

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und
Tumorimmunologie

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1 bei akuter Graft-versus-Host Erkrankung:
Messung von Serumkonzentrationen und funktionelle Analysen**

**Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1 in acute Graft-versus-Host Disease: measurement of
serum concentrations and functional Analysis**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nora Marie Uhlig

aus Potsdam

Datum der Promotion: 03.03.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	IX
Abstract	X
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Allojene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSZT)	- 1 -
1.1.1 Indikationen für allo-HSZT.....	- 2 -
1.1.2 Konditionierung	- 3 -
1.1.3 Komplikationen nach allogener HSZT	- 4 -
1.2 Akute Graft-versus-Host Disease (aGvHD)	- 4 -
1.2.1 Epidemiologie der aGvHD.....	- 4 -
1.2.2 Risikofaktoren für aGvHD	- 5 -
1.2.3 Klinische Manifestation und Stadieneinteilung der aGvHD.....	- 6 -
1.2.4 Pathophysiologie der aGvHD.....	- 7 -
1.2.5 Prävention und Therapie der aGvHD.....	- 8 -
1.3 Angiogenese	- 10 -
1.3.1 Regulation und Mechanismen der physiologischen Angiogenese.....	- 10 -
1.3.2 Pathologische Angiogenese.....	- 13 -
1.3.3 TGF- β -Signalweg und Lrg1	- 14 -
1.3.4 Angiogenese als therapeutisches Target	- 14 -
2 Zielsetzung und Fragestellung	- 16 -
3 Material und Methodik	- 18 -
3.1 Materialien	- 18 -
3.1.1 Patient:innenkollektiv.....	- 18 -
3.1.2 Murines Serum	- 20 -
3.1.3 Zelllinien	- 21 -
3.1.4 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	- 22 -
3.2 Methoden	- 23 -

3.2.1	Serum Assays	- 23 -
3.2.1.1	Humaner Enzymimmunoassay	- 23 -
3.2.1.2	Muriner Enzymimmunoassay	- 24 -
3.2.2	<i>In vitro</i> Assays.....	- 25 -
3.2.2.1	Viabilitäts- und Proliferationsassay	- 25 -
3.2.2.2	Wound-healing Assay	- 26 -
3.2.2.3	Tube-formation Assay.....	- 27 -
3.3	Statistische Planung und Auswertung.....	- 28 -
4	Ergebnisse	- 30 -
4.1	Lrg1-Serumkonzentration nach allo-HSZT	- 30 -
4.1.1	Lrg1-Level im Serum von Mäusen nach allo-HSZT	- 30 -
4.1.2	Untersuchung humaner Serumproben.....	- 31 -
4.1.2.1	Deskriptive Statistik des Patient:innenkollektivs.....	- 32 -
4.1.2.2	Lrg1-Konzentration im Serum von Patient:innen nach allo-HSZT	- 35 -
4.2	Einfluss von Lrg1 auf funktionelle Veränderungen in Endothelzellen.....	- 37 -
4.2.1	Proliferationspotential von Endothelzellen nach Serumstimulation	- 38 -
4.2.2	Zelluläres Migrationspotential nach Serumstimulation	- 40 -
4.2.3	Zelluläres Tube-formation Potential nach Serumstimulation	- 43 -
5	Diskussion	- 45 -
5.1	Lrg1-Serumkonzentration nach allo-HSZT	- 45 -
5.2	Einfluss von Lrg1 auf funktionelle Veränderungen in Endothelzellen.....	- 48 -
5.2.1	Proliferationsverhalten von Zellen unter Lrg1-Stimulation.....	- 48 -
5.2.2	Einfluss von Lrg1 auf das Migrationspotential von Endothelzellen	- 52 -
5.2.3	Tube-formation Potential von Endothelzellen unter Lrg1-Stimulation	- 53 -
5.3	Ausblick.....	- 55 -
6	Literaturverzeichnis.....	- 57 -
	Eidesstattliche Versicherung.....	- 68 -
	Curriculum vitae	- 70 -
	Danksagung.....	- 72 -
	Bescheinigung des akkreditierten Statistikers.....	- 73 -

Abkürzungsverzeichnis

ActRIIA/B	activin receptor IIA/B
aGvHD	acute Graft-versus-Host Disease
ALK	activin receptor like kinase
ALL	akute lymphatische Leukämie
allo-HSZT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
AMHRII	anti-mullerian hormone receptor type 2
AML	akute myeloische Leukämie
ANG1/2	Angiopoetin 1/2
AP	alkalische Phosphatase
APC	antigen presenting cell
ATG	Antithymozytenglobulin
BCA	bicinconinic acid assay
BM	bone marrow
BMP	bone morphogenic proteins
BMPRII	bone morphogenic protein receptor type II
Bu	Busulfan
CD	cluster of differentiation
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CR	complete remission
CRP	C-reaktives Protein
CsA	Cyclosporin A
Cy	Cyclophosphamid
DAMP	danger-associated molecular patterns

DLL4	delta like canonical notch ligand 4
EB	Evans Blue
EBM2-Medium	endothelial cell growth basal medium
EBMT	European Group of Bone Marrow Transplant
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC	endothelial cell
EGFL7	endothelial growth factor like domain multiple 7
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPC	endothelial progenitor cell
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	fluorescent activated cell sorting
Fas	APO-1: apoptosis antigen 1
FasL	Fas-Ligand
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
Flu	Fludarabin
FP-swelling	foodpad swelling
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GGT/ γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
GvT	Graft-versus-Tumor
HCT-CI	haematopoetic cell transplantation comorbidity index
HDMEC	human dermal microvascular endothelial cells
HIF	hypoxia inducible factor
HLA	humanes Leukozytenantigen

HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
hTERT	humane reverse Telomerasetranskriptase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon Gamma
I κ B	inhibitor of Kappa B
JAK	Januskinase
KO	Knockout
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipolysaccharid
Lrg1	leucine rich alpha-2-glycoprotein 1
Lrg1-/-	Lrg1-Knockout
Lrg1-WT	Lrg1-Wildtyp
MAC	myeloablative conditioning
MCECs	murine cardiac endothelial cells
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Mel	Melphalan
MHC	major histocompatibility complex
miHA	minor histocompatibility complex
MM	Multiples Myelom
MMF	Mycophenolat Mofetil
MMP	Matrix-Metalloprotease
MMRD	mismatched related donor
MMUD	mismatched unrelated donor
MPN	Myeloproliferative Neoplasie

MPO	Myeloperoxidase
MRD	matched related donor
MSC	Mesenchymal stem cell
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid
MTX	Methotrexat
MUD	matched unrelated donor
MuMECs	immortalized murine microvascular endothelial cells
NFkB	nuclear factor kappa B
NK Zelle	natürliche Killerzelle
NMAC	non-myeloablative conditioning regime
NOD	nucleotid-binding oligomerization domain
NPARP	nuclear poly adenosine diphosphate-ribose polymerase
Nrp1	neurolipin 1
OD	optische Dichte
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBSC	peripher blood stem cell
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PGC1 α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha
PHD-2	hypoxia inducible prolylhydroxylase 2
PIGF	placental growth factor
RIC	reduced intensity conditioning
ROS	reactive oxygen species
SDF1 α	stromal cell derived factor 1 alpha
Smads	small mothers against decapentaplegic
STAT	signal transducers and activators of transcription

SV40T	simian vacuolating virus 40 T antigen
syn-HSZT	syngene hämatopoetische Stammzelltransplantation
TBI	total body irradiation
TCR	T-cell receptor
TGF- β	transforming growth factor beta
T β RII	transforming growth factor beta receptor II
Tie1/2	tyrosine kinase with immunoglobuline-like and EGF-like domains 1/2
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteases
TLI	total lymphoid irradiation
TLR	toll-like-receptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMNK1-Zellen	immortalized human liver sinusoidal endothelial cells
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRM	treatment related mortality
VCAM-1	vascular cell adhesion protein 1
VE-Cadherin	vascular endothelial cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
WNT	wingless-related integration site
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Indikationen für allo-HSZT im Jahr 2019.....	- 2 -
Abbildung 2. Übersicht über Konditionierungsregime.....	- 3 -
Abbildung 3. Pathophysiologie der aGvHD.	- 8 -
Abbildung 4. Prophylaxe der aGvHD.....	- 9 -
Abbildung 5. Mechanismen der Angiogenese.	- 12 -
Abbildung 6. Lrg1-Enzymimmunoassay für humane Proben.....	- 24 -
Abbildung 7. Analysierte Parameter des Angiogenesis Analyzer.	- 28 -
Abbildung 8. Lrg1-Konzentration im murinen Serum nach HSZT.	- 31 -
Abbildung 9. Verteilung der Grunderkrankungen.	- 33 -
Abbildung 10. Lrg1-Konzentration im Serum von Patient:innen nach allo-HSZT.	- 36 -
Abbildung 11. Einzelgraphen der Patient:innen nach allo-HSZT im Direktvergleich.	- 37 -
Abbildung 12. Proteinquantifizierung mittels BCA.....	- 38 -
Abbildung 13. Proliferationspotential von Endothelzellen nach Serumstimulation.	- 39 -
Abbildung 14. Migrationspotential von Endothelzellen unter Serumstimulation.....	- 42 -
Abbildung 15. Tube-formation Potential von TMNK1-Zellen unter Serumstimulation. ...	- 44 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Stadien- und Gradeinteilung der aGvHD.....	- 7 -
Tabelle 2. Übersicht über Reagenzien.....	- 22 -
Tabelle 3. Übersicht über Verbrauchsmaterialien.....	- 23 -
Tabelle 4. Übersicht über verwendete Geräte.	- 23 -
Tabelle 5. Übersicht über die Stichprobe.	- 32 -
Tabelle 6. Beschreibung der aGvHD- und Kontrollgruppe.	- 34 -

Zusammenfassung

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSZT) ist für viele hämatologische Erkrankungen die einzige kurative Therapieoption. Die akute Graft-versus-Host-Krankheit (aGvHD) ist eine häufige Nebenwirkung der allo-HSZT. Es kommt zur zytotoxischen Alloreaktion von T-Zellen des Spenders auf den Empfängerorganismus, gefolgt von einer mitunter starken Inflammation des Gewebes. Typische Zielorgane der aGvHD sind Haut, Darm und Leber. Aktuell wird die aGvHD mit unspezifischer, immunsuppressiver Therapie behandelt, welche allerdings mit hohem Infektionsrisiko und dem Risiko für Tumorrezidive einhergeht. Aus diesem Grund besteht der Bedarf nach alternativen Therapieoptionen, die spezifischer in die Pathogenese der aGvHD eingreifen und damit ein geringeres Risiko für systemische Nebenwirkungen haben.

Es ist bereits bekannt, dass pathologische Angiogenese eine zentrale Rolle in der Pathogenese der aGvHD spielt. Als ein spezifischer Regulator der pathologischen Angiogenese konnte das Glykoprotein Lrg1 (leucine rich alpha-2-glycoprotein 1) identifiziert werden. Lrg1 ist in die Modulation des TGF- β -Pathways involviert. Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte ich den Einfluss von Lrg1 auf die Entstehung von aGvHD und auf das Angiogeneseverhalten verschiedener Endothelzelllinien (MCECs, MuMECs, TMNK1-Zellen).

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die Lrg1 Konzentration im Serum von Patient:innen nach allo-HSZT mit aGvHD signifikant höher ist, als bei Patient:innen nach allo-HSZT ohne aGvHD. Die Untersuchung des Angiogeneseverhaltens verschiedener Endothelzelllinien unterstreicht die funktionelle Relevanz von Lrg1. Es zeigte sich ein signifikant höheres Migrationspotential unter Stimulation mit Serum von Lrg1-WT-Tieren aus inflammatorischem Setting im Vergleich zu Serum von Lrg1-/- Tieren. Nur in einer der getesteten Endothelzelllinien (MCECs) zeigte sich außerdem eine signifikant gesteigerte Zellproliferation unter Stimulation mit Lrg1-WT-Serum.

Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass:

- Lrg1 während der aGvHD bei Patient:innen hochreguliert ist; und
- die Initiierung proangiogener Signalwege in Endothelzellen durch Lrg1 vermutet werden kann.

Die spezifische Inhibition der pathologischen Angiogenese über den Lrg1 Signalweg könnte daher ein innovativer und klinisch relevanter therapeutischer Angriffspunkt bei aGvHD sein.

Abstract

Allogenic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is the only curative therapy for various hematological diseases. Despite improved conditioning regimes and aGvHD prophylaxis acute Graft-versus-Host Disease remains one of the most frequently observed complications after allo-HSCT. Donor-T-cells induce a cytotoxic reaction towards the recipients' tissue, followed by an occasionally extensive inflammation. Typical target organs of aGvHD are skin, liver, and gastrointestinal tract. By now, aGvHD is treated with unspecific immunosuppressive therapy, which holds high risk of infections and tumor relapse. For this reason, there is a need for alternative therapeutic options that intervene more specifically the pathogenesis of aGvHD, containing less risk of systemic side effects.

It is already known that aGvHD is mostly driven by pathological angiogenesis. As a specific regulator of pathological angiogenesis, the glycoprotein Lrg1 (leucine rich alpha-2-glycoprotein 1) was identified. Lrg1 is involved in modulation of TGF- β -pathway. In this work I further investigated the effect of Lrg1 on the development of aGvHD and the influence of Lrg1 on angiogenesis in different endothelial cell lines (MCECs, MuMECs TMNK1-cells).

In the first part of this process I was able to show significantly higher Lrg1-levels in patients after allo-HSCT who developed aGvHD, compared to patients after allo-HSCT who had not developed aGvHD. The analysis of angiogenesis in different endothelial cell lines emphasizes the functional relevance of Lrg1. Significantly increased migrational potential of all three endothelial cell lines was to be observed in cells stimulated with serum of Lrg1-WT-animals taken of an inflammatory setting, compared to cells stimulated with serum of Lrg1-/- animals. In only one of the tested cell lines (MCECs) significantly increased cell proliferation in cells stimulated with Lrg1-WT-serum could be found, compared to cells stimulated with Lrg1-/- serum.

Our results suggest that:

- Lrg1 is being upregulated during aGvHD in patients; and
- the initiation of proangiogenic pathways in endothelial cells might be supported by Lrg1.

For this reason, the specific inhibition of pathological angiogenesis via Lrg1 signaling could be an innovative and clinically relevant therapeutic target for aGvHD.

1 Einleitung

1.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSZT)

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSZT) nimmt eine zentrale Position in der Therapie hämatologischer Erkrankungen ein und stellt in den meisten Fällen die einzige kurative Therapieoption dar. Ziel ist es, die pathologisch veränderte Hämatopoese einschließlich des Immunsystems der Patient:innen durch hämatopoetische Stammzellen von Spender:innen zu ersetzen. Dadurch kann die langfristige Heilung der Grunderkrankung erreicht werden.(1) Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich bei der Proliferation in stärker differenzierte Tochterzellen und in Tochterzellen mit Stammzeleigenschaften zu teilen. Am Beispiel der hämatopoetischen Stammzellen teilt sich eine multipotente Stammzelle in zwei oligopotente myeloische oder lymphatische Progenitorzellen. Bei Stimulation durch den Stammzellfaktor kommt es zur asymmetrischen Teilung in eine oligopotente Progenitorzelle und eine multipotente Tochterzelle. Diese Fähigkeit wird bei allo-HSZT ausgenutzt, um die pathologisch veränderten Stammzellen der Empfänger:innen durch gesunde Stammzellen von Spender:innen zu ersetzen. Die multipotenten gespendeten Stammzellen sind in der Lage, sich in die verschiedenen myeloischen und lymphatischen Zellen zu differenzieren. Durch die Regenerationsfähigkeit der Stammzellen ergeben sich bei Spender:innen keine dauerhaften Folgen.(2) Die Stammzellen können dabei aus Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut entnommen werden.(1) Anders als bei der autologen Stammzelltransplantation, bei der die Stammzellen den Patient:innen selbst entnommen und später reimplantiert werden, werden bei der allo-HSZT Stammzellen von Spender:innen genutzt. Diese können von verwandten Spender:innen oder Fremdspender:innen stammen.(1) In dieser Arbeit richte ich den Fokus auf die allo-HSZT. Durch die körperfremden, immunkompetenten Stammzellen wird bei den Empfänger:innen Alloreaktivität ausgelöst, die zur Graft-versus-Tumor- (GvT) bzw. Graft-versus-Leukemia-Reaktion (GvL) und damit zur dauerhaften immunologischen Eliminierung der Tumorzellen führt. Zur Vorbereitung der Transplantation muss eine Konditionierung mittels Chemotherapie und/oder Bestrahlung stattfinden (Vgl. 1.1.2). Diese eliminiert Tumorzellen und induziert eine Immunsuppression bei Patient:innen, welche das Engraftment des Stammzelltransplantats ermöglicht.(3)

Beschrieben wurde die Stammzelltransplantation 1957 von E. Donnall Thomas, mit dem Ziel der hämatopoetischen Rekonstitution nach myeloablativer Bestrahlung. Bei nur zwei von sechs Patient:innen war das Engraftment erfolgreich. Innerhalb der ersten einhundert Tage verstarben alle sechs von ihm behandelten Patient:innen. Dies war zurückzuführen auf unzureichendes

Wissen zur Histokompatibilität zwischen Spender:innen und Empfänger:innen.(4) Durch die Entdeckung und Entschlüsselung des humanen Leukozyten-Antigen-Systems (HLA-System), welches die Gene für den major histocompatibility complex (MHC) beinhaltet, konnten in den folgenden Jahrzehnten große Fortschritte in der Stammzellforschung erreicht werden (Vgl. 1.2.2). Im Jahr 1990 wurden weltweit bereits knapp 10.000 Transplantationen durchgeführt. Für diesen Erfolg erhielt E. Donnall Thomas im selben Jahr den Nobelpreis für Medizin.(5) Nach dem Gutachten der European Society for Blood and Bone Marrow Transplantation (EBMT) wurden im Jahr 2019 in Europa 48.501 HSZT durchgeführt, davon 19.798 allo-HSZT.(6)

1.1.1 Indikationen für allo-HSZT

Die allo-HSZT ist für viele hämatologische Erkrankungen die einzige kurative Therapieoption. Die folgende Abbildung zeigt die häufigsten Indikationen für allo-HSZT bei Erwachsenen in Europa im Jahr 2019.(6)

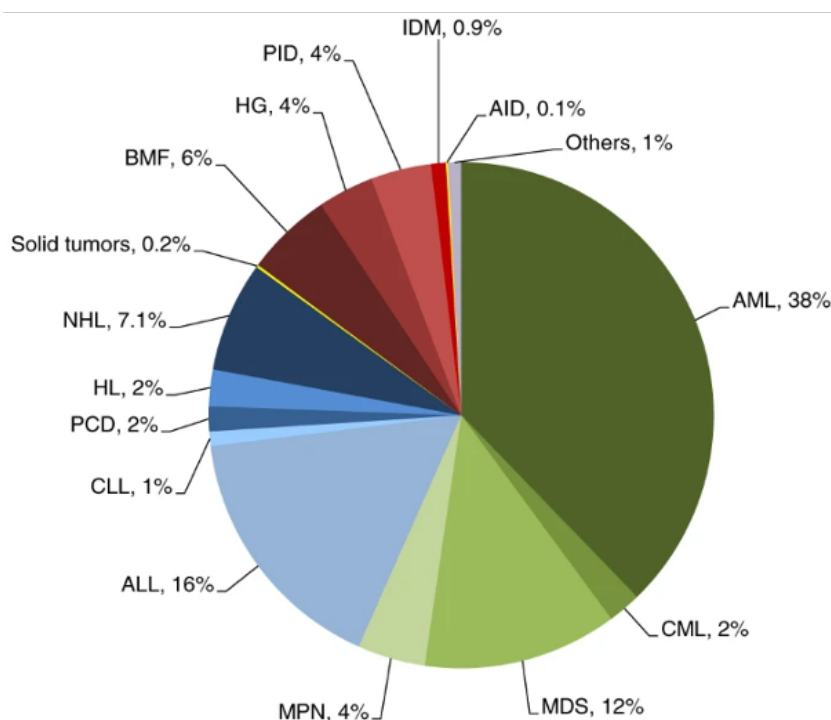


Abbildung 1. Indikationen für allo-HSZT im Jahr 2019.

Übersicht über die Anteile verschiedener Indikationen an der Gesamtheit aller allo-HSZT im Jahr 2019. AML: akute myeloische Leukämie. CML: chronisch myeloische Leukämie. MDS: myelodysplastisches Syndrom. MPN: myeloproliferative Neoplasie. ALL: akute lymphatische Leukämie. CLL: chronische lymphatische Leukämie. PCD: Plasmazelllymphom (plasma cell disorder). HL: Hodgkin-Lymphom. NHL: Non-Hodgkin-Lymphom. BMF: Knochenmarkinsuffizienz (bone marrow failure). HG: Hämoglobinopathien (hemoglobinopathies) PID: primäre Immundefekte (primary immune deficiency). IDM: inhibitorische Stoffwechselstörungen (inhibitory disorders of metabolism). AID: Autoimmunerkrankungen (autoimmune diseases). Quelle: Passweg et al., 2021.(6)

1.1.2 Konditionierung

Vor der allo-HSZT erhalten Patient:innen eine Konditionierungstherapie aus Chemotherapie und/oder Bestrahlung. Diese dient der Eradikation der Tumorzellen und der Suppression des Immunsystems. Die Konditionierung kann in ihrer Intensität variieren. Drei Intensitätsstufen sind zu unterscheiden: myeloablative Konditionierung (MAC; myeloablative conditioning), dosisreduzierte Konditionierung (RIC; reduced intensity conditioning) und minimalintensive, nicht-myeloablative Konditionierung (MIC/NMAC; minimal invasive conditioning/non myeloablative conditioning).(7) Typische Konditionierungsregime sind in Abbildung 2 dargestellt.

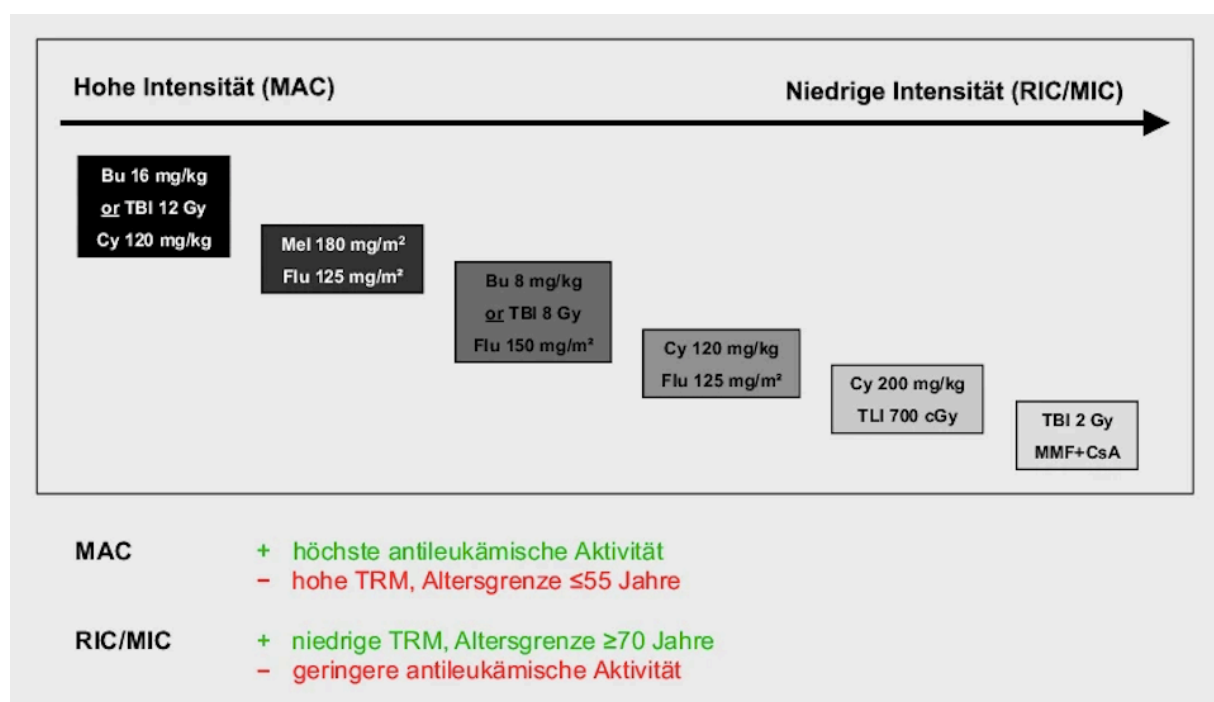


Abbildung 2. Übersicht über Konditionierungsregime.

MAC: myeloablative Konditionierung (myeloablative conditioning). RIC: dosisreduzierte Konditionierung (reduced intensity conditioning). MIC: minimalintensive, nicht-myeloablative Konditionierung (minimal intensive conditioning). TRM: behandlungsassoziierte Mortalität (treatment related mortality). Bu: Busulfan. Cy: Cyclophosphamid. Mel: Melphalan. Flu: Fludarabin. TBI: Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation). TLI: Bestrahlung des lymphatischen Systems (total lymphoid irradiation). MMF: Mycophenolat-Mofetil. CsA: Cyclosporin A. Quelle: Hemmati et al., 2018.(7)

Die Entscheidung für ein Konditionsregime wird individuell je nach Grunderkrankung, Alter und Komorbiditäten der Patient:innen, Art des Stammzellpräparats, Spendentyp und HSZT-Komorbiditätsindex getroffen.(8) MAC weist eine höhere Effektivität in der Bekämpfung leukämischer Zellen auf, geht allerdings durch die Induktion einer irreversiblen Zytopenie auch mit höherer Toxizität einher, sodass überwiegend junge Patient:innen ohne Komorbiditäten von ihr profitieren. NMAC induziert kaum Zytopenie, ist dadurch weniger toxisch und auch für

ältere, multimorbide Patient:innen geeignet. RIC kann zwischen MAC und NMAC eingeordnet werden. Sie induziert abhängig von der Kombination der Zytostatika und der Bestrahlungsintensität variable Zytopenien.(9) Bisher konnten keine generellen Unterschiede in der Wirksamkeit der verschiedenen Konditionierungsregime festgestellt werden, weder in Bezug auf den Krankheitsverlauf und das Überleben der Patient:innen, noch in Bezug auf die Entwicklung einer Graft-versus-Host Disease (GvHD).(8)

1.1.3 Komplikationen nach allogener HSZT

Die Therapie maligner hämatologischer Erkrankungen wurde in den vergangenen Jahren konstant verbessert. Die HSZT ist zurzeit die einzige kurative Therapieoption. Durch Einführung und Individualisierung der Konditionierungsregime und Infektions- und GvHD-Prophylaxe konnte die Zahl der Komplikationen nach HSZT deutlich verringert werden. Trotzdem liegt die 1-Jahres-Überlebensrate nach allo-HSZT bei nur 63%.(10-12) Häufige Komplikationen sind fehlendes Engraftment, Infektionen durch immunsuppressive Konditionierung und GvHD-Prophylaxe und die Entwicklung akuter und/oder chronischer GvHD.(12-15) Aufgrund der großen Relevanz für diese Arbeit wird die akute GvHD in Kapitel 1.2 detaillierter thematisiert.

1.2 Akute Graft-versus-Host Disease (aGvHD)

GvHD ist die häufigste Komplikation nach allo-HSZT und betrifft 30-50% der Patient:innen.(16) Man unterscheidet akute und chronische GvHD. Akute GvHD (aGvHD) beschreibt die Immunreaktion von Donor-T-Zellen auf Zellen des Empfängerorganismus. Die Pathophysiologie der chronischen GvHD ist noch nicht abschließend geklärt. Man vermutet eine verstärkte Antikörperbildung und Reaktion von Donor-T-Lymphozyten auf Alloantigene der Empfänger:innen. Klinisch präsentiert sich die chronische GvHD ähnlich einer Autoimmunreaktion.(16-18) Im Folgenden liegt der Fokus auf der aGvHD.

1.2.1 Epidemiologie der aGvHD

Die Inzidenz der aGvHD nach allo-HSZT beträgt 30-50%, davon sind ca. 15% schwere Verläufe, entsprechend Grad III-IV. Die Langzeitüberlebensrate für Patient:innen mit schweren Verläufen beträgt 30% (aGvHD III°) bzw. <5% (aGvHD IV°), während mildere Verläufe (aGvHD I-II°) mit einem Langzeitüberleben von >80% einhergehen.(19, 20) Die klassische Unterscheidung zwischen akuter und chronischer GvHD erfolgt nach dem Zeitpunkt des Auftretens der aGvHD. Innerhalb der ersten 100 Tage nach allo-HSZT wird GvHD als akut bezeichnet, danach als chronisch. Aufgrund der mittlerweile bekannten persistierenden,

rekurrierenden und late-onset Formen der aGvHD wird die Unterscheidung zwischen akut und chronisch heutzutage überwiegend anhand der klinischen Symptomatik getroffen.(21)

1.2.2 Risikofaktoren für aGvHD

Der größte Risikofaktor für die Entwicklung einer aGvHD ist ein HLA-Mismatch zwischen Spender:in und Empfänger:in. Der HLA-Komplex wird vom major histocompatibility complex (MHC) auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 kodiert und ist reich an Polymorphismen. Die HLA-Proteine dienen der Antigenpräsentation und lassen sich in drei Hauptgruppen einteilen, wobei HLA-III-Proteine nicht an der Antigenpräsentation beteiligt sind. HLA-I-Proteine sind auf jeder kernhaltigen somatischen Zelle sowie auf Thrombozyten vorhanden und präsentieren körpereigene Proteinfragmente. Sie kennzeichnen die Zelle selbst und deren produzierte Proteine als körpereigen und schützen damit vor einer Autoimmunreaktion durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). HLA-II-Proteine werden auf professionell antigenpräsentierenden Zellen (APCs) exprimiert. Sie präsentieren den CD4⁺ T-Zellen extrazelluläre Antigene und regulieren so deren Aktivität. Für die HSZT ist die Übereinstimmung der beiden Allele von HLA-A, HLA-B, HLA-C (kodiert im MHC-I-Komplex) und HLA-DQ und HLA-DR (kodiert im MHC-II Komplex) relevant.(22, 23)

Neben den HLA-Proteinen spielen minor histocompatibility antigens (miHAs) eine Rolle als Risikofaktoren für aGvHD. Diese von intrazellulären Proteinen abstammende Peptide liegen an MHC-Rezeptoren gebunden vor und weisen trotz HLA-Übereinstimmung aufgrund von Polymorphismen und Punktmutationen eine hohe Variabilität auf. Die miHAs können von Donor-T-Zellen erkannt werden und eine Immunreaktion triggern.(22)

Unabhängig von HLA-Genen gibt es weitere genetische Polymorphismen, die das Risiko für aGvHD erhöhen. Hierzu zählen Gene der Zytokinexpression, zum Beispiel Gene für Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), IL-10 und NF κ B. Höhere TNF- α -Expression und niedrigere IL-10-Expression gehen mit vermehrtem Auftreten einer aGvHD einher.(24) Niedrige Konzentrationen von NF κ B durch Polymorphismen im regulierenden NOD2/CARD15 Pathway erhöhen ebenso das Risiko für das Auftreten von aGvHD.(22) Nicht genetisch bedingte Risikofaktoren für aGvHD sind die Kombination aus einer weiblichen Spenderin und einem männlichen Empfänger, das Alter der Empfänger:innen bei allo-HSZT, die Konditionierung mit MAC Regime, unverwandte Spender:innen und eine andere Grunderkrankung als ALL.(19, 25, 26)

1.2.3 Klinische Manifestation und Stadieneinteilung der aGvHD

Die Hauptmanifestationsorte der aGvHD sind Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber. Je nach Schweregrad zeigt sich die Manifestation in einem einzelnen Organ oder in der Kombination mehrerer betroffener Organsysteme.(16, 25, 27-29)

Die Erstmanifestation erscheint häufig als makulopapulöses Exanthem der Haut mit Pruritus, gegebenenfalls mit Blasenbildung und Ulzeration. Histologisch finden sich apoptotische Areale am Übergang von Epidermis zu Dermis mit perivaskulären Lymphozyteninfiltraten.(27, 30)

Hauptsymptome der aGvHD des Gastrointestinaltraktes sind Appetitverlust, Dyspepsie, Übelkeit, Erbrechen, Abdominalschmerz, Gewichtsverlust, sekretorische Diarrhö und gastrointestinale Blutungen durch Reizung der Mukosa mit Ulzeration. Histologisch präsentieren sich apoptotische Areale im Bereich der intestinalen Stammzellen. Infolgedessen kommt es zur Apoptose der Enterozyten und der intestinalen Immunzellen (Paneth-Zellen).(31)

In der Leber präsentiert sich aGvHD mit cholestaseähnlicher Symptomatik. Es kommt zum Anstieg der Cholestaseparameter konjugiertes Bilirubin, alkalische Phosphatase (AP) und Gamma-Glutamyltransferase (γ -GT). Klinisch zeigt sich ein Ikterus, Hepatosplenomegalie, acholischer Stuhl, dunkler Urin und im Verlauf Pruritus. Histologisch sind analog zur aGvHD der Haut und des Gastrointestinaltraktes ebenfalls perivaskuläre Lymphozyteninfiltrate, Apoptose in biliären Kompartimenten sowie Pericholangitis nachweisbar.(32)

Die Stadieneinteilung der aGvHD richtet sich nach der Schwere der Betroffenheit von Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt. Letzterer wird noch einmal in oberen und unteren Gastrointestinaltrakt unterteilt. Jedes betroffene Organ wird einem Stadium von 1-4 zugeteilt. Aus den Stadien der einzelnen Organe lässt sich dann ein Gesamtgrad I-IV der aGvHD bestimmen, wobei 0 keiner und IV der schwersten Ausprägung der aGvHD entspricht (Vgl. Tab. 1).(33, 34)

Ausmaß der Organmanifestation				
Haut	Leber	oberer Gastrointestinaltrakt	unterer Gastrointestinaltrakt	
<i>Stadium</i>				
0	Kein aktiver erythematöser Ausschlag	Bilirubin <2mg/dl	Keine/intermittierende Nausea/Emesis	Diarrhoe <500ml/d oder <3 Episoden/d
1	Ausschlag <25% der Hautoberfläche	Bilirubin 2-3 mg/dl	Persistierende Nausea/Emesis	Diarrhoe 500-999ml/d oder 3-4 Episoden/d
2	Ausschlag 25-50% der Hautoberfläche	Bilirubin 3-6 mg/dl		Diarrhoe 1000-1500ml/d oder 5-7 Episoden/d
3	Ausschlag >50% der Hautoberfläche	Bilirubin 6-15 mg/dl		Diarrhoe >1500 ml/d oder >7 Episoden/d
4	Generalisierte Erythrodermie, Blasenbildung, Schuppung	Bilirubin >15 mg/dl		schwere abdominale Schmerzen, Ileus, Stuhlveränderungen
<i>Grad</i>				
0	Keine Organmanifestation			
I	Stadium 1-2	keine Beteiligung	keine Beteiligung	keine Beteiligung
II	Stadium 3	Stadium 1	Stadium 1	Stadium 1
III	Stadium 0-3	Stadium 2-3	Stadium 0-1	Stadium 2-3
IV	Stadium 4	Stadium 4	Stadium 0-1	Stadium 4

Tabelle 1. Stadien- und Gradeinteilung der aGvHD.

Tabellarische Darstellung der Stadien- und Gradeinteilung der aGvHD. d: Tag (day). dl: Deziliter. ml: Milliliter. Quelle: Harris et al., 2016.(33) Strong Rodrigues et al., 2018.(34)

1.2.4 Pathophysiologie der aGvHD

Die Pathophysiologie der aGvHD lässt sich in drei Phasen einteilen (Vgl. Abb. 3.).

1. Afferente Phase: Durch die Zytotoxizität des Konditionierungsregimes kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-1), danger associated molecular patterns (DAMPs) aus apoptotischen intestinalen Zellen und pathogene associated molecular patterns (PAMPs) aus dem Darmmikrobiom. Diese können durch die geschädigte Mukosa in die Blutzirkulation eintreten. APCs werden durch den anfänglichen Zytokinsturm aktiviert und präsentieren Alloantigene auf ihrer Oberfläche.(22, 35)
2. Efferente Phase: Donor-T-Zellen werden durch die auf den APCs präsentierten Alloantigene und durch zirkulierende Zytokine aktiviert. Es folgt das Priming und der Stimulus zur Proliferation. Die aktivierten T-Zellen produzieren in hohem Maße IL-2 und IFN- γ . IL-2 stimuliert die aktivierten T-Zellen sowie die Proliferation und Differenzierung von NK-Zellen, induziert Antikörperbildung in B-Zellen und reguliert die Reifung regulatorischer T-Zellen. IFN- γ stimuliert die zelluläre Immunabwehr vor allem in Makrophagen, steigert die Expression von MHC-I/II-Proteinen auf der Oberfläche von APCs und induziert den Klassenwechsel von IgM- zu IgG-Antikörpern.(22, 35)
3. Effektorphase: Die aktivierten zytotoxischen Donor-T-Zellen sowie die zelluläre und humorale Immunantwort führen im Empfängerorganismus zu Zell- und Endorganschäden. Die Mechanismen der Gewebeschädigung werden vermittelt durch Fas-Rezeptor/Fas-Ligand Interaktion, Perforin-Granzym-B und direkte Zytokineffekte.(22, 35)

Fas-Ligand wird auf aktivierten zytotoxischen T-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen exprimiert, während Fas-Rezeptor auf aGvHD-Zielgewebe ausgebildet wird. Eine Interaktion von Ligand und Rezeptor löst Apoptose aus.(36)

Granzym-B wird aus zytotoxischen T-Zellen freigesetzt, gelangt über Endozytose in die Zielzelle und induziert dort die Fragmentierung der DNA und damit Apoptose.(37)

Direkte Zytokineffekte sind vor allem ausgelöst durch TNF- α . TNF- α aktiviert APCs, induziert Chemokinausschüttung, rekrutiert weitere Immunzellen und induziert auf direktem Weg die Apoptose der Zielzellen.(38)

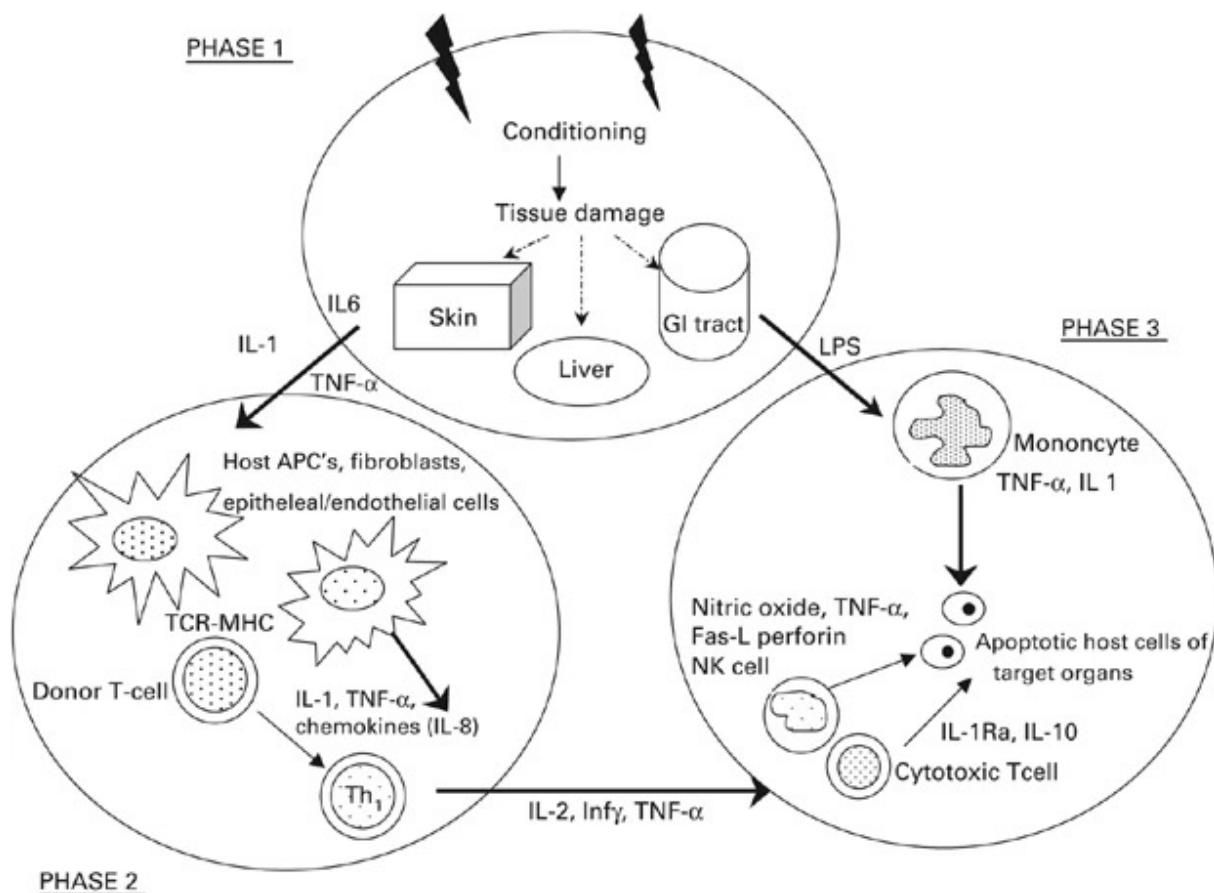


Abbildung 3. Pathophysiologie der aGvHD.

Schematische Darstellung der Pathogenese von aGvHD. IL-1/2/6/8/10: Interleukin 1/2/6/8/10. LPS: Lipopolysaccharide. TNF- α : Tumornekrosefaktor alpha. APC: Antigen präsentierende Zellen (antigen presenting cells). TCR: T-Zell-Rezeptor (T-cell receptor). MHC: major histocompatibility complex. Infy: Interferon gamma (IFN- γ). Fas-L: Fas-Ligand. NK-cell: Natürliche Killerzelle (natural killer cell). GI-tract: Gastrointestinaltrakt (gastrointestinal tract). Quelle: Ball et al., 2008.(22)

1.2.5 Prävention und Therapie der aGvHD

Eine medikamentöse GvHD Prophylaxe vor allo-HSZT soll das Risiko für die Entstehung einer GvHD verringern. Einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Prophylaxe haben die Grunderkrankung, das Alter der Empfänger:innen zum Zeitpunkt der HSZT, die HLA-

Kompatibilität und das individuelle aGvHD-Risiko (Vgl. Abb. 4). Etabliert ist die Kombination eines Calcineurininhibitors (Cyclosporin A, Tacrolimus) mit Methotrexat (MTX) oder Mycophenolat-Mofetil (MMF). Zusätzlich kann bei erhöhtem Risiko Antithymozytenglobulin eingesetzt werden.(15, 39)

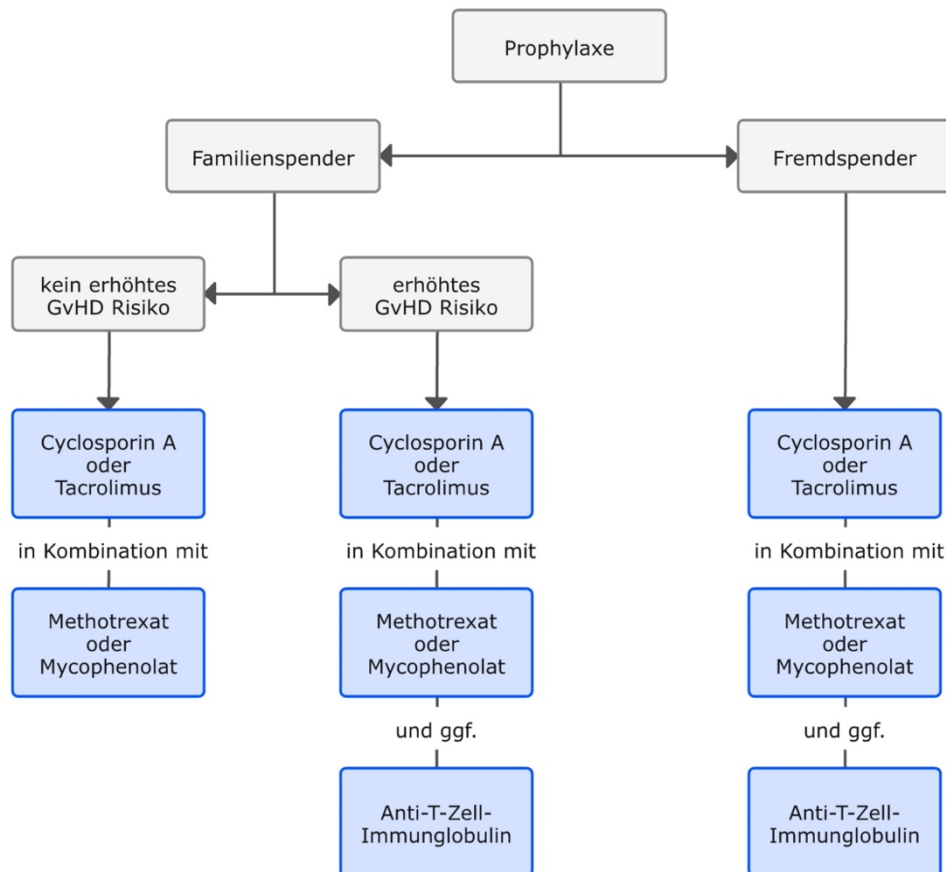


Abbildung 4. Prophylaxe der aGvHD.

Schematische Darstellung der Auswahl der medikamentösen GvHD-Prophylaxe. GvHD: Graft-versus-Host Erkrankung (Graft-versus-Host Disease). Quelle: Zeiser et al., 2020.(39)

Die systemische Therapie der aGvHD geht immer mit intensivierter Immunsuppression und damit einem erhöhten Infektionsrisiko einher. Daher wird die systemische Therapie erst ab aGvHD II° eingeleitet. Die aGvHD I° spricht in der Regel gut auf topische Therapie mit Glucocorticoiden an.(15, 40)

Die Erstlinientherapie für aGvHD II-IV° ist neben der Fortführung der GvHD-Prophylaxe die systemische Glucocorticoidtherapie. Glucocorticoide haben durch die Inhibition von NFκB eine breite immunmodulatorische Wirkung. Mittel der Wahl sind Methylprednisolon oder Prednisolon in Kombination mit topischer Therapie und supportiven Maßnahmen.(39, 40) Es gibt keine standardisierte Empfehlung für die Zweitlinientherapie bei fehlendem Ansprechen

auf systemische Glucocorticoide. Mögliche Therapieoptionen sind TNF- α -Inhibitoren wie Etanercept, mTOR-Inhibitoren, Antimetabolite, Kinaseinhibitoren, monoklonale Antikörper und α 1-Antitrypsin.(15, 39-41)

1.3 Angiogenese

Angiogenese beschreibt den Prozess der Differenzierung und des Remodellings von Gefäßsystemen. Angiogenese ist ein physiologischer Prozess mit hoher Relevanz für Wachstum und Wundheilung, ist aber auch maßgeblich an Pathologien wie Inflammation und Tumorerkrankungen beteiligt.(42-44)

Ein der Angiogenese in der Regel vorausgehender Prozess ist die Vaskulogenese. Vaskulogenese beschreibt die Neubildung von Gefäßsystemen aus Angioblasten und hämatopoetischen Stammzellen und ist primär in der Embryogenese von Bedeutung. Obwohl Vaskulogenese ein überwiegend embryonaler, primitiver Prozess ist, kann sie im Rahmen verschiedener Erkrankungen auch im adulten Organismus stattfinden.(44)

Vaskulogenese und Angiogenese stehen in engem Zusammenhang miteinander, wobei die klinische Relevanz der Angiogenese im Hinblick auf mögliche therapeutische Angriffspunkte im Vordergrund steht.(45) Im Rahmen dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Rolle der Angiogenese in der Pathophysiologie der aGvHD.

1.3.1 Regulation und Mechanismen der physiologischen Angiogenese

Physiologisch liegen die Endothelzellen im Ruhezustand vor und haben eine niedrige Proliferationsrate. Durch autokrine Sekretion von vascular endothelial growth factor (VEGF), Notch, angiopoietin-1 (ANG1) und fibroblast growth factors (FGFs) schützen sich die Endothelzellen selbst vor Schädigung und Apoptose. Die Zellen bilden eine Einzelzellschicht auf der Innenseite aller Gefäße aus, je nach Gewebe mit Unterschieden im Aufbau und in der Dichtigkeit. Tight junctions und Zonulae adhaerens, bestehend aus VE-cadherinen und Claudinen, bilden die Verbindungen zwischen den einzelnen Zellen und regulieren die Dichtigkeit des Zellverbandes. Die Endothelzellen sind umgeben von Perizyten, welche ebenfalls VEGF und ANG-1 sezernieren. Die Zell-Zell-Kontakte zu den Perizyten sowie die Stimulation durch VEGF und ANG-1 stellen einen Überlebensstimulus für die Endothelzellen dar und hemmen gleichzeitig deren Proliferation.(46)

Kommt es zu einem Zustand, in dem die Neubildung von Gefäßstrukturen notwendig ist, beispielsweise in der Wundheilung, bildet sich ein Ungleichgewicht der oben genannten Faktoren zugunsten proangiogener Stimuli aus. Durch zirkulierende proangiogene Zytokine

kommt es zur Vasodilatation und Erhöhung der Permeabilität der tight junctions und Zonulae adhaerens. Immunzellen, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine migrieren in den Extravasalraum. Die Endothelzellen werden aus ihrem Ruhezustand aktiviert und die umliegende Extrazellulärmatrix wird aufgebrochen. Durch Proliferation und Migration der aktivierten Endothelzellen kommt es zur Neuorganisation und Formung eines neuen Lumens. Dafür agiert die Endothelzelle mit der höchsten Exposition gegenüber proangiogenen Faktoren als Tip-Zelle. Diese führt die Zellmigration in Richtung des Angiogenesesignals an. Die Nachbarzellen der Tip-Zellen werden zu Stalk-Zellen mit hohem Proliferationspotential. Sie bilden neues Endothel hinter den Tip-Zellen und formen ein Lumen. Die Endothelzellen werden wieder von Perizyten umschlossen und treten erneut in den Ruhezustand ein (Vgl. Abb. 5).(46)

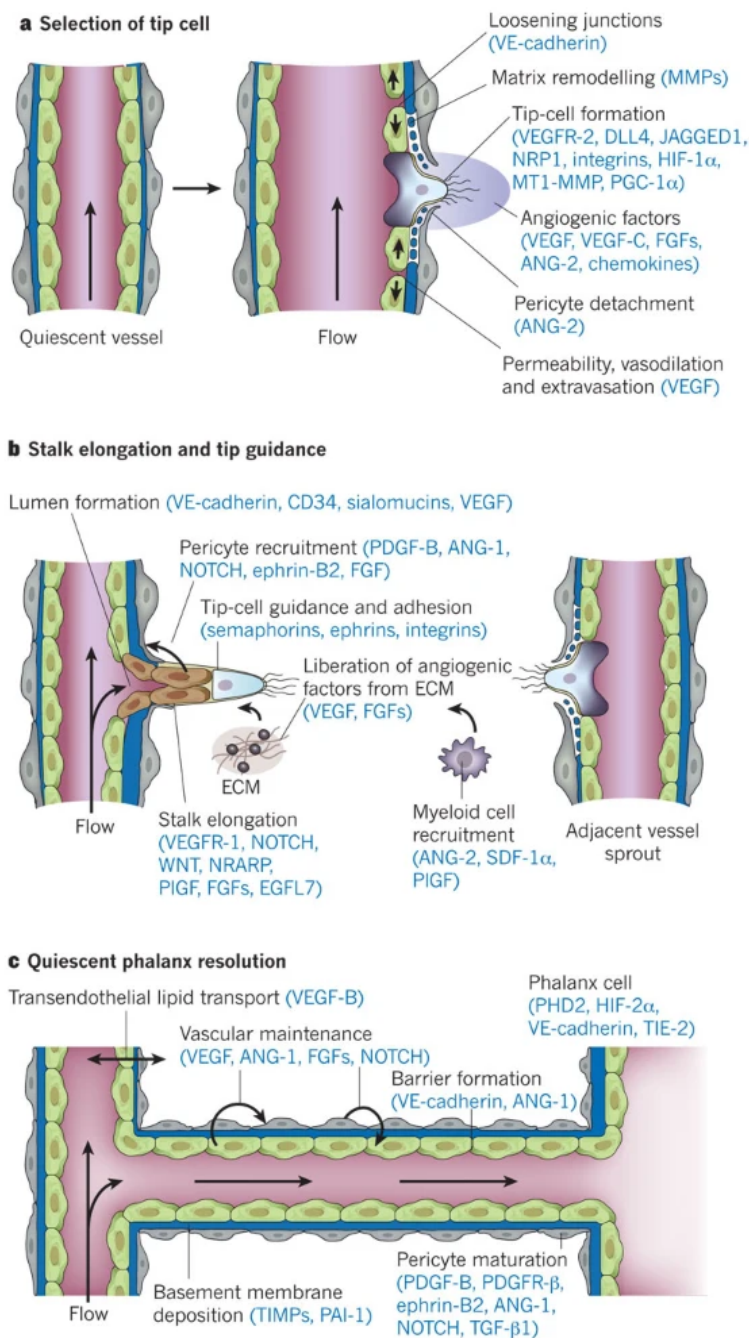


Abbildung 5. Mechanismen der Angiogenese.

Schematische Darstellung des Ablaufs der Angiogenese. a: Selektion der Tip-Zelle. b: Ausdehnung des Zellverbandes durch Stalkzellen hinter führenden Tip-Zellen. c: Formung eines Lumens und Rückkehr in den Ruhezustand. MMPs: Matrix-Metalloproteasen. VEGF: vascular endothelial growth factor. VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-Rezeptor). DLL4: delta like canonical notch ligand 4. Nrp1: neuropilin 1. HIF-1/2 α : hypoxia induced factor 1/2 α . PGC1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α . FGF: fibroblast growth factor. ANG-1/2: Angiopoetin 1/2. NPARP: nuclear poly adenosine diphosphate-ribose polymerase. PIGF: placental growth factor. EGFL7: endothelial growth factor like domain multiple 7. SDF-1 α : stromal cell derived factor 1 α . PHD-2: hypoxia inducible prolylhydroxylase 2. Tie2: tyrosin protein kinase receptor 2. PAI-1: plasminogen activator inhibitor 1. PDGF: platelet derived growth factor. PDGFR: platelet derived growth factor receptor. Quelle: Carmeliet et al. 2011.(46)

1.3.2 Pathologische Angiogenese

Im adulten Organismus ist die dysregulierte Angiogenese ein treibender Faktor für die Entstehung und den Progress von Inflammation, Tumorerkrankungen und ischämischen Ereignissen.(44, 47)

Inflammation kann durch pathogene Erreger, Gewebeschädigung, toxische Schädigung oder Strahlung ausgelöst werden. Die Entzündung ist dabei die Reaktion auf einen Stimulus und dient dessen Eliminierung. Durch die Gewebeschädigung werden vasoaktive Mediatoren aus Endothelzellen und extrazellulärer Matrix freigesetzt. Diese induzieren Hyperperfusion und steigern die Gefäßpermeabilität, sodass rekrutierte Immunzellen, insbesondere Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, in den Extravasalraum migrieren können. Monozyten und M2-Makrophagen induzieren dabei pathologische Angiogenese bei Inflammation, während tumorassoziierte Makrophagen und dendritische Zellen eher bei tumorassoziiierter Angiogenese vordergründig sind. Diese verstärken wiederum die Entzündungsreaktion und induzieren vermehrt Angiogenese.(47-51)

Neben der Immunzellinfiltration spielt auch Hypoxie eine wichtige Rolle für die Induktion von Angiogenese. Endothelzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche sauerstoffsensitive Hydroxylasen, die an die proangiogenen Transkriptionsfaktoren NFκB und hypoxia inducible factors (HIFs) gekoppelt sind. Beide liegen inaktiv gebunden vor. Hypoxie induziert werden HIF und NFκB aktiviert und können als Transkriptionsfaktoren in den Zellkern translozieren. Dort induzieren sie die Transkription proinflammatorischer und proangiogener Zielgene, welche wiederum für die weitere Rekrutierung von Immunzellen und die Induktion von Angiogenese verantwortlich sind. Hypoxie und Immunzellinfiltration sind im entzündlichen Gewebe sich gegenseitig verstärkende Mechanismen, da die proangiogene Wirkung die angiostatische Wirkung überwiegt. So kommt es vermehrt zu pathologisch gesteigerter und ineffektiver Angiogenese.(51)

Die Beteiligung pathologischer Angiogenese an der Entstehung entzündlicher Erkrankungen wie Retinopathien, rheumatoider Arthritis und in der Wundheilung ist bereits untersucht.(51) Studien konnten nachweisen, dass auch bei der Pathogenese der aGvHD Neovaskularisation stattfindet und entscheidend für den Krankheitsverlauf ist.(51, 52) Riesner et al. konnten zeigen, dass Angiogenese in der frühen Phase der aGvHD im Mausmodell die Inflammation initiiert, und nicht, wie angenommen, eine Folge der Inflammation ist. Dabei wurde ausschließlich in den Zielorganen der aGvHD eine gesteigerte Gefäßdichte, welche der charakteristischen Leukozyteninfiltration vorherging, beobachtet.(52)

1.3.3 TGF- β -Signalweg und Lrg1

Der TGF- β -Signalweg ist ein entscheidender Regulator der Angiogenese. Je nach Zielzelle, deren Aktivitätszustand und Rezeptortyp kann TGF- β sowohl proangiogen als auch angiostatisch wirken. Zur TGF- β -Familie gehören 29 Liganden, darunter Activine, bone morphogenic proteins (BMPs) und TGF- β -Proteine I-III. Die TGF- β -Rezeptoren sind Serin-Threonin-Kinasen und gliedern sich in Rezeptorklasse I (ALK1-7) und II (ActRIIA/B, BMPRII, T β RII und AMHRII). Die durch TGF- β ausgelöste Signalkaskade führt zur Bildung eines Transkriptionsfaktorkomplexes aus intrazellulären Smad-Proteinen, der in den Zellkern transloziert und die Transkription der Zielgene induziert. Durch die verschiedenen Liganden, Rezeptoren und Rezeptorkomplexe, intrazelluläre Kombination von Smadproteinen sowie die Notwendigkeit verschiedener spezifischer Kofaktoren ist der TGF- β -Signalweg hochvariabel in seiner Wirkung.

In Endothelzellen wirkt der Komplex aus TGF- β /ALK1 proangiogen. Die Bildung des TGF- β /ALK1-Komplexes wird maßgeblich gefördert durch das Vorhandensein des Kofaktors Endoglin. Der TGF- β /ALK5-Komplex wirkt antiangiogen und hemmt Proliferation und Migration der Endothelzellen.(53, 54)

Eine entscheidende Rolle in der Regulation des TGF- β -Signalwegs scheint leucine rich alpha-2-glycoprotein 1 (Lrg1) zu spielen. Wang et al. konnten in ihrer Studie im Jahr 2013 zum ersten Mal nachweisen, dass die basale Lrg1-Expression im Mausmodell unter pathologischen Bedingungen stark hochreguliert wird. Lrg1 kann unabhängig von anderen Kofaktoren an ALK5 binden und die antiangiogene Signalkaskade induzieren. Allerdings hat Lrg1 eine höhere Affinität zum Kofaktor Endoglin und fördert die Bildung des proangiogenen Endoglin/ALK1-Rezeptorkomplexes. Dieser wird durch die Bindung von TGF- β stabilisiert, während der Lrg1/ALK5-Komplex durch die Bindung von TGF- β destabilisiert wird. Da Lrg1, TGF- β und Endoglin spezifisch unter pathologischen Bedingungen hochreguliert werden, induziert Lrg1 auf diesem Weg den Wechsel vom angiostatischen zum proangiogenen Signalweg. Die Daten weisen außerdem darauf hin, dass Lrg1 in der physiologischen Angiogenese nur eine untergeordnete Rolle spielt.(55) Diese Tatsache macht Lrg1 zu einem hochrelevanten therapeutischen Angriffspunkt für durch pathologische Angiogenese charakterisierte Erkrankungen, wie Entzündungsprozesse, Tumorerkrankungen und aGvHD.

1.3.4 Angiogenese als therapeutisches Target

Wie in 1.3.3 beschrieben, spielt die Angiogenese eine zentrale Rolle bei inflammatorischen Prozessen und Tumorerkrankungen. Im betroffenen Gewebe ist das Angiogenesepotential

deutlich erhöht, allerdings findet durch vermehrte Entdifferenzierung und gesteigerte Proliferationsrate überwiegend pathologische, insuffiziente Angiogenese statt. Dadurch persistiert der hypoxische Zustand des Gewebes. Dies begünstigt weitere Entdifferenzierung und Inflammation. Durch die erhöhte Gefäßdichte wandern außerdem vermehrt Immunzellen in das betroffene Gewebe ein, die die Organschädigung vorantreiben. Ein therapeutischer Angriffspunkt, um Tumorwachstum und überschießende Inflammation zu hemmen, stellt daher die Inhibition der Angiogenese dar.(56, 57)

Ein therapeutisches Ziel in der proangiogenen Signalkaskade ist die Inhibition von VEGF. Diese soll die Angiogenese hemmen und die Regression bestehender Gefäße fördern. Aufgrund der gesteigerten Freisetzung von VEGF in pathologisch verändertem Gewebe besteht dort eine erhöhte Wirksamkeit der VEGF-Inhibitoren. Allerdings ist VEGF auch in der physiologischen Angiogenese relevant (Vgl. 1.3.1), sodass auch diese von einer Inhibition beeinflusst wird. Unspezifische Angiogeneseinhibition geht immer auch mit einem Risiko für unerwünschte Nebenwirkungen einher. Häufige Nebenwirkungen sind Nephrotoxizität mit Hypertension und Proteinurie, Schädigung des Gastrointestinaltraktes, Thrombophilie, Wundheilungsstörungen und Infektionen.(58, 59)

Es besteht der Bedarf nach spezifischen therapeutischen Angriffspunkten, die überwiegend pathologische Angiogenese induzieren und dementsprechend bei Antagonisierung ein geringeres Nebenwirkungsprofil aufweisen. Ein solches molekulares Ziel könnte Lrg1 sein (Vgl. 1.3.4). Wang et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass die Inhibition von Lrg1 mit einem spezifischen Antikörper die pathologische Angiogenese in der Retina hemmt, ohne die physiologische Angiogenese oder bestehende Gefäße zu beeinträchtigen.(55)

2 Zielsetzung und Fragestellung

Die akute Graft-versus-Host Disease ist mit einer Inzidenz von 30-50% eine der häufigsten Komplikationen nach allo-HSZT und ursächlich für 15-30% aller Todesfälle nach HSZT.(39) Die bisherige Therapie besteht aus präventiver und therapeutischer Immunsuppression, die hauptsächlich die Aktivität der Donor-T-Zellen beeinflusst. Diese Immunsuppression geht allerdings mit einem erhöhten Risiko für opportunistische Infektionen einher. Dementsprechend besteht die Notwendigkeit neuer Therapieoptionen, die spezifischer in die Pathomechanismen der aGvHD eingreifen und so die Inzidenz schwerer systemischer Nebenwirkungen senken.

Ein potenzieller Angriffspunkt neuer Therapien ist die Angiogenesehemmung. Angiogenese wird im Rahmen verschiedener entzündlicher Erkrankungen als Initiator von Entzündungsprozessen beschrieben, sodass eine spezifische Hemmung der Angiogenese ein vielversprechender Therapieansatz in der Behandlung inflammatorischer Erkrankungen ist. Die Beteiligung des Glykoproteins Lrg1 im proangiogenen TGF- β -Pathway konnte von Wang et al. gezeigt werden. Im Mausmodell wurde die zentrale Rolle von Lrg1 im TGF- β -Pathway insbesondere im Rahmen der pathologischen Angiogenese nachgewiesen (Vgl. 1.3.3; Vgl. 1.3.4).(55) Lrg1 konnte als mögliches Schlüsselprotein in der Angiogeneseregulation bei Erkrankungen wie Retinopathie, diabetischer Nephropathie und kolorektalem Karzinom identifiziert werden.(55, 60, 61) Darüber hinaus wurde Lrg1 als Biomarker für entzündliche Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und Sepsis beschrieben.(62-65)

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Aktivierung von Endothelzellen und Angiogenese initiierende Faktoren für die Entstehung der aGvHD sind. Als Folge daraus finden entzündliche Veränderungen in den Zielorganen statt.(52) Aus Experimenten mit *in vivo* HSZT-Mausmodellen unserer Arbeitsgruppe wissen wir, dass Mäuse mit einem Knockout im Lrg1-Gen (Lrg1^{-/-}) nach allo-HSZT signifikant geringere aGvHD-Grade aufweisen als Lrg1-Wildtyp-Mäuse (Lrg1-WT).

Im Rahmen dieser Arbeit ist es mein Ziel, Serum von Mäusen nach syngener und allogener HSZT zu analysieren und deren Lrg1-Level zu bestimmen. Um die klinische Relevanz zu bestätigen, werde ich auch bei Patient:innen nach allo-HSZT die Lrg1-Konzentration im Serum messen. Durch die Bestimmung der Lrg1-Konzentration im murinen und humanen Serum nach

HSZT soll nachgewiesen werden, dass höhere Lrg1-Spiegel nach HSZT mit der Ausbildung von aGvHD im Zusammenhang stehen.

Weiterhin möchte ich in verschiedenen *in vitro* Experimenten zeigen, dass eine erhöhte Lrg1-Serumkonzentration als Teil einer Entzündungskaskade die Aktivität des proangiogenen TGF- β -Pathways steigert und damit Einfluss auf das Angiogenesepotential von Endothelzellen nimmt.

Die Untersuchung des TGF- β -Pathways mit Lrg1 als dessen potenziellen Regulator bei aGvHD schafft die Grundlage für die Identifikation eines neuen therapeutischen Angriffspunkts in der aGvHD-Therapie. Die therapeutische Lrg1-Inhibition würde die spezifische Inhibition der pathologischen Angiogenese bei aGvHD ermöglichen. Der Bedarf nach einem solchen spezifischen Inhibitor pathologischer Angiogenese ist hoch, denn die Angiogeneseinhibition über Hemmung von VEGF bringt durch die unspezifische Wirkung ein hohes Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkungen mit sich.(56, 58, 59) Lrg1 könnte nach aktuellem Wissensstand ein solches Zielprotein für spezifische Angiogenesehemmung sein, sodass die weitere Forschung zu Lrg1 und seiner Wirkung vielversprechend ist.

3 Material und Methodik

3.1 Materialien

Im Folgenden werden alle für die durchgeführten Versuche verwendeten Materialien beschrieben. Hierzu gehören neben Labormaterialien, Reagenzien und Geräten auch biologische Materialien wie das für die Serumanalysen gewonnene Serum von Mäusen und Patient:innen und die in den *in vitro* Experimenten verwendete Zelllinien.

3.1.1 VPatient:innenkollektiv

Die Gewinnung der humanen Serumproben für die Messung der Lrg1-Konzentration wurde von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin genehmigt (Ethikvotum EA4/204/19) und richtet sich nach den Prinzipien der Deklaration von Helsinki. Alle Patient:innen wurden ärztlich aufgeklärt und haben eine schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnet. Im Zeitraum von März 2020 bis November 2020 wurden Serumproben von insgesamt 70 konsekutiv aufgenommenen Patient:innen gesammelt, die aufgrund maligner hämatologischer Grunderkrankungen eine allo-HSZT erhalten haben. Die Blutentnahmen fanden einmal wöchentlich für den gesamten Zeitraum des Krankenhausaufenthalts statt und wurden durch das Pflegepersonal durchgeführt. Anschließend wurden die Blutproben in unserem Labor aufbereitet und jeweils 3x300µl Serum pro Patient:in in Eppendorf Reaktionsgefäßen bei -80°C eingefroren. Die Proben wurden mit dem individuellen Code, dem Abnahmedatum und der Nummer des Prä- bzw. Posttransplantationstages beschriftet.

Für die Aufnahme in die Analyse galten die Einschlusskriterien Volljährigkeit, geplante allo-HSZT bei hämatologischer Erkrankung und das Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung.

Alle Daten wurden auf dem Charité-Datenserver unter Wahrung des Datenschutzes gespeichert. Aus Akten und den vorliegenden Arztbriefen wurden folgende Daten der Patient:innen erhoben und in einer Exceltabelle dokumentiert:

- Personenbezogene Daten: Geburtsdatum, Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, BMI, Datum der Aufnahme und Entlassung.
- Datum der allo-HSZT, Grunderkrankung, Datum der Erstdiagnose, Remissionsstatus.
- Spendentyp, Geschlecht der Spender:innen, Typ des Stammzellpräparates.
- Datum des Beginns der Konditionierung, Konditionierungsregime (RIC, MAC), ATG-Gabe.

- HCT-CI: haematopoetic cell transplantation comorbidity Index. Komorbiditätsindex für HSZT. Dient der Risikoeinschätzung für die HSZT durch Berücksichtigung relevanter Vorerkrankungen der Patient:innen. Ein niedriger Score entspricht niedrigerem Risiko. (66)
- EBMT Risk Score: European Group of Bone Marrow Transplant Risk Score. Dient der Vorhersage des Outcomes der Patient:innen nach Transplantation unter Berücksichtigung des Alters der Empfänger:innen, Geschlecht der Spender:innen, Spendentyp und zeitlichem Abstand zwischen Diagnose und Transplantation. Werte von 0 bis 7, niedriger Score entspricht niedrigem Risiko.(67)
- Karnofsky-Index: Skala von 0 bis 100% zur Einschätzung der Einschränkung der Aktivität und Selbstversorgung von Patient:innen mit Tumorerkrankungen. Skalierung in Zehnerschritten, 100% entspricht keiner Einschränkung, 0% entspricht Tod.(68)
- Art der aGvHD-Prophylaxe (CsA+MMF, CsA+MTX, keine), Datum der aGvHD-Diagnose, aGvHD-Stadium in Haut, Darm und Leber, Steroidsensibilität.
- Reaktivierung einer CMV/EBV-Infektion.
- Tod, Datum des Todes, Todesursache.

Alle Patient:innen erhielten PBSCs und ein Konditionierungsregime in Kombination mit ATG. Von 70 Patient:innen erkrankten insgesamt 28 Patient:innen an aGvHD (I°=18, II°=7, III°=3). In die Analyse eingeschlossen wurden alle Patient:innen mit Grad II und III aGvHD, die im relevanten Zeitraum keine nachgewiesene Infektion hatten. Ein Patient wurde trotz aGvHD II° aus der Analyse ausgeschlossen, da aufgrund des frühen Auftretens der aGvHD (D+4) von einer hyperakuten GvHD ausgegangen werden musste. Daraus ergibt sich eine Gesamtanzahl von n=9 Patient:innen. Den Patient:innen wurde jeweils ein:e Kontrollpatient:in ohne aGvHD zugeordnet. Die Auswahl der Kontrollpatient:innen erfolgte anhand von Alter, Spendentyp, Konditionierungsregime und Art der GvHD-Prophylaxe. Patient:innen, die als Folge der Immunsuppression eine CMV-/EBV-Infektion hatten, wurden als Kontrollpatient:innen ausgeschlossen. Daraus ergibt sich die Gesamtzahl von 18 Patient:innen- und Kontrollproben, deren Lrg1-Konzentration im Serum bestimmt wurde (Vgl. 4.1.2.1).

Von allen 18 eingeschlossenen Personen wurde eine Probe vom Zeitpunkt vor und eine Probe vom Zeitpunkt nach Transplantation analysiert. Die Probe vor Transplantation wurde vom frühesten verfügbaren Zeitpunkt gewählt (D-8 bis D-1), um eine Beeinflussung der Lrg1-Konzentration durch die Konditionierungstherapie möglichst auszuschließen. Eine Blutentnahme vor Beginn der Konditionierung konnte nur in wenigen Fällen gewährleistet werden, da die stationäre Aufnahme in der Regel erst an Tag D-1 oder D0 erfolgte. In der

aGvHD-Gruppe richtete sich die Auswahl der post-Transplantationsprobe nach dem Diagnosedatum der aGvHD. Es wurde die Serumprobe gewählt, die mit dem geringsten Abstand zum Diagnosedatum abgenommen wurde. Im Durchschnitt wurde die Diagnose an D+17 gestellt. Die Entnathmezeitpunkte der post-Transplantationsproben der aGvHD-Gruppe liegen zwischen D+12 und D+27. Entsprechend dazu wurden die post-Transplantationsproben in der Kontrollgruppe zwischen D+17 und D+20 gewählt (Durchschnitt: D+19).

3.1.2 Murines Serum

Für die Messung der Lrg1-Serumkonzentration wurde Serum verschiedener Mausmodelle verwendet (Tierversuchsantrag G0086/17). Serum unbehandelter Lrg1-Wildtyp- (Lrg1-WT) und Lrg1-Knockout-Mäuse (Lrg1-/-) wurde zur Stimulation der Zellen in den *in vitro* Versuchen verwendet. Es handelt sich um heterozygot gezüchtete B6 Mäuse mit Lrg1-Knockout auf einem Allel, sodass bei der Paarung 25% Lrg1-/- Tiere, 25% Lrg1-WT-Tiere und 50% heterozygote Tiere entstehen. Die Mäuse wurden zur Verfügung gestellt von John Greenwood und Stephen E. Moss (Department of Cell Biology, UCL Institute of Ophthalmology, London). Das Serum der unbehandelten Tiere wurde im Rahmen von Paw edema/Foodpad swelling Experimenten (FP-swelling) vor Beginn des Versuches von retroorbital entnommen. Für das FP-swelling Experiment wurden die Tiere mit 0,03mg/kg Buprenorphin und 5% Isofluran analgosediert. Die plantare Seite der Hinterpfoten wurde mit Betadin und 70% Ethanol gereinigt. Die Nadel wurde in der Metatarsalregion inseriert und 25µl Carrageen in die eine sowie 0,9% NaCl als Kontrolle in die zweite Hinterpfote injiziert. Die Dicke der Pfoten wurde vor der Injektion sowie nach 2, 4 und 6 Stunden gemessen und dokumentiert. Nach Beendigung des Versuches wurden die Tiere getötet und die Pfoten für die histologische Untersuchung gesichert.

Für den murinen Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde Serum von aGvHD-induzierten Mäusen im Rahmen eines *in vivo* GvHD-Experimentes genutzt. Die Tiere wurden ab Tag 7 vor HSZT (D-7) mit Busulfan und Cyclophosphamid konditioniert. Die Konditionierung endete an D-3, gefolgt von zwei behandlungsfreien Tagen. Am Tag der Transplantation (D0) wurden Knochenmark (KM) sowie T-Zellen aus der Milz der Spendertiere isoliert und in die Schwanzvene des Empfängertiers injiziert. Als Kontrolle wurde neben der allo-HSZT auch syngene HSZT (syn-HSZT) durchgeführt. Für die syn-HSZT wurden sowohl als Spender als auch als Empfänger B6-Mäuse eingesetzt. Bei der syn-HSZT wurden nur KM-Zellen injiziert, keine T-Zellen.

Für die Transplantation wurde die entsprechende Menge der KM- und T-Zellen nach der Isolierung in 100µl Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline (DPBS) resuspendiert. Die Empfängertiere wurden 10 Minuten unter einer Wärmelampe erwärmt, um die peripheren Gefäße zu erweitern. Dann wurden 100µl KM-Zellsuspension und 100µl T-Zellsuspension in die Schwanzvene injiziert. Mittels Chimerismusanalyse in der FACS-Messung wurde an D+15 das Engraftment kontrolliert. Ein Nachweis von 80-90% Spenderzellen in der CD3+ Fraktion der Spenderblutproben wurde als erfolgreiches Engraftment definiert. Ab D+8 wurde zwei Mal pro Woche der aGvHD-Score nach Cooke et al. erhoben.(69) Dafür wurden Körperhaltung, Fell, Haut, Aktivitätsgrad und Gewichtsverlust auf einer Skala von 0-2 beurteilt. Bei Erreichen eines Gesamtscores von 6 oder einem Score von 2 in einem der Parameter wurde das entsprechende Tier getötet. Das Überleben wurde täglich kontrolliert. Die retroorbitalen Blutentnahmen fanden am Tag der Transplantation (D0), in der Phase der Initiierung der Angiogenese (D+2) und in der Akutphase der aGvHD (D+22) statt.

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei geringen und variierenden Mengen an Serum pro Blutentnahme einzuschätzen und zu sichern, habe ich von allen Seren eine Gesamtproteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure Assay (BCA) durchgeführt (Vgl. 4.2, Abb. 12).(70)

3.1.3 Zelllinien

Für die *in vitro* Versuche unter Stimulation mit murinem Serum habe ich drei verschiedene Endothelzelllinien verwendet:

- MCECs: Immortalized Murine Cardiac Endothelial Cells. Murine, kardiale Endothelzellen, die mit SV40T-Antigen und humaner reverser Telomerasetranskriptase (hTERT) immortalisiert wurden. Sie besitzen normale Endothel Eigenschaften mit Ausbildung dichter tight junctions bei unendlicher Proliferationsfähigkeit.
- MuMECs: Immortalized Murine Microvascular Endothelial Cells. Murine mikrovaskuläre Endothelzellen aus der Haut, die mit der CI-Screening Methode immortalisiert wurden und damit unendliche Proliferationsfähigkeit aufweisen.(71)
- TMNK1-Zellen: Immortalized Human Liver Sinusoidal Endothelial Cells. Humane sinusoidale Leberendothelzellen, die mit SV40T und hTERT immortalisiert wurden und dadurch unendliche Proliferationsfähigkeit besitzen. Sie exprimieren Endothelzellmarker wie Faktor VIII, VEGFR I/II und CD34 und weisen erhöhtes Angiogenesepotential in Matrigel auf.

Die Zellen wurden in Suspension in Freezing-Medium in flüssigem Stickstoff in einer Menge von 10^6 Zellen pro Vial gelagert. Für die Nutzung habe ich die Zellen aufgetaut und in Zellkulturflaschen mit Standard-Nährmedium (DMEM+ 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert. 24 Stunden nach Auftauen der Zellen wurde das Nährmedium erneuert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage passagiert. Dafür habe ich die Zelladhäsion mit Trypsin (MCECs) oder Accutase (MuMECs und TMNK1-Zellen) gelöst, die Reaktion mit Nährmedium gestoppt und die Zellen 5 Minuten bei 1200rpm zentrifugiert. Der Überstand aus Nährmedium und Trypsin/Accutase wurde abgenommen und die Zellen in 5ml frischem Nährmedium resuspendiert. Für die Weiterverwendung in *in vitro* Assays habe ich die Zellen gezählt und in entsprechender Menge ausgesät. Zur weiteren Kultivierung wurde ein Teil der Zellsuspension zusammen mit 12ml frischem Nährmedium erneut im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Arbeit mit Zellen fand unter möglichst kontaminationsfreien Bedingungen in der Zellkulturbench unter Abzug statt.

3.1.4 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die verwendeten Substanzen, Verbrauchsmaterialien und Geräte im Rahmen der Laborarbeit.

Reagenzien	Hersteller	
Accutase- Enzyme Cell Detachment Medium	Invitrogen	Carlsbad, California, USA
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS; PBS)	Gibco; Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Gibco; Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Ethanol	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Fetal calf serum (FCS)	Invitrogen	Carlsbad, California, USA
Matrigel	Corning	Corning, New York, USA
Penicillin/ Streptomycin	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Trypsin 2.5%	Gibco; Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Trypan Blau Lösung 0.4%	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 2. Übersicht über Reagenzien.

Tabellarische Auflistung häufig genutzter Reagenzien. Angaben mit Hersteller und Herstellungsort.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	
BZO Seal Film	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
ELISA Kit for Lrg1 (murine)	Cloud-Clone Corp	Houston, USA
Eppendorff Reaktionsgefäße 0,5ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorff Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Falcons 50ml	VWR	Darmstadt, Deutschland
Falcons 15ml	VWR	Darmstadt, Deutschland
Human Lrg1 ELISA Kit	Abcam	Cambridge, Großbritannien
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Superior Germany	Lauda-Königshofen, Deutschland
PCR 96-Well Platte	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S.	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Trypan Blau Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
TC-Flasche T75, Cell+Bel. Kap	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 24 Well, Cell+F	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 96 Well, Cell+F	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 3. Übersicht über Verbrauchsmaterialien.

Tabellarische Übersicht über häufig genutzte Verbrauchsmaterialien. Angaben mit Hersteller und Herstellungsort.

Gerät	Hersteller	
IncuCyte 2019B	BioScience Inc.	Essen, Deutschland
IncuCyte 2020B	BioScience Inc.	Essen, Deutschland
Heraeus Megafuge 1.0 R	Heraeus	Hanau, Deutschland
Heraeus Pico 17 Zentrifuge	Heraeus	Hanau, Deutschland
Laboratory peristaltic pump PLP 380	behr Labor-Technik	Düsseldorf, Deutschland
Motic AE31 inverted microscope	Motic	Hong Kong, Japan
Tecan infinite 200Pro Platereader	Tecan	Männedorf, Schweiz

Tabelle 4. Übersicht über verwendete Geräte.

Auflistung benutzter Geräte mit Hersteller und Herstellungsort.

3.2 Methoden

Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die verwendeten Methoden. Diese umfassen die Untersuchungen von humanem und murinem Serum sowie die *in vitro* Experimente an Endothelzellen.

3.2.1 Serum Assays

Die Untersuchungen des murinen und humanen Serums auf Lrg1 wurden mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Diese werden nachfolgend im Detail beschrieben.

3.2.1.1 Humaner Enzymimmunoassay

Zur Bestimmung der Lrg1-Serumkonzentration bei Patient:innen nach allo-HSZT habe ich mittels ELISA durchgeführt. Das Testkit stammt von der Firma Abcam© (ab260066) und dient speziell der Detektion von Lrg1 in humanen Proben. Um Ergebnisse im Bereich der Standardkurve zu erhalten, sollten die Serumproben nach Angaben des Herstellers im

Verhältnis 1:10.000 bis 1:320.000 verdünnt werden. Für meine Proben war die größtmögliche Verdünnung von 1:320.000 notwendig. Die Herstellung der Standardreihe erfolgte mit rekombinantem Lrg1, welches vom Hersteller in Pulverform mitgeliefert und vor Gebrauch nach Gebrauchsanweisung gelöst wurde. Standardreihe und verdünnte Proben wurden nun auf die ebenfalls mitgelieferte und vorbeschichtete Platte aufgetragen (50µl/Well). Hinzu kam eine Suspension aus Capture-Antikörper zur Immobilisierung des nachzuweisenden Antigens, in diesem Fall Lrg1, und Detection-Antikörper zur späteren Sichtbarmachung des Antigen-Antikörperkomplexes. Die Nutzung von zwei Antikörpern zur Fixierung und Sichtbarmachung des Antigens wird als Sandwich-ELISA bezeichnet. Nach der Inkubationszeit und dem Auswaschen des Überstandes erfolgte die Zugabe des TMB-Substrates. Die Reaktion des TMB-Substrates mit dem konjugierten Detection-Antikörper führt zur Farbentwicklung. Durch Zugabe der Stop-Lösung wurde die Reaktion gestoppt. Gleichzeitig führt die Zugabe der Stop-Lösung zum Farbumschlag. Dieser ermöglicht die Quantifizierung des Antigens (Lrg1) mittels Messung der optischen Dichte im Microplaterereader bei einer Wellenlänge von 450nm. Die optische Dichte korreliert mit der Menge des vorhandenen Antigens und kann mit Hilfe der Standardkurve in die Lrg1-Konzentration umgerechnet werden.(70)

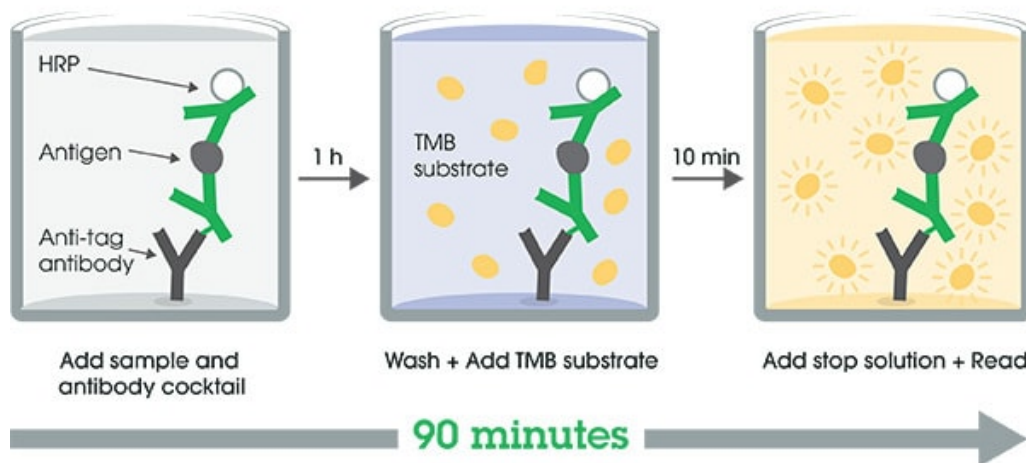


Abbildung 6. Lrg1-Enzymimmunoassay für humane Proben.

Schematische Darstellung der Funktionsweise des ELISA zur Detektion von Lrg1 in humanen Proben. HRP: horseradish peroxidase. TMB: Tetramethylbenzidin. Quelle: Abcam©.(70)

3.2.1.2 Muriner Enzymimmunoassay

Die Lrg1-Konzentration im Serum von aGvHD-Mäusen nach allo-HSZT wurde ebenfalls mit einem ELISA gemessen. Dieser wurde von der Firma Cloudclone© hergestellt (SEB934Mu) und dient dem Nachweis von Lrg1 in murinen Proben. Der Hersteller empfiehlt eine

Verdünnung der Proben von 1:100. Um Ergebnisse im Bereich der Standardkurve zu erhalten, wurden die Proben in diesem Assay in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Das Prinzip ist analog zum Lrg1-ELISA der Firma Abcam© ein Sandwich-ELISA (Vgl. 3.2.1.2).(72)

3.2.2 *In vitro* Assays

Im Folgenden werden die drei durchgeführten *in vitro* Assays beschrieben. Die Methoden sind in unserer Arbeitsgruppe etabliert, die Protokolle wurden als etabliert übernommen und gegebenenfalls an die individuellen Anforderungen des Experimentes angepasst. Die verwendeten Zellzahlen wurden nach vorherigen Versuchen innerhalb der Arbeitsgruppe sowie nach Literaturrecherche ausgewählt und nach ersten Versuchen ebenfalls individuell an das Experiment und die Zellreihe angepasst.

3.2.2.1 Viabilitäts- und Proliferationsassay

Der Viabilitäts- und Proliferationsassay dient der Beurteilung des Überlebens und der Proliferationsrate von Zellen. Der verwendete MTT-Assay folgt dem Prinzip der Metabolisierung eines zugegebenen Substrates durch lebendige Zellen. Der MTT-Assay nutzt die Umwandlung des gelb gefärbten wasserlöslichen MTT-Substrates [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid] in lilafarbenes, wasserunlösliches Formazan. Diese Umwandlung findet durch die mitochondriale Reduktaseaktivität lebendiger Zellen statt. Durch die Zugabe von Hydrochloresäure (HCl) am Ende der Reaktion kann das Formazan aus den Zellen gelöst und die optische Dichte gemessen werden.(73)

In diesem Versuch habe ich die drei zuvor beschriebenen Zelllinien verwendet (Vgl. 3.1.3). Die Zellen wurden nach dem Auftauen kultiviert, sodass sich ausreichend Zellen für den Versuch in der Zellkulturflasche befanden. Die Zellen wurden nun mit Trypsin bzw. Accutase vom Boden der Flasche gelöst, zentrifugiert und das entstandene Zellpallet in 5ml Standard-Nährmedium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und $3 \cdot 10^3$ Zellen pro Well in einer 24-Well Platte für adhäsive Zellen in Nährmedium ausgesät. Pro Zellreihe wurden Zellen in drei Platten ausgesät, da die Proliferation und Viabilität der Zellen zu drei verschiedenen Zeitpunkten gemessen werden sollte. Die Platten wurden nun im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ für 1-2 Stunden inkubiert, bis die Zellen am Boden der Platte angewachsen waren. In dieser Zeit wurden die zwei zu testenden Medien (DMEM mit je 2% Lrg1-WT- bzw. Lrg1-/-Serum) sowie je eine Positiv- und eine Negativkontrolle vorbereitet. Die Positivkontrolle bestand aus 100% Standard-Nährmedium. Ich habe Triplikate für jedes zu testende Medium hergestellt, um mögliche Abweichungen der Zellzahl und im Wachstumsverhalten der Zellen auszugleichen. Nach Anwachsen der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Wells mit PBS gewaschen

und 100µl des Test- bzw. Kontrollmediums pro Well hinzugegeben. Die Platten wurden die nächsten 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach 24, 48 und 72 Stunden habe ich 10µl MTT-Substrat in jedes Well der für den entsprechenden Zeitpunkt vorgesehenen Platte jeder Zellreihe pipettiert und die Zellen erneut 4 Stunden inkubiert, bis die Zellen das MTT-Substrat resorbiert hatten. Dann wurde HCl hinzugegeben und die Zellen noch einmal 2-4 Stunden inkubiert, bis alle Kristalle gelöst und mikroskopisch keine soliden Rückstände erkennbar waren. Die optische Dichte wurde anschließend im Microplatereader bei 560nm gemessen. Der MTT-Assay wurde drei Mal wiederholt und der Mittelwert der Ergebnisse gebildet.

3.2.2.2 Wound-healing Assay

Der Wound-healing Assay (Scratch Assay) dient der Beurteilung der Migrationsfähigkeit von Zellen *in vitro*. In einer Einzelzellschicht wird eine artifizielle Wunde gesetzt. So kann beobachtet werden, mit welcher Geschwindigkeit die Zellen in der Lage sind, diese Wunde durch Proliferation und Migration zu schließen.(74)

Auch den Scratch Assay habe ich mit den drei bereits beschriebenen Zelllinien durchgeführt (Vgl. 3.1.3). Zunächst habe ich die kultivierten Zellen mit Trypsin bzw. Accutase aus der Zellkulturflasche gelöst, zentrifugiert, in frischem Nährmedium resuspendiert und gezählt. Es wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen (MCECs und MuMECs) bzw. $4 \cdot 10^4$ Zellen (TMNK1-Zellen) in Suspension pro Well auf je einer 24-Well-Platte pro Zellreihe ausgesät. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, sodass sie anwachsen und eine geschlossene Einzelzellschicht (Monolayer) auf dem Boden der Wells bilden konnten. Nach der Inkubation habe ich mit einer Pipettenspitze auf dem Boden aller Wells mittig ein Kreuz gesetzt, dieses stellt die artifizielle Wunde dar. Daraufhin wurde das Nährmedium mit losen Zellen abgenommen, die Wells mit DPBS gewaschen und das Test- und Kontrollmedium hinzugegeben (Vgl. 3.2.2.2). Die Platten wurden anschließend für 15 Stunden im Live-Cell-Analyse-System IncuCyte (IncuCyte 2019B, IncuCyte 2020B, Vgl. Tab. 4) inkubiert und alle 3 Stunden fotografiert, um die Zellmigration zu dokumentieren. Der Scratch Assay wurde drei Mal wiederholt, in jedem Assay habe ich für alle Testmedien Triplikate verwendet, um mögliche Abweichungen der Zellzahl oder im Zellwachstum auszugleichen. Die Fotos wurden mit Fiji (ImageJ) ausgewertet. Dazu wurde die offene Fläche der artifiziellen Wunde markiert und gemessen. Die offene Fläche zum Zeitpunkt 0 diente als Referenzwert (100%), zu welchem ich die Fläche der anderen Zeitpunkte in Relation gesetzt habe. Daraus lässt sich eine Kurve

ableiten, die die offene Fläche in Abhängigkeit der Zeit abbildet. Auf diese Weise konnte der Einfluss der Testmedien auf die Zellmigration verglichen werden.

3.2.2.3 Tube-formation Assay

Der Tube-formation Assay dient der Beurteilung der Fähigkeit zur Bildung neuer Gefäßformationen durch Zellen. Die Zellen werden in Matrigel ausgesät. Dieses besitzt Eigenschaften einer extrazellulären Matrix (EZM) und regt die Zellen zur Bildung kapillarähnlicher Strukturen an. Je nach Zugabe verschiedener Nähr- und Testmedien kann der Einfluss des entsprechenden Mediums auf das Angiogenesepotential der Zellen festgestellt werden.(75)

Den Tube-formation Assay habe ich in drei Wiederholungen mit MCECs, MuMECs und TMNK1-Zellen durchgeführt. Aufgrund des ausbleibenden Anwachsens der MCECs und MuMECs in allen drei Versuchen konnte ich diese beiden Zelllinien nicht mit in die Auswertung einbeziehen. Die Auswertung erfolgte nur für die TMNK1-Zellreihe.

Zunächst wurde das Matrigel, welches bei -20°C lagert, unter ständiger Kühlung auf Eis aufgetaut, um frühzeitige Polymerisierung durch zu hohe Temperaturen zu vermeiden. In einer 96-Well Platte habe ich $40\mu\text{l}$ pro Well Matrigel einpipettiert und die Platte für 30 Minuten bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Das Matrigel polymerisiert und nimmt Eigenschaften der EZM an. Die Zellen wurden mit Trypsin bzw. Accutase aus der Zellkulturflasche gelöst, zentrifugiert, resuspendiert und gezählt. Pro Well habe ich $2 \cdot 10^4$ Zellen in Suspension auf dem Matrigel ausgesät. Es folgte eine erneute Inkubation von 15 bis 30 Minuten zum Anwachsen der Zellen. Für alle zu testenden Medien wurden Triplikate erstellt, um Abweichungen der Zellzahl und im Wachstumsverhalten der Zellen auszugleichen. Nach der Inkubation habe ich das Nährmedium abgenommen und $100\mu\text{l}$ Testmedium aufgetragen (Vgl. 3.2.2.3). Mit dem Live-Cell-Analyse-System IncuCyte (Vgl. Tab. 4) wurde das Angiogeneseverhalten der Zellen alle 2 Stunden für die nächsten 5 Stunden fotografisch dokumentiert. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Angiogenesis Analyzer Macro von Fiji (ImageJ). Der Angiogenesis Analyzer analysiert die von den Zellen gebildeten Netzwerke auf verschiedene Charakteristika. Folgende von der Software analysierten Parameter habe ich auf Basis der Literaturrecherche (76-79) in meine Auswertung eingeschlossen (Vgl. Abb. 7):

- *Nodes*: Pixel mit mindestens drei angrenzenden Pixeln. Einheit: Gesamtanzahl in der analysierten Fläche.
- *Junctions*: Gruppierte *Nodes*, die eine Bifurkation ausbilden. Einheit: Gesamtanzahl in der analysierten Fläche.

- *Meshes*: Durch *Junctions* und *Segments* eingeschlossene Fläche. Einheit: Gesamtanzahl in der analysierten Fläche.
- *Segments*: Binäre Linie, die durch zwei *Junctions* begrenzt wird. Einheit: Gesamtanzahl in der analysierten Fläche.
- *Branches*: Binäre Linie, die durch eine *Junction* und eine *Extremity* (Pixel mit einem angrenzenden Pixel) begrenzt wird. Einheit: Gesamtanzahl in der analysierten Fläche.
- *Total length*: Summe der *Branches* und *Segments* pro Bild. Einheit: Pixel.

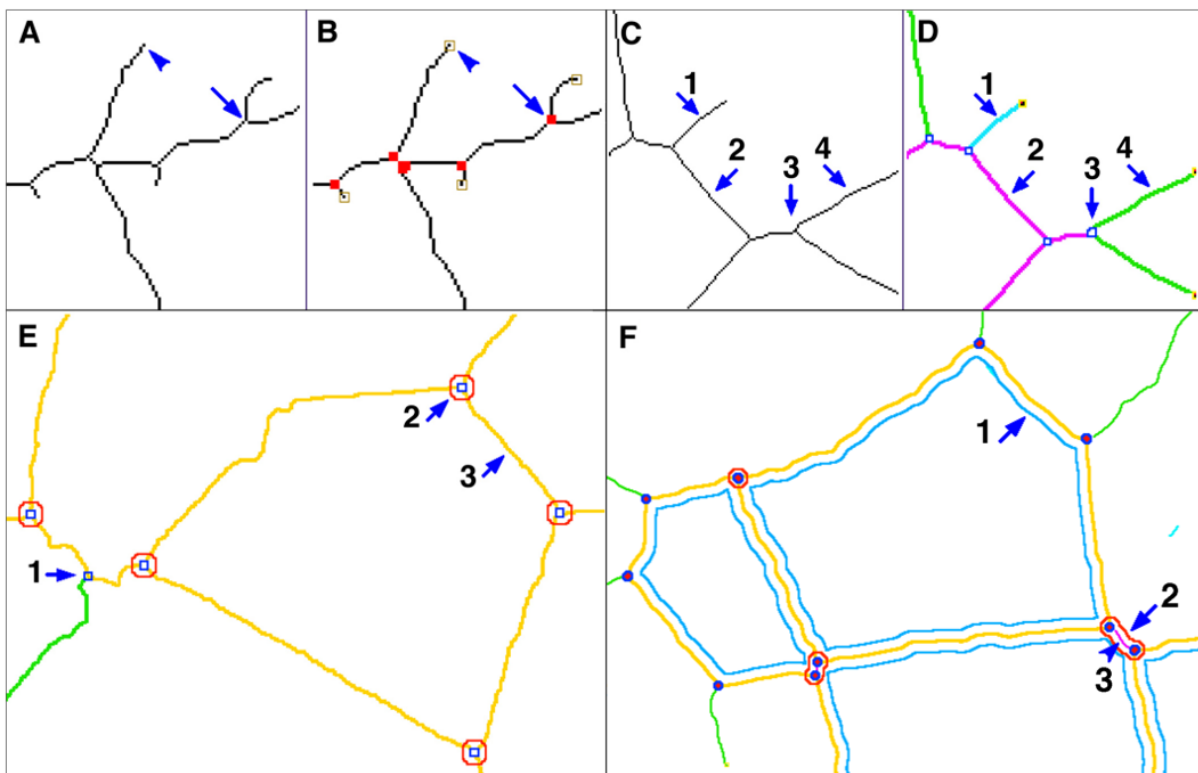


Abbildung 7. Analytierte Parameter des Angiogenesis Analyzers.

A und B: Pfeilköpfe markieren Extremities. Rote Markierung: Nodes (Pixel mit drei oder mehr benachbarten Pixeln). Ganze Pfeile: Bifurkationen. C1 und D1: Twigs (Branches, deren Länge zu kurz ist, um als solche erkannt zu werden). C2 und D2: Segments. C3 und D3: Segments begrenzende Junctions. C4 und D4: Branches. E1: Junction mit einem Branch. E2: Master Junction (Junctions, die mindestens 3 Master Segments verbinden). E3: Master Segment (Segmentabschnitte begrenzt von mindestens 2 Master Junctions, die nicht exklusiv nur einen Branch begrenzen). F: Gesamtes Netzwerk mit seinen Komponenten. Master Segments sind verbunden durch Master Junctions und bilden Meshes (F1). F2 und F3: zwei nah beieinander liegende Master Junctions können fusionieren. Quelle: Carpentier, G. 2012.(80)

3.3 Statistische Planung und Auswertung

Die statistische Beratung erfolgte durch das Institut für Biometrie der Charité. Die Planung der Fallzahl von 70 Patient:innen beruht auf der Effektgrößenabschätzung, da bisher keine Daten zur Lrg1-Expression nach allo-HSZT vorliegen. Eine Stichprobengröße von $n=70$ mit 20%

Dropout hat 80% Leistung, um eine Effektgröße mit 0,381 unter Verwendung eines gepaarten t-Tests mit einem zweiseitigen Signifikanzniveau von 0,013 zu detektieren.

Die statistische Analyse für alle gewonnenen Daten wurde mit einem ungepaarten Student's t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Daten des humanen Lrg1-ELISAs wurden mit dem Student's t-Test für abhängige Stichproben auf Signifikanz getestet, da die Kontrollgruppe an die Patient:innengruppe angepasst wurde, um Vergleichbarkeit zu schaffen. Im Falle des Wound-healing Assays führte ich eine explorative Datenauswertung unter Analyse verschiedener Zeitpunkte durch. Die Auswertung wurde nicht für multiples Testen adjustiert. Die Ergebnisse werden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. Alle statistischen Tests wurden in GraphPad Prism durchgeführt (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA). Auch die Erstellung der Grafiken erfolgte mit GraphPad Prism.

Die statistische Beratung erfolgte durch das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité. Das entsprechende Gutachten des akkreditierten Statistikers liegt dieser Arbeit bei.

4 Ergebnisse

4.1 Lrg1-Serumkonzentration nach allo-HSZT

Um den Zusammenhang zwischen Lrg1 und aGvHD genauer zu untersuchen, wurden Lrg1-Konzentrationen mittels ELISA im murinen und humanen Serum nach allo-HSZT gemessen. Ziel war es, festzustellen, ob die Menge an Lrg1 im Serum nach allo-HSZT in Abhängigkeit von der Entwicklung einer aGvHD variiert. Die folgenden Ergebnisse stellen die Lrg1-Quantifizierung mittels ELISA im Serum von Patient:innen und Mäusen nach allo-HSZT dar.

4.1.1 Lrg1-Level im Serum von Mäusen nach allo-HSZT

Für entzündliche Erkrankungen und Tumorerkrankungen konnte im Mausmodell bereits nachgewiesen werden, dass Lrg1 die Entstehung von Inflammation über Initiierung pathologischer Angiogenese fördert.(52, 55, 60, 61) Um zu untersuchen, ob Lrg1 während der aGvHD hochreguliert wird, wurden Lrg1-Level mittels ELISA im Serum von Mäusen nach allo-HSZT bestimmt. Als Kontrollgruppe diente Serum von Mäusen nach syn-HSZT. Es wurden Serumproben vom Tag der HSZT (D0, prä HSZT) und in der Akutphase der aGvHD (D22, post HSZT) entnommen und analysiert.

Die allo-HSZT-Gruppe wurde mit Mäusen nach syn-HSZT verglichen. Der Vergleich der Lrg1-Konzentrationen im Serum von allo- und syn-transplantierten Tieren zeigte an D0 keinen signifikanten Unterschied. Die Lrg1-Konzentration in der syn-HSZT-Gruppe betrug im Mittelwert 455,1 ng/ml, in der allo-HSZT-Gruppe 459,7 ng/ml. An D22 war die Lrg1-Konzentration in der syn-HSZT-Gruppe ähnlich dem Ausgangsniveau von D0 (475,1 ng/ml). In der allo-HSZT-Gruppe stieg die Lrg1-Konzentration auf einen Mittelwert von 572,5 ng/ml. Der Unterschied zwischen syn- und allo-HSZT-Gruppe an D22 war nicht signifikant ($p=0.07$), zeigt jedoch eine deutliche Tendenz in Richtung höherer Lrg1 Konzentrationen nach allo-HSZT. Der Anstieg der Lrg1-Konzentrationen in der allo-HSZT-Gruppe von D0 zu D22 ist mit $p=0.06$ nicht signifikant. Es zeigt sich jedoch im zeitlichen Verlauf ein messbarer Anstieg der Lrg1-Konzentration, während in der syn-HSZT-Kontrollgruppe kein Anstieg zwischen D0 und D22 zu beobachten ist (Vgl. Abb. 8).

Zusammenfassend war in beiden Gruppen eine ähnliche Ausgangskonzentration an Lrg1 nachweisbar. Nach syn-HSZT war die Lrg1-Konzentration an D22 kaum angestiegen, während die Konzentration nach allo-HSZT an D22 stärker über das Ausgangsniveau anstieg.

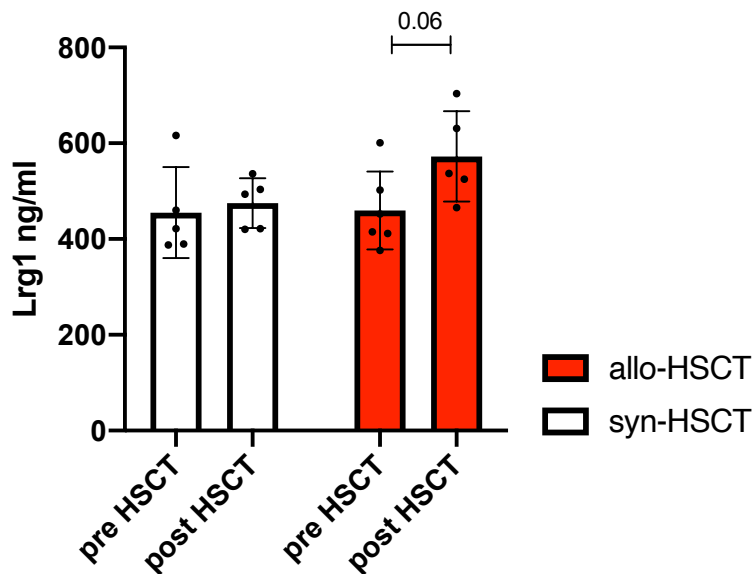


Abbildung 8. Lrg1-Konzentration im murinen Serum nach HSZT.

Quantifizierung der Lrg1-Konzentration im Serum von Mäusen vor und nach syn-/allo-HSZT. Angaben in ng/ml. Fehlerbalken zeigen Mittelwert +/- Standardabweichung. n=11. syn-HSZT: 5 Tiere. allo-HSZT: 6 Tiere. Test auf Signifikanz mit ungepaartem Student's t-Test. Signifikanzniveau $p=0.05$. Lrg1: Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1. ng/ml: Nanogramm pro Milliliter. syn-HSCT: syngene haematopoetic stem cell transplantation (syngene hämatopoetische Stammzelltransplantation). allo-HSCT: allogene haematopoetic stem cell transplantation (allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation). pre HSCT: Tag 0 (D0). post HSCT: Tag 22 (D22).

4.1.2 Untersuchung humaner Serumproben

Um nachzuweisen, dass bei Patient:innen nach allo-HSZT eine Korrelation zwischen Lrg1-Konzentration im Serum und aGvHD besteht, wurden über einen Zeitraum von 9 Monaten Blutproben von 70 Patient:innen gesammelt und daraus Serum generiert. Die Ergebnisse umfassen die deskriptive Statistik des Patient:innenkollektivs sowie die Ergebnisse der Serumuntersuchung mittels ELISA.

4.1.2.1 Deskriptive Statistik des Patient:innenkollektivs

Die Beschreibung der Gesamtheit der in die Untersuchung eingeschlossenen Patient:innen ist der folgenden Tabelle zu entnehmen (Vgl. Tab. 5).

		Anzahl	
		Absolut (n)	Relativ (%)
Patient:innen	gesamt	70	100
	m	43	61,4
	w	27	38,6
Alter (Mittelwert in Jahren)	gesamt	55,4	
	m	56,9	
	w	52,9	
Konditionierung	RIC	49	70
	MAC	21	30
	ATG	70	100
Spender:innentyp	MRD	12	17,1
	MUD	53	75,7
	MMRD	2	2,9
	MMUD	3	4,3
Geschlecht Spender:in	m	36	51,4
	w	15	21,4
	k.A.	19	27,1
Stammzellpräparat	PBSC	70	100
	BM	0	0
Remissionsstatus	CR1	42	60
	CR2	6	8,6
	keine Remission	19	27,1
	k.A.	3	4,3
GvHD Prophylaxe	CsA+MMF	56	80
	CsA+MTX	10	14,3
	keine	1	1,4
	k.A.	3	4,3
aGvHD	keine	42	60
	I°	18	25,7
	II°	7	10
	III°	3	4,3
	IV°	0	0

Tabelle 5. Deskriptive Statistik der Stichprobe.

Tabellarische Darstellung der Patient:innenpopulation. aGvHD: akute Graft-versus-Host Erkrankung (acute Graft-versus-Host Disease). m: männlich. w: weiblich. RIC: dosisreduzierte Konditionierung (reduced intensity conditioning). MAC: myeloablative Konditionierung (myeloablative conditioning). ATG: Antithymozytenglobulin. MRD: passender verwandter Spender (matched related donor). MUD: passender unverwandter Spender (matched unrelated donor). MMRD: unpassender, verwandter Spender (mismatched related donor). MMUD: unpassender, unverwandter Spender (mismatched unrelated donor). PBSC: Stammzellen aus peripherem Blut (periphere blood stem cells). BM: Knochenmark (bone marrow). CR: Komplettremission (complete remission). CsA: Cyclosporin A. MMF: Mycophelat Mofetil. MTX: Methotrexat. k.A.: keine Angabe.

Die Abbildung zeigt die Verteilung der Grunderkrankungen innerhalb der Stichprobe, die die Indikation zur allo-HSZT stellten (Vgl. Abb. 9).

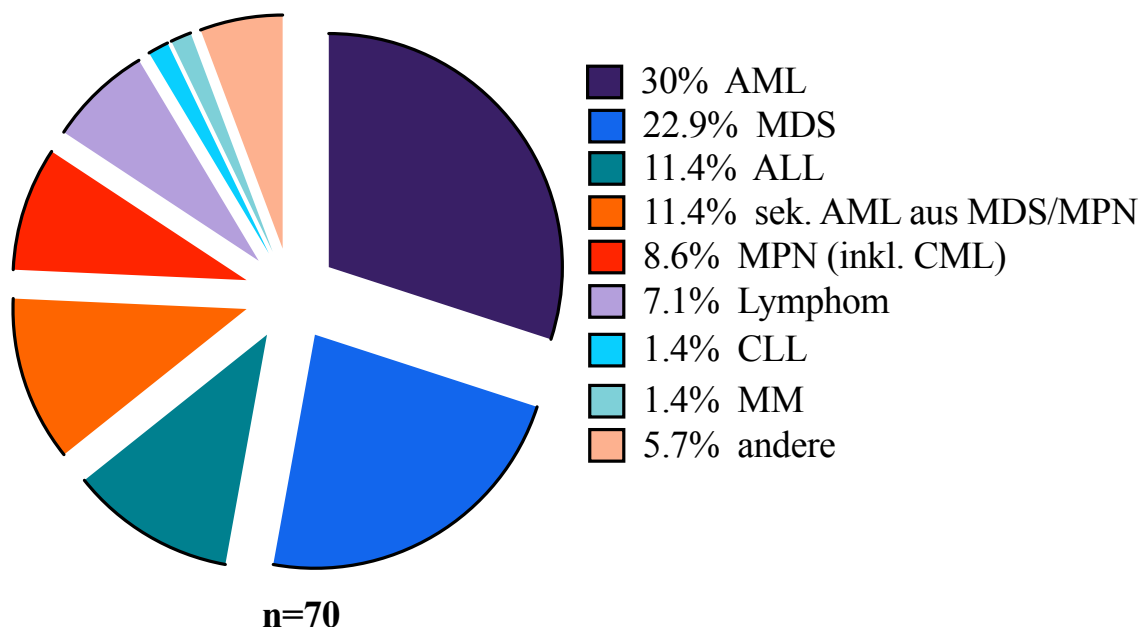


Abbildung 9. Verteilung der Grunderkrankungen.

Prozentualer Anteil der verschiedenen Grunderkrankungen der Stichprobe. n=70 Patient:innen. AML: akute myeloische Leukämie. MDS: myelodysplastisches Syndrom. ALL: akute lymphatische Leukämie. MPN: myeloproliferative Neoplasie. CML: chronisch myeloische Leukämie. CLL: chronisch lymphatische Leukämie. MM: Multiples Myelom.

Von den eingeschlossenen Patient:innen konnten 10 Patient:innen identifiziert werden, die nach allo-HSZT eine aGvHD II° oder III° entwickelten und den Auswahlkriterien entsprachen (Vgl. 3.1.1). Ein Patient wurde trotz aGvHD II° aus der Analyse ausgeschlossen, da aufgrund des frühen Auftretens der aGvHD (D+4) von einer hyperakuten GvHD ausgegangen werden musste. Daraus ergibt sich eine Gesamtanzahl von n=9 Patient:innen. Diesen Patient:innen wurde je ein:e Kontrollpatient:in aus der Gruppe ohne aGvHD zugeordnet. Die folgende Tabelle beschreibt die aGvHD- und Kontrollgruppe (Vgl. Tab. 6).

		Anzahl aGvHD		Anzahl Kontrollgruppe	
		Absolut (n)	Relativ (%)	Absolut (n)	Relativ (%)
Patient:innen	gesamt	9	100	9	100
	m	5	55,6	5	55,6
	w	4	44,4	4	44,4
Alter (Mittelwert in Jahren)	gesamt	58,1		58,1	
	m	57,6		57,6	
	w	58,7		58,7	
Konditionierung	RIC	8	88,9	8	88,9
	MAC	1	11,1	6	66,7
	ATG	9	100	9	100
Spender:innentyp	MRD	3	33,3	3	33,3
	MUD	5	55,6	6	66,7
	MMRD	1	11,1	0	0
	MMUD	0	0	0	0
Geschlecht Spender:in	m	3	33,3	3	33,3
	w	1	11,1	1	11,1
	k.A.	5	55,6	5	55,6
Stammzellpräparat	PBSC	9	100	9	100
	BM	0	0	0	0
Remissionsstatus	CR1	2	22,2	7	77,8
	CR2	2	22,2	0	0
	keine Remission	4	44,4	2	22,2
	k.A.	1	11,1	0	0
GvHD Prophylaxe	CsA+MMF	8	88,9	9	100
	CsA+MTX	1	11,1	0	0
	keine	0	0	0	0
	k.A.	0	0	0	0
aGvHD	keine	0	0	0	0
	I°	0	0	0	0
	II°	6	66,7	0	0
	III°	3	33,3	0	0
	IV°	0	0	0	0

Tabelle 6. Deskriptive Statistik der aGvHD- und Kontrollgruppe.

Tabellarische Darstellung der Patient:innenpopulation. aGvHD: akute Graft-versus-Host Erkrankung (acute Graft-versus-Host Disease). m: männlich. w: weiblich. RIC: dosisreduzierte Konditionierung (reduced intensity conditioning). MAC: myeloablative Konditionierung (myeloablative conditioning). ATG: Antithymozytenglobulin. MRD: passender verwandter Spender (matched related donor). MUD: passender unverwandter Spender (matched unrelated donor). MMRD: unpassender, verwandter Spender (mismatched related donor). MMUD: unpassender, unverwandter Spender (mismatched unrelated donor). PBSC: Stammzellen aus peripherem Blut (periphere blood stem cells). BM: Knochenmark (bone marrow). CR: Komplettremission (complete remission). CsA: Cyclosporin A. MMF: Mycophelat Mofetil. MTX: Methotrexat. k.A.: keine Angabe.

4.1.2.2 Lrg1-Konzentration im Serum von Patient:innen nach allo-HSZT

Die Untersuchung des murinen Serums ergab, dass die Lrg1-Konzentration nach allo-HSZT im zeitlichen Verlauf tendenziell einen Anstieg zeigte, während die Lrg1-Konzentration nach syn-HSZT nahezu auf Ausgangsniveau blieb (Vgl. Abb. 8). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass es einen Zusammenhang zwischen erhöhten Lrg1-Spiegeln im Serum und der Entwicklung von aGvHD gibt. Der nächste Schritt war die Untersuchung humaner Serumproben, um festzustellen, ob dieser mögliche Zusammenhang auch hier zu beobachten ist.

Es wurde jeweils eine Serumprobe pro Patient:in vor und nach allo-HSZT auf die Lrg1-Konzentration untersucht. Die Probe nach allo-HSZT stammt in der aGvHD-Gruppe aus der Phase der aktiven aGvHD und wurde nicht, wie im Mausmodell, zu einem vorher festgelegten Zeitpunkt nach allo-HSZT entnommen (Vgl. 3.1.1). In den Serumproben vor allo-HSZT zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen aGvHD- und Kontrollgruppe. Nach allo-HSZT war in der aGvHD-Gruppe ein signifikanter Anstieg der Lrg1-Konzentration im Vergleich zum Ausgangswert zu beobachten, während die Lrg1-Konzentration in der Kontrollgruppe nicht signifikant anstieg. Vor allo-HSZT betrug der Mittelwert der Lrg1-Konzentration der aGvHD-Gruppe 363,1 pg/ml. Dieser stieg nach allo-HSZT auf 971,6 pg/ml. In der Kontrollgruppe betrug die mittlere Lrg1-Konzentration vor allo-HSZT 269,6 pg/ml, nach allo-HSZT 373 pg/ml. In der Kontrollgruppe war der Anstieg des Lrg1-Levels nach allo-HSZT nicht signifikant. Die Lrg1-Konzentration in der aGvHD-Gruppe war nach allo-HSZT signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Vgl. Abb. 10).

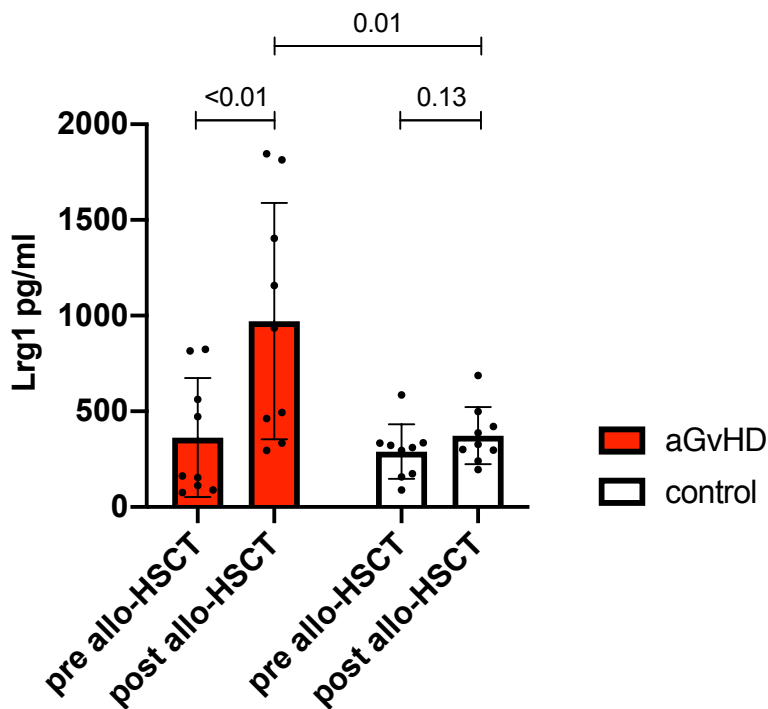


Abbildung 10. Lrg1-Konzentration im Serum von Patient:innen nach allo-HSCT.

Grafische Darstellung der Lrg1-Konzentration im Serum von Patient:innen vor und nach allo-HSCT mit aGvHD im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne aGvHD. Angaben in pg/ml. Fehlerbalken zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung. $n=18$ Patient:innen, davon 9 mit aGvHD und 9 ohne aGvHD. Test auf Signifikanz mit ungepaartem Student's t-Test für abhängige Stichproben. Signifikanzniveau $p=0.05$. Lrg1: leucine rich alpha-2-glycoprotein 1. pg/ml: Picogramm pro Milliliter. allo-HSCT: allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allogene haematopoetic stem cell transplantation). aGvHD: akute Graft-versus-Host Erkrankung (acute Graft-versus-Host Disease). pre allo-HSCT: vor allo-HSCT. post allo-HSCT: nach allo-HSCT.

Der direkte Vergleich der Lrg1-Konzentrationen der einzelnen Patient:innen mit den entsprechenden Kontrollpatient:innen wurde ebenfalls grafisch dargestellt (Vgl. Abb. 11). Diese detailliertere Darstellung dient dem weiteren Verständnis der gruppierten Auswertung aus Abbildung 10.

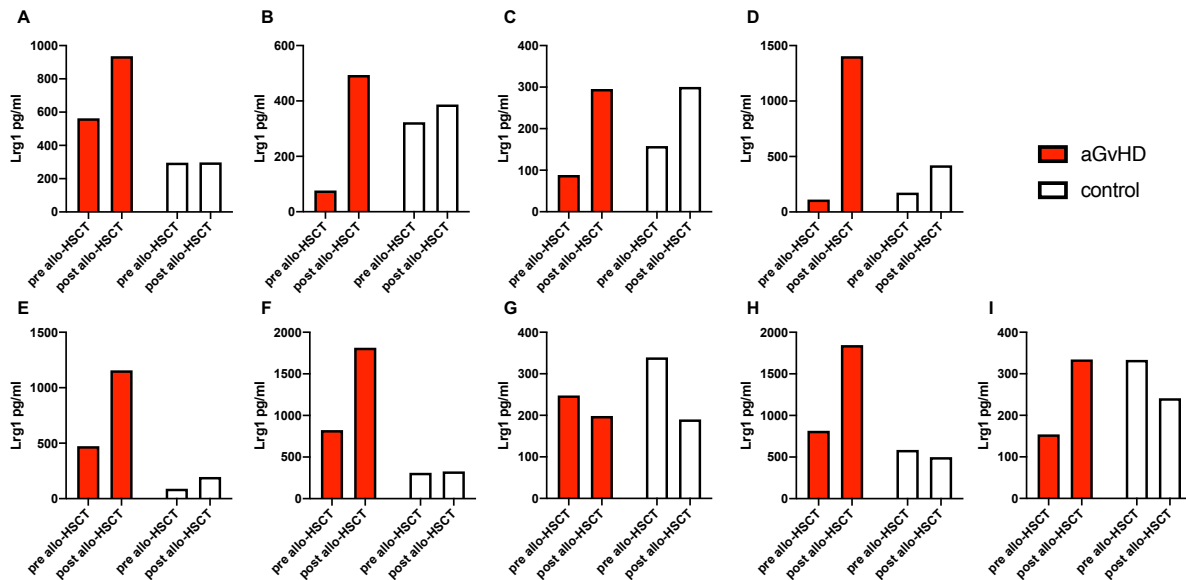


Abbildung 11. Direktvergleich der Lrg1-Konzentrationen von aGvHD- und Kontrollpatient:innen.

Direktvergleich der Lrg1-Konzentration im Serum der aGvHD-Patient:innen und Kontrollpatient:innen. Dargestellt ist die Lrg1-Konzentration im Serum vor und nach allo-HSCT. A: aGvHD-Patient:in 20, Kontrollpatient:in 26. B: aGvHD-Patient:in 33, Kontrollpatient:in 4. C: aGvHD-Patient:in 43, Kontrollpatient:in 49. D: aGvHD-Patient:in 51, Kontrollpatient:in 27. E: aGvHD-Patient:in 56, Kontrollpatient:in 14. F: aGvHD-Patient:in 61, Kontrollpatient:in 5. G: aGvHD-Patient:in 41, Kontrollpatient:in 28. H: aGvHD-Patient:in 64, Kontrollpatient:in 8. I: aGvHD-Patient:in 70, Kontrollpatient:in 25. Lrg1: leucine rich alpha-2-glycoprotein 1. pg/ml: Picogramm pro Milliliter. allo-HSCT: allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allogene haematopoetic stem cell transplantation). aGvHD: akute Graft-versus-Host Erkrankung (acute Graft-versus-Host Disease). pre allo-HSCT: vor allo-HSCT. post allo-HSCT: nach allo-HSCT.

4.2 Einfluss von Lrg1 auf funktionelle Veränderungen in Endothelzellen

In der Messung der Lrg1-Konzentration im murinen und humanen Serum konnte ein Zusammenhang zwischen aGvHD nach allo-HSCT und erhöhten Lrg1-Konzentrationen im Serum festgestellt werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der direkte Einfluss von Lrg1 auf das Angiogenesepotential von Endothelzellen untersucht werden. Dazu habe ich drei verschiedene Assays genutzt, um Proliferation, Migration und Tube-formation Potential von Zellen *in vitro* zu beurteilen. Die Versuche wurden mit den drei endothelialen Zelllinien MCECs, MuMECs und TMNK1-Zellen durchgeführt (Vgl. 3.1.3). Die verwendeten Endothelzelllinien stammen aus murinen (MCECs und MuMECs) und humanen (TMNK1-Zellen) Geweben. Zellen aller Zelllinien wurden dafür mit 2% Serum von Lrg1-/- und Lrg1-WT-Tieren in DMEM als Trägersubstanz stimuliert.

Da die Menge des entnommenen Blutes im Rahmen von *in vivo* Experimenten limitiert ist, wurde für die Versuche Serum aus verschiedenen *in vivo* Experimenten genutzt (Vgl. 3.1.2). Um die Vergleichbarkeit der Protein- und damit auch der Lrg1-Konzentration im Serum

dokumentieren und beurteilen zu können, habe ich von allen verwendeten Seren eine Gesamtproteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure Assay (BCA) durchgeführt (Vgl. Abb. 12). Trotz der Unterschiede der Proteinkonzentration in einzelnen Assays (Vgl. Abb. 12A) zeigte sich insgesamt kein Unterschied in der Proteinkonzentration zwischen gepoolten Lrg1-WT- und Lrg1^{-/-} Seren (Vgl. Abb. 12B). Die Messung dient der besseren Nachvollziehbarkeit und Transparenz der Ergebnisse der *in vitro* Assays, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden und deren Ergebnisse nachfolgend dargestellt werden.

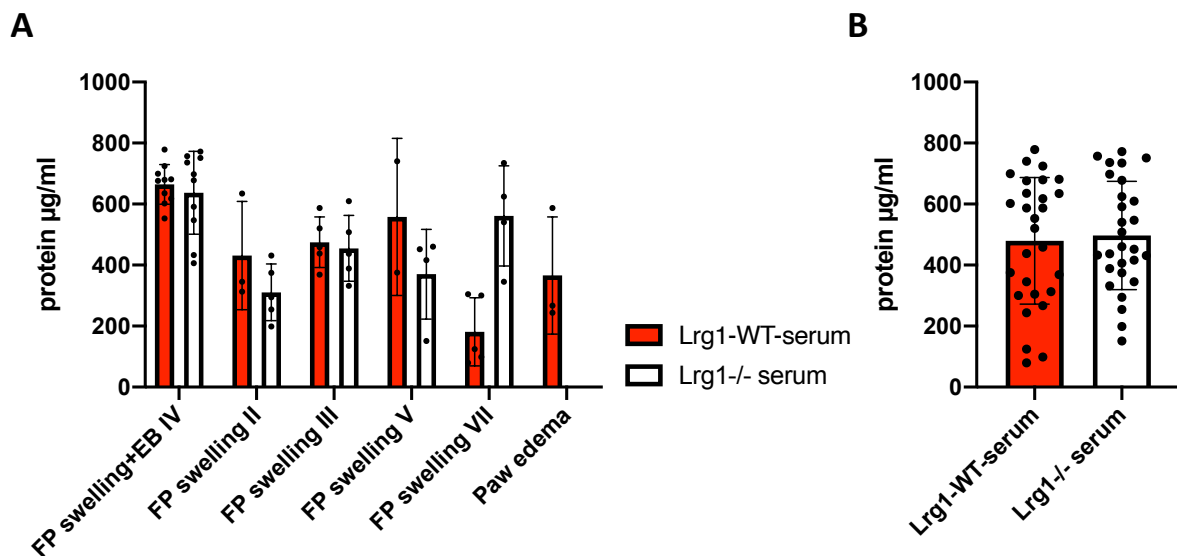


Abbildung 12. Proteinquantifizierung mittels BCA.

Quantifizierung des Proteingehalts des für die *in vitro* Experimente verwendeten Serums. Quantifizierung mittels BCA. A: Y-Achse zeigt die Proteinkonzentration in µg/ml im Serum. X-Achse zeigt das Experiment, aus dem das Serum gewonnen wurde. B: Darstellung der Proteinkonzentration in µg/ml des gepoolten Lrg1-WT- und Lrg1^{-/-} Serums. BCA: Bicinchoninsäure Assay (Bicinchoninic acid assay). FP-swelling: Foodpad-swelling. EB: Evans Blue. Lrg1: leucine rich alpha-2-glycoprotein 1. Lrg1-WT: Lrg1-Wildtyp. Lrg1^{-/-}: Lrg1-Knockout. µg/ml: Microgramm pro Milliliter.

Das Serum wurde den Tieren bei Inflammation unter pathologischen Bedingungen entnommen, um entsprechende entzündliche Mediatoren im Serum zu erhalten. Als Positivkontrolle diente jeweils Standard-Nährmedium (DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin) ohne weitere Zusätze. Die drei funktionalen Assays Proliferationsassay, Scratch Assay und Tubeformation Assay, welche in unserer Arbeitsgruppe etabliert sind, dienen der Beurteilung funktionaler Veränderungen von Endothelzellen.(73-75, 81)

4.2.1 Proliferationspotential von Endothelzellen nach Serumstimulation

Zellproliferation ist eine Grundvoraussetzung für Angiogenese. Um diese unter dem Einfluss von Lrg1 zu beurteilen, wurde ein metabolischer Proliferationsassay durchgeführt. Dieser dient

der Sichtbarmachung vitaler Zellen durch Metabolisierung des MTT-Substrates (Vgl. 3.2.2.1). MCECs, MuMECs und TMNK1-Zellen wurden mit 2% Lrg1^{-/-} bzw. Lrg1-WT-Serum in DMEM ausgesät und die Proliferation nach 48 Stunden gemessen. Als Referenzwert diente die Positivkontrolle mit Standard-Nährmedium.

MCECs zeigten unter Stimulation mit Lrg1^{-/-}-Serum eine signifikant geringere Proliferationsrate als mit Lrg1-WT-Serum. Nach 48 Stunden betrug der Mittelwert der relativen Proliferation der mit Lrg1^{-/-}-Serum stimulierten Zellen 99,7%, die der mit Lrg1-WT-Serum stimulierten Zellen 121,6% im Verhältnis zur Positivkontrolle (100%).

Auch bei MuMECs und TMNK1-Zellen ist nach 48 Stunden eine Tendenz zu einer geringeren Proliferationsrate bei mit Lrg1^{-/-}-Serum stimulierten Zellen zu erkennen. Die mittlere Proliferationsrate unter Lrg1^{-/-}-Serumstimulation betrug 99,5% bei MuMECs und 81,7% bei TMNK1-Zellen. Unter Lrg1-WT-Serumstimulation betrug die relative Proliferationsrate der MuMECs 130% und bei den TMNK1-Zellen 95%. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant ($p=0.19$ bzw. $p=0.13$).

Insgesamt zeigte sich bei Zugabe von Lrg1^{-/-}-Serum eine signifikant geringere Proliferationsrate der MCECs. Bei MuMECs und TMNK1-Zellen ist ebenfalls eine Tendenz zu geringerer Proliferation erkennbar (Vgl. Abb. 13).

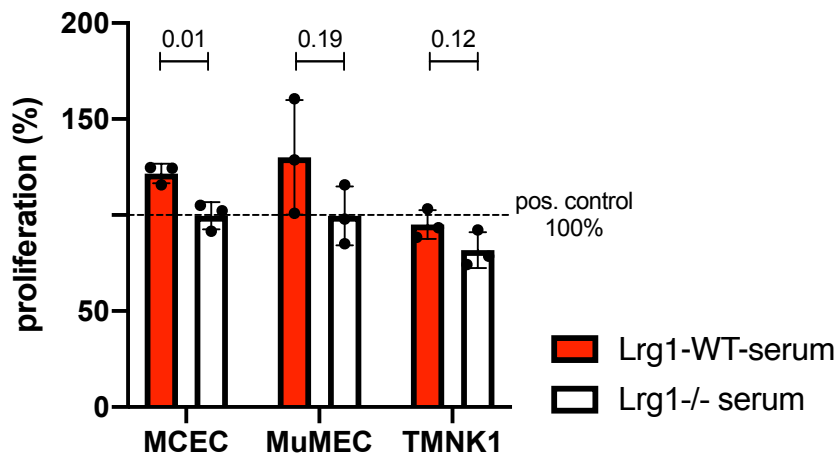


Abbildung 13. Proliferationspotential von Endothelzellen nach Serumstimulation.

Grafische Darstellung des Proliferationsverhaltens von MCECs, MuMECs und TMNK1-Zellen nach Stimulation mit 2% Lrg1^{-/-}-Serum und 2% Lrg1-WT-Serum. Werte gemessen nach 48h. Darstellung in %. Als Referenz gilt die Positivkontrolle (Standard-Kulturmedium). Fehlerbalken zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung. $n=3$ Versuchswiederholungen. Test auf Signifikanz mit ungepaartem Student's t-Test. Signifikanzniveau $p=0.05$. MCEC: murine cardiac endothelial cells. MuMEC: murine dermal microvascular endothelial cells. TMNK1: human liver sinusoidal endothelial cells. Lrg1: leucine rich alpha-2-glycoprotein 1. Lrg1^{-/-}-Serum: murines Lrg1-Knockout Serum. Lrg1-WT-Serum: murines Lrg1-Wildtyp-Serum. pos. control: Positivkontrolle. SD: Standardabweichung.

4.2.2 Zelluläres Migrationspotential nach Serumstimulation

Um eine funktionsfähige Gefäßformation zu bilden, migrieren Zellen einem proangiogenen Chemokinsignal der Tip-Zellen folgend an ihren Bestimmungsort. Die Zellmigration wird durch verschiedene Mediatoren reguliert (Vgl. 1.3.1). Um den Einfluss von Lrg1 auf die Migration verschiedener Endothelzellen zu untersuchen, habe ich den Wound-healing Assay (Scratch Assay) mit MCECs, MuMECs und TMNK1-Zellen durchgeführt.

In die Einzelzellschicht der entsprechenden Zelllinie wurde mit einer Pipettenspitze eine artifizielle Wunde gesetzt und das Testmedium mit 2% Lrg1^{-/-} bzw. Lrg1-WT-Serum sowie das Kontrollmedium aufgetragen (Vgl. 3.2.2.2). Die Zellkulturplatten wurden im Live-Cell-Analyse-System IncuCyte (Vgl. Tab. 4) inkubiert und die Zellmigration und -proliferation alle 3 Stunden über einen Gesamtzeitraum von 15 Stunden fotografisch dokumentiert. Die offene Fläche wurde in Fiji (ImageJ) gemessen und in Relation zum Ausgangswert zum Zeitpunkt Null gesetzt.

Bei allen drei Zelllinien konnte eine signifikant langsamere Zellmigration bei mit Lrg1^{-/-}-Serum stimulierten Zellen im Vergleich zu mit Lrg1-WT-Serum stimulierten Zellen festgestellt werden (Vgl. Abb. 14).

MCECs zeigten nach 15 Stunden einen signifikanten Unterschied zwischen mit Lrg1^{-/-} und Lrg1-WT-Serum stimulierten Zellen, wobei die Migrationsrate auch zu den vorherigen Zeitpunkten bei mit Lrg1^{-/-}-Serum stimulierten Zellen konstant langsamer war. Nach 15 Stunden betrug die offene Fläche bei Zellen mit Lrg1^{-/-}-Serumstimulation 35,1% des Ausgangswertes. Bei Zellen mit Stimulation durch Lrg1-WT-Serum betrug die offene Fläche nach 15 Stunden 18,8% des Ausgangswertes. Dieser Unterschied ist signifikant.

MuMECs zeigten nach 3, 6, 9 und 12 Stunden signifikante Unterschiede in der Migrationsrate. Die Zellmigration unter Stimulation mit Lrg1^{-/-}-Serum war zu jedem Zeitpunkt langsamer als unter Stimulation mit Lrg1-WT-Serum. Unter Stimulation mit Lrg1^{-/-}-Serum betrug die offene Fläche nach 3 Stunden 95,5%, mit Lrg1-WT-Serum 88,5%. Nach 6 Stunden betrug die Fläche unter Einfluss von Lrg1^{-/-}-Serum 83,3%, mit Lrg1-WT-Serum 72,4%. Nach 9 Stunden hatte sich die offene Fläche bei Stimulation mit Lrg1^{-/-}-Serum auf 66,9% reduziert, bei Lrg1-WT-Serum auf 52,9%. Nach 12 Stunden betrug die offene Fläche der Zellen mit Lrg1^{-/-}-Stimulation noch 49% des Ausgangswertes, die der Zellen mit Lrg1-WT-Serum noch 28,5% des Ausgangswertes. Nach 15 Stunden war die offene Fläche unter allen drei Konditionen nahezu geschlossen, sodass kein signifikanter Unterschied mehr feststellbar war.

TMNK1-Zellen zeigten ebenfalls zu allen Zeitpunkten eine niedrigere Migrationsrate bei Stimulation mit Lrg1^{-/-} Serum. Signifikant war dieser Unterschied nach 6, 9 und 12 Stunden. Unter Stimulation mit Lrg1^{-/-}-Serum betrug die offene Fläche nach 6 Stunden 75,7%, mit Lrg1-WT-Serum 68,4%. Nach 9 Stunden betrug die offene Fläche 63,9% unter Einfluss von Lrg1^{-/-}-Serum 63,9%, mit Lrg1-WT-Serum 54,3%. Nach 12 Stunden hatte sich die offene Fläche unter Stimulation mit Lrg1^{-/-}-Serum auf 53,8% des Ausgangswertes reduziert, unter Stimulation mit Lrg1-WT-Serum auf 42,2%.

Alle drei Zelllinien zeigten bei Stimulation mit Lrg1^{-/-}-Serum signifikant langsamere Zellmigration. Die Unterschiede wurden innerhalb der verschiedenen Zelllinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten signifikant, was auf unterschiedliche Wachstumsraten der Zelllinien zurückzuführen ist. Das spiegelt die Relevanz zelllinienspezifischer Charakteristika wider. Insgesamt zeigen die Ergebnisse des Wound-healing Assays, dass Lrg1 das Migrationspotential von Endothelzellen steigert (Vgl. Abb. 14).

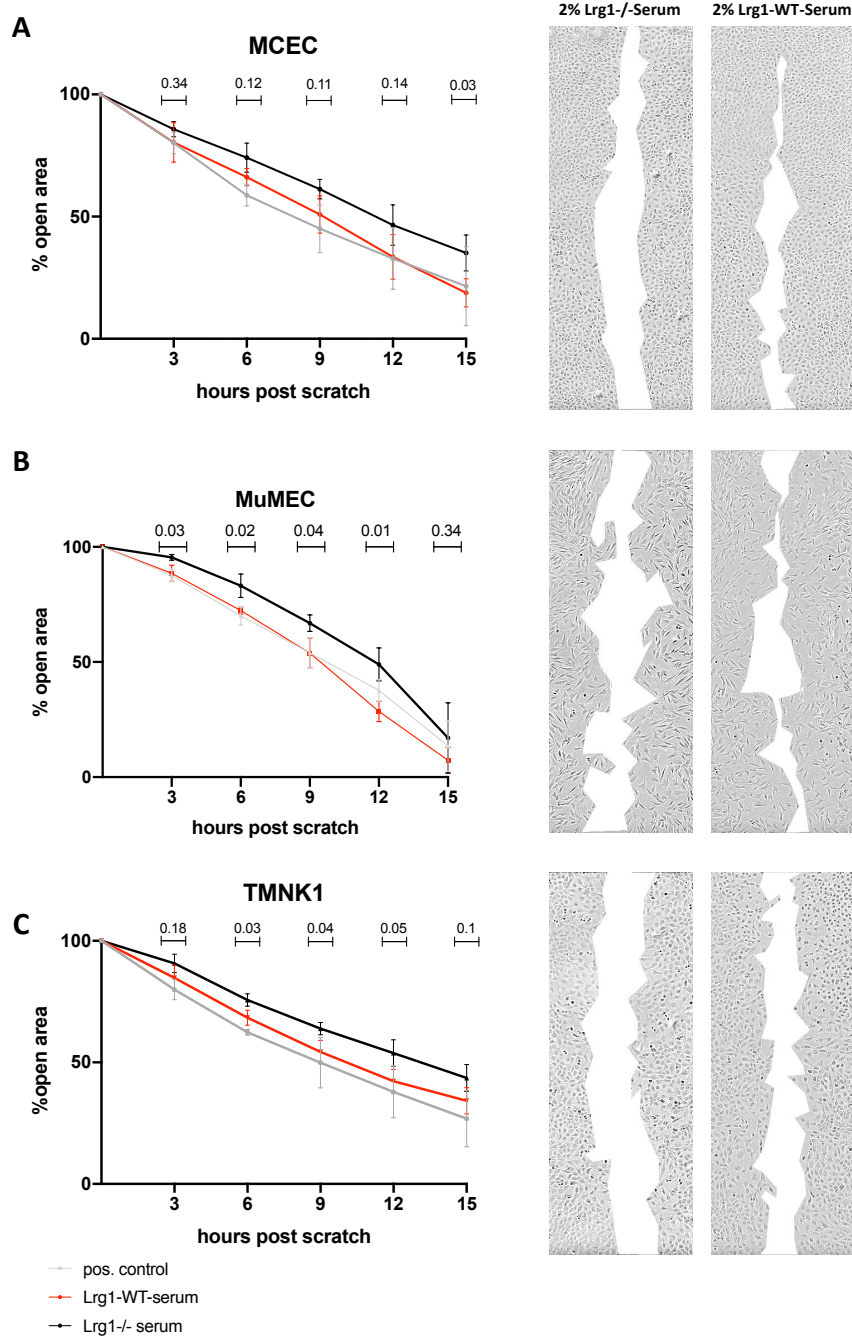


Abbildung 14. Migrationspotential von Endothelzellen unter Serumstimulation.

Grafische Darstellung der Wound-healing Assays. Anteil der offenen Fläche in Relation zum Ausgangswert über einen Zeitraum von 15h. A: Grafische Darstellung des Migrationsverhaltens bei MCECs (links). Repräsentative Bilder der offenen Fläche nach 15h von MCECs unter Stimulation mit Lrg1-/-Serum und Lrg1-WT-Serum (rechts). B: Grafische Darstellung des Migrationsverhaltens bei MuMECs (links). Repräsentative Bilder der offenen Fläche nach 12h von MuMECs unter Stimulation mit Lrg1-/-Serum und Lrg1-WT-Serum (rechts). C: Grafische Darstellung des Migrationsverhaltens von TMNK1-Zellen (links). Repräsentative Bilder der offenen Fläche nach 12h von TMNK1-Zellen unter Stimulation mit Lrg1-/-Serum und Lrg1-WT-Serum (rechts). Fehlerbalken zeigen Mittelwert +/- Standardabweichung. n=3 Wiederholungen. Test auf Signifikanz mit ungepaartem Student's t-Test. Explorative Auswertung, nicht adjustiert für multiples Testen. Signifikanzniveau $p=0.05$. MCEC: murine cardiac endothelial cells. MuMEC: murine dermal microvascular endothelial cells. TMNK1: human liver sinusoidal endothelial cells. Lrg1: leucine rich alpha-2-glycoprotein 1. Lrg1-/-Serum: murines Lrg1-Knockout Serum. Lrg1-WT-serum: murines Lrg1-Wildtyp-Serum. pos. control: Positivkontrolle. SD: Standardabweichung.

4.2.3 Zelluläres Tube-formation Potential nach Serumstimulation

Nach Proliferation und Migration sind Endothelzellen in der Lage, neue native Gefäßformationen zu bilden. Das Tube-formation Potential wird ebenso wie Proliferation und Migration durch proangiogene Signale induziert und gefördert. Um das Tube-formation Potential von Endothelzellen zu untersuchen, habe ich den Tube-formation Assay an den drei bereits beschriebenen Zelllinien MCECs, MuMECs und TMNK1-Zellen durchgeführt. Dieser Assay wird zur Beurteilung der Formation neuer Gefäßstrukturen angewandt (75, 79, 82) und ist ebenso in unserer Arbeitsgruppe etabliert. In allen Wiederholungen des Tube-formation Assays im Rahmen dieser Arbeit konnte ich unter den beschriebenen Mediumbedingungen ohne zugefügte Wachstumsfaktoren (Vgl. 3.2.2.3) nur in den humanen Endothelzellen (TMNK1-Zellen) Tube-formation beobachten. Aus diesem Grund werden im Folgenden nur die Ergebnisse des Tube-formation Assays an TMNK1-Zellen vorgestellt.

Der Tube-formation Assay wurde wie in 3.2.2.3 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden mit 2% Lrg1^{-/-}-Serum und Lrg1-WT-Serum in DMEM stimuliert. Die Positivkontrolle bildete Standard-Nährmedium. Das Experiment wurde drei Mal unter gleichen Bedingungen wiederholt. Die Zellkulturplatten wurden im Live-Cell-Analyse System IncuCyte (Vgl. Tab. 4) inkubiert und alle 2 Stunden fotografisch dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Angiogenesis Analyzer von Fiji (ImageJ).⁽⁷⁸⁾ Nach Literaturrecherche (76-79) wurden die von der Software ausgewerteten Charakteristika Nb. Nodes, Nb. Junctions, Nb. Meshes, Nb. Segments, Nb. Branches und total tube length in die endgültige statistische Auswertung eingeschlossen (Vgl. 3.2.2.3).

Bei den untersuchten Parametern zeigte sich unter Stimulation mit Lrg1^{-/-}-Serum eine Tendenz zu niedrigeren Werten in allen analysierten Tube-formation-Charakteristika, entsprechend einer verringerten Bildung von Gefäßaussprossungen und verringerter Netzwerkbildung im Vergleich zu mit Lrg1-WT-Serum stimulierten Zellen. Die Unterschiede sind nicht signifikant (Vgl. Abb. 15).

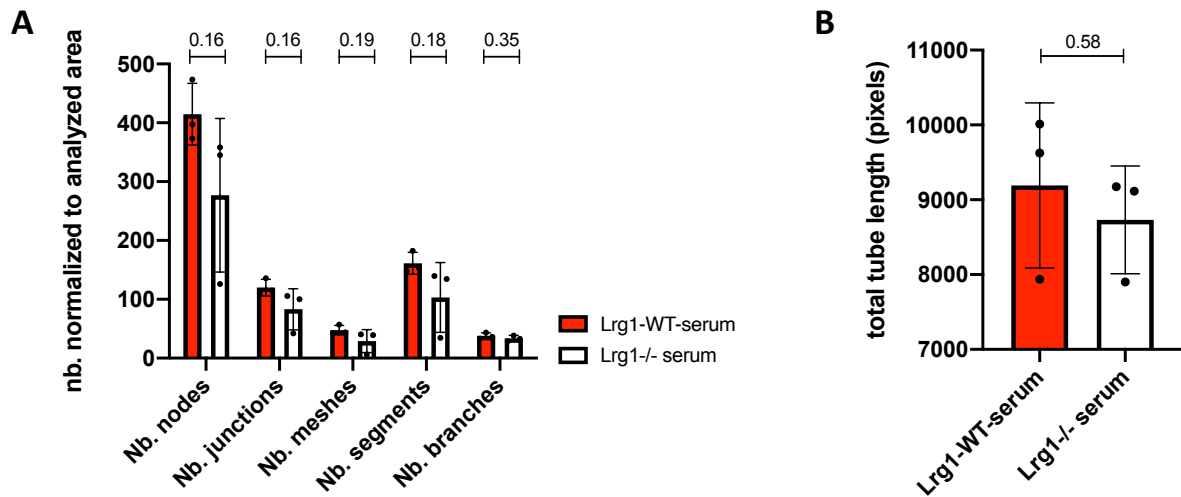


Abbildung 15. Tube-formation Potential von TMNK1-Zellen unter Serumstimulation.

Grafische Darstellung des Tube-formation Potentials TMNK1-Zellen nach Stimulation mit 2% Lrg1^{-/-}-Serum und 2% Lrg1-WT-Serum. Werte nach 4h. A: Anzahl gebildeter nodes, junctions, meshes, segments und branches nach 4h. Anzahl normalisiert auf die Fläche des ausgewerteten Bildausschnitts. B: Länge der Tubes in Pixeln nach 4h. Test auf Signifikanz mit ungepaartem Student's t-Test. Signifikanzniveau $p=0.05$. Fehlerbalken zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung. TMNK1: human liver sinusoidal endothelial cells. Lrg1: leucine rich alpha-2-glycoprotein 1. Lrg1^{-/-}-serum: murines Lrg1-Knockout Serum. Lrg1-WT-serum: murines Lrg1-Wildtyp-Serum. SD: Standardabweichung. Nb: Number.

5 Diskussion

Dem Aufbau des Ergebnisteils folgend wird auch die Diskussion in die zwei Teile ‚Lrg1-Serumkonzentration nach allo-HSZT‘ und ‚Einfluss von Lrg1 auf funktionelle Veränderungen in Endothelzellen‘ unterteilt.

5.1 Lrg1-Serumkonzentration nach allo-HSZT

Es ist bereits bekannt, dass Lrg1 als Teil des proangiogenen TGF- β -Signalwegs pathologische Angiogenese im Rahmen verschiedener Tumorerkrankungen sowie inflammatorischer und autoimmunvermittelter Erkrankungen induziert. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Lrg1 unter anderem bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (65, 83, 84), Erkrankungen des rheumatoiden Formkreises (62, 85), Appendizitis (86) und Tumorerkrankungen wie Kolorektalkarzinom (61), Ovarialkarzinom (87) und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (88) hochreguliert ist und als Biomarker sowie als prognostischer Marker dienen kann. Die genannten Erkrankungen gehen alle mit Inflammation und Veränderungen der Angiogenese einher. Die Hypothese, dass auch bei aGvHD erhöhte Konzentrationen von Lrg1 an der Entstehung der Erkrankung beteiligt sind, liegt aufgrund dieser Erkenntnisse nahe. Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mittels ELISA die Lrg1-Serumkonzentration von Mäusen nach allo-HSZT und syn-HSZT bestimmt. Nach syn-HSZT tritt aufgrund von HLA-identischer Transplantation keine aGvHD auf. Aufgrund der ansonsten gleichen Behandlung hat sich die syn-HSZT als aGvHD-Kontrollgruppe etabliert. Die Ergebnisse zeigten eine Tendenz zu höheren Lrg1-Konzentrationen an D22 nach allo-HSZT im Vergleich zum Serum von Mäusen nach syn-HSZT. Nach syn-HSZT lagen die Werte an D22 auf dem Niveau der Ausgangswerte von D0, während die Werte nach allo-HSZT anstiegen. Tag 22 entspricht dem Zeitraum der Akutphase der aGvHD. Die vorliegenden Ergebnisse sind dementsprechend vereinbar mit der Entstehung von aGvHD in der allo-HSZT-Gruppe. Diese Ergebnisse fügen sich wie erwartet in die Erkenntnisse vorangegangener Studien anderer Pathologien, wie oben beschrieben, ein.

Bereits erwähnt wurde die Studie von Wang et al., die eine signifikante Hochregulation von Lrg1 im Rahmen von hypoxieinduziertem vaskulärem Remodelling der Retina und bei choroidaler Neovaskularisation im Mausmodell nachweisen konnte. Außerdem stellten Wang et al. fest, dass Lrg1 fast ausschließlich im vaskulären System exprimiert wird, neben retinalen Gefäßen auch in Gefäßen der Haut, der Brustdrüse und des Gastrointestinaltraktes. An Lrg1^{-/-}-Mäusen und Lrg1^{-WT}-Mäusen wurde infolgedessen untersucht, inwiefern die Abwesenheit

von Lrg1 Neovaskularisation unter verschiedenen Bedingungen beeinflusst. Dazu wurde choroidale Neovaskularisation induziert und mittels Fluoreszenzangiographie die Gefäßdichte beurteilt. Lrg1^{-/-}-Mäuse hatten im Vergleich zu Lrg1-WT-Tieren eine signifikant geringere Gefäßdichte und geringere Fluoreszin-Leckage. Im Gegensatz dazu hatte Lrg1 keinen Einfluss auf die Revaskularisation nach hyperoxieinduzierter Gefäßremission. Zusammenfassend schließen Wang et al. darauf, dass Lrg1 unter pathologischen Bedingungen überexprimiert wird und über Induktion des TGF- β -Signalwegs Neovaskularisation fördert, das physiologische sauerstoffabhängige Gefäßremodelling dabei jedoch nicht beeinträchtigt.(55)

Auch im experimentellen Mausmodell der aGvHD wurde eine gesteigerte Neovaskularisation und Gefäßdichte in den Zielorganen beobachtet.(52) Die Ergebnisse der Messung des Lrg1-Serumlevels bei Mäusen nach allo-HSZT zeigen, dass auch bei aGvHD ein Anstieg der Lrg1-Konzentration im Serum nachweisbar ist. Meine Ergebnisse sind vereinbar mit denen von Wang et al. und stützen die Hypothese, dass Lrg1 an der gesteigerten Angiogenese und Neovaskularisation beteiligt ist, indem es den Wechsel vom angiostatischen zum proangiogenen TGF- β -Signalweg initiiert (Vgl. 1.3.3).

Der Unterschied der Lrg1-Konzentration zwischen Tieren nach syn- und allo-HSZT an D22 ist nicht signifikant, zeigt jedoch eine deutliche Tendenz zu höheren Lrg1-Werten in der allo-HSZT-Gruppe. Auch der Anstieg der Lrg1-Konzentration zwischen D0 und D22 in der allo-HSZT-Gruppe war nicht signifikant, zeigte jedoch ebenfalls eine deutliche Tendenz. Das Experiment sollte in Zukunft mit einer größeren Anzahl an Tieren wiederholt werden, um das Ergebnis zu verifizieren. Um den Effekt der Konditionierung auf die Lrg1-Konzentration zukünftig zu erfassen, sollte in Folgeexperimenten eine weitere Blutentnahme vor Beginn der Konditionierung eingeplant werden. Der Effekt der Konditionierungstherapie auf die Lrg1-Konzentration könnte so besser eingeschätzt und konditionierungsbedingte falsch hohe Lrg1-Konzentrationen könnten identifiziert und vermieden werden.

Zusätzlich zur Lrg1-Quantifizierung im Mausserum wurde auch bei Patient:innen nach allo-HSZT Lrg1 im Serum gemessen und die Werte von aGvHD-Patient:innen mit denen von Patient:innen ohne aGvHD verglichen. Es zeigten sich in der aGvHD-Gruppe signifikant höhere Lrg1-Serumspiegel als in der Kontrollgruppe. Analog zu den Ergebnissen der Messung der Lrg1-Konzentration im murinen Serum ist auch das Ergebnis des humanen ELISAs konkordant mit Erkenntnissen vorangegangener Studien zu angiogeneseassoziierten Pathologien.

Shinzaki et al. konnten nachweisen, dass höhere Lrg1-Konzentrationen im Serum von Patient:innen mit Colitis Ulcerosa mit gesteigerter Krankheitsaktivität einhergingen, während niedrige Lrg1-Konzentrationen mit Remission der Erkrankung und Ausheilung der Mukosa korrelierten.(83)

Ähnliche Ergebnisse zeigten Naka et al. in ihrer Studie. Auch hier korrelierten hohe Lrg1-Konzentrationen mit höherer Krankheitsaktivität der Colitis Ulcerosa, während in Remission ein rasches Abfallen des Lrg1-Levels zu beobachten war. Auch bei rheumatoider Arthritis korrelierten Lrg1-Level mit gesteigerter Krankheitsaktivität. Lrg1-Anstieg war ein zuverlässiger Marker für gesteigerte Entzündungsaktivität bei rheumatoider Arthritis, während der standardmäßig gemessene Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP) trotz klinisch aktiver Erkrankung nicht anstieg.(89)

Verschiedenen Studien zufolge ist Lrg1 auch an der pathologischen Angiogenese bei Tumorerkrankungen beteiligt. Die Studie von Li et al. zeigt, dass hohe Lrg1-Spiegel ein negativer prognostischer Marker bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom sind. Die Expression von Lrg1 war in Tumorzellen hochreguliert und steigerte Proliferations-, Migrations- und Invasionspotential der Tumorzellen. Darüber hinaus wurde gesteigerte pathologische Angiogenese im Tumorgewebe nachgewiesen, assoziiert mit Lrg1-induzierter gesteigerter Aktivität des TGF- β -Signalwegs.(88) Ähnliche Ergebnisse konnten Yamamoto et al. zeigen. In ihrer Studie korrelierte eine hohe Expression von Lrg1 in Tumorzellen des Magens mit schlechterer TNM-Klassifikation (Klassifikation zum Staging maligner Tumoren anhand von Primärtumor, Lymphknotenbefall und Fernmetastasen) und damit schlechterer Krankheitsprognose.(90) Diese beiden Studien untersuchten ausschließlich die Lrg1-Expression im pathologisch veränderten Gewebe, jedoch nicht im Serum der Patient:innen. Im Falle der aGvHD wird angenommen, dass Lrg1 im Rahmen der Inflammation nicht nur aus dem Gewebe, sondern auch aus neutrophilen Granulozyten sezerniert wird, und so zusammen mit anderen proinflammatorischen Substanzen im Serum ansteigt und pathologische Angiogenese über den TGF- β -Signalweg induziert. Andersen et al. untersuchten in ihrer Studie sowohl die Lrg1-Expression im Tumorgewebe als auch die Lrg1-Serumkonzentration bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Es konnte gesteigerte Lrg1-Expression in den Tumorzellen und erhöhte Lrg1-Konzentrationen im Serum erkrankter Patientinnen nachgewiesen werden.(87) Es ist davon auszugehen, dass auch tumorassoziierte Inflammation einen Lrg1-Anstieg im Serum bewirkt und dadurch Tumorangiogenese gefördert wird.

Nach meinem aktuellem Wissen liegen bisher keine Daten zum Zusammenhang zwischen Lrg1-Konzentration im Serum von Patient:innen und aGvHD vor. Die Daten der oben genannten Studien erlauben die Annahme, dass auch bei aGvHD ein Zusammenhang zwischen Krankheitsentstehung und erhöhten Lrg1-Serumspiegeln besteht. Wie bereits zuvor beschrieben, bestehen Parallelen in der Pathogenese zwischen aGvHD und Autoimmunerkrankungen, Tumorerkrankungen und anderen entzündlichen Prozessen. Die in den durchgeführten Versuchen nachgewiesene signifikant höhere Lrg1-Konzentration im Serum von aGvHD-Patient:innen verglichen mit Patient:innen ohne aGvHD stützt diese Hypothese und ist vereinbar mit den Ergebnissen vorangegangener Studien.

Ein weiterführender Ansatz für zukünftige Projekte wäre die Frage, ob auch bei der aGvHD eine Korrelation zwischen Schweregrad der Erkrankung und Lrg1-Konzentration besteht und Lrg1 somit als Biomarker und Verlaufparameter genutzt werden könnte. Dafür müsste eine größere Anzahl an Blutproben generiert werden, um Patient:innen aller Schweregrade der aGvHD zu erfassen und einzuschließen. Bei zukünftigen Bestimmungen der Lrg1-Serumkonzentration sollte, wie auch bei Messung der Lrg1-Konzentration im murinen Serum, die erste Blutentnahme vor Beginn der Konditionierungstherapie stattfinden, um konditionierungsbedingte Veränderungen der Lrg1-Konzentration zu erkennen und einzuordnen.

5.2 Einfluss von Lrg1 auf funktionelle Veränderungen in Endothelzellen

Die Ergebnisse der Messung der Lrg1-Konzentration im humanen und murinen Serum bei aGvHD suggerieren, dass erhöhte Konzentrationen von Lrg1 im Serum mit gesteigerter Angiogenese einhergehen. Wie in 1.3 beschrieben, sind Proliferation, Migration und Tube-formation Potential mit Bildung neuer Gefäßformationen Voraussetzung für Angiogenese. Den direkten Einfluss von Lrg1 im Serum auf Endothelzellen untersuchte ich mit den drei *in vitro* Assays MTT, Wound-healing Assay und Tube-formation Assay (Vgl. 3.2.2). Die Versuche wurden an MCECs, MuMECs und TMNK1-Zellen durchgeführt. Die Arbeit mit diesen Zelllinien ist in unserem Labor bereits etabliert. Aufgrund ihres hohen angiogenen Potentials eignen sich alle drei Zelllinien für die von mir geplanten und durchgeführten Experimente. Die Verwendung verschiedener Endothelzelllinien hat zudem den Vorteil, dass mögliche Unterschiede im Angiogeneseverhalten verschiedener Gewebe identifiziert werden können.

5.2.1 Proliferationsverhalten von Zellen unter Lrg1-Stimulation

Die Proliferation von Endothelzellen ist eine Voraussetzung für Angiogenese. Dass Lrg1 die Angiogenese über Regulation des TGF- β -Signalwegs beeinflusst, ist bekannt und wurde in

dieser Arbeit bereits besprochen (Vgl. 1.3.3; Vgl. 5.1). Zur Beurteilung des Proliferationspotentials von Endothelzellen unter dem Einfluss von Lrg1 führte ich im Rahmen dieser Arbeit MTT-Assays an MCECs, MuMECs und TMNK1-Zellen durch. Dieser erlaubt die Messung der Viabilität von Zellen anhand ihrer metabolischen Aktivität.(73) Im MTT-Assay konnte ich signifikant gesteigertes Proliferationspotential der MCECs bei Stimulation mit Lrg1-WT-Serum gegenüber der Stimulation mit Lrg1-/-Serum zeigen. Bei MuMECs und TMNK1-Zellen war diesbezüglich ebenfalls eine Tendenz zu erkennen.

Zhong et al. zeigten, dass ein Knockout von Lrg1 in Glioblastomzellen deren Proliferationsrate verglichen mit nicht-Tumorzellen ohne Lrg1-Knockdown signifikant senkte und den Zellzyklusarrest in Tumorzellen induzierte. Es wurde eine signifikant niedrigere Proliferationsrate der Lrg1-/-Glioblastomzellen im MTT-Assay beobachtet.(91) Auch Li et al. zeigten in ihrer Studie signifikant geringere Proliferationsraten einer non small cell lung cancer (NSCLCs) Zelllinie mit Lrg1-Knockdown, verglichen mit Tumorzellen ohne Knockdown.(88) Zhou et al. konnten ähnliche Ergebnisse im MTT-Assay mit Zellen kolorektaler Karzinome unter Stimulation mit rekombinantem Lrg1 zeigen. Auch hier war die Proliferationsrate ohne Stimulation durch Lrg1 signifikant geringer und die Apoptoserate signifikant höher als in Tumorzellen mit Lrg1-Stimulation.(92)

Die Ergebnisse der MTT-Assays, die ich im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt habe, gehen mit denen der drei genannten Studien an Tumorzellen einher. Da für die Untersuchung des Einflusses von Lrg1 auf aGvHD vor allem das Verhalten von Endothelzellen relevant ist, nutzte ich MCECs, MuMECs und TMNK1-Zellen. Diese drei Zelllinien sind für die Untersuchung des Einflusses von Lrg1 auf aGvHD besonders geeignet, da sie ein hohes angiogenes Potential aufweisen und für alle drei in dieser Arbeit durchgeführten Assays verwendet werden können. Darüber hinaus werden durch diese drei Zelllinien sowohl murine als auch humane Gewebe repräsentiert. Im Hinblick auf die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Lrg1 und aGvHD eignen sich TMNK1-Zellen und MuMECs als humane hepatische und murine dermale Endothelzelllinien insbesondere, weil Leber und Haut neben dem Gastrointestinaltrakt als Zielorgane der aGvHD gelten. Die Beteiligung kardialer Endothelzellen an aGvHD ist noch umstritten. Aus vorangegangenen Studien ist jedoch bekannt, dass murine sowie auch humane kardiale Endothelzellen die Fähigkeit besitzen, autonom Neovaskularisation nach ischämischen Ereignissen zu initiieren.(93, 94) Li et al. zeigten in ihrer Studie, dass murine kardiale Endothelzellen in der Lage sind, nach Myokardinfarkt ohne Stimulation myeloproliferativer Zellen und ohne endothelial-mesenchymale Transition Neovaskularisation zu induzieren.(94) Dieses besondere angiogene Potential könnte Grund dafür sein, dass ich im MTT-Assay nur

bei MCECs signifikant gesteigerte Proliferation unter Stimulation mit Lrg1-WT-Serum zeigen konnte.

Ein weiterer Unterschied zu den oben genannten Vergleichsstudien ist die Art der Stimulation mit Lrg1. Statt eines zellulären Lrg1-Knockdowns oder der Stimulation mit rekombinantem Lrg1 verwendete ich Serum von Lrg1^{-/-} und Lrg1-WT-Mäusen. Das Serum wurde im Rahmen von Foodpad-swelling-Experimenten gewonnen (Vgl. 3.1.2). Die Abnahme des Serums erfolgte im inflammatorischen Setting. Dem liegt zugrunde, dass Lrg1 als Teil einer Signalkaskade bei Inflammation auch einen Effekt auf andere proinflammatorische Faktoren hat, die ebenfalls ins Serum abgegeben werden. Beispielsweise ist Lrg1 in neutrophilen Granulozyten gespeichert und wird bei Initiierung von Inflammation zusammen mit Lactoferrin als first defense ausgeschüttet. Basierend auf den Erkenntnissen von Wang et al. zum Einfluss von Lrg1 unter pathologischen Bedingungen (55) ist es sinnvoll, Lrg1-Stimulation mit Serum durchzuführen, da nur so der pathologische Effekt von Lrg1 im Rahmen der induzierten Signalkaskade erfasst werden kann. Die Serumstimulation soll den Zustand unter pathologischen Bedingungen bei aGvHD möglichst genau replizieren, während die Verwendung von rekombinantem Lrg1 oder die Induktion des Lrg1-Knockdowns isoliert den Effekt von Lrg1 abbildet.

Weniger gut beschrieben als der Einfluss von Lrg1 auf Tumorzellen ist das Proliferationsverhalten von nicht-Tumorzellen unter dem Einfluss von Lrg1. Gao et al. untersuchten in ihrer Studie den Einfluss von Lrg1 auf die Wundheilung unter physiologischen und diabetischen Konditionen. Dafür führten sie unter anderem einen Proliferationsassay mit Keratinozyten durch, die mit rekombinantem Lrg1 stimuliert wurden. Sie konnten keinen signifikanten Unterschied in der Proliferationsrate zwischen Lrg1-stimulierten Zellen und der Kontrolle ohne Lrg1 feststellen.(95) Ähnliche Ergebnisse zeigte die Studie von Wang et al., die den Einfluss von Lrg1 auf mesenchymale Stammzellen im Rahmen der Osteoarthritis untersuchte. Auch hier konnte kein Unterschied im Proliferationsverhalten zwischen Lrg1-stimulierten und nicht Lrg1-stimulierten Zellen beobachtet werden.(96) Liu et al. untersuchten humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) unter Stimulation mit rekombinantem Lrg1. Sie nutzten zur Quantifizierung der Zellen eine immunohistochemische Färbung. Sie konnten eine signifikant verringerte Proliferationsrate in Abwesenheit von Lrg1 feststellen, verglichen mit den Zellen, die mit rekombinantem Lrg1 stimuliert wurden. Außerdem untersuchten sie wie Gao et al. ebenfalls den Einfluss von Lrg1 auf Keratinozyten. Verglichen wurden jeweils rekombinant-Lrg1-stimulierte Zellen mit nicht stimulierten Zellen sowie Zellen mit genetischem Lrg1-Knockdown mit einer Kontrolle ohne Lrg1-Knockdown.

In beiden Fällen konnte in Abwesenheit von Lrg1 eine signifikant geringere Proliferationsrate festgestellt werden.(76) Dieses Ergebnis steht im Kontrast zur Vergleichsstudie von Gao et al.. Unterschiede zwischen den beiden Studien sind die verwendeten Keratinozyten-Zelllinien, die Unterschiede im Proliferationsverhalten aufweisen können. Außerdem wurden verschiedene Proliferationsassays verwendet, die zur Abweichung der Ergebnisse beigetragen haben könnten. Meine Ergebnisse sind am Ehesten vergleichbar mit denen von Liu et al. (76). Bisher gibt es keine Studien zum Einfluss von Lrg1 als Serumbestandteil auf MCECs, MuMECs und TMNK1-Zellen. Ausgehend von den Ergebnissen von Liu et al. bestand die Annahme, dass auch ich in den Endothelzelllinien, besonders aber in der dermalen Endothelzelllinie MuMECs, ein signifikant gesteigertes Proliferationspotential unter Stimulation mit Lrg1-WT-Serum beobachten würde. Im Unterschied zu dieser Arbeit verwendeten Liu et al. eine humane dermale Endothelzelllinie, die möglicherweise andere Proliferationseigenschaften aufweist als murine dermale Endothelzellen. Hinzu kommt, dass ich aus oben genannten Gründen mit Serumstimulation arbeitete, während in allen Vergleichsstudien Zellen mit Lrg1-Knockdown oder rekombinantes Lrg1 zur Stimulation der Zellen eingesetzt wurde. Möglicherweise tritt die Veränderung des Proliferationsverhaltens unter Serumstimulation im Vergleich zur direkten Lrg1-Stimulation erst verzögert auf, sodass nach 48 Stunden bei MuMECs und TMNK1-Zellen nur eine Tendenz zu beobachten war, während bei MCECs aufgrund ihres besonderen Angiogenesepotentials bereits ein signifikanter Unterschied erkennbar war. Um dies zu bestätigen, wären Daten von späteren Messzeitpunkten relevant. Diese konnte ich in dieser Arbeit durch Limitationen in der Auswahl der passenden Zellzahl jedoch nicht generieren.

Die Zellen wurden in einer Anzahl von $3 \cdot 10^3$ Zellen pro Well ausgesät. Zum geplanten dritten Messzeitpunkt nach 72 Stunden waren die Zellen der mit Lrg1-WT-serumstimulierten Wells aller drei Zelllinien durch die hohen Proliferationsraten bereits konfluent, sodass es zur Apoptose kam und keine validen Daten mehr generiert werden konnten. Durch das stark unterschiedliche Wachstum der mit Lrg1-/- und Lrg1-WT-Serum stimulierten Zellen konnte ich keine passenden Konditionen für alle Zellen und Serumzusätze herstellen. Eine Reduktion der initialen Zellzahl zugunsten der mit Lrg1-WT-Serum stimulierten Zellen hätte möglicherweise aufgrund der fehlenden Zell-Zellkontakte zu Beginn des Assays zur frühzeitigen Apoptose der mit Lrg1-/-Serum stimulierten Zellen geführt. In vergleichbaren Studien mit anderen Zelllinien wurden signifikante Unterschiede bis 5 Tage nach Beginn des Experiments beobachtet.(76, 88, 91, 92) Möglicherweise hätte sich die gezeigte Tendenz bei MuMECs und TMNK1-Zellen zum dritten Messzeitpunkt nach 72 Stunden verstärkt. Für zukünftige Wiederholungen des Experiments wäre es essenziell, eine passende Zellzahl und

passende Konditionen individuell für jede Zellreihe zu etablieren, um Daten späterer Messzeitpunkte zu generieren. Ein Nachteil wäre die geringere Vergleichbarkeit, da die Versuche pro Zellreihe mit verschiedenen Konditionen durchgeführt werden müssten.

Ein weiterer limitierender Faktor ist das aus verschiedenen Experimenten gewonnene Mausserum. Aufgrund der geringen Menge Serum, die pro Blutentnahme bei einem Tier entnommen werden kann, konnte nicht für alle drei Wiederholungen des MTT-Assays Serum der gleichen Tiere verwendet werden. Unterschiede in der Gesamtproteinkonzentration und damit auch in der Lrg1-Konzentration der Testseren könnten variierende Wachstumsraten zwischen den drei MTT-Assays erklären. Unterschiedliche Wachstumsraten führen zu höherer Varianz der Werte. Die durchgeführte Gesamtproteinmessung ergab trotz Unterschieden in der Serumproteinkonzentration der einzelnen serumgenerierenden Experimente keine Unterschiede in der Proteinkonzentration zwischen gepooltem Lrg1-WT- und Lrg1-/- Serum (Vgl. 4.2; Vgl. Abb. 12). Eine Wiederholung des Experiments mit einer höheren Anzahl an Versuchswiederholungen wäre sinnvoll für die Validierung der hier erkennbaren Tendenz zu reduzierter Proliferation in Abwesenheit von Lrg1 bei MuMECs und TMNK1-Zellen. So könnten mögliche Auswirkungen unterschiedlicher Proteinkonzentrationen im Serum relativiert werden.

Aus den Vergleichsstudien lässt sich schließen, dass Lrg1 einen größeren Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen hat. Der Einfluss von Lrg1 auf die Proliferation von Gewebszellen und Endothelzellen scheint geringer ausgeprägt, beziehungsweise scheint der Effekt zwischen den verschiedenen Zelllinien stärker zu variieren. In meinen Versuchen hatte Lrg1 einen größeren Effekt auf MCECs als auf MuMECs und TMNK1-Zellen. Dies könnte zurückzuführen sein auf unterschiedliches Proliferationsverhalten der Zelllinien, sodass ein Effekt bei MuMECs und TMNK1-Zellen erst später aufgetreten wäre.

5.2.2 Einfluss von Lrg1 auf das Migrationspotential von Endothelzellen

Endothelzellen sind in der Lage, durch Migration neue Gefäßformationen zu bilden und ein bestehendes Gefäßnetzwerk zu erweitern.⁽⁴⁶⁾ Zur Beurteilung des Migrationspotentials von MCECs, MuMECs und TMNK1-Zellen führte ich Wound-healing Assays durch. In allen drei Zelllinien konnte ich signifikant gesteigerte Migration unter Stimulation mit Lrg1-WT-Serum beobachten. Nach meinem aktuellen Wissen gibt es bisher keine Daten zum Einfluss von Serum-Lrg1 auf das Migrationsverhalten von Endothelzellen.

Neben dem Proliferationsverhalten dermalen Endothelzellen und Keratinozyten (Vgl. 5.2.1) beschrieben Liu et al. in ihrer Studie auch deren Migrationspotential unter Stimulation mit Lrg1.

Für die Beurteilung des Migrationspotentials wurde ein Wound-healing Assay mit Lrg1^{-/-}-Keratinocyten und ein Transwell-Migration-Assay mit humanen dermalen Epithelzellen und exogener Stimulation mit rekombinantem Lrg1 durchgeführt. Beide Versuche zeigten signifikant gesteigertes Migrationspotential bei Stimulation mit rekombinantem Lrg1.(76) Ähnliche Ergebnisse zeigten Gao et al. im Wound-healing Assay mit Keratinocyten. Auch sie zeigten signifikant verringertes migratorisches Potential von Keratinocyten ohne Stimulation mit rekombinantem Lrg1.(95) Ebenso wie die beiden genannten Studien konnte auch ich im Wound-healing Assay signifikant gesteigertes Migrationspotential unter Lrg1-Stimulation bei MCECs, MuMECs und TMNK1-Zellen beobachten. Die gemessene offene Fläche war unter Stimulation mit Lrg1-WT-Serum signifikant schneller geschlossen als unter Stimulation mit Lrg1^{-/-}-Serum. Wie auch im Proliferationsassay stimulierte ich die Zellen mit Serum von Lrg1^{-/-} und Lrg1-WT-Mäusen aus inflammatorischem Setting, um den Einfluss von Lrg1 und der Lrg1-induzierten Signalkaskade zu erfassen. Dadurch lässt sich das Migrationsverhalten von Endothelzellen unter pathologischen Bedingungen wie aGvHD realitätsnah *in vitro* darstellen.

Wang et al. konnten in ihrer Studie nachweisen, dass Lrg1 die Zellmigration mesenchymaler Stammzellen bei Osteoarthritis signifikant steigert, während die Proliferation nicht signifikant gesteigert war. Osteoarthritis ist eine degenerativ-entzündliche Erkrankung des Gelenkknorpels, die maßgeblich durch pathologische Neovaskularisation charakterisiert ist.(96) Die Tatsache, dass die Zellmigration auch bei dieser Erkrankung durch Anwesenheit von Lrg1 gesteigert ist, stützt meine Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Lrg1 auf Endothelzellen im inflammatorischen Setting. Insgesamt scheint Lrg1 einen größeren und eindeutigeren Einfluss auf Zellmigration zu haben als auf die Proliferation, das suggerieren die Ergebnisse der Vergleichsstudien und auch die Ergebnisse meiner Proliferations- und Migrationsassays an den drei genannten Zelllinien.

5.2.3 Tube-formation Potential von Endothelzellen unter Lrg1-Stimulation

Der Tube-Formation Assay ist ein in der Literatur häufig beschriebener und etablierter Versuch zur Beurteilung des Angiogenesepotentials und des Potentials zur Bildung neuer Gefäßformationen von Zellen.(75, 79, 81, 82) Die Zellen werden auf Matrigel ausgesät, welches durch temperaturabhängige Polymerisation die Eigenschaften und die Struktur extrazellulärer Matrix annimmt. Als Testmedium diente hier DMEM, dem wie beim MTT- und Wound-healing Assay 2% Lrg1^{-/-} oder Lrg1-WT-Serum hinzugefügt wurde. Im Matrigel bilden die Zellen gefäßnetzartige Strukturen, die Tubes. Die Ausbildung der Tubes kann dann

mit spezieller Software, in diesem Fall Fiji (ImageJ) anhand verschiedener Charakteristika quantifiziert werden.

Der Tube-formation Assay im Rahmen dieser Arbeit konnte nur mit TMNK1-Zellen erfolgreich durchgeführt werden. MCECs und MuMECs zeigten geringes Wachstum und fehlende Ausbildung von Tubes in allen drei Wiederholungen des Experimentes. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Wachstumsfaktoren im Testmedium nicht ausreichten, um das Überleben der Zellen sicherzustellen. Es scheint, als reagierten die humanen TMNK1-Zellen sensibler auf die geringe Menge zugegebenen murinen Serums und bräuchten weniger Wachstumsfaktoren für die Ausbildung von Tubes, als die murinen Zelllinien. Da dieses Phänomen trotz gleicher Versuchskonditionen nur im Tube-Formation Assay auftrat, liegt die Vermutung nahe, dass Lrg1 einen größeren Einfluss auf Proliferation und Migration von Endothelzellen hat als auf deren Tube-formation Potential. Vermutlich ist für die Beeinflussung des Tube-formation Verhaltens die Exposition gegenüber höheren Konzentrationen von Lrg1, anderen inflammatorischen Zytokinen und weiteren Wachstumsfaktoren der Signalkaskade notwendig.

Mit TMNK1-Zellen konnte ich den Tube-formation Assay erfolgreich durchführen. Mit Fiji (ImageJ) wurden die Charakteristika Anzahl der Nodes, Junctions, Meshes, Segments, Branches und Länge der Tubes gemessen. Bei allen diesen Parametern zeigten sich höhere Werte bei Zellen, die mit Lrg1-WT-Serum stimuliert wurden. Die Unterschiede waren nicht signifikant.

Wang et al. führten den Tube-Formation Assay mit humanen Endothelzellen der Umbilikalvene (HUVEC) durch und stimulierten diese mit rekombinantem Lrg1. Sie beobachteten signifikant gesteigerte Anzahl an branching points und gesteigerte Länge der tubes (Vgl. 3.2.2.3), verglichen mit HUVEC ohne Lrg1-Stimulation.⁽⁵⁵⁾ Liu et al. führten den Tube-formation-Assay mit HDMEC durch. Diese wurden ebenfalls mit rekombinantem Lrg1 stimuliert. Sie konnten eine signifikant höhere Anzahl an junctions und gesteigerte Länge der tubes bei Stimulation mit Lrg1 beobachten.⁽⁷⁶⁾

Die Ergebnisse meines Tube-formation Assays mit TMNK1-Zellen zeigten die gleiche Tendenz, wie die der genannten Vergleichsstudien. Die fehlende Signifikanz der Ergebnisse könnte zurückzuführen sein auf die große Varianz in der Ausprägung der analysierten Merkmale zwischen den drei Wiederholungen des Assays. Möglicherweise könnte eine größere Anzahl an Versuchswiederholungen den von uns beschriebenen Trend zum gesteigerten Tube-formation Potential der TMNK1-Zellen bei Lrg1-Exposition validieren.

Im Unterschied zu den beiden oben genannten Referenzstudien nutzte ich als Trägermedium für das murine Serum DMEM. Nur zum Aussäen der Zellen wurde Standard-Nährmedium mit 10% FCS genutzt, um das Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Dieses wurde daraufhin abgenommen und durch das Testmedium aus DMEM und dem entsprechenden murinen Serum ersetzt (Vgl. 3.2.2.3). In den Vergleichsstudien wurde als Trägersubstanz für das rekombinante Lrg1 EBM2-Medium genutzt. Die Zusätze zur Herstellung dieses Mediums enthalten Wachstumsfaktoren und Serum, welche das Überleben der Zellen sichern und die Ausbildung der tubes unterstützen sollen. Ich entschied mich für DMEM als Trägermedium, um die Effekte des zugegebenen murinen Serums von Lrg1-WT- und Lrg1-/-Mäusen nicht durch Zusätze im Trägermedium zu verfälschen. Die Verwendung von EBM2-Nährmedium war keine Option für den Tube-formation Assay im Rahmen dieser Arbeit, da das im Medium enthaltene Serum die Effekte des murinen Testserums beeinflussen oder überlagern würde.

Darüber hinaus wurde auch beim Tube-formation Assay aus den bereits beschriebenen Gründen (Vgl. 5.2.1; Vgl. 5.2.2) Serum verschiedener muriner *in vivo* Experimente genutzt. Auch das könnte das Tube-formation Verhalten der Zellen beeinflusst haben. Die Verwendung des Serums verschiedener Tiere für die Versuchswiederholungen könnte auch die große Varianz in den Ergebnissen des Tube-formation Assays und damit die fehlende Signifikanz bei drei Versuchswiederholungen erklären.

Meine Ergebnisse suggerieren, dass Lrg1 das Tube-formation Potential von TMNK1-Zellen positiv beeinflusst. Außerdem vermute ich, dass der Einfluss von Lrg1 auf das Tube-formation Potential von Endothelzellen geringer ist als auf das Migrations- und Proliferationspotential. Aufgrund der oben genannten Gründe sollte diese Annahme jedoch in zukünftigen Projekten noch einmal überprüft und validiert werden.

5.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte ich nachweisen, dass die Konzentration des Glykoproteins Lrg1 im humanen Serum im Rahmen der aGvHD nach allo-HSZT signifikant erhöht ist, verglichen mit der Kontrollgruppe ohne aGvHD. Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass Lrg1 an der Pathogenese der aGvHD durch Induktion pathologischer Angiogenese beteiligt ist. Ein nächster Schritt wäre die Fortführung der Blutentnahmen der Patient:innen nach allo-HSZT zur Vergrößerung der Stichprobe, sowie das Generieren von Proben mehreren Zentren zur Validierung der Resultate. Auf diese Weise könnte auch eine Korrelation zwischen Schweregrad der aGvHD und Höhe der Lrg1-Konzentration im Serum untersucht werden.

Wang et al. setzten einen Antikörper gegen Lrg1 in ihrer Studie bereits erfolgreich im Mausmodell bei Retinopathie ein. Er konnte die Aktivierung pathologischer Angiogenese signifikant reduzieren.(55) Die gleiche Arbeitsgruppe hat mittlerweile einen humanisierten anti-Lrg1 Antikörper entwickelt. Da Lrg1 ein vielversprechender Angriffspunkt spezifisch in der Signalkaskade der pathologischen Angiogenese ist, könnte ein Antikörper auch in der Therapie der aGvHD von großem Nutzen sein. Bei vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde ein spezifischer Lrg1-Antagonist bereits *in vivo* in aGvHD-Experimenten verwendet, führte jedoch nicht zu einer signifikant geringeren aGvHD-Ausprägung. Mögliche Veränderungen für zukünftige Experimente sind Anpassungen des Behandlungsschemas, der injizierten Dosis sowie der Applikationsroute.

Weiterhin konnte ich nachweisen, dass Lrg1 das Angiogenesepotential von Endothelzellen *in vitro* steigert. Es sollten weitere Wiederholungen des MTT-Assays und des Tube-formation Assays durchgeführt werden, um die dargestellten Tendenzen in diesen beiden Versuchen zu bestätigen.

Um den Effekt von Lrg1 auf Endothelzellen besser herauszuarbeiten, kann mit dem CRISPR/Cas9-System ein direkter Lrg1-Knockout in Endothelzellen induziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass auf diese Weise der Effekt von Lrg1 auf funktionelle Eigenschaften der Endothelzellen wie Proliferation, Migration und Tube-formation Potential noch deutlicher erkennbar wäre. Erste Versuche dazu in unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass Endothelzellen mit Lrg1-Knockout durch das CRISPR/Cas9-System signifikant langsames Wachstum aufweisen als Endothelzellen ohne Knockout. Die weitere Untersuchung des Proliferations-, Migrations- und Tube-formation Potentials dieser Lrg1-/- Endothelzellen ist geplant.

Auch in den *in vitro* Experimenten wäre der Einsatz eines Lrg1-Antikörpers an Endothelzellen sinnvoll. In diesem Setting könnte die Wirkung des Antikörpers auf Lrg1 und auf die funktionellen Eigenschaften der Endothelzellen *in vitro* untersucht werden.

Insgesamt bekräftigen die Ergebnisse der Messung der Lrg1-Konzentration im Serum in Kombination mit den Ergebnissen der *in vitro* Assays meine Hypothese, dass Lrg1 an der Induktion pathologischer Angiogenese bei aGvHD beteiligt ist. Diese aktuelle Arbeit trägt dazu bei, eine solide Grundlage für die translationale Entwicklung einer Lrg1-basierten Therapiemöglichkeit bei aGvHD zu schaffen.

6 Literaturverzeichnis

1. Penack O, Peczynski C, Mohty M, Yakoub-Agha I, Styczynski J, Montoto S, Duarte RF, Kröger N, Schoemans H, Koenecke C, Peric Z, Basak GW. How much has allogeneic stem cell transplant-related mortality improved since the 1980s? A retrospective analysis from the EBMT. *Blood Adv.* 2020;4(24):6283-90.
2. Copelan EA. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine.* 2006;354(17):1813-26.
3. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2006;354(17):1813-26.
4. Simpson E, Dazzi F. Bone Marrow Transplantation 1957-2019. *Front Immunol.* 2019;10:1246.
5. Thomas ED. A history of haemopoietic cell transplantation. *Br J Haematol.* 1999;105(2):330-9.
6. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, Basak GW, de la Cámara R, Corbacioglu S, Dolstra H, Duarte R, Glass B, Greco R, Lankester AC, Mohty M, Peffault de Latour R, Snowden JA, Yakoub-Agha I, Kröger N. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. *Bone Marrow Transplant.* 2021.
7. Hemmati PG. Allogene Stammzelltransplantation. *best practice onkologie.* 2018;13(3):128-36.
8. Çiftçiler R, Göker H, Demiroğlu H, Aladağ E, Aksu S, Haznedaroğlu İ C, Sayinalp N, Özcebe O, Tekin F, Büyükaşık Y. Comparison of Myeloablative Versus Reduced-Intensity Conditioning Regimens for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia: A Cohort Study. *Turk J Haematol.* 2019;36(2):88-96.
9. Jethava YS, Sica S, Savani B, Socola F, Jagasia M, Mohty M, Nagler A, Bacigalupo A. Conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplants in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2017;52(11):1504-11.
10. Mackall C, Fry T, Gress R, Peggs K, Storek J, Toubert A. Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. *Bone Marrow Transplant.* 2009;44(8):457-62.

11. Barriga F, Ramírez P, Wietstruck A, Rojas N. Hematopoietic stem cell transplantation: clinical use and perspectives. *Biol Res.* 2012;45(3):307-16.
12. Hahn T, McCarthy PL, Hassebroek A, Bredeson C, Gajewski JL, Hale GA, Isola LM, Lazarus HM, Lee SJ, LeMaistre CF, Loberiza F, Maziarz RT, Rizzo JD, Joffe S, Parsons S, Majhail NS. Significant Improvement in Survival After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation During a Period of Significantly Increased Use, Older Recipient Age, and Use of Unrelated Donors. *Journal of Clinical Oncology.* 2013;31(19):2437-49.
13. Kao RL, Holtan SG. Host and Graft Factors Impacting Infection Risk in Hematopoietic Cell Transplantation. *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33(2):311-29.
14. Majhail NS. Long-term complications after hematopoietic cell transplantation. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2017;10(4):220-7.
15. Penack O, Marchetti M, Ruutu T, Aljurf M, Bacigalupo A, Bonifazi F, Ciceri F, Cornelissen J, Malladi R, Duarte RF, Giebel S, Greinix H, Holler E, Lawitschka A, Mielke S, Mohty M, Arat M, Nagler A, Passweg J, Schoemans H, Socié G, Solano C, Vrhovac R, Zeiser R, Kröger N, Basak GW. Prophylaxis and management of graft versus host disease after stem-cell transplantation for haematological malignancies: updated consensus recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet Haematol.* 2020;7(2):e157-e67.
16. Murray J, Stringer J, Hutt D. Graft-Versus-Host Disease (GvHD). In: Kenyon M, Babic A, editors. *The European Blood and Marrow Transplantation Textbook for Nurses: Under the Auspices of EBMT.* Cham (CH): Springer
Copyright 2018, EBMT and the Author(s). 2018. p. 221-51.
17. Trajkovska I, Georgievski B, Cevreska L, Gacovski A, Hasan T, Nedeska-Minova N. Early and Late Complications in Patients with Allogeneic Transplantation of Hematopoietic Stem Cell - Case Report. *Open Access Maced J Med Sci.* 2017;5(3):340-3.
18. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2565-79.
19. Teshima T, Reddy P, Zeiser R. Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(1):11-6.

20. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:35.
21. Schoemans HM, Lee SJ, Ferrara JL, Wolff D, Levine JE, Schultz KR, Shaw BE, Flowers ME, Ruutu T, Greinix H, Holler E, Basak G, Duarte RF, Pavletic SZ. EBMT-NIH-CIBMTR Task Force position statement on standardized terminology & guidance for graft-versus-host disease assessment. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53(11):1401-15.
22. Ball LM, Egeler RM. Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41 Suppl 2:S58-64.
23. Petersdorf EW. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(5):588-93.
24. Dickinson AM, Charron D. Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(5):517-25.
25. Aladağ E, Kelkitli E, Göker H. Acute Graft-Versus-Host Disease: A Brief Review. *Turk J Haematol.* 2020;37(1):1-4.
26. Lee SE, Cho BS, Kim JH, Yoon JH, Shin SH, Yahng SA, Eom KS, Kim YJ, Kim HJ, Lee S, Min CK, Cho SG, Kim DW, Lee JW, Min WS, Park CW. Risk and prognostic factors for acute GVHD based on NIH consensus criteria. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(4):587-92.
27. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009;373(9674):1550-61.
28. Moreno DF, Cid J. Graft-versus-host disease. *Med Clin (Barc).* 2019;152(1):22-8.
29. Ramachandran V, Kolli SS, Strowd LC. Review of Graft-Versus-Host Disease. *Dermatol Clin.* 2019;37(4):569-82.
30. Häusermann P, Walter RB, Halter J, Biedermann BC, Tichelli A, Itin P, Gratwohl A. Cutaneous graft-versus-host disease: a guide for the dermatologist. *Dermatology.* 2008;216(4):287-304.
31. Naymagon S, Naymagon L, Wong SY, Ko HM, Renteria A, Levine J, Colombel JF, Ferrara J. Acute graft-versus-host disease of the gut: considerations for the gastroenterologist. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(12):711-26.

32. Dignan FL, Clark A, Amrolia P, Cornish J, Jackson G, Mahendra P, Scarisbrick JJ, Taylor PC, Hadzic N, Shaw BE, Potter MN, Haematology obotH-oTFotBCfSi, Blood tBSf, Transplantation M. Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. *British Journal of Haematology*. 2012;158(1):30-45.
33. Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, Chanswangphuwana C, Efebera YA, Holler E, Litzow M, Ordemann R, Qayed M, Renteria AS, Reshef R, Wöfl M, Chen YB, Goldstein S, Jagasia M, Locatelli F, Mielke S, Porter D, Schechter T, Shekhovtsova Z, Ferrara JL, Levine JE. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(1):4-10.
34. Strong Rodrigues K, Oliveira-Ribeiro C, de Abreu Fiuza Gomes S, Knobler R. Cutaneous Graft-Versus-Host Disease: Diagnosis and Treatment. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2018;19(1):33-50.
35. Nassereddine S, Rafei H, Elbahesh E, Tabbara I. Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. *Anticancer Res*. 2017;37(4):1547-55.
36. Stoneman VE, Bennett MR. Role of Fas/Fas-L in vascular cell apoptosis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009;53(2):100-8.
37. Lord SJ, Rajotte RV, Korbitt GS, Bleackley RC. Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev*. 2003;193:31-8.
38. Levine JE. Implications of TNF- α in the pathogenesis and management of GVHD. *Int J Hematol*. 2011;93(5):571-7.
39. Zeiser R, Wolff D, Scheid C, Luft T, Greinix H, Dreger P, Finke J, Holler E. Graft-versus-Host Erkrankung, akut 2020. updated 31.01.2020. Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/graft-versus-host-erkrankung-akut/@@guideline/html/index.html>. Access Date: 25.01.2021.
40. Khaled Y, Reddy P, Krijanovski O. Emerging drugs for acute graft-versus-host disease. *Expert Opinion on Emerging Drugs*. 2009;14(2):219-32.
41. Jamil MO, Mineishi S. State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment. *Int J Hematol*. 2015;101(5):452-66.

42. Jousseaume AM, Kirchhof B, Gottstein C. [Molecular mechanisms of vasculogenesis and angiogenesis. What regulates vascular growth?]. *Ophthalmologie*. 2003;100(4):284-91.
43. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-4.
44. Tang DG, Conti CJ. Endothelial cell development, vasculogenesis, angiogenesis, and tumor neovascularization: an update. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30(1):109-17.
45. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000;6(4):389-95.
46. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298-307.
47. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*. 2003;9(6):653-60.
48. Chambers SE, O'Neill CL, O'Doherty TM, Medina RJ, Stitt AW. The role of immune-related myeloid cells in angiogenesis. *Immunobiology*. 2013;218(11):1370-5.
49. Fainaru O, Almog N, Yung CW, Nakai K, Montoya-Zavala M, Abdollahi A, D'Amato R, Ingber DE. Tumor growth and angiogenesis are dependent on the presence of immature dendritic cells. *FASEB J*. 2010;24(5):1411-8.
50. Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 1994;55(3):410-22.
51. Szade A, Grochot-Przeczek A, Florczyk U, Jozkowicz A, Dulak J. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IUBMB Life*. 2015;67(3):145-59.
52. Riesner K, Shi Y, Jacobi A, Kräter 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.
53. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003;425(6958):577-84.
54. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res*. 2005;65(3):599-608.

55. Wang X, Abraham S, McKenzie JAG, Jeffs N, Swire M, Tripathi VB, Luhmann UFO, Lange CAK, Zhai Z, Arthur HM, Bainbridge J, Moss SE, Greenwood J. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- β signalling. *Nature*. 2013;499(7458):306-11.
56. Niu G, Chen X. Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy. *Curr Drug Targets*. 2010;11(8):1000-17.
57. Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017;20(4):409-26.
58. Roodhart JM, Langenberg MH, Witteveen E, Voest EE. The molecular basis of class side effects due to treatment with inhibitors of the VEGF/VEGFR pathway. *Curr Clin Pharmacol*. 2008;3(2):132-43.
59. van Heeckeren WJ, Ortiz J, Cooney MM, Remick SC. Hypertension, proteinuria, and antagonism of vascular endothelial growth factor signaling: clinical toxicity, therapeutic target, or novel biomarker? *J Clin Oncol*. 2007;25(21):2993-5.
60. Hong Q, Zhang L, Fu J, Verghese DA, Chauhan K, Nadkarni GN, Li Z, Ju W, Kretzler M, Cai GY, Chen XM, D'Agati VD, Coca SG, Schlondorff D, He JC, Lee K. LRG1 Promotes Diabetic Kidney Disease Progression by Enhancing TGF- β -Induced Angiogenesis. *J Am Soc Nephrol*. 2019;30(4):546-62.
61. Zhang J, Zhu L, Fang J, Ge Z, Li X. LRG1 modulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in colorectal cancer via HIF-1 α activation. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016;35:29.
62. Fujimoto M, Serada S, Suzuki K, Nishikawa A, Ogata A, Nanki T, Hattori K, Kohsaka H, Miyasaka N, Takeuchi T, Naka T. Leucine-rich α 2 -glycoprotein as a potential biomarker for joint inflammation during anti-interleukin-6 biologic therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(8):2056-60.
63. Hashida T, Nakada TA, Satoh M, Tomita K, Kawaguchi R, Nomura F, Oda S. Proteome analysis of hemofilter adsorbates to identify novel substances of sepsis: a pilot study. *J Artif Organs*. 2017;20(2):132-7.

-
64. Serada S, Fujimoto M, Ogata A, Terabe F, Hirano T, Iijima H, Shinzaki S, Nishikawa T, Ohkawara T, Iwahori K, Ohguro N, Kishimoto T, Naka T. iTRAQ-based proteomic identification of leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(4):770-4.
 65. Serada S, Fujimoto M, Terabe F, Iijima H, Shinzaki S, Matsuzaki S, Ohkawara T, Nezu R, Nakajima S, Kobayashi T, Plevy SE, Takehara T, Naka T. Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(11):2169-79.
 66. Sorrow ML, Storb RF, Sandmaier BM, Maziarz RT, Pulsipher MA, Maris MB, Bhatia S, Ostronoff F, Deeg HJ, Syrjala KL, Estey E, Maloney DG, Appelbaum FR, Martin PJ, Storer BE. Comorbidity-age index: a clinical measure of biologic age before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2014;32(29):3249-56.
 67. Gratwohl A. The EBMT risk score. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47(6):749-56.
 68. Yıldız Çeltak N, Süren M, Demir O, Okan İ. Karnofsky Performance Scale validity and reliability of Turkish palliative cancer patients. *Turk J Med Sci.* 2019;49(3):894-8.
 69. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J, Jr., Crawford JM, Ferrara JL. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood.* 1996;88(8):3230-9.
 70. Abcam©. Human LRG ELISA Kit (LRG1) (ab260066). Available from: <https://www.abcam.com/human-lrg-elisa-kit-lrg1-ab260066.html>. Access Date: 22.06.2021.
 71. Lipps C, Klein F, Wahlicht T, Seiffert V, Butueva M, Zauers J, Truschel T, Luckner M, Köster M, MacLeod R, Pezoldt J, Hühn J, Yuan Q, Müller PP, Kempf H, Zweigerdt R, Dittrich-Breiholz O, Pufe T, Beckmann R, Drescher W, Riancho J, Sañudo C, Korff T, Opalka B, Rebmann V, Göthert JR, Alves PM, Ott M, Schucht R, Hauser H, Wirth D, May T. Expansion of functional personalized cells with specific transgene combinations. *Nature Communications.* 2018;9(1):994.
 72. Cloudclone©. ELISA Kit for Leucine Rich Alpha-2-Glycoprotein 1 (LRG1) (SEB934Ra). Available from: <http://www.cloud-clone.com/products/SEB934Ra.html>. Access Date: 22.06.2021.

-
73. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(6).
 74. Martinotti S, Ranzato E. Scratch Wound Healing Assay. *Methods Mol Biol.* 2020;2109:225-9.
 75. Ponce ML. Tube formation: an in vitro matrigel angiogenesis assay. *Methods Mol Biol.* 2009;467:183-8.
 76. Liu C, Teo MHY, Pek SLT, Wu X, Leong ML, Tay HM, Hou HW, Ruedl C, Moss SE, Greenwood J, Tavintharan S, Hong W, Wang X. A Multifunctional Role of Leucine-Rich α -2-Glycoprotein 1 in Cutaneous Wound Healing Under Normal and Diabetic Conditions. *Diabetes.* 2020;69(11):2467-80.
 77. Wang CH, Li M, Liu LL, Zhou RY, Fu J, Zhang CZ, Yun JP. LRG1 expression indicates unfavorable clinical outcome in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2015;6(39):42118-29.
 78. Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, Rasband W, Cuendet M, Uzan G, Albanese P. Angiogenesis Analyzer for ImageJ - A comparative morphometric analysis of "Endothelial Tube Formation Assay" and "Fibrin Bead Assay". *Sci Rep.* 2020;10(1):11568.
 79. Gentile MT, Pastorino O, Bifulco M, Colucci-D'Amato L. HUVEC Tube-formation Assay to Evaluate the Impact of Natural Products on Angiogenesis. *J Vis Exp.* 2019(148).
 80. Carpentier G. ImageJ contribution: Angiogenesis Analyzer. 2012. Available from: http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzer-for-ImageJ&artpage=3-6&lang=en#outil_sommaire_3,. Access Date: 19.02.2021.

81. Nowak-Sliwinska P, Alitalo K, Allen E, Anisimov A, Aplin AC, Auerbach R, Augustin HG, Bates DO, van Beijnum JR, Bender RHF, Bergers G, Bikfalvi A, Bischoff J, Böck BC, Brooks PC, Bussolino F, Cakir B, Carmeliet P, Castranova D, Cimpean AM, Cleaver O, Coukos G, Davis GE, De Palma M, Dimberg A, Dings RPM, Djonov V, Dudley AC, Dufton NP, Fendt SM, Ferrara N, Fruttiger M, Fukumura D, Ghesquière B, Gong Y, Griffin RJ, Harris AL, Hughes CCW, Hultgren NW, Iruela-Arispe ML, Irving M, Jain RK, Kalluri R, Kalucka J, Kerbel RS, Kitajewski J, Klaassen I, Kleinmann HK, Koolwijk P, Kuczynski E, Kwak BR, Marien K, Melero-Martin JM, Munn LL, Nicosia RF, Noel A, Nurro J, Olsson AK, Petrova TV, Pietras K, Pili R, Pollard JW, Post MJ, Quax PHA, Rabinovich GA, Raica M, Randi AM, Ribatti D, Ruegg C, Schlingemann RO, Schulte-Merker S, Smith LEH, Song JW, Stacker SA, Stalin J, Stratman AN, Van de Velde M, van Hinsbergh VWM, Vermeulen PB, Waltenberger J, Weinstein BM, Xin H, Yetkin-Arik B, Yla-Herttuala S, Yoder MC, Griffioen AW. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*. 2018;21(3):425-532.
82. McGonigle S, Shifrin V. In vitro assay of angiogenesis: inhibition of capillary tube formation. *Curr Protoc Pharmacol*. 2008;Chapter 12:Unit12.
83. Shinzaki S, Matsuoka K, Iijima H, Mizuno S, Serada S, Fujimoto M, Arai N, Koyama N, Morii E, Watanabe M, Hibi T, Kanai T, Takehara T, Naka T. Leucine-rich Alpha-2 Glycoprotein is a Serum Biomarker of Mucosal Healing in Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis*. 2017;11(1):84-91.
84. Yoshimura T, Mitsuyama K, Sakemi R, Takedatsu H, Yoshioka S, Kuwaki K, Mori A, Fukunaga S, Araki T, Morita M, Tsuruta K, Yamasaki H, Torimura T. Evaluation of Serum Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein as a New Inflammatory Biomarker of Inflammatory Bowel Disease. *Mediators Inflamm*. 2021;2021:8825374.
85. Shimizu M, Inoue N, Mizuta M, Nakagishi Y, Yachie A. Serum Leucine-Rich α 2-Glycoprotein as a Biomarker for Monitoring Disease Activity in Patients with Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Immunol Res*. 2019;2019:3140204.
86. Rainer TH, Leung LY, Chan C, Leung YK, Cheng NM, Lai P, Cheung YS, Graham CA. Circulating human leucine-rich α -2-glycoprotein 1 mRNA and protein levels to detect acute appendicitis in patients with acute abdominal pain. *Clin Biochem*. 2017;50(9):485-90.

87. Andersen JD, Boylan KL, Jemmerson R, Geller MA, Misemer B, Harrington KM, Weivoda S, Witthuhn BA, Argenta P, Vogel RI, Skubitz AP. Leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 is upregulated in sera and tumors of ovarian cancer patients. *J Ovarian Res.* 2010;3:21.
88. Li Z, Zeng C, Nong Q, Long F, Liu J, Mu Z, Chen B, Wu D, Wu H. Exosomal Leucine-Rich-Alpha2-Glycoprotein 1 Derived from Non-Small-Cell Lung Cancer Cells Promotes Angiogenesis via TGF- β Signal Pathway. *Mol Ther Oncolytics.* 2019;14:313-22.
89. Naka T, Fujimoto M. LRG is a novel inflammatory marker clinically useful for the evaluation of disease activity in rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease. *Immunol Med.* 2018;41(2):62-7.
90. Yamamoto M, Takahashi T, Serada S, Sugase T, Tanaka K, Miyazaki Y, Makino T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Nakajima K, Takiguchi S, Naka T, Mori M, Doki Y. Overexpression of leucine-rich α 2-glycoprotein-1 is a prognostic marker and enhances tumor migration in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2017;108(10):2052-60.
91. Zhong D, Zhao S, He G, Li J, Lang Y, Ye W, Li Y, Jiang C, Li X. Stable knockdown of LRG1 by RNA interference inhibits growth and promotes apoptosis of glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Tumour Biol.* 2015;36(6):4271-8.
92. Zhou Y, Zhang X, Zhang J, Fang J, Ge Z, Li X. LRG1 promotes proliferation and inhibits apoptosis in colorectal cancer cells via RUNX1 activation. *PLoS One.* 2017;12(4):e0175122.
93. He L, Huang X, Kanisicak O, Li Y, Wang Y, Li Y, Pu W, Liu Q, Zhang H, Tian X, Zhao H, Liu X, Zhang S, Nie Y, Hu S, Miao X, Wang QD, Wang F, Chen T, Xu Q, Lui KO, Molkenstein JD, Zhou B. Preexisting endothelial cells mediate cardiac neovascularization after injury. *J Clin Invest.* 2017;127(8):2968-81.
94. Li Z, Solomonidis EG, Meloni M, Taylor RS, Duffin R, Dobie R, Magalhaes MS, Henderson BEP, Louwe PA, D'Amico G, Hovalala-Dilke KM, Shah AM, Mills NL, Simons BD, Gray GA, Henderson NC, Baker AH, Brittan M. Single-cell transcriptome analyses reveal novel targets modulating cardiac neovascularization by resident endothelial cells following myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2019;40(30):2507-20.

95. Gao Y, Xie Z, Ho C, Wang J, Li Q, Zhang Y, Zhou J. LRG1 Promotes Keratinocyte Migration and Wound Repair through Regulation of HIF-1 α Stability. *J Invest Dermatol.* 2020;140(2):455-64.e8.
96. Wang Y, Xu J, Zhang X, Wang C, Huang Y, Dai K, Zhang X. TNF- α -induced LRG1 promotes angiogenesis and mesenchymal stem cell migration in the subchondral bone during osteoarthritis. *Cell Death Dis.* 2017;8(3):e2715.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nora Marie Uhlig, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1 bei akuter Graft-versus-Host Erkrankung: Messung von Serumkonzentrationen und funktionelle Analysen

Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1 in acute Graft-versus-Host Disease: measurement of serum concentrations and functional Analysis

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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Curriculum vitae

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

Danksagung

Ich bedanke mich bei meiner Betreuerin Sarah Mertlitz, meinem Betreuer Prof. Dr. Olaf Penack und der gesamten Arbeitsgruppe für die großartige Betreuung, Unterstützung und den ständigen Austausch während des gesamten Promotionsprozesses.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und allen Menschen, die mich in dieser Phase und darüber hinaus mit viel Geduld und Vertrauen begleitet, ermutigt und unterstützt haben.

Bescheinigung des akkreditierten Statistikers



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Uhlig, Nora Marie
Emailadresse: nora-marie.uhlig@charite.de
Matrikelnummer: 222356
PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. Olaf Penack
Promotionsinstitution / Klinik: CC14

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau *Nora Marie Uhlig* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 16.02.2021
- Termin 2: 06.07.2021

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Vergleich der zwei zeitlichen Kurven zur Heilung von Zellen sollte, wie ursprünglich geplant, mittels statistischem Test für einen Zeitpunkt durchgeführt werden. Alternativ wäre ein Mixed Linear Model Ansatz denkbar. Hiervon wird aber wegen der Voraussetzung der Linearität und der relativ hohen Modellkomplexität im Vergleich zur Fallzahl abgeraten.
- Zum Vergleich von zwei gematchten Gruppen sollte ein Test für verbundene Stichproben verwendet werden.
- Da zu mehreren Zeitpunkten Gruppenvergleiche stattfinden, sollte im Methodikteil auf den explorativen Charakter der Analysen hingewiesen werden und darauf, dass nicht für multiples Testen adjustiert wird.

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 06.07.2021

Name des Beraters: Björn Bokelmann

Bjoern Bokelmann
Digital unterschrieben von Bjoern
Bokelmann
Datum: 2021.07.06 09:50:26 +02'00'
Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

