in EGM-2 Medium). Als Positivkontrolle (pos ctr) diente EGM-2 Medium supplementiert mit Wachstumsfaktoren und als Negativkontrolle (neg ctr) diente EBM-2-Medium ohne Wachstumsfaktoren.

Es zeigte sich eine signifikante Minderung der Zellmigration und -proliferation nach der Inkubation mit 100 µg/ml ATG-F (77% vs. 57%, *** $p < 0.0003$) und 200 µg/ml (77% vs. 61%, ** $p = 0.0048$). Es zeigten sich keine signifikanten Änderungen nach der Inkubation mit 50 µg/ml ATG-F (77% vs. 78%, $p = 0.99$) und 10 µg/ml ATG-F (77% vs. 84%, $p = 0.47$).

Die hier gezeigten Daten wurden in Quadruplikaten in drei unabhängigen Versuchen erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktoriellem ANOVA-Test und anschließendem Dunnett-Test.

3.1.2 ATG-F bewirkt eine signifikante dosisabhängige Inhibierung der Zellproliferationsrate im MTT Assay

Der MTT Assay ist ein Versuch, der für die Bestimmung der Proliferationsrate von Zellen verwendet wird. Die am Ende gemessene optische Dichte korreliert mit der Proliferationsrate der lebenden Zellen.

Für den MTT Assay wurden die HUVECS in drei 96-Well-Mikrotiterplatten überführt. ATG-F wurde in vier verschiedenen Konzentrationen (10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml) auf die Zellen gegeben und die Platten für jeweils 24 Stunden (D+1), 48 Stunden (D+2) oder 72 Stunden (D+3) inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde das *MTT Reagent* hinzugegeben, welches von den Mitochondrien der lebenden Zellen in unlösliche Formazan-Kristalle reduziert wird. Nach 3 Stunden wurde das *Detergent Reagent* hinzugegeben, welches die Kristalle auflöst, sodass anschließend die optische Dichte im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden konnte.

Sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 und 72 Stunden zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der gemessenen optischen Dichte (Abb. 8-10).

Nach 24 Stunden (D+1) zeigte sich eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate für die Zellen, die mit 200 µg/ml ATG-F (100% vs. 75%, **p=0.0019) und 100 µg/ml ATG-F (100% vs. 81%, *p=0.026) inkubiert wurden. Nach der Inkubation mit 50 µg/ml ATG-F (100% vs. 83%, p=0.06) und 10 µg/ml ATG-F (100% vs. 94%, p=0.84) zeigten sich nicht-signifikante Minderungen der Proliferationsrate. Insgesamt war die Minderung der Proliferationsrate nach 24-stündiger Inkubation dosisabhängig (Abb. 8).

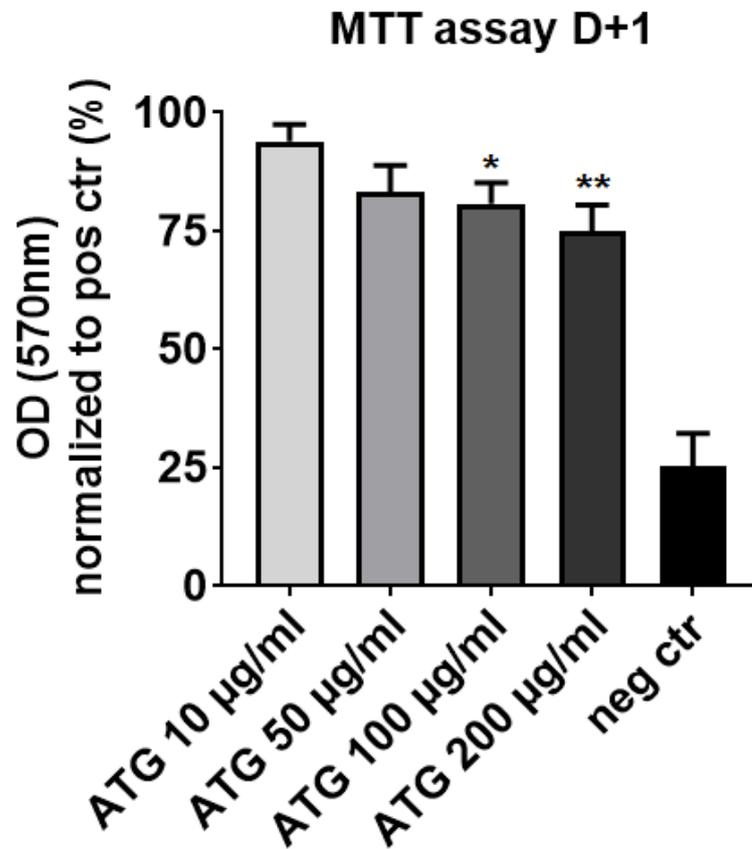


Abb. 8: Graphische Auswertung der Ergebnisse des MTT Assays nach 24-stündiger Inkubation (D+1) von HUVECS mit ATG-F (10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml supplementiert in EGM-2 Medium). Als Positivkontrolle (pos ctr) diente EGM-2 Medium supplementiert mit Wachstumsfaktoren und als Negativkontrolle (neg ctr) diente EBM-2-Medium ohne Wachstumsfaktoren.

Ergebnisse nach 24-stündiger Inkubation (D+1) mit ATG-F in verschiedenen Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 94%, $p=0.84$), 50 µg/ml (100% vs. 83%, $p=0.06$), 100 µg/ml (100% vs. 81%, $*p=0.026$) und 200 µg/ml (100% vs. 75%, $**p=0.0019$).

Die hier gezeigten Daten wurden in Quadruplikaten in vier unabhängigen Versuchen erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktoriellem ANOVA-Test und anschließendem Dunnett-Test.

Nach 48 Stunden (D+2) zeigte sich eine signifikante, dosisabhängige Reduktion der Proliferationsrate für alle eingesetzten ATG-F-Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 87%, $*p=0.046$), 50 µg/ml (100% vs. 82%, $**p=0.0027$), 100 µg/ml (100% vs. 76%, $***p<0,0001$) und 200 µg/ml (100% vs. 68%, $****p<0,0001$) (Abb. 9).

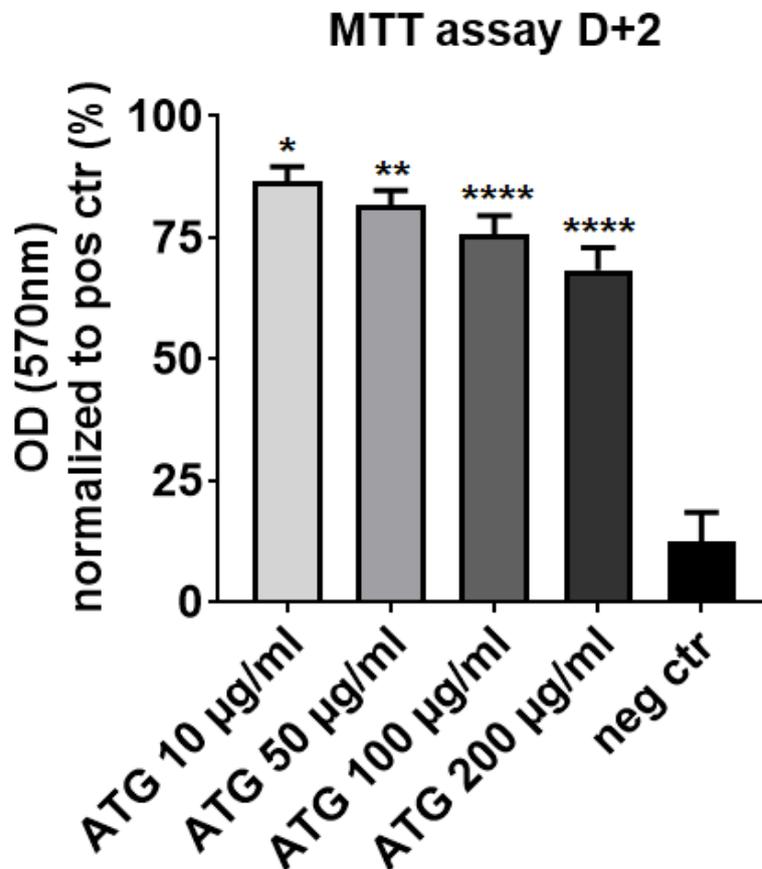


Abb. 9: Graphische Auswertung der Ergebnisse des MTT Assays nach 48-stündiger Inkubation (D+2) von HUVECS mit ATG-F (10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml supplementiert in EGM-2 Medium). Als Positivkontrolle (pos ctr) diente EGM-2 Medium supplementiert mit Wachstumsfaktoren und als Negativkontrolle (neg ctr) diente EBM-2-Medium ohne Wachstumsfaktoren.

Ergebnisse nach 48-stündiger Inkubation (D+1) mit ATG-F in verschiedenen Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 87%, * $p=0.046$), 50 µg/ml (100% vs. 82%, ** $p=0.0027$), 100 µg/ml (100% vs. 76%, **** $p<0,0001$) und 200 µg/ml (100% vs. 68%, **** $p<0,0001$).

Die hier gezeigten Daten wurden in Quadruplikaten in vier unabhängigen Versuchen erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktoriellem ANOVA-Test und anschließendem Dunnett-Test.

Auch nach 72 Stunden (D+3) zeigte sich eine signifikante, dosisabhängige Reduktion der Zellproliferationsrate. Die Inkubation mit ATG-F 10 µg/ml (100% vs. 94%, $p=0.29$) zeigte eine Reduktion, die jedoch nicht signifikant war. Die Reduktion der Proliferationsrate war nach 72-stündiger Inkubation mit den übrigen ATG-F-Konzentrationen jedoch signifikant: 50 µg/ml (100% vs. 86%, ** $p=0.0013$), 100 µg/ml (100% vs. 80%, **** $p=<0,0001$) und 200 µg/ml (100% vs. 75%, **** $p=<0,0001$) (Abb. 10).

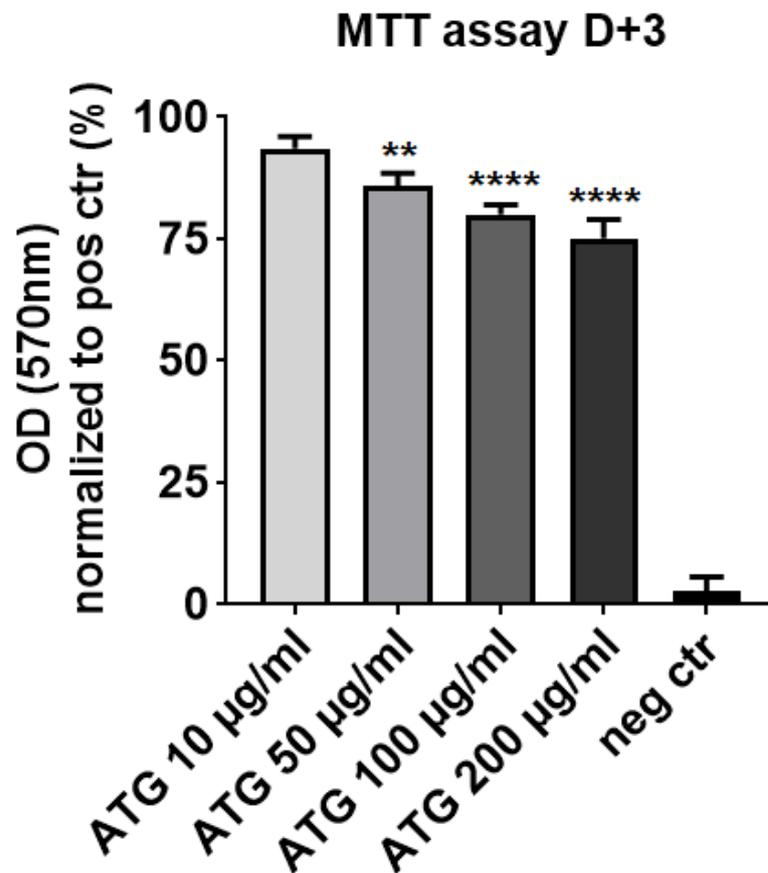


Abb. 10: Graphische Auswertung der Ergebnisse des MTT Assays nach 72-stündiger Inkubation (D+3) von HUVECS mit ATG-F (10, 50, 100 und 200 µg/ml) supplementiert in EGM-2 Medium. Als Positivkontrolle (pos ctr) diente EGM-2 Medium supplementiert mit Wachstumsfaktoren und als Negativkontrolle (neg ctr) diente EBM-2-Medium ohne Wachstumsfaktoren.

Ergebnisse nach 72-stündiger Inkubation (D+3) mit ATG-F in verschiedenen Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 94%, $p=0.29$), 50 µg/ml (100% vs. 86%, $**p=0.0013$), 100 µg/ml (100% vs. 80%, $****p<0,0001$) und 200 µg/ml (100% vs. 75%, $****p<0,0001$).

Die hier gezeigten Daten wurden in Quadruplikaten in vier unabhängigen Versuchen erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktoriellem ANOVA-Test und anschließendem Dunnett-Test.

3.1.3 ATG-F zeigt keinen signifikanten Effekt auf die angiogene Aktivität der HUVECS im Tube Formation Assay

Der Tube Formation Assay misst die Fähigkeit von Endothelzellen, kapillarähnliche Strukturen, sogenannte *tubes*, zu bilden. Er ist somit ein Versuch, der für die Bestimmung der angiogenen Aktivität von Endothelzellen verwendet wird.

Für den Tube Formation Assay wurden HUVECS in eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben, dessen Wells vorher mit Matrigel beschichtet wurden. Das ATG-F wurde in vier unterschiedlichen Konzentrationen (10, 50, 100 und 200 $\mu\text{g/ml}$) auf die Zellen gegeben und die Platte anschließend bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 6 Stunden zeigte sich in der Positivkontrolle eine deutliche Formation von *tubes* und es wurden mikroskopische Aufnahmen von allen Wells gemacht, die mithilfe der Programme „Angiogenesis Analyzer“ und Image J analysiert wurden (Abb. 11).

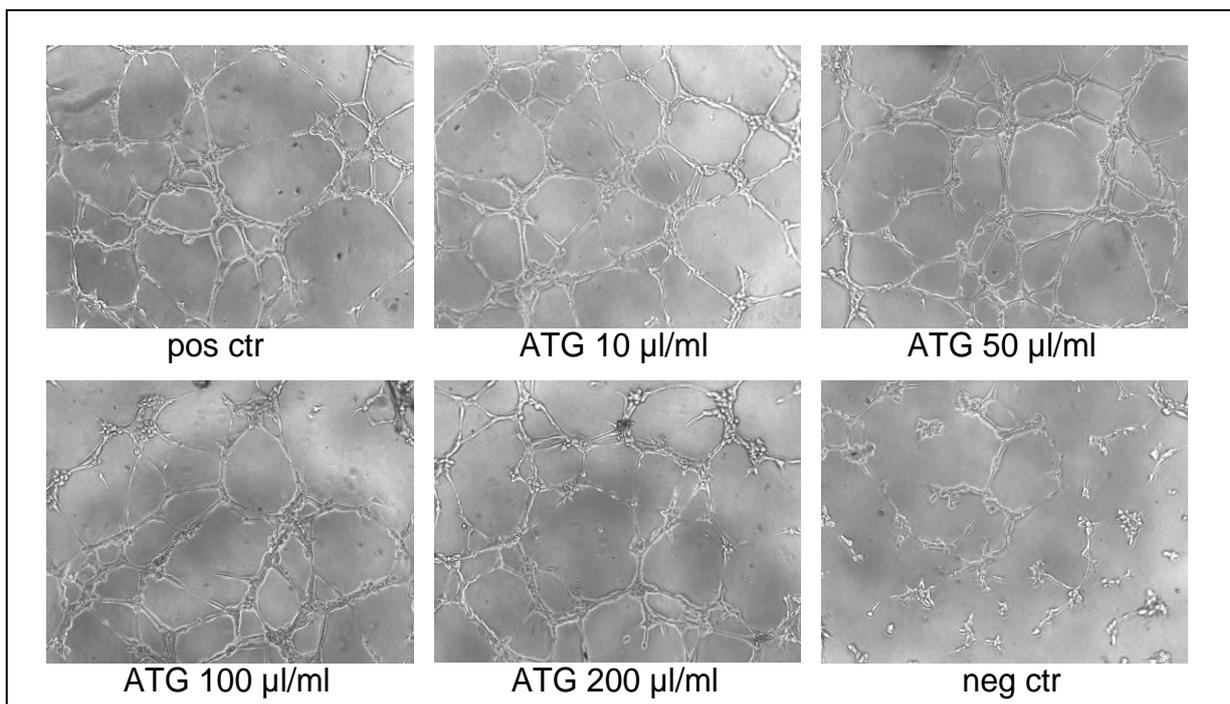


Abb. 11: Exemplarische mikroskopische Fotos in 10-facher Vergrößerung: HUVECS im Tube Formation Assay nach 6-stündiger Inkubation mit ATG-F (10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ und 200 $\mu\text{g/ml}$). Als Positivkontrolle (pos ctr) diente EGM-2-Medium supplementiert mit Wachstumsfaktoren. Als Negativkontrolle (neg ctr) diente EBM-2-Medium ohne Wachstumsfaktoren.

Für die Auswertung wurden folgende Merkmale des Tube Formation Assays analysiert (Abb. 12):

1. *Number of junctions* = Anzahl an Knotenpunkten (roter Punkt, blau umrandet)
2. *Number of master junctions* = Anzahl an Hauptknotenpunkten (roter Punkt; blau und rot umrandet)
3. *Number of segments* = Anzahl an Segmenten (gelb; begrenzt durch (Haupt-) Knotenpunkte)

4. *Number of master segments* = Anzahl an Hauptsegmenten (gelb; begrenzt durch Hauptknotenpunkte)
5. *Number of meshes* = Anzahl an Netzwerken (hellblau; ringförmig)
6. *Mean mesh size* = durchschnittliche Größe eines Netzwerks
7. *Total meshes area* = gesamte Fläche aller Netzwerke

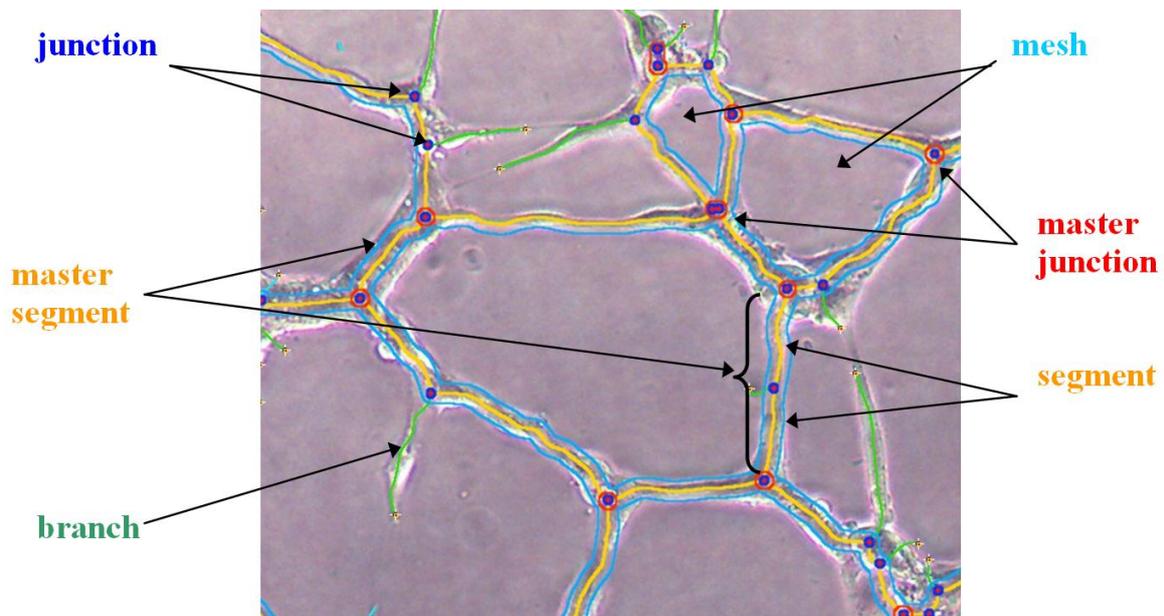


Abb. 12: Auswertung eines mikroskopischen Fotos mithilfe des Programms Image J und der Software „Angiogenesis Analyzer“ von Gilles Carpentier für den Tube Formation Assay.

Für die Auswertung wurden unter anderem folgende Strukturen analysiert:

Junction = Knotenpunkt; roter Punkt, blau umrandet.

Master Junction = Hauptknotenpunkt; roter Punkt, blau und rot umrandet.

Segment = Segment; gelb, durch Knotenpunkte begrenzt.

Master segment = Hauptsegmente; gelb, durch Hauptknotenpunkte begrenzt.

Mesh = Netzwerk; hellblau, ringförmig.

Die Inkubation der HUVECS mit ATG-F zeigte für alle betrachteten Merkmale der Tube Formation keinen signifikanten Einfluss auf die angiogene Aktivität der HUVECS. Im Gegensatz zu den niedrigeren Konzentrationen, zeigte die Inkubation mit 200 µg/ml ATG-F für alle betrachteten Merkmale eine leichte Minderung der Proliferationsrate, die jedoch nicht-signifikant ist (Abb. 13).

Number of junctions: im Vergleich zur Positivkontrolle zeigte sich kein signifikanter Effekt nach der Inkubation mit ATG-F in folgenden Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 94%,

p=0.98), 50 µg/ml (100% vs. 107%, p=0.96), 100 µg/ml (100% vs. 102%, p=0.99) und 200 µg/ml (100% vs. 91%, p=0.89) (Abb. 13A).

Number of master junctions: im Vergleich zur Positivkontrolle zeigte sich kein signifikanter Effekt nach der Inkubation mit ATG-F in folgenden Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 92%, p=0.96), 50 µg/ml (100% vs. 103%, p=0.99), 100 µg/ml (100% vs. 95%, p=0.99) und 200 µg/ml (100% vs. 76%, p=0.19) (Abb. 13B).

Number of segments: im Vergleich zur Positivkontrolle zeigte sich kein signifikanter Effekt nach der Inkubation mit ATG-F in folgenden Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 95%, p=0.99), 50 µg/ml (100% vs. 108%, p=0.95), 100 µg/ml (100% vs. 101%, p=0.99) und 200 µg/ml (100% vs. 86%, p=0.63) (Abb. 13C).

Number of master segments: im Vergleich zur Positivkontrolle zeigte sich kein signifikanter Effekt nach der Inkubation mit ATG-F in folgenden Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 89%, p=0.83), 50 µg/ml (102%, p=0.99), 100 µg/ml (100% vs. 94%, p=0.99) und 200 µg/ml (100% vs. 76%, p=0.16) (Abb. 13D).

Number of meshes: im Vergleich zur Positivkontrolle zeigte sich kein signifikanter Effekt nach der Inkubation mit ATG-F in folgenden Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 106%, p=0.99), 50 µg/ml (100% vs. 109%, p=0.98), 100 µg/ml (100% vs. 100%, p=0.99) und 200 µg/ml (100% vs. 62%, p=0.11) (Abb. 13E).

Mean mesh size: im Vergleich zur Positivkontrolle zeigte sich kein signifikanter Effekt nach der Inkubation mit ATG-F in folgenden Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 90%, p=0.99), 50 µg/ml (100% vs. 98%, p=0.99), 100 µg/ml (100% vs. 93%, p=0.99) und 200 µg/ml (100% vs. 64%, p=0.32) (Abb. 13F).

Total meshes area: im Vergleich zur Positivkontrolle zeigte sich kein signifikanter Effekt nach der Inkubation mit ATG-F in folgenden Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 105%, p=0.99), 50 µg/ml (100% vs. 123%, p=0.87), 100 µg/ml (100% vs. 111%, p=0.99) und 200 µg/ml (100% vs. 65%, p=0.59) (Abb. 13G).

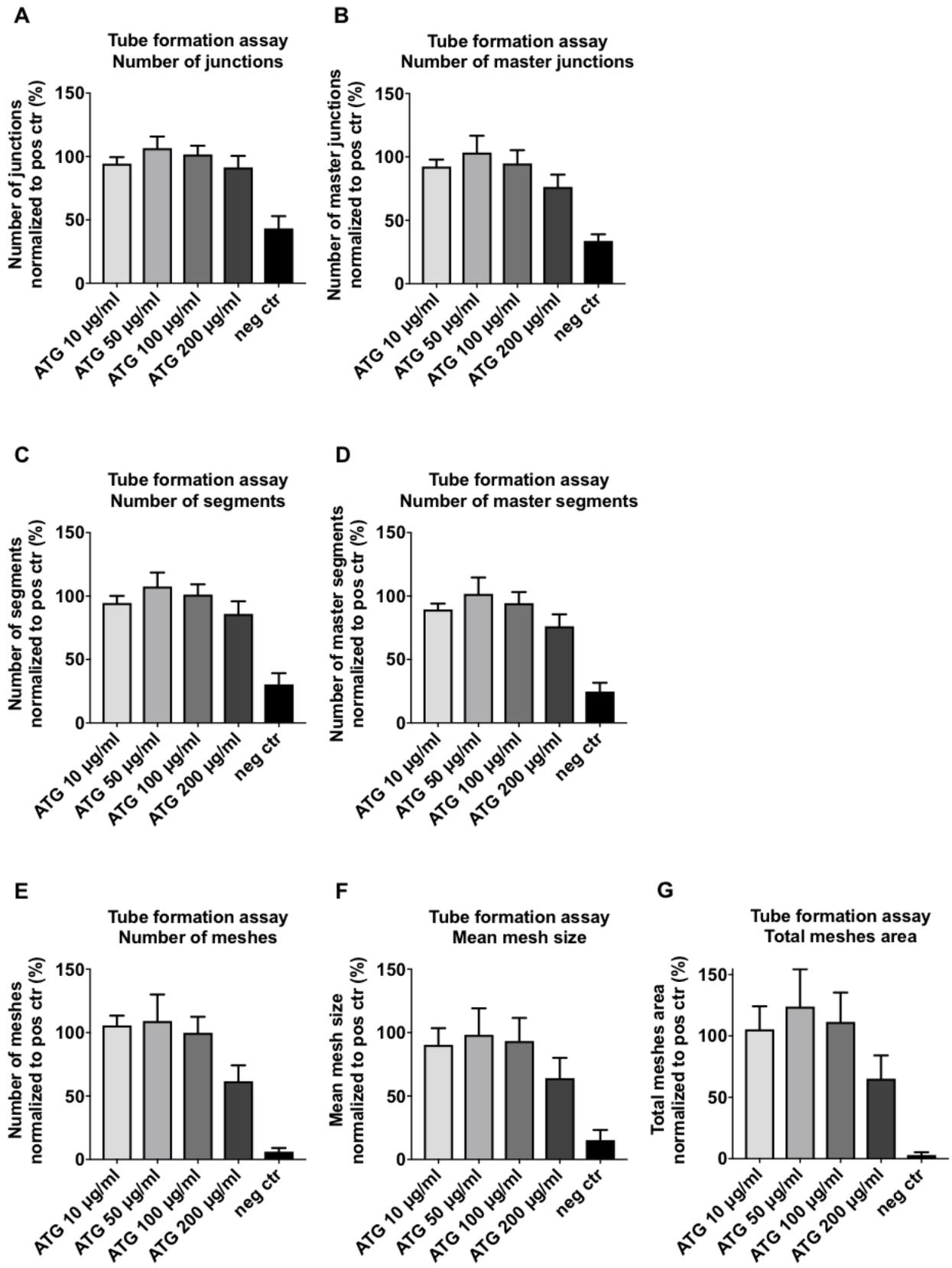


Abb. 13: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Tube Formation Assays nach 6-stündiger Inkubation der HUVECS mit ATG-F (10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml) supplementiert in

EGM-2 Medium). Als Positivkontrolle (pos ctr) diente EGM-2 Medium supplementiert mit Wachstumsfaktoren. Als Negativkontrolle (neg ctr) diente EBM-2-Medium ohne Wachstumsfaktoren. **A:** Anzahl an Knotenpunkten (*number of junctions*). ATG-F 10 µg/ml (100% vs. 94%, p=0.98), 50 µg/ml (100% vs. 107%, p=0.96), 100 µg/ml (100% vs. 102%, p=0.99) und 200 µg/ml (100% vs. 91%, p=0.89).

B: Anzahl an Hauptknotenpunkten (*number of master junctions*). ATG-F 10 µg/ml (100% vs. 92%, p=0.96), 50 µg/ml (100% vs. 103%, p=0.99), 100 µg/ml (100% vs. 95%, p=0.99) und 200 µg/ml (100% vs. 76%, p=0.19).

C: Anzahl an Segmenten (*number of segments*). ATG-F 10 µg/ml (100% vs. 95%, p=0.99), 50 µg/ml (100% vs. 108%, p=0.95), 100 µg/ml (100% vs. 101%, p=0.99) und 200 µg/ml (100% vs. 86%, p=0.63).

D: Anzahl an Hauptsegmenten (*number of master segments*). ATG-F 10 µg/ml (100% vs. 89%, p=0.83), 50 µg/ml (100% vs. 102%, p=0.99), 100 µg/ml (100% vs. 94%, p=0.99) und 200 µg/ml (100% vs. 76%, p=0.16).

E: Anzahl an Netzwerken (*number of meshes*). ATG-F 10 µg/ml (100% vs. 106%, p=0.99), 50 µg/ml (100% vs. 109%, p=0.98), 100 µg/ml (100% vs. 100%, p=0.99) und 200 µg/ml (100% vs. 62%, p=0.11).

F: Durchschnittliche Größe eines Netzwerks (*mean mesh size*). ATG-F 10 µg/ml (100% vs. 90%, p=0.99), 50 µg/ml (100% vs. 98%, p=0.99), 100 µg/ml (100% vs. 93%, p=0.99) und 200 µg/ml (100% vs. 64%, p=0.32).

G: Gesamte Fläche aller Netzwerke (*total meshes area*). ATG-F 10 µg/ml (100% vs. 105%, p=0.99), 50 µg/ml (100% vs. 123%, p=0.87), 100 µg/ml (100% vs. 111%, p=0.99) und 200 µg/ml (100% vs. 65%, p=0.59).

Die hier gezeigten Daten wurden in Quadruplikaten in drei unabhängigen Versuchen erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktoriellem ANOVA-Test und anschließendem Dunnett-Test.

3.2 Versuche mit DF

3.2.1 DF zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Zellmigration und Zellproliferation im Scratch Assay

Der Scratch Assay ist ein Versuch, der die Zellmigration und -proliferation misst.

Die 8-stündige Inkubation der HUVECS mit DF zeigte keine signifikante Änderung der Zellmigration und -proliferation für alle eingesetzten DF-Konzentrationen: 10 µg/ml (31% vs. 35%, p=0.95), 100 µg/ml (31% vs. 35%, p=0.96) und 500 µg/ml (31% vs. 39%, p=0.56). Trotz der nicht-signifikanten Ergebnisse zeigte sich insgesamt jedoch eine leichte dosisabhängige Zunahme der Zellmigration und -proliferation (Abb. 14).

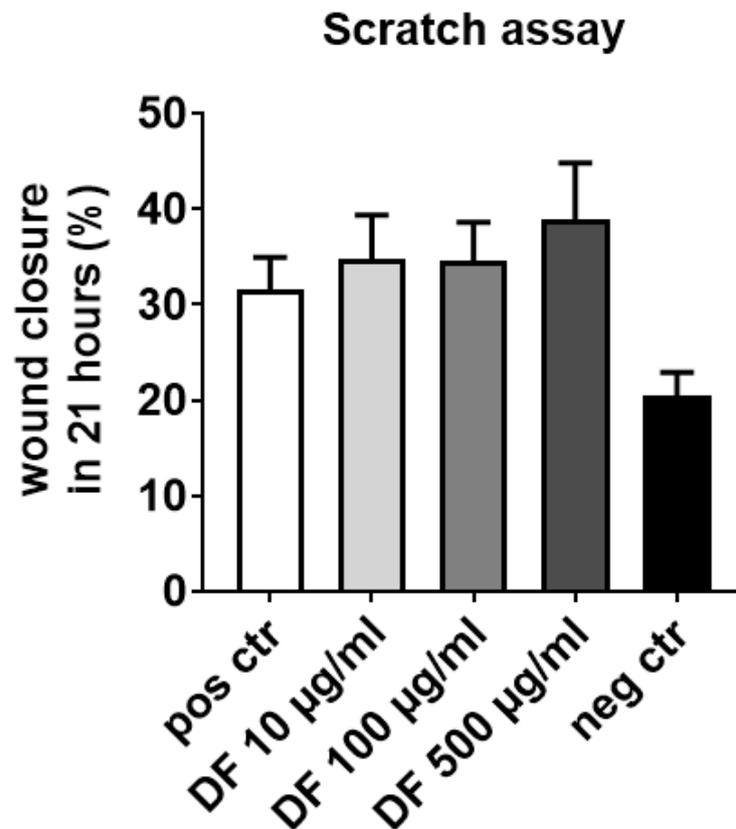


Abb. 14: Graphische Auswertung des Scratch Assays nach 8-stündiger Inkubation der HUVECS mit DF (10 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml supplementiert in EGM-2 Medium). Als Positivkontrolle (pos ctr) diente EGM-2 Medium supplementiert mit Wachstumsfaktoren und als Negativkontrolle (neg ctr) diente EBM-2-Medium ohne Wachstumsfaktoren.

Es zeigte sich keine signifikante Änderung der Zellmigration und -proliferation nach der Inkubation mit DF in allen eingesetzten Konzentrationen: 10 µg/ml (31% vs. 35%, $p=0.95$), 100 µg/ml (31% vs. 35%, $p=0.96$) und 500 µg/ml (31% vs. 39%, $p=0.56$).

Die hier gezeigten Daten wurden in Quadruplikaten in zwei unabhängigen Versuchen erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktoriellem ANOVA-Test und anschließendem Dunnett-Test.

3.2.2 DF inhibiert die Zellproliferationsrate der HUVECS im MTT Assay in dosisabhängiger Form

Der MTT Assay ist ein Versuch, der die Proliferationsrate von lebendigen Zellen misst.

Die Inkubation von HUVECS mit DF in verschiedenen Konzentrationen zeigte eine Inhibierung der Zellproliferationsrate in dosisabhängiger Form (Abb. 15-17).

Nach 24-stündiger Inkubation (D+1) zeigte sich eine nicht-signifikante Reduktion der Zellproliferationsrate für alle eingesetzten DF-Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 86%,

p=0.39), 100 µg/ml (100% vs. 79%, p=0.08) und 200 µg/ml (100% vs. 78%, p=0.07) (Abb. 15).

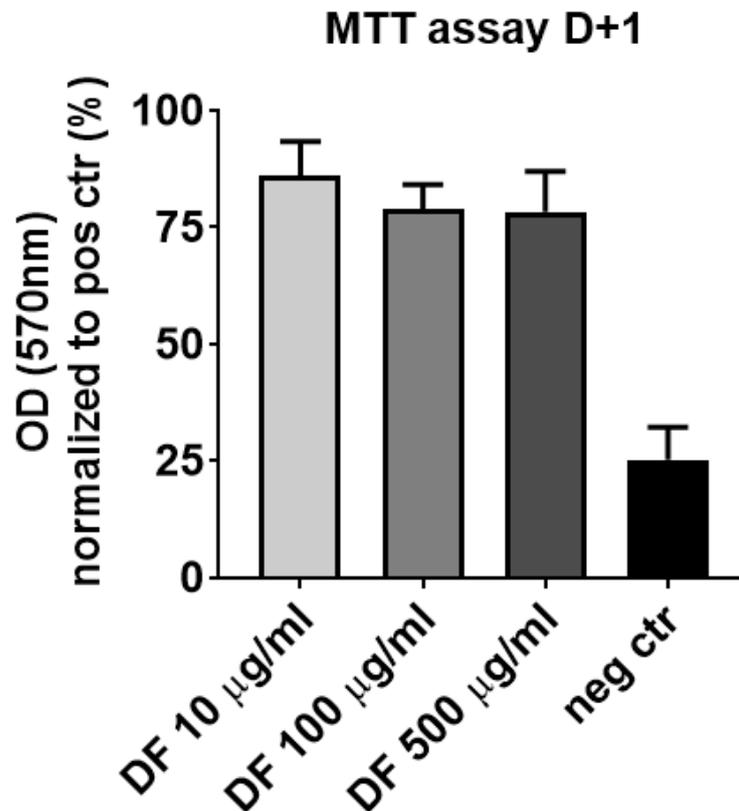


Abb. 15: Graphische Auswertung der Ergebnisse des MTT Assays nach 24-stündiger Inkubation (D+1) von HUVECS mit DF (10 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml supplementiert in EGM-2 Medium). Als Positivkontrolle (pos ctr) diente EGM-2 Medium supplementiert mit Wachstumsfaktoren und als Negativkontrolle (neg ctr) diente EBM-2-Medium ohne Wachstumsfaktoren. Ergebnisse nach 24-stündiger Inkubation (D+1) mit DF in folgenden Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 86%, p=0.39), 100 µg/ml (100% vs. 79%, p=0.08) und 500 µg/ml (100% vs. 78%, p=0.07). Die hier gezeigten Daten wurden in Quadruplikaten in drei unabhängigen Versuchen erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktoriellem ANOVA-Test und anschließendem Dunnett-Test.

Nach 48-stündiger Inkubation (D+2) zeigte sich hingegen eine signifikante dosisabhängige Reduktion der Zellproliferationsrate für alle eingesetzten DF-Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 86%, *p=0.019), 100 µg/ml (100% vs. 76%, ***p=0.0001) und 200 µg/ml (100% vs. 75%, ***p=0.0001) (Abb. 16).

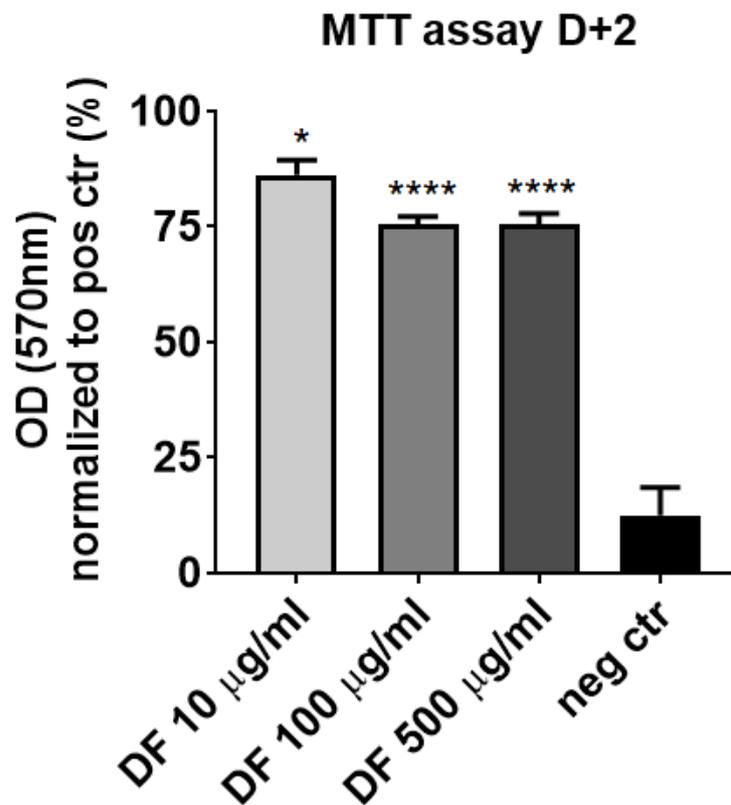


Abb. 16: Graphische Auswertung der Ergebnisse des MTT Assays nach 48-stündiger Inkubation (D+2) von HUVECS mit DF (10 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml supplementiert in EGM-2 Medium). Als Positivkontrolle (pos ctr) diente EGM-2 Medium supplementiert mit Wachstumsfaktoren und als Negativkontrolle (neg ctr) diente EBM-2-Medium ohne Wachstumsfaktoren.

Ergebnisse nach 48-stündiger Inkubation (D+2) mit DF in folgenden Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 86%, *p=0.019), 100 µg/ml (100% vs. 76%, ***p=0.0001) und 500 µg/ml (100% vs. 75%, ***p=0.0001).

Die hier gezeigten Daten wurden in Quadruplikaten in drei unabhängigen Versuchen erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktoriellem ANOVA-Test und anschließendem Dunnett-Test.

Und auch nach 72-stündiger Inkubationszeit (D+3) zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der Zellproliferationsrate. Die Inkubation mit 10 µg/ml DF zeigte eine nicht-signifikante Reduktion der Zellproliferationsrate (100% vs. 89%, p=0.23). Die Inkubation mit den übrigen DF-Konzentrationen zeigte jedoch signifikante Ergebnisse: 100 µg/ml (100% vs. 72%, ***p=0.0001) und 200 µg/ml (100% vs. 74%, ***p=0.0006) (Abb. 17).

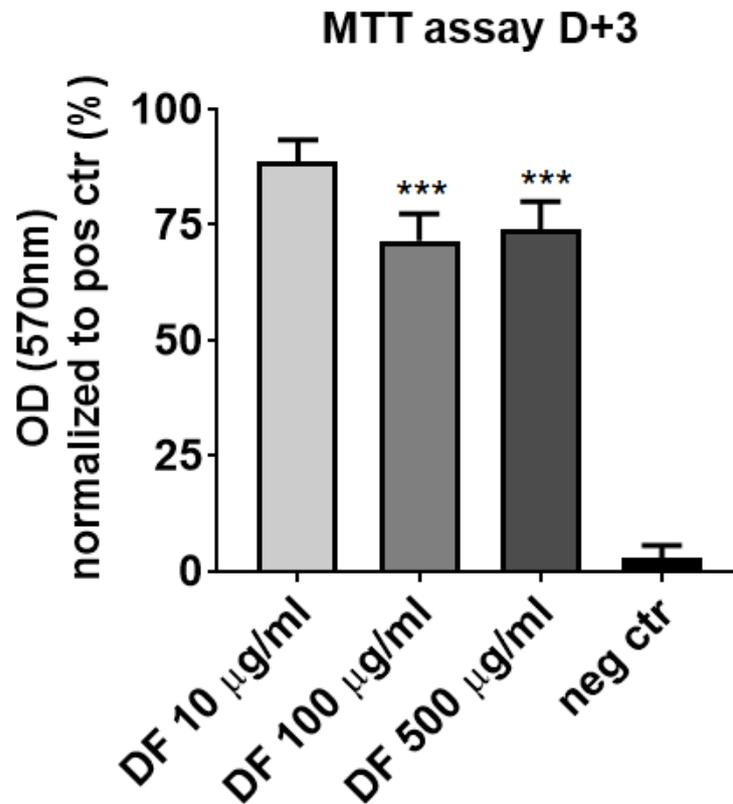


Abb. 17: Graphische Auswertung der Ergebnisse des MTT Assays nach 72-stündiger Inkubation (D+3) von HUVECS mit DF (10 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml supplementiert in EGM-2 Medium). Als Positivkontrolle (pos ctr) diente EGM-2 Medium supplementiert mit Wachstumsfaktoren und als Negativkontrolle (neg ctr) diente EBM-2-Medium ohne Wachstumsfaktoren.

Ergebnisse nach 72-stündiger Inkubation (D+3) mit DF in folgenden Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 89%, $p=0.23$), 100 µg/ml (100% vs. 72%, $***p=0.0001$) und 500 µg/ml (100% vs. 74%, $***p=0.0006$).

Die hier gezeigten Daten wurden in Quadruplikaten in drei unabhängigen Versuchen erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktoriellem ANOVA-Test und anschließendem Dunnett-Test.

3.2.3 DF inhibiert die angiogene Aktivität von HUVECS im Tube Formation Assay in dosisabhängiger Form

Der Tube Formation Assay misst die Fähigkeit von Endothelzellen, kapillarähnliche Strukturen, sogenannte *tubes*, zu bilden. Er ist somit ein Versuch, der für die Bestimmung der angiogenen Aktivität von Endothelzellen verwendet wird.

Für den Tube Formation Assay wurden HUVECS in eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und mit DF in unterschiedlichen Konzentrationen (10, 100 und 500 µg/ml) inkubiert. Nach 6 Stunden zeigte sich in der Positivkontrolle eine deutliche Formation von

tubes und es wurden mikroskopische Aufnahmen von allen Wells gemacht, die mithilfe der Programme „Angiogenesis Analyzer“ und Image J analysiert wurden.

Die Inkubation von HUVECS mit DF zeigte im Tube Formation Assay für alle von mir betrachteten Merkmale eine dosisabhängige, signifikante Minderung der angiogenen Aktivität der HUVECS (Abb. 18).

Für die Anzahl an Knotenpunkten (*number of junctions*) zeigte sich eine signifikante dosisabhängige Minderung nach Inkubation mit allen DF-Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 62%, **** $p < 0.0001$), 100 µg/ml (100% vs. 54%, **** $p < 0.0001$) und 500 µg/ml (100% vs. 42%, **** $p < 0.0001$) (Abb. 18A).

Für die Anzahl an Hauptknotenpunkten (*number of master junctions*) zeigte sich eine signifikante Minderung nach Inkubation mit allen DF-Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 56%, **** $p < 0.0001$), 100 µg/ml (100% vs. 45%, **** $p < 0.0001$) und 500 µg/ml (100% vs. 33%, **** $p < 0.0001$) (Abb. 18B).

Für die Anzahl an Segmenten (*number of segments*) zeigte sich eine signifikante Minderung nach Inkubation mit allen DF-Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 57%, **** $p < 0.0001$), 100 µg/ml (100% vs. 45%, **** $p < 0.0001$) und 500 µg/ml (100% vs. 32%, **** $p < 0.0001$) (Abb. 18C).

Für die Anzahl an Hauptsegmenten (*number of master segments*) zeigte die Inkubation mit DF eine signifikante Minderung für alle eingesetzten Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 51%, **** $p < 0.0001$), 100 µg/ml (100% vs. 40%, **** $p < 0.0001$) und 500 µg/ml (100% vs. 29%, **** $p < 0.0001$) (Abb. 18D).

Für die Anzahl an Netzwerken (*number of meshes*) zeigte sich eine signifikante Minderung nach Inkubation mit allen DF-Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 44%, ** $p = 0.0042$), 100 µg/ml (100% vs. 31%, *** $p = 0.0005$) und 500 µg/ml (100% vs. 19%, **** $p < 0.0001$) (Abb. 18E).

Für die durchschnittliche Größe eines Netzwerks (*mean mesh size*) zeigte sich eine signifikante Minderung nach Inkubation mit 500 µg/ml DF (100% vs. 18%, * $p = 0.012$). Es zeigte sich eine nicht-signifikante Reduktion der angiogenen Aktivität nach der Inkubation mit den übrigen DF-Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 62%, $p = 0.41$) und 100 µg/ml (100% vs. 52%, $p = 0.22$) (Abb. 18F).

Für das Merkmal der gesamten Fläche aller Netzwerke (*total meshes area*) zeigte sich eine signifikante Minderung nach Inkubation mit allen DF-Konzentrationen: 10 µg/ml (100% vs. 36%, **p=0.0086), 100 µg/ml (100% vs. 26%, **p=0.002) und 500 µg/ml (100% vs. 5%, ***p=0.0001) (Abb. 18G).

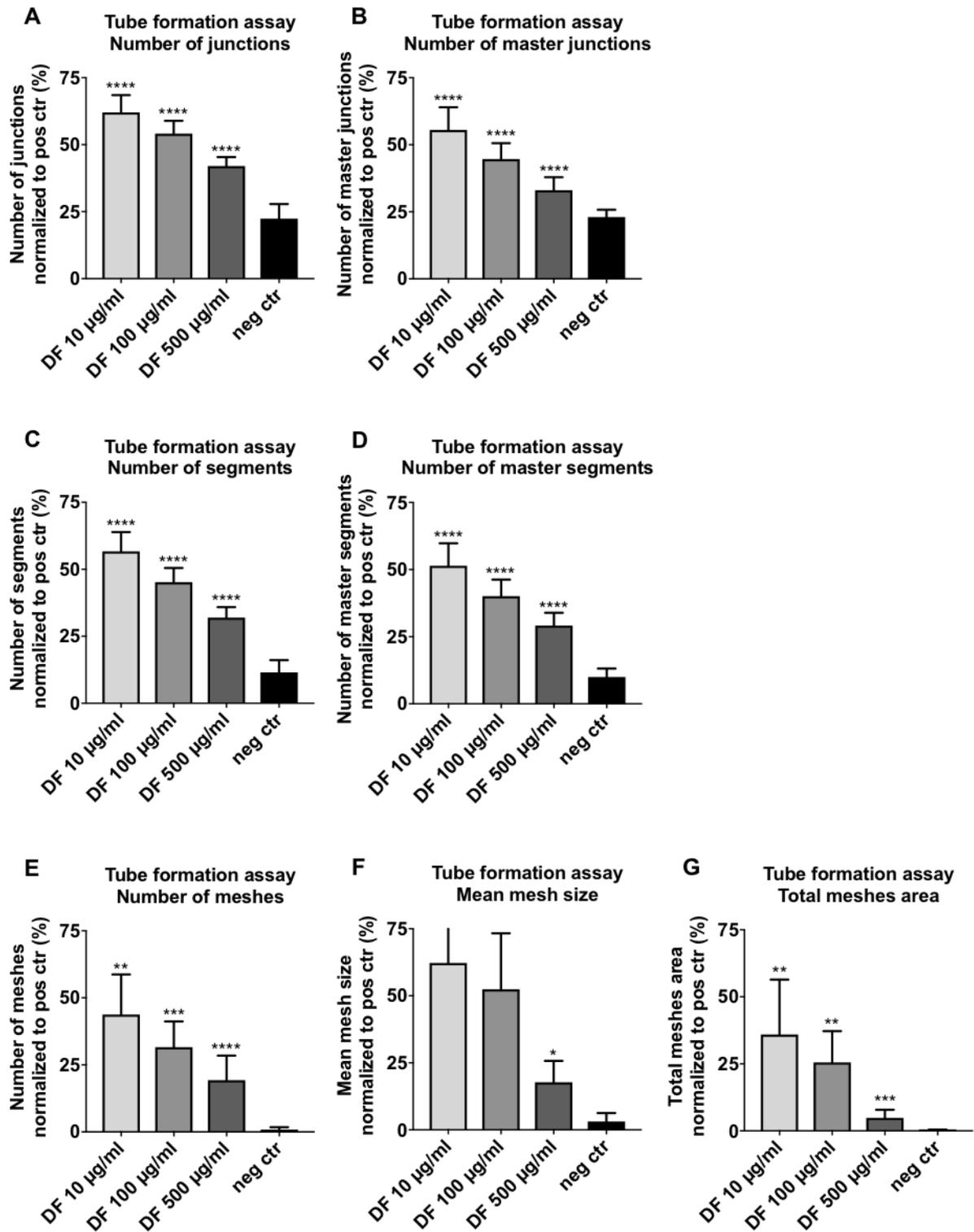


Abb. 18: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Tube Formation Assays nach 6-stündiger Inkubation der HUVECS mit DF (10 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml) supplementiert in EGM-2 Medium. Als Positivkontrolle (pos ctr) diente EGM-2 Medium supplementiert mit Wachstumsfaktoren. Als Negativkontrolle (neg ctr) diente EBM-2-Medium ohne Wachstumsfaktoren.

A: Anzahl an Knotenpunkten (*number of junctions*) nach Inkubation mit DF 10 µg/ml (100% vs. 62%, **** $p < 0.0001$), 100 µg/ml (100% vs. 54%, **** $p < 0.0001$) und 500 µg/ml (100% vs. 42%, **** $p < 0.0001$).

B: Anzahl an Hauptknotenpunkten (*number of master junctions*) nach Inkubation mit DF 10 µg/ml (100% vs. 56%, **** $p < 0.0001$), 100 µg/ml (100% vs. 45%, **** $p < 0.0001$) und 500 µg/ml (100% vs. 33%, **** $p < 0.0001$).

C: Anzahl an Segmenten (*number of segments*) nach Inkubation mit DF 10 µg/ml (100% vs. 57%, **** $p < 0.0001$), 100 µg/ml (100% vs. 45%, **** $p < 0.0001$) und 500 µg/ml (100% vs. 32%, **** $p < 0.0001$).

D: Anzahl an Hauptsegmenten (*number of master segments*) nach Inkubation mit DF 10 µg/ml (100% vs. 51%, **** $p < 0.0001$), 100 µg/ml (100% vs. 40%, **** $p < 0.0001$) und 500 µg/ml (100% vs. 29%, **** $p < 0.0001$).

E: Anzahl an Netzwerken (*number of meshes*) nach Inkubation mit DF 10 µg/ml (100% vs. 44%, ** $p = 0.0042$), 100 µg/ml (100% vs. 31%, *** $p = 0.0005$) und 500 µg/ml (100% vs. 19%, **** $p < 0.0001$).

F: Durchschnittliche Größe eines Netzwerks (*mean mesh size*) nach Inkubation mit DF 10 µg/ml (100% vs. 62%, $p = 0.41$), 100 µg/ml (100% vs. 52%, $p = 0.22$) und 500 µg/ml (100% vs. 18%, * $p = 0.012$).

G: Gesamte Fläche aller Netzwerke (*total meshes area*) nach Inkubation mit DF 10 µg/ml (100% vs. 36%, ** $p = 0.0086$), 100 µg/ml (100% vs. 26%, ** $p = 0.002$) und 500 µg/ml (100% vs. 5%, **** $p = 0.0001$).

Die hier gezeigten Daten wurden in Quadruplikaten in zwei unabhängigen Versuchen erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktoriellem ANOVA-Test und anschließendem Dunnett-Test.

4 Diskussion

Die allo-HSCT ist eine zunehmend durchgeführte Form der Therapie, die zur Behandlung einiger hämatonkologischer Erkrankungen, wie beispielsweise akute oder chronische Leukämien und Lymphome, verwendet wird. Aufgrund optimierter Verfahren mit fallenden Mortalitätsraten sowie eines steigenden Gesamtüberlebens wird die allo-HSCT in den letzten Jahren und Jahrzehnten zunehmend für die Therapie entsprechender Patienten eingesetzt. Im Rahmen einer allo-HSCT kann es jedoch auch heute noch zu lebensbedrohlichen Komplikationen kommen. Hierzu zählen zum Beispiel die GVHD und die VOD/SOS. Bei beiden Erkrankungen kommt es zu einer initialen multifaktoriellen Schädigung der Endothelzellen mit einer nachfolgenden Entzündungsreaktion im und um das Endothel, die letztendlich zu Organschädigungen führen kann.

Die GVHD stellt eine der häufigsten Komplikationen nach allo-HSCT dar und geht mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher (14, 25, 26, 31). Durch die initiale Schädigung der Endothelzellen während der Konditionierungstherapie kann es zur verstärkten Neovaskularisierung kommen, wodurch Entzündungszellen leichter in die Zielorgane der GVHD migrieren und diese schädigen können. Zur Prävention der GVHD gibt es einige Ansatzpunkte, zu denen beispielsweise die Gabe von ATG-F, einem polyklonalen Antikörpergemisch zur Depletion der alloreaktiven T-Zellen, gehört. Neben der TCD spielt jedoch auch die Interaktion von ATG-F mit Endothelzellen eine entscheidende Rolle. In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass ATG-F an Endothelzellen binden und dort die Expression von proinflammatorischen Adhäsionsmolekülen und Zytokinen hemmen kann (44, 50, 53). Der Einfluss von ATG-F auf die Neovaskularisierung, die eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der GVHD darstellt, ist bisher jedoch unklar. In dieser Arbeit konnte ich erstmals zeigen, dass ATG-F *in vitro* wichtige endotheliale Funktionen wie die Proliferation und Migration hemmen könnte. Daraus lässt sich schließen, dass die effektive Wirkung von ATG-F bezüglich der GVHD-Inzidenz nicht nur auf der TCD, sondern auch auf einer Beeinflussung der Neovaskularisierung beruhen könnte.

Die VOD/SOS stellt eine weitere sehr lebensbedrohliche Komplikation der allo-HSCT dar. Durch die initiale Konditionierungstherapie kann es zur Schädigung der sinusoidalen Endothelzellen der Leber kommen. Im weiteren Verlauf kommt es durch die Zerstörung der endothelialen Strukturen sowie durch eine prokoagulatorische Entzündungsreaktion

zu einer Obliteration der Lebervenen mit nachfolgender Entwicklung einer Leberinsuffizienz bis hin zum hochletalen Multiorganversagen (57). Zur Prävention und Therapie der VOD/SOS stellt DF, ein Gemisch aus Nukleinsäurepolymeren, nach heutigem Kenntnisstand das effektivste Medikament dar (71). Zu den zwei wichtigsten Wirkmechanismen des DF zählen die Schutzfunktion gegenüber Endothelzellen sowie die Wiederherstellung der thrombotisch-fibrinolytischen Balance (73). Die Datenlage zur Interaktion des DF mit Endothelzellen ist bisher jedoch ungewiss und widersprüchlich. In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass DF *in vitro* endotheliale Funktionen wie die Proliferationsrate und die angiogene Aktivität hemmen könnte. Dies lässt also darauf schließen, dass DF vor allem die Schädigung von Endothelzellen verhindern könnte, während die Endothelregeneration durch DF eher gehemmt werden könnte.

Bei der Planung von endothelspezifischen Therapien sollte die Wirkung von ATG-F und DF auf endotheliale Funktionen bedacht werden. Da ATG-F vor allem in hohen Konzentrationen die endothelialen Funktionen hemmen kann, könnte seine Interaktion mit Endothelzellen vor allem während der frühen Phase nach einer allo-HSCT, also zum Zeitpunkt der Neovaskularisierung, eine entscheidende Rolle spielen. Im späteren Verlauf, während die endotheliale Regeneration stattfindet, könnte die Gabe von ATG-F jedoch eher negative Auswirkungen haben. DF zeigte in dieser Arbeit eine anti-proliferative und anti-angiogene Wirkung auf Endothelzellen, sodass es die endotheliale Regeneration nach initialer Schädigung beeinträchtigen könnte.

Weitere Versuche könnten sich anschließen, um die Dosierung sowie die zeitliche Gabe von ATG-F und DF im Rahmen von endothelialen Komplikationen nach einer allo-HSCT zu optimieren. Zudem stellen beide Medikamente potentielle Kandidaten für den Einsatz in anderen Endothel-assoziierten Erkrankungen, wie beispielsweise chronische Niereninsuffizienz oder Arteriosklerose, dar.

4.1 Versuche mit ATG-F

4.1.1 ATG-F hemmt in hohen Konzentrationen die Migration und Proliferation der HUVECS im Scratch Assay

Im Scratch Assay konnte ich eine signifikante Hemmung der Migration und Proliferation von HUVECS nach der Inkubation mit ATG-F in Konzentrationen von 100 µg/ml und 200

µg/ml beobachten. Ähnlich hohe ATG-F-Konzentrationen sind typischerweise als Spitzenkonzentrationen nur während der ersten Tage nach der ATG-F-Infusion im Patientenserum messbar und sind daher auch als maximale Konzentrationen für die Assays meiner Arbeit gewählt worden (89). Während dieser ersten Tage nach einer allo-HSCT findet auch die Angiogenese (d+1 bis d+2) und nachfolgend die Lymphozyteninfiltration in die Zielorgane der GVHD (ab d+7) statt (40). Bei niedrigeren ATG-F-Konzentrationen, die üblicherweise bis zu fünf Wochen nach der ATG-F-Infusion im Patientenserum gefunden werden können, konnte ich in dieser Arbeit keine signifikanten Effekte im Scratch Assay beobachten (89, 92). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ATG-F vor allem während der ersten Tage nach einer allo-HSCT, wenn die ATG-F-Konzentrationen noch ausreichend hoch sind, die endothelialen Funktionen und somit auch die Neovaskularisierung hemmen könnte. Die nachfolgende Lymphozyteninfiltration und der Gewebeschaden wären somit auch verringert, wodurch die GVHD-Rate durch ATG-F gesenkt werden könnte. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ATG-F in späteren Phasen der GVHD aufgrund der geringen Serumkonzentration keinen relevanten Einfluss auf endotheliale Funktionen haben könnte.

4.1.2 ATG-F zeigt eine dosisabhängige Hemmung der Proliferationsrate im MTT Assay

Im MTT Assay konnte ich eine dosisabhängige Hemmung der Proliferationsrate durch ATG-F beobachten. Bereits in der niedrigen Konzentration von 10 µg/ml konnte ATG-F eine signifikante Hemmung bewirken. Diese niedrigen Konzentrationen werden nach einer allo-HSCT über viele Tage hinweg im Patientenserum gemessen (89). Somit lässt sich vermuten, dass ATG-F auch viele Tage nach einer allo-HSCT die endothelialen Funktionen beeinflussen könnte.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen des Scratch Assays, hatte ATG-F auch im MTT Assay in höheren Konzentrationen besonders starke Effekte auf die Proliferationsrate der HUVECS. Die Daten aus dem MTT Assay lassen also darauf schließen, dass sowohl in der frühen Phase nach einer allo-HSCT als auch über viele Tage hinweg eine relevante Interaktion zwischen ATG-F und Endothelzellen bestehen könnte.

4.1.3 ATG-F zeigt keine Wirkung auf die angiogene Aktivität von HUVECS im Tube Formation Assay

Im Tube Formation Assay zeigte ATG-F keine signifikante Wirkung auf die angiogene Aktivität der HUVECS. Lediglich nach der Inkubation mit 200 µg/ml ATG-F zeigte sich eine leichte Hemmung der endothelialen Fähigkeit sogenannte *tubes* zu bilden. Es lässt sich also vermuten, dass ATG-F möglicherweise in sehr hohen Konzentrationen, die jedoch außerhalb des klinisch relevanten Bereiches liegen würden, einen signifikanten Effekt im Tube Formation Assay zeigen könnte.

Der Tube Formation Assay kann am ehesten genutzt werden, um eine Aussage über die Differenzierungsfähigkeit von HUVECS zu treffen, während der Scratch Assay und der MTT Assay eher die Proliferationsfähigkeit beschreiben. Aus den Ergebnissen des Tube Formation Assays lässt sich also unter Berücksichtigung der Ergebnisse der anderen beiden Assays interpretieren, dass ATG-F keinen Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit der HUVECS haben könnte, sondern vor allem deren Proliferationsfähigkeit beeinflussen könnte.

4.1.4 Schlussfolgerungen

Mit dieser Arbeit konnte ich erstmals zeigen, dass ATG-F *in vitro* signifikante Effekte auf endotheliale Zellfunktionen hat. Diese Effekte waren in meinen Versuchen am stärksten ausgeprägt nach der Inkubation mit den höheren ATG-F-Konzentrationen von 100-200 µg/ml. Bei Patienten beträgt das gemessene unspezifische Kaninchen-IgG im Serum durchschnittlich über 100 µg/ml am 30. Tag nach einer Infusion mit 30 mg/kg ATG-F (89). Daraus lässt sich schließen, dass die ATG-F-Serumkonzentrationen bei Patienten nach einer allo-HSCT möglicherweise ausreichen würden, um die endotheliale Funktion auch *in vivo* zu beeinflussen.

Die Ergebnisse des Scratch Assays und des MTT Assays haben signifikante Effekte des ATG-F auf die endotheliale Proliferation, Migration und Proliferationsrate gezeigt. Dies lässt darauf schließen, dass ATG-F während der ersten Tage nach einer allo-HSCT eine stärkere Wirkung auf Endothelzellen haben könnte, wenn noch hohe ATG-F-Werte im Patientenserum messbar sind. Da auch die Neovaskularisierung und die Lymphozyteninfiltration während der ersten Tage nach einer allo-HSCT stattfinden (40),

könnte eine ATG-F-bedingte Hemmung der Neovaskularisierung während der Frühphase die verringerte Rate an GVHD-Erkrankungen erklären.

In einer Studie konnten Penack et al. zeigen, dass die Hemmung der Neovaskularisierung mit dem Antikörper E4G10, welches das vascular-endothelial-cadherin und somit die Gefäßneubildung durch Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen (*endothelial progenitor cells*; EPC) des Spenders antagonisiert, mit geringeren klinischen Schweregraden der GVHD und einem erhöhten Gesamtüberleben einhergeht (28). Interessanterweise zeigen auch andere immunsuppressive Medikamente wie MTX, MMF und CsA, die zur Prävention und Therapie der GVHD eingesetzt werden, anti-angiogene Eigenschaften (93, 94). Eine Hemmung der Neovaskularisierung durch ATG-F könnte also neben der TCD eine zusätzliche Erklärung für die verringerten GVHD-Raten sein.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Gabe von ATG-F das Auftreten von akuter und chronischer GVHD senken kann ohne die Malignomrezidivrate zu erhöhen (46, 95). Die alloreaktiven Spenderzellen spielen in der Pathogenese der GVHD sowie für den GVT-Effekt eine entscheidende Rolle, sodass sich die GVHD und der GVT-Effekt grundsätzlich gegensätzlich zueinander verhalten. So kann beispielsweise die Transplantation von T-Zell-depletierten Stammzellpräparaten zwar eine verminderte GVHD-Rate bewirken, aber auf der anderen Seite durch eine Abschwächung der vorteilhaften GVT-Effekte auch zu einem Anstieg der Rezidivrate führen (96, 97). Bereits 1999 konnten Remberger et al. nachweisen, dass die Gabe von ATG-F im Vergleich zu Thymoglobulin die GVT-Effekte effektiver erhalten kann (98). Westphal et al. konnten zeigen, dass ATG-F *in vitro* an verschiedene hämatologische Tumorzellen binden kann und somit einige Anti-Tumor-Effekte wie die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität und die Komplement-abhängige Zytotoxizität gegen Tumorzellen stimulieren kann (99). Doch auch die Neovaskularisierung spielt in der GVT-Aktivität eine entscheidende Rolle. In einem Artikel aus der Zeitschrift *Blood* beschreiben Penack et al., dass die Hemmung der Neovaskularisierung die positiven GVT-Effekte fördern kann (33). Die in dieser Arbeit angedeutete ATG-F-bedingte Hemmung der Neovaskularisierung könnte also die unveränderte Rezidivrate trotz geringerer GVHD-Rate erklären, da ATG-F unabhängig von der TCD in den Pathomechanismus der GVHD eingreifen könnte.

Überraschenderweise und konträr zu meiner ursprünglichen Hypothese, zeigte ATG-F im Tube Formation Assay keine signifikante Hemmung der angiogenen Aktivität der HUVECS. Dies lässt sich aber durch den Zusammenhang erklären, dass Zellen sich

entweder im Proliferationsmodus oder im Differenzierungsmodus befinden, jedoch nicht beides gleichzeitig stattfinden kann (100). Die angiogene Aktivität, die im TF Assay gemessen wird, ist eher ein Aspekt der Differenzierungsfähigkeit, während die Proliferation und die Migration, die im Scratch Assay und MTT Assay gemessen werden, Funktionen des Proliferationsmodus darstellen. Dies lässt vermuten, dass ATG-F seine Wirkung auf Endothelzellen vor allem während der Proliferationsphase entfalten könnte, während es in der Differenzierungsphase kaum Wirkung zeigen könnte.

Die Neovaskularisierung kann auf zwei verschiedene Arten ablaufen: bei der Vaskulogenese entstehen neue Gefäße durch die Rekrutierung von EPC, während die Angiogenese das Sprießen bereits vorhandener Gefäße beschreibt (28). Einige Studien mit tierischen Modellen oder menschlichen Proben konnten zeigen, dass die Vaskulogenese durch Spender-EPC eine größere Rolle im Pathomechanismus der GVHD spielt als die Angiogenese (28, 101, 102). Dabei kommt es aufgrund der endothelialen Aktivierung und Schädigung während der Konditionierungstherapie zur Rekrutierung von Spender-EPC, die daraufhin zu reifen Endothelzellen differenzieren und neue Gefäße bilden (33, 39, 103). Vor Kurzem konnten Riesner et al. jedoch zeigen, dass die initiale Neovaskularisierung im Pathomechanismus der GVHD durch Angiogenese stattfinden könnte, und schließen daraus, dass die Vaskulogenese erst in späteren Stadien der GVHD, also nach Infiltration der Gewebe mit Entzündungszellen, stattfinden könnte (40). Da jedoch sowohl bei der Vaskulogenese als auch bei der Angiogenese die Proliferation und Migration zeitlich vor der Differenzierung der Endothelzellen stattfinden, lassen meine Ergebnisse darauf schließen, dass ATG-F die ersten beiden Schritte der Neovaskularisierung sowohl initial als auch im weiteren Verlauf effektiv hemmen könnte und dadurch die Entwicklung einer GVHD verhindern könnte.

Im MTT Assay zeigte die Inkubation mit ATG-F, anders als im Scratch Assay, auch in den niedrigeren Konzentrationen von 10-50 µg/ml signifikante Wirkungen. Da es in späteren Phasen der GVHD zu erheblichen Endothelschäden (ab d+15) kommt, spielen eine intakte endotheliale Regeneration und die Revaskularisierung von geschädigten Geweben eine entscheidende Rolle (40). Eine Hemmung der endothelialen Funktionen wäre in dieser Phase also kontraproduktiv. Um herauszufinden, ob ATG-F tatsächlich auch in niedrigeren Konzentrationen die Funktion der Endothelzellen und somit dessen Regenerationsfähigkeit in späteren Phasen der GVHD beeinflussen könnte, wären weitere Untersuchungen mit Patientenproben nach allo-HSCT nötig.

Remberger et al. fanden heraus, dass nicht die Dosis des infundierten ATG-Präparats für die Prävention der GVHD entscheidend ist, sondern die im Patientenserum tatsächlich gemessene Konzentration direkt vor der allo-HSCT (92). So konnten sie nachweisen, dass bei einer Patientengruppe, die eine hohe Dosis an Thymoglobulin bekommen hatte, zum Teil nur geringe Konzentrationen (<70 mg/ml) direkt vor der allo-HSCT im Serum messbar waren, was auch mit einer höheren Rate an GVHD einherging (92). Da auch in meinen Versuchen eine Hemmung der endothelialen Funktionen vor allem bei hohen ATG-F-Konzentrationen (≥ 100 $\mu\text{g/ml}$) zu sehen war, stellt die tatsächlich gemessene Serumkonzentration vor einer allo-HSCT einen wichtigen Parameter dar, um einzuschätzen, ob die ATG-F-Konzentration ausreichend wäre, um die Neovaskularisierung und dadurch die Entwicklung einer GVHD überhaupt hemmen zu können.

4.2 Versuche mit DF

4.2.1 DF zeigt keine Wirkung auf die endotheliale Migration und Proliferation im Scratch Assay

Im Scratch Assay konnte ich keine signifikante Änderung der Migration und Proliferation von HUVECS durch die Gabe von DF nachweisen. Es zeigte sich jedoch eine leichte dosisabhängige Zunahme der Proliferation und Migration. Dies könnte darauf hinweisen, dass DF als endothelschützendes Agens die Regenerationsfähigkeit der Endothelien nach initialer Schädigung unterstützen könnte und dadurch die Rate an endothelialen Erkrankungen wie die VOD/SOS senken könnte. In der Literatur gibt es bezüglich der Wirkung von DF auf die endotheliale Proliferation bisher nur eine eingeschränkte und stark widersprüchliche Datenlage. So konnten Benimetskaya et al. zeigen, dass die Gabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ DF das Wachstum von HUVECS unter einem 3-dimensionalen Kollagen-I-Gel um das 2-fache und auf Plastik ohne Gelaufgabe um das 1,6-fache erhöhen konnte (74). Im Gegensatz dazu konnten Guglielmelli et al. zeigen, dass DF einige Wachstumsfaktoren wie VEGF, den Fibroblasten-Wachstumsfaktor bFGF, IL-8 und den *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) antagonisieren kann und somit die Proliferation, Adhäsion und Migration von Endothelzellen runterregulieren kann (20). In ähnlicher Richtung konnten Gottfried et al. zeigen, dass DF die Phosphorylierung des Akt-PI3K-

mTOR Signalwegs reduzieren kann, wodurch endotheliales Wachstum und Aktivierung gehemmt werden (104).

Die Ergebnisse des Scratch Assays meiner Arbeit unterstützen trotz insignifikant veränderter Werte eher die Daten von Benimetskaya et al. zur Proliferationsförderung und befürworten somit die Hypothese, dass DF als endothelschützendes Medikament die endotheliale Regeneration und die Revaskularisierung von geschädigten Geweben fördern könnte.

4.2.2 DF zeigt eine dosisabhängige Hemmung der Proliferationsrate im MTT Assay

Im MTT Assay konnte ich eine dosisabhängige Reduktion der Proliferationsrate von HUVECS sehen, die für die DF-Konzentration von 100 µg/ml und 500 µg/ml signifikant war. Diese Ergebnisse widersprechen den oben erwähnten Daten von Benimetskaya et al., die eine bis zu 2-fach erhöhte Proliferationsrate von HUVECS nach DF-Gabe zeigen (74). Stattdessen stimmen meine Ergebnisse mit den Daten von Guglielmelli et al. und Gottfried et al. überein, die in ihren Studien eine Wachstumshemmung durch DF feststellen konnten (20, 104).

Meine Ergebnisse im MTT Assay sind außerdem auch konträr zu den Ergebnissen im Scratch Assay, die eher auf eine proliferationsfördernde Wirkung des DF hindeuten. Da die Ergebnisse des MTT Assays im Gegensatz zum Scratch Assay jedoch signifikante Veränderungen zeigten, könnten sie von größerer klinischer Relevanz sein. Das würde wiederum darauf hindeuten, dass DF die endotheliale Regeneration und Revaskularisierung nach initialer Gewebeschädigung beeinträchtigen könnte. Die positive Wirkung von DF bei der Prävention zur VOD/SOS könnte also vor allem auf der endothelschützenden Komponente beruhen statt auf der endothelregenerierenden Komponente.

4.2.3 DF hemmt dosisabhängig die angiogene Aktivität der HUVECS im Tube Formation Assay

Im Tube Formation Assay konnte ich eine signifikante und dosisabhängige Reduktion der angiogenen Aktivität von HUVECS für alle eingesetzten DF-Konzentrationen sehen.

Diese Ergebnisse gehen mit denen des MTT Assays einher, die auch eine gehemmte endotheliale Funktion durch die Gabe von DF zeigen.

In der Literatur gibt es zur Wirkung des DF auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen sehr widersprüchliche Studien. So zeigten Koehl et al. im Jahr 2007, dass DF anti-angiogene Eigenschaften besitzt. In ihren Versuchen konnten sie zeigen, dass DF die Fähigkeit von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC), auf einer Schicht von dermalen Fibroblasten Gefäßstrukturen zu formieren, hemmen konnte (105). Zudem konnten sie zeigen, dass DF die Angiogenese, also die Gefäßneubildung durch das Sprießen bereits vorhandener Gefäße, an kultivierten ringförmigen Aortensegmenten von Ratten blockieren konnte (105). Zusätzlich konnten Koehl et al. in einem *in vivo* Experiment zeigen, dass DF die Angiogenese eines humanen Magentumors im Rückenhautkammermodell der Maus hemmen konnte (105).

Die Plausibilität dieser anti-angiogenen Ergebnisse spiegeln sich in den Versuchen von Nakamura et al. wider, die eine signifikante Suppression der morphologischen Erscheinungen von VOD/SOS nach der Gabe des Antikörpers Sorafenib, welches die Neovaskularisierung über VEGFR-2 und VEGFR-3 hemmt, im Rattenmodell zeigen konnten (106).

Auf der anderen Seite konnten Benimetskaya et al. zeigen, dass DF die angiogene Eigenschaft von Endothelzellen fördert. So konnten sie in ihren Versuchen zeigen, dass DF die tubuläre Morphogenese von HMEC-1 Zellen um das 6- bis 7-fache steigern kann, indem es mit hoher Affinität an den proangiogenen Fibroblasten-Wachstumsfaktor bFGF binden und diesen stabilisieren kann (74). Benimetskaya et al. schließen daraus, dass die vorteilhafte Wirkung von DF bezüglich des Pathomechanismus von VOD/SOS auf eine erleichterte Revaskularisierung der geschädigten, hypoxischen Lebergewebe zurückzuführen sein könnte (74).

In meiner Arbeit könnten die anti-angiogenen Ergebnisse des Tube Formation Assays, übereinstimmend mit den Ergebnissen des MTT Assays, eher darauf hindeuten, dass die Endothelregeneration durch DF gehemmt werden könnte und stattdessen die endothelschützende Komponente eine wichtigere Rolle spielen könnte.

4.2.4 Schlussfolgerungen

In meiner Arbeit konnte ich *in vitro* eine signifikante Hemmung der endothelialen Funktionen wie Proliferationsrate und angiogene Aktivität durch die Gabe von DF in unterschiedlichen Konzentrationen nachweisen. In der Literatur sind bisher nur wenige und zudem stark widersprüchliche Daten zur Wirkung des DF auf Endothelzellen bekannt. Die widersprüchliche Datenlage lässt darauf schließen, dass die Interaktion von DF mit Endothelzellen sehr stark von den umgebenden Einflussfaktoren wie der DF-Konzentration, der Endothelzelllinie, der Zellumgebung und dem Zeitpunkt der DF-Gabe abhängt.

DF wird in der Klinik über einen Zeitraum von mindestens 21 Tagen in einer Dosierung von 6,25 mg/kg Körpergewicht als 2-stündige Infusion alle 6 Stunden angewendet (107). Bei gesunden Probanden erreicht DF die maximale Serumkonzentration am Ende der Infusionsdauer und ist aufgrund der raschen Clearance bereits 3,5 Stunden nach Infusionsbeginn nicht mehr nachweisbar (107). Da in meinen Versuchen die höheren DF-Konzentrationen mit einer stärkeren Hemmung der endothelialen Funktionen einhergingen, deutet dies darauf hin, dass DF vor allem in den ersten Stunden während und nach einer Infusion wirken könnte, wenn die Serumkonzentration am höchsten ist. Außerdem lässt sich daraus schließen, dass DF über die 21-tägige Gabe hinweg in wiederholten Intervallen mit zwischenzeitlichen Pausen seine Wirkung auf endotheliale Funktionen entfalten könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die positive Wirkung des DF bezüglich der Prävention von VOD/SOS auf einer Prophylaxe des Endothelschadens beruhen könnte und weniger auf einer Verbesserung der Endothelregeneration, da endotheliale Funktionen in meinen durchgeführten Assays gehemmt wurden. Dies könnte auch die von Corbacioglu et al. nachgewiesene verminderte Rate an akuter GVHD nach DF-Gabe erklären, da DF durch eine Hemmung der Neovaskularisierung die Entstehung der GVHD beeinträchtigen könnte (78). Zusätzlich könnte DF als endothelprotektives Medikament eine endotheliale Schädigung, die der Neovaskularisierung immer vorausgeht, hemmen und dadurch weiter zur verminderten GVHD-Rate beitragen.

4.3 Limitationen

Die Interpretation der Ergebnisse meiner Arbeit unterliegt einigen Limitationen.

So können die hier eingesetzten HUVECS, die ein simples und gut verfügbares Modell für Endothelzellen darstellen, nicht die metabolischen und physiologischen Kapazitäten und Reaktionen anderer Endothelzelllinien abbilden. Humane Primärzellen, zu denen auch die HUVECS zählen, können zwar den physiologischen Zustand *in vivo* akkurater imitieren, dafür aber sehr abweichend reagieren, was beispielsweise zu Unterschieden in Inkubationszeiten und Proliferationsraten führen könnte.

HUVECS gehören zu den Zellen des makrovaskulären Systems. Da die GVHD sowie die VOD/SOS jedoch auch mikrovaskuläre Endothelzellen schädigen können, wären weitere Versuche mit anderen Endothelzelllinien nötig, um diesen Aspekt genauer zu beschreiben.

Kanzler et al. konnten zeigen, dass ATG-F stärker an aktivierte Endothelzellen binden kann (53). In meinen Versuchen habe ich jedoch nur unstimulierte HUVECS verwendet, sodass *in vivo* von einer stärkeren Interaktion zwischen ATG-F und Endothelzellen ausgegangen werden könnte, da eine Schädigung und Aktivierung der Endothelzellen einen festen Bestandteil im Pathomechanismus von GVHD und VOD/SOS ausmacht. Weitere Versuche mit beispielsweise TNF α -stimulierten Endothelzellen oder in der Anwesenheit von Leukozyten wären also nötig, um eine klinisch akkuratere Wirkung von ATG-F und DF auf Endothelzellen zu erforschen.

Als Positivkontrolle habe ich in meinen Assays ein mit Wachstumsfaktoren versetztes Medium verwendet. Allerdings könnte in den Versuchen mit ATG-F die Verwendung von polyklonalen Kaninchen-IgG-Antikörpern als Positivkontrolle sinnvoller bzw. aussagekräftiger sein, um unspezifische Bindungen und Wirkungen des ATG-F ausschließen zu können.

Eine weitere Limitation meiner Arbeit ist die Frage nach der Wirkung von ATG-F bzw. DF auf die Apoptose von HUVECS, die ebenfalls eine Hemmung der endothelialen Funktionen bewirken könnte. Es ist bereits in einigen Studien beschrieben, dass ATG dosisabhängig die Apoptose von Leukozyten induzieren kann (108, 109). Werner et al. konnten zudem beschreiben, dass ATG eine pro-apoptotische Wirkung auf humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) hat (110). In meinen Versuchen konnte ATG-F die endothelialen Funktionen dosisabhängig hemmen, was ebenfalls auf eine pro-apoptotische Wirkung zurückzuführen sein könnte. Da die Beeinflussung von ATG-F auf

die Apoptose von HUVECS bisher jedoch noch nicht in Studien beschrieben wurde, wären hier also weitere Versuche notwendig. Eissner et al. beschreiben, dass DF keinen negativen Einfluss auf die endotheliale Zellviabilität hat und zudem die Chemotherapie-induzierte Apoptose von Endothelzellen hemmen kann (88). Da diese Versuche mit HMEC-1-Zellen durchgeführt wurden, wären auch hier weitere Versuche notwendig, um den Einfluss von DF auf die Apoptose von HUVECS zu beschreiben.

In meinen Versuchen habe ich lediglich ATG-F und keine weiteren ATG-Präparate eingesetzt. Über potentielle Variationen der Wirkung verschiedener ATG-Präparate (ATG-F, Thymoglobulin, Atgam) auf endotheliale Funktionen kann diese Arbeit also keine Hinweise geben.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte ich erstmals zeigen, dass ATG-F *in vitro* endotheliale Zellfunktionen wie die Migration und die Proliferation signifikant hemmen kann. Bei der GVHD spielen sowohl der Endothelschaden als auch die Neovaskularisierung eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus. Da ATG-F in höheren Konzentrationen endotheliale Funktionen stärker beeinflussen könnte, sind die zeitliche Gabe sowie der ATG-F-Serumspiegel entscheidend für die Therapie und Prävention endothelialer Komplikationen. So könnte ATG-F in der frühen Phase nach einer allo-HSCT die Neovaskularisierung effektiv hemmen, während es in einer späteren Phase jedoch die endotheliale Regeneration behindern und den endothelialen Schaden dadurch verstärken könnte. Die Wirkung von ATG-F auf endotheliale Funktionen könnte jedoch stark von der Dosis sowie dem Zeitpunkt der Gabe abhängig sein. Das könnte auch erklären, warum im Tube Formation Assay keine signifikanten Ergebnisse zu sehen waren, obwohl dies zu erwarten gewesen wäre.

Zur effektiveren Prävention und Therapie endothelialer Komplikationen bei einer allo-HSCT wären genauere und sensitivere diagnostische Kriterien notwendig. Da beispielsweise die endotheliale Vulnerabilität bereits vor der allo-HSCT kritisch für die Entwicklung einer GVHD und für das Ansprechen auf Therapieversuche ist, wäre die Identifikation von Risikopatienten anhand endothelialer Vulnerabilitätsparameter hilfreich, um den situativen und zeitlichen Einsatz von ATG-F zu präzisieren (29, 39, 111). So lässt sich eine endotheliale Schädigung beispielsweise anhand der Messung von Zytokinen,

Chemokinen und Leukozytenadhäsionsmolekülen (z.B. vWF, VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, ANG2 und VEGF) im Serum von Patienten quantifizieren und stellt einen negativen Vorhersagewert für das Überleben nach einer allo-HSCT dar (112).

Mertzlitz et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass nicht nur die Neovaskularisierung, sondern auch die Lymphangiogenese eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus der GVHD spielt (113). Durch eine verstärkte Lymphangiogenese können lösliche Antigene und aktivierte APC besser in die Lymphknoten und zur Milz gelangen, wodurch allogene Reaktionen im Rahmen einer GVHD verstärkt werden könnten (113-115). So konnten Mertzlitz et al. nachweisen, dass eine erhöhte Anzahl an Lymphgefäßen in Duodenum- und Kolonbiopsien von Patienten mit akuter GVHD Grad III-IV vorliegt, und dass die Hemmung der Lymphangiogenese mit einem Anti-VEGFR-3-Antikörper die GVHD-assoziierte Organschädigung und Gesamtmortalität im Tiermodell senken kann (113). Der Einfluss von ATG-F auf die Lymphangiogenese ist noch nicht beschrieben und wäre hinsichtlich des besseren Verständnisses der Wirkungsweisen von ATG-F und hinsichtlich weiterer potentieller Therapiemöglichkeiten der GVHD und anderer endothelialer Erkrankungen von großem Interesse.

In meinen Versuchen mit DF konnte ich eine signifikante Hemmung der endothelialen Funktionen wie Proliferationsrate und angiogene Aktivität aufzeigen. Auch DF scheint in Abhängigkeit von Zeit und Dosis unterschiedliche Wirkungen auf endotheliale Funktionen zu haben, worauf die widersprüchliche Datenlage in der Literatur hinweist. So sind die optimale Dosis sowie die zeitliche Gabe von DF noch unklar, obwohl sie einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkung von DF auf Endothelschaden und Endothelregeneration haben könnten. Die anti-proliferativen und anti-angiogenen Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass DF weniger die Endothelregeneration unterstützt, sondern vor allem die Endothelschädigung verhindert und dadurch in die Pathogenese der VOD/SOS eingreifen kann. Somit wäre die Identifikation von Risikopatienten durch endotheliale Vulnerabilitätsparameter vor einer allo-HSCT hilfreich, um den situativen und zeitlichen Einsatz von DF zu präzisieren. Auch der Einfluss von DF auf die Lymphangiogenese, die eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der GVHD spielt, ist noch nicht beschrieben und wäre hinsichtlich weiterer potentieller Therapiemöglichkeiten der GVHD und anderer endothelialer Erkrankungen von großem Interesse (99).

Das wachsende Wissen über die komplexen immunologischen Eigenschaften von ATG-F und DF weist darauf hin, dass die Liste an Indikationen für diese beiden Medikamente zukünftig um einige Krankheitsbilder erweitert werden könnte. ATG-Präparate werden bereits zusätzlich zur GVHD-Prophylaxe auch im Rahmen von soliden Organtransplantationen, zur Therapie der Aplastischen Anämie und bei einigen Autoimmunerkrankungen eingesetzt (44, 45, 55). Auch die Gabe von DF könnte sich beispielsweise vor einer soliden Organtransplantation zur Vermeidung von endothelialen Schäden und Abstoßungsreaktionen bewähren. Die Gabe von ATG-F oder DF bei weiteren häufigen Erkrankungen der heutigen Zeit (beispielsweise chronische Niereninsuffizienz, Adipositas, Sepsis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Arthritis), die allesamt mit einer Endothelschädigung oder einer verstärkten Neovaskularisierung einhergehen, wäre zukünftig vorstellbar und bedarf weiterer Forschung (85). Auch der Einsatz dieser beiden Medikamente zur Therapie und Prophylaxe von weiteren Erkrankungen aus der Gruppe des vaskulären Endothelsyndroms, wie beispielsweise TA-TAM oder IPS, bedarf weiterer Forschungsstudien.

ATG-F und DF sind aufgrund ihrer vielfältigen Interaktionen mit Endothelzellen zwei Medikamente, die zukünftig eine wichtige Rolle in der Prävention und Therapie von einer Vielzahl an Erkrankungen spielen könnten, zu denen sowohl allo-HSCT-assoziierte Komplikationen als auch andere vaskuläre Erkrankungen zählen. Insbesondere bei der Planung von endothelspezifischen Therapien sollte die Wirkung von ATG-F und DF auf endotheliale Funktionen bedacht werden, um die therapeutischen Möglichkeiten bei einer GVHD oder VOD/SOS zu optimieren und das Outcome nach einer allo-HSCT zu verbessern.

5 Literaturverzeichnis

1. Dreger P, Beelen D, Bornhäuser M, Einsele H, Kröger N, Passweg J, Zeiser R. Onkopedia Leitlinien: Allogene Stammzelltransplantation - Indikationen. Berlin: DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.; 2016.
2. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Dufour C, Kuball J, Farge-Bancel D, Gennery A, Kroger N, Lanza F, Nagler A, Sureda A, Mohty M. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(6):786-92.
3. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):340-52.
4. Remberger M, Ackefors M, Berglund S, Blennow O, Dahllof G, Dlugosz A, Garming-Legert K, Gertow J, Gustafsson B, Hassan M, Hassan Z, Hauzenberger D, Hagglund H, Karlsson H, Klingspor L, Kumlien G, Le Blanc K, Ljungman P, Machaczka M, Malmberg KJ, Marschall HU, Mattsson J, Olsson R, Omazic B, Sairafi D, Schaffer M, Svahn BM, Svenberg P, Swartling L, Szakos A, Uhlin M, Uzunel M, Watz E, Wernerson A, Wikman A, Wikstrom AC, Winiarski J, Ringden O. Improved survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in recent years. A single-center study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(11):1688-97.
5. Ehninger G, Holler E. Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation. DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e.V.; 2005.
6. Tallen G, Kühl J. Stammzelltransplantation. Kompetenznetz Pädiatrische Onkologie und Hämatologie; 2014.
7. Niederwieser D, Baldomero H, Szer J, Gratwohl M, Aljurf M, Atsuta Y, Bouzas LF, Confer D, Greinix H, Horowitz M, Iida M, Lipton J, Mohty M, Novitzky N, Nunez J, Passweg J, Pasquini MC, Kodera Y, Apperley J, Seber A, Gratwohl A. Hematopoietic stem cell transplantation activity worldwide in 2012 and a SWOT analysis of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Group including the global survey. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(6):778-85.
8. Forman SJ, Nakamura R. Hematopoietic Cell Transplantation. In: Haller D, Wagman L, Camphausen K, Hoskins W, editors. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach, Medical, Surgical, and Radiation Oncology: UBM Medica*; 2014.
9. Kröger N, Burchert A, Niederwieser D, Wulf G. Onkopedia Leitlinien: Allogene Stammzelltransplantation - Konditionierung. Berlin: DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.; 2016.
10. Rezvani AR, Storb RF. Prevention of graft-vs.-host disease. *Expert Opin Pharmacother.* 2012;13(12):1737-50.
11. Biedermann BC, Sahner S, Gregor M, Tsakiris DA, Jeanneret C, Pober JS, Gratwohl A. Endothelial injury mediated by cytotoxic T lymphocytes and loss of microvessels in chronic graft versus host disease. *Lancet.* 2002;359(9323):2078-83.
12. Canaani J, Beohou E, Labopin M, Ghavamzadeh A, Beelen D, Hamladji RM, Niederwieser D, Volin L, Markiewicz M, Arnold R, Mufti G, Ehninger G, Socie G, Kroger N, Mohty M, Nagler A. Trends in patient outcome over the past two decades following allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia: an ALWP/EBMT analysis. *J Intern Med.* 2018.
13. Battipaglia G, Labopin M, Candoni A, Fanin R, El Cheikh J, Blaise D, Michallet M, Ruggeri A, Contentin N, Ribera JM, Stadler M, Sierra J, von dem Borne PA, Bloor A, Socie G, Nagler A, Mohty M. Risk of sinusoidal obstruction syndrome in allogeneic stem cell transplantation after prior gemtuzumab ozogamicin treatment: a retrospective study from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 2017.

14. Biedermann BC. Vascular endothelium and graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008;21(2):129-38.
15. Gratwohl A, Brand R, Frassoni F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P, Einsele H, Cordonnier C, Acute, Chronic Leukemia Working P, Infectious Diseases Working Party of the European Group for B, Marrow T. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36(9):757-69.
16. Zhang XY, Zhang PY. Stem cell transplantation during cancer. *Oncol Lett.* 2016;12(6):4297-300.
17. Ringden O, Erkers T, Aschan J, Garming-Legert K, Le Blanc K, Hagglund H, Omazic B, Svenberg P, Dahllof G, Mattsson J, Ljungman P, Remberger M. A prospective randomized toxicity study to compare reduced-intensity and myeloablative conditioning in patients with myeloid leukaemia undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *J Intern Med.* 2013;274(2):153-62.
18. Carreras E, Diaz-Ricart M. The role of the endothelium in the short-term complications of hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(12):1495-502.
19. Aird WC. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost.* 2005;3(7):1392-406.
20. Guglielmelli T, Bringham S, Palumbo A. Update on the use of defibrotide. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(3):353-61.
21. Palomo M, Diaz-Ricart M, Rovira M, Escolar G, Carreras E. Defibrotide prevents the activation of macrovascular and microvascular endothelia caused by soluble factors released to blood by autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(4):497-506.
22. Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME. Defibrotide: properties and clinical use of an old/new drug. *Vascul Pharmacol.* 2013;59(1-2):1-10.
23. Cooke KR, Jannin A, Ho V. The contribution of endothelial activation and injury to end-organ toxicity following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(1 Suppl 1):23-32.
24. Barker CC, Butzner JD, Anderson RA, Brant R, Sauve RS. Incidence, survival and risk factors for the development of veno-occlusive disease in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32(1):79-87.
25. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2565-79.
26. Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med.* 2018;378(6):586.
27. Zeiser R, Wolff D, Scheid C, Luft T, Greinix H, Dreger P, Finke J, Holler E. *Onkopedia Leitlinien: Graft-versus-Host Erkrankung, akut.* Berlin: DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.; 2017.
28. Penack O, Henke E, Suh D, King CG, Smith OM, Na IK, Holland AM, Ghosh A, Lu SX, Jenq RR, Liu C, Murphy GF, Lu TT, May C, Scheinberg DA, Gao DC, Mittal V, Heller G, Benezra R, van den Brink MR. Inhibition of neovascularization to simultaneously ameliorate graft-vs-host disease and decrease tumor growth. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(12):894-908.
29. Tichelli A, Gratwohl A. Vascular endothelium as 'novel' target of graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008;21(2):139-48.
30. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009;373(9674):1550-61.
31. Theurich S, Fischmann H, Chakupurakal G, Shimabukuro-Vornhagen A, Chemnitz JM, Holtick U, Rothe A, Scheid C, Hallek M, Skoetz N, von Bergwelt-Baildon M. Anti-

- thymocyte globulins for post-transplant graft-versus-host disease prophylaxis-A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88(1):178-86.
32. Hahn T, McCarthy PL, Jr., Zhang MJ, Wang D, Arora M, Frangoul H, Gale RP, Hale GA, Horan J, Isola L, Maziarz RT, van Rood JJ, Gupta V, Halter J, Reddy V, Tiberghien P, Litzow M, Anasetti C, Pavletic S, Ringden O. Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia. *J Clin Oncol*. 2008;26(35):5728-34.
 33. Penack O, Socie G, van den Brink MR. The importance of neovascularization and its inhibition for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(16):4181-9.
 34. Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med*. 1975;292(17):895-902.
 35. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18(4):295-304.
 36. Wolff D, Zeiser R, Scheid C, Luft T, Mielke S, Dreger P, Finke J, Holler E, Greinix H. *Onkopedia Leitlinien: Graft-versus-Host Erkrankung, chronisch*. Berlin: DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.; 2017.
 37. Dumler JS, Beschorner WE, Farmer ER, Di Gennaro KA, Saral R, Santos GW. Endothelial-cell injury in cutaneous acute graft-versus-host disease. *Am J Pathol*. 1989;135(6):1097-103.
 38. Marmaduke DP, Greenson JK, Cunningham I, Herderick EE, Cornhill JF. Gastric vascular ectasia in patients undergoing bone marrow transplantation. *Am J Clin Pathol*. 1994;102(2):194-8.
 39. Penack O. CH 20 - The endothelium in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. *Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. San Diego: Academic Press; 2013. p. 479-92.
 40. Riesner K, Shi Y, Jacobi A, Krater M, Kalupa M, McGearey A, Mertlitz S, Cordes S, Schrezenmeier JF, Mengwasser J, Westphal S, Perez-Hernandez D, Schmitt C, Dittmar G, Guck J, Penack O. Initiation of acute graft-versus-host disease by angiogenesis. *Blood*. 2017;129(14):2021-32.
 41. Remberger M, Aschan J, Barkholt L, Tollemar J, Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with anti-thymocyte globulin. *Clin Transplant*. 2001;15(3):147-53.
 42. Fachinformation: ATG-Fresenius S 20 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung. Stand: Januar 2014. Neovii Biotech GmbH, Gräfelfing, Deutschland. Zulassungsnummer 452a/87 [Available from: https://www.gelbe-liste.de/produkte/atg-fresenius-s-20-mg-ml-konzentrat-zur-herstellung-einer-infusionsloesung-5-ml_257093/fachinformation].
 43. Kroger N, Solano C, Wolschke C, Bandini G, Patriarca F, Pini M, Nagler A, Selleri C, Risitano A, Messina G, Bethge W, Perez de Oteiza J, Duarte R, Carella AM, Cimminiello M, Guidi S, Finke J, Mordini N, Ferrà C, Sierra J, Russo D, Petrini M, Milone G, Benedetti F, Heinzelmann M, Pastore D, Jurado M, Terruzzi E, Narni F, Volp A, Ayuk F, Ruutu T, Bonifazi F. Antilymphocyte Globulin for Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 2016;374(1):43-53.
 44. Beiras-Fernandez A, Chappell D, Hammer C, Beiras A, Reichart B, Thein E. Impact of polyclonal anti-thymocyte globulins on the expression of adhesion and inflammation molecules after ischemia-reperfusion injury. *Transpl Immunol*. 2009;20(4):224-8.
 45. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia*. 2007;21(7):1387-94.

46. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, Volin L, Ruutu T, Heim DA, Schwerdtfeger R, Kolbe K, Mayer J, Maertens JA, Linkesch W, Holler E, Koza V, Bornhauser M, Einsele H, Kolb HJ, Bertz H, Egger M, Grishina O, Socie G. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(9):855-64.
47. Yang N, Chen J, Zhang H, Dai Z, Yao H, Ma X, Bai J, Zhang Y, Zhang W. Horse versus rabbit antithymocyte globulin in immunosuppressive therapy of treatment-naïve aplastic anemia: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol.* 2017;96(12):2031-43.
48. Ayuk F, Diyachenko G, Zabelina T, Wolschke C, Fehse B, Bacher U, Ertmann R, Kroger N, Zander AR. Comparison of two doses of antithymocyte globulin in patients undergoing matched unrelated donor allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(8):913-9.
49. Beiras-Fernandez A, Hernandez-Sierra A, Schulz U, Richter M, Thein E, Moritz A, Werner I. Binding of ATGs to Endothelial Cells In Vivo. *Ann Transplant.* 2016;21:311-6.
50. Beiras-Fernandez A, Walther S, Thein E, Muenzing S, Hammer C. Influence of polyclonal ATGs on expression of adhesion molecules: an experimental study. *Transplant Proc.* 2005;37(4):1944-6.
51. Brokhof MM, Sollinger HW, Hager DR, Muth BL, Pirsch JD, Fernandez LA, Bellingham JM, Mezrich JD, Foley DP, D'Alessandro AM, Odorico JS, Mohamed MA, Vidyasagar V, Ellis TM, Kaufman DB, Djamali A. Antithymocyte globulin is associated with a lower incidence of de novo donor-specific antibodies in moderately sensitized renal transplant recipients. *Transplantation.* 2014;97(6):612-7.
52. Popow I, Leitner J, Grabmeier-Pfistershammer K, Majdic O, Zlabinger GJ, Kundi M, Steinberger P. A comprehensive and quantitative analysis of the major specificities in rabbit antithymocyte globulin preparations. *Am J Transplant.* 2013;13(12):3103-13.
53. Kanzler I, Seitz-Merwald I, Schleger S, Kaczmarek I, Kur F, Beiras-Fernandez A. In vitro effects of ATG-Fresenius on immune cell adhesion. *Transplant Proc.* 2013;45(5):1846-9.
54. Walther S, Beiras-Fernandez A, Csapo C, Munzing S, Stief CG, Hammer C, Reichart B, Thein E. Influence of polyclonal antithymocyte globulins on the expression of adhesion molecules of isolated human umbilical vein endothelial cells. *Transplant Proc.* 2010;42(5):1931-4.
55. Beiras-Fernandez A, Walther S, Csapo C, Muenzing S, Hammer C, Reichart B, Thein E. Antithymocyte globulins bind to human umbilical vein endothelial cells. *Transplant Proc.* 2009;41(6):2286-8.
56. Dalle JH, Giralt SA. Hepatic Venous-Occlusive Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Risk Factors and Stratification, Prophylaxis, and Treatment. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(3):400-9.
57. Fan CQ, Crawford JM. Sinusoidal obstruction syndrome (hepatic veno-occlusive disease). *J Clin Exp Hepatol.* 2014;4(4):332-46.
58. Toh HC, McAfee SL, Sackstein R, Cox BF, Colby C, Spitzer TR. Late onset veno-occlusive disease following high-dose chemotherapy and stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24(8):891-5.
59. McDonald GB, Sharma P, Matthews DE, Shulman HM, Thomas ED. Venocclusive disease of the liver after bone marrow transplantation: diagnosis, incidence, and predisposing factors. *Hepatology.* 1984;4(1):116-22.
60. Corbacioglu S, Carreras E, Ansari M, Balduzzi A, Cesaro S, Dalle JH, Dignan F, Gibson B, Guengoer T, Gruhn B, Lankester A, Locatelli F, Pagliuca A, Peters C, Richardson PG, Schulz AS, Sedlacek P, Stein J, Sykora KW, Toporski J, Trigos E, Vetteranta K, Wachowiak J, Wallhult E, Wynn R, Yaniv I, Yesilipek A, Mohty M, Bader P. Diagnosis and

- severity criteria for sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease in pediatric patients: a new classification from the European society for blood and marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53(2):138-45.
61. Mohty M, Malard F, Abecassis M, Aerts E, Alaskar AS, Aljurf M, Arat M, Bader P, Baron F, Bazarbachi A, Blaise D, Ciceri F, Corbacioglu S, Dalle JH, Dignan F, Fukuda T, Huynh A, Masszi T, Michallet M, Nagler A, NiChonghaile M, Okamoto S, Pagliuca A, Peters C, Petersen FB, Richardson PG, Ruutu T, Savani BN, Wallhult E, Yakoub-Agha I, Duarte RF, Carreras E. Revised diagnosis and severity criteria for sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease in adult patients: a new classification from the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(7):906-12.
 62. Mohty M, Malard F, Abecassis M, Aerts E, Alaskar AS, Aljurf M, Arat M, Bader P, Baron F, Bazarbachi A, Blaise D, Ciceri F, Corbacioglu S, Dalle JH, Duarte RF, Fukuda T, Huynh A, Masszi T, Michallet M, Nagler A, NiChonghaile M, Pagliuca T, Peters C, Petersen FB, Richardson PG, Ruutu T, Savani BN, Wallhult E, Yakoub-Agha I, Carreras E. Sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease: current situation and perspectives-a position statement from the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* 2015;50(6):781-9.
 63. Carreras E, Diaz-Beya M, Rosinol L, Martinez C, Fernandez-Aviles F, Rovira M. The incidence of veno-occlusive disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation has diminished and the outcome improved over the last decade. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(11):1713-20.
 64. Coppell JA, Richardson PG, Soiffer R, Martin PL, Kernan NA, Chen A, Guinan E, Vogelsang G, Krishnan A, Giralt S, Revta C, Carreau NA, Iacobelli M, Carreras E, Ruutu T, Barbui T, Antin JH, Niederwieser D. Hepatic veno-occlusive disease following stem cell transplantation: incidence, clinical course, and outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(2):157-68.
 65. Cesaro S, Pillon M, Talenti E, Toffolutti T, Calore E, Tridello G, Strugo L, Destro R, Gazzola MV, Varotto S, Errigo G, Carli M, Zanesco L, Messina C. A prospective survey on incidence, risk factors and therapy of hepatic veno-occlusive disease in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2005;90(10):1396-404.
 66. Lee SH, Yoo KH, Sung KW, Koo HH, Kwon YJ, Kwon MM, Park HJ, Park BK, Kim YY, Park JA, Im HJ, Seo JJ, Kang HJ, Shin HY, Ahn HS. Hepatic veno-occlusive disease in children after hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors, and outcome. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(8):1287-93.
 67. Carreras E. How I manage sinusoidal obstruction syndrome after haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol.* 2015;168(4):481-91.
 68. Cheuk DK, Chiang AK, Ha SY, Chan GC. Interventions for prophylaxis of hepatic veno-occlusive disease in people undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015(5):CD009311.
 69. Bearman SI. The syndrome of hepatic veno-occlusive disease after marrow transplantation. *Blood.* 1995;85(11):3005-20.
 70. Hallahan DE, Spriggs DR, Beckett MA, Kufe DW, Weichselbaum RR. Increased tumor necrosis factor alpha mRNA after cellular exposure to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(24):10104-7.
 71. Helmy A. Review article: updates in the pathogenesis and therapy of hepatic sinusoidal obstruction syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(1):11-25.
 72. Coppell JA, Brown SA, Perry DJ. Veno-occlusive disease: cytokines, genetics, and haemostasis. *Blood Rev.* 2003;17(2):63-70.

73. Richardson PG, Corbacioglu S, Ho VT, Kernan NA, Lehmann L, Maguire C, Maglio M, Hoyle M, Sardella M, Giralt S, Holler E, Carreras E, Niederwieser D, Soiffer R. Drug safety evaluation of defibrotide. *Expert Opin Drug Saf.* 2013;12(1):123-36.
74. Benimetskaya L, Wu S, Voskresenskiy AM, Echart C, Zhou JF, Shin J, Iacobelli M, Richardson P, Ayyanar K, Stein CA. Angiogenesis alteration by defibrotide: implications for its mechanism of action in severe hepatic veno-occlusive disease. *Blood.* 2008;112(10):4343-52.
75. DeLeve LD, Shulman HM, McDonald GB. Toxic injury to hepatic sinusoids: sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease). *Semin Liver Dis.* 2002;22(1):27-42.
76. Nadir Y, Brenner B. Thrombotic and Hemorrhagic Complications Associated With Stem Cell Transplantation 2016 [Available from: <https://oncohemakey.com/thrombotic-and-hemorrhagic-complications-associated-with-stem-cell-transplantation/>].
77. Dignan FL, Wynn RF, Hadzic N, Karani J, Quaglia A, Pagliuca A, Veys P, Potter MN. BCSH/BSBMT guideline: diagnosis and management of veno-occlusive disease (sinusoidal obstruction syndrome) following haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2013;163(4):444-57.
78. Corbacioglu S, Cesaro S, Faraci M, Valteau-Couanet D, Gruhn B, Rovelli A, Boelens JJ, Hewitt A, Schrum J, Schulz AS, Muller I, Stein J, Wynn R, Greil J, Sykora KW, Matthes-Martin S, Fuhrer M, O'Meara A, Toporski J, Sedlacek P, Schlegel PG, Ehlert K, Fasth A, Winiarski J, Arvidson J, Mauz-Korholz C, Ozsahin H, Schrauder A, Bader P, Massaro J, D'Agostino R, Hoyle M, Iacobelli M, Debatin KM, Peters C, Dini G. Defibrotide for prophylaxis of hepatic veno-occlusive disease in paediatric haemopoietic stem-cell transplantation: an open-label, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet.* 2012;379(9823):1301-9.
79. Palmer KJ, Goa KL. Defibrotide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in vascular disorders. *Drugs.* 1993;45(2):259-94.
80. Richardson PG, Carreras E, Iacobelli M, Nejadnik B. The use of defibrotide in blood and marrow transplantation. *Blood Adv.* 2018;2(12):1495-509.
81. Falanga A, Vignoli A, Marchetti M, Barbui T. Defibrotide reduces procoagulant activity and increases fibrinolytic properties of endothelial cells. *Leukemia.* 2003;17(8):1636-42.
82. Cella G, Sbarai A, Mazzaro G, Motta G, Carraro P, Andreozzi GM, Hoppensteadt DA, Fareed J. Tissue factor pathway inhibitor release induced by defibrotide and heparins. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2001;7(3):225-8.
83. Coccheri S, Biagi G, Legnani C, Bianchini B, Grauso F. Acute effects of defibrotide, an experimental antithrombotic agent, on fibrinolysis and blood prostanoids in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1988;35(2):151-6.
84. Mitsiades CS, Rouleau C, Echart C, Menon K, Teicher B, Distaso M, Palumbo A, Boccadoro M, Anderson KC, Iacobelli M, Richardson PG. Preclinical studies in support of defibrotide for the treatment of multiple myeloma and other neoplasias. *Clin Cancer Res.* 2009;15(4):1210-21.
85. Palomo M, Mir E, Rovira M, Escolar G, Carreras E, Diaz-Ricart M. What is going on between defibrotide and endothelial cells? Snapshots reveal the hot spots of their romance. *Blood.* 2016;127(13):1719-27.
86. Bianchi G, Barone D, Lanzarotti E, Tettamanti R, Porta R, Moltrasio D, Cedro A, Salvetti L, Mantovani M, Prino G. Defibrotide, a single-stranded polydeoxyribonucleotide acting as an adenosine receptor agonist. *Eur J Pharmacol.* 1993;238(2-3):327-34.
87. Chopra R, Eaton JD, Grassi A, Potter M, Shaw B, Salat C, Neumeister P, Finazzi G, Iacobelli M, Bowyer K, Prentice HG, Barbui T. Defibrotide for the treatment of hepatic veno-occlusive disease: results of the European compassionate-use study. *Br J Haematol.* 2000;111(4):1122-9.

88. Eissner G, Multhoff G, Gerbitz A, Kirchner S, Bauer S, Haffner S, Sondermann D, Andreesen R, Holler E. Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide. *Blood*. 2002;100(1):334-40.
89. Mastaglio S, Peccatori J, Bernardi M, Clerici D, Crotta A, Messina C, Assanelli A, Corti C, Lupo Stanghellini MT, Marcatti M, Bonini C, Ciceri F. Pharmacokinetics of ATG-Fresenius S in Patients undergoing allogeneic stem cell transplantation: implications for adoptive immunotherapy. Paper presented at: 35th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation; March 28-April 1, 2009; Göteborg, Sweden.
90. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5.
91. Carpentier G, Martinelli M, Courty J, Cascone I, editors. *Angiogenesis Analyzer for ImageJ*. 4th ImageJ User and Developer Conference proceedings; 2012; Mondorf-les-Bains, Luxembourg.
92. Remberger M, Sundberg B. Rabbit-immunoglobulin G levels in patients receiving thymoglobulin as part of conditioning before unrelated donor stem cell transplantation. *Haematologica*. 2005;90(7):931-8.
93. Bucak YY, Erdurmus M, Terzi EH, Kukner A, Celebi S. Inhibitory effects of topical cyclosporine A 0.05% on immune-mediated corneal neovascularization in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013;251(11):2555-61.
94. Jousen AM, Kruse FE, Volcker HE, Kirchhof B. Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1999;237(11):920-7.
95. Wolschke C, Zabelina T, Ayuk F, Alchalby H, Berger J, Klyuchnikov E, Pein UM, Schumacher S, Amtsfeld G, Adjalle R, Wortmann F, Lellek H, Randenborgh A, Zander A, Kroger N. Effective prevention of GVHD using in vivo T-cell depletion with anti-lymphocyte globulin in HLA-identical or -mismatched sibling peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(1):126-30.
96. Apperley JF, Mauro FR, Goldman JM, Gregory W, Arthur CK, Hows J, Arcese W, Papa G, Mandelli F, Wardle D, Gravett P, Franklin IM, Bandini G, Ricci P, Tura S, Iacone A, Torlontano G, Heit W, Champlin R, Gale RP. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: importance of a graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol*. 1988;69(2):239-45.
97. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75(3):555-62.
98. Remberger M, Svahn BM, Hentschke P, Lofgren C, Ringden O. Effect on cytokine release and graft-versus-host disease of different anti-T cell antibodies during conditioning for unrelated haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1999;24(8):823-30.
99. Westphal S, Brinkmann H, Kalupa M, Wilke A, Seitz-Merwald I, Penack O. Anti-tumor effects of anti-T-cell globulin. *Exp Hematol*. 2014;42(10):875-82.
100. Ruijtenberg S, van den Heuvel S. Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle*. 2016;15(2):196-212.
101. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Heibel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. 2000;105(1):71-7.
102. Murata H, Janin A, Leboeuf C, Soulier J, Gluckman E, Meignin V, Socie G. Donor-derived cells and human graft-versus-host disease of the skin. *Blood*. 2007;109(6):2663-5.
103. Jiang S, Walker L, Afentoulis M, Anderson DA, Jauron-Mills L, Corless CL, Fleming WH. Transplanted human bone marrow contributes to vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(48):16891-6.

104. Gottfried E, Kreutz M, Haffner S, Holler E, Iacobelli M, Andreesen R, Eissner G. Differentiation of human tumour-associated dendritic cells into endothelial-like cells: an alternative pathway of tumour angiogenesis. *Scand J Immunol.* 2007;65(4):329-35.
105. Koehl GE, Geissler EK, Iacobelli M, Frei C, Burger V, Haffner S, Holler E, Andreesen R, Schlitt HJ, Eissner G. Defibrotide: an endothelium protecting and stabilizing drug, has an anti-angiogenic potential in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther.* 2007;6(5):686-90.
106. Nakamura K, Hatano E, Narita M, Miyagawa-Hayashino A, Koyama Y, Nagata H, Iwaisako K, Taura K, Uemoto S. Sorafenib attenuates monocrotaline-induced sinusoidal obstruction syndrome in rats through suppression of JNK and MMP-9. *J Hepatol.* 2012;57(5):1037-43.
107. Fachinformation: Defitelio 80 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung. Stand: 26. Mai 2016. Gentium S.r.l, Villa Guardia, Italien. Zulassungsnummer: EU/1/13/878/001 [Available from: https://www.gelbe-liste.de/produkte/defitelio-80-mg-ml-konzentrat-zur-herstellung-einer-infusionsloesung_839174/fachinformation].
108. Beiras-Fernandez A, Thein E, Chappel D, Gallego R, Fernandez-Roel D, Kemming G, Hammer C. Polyclonal anti-thymocyte globulins influence apoptosis in reperfused tissues after ischaemia in a non-human primate model. *Transpl Int.* 2004;17(8):453-7.
109. Dubey S, Srivastava A, Nityanand S. Induction of apoptosis of peripheral blood mononuclear cells by antithymocyte globulin (ATG) in aplastic anemia: an in vivo and in vitro study. *Ann Hematol.* 2002;81(5):249-53.
110. Werner I, Bogert NV, Stock UA, Moritz A, Beiras-Fernandez A. Dose/time-dependent modulation of the endothelial function through induction agents: non-depleting versus depleting agents. *Transplant Proc.* 2014;46(9):2953-6.
111. Luft T, Dietrich S, Falk C, Conzelmann M, Hess M, Benner A, Neumann F, Isermann B, Hegenbart U, Ho AD, Dreger P. Steroid-refractory GVHD: T-cell attack within a vulnerable endothelial system. *Blood.* 2011;118(6):1685-92.
112. Palomo M, Diaz-Ricart M, Carbo C, Rovira M, Fernandez-Aviles F, Martine C, Ghita G, Escolar G, Carreras E. Endothelial dysfunction after hematopoietic stem cell transplantation: role of the conditioning regimen and the type of transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(7):985-93.
113. Mertlitz S, Shi Y, Kalupa M, Grotzinger C, Mengwasser J, Riesner K, Cordes S, Elezkurtaj S, Penack O. Lymphangiogenesis is a feature of acute GVHD, and VEGFR-3 inhibition protects against experimental GVHD. *Blood.* 2017;129(13):1865-75.
114. Dietrich T, Bock F, Yuen D, Hos D, Bachmann BO, Zahn G, Wiegand S, Chen L, Cursiefen C. Cutting edge: lymphatic vessels, not blood vessels, primarily mediate immune rejections after transplantation. *J Immunol.* 2010;184(2):535-9.
115. Angeli V, Ginhoux F, Llodra J, Quemeneur L, Frenette PS, Skobe M, Jessberger R, Merad M, Randolph GJ. B cell-driven lymphangiogenesis in inflamed lymph nodes enhances dendritic cell mobilization. *Immunity.* 2006;24(2):203-15.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hannah Lena Hamelmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von Anti-Thymozyten-Globulin und Defibrotid auf die Proliferation, Migration und angiogene Aktivität von Endothelzellen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagungen

Ich möchte mich bei allen Menschen herzlich bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Olaf Penack, der es mir ermöglicht hat, an diesem spannenden Thema zu arbeiten und der mir als Betreuer jederzeit unterstützend mit Ratschlägen und Ideen zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Penack für die Unterstützung und die große Hilfsbereitschaft! Vielen Dank an Aleix, Jörg, Katarina, Martina, Sarah, Steffen, Yu, Sabine und Sandra.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und Paul, die immer für mich da sind und mich stets ermutigen. Und mir dadurch ermöglichen, meine Ziele zu erreichen.

Ein großer Dank gilt auch Janni, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Ebenfalls vielen Dank an meine Geschwister, meine Familie und meine Freunde, die mir liebevoll und unterstützend zur Seite stehen.