

Aus dem Lehrstuhl für Augenheilkunde  
Prof. Dr. med. Horst Helbig  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**Analyse der Tränenflüssigkeit von Patienten vor und nach allogener  
Stammzelltransplantation zur Detektion neuer Biomarker der *Graft-versus-Host*  
Erkrankung**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Markus Englbrecht

2020



Aus dem Lehrstuhl für Augenheilkunde  
Prof. Dr. med. Horst Helbig  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**Analyse der Tränenflüssigkeit von Patienten vor und nach allogener  
Stammzelltransplantation zur Detektion neuer Biomarker der *Graft-versus-Host*  
Erkrankung**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Markus Englbrecht

2020

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Horst Helbig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniel Wolff

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2020

## Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis .....	VII
II.	Abbildungsverzeichnis .....	IX
III.	Tabellenverzeichnis.....	X
1	Einleitung .....	1
1.1	Die Stammzelltransplantation als Ausgangspunkt der <i>graft-versus-host-disease</i> (GvHD).....	1
1.2	Der <i>graft-versus-leukemia</i> (GvL) Effekt .....	2
1.3	Akute und chronische GvHD .....	3
1.4	Pathophysiologie der akuten GvHD .....	3
1.5	Pathophysiologie der chronischen GvHD .....	4
1.6	Therapie und Prophylaxe der GvHD .....	5
1.7	Okuläre GvHD .....	5
1.7.1	Diagnostik der okulären GvHD .....	6
1.7.2	Therapie der okulären GvHD .....	6
1.7.3	Biomarker der okulären GvHD .....	7
1.8	Komplementsystem und GvHD .....	9
1.9	Tränenfilmanalyse mittels Multiplex Mikropartikel ( <i>Bead</i> ) Assay .....	11
1.10	Zielsetzung .....	13
2	Material und Methoden .....	14
2.1	Material .....	14
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Klinische Untersuchungsmethoden .....	20
2.2.2	Proteinextraktion aus Schirmer-Proben.....	21
2.2.3	SDS-PAGE.....	22
2.2.4	Coomassie Blau Färbung.....	22
2.2.5	Schnelle Silberfärbung nach Budowle .....	22
2.2.6	<i>Bead</i> -Kopplung .....	23
2.2.7	Biotinylierung Ziege anti-Properdin.....	23
2.2.8	Multiplex-Assay .....	23
2.2.9	ELISA.....	24
2.2.10	Statistik.....	25
3	Ergebnisse .....	26
3.1	Patientencharakteristika und klinische Untersuchungsdaten.....	26
3.1.1	Charakterisierung der Patientenkohorte .....	26
3.1.2	Analyse der klinischen Untersuchungsergebnisse.....	27
3.2	Analyse der Tränenfilme .....	28

3.2.1	Überprüfung der Proteinisolationmethode.....	28
3.2.2	Überprüfung der Reproduzierbarkeit der verwendeten Assays.....	31
3.2.3	Vergleich der gemessenen Zytokin- und Chemokin-Werte zwischen Erstuntersuchung und Folgeuntersuchung.....	33
3.2.4	Reevaluierung der Proteinisolationmethode .....	38
3.3	Etablierung eines Multiplex-Assays.....	39
3.3.1	Auswahl des Fängerantikörpers .....	39
3.3.2	Auswahl der Detektionsbedingungen.....	40
3.3.3	Auswahl des Streptavidin-Phycoerythrin .....	42
3.3.4	Spezifitätsanalyse .....	45
3.3.5	Sensitivitätsbestimmung.....	46
3.3.6	Varianzanalyse .....	48
3.3.7	Zusammenfassung des C3a, C5a und Properdin Assays.....	48
4	Diskussion.....	50
4.1	Klinische Untersuchung .....	50
4.2	Studiensetting .....	52
4.3	Analyse der Schirmer-Proben.....	52
4.3.1	Vergleich verschiedener Proteingewinnungsmethoden.....	52
4.3.2	Analyse der untersuchten Biomarker .....	55
4.4	Etablierung eines Multiplex-Assays.....	58
4.4.1	Vergleich des Detektionsbereichs des C3a, C5a, Properdin Multiplex-Assay mit bereits etablierten Nachweisverfahren .....	58
4.4.2	Spezifität und Varianz des C3a, C5a, Properdin Multiplex-Assays .....	60
4.4.3	Durchführbarkeit in verschiedenen Probenmaterialien .....	61
5	Zusammenfassung.....	62
6	Literaturverzeichnis.....	64
7	Danksagung.....	73
8	Lebenslauf .....	74

## I. Abkürzungsverzeichnis

aGvHD	<i>acute-graft-versus-host-disease/</i> akute Transplantat gegen Empfänger Reaktion
ALL	akute lymphatische Leukämie
Ak	Antikörper
AML	akute myeloische Leukämie
AU	<i>arbitrary unit</i>
Bead	Mikropartikel
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFP	<i>complement factor properdin</i>
cGvHD	<i>chronic-graft-versus-host-disease/</i> chronische Transplantat gegen Empfänger Reaktion
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
CXCL	<i>C-X-C motif ligand</i>
dpl	depletiert
E	Erstuntersuchung
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor/</i> Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FU	Folgeuntersuchung
GvH	<i>graft-versus-host/</i> Transplantat gegen Empfänger
GvHD	<i>graft-versus-host-disease/</i> Transplantat gegen Empfänger Reaktion
GvL	<i>graft versus leukemia/</i> Transplantat gegen Leukämie
HNS	humanes Serum
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LIPCOF	lidkantenparallele, konjunktivale Falte
LOD	<i>limit of detection/</i> untere Nachweisgrenze

mAk	Maus-Antikörper
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
miHAg	<i>minor histocompatibility antigens</i>
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MPS	myeloproliferatives Syndrom
MTX	Methotrexat
NHL	non-Hodgkin-Lymphom
NIH	<i>National Institute of Health</i> / Nationales Gesundheitsinstitut
NK	natürliche Killerzelle
OSDI	<i>Ocular Surface Disease Index</i> / Augenoberflächen Krankheitsindex
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
ROC	<i>receiver operating characteristic</i> / Grenzwertoptimierungskurve
RT	Raumtemperatur
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SZT	Stammzelltransplantation
TBI	<i>total body irradiation</i> / Ganzkörperbestrahlung
TBUT	<i>tear-breakup-time</i> / Tränenfilmaufrisszeit
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$

## II. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b> Prinzip eines Multiplex <i>Bead</i> Assays.....	<b>12</b>
<b>Abbildung 2.</b> Nachweis isolierter Proteine aus Schirmer-Proben mittels SDS-PAGE .....	<b>29</b>
<b>Abbildung 3.</b> Beziehung zwischen Schirmer-Laufweite und gemessener Gesamteproteinkonzentration .....	<b>30</b>
<b>Abbildung 4.</b> Reproduzierbarkeit der Standardkurven.....	<b>33</b>
<b>Abbildung 5.</b> Vergleich der gemessenen Standardwerte zwischen E und FU (MFI).....	<b>34</b>
<b>Abbildung 6.</b> Vergleich der gemessenen Werte zwischen E und FU (pg/ml).....	<b>35</b>
<b>Abbildung 7.</b> Vergleich von E und FU bezogen auf die gemessene Gesamteproteinkonzentration. ....	<b>38</b>
<b>Abbildung 8.</b> Properdin-Singleplex mit unterschiedlichen Fänger-Ak und -mengen. ....	<b>40</b>
<b>Abbildung 9.</b> Properdin-Singleplex-Optimierung mittels verschiedener Detektionsantikörpermengen .....	<b>41</b>
<b>Abbildung 10.</b> Variation des SA-PE .....	<b>43</b>
<b>Abbildung 11.</b> Ermittlung der optimalen SA-PE Konzentration.....	<b>44</b>
<b>Abbildung 12.</b> Spezifitätsüberprüfung des Multiplex-Assays.....	<b>46</b>
<b>Abbildung 13.</b> Sensitivität des Multiplexassays .....	<b>47</b>

### III. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> Chemikalien.....	<b>14</b>
<b>Tabelle 2.</b> Geräte .....	<b>15</b>
<b>Tabelle 3.</b> Material .....	<b>15</b>
<b>Tabelle 4.</b> Software.....	<b>15</b>
<b>Tabelle 5.</b> Lösungen und Puffer .....	<b>16</b>
<b>Tabelle 6.</b> Antigene .....	<b>17</b>
<b>Tabelle 7.</b> Seren .....	<b>18</b>
<b>Tabelle 8.</b> Antikörper .....	<b>18</b>
<b>Tabelle 9.</b> Kit-Systeme .....	<b>19</b>
<b>Tabelle 10.</b> Molekularmassenstandards.....	<b>20</b>
<b>Tabelle 11.</b> Probenmaterial.....	<b>20</b>
<b>Tabelle 12.</b> Charakterisierung der Patientenkohorte.....	<b>26</b>
<b>Tabelle 13.</b> Analyse der klinischen Untersuchungsergebnisse .....	<b>27</b>
<b>Tabelle 14.</b> Wiederfindungsrate der Zytokine in behandeltem Standard.....	<b>31</b>
<b>Tabelle 15.</b> Interassayvarianz .....	<b>33</b>
<b>Tabelle 16.</b> Wiederfindungsrate einer Standardschirmerprobe nach dem Proteinisolationsschema.....	<b>38</b>
<b>Tabelle 17.</b> Bedingungen des Properdin Multiplex-Assay .....	<b>44</b>
<b>Tabelle 18.</b> Inter- und Intraassayvarianz des Multiplex-Assays.....	<b>48</b>
<b>Tabelle 19.</b> Kennzahlen des Multiplex-Assay .....	<b>49</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Stammzelltransplantation als Ausgangspunkt der *graft-versus-host-disease* (GvHD)

Die GvHD ist eine Multisystemerkrankung auf der Basis eines fehlregulierten Immunsystems. Sie ist der Hauptfaktor für die Morbidität und Mortalität im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation (SZT) (Im et al. 2017).

Die Transplantation von Knochenmark oder Stammzellen ist eine potentiell kurative Behandlung verschiedenster maligner und nicht maligner hämatologischer Erkrankungen. Es werden drei Formen der SZT unterschieden: Bei der autologen SZT erhält ein Patient seine eigenen, vor einer Konditionierungstherapie entnommenen Stammzellen. Bei einer syngenetischen SZT erhält der Patient die Stammzellen eines eineiigen Zwillings. Die häufigste angewandte Form ist die allogene SZT. Hier erhält der Patient Stammzellen eines fremden oder verwandten Spenders (Yang et al. 2015). Sie wird beispielsweise zur Therapie verschiedener Leukämien oder Anämieformen angewendet (Majhail et al. 2015). Hierbei sollte immer ein humaner-Leukozyten-Antigen (HLA)-identer Spender bevorzugt werden, da mit dieser Methode weniger Komplikationen auftreten im Vergleich zur SZT mit einem nicht HLA-identen Spender (Verneris et al. 2015).

Für die Durchführung der Stammzelltransplantation haben sich dabei folgende Methoden etabliert: Bei der Verwendung von aus Knochenmark gewonnenen Stammzellen wird dem Spender in Allgemeinanästhesie durch mehrere Punktionen des hinteren Beckenkammes bis zu 1,5 Liter Blut entnommen, um die benötigte Menge an Stammzellen zu erhalten. Dabei muss immer gewährleistet sein, dass die Gesundheit des Spenders nicht beeinträchtigt wird. Ein Vorteil dieser Methode ist das geringere Auftreten einer GvHD aufgrund der geringeren T-Zelldichte im Vergleich zur peripheren Blutstammzelltransplantation. Demgegenüber steht das erhöhte Risiko eines Transplantatversagens durch die geringere Dichte an Vorläuferzellen (Anasetti et al. 2012). Die Gewinnung peripherer Blutstammzellen ist die heutzutage am häufigsten verwendete Methode. Im Vergleich zur Knochenmarkstransplantation kommt es bei der peripheren Blutstammzellspende zu einem schnelleren Anwachsen und einer schnelleren Funktionsaufnahme des Transplantats (engl. *engraftment*), sowie zu einer geringeren Anzahl infektiöser Komplikationen nach der Transplantation (Blaise et al. 2000). Allerdings ist das Risiko für das Auftreten einer GvHD erhöht (Zaucha et al. 2001). Die

Verwendung von Stammzellen aus Nabelschnurblut bildet eine Alternative und wird bevorzugt bei Kindern eingesetzt. Vorteil dieser Variante ist die schnelle Verfügbarkeit aufgrund der Lagerung in Spenderbanken. Durch ein verzögertes Anwachsen der neutrophilen Granulozyten und der Thrombozyten ist jedoch die Infektionsgefahr erhöht und erfordert eine längere medikamentöse Therapie (Gluckman et al. 1997; Wagner et al. 1995; Rocha et al. 2004; Ballen et al. 2007).

Für das Gelingen einer Stammzelltransplantation ist eine vorhergehende Konditionierungstherapie notwendig. Dadurch wird die Aktivität des Immunsystems des Patienten verringert, um das Anwachsen des Transplantats zu ermöglichen. Bei der myeloablativen Konditionierungstherapie wird eine Kombination aus einer Ganzkörperbestrahlung (engl. *total body irradiation*, TBI) und/ oder einer Chemotherapie verwendet (Thomas et al. 1975). Als Chemotherapeutika werden dabei oft Busulfan in Kombination mit Cyclophosphamid eingesetzt (Tutschka et al. 1987). Hierdurch kommt es zu einer generalisierten Zerstörung sowohl maligner als auch gutartiger Zellen.

## **1.2 Der *graft-versus-leukemia* (GvL) Effekt**

Eine Neuerung in der Therapie mittels allogener SZT war die Einführung eines dosisreduzierten Konditionierungsschemas (Blume et al. 2008). Dieses beruht auf der Grundlage des GvL-Effekts zur Therapie der Grunderkrankung. Dabei werden die aufgrund der weniger potenten Konditionierungstherapie noch nicht abgetöteten malignen Zellen durch die übertragenen Spender T-Zellen angegriffen und zerstört. Durch eine nach erfolgreichem *engraftment* durchgeführte Transplantation von Lymphozyten desselben Spenders kann ein zusätzlicher GvL-Effekt bewirkt werden. Dadurch kann die Rate von Patienten mit kompletter Remission zusätzlich erhöht werden. Dies stellt eine mögliche Therapie für v.a. multimorbide Patienten dar, für die die myeloablativ Konditionierungstherapie aufgrund ihrer stärkeren Nebenwirkungen keine Alternative darstellt (Giralt et al. 1997; Kolb et al. 1995). Auch wenn die zellulären und humoralen Mechanismen des GvL-Effekts noch nicht vollends verstanden sind, spielen die *cluster of differentiation* (CD)4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sowie die natürlichen Killerzellen (NK) eine wichtige Rolle (Barrett 1997). Im Mausmodell war bei Einsatz eines CD8<sup>+</sup> T-Zellen depletierten Transplantats bzw. bei Einsatz eines mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen angereicherten Transplantats die Inzidenz der GvHD erniedrigt bei gleichzeitig erhöhtem leukämiefreien Überleben (Korngold und Sprent 1987). Allerdings konnte durch den Zusatz von konzentrierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu dem Transplantat ein verstärkter GvL-Effekt sowie ein

verbessertes *engraftment* beobachtet werden, ohne gleichzeitig eine GvHD zu verursachen (Palathumpat et al. 1995). Außerdem kam es infolge einer verringerten NK-Zellaktivität nach der Stammzelltransplantation zu einem vermehrten Rezidiv der hämatologischen Grunderkrankung (Jiang et al. 1997).

### **1.3 Akute und chronische GvHD**

Die GvHD ist eine häufige Komplikation der allogenen SZT und ein Hauptfaktor für die hohe Morbidität und Mortalität dieser Therapie. Sie wird in eine akute und eine chronische Form unterteilt. Vor 2005 wurde diese Einteilung nur nach dem zeitlichen Auftreten der GvHD vorgenommen. Das Auftreten einer Immunreaktion innerhalb 100 Tage nach Stammzelltransplantation wurde akute GvHD (aGvHD) genannt, alle nach 100 Tagen auftretenden Manifestationen wurden als chronische GvHD (cGvHD) bezeichnet. Da sich diese Klassifikation als unzureichend erwies, entwickelte das National Institute of Health (NIH) eine neue Einteilung, bei der die Nebenwirkungen entsprechend ihres klinischen Erscheinungsbildes der akuten oder der chronischen GvHD zugeordnet werden (Lee 2017). Typische klinische Merkmale einer aGvHD sind Erythem, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe (Filipovich et al. 2005; Jagasia et al. 2015; Lee 2017; Cotliar 2017).

Die cGvHD ist eine potentiell lebensbedrohliche Nebenwirkung der allogenen Stammzelltransplantation. Sie tritt in etwa bei der Hälfte aller Patienten auf. Die Häufigkeit variiert stark in Abhängigkeit von der Art der Stammzellquelle, der Art des Spenders, der Art des Konditionierungsregimes und der Beschaffenheit des Transplantats. Die Inzidenz der cGvHD nimmt aufgrund der verbesserten Überlebensrate, des vermehrten Einsatzes peripherer Blutstammzellen und des erhöhten Alters der behandelten Patienten zu (Vukić et al. 2016; Cotliar 2017; Baird und Pavletic 2006). Sie kann nahezu alle Organsysteme betreffen und weist phänotypische Merkmale bekannter Autoimmunerkrankungen wie Sklerodermie oder Sjögren-Syndrom auf (Cotliar 2017).

### **1.4 Pathophysiologie der akuten GvHD**

Die Voraussetzungen für die Entwicklung einer GvHD wurden bereits 1966 von Billingham beschrieben: Im Transplantat müssen immunkompetente Zellen enthalten sein. Der Empfänger muss darüber hinaus ein defektes Immunsystem besitzen und nicht in der Lage sein, das Transplantat abzustößen. Außerdem muss der Empfänger Antigene besitzen, die den

Zellen des Transplantats fremd sind und somit eine Immunreaktion auslösen können (Billingham 1966). Trotz gleicher Voraussetzungen unterscheiden sich die akute und die chronische GvHD in ihrer Pathophysiologie. Die aGvHD wird dabei in 3 Phasen gegliedert:

In Phase 1 kommt es durch die Konditionierungstherapie und die bestehende Grunderkrankung zu einer Schädigung des Gewebes des Empfängers. Dadurch werden proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) freigesetzt, aber auch bakterielle Antigene wie Lipopolysaccharide (LPS) durch Schädigung der Darmflora. Dies führt zu einer Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen (APCs) (Holler et al. 1990; Goker et al. 2001). In Phase 2 werden die Spender T-Zellen durch Interaktion mit den *major histocompatibility complex* (MHC) Antigenen und *minor histocompatibility antigens* (miHAg) der APCs aktiviert und zur vermehrten Produktion von IL-2 und IFN- $\gamma$  angeregt. Dadurch kann es zur Ausbildung von *graft-versus-host* (GvH)-Reaktionen kommen (Rus et al. 1995; Goulmy et al. 1996). In Phase 3 kommt es durch die Zytokine zur direkten zytotoxischen Wirkung und zur weiteren Stimulation der Zellen des Immunsystems. Auf diese Weise aktivierte zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen nutzen zur Abtötung von Gewebezellen die Fas/ FasL Interaktion und den Perforin/ Granzym Weg. Darüber hinaus sezernieren Makrophagen nach Stimulation ihrer *toll like receptors* (TLRs) weiterhin Zytokine, welche zu einer fortlaufenden Gewebeschädigung führen. Durch die dadurch in großen Mengen aus körpereigenem Gewebe freigesetzten LPS kann es zu einer weiteren Makrophagenaktivierung kommen, welche in einem Zytokinsturm enden kann (Ferrara 2000; Ferrara und Reddy 2006a; Kägi et al. 1994; Teshima et al. 2002).

## **1.5 Pathophysiologie der chronischen GvHD**

Die Pathophysiologie der cGvHD ist noch nicht vollständig geklärt. Eine wichtige Rolle scheinen jedoch allo- und autoreaktive T-Zellen, eine gestörte Thymusfunktion mit entsprechender defekter negativer T-Zell-Selektion und ein Mangel regulatorischer T-Zellen zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration regulatorischer T-Zellen bei stammzelltransplantierten Patienten mit cGvHD verringert war sowohl im Vergleich zu stammzelltransplantierten Patienten ohne cGvHD als auch im Vergleich zu gesunden Personen (Zorn et al. 2005). Im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation zeigte sich eine erhöhte Expression von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bei im Blut zirkulierenden T-Zellen im Vergleich zu der Expression bei inaktiven T-Zellen. Beide Faktoren zeigten eine große Voraussagekraft für die Entstehung einer schweren cGvHD (Ritchie et al. 2005). Eine

entscheidende Rolle für die Entstehung der cGvHD spielen außerdem B-Zellen und mögliche Autoantikörper sowie freigesetzte Chemokine und Zytokine.

## **1.6 Therapie und Prophylaxe der GvHD**

Für die Prophylaxe der GvHD wird typischerweise eine Kombination aus einem Calcineurininhibitor (z.B. Cyclosporin) zusammen mit MTX (Methotrexat) oder MMF (Mycophenolat Mofetil) verwendet (Gratwohl und Niederwieser 2012; Terakura et al. 2017). Mittel der Wahl bei der Therapie der akuten und chronischen GvHD sind Kortikosteroide wie Prednisolon. Diese werden oft mit anderen im Rahmen der Chemotherapie verwendeten Medikamenten wie MTX, MMF oder Cyclosporin kombiniert. Darüber hinaus wird aktuell an neueren Therapien mithilfe spezifischer Antikörper geforscht, welche teilweise im klinischen Alltag bereits zum Einsatz kommen (Cotliar 2017). So wurde bereits Rituximab zur Hemmung von CD20+ B-Zellen und Ruxolitinib zur Hemmung des JAK/ STAT Signalwegs von CD4+ T-Zellen eingesetzt mit jeweils guten Ergebnissen (Cutler et al. 2013; Zeiser et al. 2015). Die therapeutischen Optionen ergeben sich anhand der beteiligten Systeme (Baird und Pavletic 2006; Hayashida et al. 2013; Vukić et al. 2016; Cotliar 2017).

## **1.7 Okuläre GvHD**

Die okuläre GvHD tritt in 50 – 80 % aller Patienten nach allogener Stammzelltransplantation auf. Meist entwickelt sie sich zusätzlich zu einer bereits bestehenden GvHD und nicht als alleinige Krankheitsentität (Dietrich-Ntoukas und Steven 2015). Dabei können alle Augenstrukturen betroffen sein (Nassiri et al. 2013). Die akute Form der okulären GvHD ist dabei deutlich seltener und zeigt sich meist in Form einer Rötung und Chemosis der Bindehaut und kann sich bis zum Vollbild einer pseudomembranösen Konjunktivitis entwickeln (Siebelmann et al. 2015). Die chronische okuläre GvHD hingegen tritt wesentlich häufiger auf. Eines der Hauptcharakteristika der okulären cGvHD ist die Entwicklung einer Keratokonjunktivitis sicca. Es kommt dabei durch eine fibrotische Zersetzung des Tränenapparates zu einer Benetzungsstörung des Auges mit typischen Symptomen wie Fremdkörpergefühl, Schmerzen, Brennen und Photophobie (Ogawa et al. 1999). Im Bereich der Lider zeigen sich häufig eine Blepharitis und ein Meibomdrüsenstau bzw. -atrophie (Dietrich-Ntoukas und Steven 2015). Eine Konjunktivitis tritt in ca. 10 % der Fälle auf. Sie kann zu bleibender konjunktivaler Fibrosierung führen und ist oft ein Zeichen für eine schwere systemische cGvHD (Nassiri et al. 2013). Im Bereich der Hornhaut können korneale

Epitheldefekte auftreten, die bis hin zu kornealen Ulzerationen führen können. Diese Komplikationen werden jedoch auch als mögliche Folgen der Bestrahlung im Rahmen der Konditionierungstherapie diskutiert. Auffälligkeiten wie Keratokonjunktivitis sicca, konjunktivale Chemosis, Retinablutungen und Keratitis können auch bereits vor Stammzelltransplantation vorliegen und mit der Grunderkrankung zusammenhängen (Kerty et al. 1999).

### **1.7.1 Diagnostik der okulären GvHD**

Bisher beruht die Diagnostik der okulären GvHD hauptsächlich auf klinischen Untersuchungen, die den *ocular surface disease index* (OSDI)-Score, den Schirmer-Test, die Messung der Tränenfilmaufrisszeit (TBUT, *tear-breakup-time*) und die Untersuchung der Augenoberfläche mithilfe von Vitalfärbungen beinhalten (Siebelmann et al. 2015). Der OSDI-Score besteht aus 12 Fragen und quantifiziert die subjektiven Beschwerden des Patienten. Er sollte vor der Transplantation erhoben werden und im Verlauf wiederholt werden, da er einen guten Verlaufsparemeter darstellt (Siebelmann et al. 2015). Die Bestimmung der Tränensekretion mithilfe des Schirmer-Tests ist elementarer Bestandteil der augenärztlichen Untersuchung vor und nach einer SZT. Dabei reicht nach NIH-Kriterien ein mittlerer Schirmer-Score beider Augen  $\leq 5$  mm, bzw.  $\leq 6 - 10$  mm bei gleichzeitiger Keratokonjunktivitis sicca zur Diagnose einer okulären GvHD, wenn zur selben Zeit ein weiteres Organ von einer GvHD betroffen ist (Filipovich et al. 2005). Die TBUT ist ein Maß für die Stabilität des Tränenfilms und somit für die Funktion des Tränenapparates und beträgt normalerweise  $\geq 10$  s. Im Rahmen einer GvHD sinkt sie häufig auf unter 5 s (Ogawa et al. 1999). Die Integrität der Kornea wird mittels Fluoreszeinfärbung überprüft (Ogawa et al. 2013).

### **1.7.2 Therapie der okulären GvHD**

Die Therapie der okulären GvHD besteht aus der systemischen Gabe von Steroiden im Rahmen der GvHD anderer Organsysteme und der Anwendung von Lokaltherapeutika. Diese beinhalten die intensive Applikation von Tränenersatzmitteln, um die Integrität der Augenoberfläche intakt zu halten (Dietrich-Ntoukas et al. 2012). Zur Bekämpfung der lokalen Inflammation kommen cyclosporinhaltige Augentropfen zum Einsatz. Diese wirken antiinflammatorisch und regen zusätzlich die Tränenproduktion an (Munir und Aylward 2017). Autologe Serumaugentropfen zur Therapie des trockenen Auges wurden in Studien

sowohl bei Patienten mit einer GvHD als auch bei Patienten mit Keratokonjunktivitis sicca ohne GvHD nach Stammzelltransplantation untersucht und zeigten eine Verbesserung der TBUT, des Visus und des Schmerzempfindens. Heute sind sie ein typischer Bestandteil der Therapie (Ogawa et al. 2003; Noble et al. 2004).

### **1.7.3 Biomarker der okulären GvHD**

Ein großes Problem der okulären cGvHD ist die oft späte Diagnosestellung zu einem Zeitpunkt, an dem bereits irreversible Schäden vorhanden sind. Ein Ziel der Forschung ist deshalb die Detektion und Etablierung von Biomarkern für die okuläre cGvHD. Mithilfe von Biomarkern sollen eine frühere Diagnose und eine Bewertung der Aktivität der cGvHD ermöglicht werden und bereits bestehende oder entstandene Pathologien vom aktuellen Krankheitsverlauf abgegrenzt werden. Des Weiteren sollen Biomarker die Einschätzung des Risikos, eine cGvHD zu entwickeln, erleichtern und als Verlaufsparemeter für das Ansprechen der Therapie dienen. Durch Einbeziehen der klinischen Untersuchungsergebnisse wird die prädiktive Stärke der Biomarker verstärkt. Eine weitere wichtige Rolle spielen Biomarker in der Untersuchung der Pathophysiologie der cGvHD. Auch wenn die Biomarker nicht direkt am Effektormechanismus der cGvHD beteiligt sind, ändert sich ihre Konzentration reaktiv als Folge der Grundpathologie. Obwohl die von der NIH geforderten Studienkriterien für die Etablierung von Biomarkern bisher von den wenigsten Studien erfüllt werden, so konnten bereits etliche Biomarker beschrieben werden, die vielversprechende Ergebnisse zeigen (Paczesny et al. 2015).

Im Bereich der Augenheilkunde wurden zu diesem Thema in den letzten Jahren bereits große Fortschritte erzielt. Die Untersuchung der Biomarker fokussiert sich dabei zumeist auf die Keratokonjunktivitis sicca, welche nicht nur die führende Krankheitsentität der okulären GvHD darstellt, sondern auch im Rahmen diverser Autoimmunkrankheiten auftritt.

Chemokine spielen eine große Rolle in Entzündungsreaktionen durch Rekrutierung diverser Leukozyten und werden durch verschiedenste Zellen ausgeschüttet, so auch durch korneale Keratozyten und Epithelzellen. Die Chemokine *C-X-C motif ligand* (CXCL)-9, CXCL-10 und CXCL-11 werden IFN- $\gamma$ -induziert ausgeschüttet und sind an der Migration und Expansion von T-Zellen beteiligt. Die Konzentration dieser Chemokine im Tränenfilm und deren Expression im konjunktivalen Epithel waren bei der Untersuchung von an Sjögren-Syndrom leidenden Patienten mit Keratokonjunktivitis sicca im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht. Darüber hinaus korrelierten CXCL-10 und CXCL-11 mit den klinischen

Untersuchungsergebnissen, v.a. mit einer reduzierten basalen Tränenproduktion (Yoon et al. 2010).

Auch Zytokine sind ein wichtiger Faktor im Rahmen von Entzündungsreaktionen. Untersucht wurden bspw. IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in Hinblick auf ihre Bedeutung als Biomarker der okulären GvHD (Yoon et al. 2010; Jung et al. 2015; Cocho et al. 2016). IL-6 wird von Makrophagen und Fibroblasten gebildet und wirkt im Rahmen von Inflammation modulierend auf B- und T-Zellen, was seine Beteiligung an der Entwicklung der cGvHD erklärt. Seine Konzentration ist im Tränenfilm von Patienten mit okulärer GvHD signifikant erhöht im Vergleich zu GvHD Patienten ohne okuläre Beteiligung und im Vergleich zu gesunden Probanden. Außerdem zeigt es eine starke Korrelation mit dem OSDI-Score, der Tränenproduktion und der kornealen Fluoreszeinfärbung (Riemens et al. 2012; Jung et al. 2015). IFN- $\gamma$  ist ein Zytokin, dessen entscheidende Bedeutung in der Pathophysiologie der GvHD bereits bekannt ist. Seine Expression ist bei peripheren T-Zellen im Rahmen einer cGvHD erhöht (Ritchie et al. 2005). Darüber hinaus wurde die zentrale Rolle IFN- $\gamma$  produzierender NK-Zellen bei der Induktion einer Keratokonjunktivitis sicca beschrieben (Chen et al. 2011). Im Rahmen seiner Diskussion als möglicher Biomarker einer chronischen GvHD war IFN- $\gamma$  signifikant erhöht bei Patienten mit okulärer GvHD im Vergleich zu GvHD-Patienten ohne okuläre Beteiligung und im Vergleich zu gesunden Probanden (Riemens et al. 2012). Zusätzlich konnte eine starke Korrelation der IFN- $\gamma$ -Konzentration mit einem erniedrigten Schirmer-Score und einer verkürzten TBUT nachgewiesen werden (Riemens et al. 2012). Auch IL-8 ist obligater Bestandteil von Inflammationsreaktionen. Seine Konzentration im Tränenfilm und seine Expression im konjunktivalen Epithel sind dementsprechend bei akuter und chronischer GvHD erhöht (Cocho et al. 2016). Die Konzentration von IL-8 korreliert positiv mit den subjektiven Krankheitssymptomen sowie dem Grad der Hyperämie der Konjunktiva. Es findet sich zudem eine negative Korrelation mit der Tränenproduktion und der TBUT. Mithilfe von logistischer Regression und ROC (*receiver operating characteristics*)-Kurven konnte durch Kombination der gemessenen IL-8- und CXCL-10-Konzentration mit dem Geschlecht und dem Alter der Patienten ein prädiktives Modell für die okuläre GvHD mit einer Sensitivität von 86,36 % und einer Spezifität von 95,24 % entwickelt werden (Cocho et al. 2015, 2016). Der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) ist ein häufig von Tumoren überexprimiertes Gen, dessen spezifische Hemmung oft als Therapiekomponente zum Einsatz kommt. Er wird nahezu in allen Geweben ausgeschüttet,

inklusive des kornealen Oberflächenepithels, wo es regenerierende Wirkung hat. Im Rahmen der Keratokonjunktivitis sicca bei okulärer GvHD ist EGFR herunterreguliert. Dementsprechend besteht zwischen EGFR und der Schwere der okulären GvHD eine negative Korrelation.

Das Komplementsystem wurde zwar noch nicht auf einen möglichen Zusammenhang mit einer GvHD getestet, allerdings konnte es in Tierversuchen bereits als wichtiger Faktor bei der Entstehung des Sjögren-Syndroms identifiziert werden (Nguyen et al. 2006).

## **1.8 Komplementsystem und GvHD**

Das Komplementsystem ist ein elementarer Bestandteil des angeborenen Immunsystems und somit hauptsächlich an der initialen Abwehr körperfremder Zellen und der Beseitigung von degenerierten, körpereigenen Strukturen beteiligt. Es besteht aus über 60 verschiedenen Proteinen und Proteinfragmenten. Drei Wege zur Aktivierung des Komplementsystems sind bekannt (Zipfel und Skerka 2009).

Der klassische Aktivierungsweg wird eingeleitet durch die Interaktion des C1-Komplexes mit einem C-reaktiven Protein oder Immunglobulin (IgM/ IgG gebundenen Zellen (Degn und Thiel 2013).

Der Lektin-Weg startet durch die Bindung von Mannose-bindendem-Lektin oder Fikolin an Oberflächen. Folgend spalten assoziierte Proteasen weitere Komplementkomponenten (C2 und C4) und eine C3-Konvertase (C4bC2a) wird gebildet (Ricklin und Lambris 2013).

Bei dem alternativen Aktivierungsweg kommt es zur spontanen Spaltung von C3. Durch die Assoziation von Faktor B mit einem C3-Spaltprodukt (C3b) an Oberflächen und der Aktivität einer Protease (Komplementfaktor D) bildet sich die alternative C3-Konvertase (C3bBb) (Ricklin und Lambris 2013). Die Bildung der C3-Konvertasen stellt den zentralen Schritt der Komplementaktivierung da. Die Aktivität der alternativen C3-Konvertase wird deshalb sehr genau reguliert, wobei der Komplementaktivator Properdin die Konvertase stabilisiert und die Reaktion aufrechterhält. Die Komplementinhibitoren Faktor H/I inhibieren dahingegen die C3-Konvertase. Die Hauptfunktion der C3-Konvertasen ist die Spaltung von C3 in C3b und C3a. C3b ist ein Opsonin, wodurch weitere körperfremde Strukturen markiert werden. C3a ist ein Anaphylatoxin, das an den C3a-Rezeptor (C3aR) bindet und in dem Anlocken von Immunzellen sowie der Modulation der Zellphysiologie resultiert (Markiewski und Lambris 2007). Durch die Addition von C3b zu den jeweiligen C3-Konvertasen entstehen die C5-

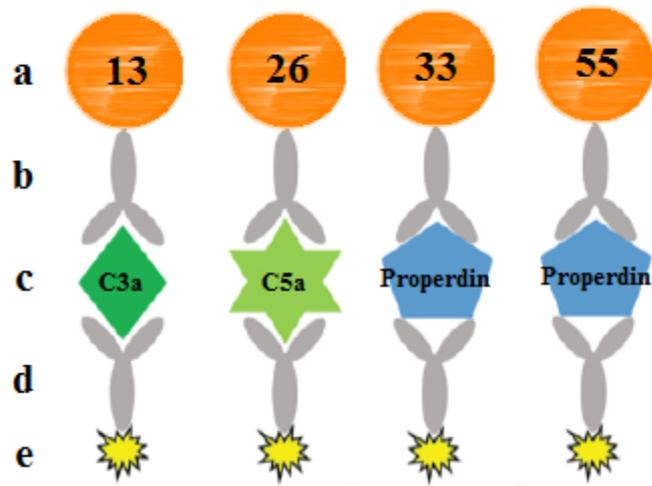
Konvertasen (C4bC2aC3b und C3bBbC3b). Diese spalten C5 in C5a und C5b. C5a ist ebenfalls ein Anaphylatoxin, das über die Interaktion mit dem C5a-Rezeptor (C5aR) einen pro-inflammatorischen Effekt auf Immun- und Gewebezellen ausübt. C5b hingegen lagert sich ab und bildet zusammen mit den Komplementfaktoren C6 - C9 den Membran-attackierenden Komplex. Dieser wird in die Zellmembran eingebaut und führt zur Lyse der Zelle (Degn und Thiel 2013; Markiewski und Lambris 2007; Ricklin und Lambris 2013).

Darüber hinaus nimmt das Komplementsystem als Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem eine zentrale Rolle ein. Die Spaltprodukte C3a und C5a sind dabei essentieller Bestandteil in der Differenzierung von T-Zellen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass durch TBI vor allogener SZT die APCs des Empfängers zur verstärkten Komplementaktivierung angeregt wurden (Kwan et al. 2012). Somit kam es durch verstärkte Aktivierung des C3a- und C5a-Rezeptors der T-Zellen zur Zunahme deren Proliferation. Dies führte zu einer verstärkten GvH-Reaktion. Umgekehrt konnte durch eine Herunterregulierung der C3a und C5a Produktion eine Verringerung der T-Zellproliferation und mit einhergehend eine Verbesserung des GvHD-Scores und des Gesamtüberlebens bewirkt werden (Cravedi et al. 2013). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der Expression des C5a-Rezeptors und der Proliferation regulatorischer T-Zellen, welche die GvHD abschwächen können. Vermehrte C5a-Produktion führte entsprechend zur Unterdrückung der regulatorischen T-Zellen (Wang et al. 2017). Die Ergebnisse legen nahe, dass durch Unterdrückung bestimmter Komplementkomponenten die Schwere der GvHD vermindert werden könnte. Der C5-Antikörper Eculizumab, welcher schon gegen die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie eingesetzt wird, ist daher Gegenstand aktueller Forschung (Melis et al. 2015).

Diese Ergebnisse wurden allgemein für GvHD beschrieben und nicht speziell für die okuläre GvHD. Allerdings ist bekannt, dass das Komplementsystem auch im gesunden Auge zum Schutz vor Pathogenen ständig aktiv ist. Darüber hinaus verhindern verschiedene Produkte des Komplementsystems (wie iC3b) die Initiierung schädlicher T-Zellreaktionen. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen wie Uveitis oder Keratitis wurden erhöhte Komplementkonzentrationen nachgewiesen (Bora et al. 2008). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass das Komplementsystem auch an der okulären GvHD beteiligt sein könnte.

## 1.9 Tränenfilmanalyse mittels Multiplex Mikropartikel (*Bead*) Assay

Zur Untersuchung der beschriebenen Proteine auf ihre mögliche Funktion als Biomarker der okulären GvHD bietet sich die Gewinnung von Tränenflüssigkeit an, da sie leicht gewonnen werden kann und keinen invasiven Eingriff darstellt. Etabliert hierfür ist die Anwendung von Glaskapillaren oder Schirmer-Streifen (Posa et al. 2013). Durch das Ansetzen der Glaskapillare am Augenaußenwinkel zieht sich Tränenflüssigkeit aufgrund der Kapillarkraft in den Hohlraum. Die Tränenflüssigkeit wird anschließend mit Zytokin Assay Puffer (Millipore Ibérica, Madrid, Spain) verdünnt und bis zur Untersuchung bei -80°C gelagert (Cocho et al. 2016). Der Schirmer-Streifen wird im lateralen, unteren Bindehautsack platziert. Anschließend schließt der Patient die Augen und die Tränenflüssigkeit wird durch das Lackmuspapier adsorbiert. Nach 5 Minuten wird der Schirmer-Streifen entfernt. Für die nachfolgende Proteinextraktion sind verschiedene Methoden beschrieben wie die Übernachtinkubation in *phosphat buffer saline* (PBS) (Riemens et al. 2012), die Extraktion der Tränenflüssigkeit durch Zentrifugation des Schirmer-Streifens mit 13000 rpm für 5 min (Posa et al. 2013) oder die nacheinander folgende Inkubation mit Ammoniumbicarbonat und Aceton (Green-Church et al. 2008). Unabhängig von der verwendeten Methode liegt die gewonnene Proteinmenge im Bereich zwischen 4,4 µg und 4,9 µg. Daher bietet sich zur Analyse der Multiplex *Bead* Assay an, eine Methode zur parallelen Analyse von bis zu 100 Analyten aus geringen Probenvolumina (25 µl – 50 µl). Demgegenüber kann mit dem herkömmlichen Sandwich *enzym linked immunosorbent assay* (ELISA) nur ein Analyt untersucht werden. Grundlage des Multiplex *Bead* Assays sind fluoreszente Mikropartikel mit 6,5 µm Durchmesser, welche sich durch ihre Fluoreszenzeigenschaften unterscheiden. Daraus ergeben sich 100 verschiedene Mikropartikelsorten, welche die parallele Detektion von 100 verschiedenen Analyten ermöglichen. Zur Durchführung des Assays werden die unterschiedlich kodierte Mikropartikel mit verschiedenen antigenspezifischen Antikörpern beladen. Diese werden mit einem geringen Probenvolumen von 50 µl inkubiert. Mithilfe eines biotinylierten Sekundärantikörpers und dem Fluoreszenz Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) wird der Antigen-Antikörper-Komplex detektiert. Durch die xMAP Technologie von Luminex® wird dann die jeweilige Fluoreszenzintensität zu der jeweiligen *Bead*-Sorte ermittelt (siehe Abbildung 1) (Pauly et al. 2009).



**Abbildung 1. Prinzip eines Multiplex *Bead* Assays**

a: fluoreszierender *Bead*, b: Fänger-Maus-Antikörper (mAk), c: Analyt, d: biotinylierter Detektions-mAk, e: Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) angepasst nach (Gallenkamp et al. 2018)

## **1.10 Zielsetzung**

Die Diagnose einer okulären GvHD nach allogener SZT wird anhand verschiedener klinischer Untersuchungsergebnisse gestellt. Deshalb wurden von 22 Patienten die ophthalmologischen Untersuchungsergebnisse vor und nach der SZT miteinander verglichen (Visus, Augeninnendruck, Schirmer-Laufweite, TBUT, OSDI, sowie morphologische Auffälligkeiten an Augenlider, Bindehaut, Hornhaut und Linse). Ein Hauptziel der Forschung zum Thema der okulären GvHD ist die Beschreibung von Biomarkern, welche eine frühzeitige Diagnose und entsprechende Therapieeinleitung erlauben, bevor irreversible Schäden aufgetreten sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Tränenflüssigkeit von Patienten vor und nach allogener SZT, um neue Biomarker für das Entstehen einer okulären GvHD zu identifizieren. Zur Analyse wurde die Tränenflüssigkeit mittels Schirmer-Streifen gewonnen, da diese Methode routinemäßig in der augenärztlichen Untersuchung vor SZT durchgeführt wird und nicht invasiv ist. Die potentiellen Biomarker CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , EGFR, C3a, C5a und Properdin wurden unter Anwendung einer Multiplextechnologie evaluiert. Der simultane Nachweis der Komplementproteine C3a, C5a und Properdin sollte in dieser Arbeit zuvor entwickelt und validiert werden. Dazu wurden die verschiedenen Antikörper und das SA-PE in ihrer Konzentration variiert. Abschließend wurde die Spezifität und die Sensitivität untersucht, um etwaige Kreuzreaktionen der Antikörper auszuschließen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

**Tabelle 1. Chemikalien**

Chemikalie	Hersteller	
<b>Magermilch-Pulver</b>	AppliChem GmbH	Darmstadt
<b>Tween 20</b>	AppliChem GmbH	Darmstadt
<b>PBS</b>	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
<b>TMB</b>	Seramun Diagnostica GmbH	Heidesee
<b>Futhan (Nafamostat Mesylat)</b>	Tokyo Chemical Industry	Eschborn
<b>EDTA</b>	Merck	Darmstadt
<b>1M HCl</b>	Carl Roth	Karlsruhe
<b>1x H<sub>2</sub>O NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Merck	Darmstadt
<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
<b>MES</b>	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
<b>BSA</b>	Carl Roth	Karlsruhe
<b>NaN<sub>3</sub></b>	Merck	Darmstadt
<b>NaOH</b>	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Aceton</b>	Carl Roth	Karlsruhe
<b>EDC</b>	Sigma Aldrich	Deisenhofen
<b>Sulfo-NHS</b>	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
<b>SA-POD</b>	Jackson	West Grove, USA
<b>SA-PE</b>	Prozyme	Hayward, USA
<b>30 % PAA</b>	AppliChem GmbH	Darmstadt
<b>APS</b>	Carl Roth	Karlsruhe
<b>TEMED</b>	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Tris</b>	AppliChem GmbH	Darmstadt
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS)</b>	Merck	Darmstadt
<b>99% Ethanol</b>	Carl Roth	Karlsruhe
<b>65 % HNO<sub>3</sub></b>	Carl Roth	Karlsruhe
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Coomassie InstantBlue</b>	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
<b>37% Formaldehyd</b>	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Essigsäure</b>	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
<b>Biotin-NHS</b>	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
<b>Assay Puffer (Verdünnungs-/ Lesebuffer Zytokinassay)</b>	Bio-Rad	Hercules, USA

**Tabelle 2. Geräte**

Gerät	Hersteller	
<b>Varioskan (Photometer)</b>	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
<b>Tischzentrifuge</b>	Kisker-Biotech	Steinfurt
<b>Standmagnet (6 Positionen)</b>	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
<b>Ultraschallbad</b>	Bandelin electronic GmbH & Co. KG	Berlin
<b>Überkopffrotor</b>	VWR International GmbH	Radnor, USA
<b>Neubauer-Zählkammer</b>	HBG Henneberg-Sander GmbH	Gießen
<b>Mikroskop (Olympus CK2)</b>	Olympus	Shinjuku, Japan
<b>Maxisorp-Platte (96 well)</b>	Thermo Fisher Scientific Inc.	Santa Clara, USA
<b>Plattenmagnet (96 Positionen)</b>	Tecan	Maennedorf, Schweiz
<b>Zentrifuge (5415C)</b>	Eppendorf	Hamburg
<b>Schüttler (IKA-Vibrax-VXR)</b>	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Staufen
<b>MAGPIX Multiplex Reader</b>	Bio-Rad Laboratories Inc.	Hercules, USA
<b>Denovix DS 11 Spectrophotometer</b>	Denovix	Wilmington, USA
<b>Vortex-Genie 2</b>	Scientific Industries Inc.	New York, USA
<b>Elektrophoreseapparatur</b>	Bio-Rad Laboratories Inc.	Hercules, USA
<b>FluorChem FC2</b>	Alpha Innotec	Kasendorf

**Tabelle 3. Material**

Material	Hersteller	
<b>MagPlex Beads</b>	Luminex Corporation	Austin, USA
<b>Assay Platte (96 well)</b>	Corning Incorporated	New York, USA
<b>PD-10 Desalting Columns</b>	GE Healthcare	Little Chalfont, GB
<b>Schirmer-Streifen</b>	Tarun Enterprises	Uttar Pradesh, India

**Tabelle 4. Software**

Software	Hersteller	
<b>Bio-Plex Manager</b>	Bio-Rad Laboratories Inc.	Hercules, USA
<b>GraphPad Prism 6</b>	GraphPad Software Inc.	La Jolla, USA
<b>AlphaEaseFC</b>	Alpha Innotec	Kasendorf
<b>Excel 2013</b>	Microsoft Corporation	Redmond, USA
<b>IBM SPSS Statistics 24</b>	IBM	North Castle, USA

**Tabelle 5. Lösungen und Puffer**

Lösung / Puffer	Zusammensetzung	Menge/ Konzentration
<b>PBS 10x, pH 7,4</b>	NaCl	1,37 M
	KCl	27 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18 mM
	H <sub>2</sub> O (bidest)	
<b>Blockierungspuffer (ELISA)</b>	PBS	1x
	Tween 20	0,1% (v/v)
	Milchpulver	2% (w/v)
<b>PBST</b>	PBS	1x
	Tween 20	0,1% (w/v)
<b>Sample diluent HB/ 0,5% BSA (Probenpuffer Zytokin-Assay)</b>	BSA Sample diluent HB(Bio-Rad)	0,5% (w/v)
<b>1% BSA/ PBS (Blockierungspuffer Multiplex) (Verdünnungs-/ Lese- und Komplement- Properdin-Assay)</b>	PBS	1x
	BSA	1% (w/v)
<b>1% BSA/ PBS + EDTA + Futan (= BPEF) (Probenpuffer Komplement- und Properdinassay )</b>	PBS	1x
	BSA	1% (w/v)
	EDTA	10 mM
	Futan	0,01% (w/v)
<b>PBS/ 0,05% Tween 20 (Waschpuffer)</b>	PBS	1x
	Tween 20	0,05% (v/v)
<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O (bidest)	100 mM
<b>Trenngel 12% (für 2 Gele)</b>	H <sub>2</sub> O (bidest)	3,5 ml
	30% PAA	4,0 ml
	4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8	2,5 ml
	40% APS	20 µl
	TEMED	20 µl
<b>Sammelgel 4% (für 2 Gele)</b>	H <sub>2</sub> O (bidest)	6,1 ml
	30% PAA	1,3 ml
	4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8	2,5 ml
	40% APS	20 µl
	TEMED	20 µl

<b>Elektrophoresepuffer</b>	Tris	50 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	H <sub>2</sub> O (bidest)	
<b>MES-Puffer (pH 5,0)</b>	MES	0,05 M
	NaOH	titrieren
	H <sub>2</sub> O (bidest)	
<b>PBS-TBN</b>	PBS	1x
	BSA	0,1% (w/v)
	Tween 20	0,02% (v/v)
	Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	0,05% (w/v)
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (pH 6,2)</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M
	NaOH	titrieren
	H <sub>2</sub> O (bidest)	
<b>Entwicklungslösung</b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,28 M
	CH <sub>2</sub> O	0,02% (v/v)
	H <sub>2</sub> O (bidest)	
<b>Fixierer</b>	Ethanol	10% (v/v)
	H <sub>2</sub> O (bidest)	
<b>Oxidizer</b>	HNO <sub>3</sub>	1% (v/v)
	H <sub>2</sub> O (bidest)	
<b>Silberlösung</b>	AgNO <sub>3</sub>	12 mM
	H <sub>2</sub> O (bidest)	
<b>Stopplösung</b>	Essigsäure	5% (v/v)
	H <sub>2</sub> O (bidest)	
<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	100 mM
	H <sub>2</sub> O (bidest)	

**Tabelle 6. Antigene**

Antigen	Hersteller	Nummer	Konzentration	Lagerung	Zusatz
<b>C3a</b>	Hycult	HC 2127	0,5 mg/ml	-80 °C	natürlich, human
<b>C5a</b>	Hycult	HC 2102	0,1 mg/ml	-80 °C	rekombinant, human
<b>Properdin</b>	Quidel	A412	1 mg/ml	-80 °C	natürlich, human
	Complement Technologies	A139	1 mg/ml	-80 °C	

**Tabelle 7. Seren**

Serum	Hersteller	Lagerung
<b>Humanes Serum (HNS)</b>	Eigenherstellung im Labor	-80 °C
<b>C2depletiertes (dpl) C9dpl HNS</b>	– Complement Technology Inc., Tyler, USA	-80 °C
<b>CFHdpl HNS</b>	Complement Technology Inc., Tyler, USA	-80 °C
<b>Complement-factor-properdin (CFP)dpl HNS</b>	Complement Technology Inc., Tyler, USA	-80 °C

**Tabelle 8. Antikörper**

Antikörper	Hersteller	Lotnummer/ Artikelnummer	Konzentration	Lagerung	Zusatz
<b>Maus-Antikörper (mAk) Klon 2991</b>	Hycult	HM2074	0,1 mg/ml	4 °C	Fänger-mAk anti-C3a-desArg
<b>mAk 474-biotin</b>	Hycult	HM2073BT	0,1 mg/ml	4 °C	Detektions-mAk anti-C3a
<b>C17/5</b>	Biozol	BLD-518202	0,5 mg/ml	4 °C	Fänger-mAk anti-C5a-desArg
<b>G25/2-biotin</b>	Biozol	BLD-518306	0,5 mg/ml	4 °C	Detektions-mAk anti-C5a
<b>IL-6</b>	Bio-Rad	171-BK29MR2	20x	4 °C	Fänger-Ak anti-IL-6
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Bio-Rad	171-BK25MR2	20x	4 °C	Fänger-Ak anti-IFN- $\gamma$
<b>IL-8</b>	Bio-Rad	171-BK31MR2	20x	4 °C	Fänger-Ak anti-IL-8
<b>CXCL-9</b>	Bio-Rad	171-BK43MR2	20x	4 °C	Fänger-Ak anti-CXCL-9
<b>CXCL-10</b>	Bio-Rad	171-BK34MR2	20x	4 °C	Fänger-Ak anti-CXCL-10
<b>CXCL-11</b>	Bio-Rad	171-BK35MR2	20x	4 °C	Fänger-Ak anti-CXCL-11
<b>sEGFR</b>	Bio-Rad	171-BC501M	20x	4 °C	Fänger-Ak anti-sEGFR

<b>IL-6 biotin</b>	Bio-Rad	171- BK29MR2	20x	4 °C	Detektions-Ak anti-IL-6
<b>IFN-<math>\gamma</math> biotin</b>	Bio-Rad	171- BK25MR2	20x	4 °C	Detektions-Ak anti- IFN- $\gamma$
<b>IL-8 biotin</b>	Bio-Rad	171- BK31MR2	20x	4 °C	Detektions-Ak anti-IL-8
<b>CXCL-9 biotin</b>	Bio-Rad	171- BK43MR2	20x	4 °C	Detektions-Ak anti-CXCL-9
<b>CXCL-10 biotin</b>	Bio-Rad	171- BK34MR2	20x	4 °C	Detektions-Ak anti-CXCL-10
<b>CXCL-11 biotin</b>	Bio-Rad	171- BK35MR2	20x	4 °C	Detektions-Ak anti-CXCL-11
<b>sEGFR biotin</b>	Bio-Rad	171-BC501M	20x	4 °C	Detektions-Ak anti-sEGFR
<b>mAk1 anti- Properdin</b>	Quidel Corporation	A233	1 mg/ml	-20 °C	Fänger-mAk anti-Properdin
<b>mAk1340 anti- Properdin</b>	Pauly et al. 2014		3,19 mg/ml	-80 °C	Fänger-mAk anti-Properdin
<b>mAk1340 anti- Properdin- biotin</b>	Pauly et al. 2014		0,4 mg/ml	-20 °C	Detektions-Ak anti-Properdin
<b>pAk anti- Properdin- biotin (selbst biotinyliert)</b>	<b>Ziege</b> Complement Technologies	A239	19 mg/ml	4 °C	Detektions-Ak anti-Properdin

**Tabelle 9. Kit-Systeme**

Kit	Artikelnummer	Hersteller
<b>Bio-Plex Pro, Human Chemokine</b>	171-DK0001	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
<b>Bio-Plex Pro, Human Cancer</b>	171-DC5000	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

**Tabelle 10. Molekularmassenstandards**

Molekularmassenstandards	Hersteller
<b>PeqGOLD Protein Marker IV (10-170 kDa)</b>	VWR International GmbH (Peqlab)

**Tabelle 11. Probenmaterial**

Proben	Bezugsquelle
<b>Tränenflüssigkeit Kammerwasser</b>	Augenklinik Universitätsklinikum Regensburg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Klinische Untersuchungsmethoden

Als Grundlage dieser Arbeit wurden 22 Patienten des Universitätsklinikums Regensburg vor und nach allogener SZT in der Poliklinik der Augenheilkunde untersucht. Hierbei wurden folgende Befunde erfasst: Beste korrigierte Sehschärfe, Untersuchungsbefund an der Spaltlampe, Integrität der Augenoberfläche mittels Vitalfärbung, OSDI-Fragebogen, TBUT und Messung der Tränenproduktion mittels Schirmer-Streifen.

Bei der Spaltlampenuntersuchung wurden die Augenlider, die Tränenpünktchen, die Bindehaut, die Linse und die sub tarsalen Kompartimente auf Pathologien untersucht. Außerdem wurde das Vorhandensein von lidkantenparallelen, konjunktivalen Falten (LIPCOF) dokumentiert. Die Integrität der Hornhaut wurde mittels Fluoreszeinfärbung überprüft. Zur Objektivierung der Schwere möglicher okulärer Symptome wurde der OSDI Fragebogen verwendet (Schiffman et al. 2000). Der Fragebogen besteht aus 12 Fragen, die sich den drei übergeordneten Gruppen Augenfunktion, Augensymptome und Umwelteinflüsse zuordnen lassen. Dabei sind die Antwortmöglichkeiten 0 = niemals, 1 = manchmal, 2 = die Hälfte der Zeit, 3 = die meiste Zeit und 4 = die ganze Zeit. Somit ergibt sich hier eine maximale Punktzahl von 48, welche für die Berechnung des OSDI-Scores nach folgender Formel weiterverwendet wird:

$$OSDI = \frac{Punktzahl * 25}{Anzahl beantworteter Fragen}$$

Bei einem somit möglichen Score zwischen 0 und 100 steht null für keine Beeinträchtigung und hundert für die schwerstmöglichen Symptome.

Zur Überprüfung der Stabilität des Tränenfilms wurde die TBUT gemessen. Dazu wurde 5 µl einer 2 %igen Fluoreszeinlösung in die Augen getropft, welche sich durch Blinzeln des Patienten gleichmäßig verteilte. Die Zeit zwischen dem letzten Blinzeln und dem ersten Auftreten eines trockenen Punktes auf dem Fluoreszein-gefärbten Tränenfilm wurde dreimal gemessen und der Mittelwert der Messung in Sekunden angegeben.

Zur Bestimmung der Tränensekretion wurde der Schirmer I-Test (ohne lokale Anästhesie) und der Schirmer Basis Test (mit lokaler Anästhesie zur Ausschaltung der irritationsbedingten Tränensekretion = Schirmer II) durchgeführt. Dazu wurde ein Schirmer-Teststreifen (Optitech, Indiana, USA) unter sterilen Bedingungen in den lateralen Unterlidkantus beider Augen eingehängt und bei geschlossenen Augen des Patienten für 5 min dort belassen. Danach wurden die Teststreifen entnommen und die Laufweite der befeuchteten Strecke in Millimetern gemessen. Die Schirmer-Streifen wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.2.2 Proteinextraktion aus Schirmer-Proben**

Die im Rahmen der routinemäßigen Augenkontrolluntersuchungen vor und nach SZT durchgeführten Schirmer-Proben wurden vom Personal der Augenklinik unter sterilen Bedingungen abgenommen und der Streifen bei -80°C in einem Reaktionsgefäß gelagert. Am Tag der Aufarbeitung wurden die Schirmer I-Streifen in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  versetzt. Anschließend wurde bei Überkopffrotation inkubiert (1 h, Raumtemperatur (RT)). Im Folgenden wurde den Proben 400 µl Aceton (-20°C) hinzugefügt, intensiv gevortext und abermals inkubiert (1 h, -20°C). Zum Abschluss wurden die Schirmer-Streifen entfernt, die Reaktionsgefäße zentrifugiert (10 min, 11000 rpm), der Überstand verworfen und die Gefäße zum Trocknen der ausgefällten Proteinpellets für ca. 30 min unter den Abzug gelegt. Die isolierten Tränenfilmproteine wurden in 50 µl  $\text{H}_2\text{O}$  bidest aufgenommen und die Proteinkonzentration am Spektrophotometer (Denovix) vermessen. Die Proben wurden mit Sample diluent HB/0,5% BSA 1:7 verdünnt und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

### 2.2.3 SDS-PAGE

Die aus den Schirmer-Streifen isolierten Proteine wurden mittels einer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Dazu wurde Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet, um die Proteine zu denaturieren und um sie dann durch das Anlegen eines elektrischen Feldes der Größe nach auftrennen zu können (Laemmli 1970). Zwei Glasplatten wurden, nach sorgfältiger Reinigung mit 70 % Ethanol, in die Vorrichtung (Bio-Rad) eingespannt (Abstand 1 mm), mit 12 % Trenngellösung auf ca. 4,5 cm Höhe aufgefüllt und dann mit H<sub>2</sub>O bidest. überschichtet. Nach der Polymerisation (30 min, RT) wurde das Wasser verworfen, die Gelkammer mit 4 % Sammelgel aufgefüllt und ein Kamm für zehn Proben eingesetzt. Nach abgeschlossener Polymerisation (30 min, RT) wurde das Gel direkt in die Elektrophoreseapparatur (Bio-Rad) eingespannt und die Vorrichtung mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Nach Entfernen des Kammes wurden die Geltaschen mit Puffer ausgespült. Nach Zugabe von nicht reduzierendem Puffer zu den Proben wurden diese für 10 min bei 95°C inkubiert und danach bis zu ihrem Gebrauch auf Eis gelagert. Es wurden 25 µl der Proben (10 µg Gesamtprotein) in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese mit 40 mA gestartet. Sobald die Proben-Banden das Trenngelende erreicht hatten (ca. 45 min) wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel für Färbungen weiterverwendet.

### 2.2.4 Coomassie Blau Färbung

Das SDS-Gel (2.2.3) wurde 3 x 5 min in H<sub>2</sub>O bidest. gespült. Die Markierung der aufgetrennten Proteine erfolgte während einer Inkubation in Coomassie InstantBlue (Sigma-Aldrich, RT, über Nacht, schüttelnd). Nach einem Waschschrift in H<sub>2</sub>O bidest. wurden die angefärbten Proteinbanden dokumentiert (AlphaEaseFC).

### 2.2.5 Schnelle Silberfärbung nach Budowle

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur und unter ständigem Schütteln durchgeführt. Zuerst wurde das Gel für 10 min in Fixierlösung (10 % Ethanol) geschwenkt, bevor es für 3 min in 1 % HNO<sub>3</sub> zur Oxidation gegeben wurde. Nach einem kurzen Waschschrift mit H<sub>2</sub>O bidest. wurde das Gel für 20 min in ein AgNO<sub>3</sub>-Bad (unter Lichtausschluss) gegeben. Danach wurde erneut gewaschen und die Entwicklungslösung zugegeben. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 5 % Essigsäure verwendet (15 min). Im Anschluss wurde mit AlphaEaseFC eine Aufnahme des Gels angefertigt (Budowle et al. 1991).

### 2.2.6 Bead-Kopplung

Sowohl die Mikropartikel-Kopplung als auch die Testdurchführung erfolgte lichtgeschützt. Für die Kopplung mit den Fängerantikörpern wurden 4 Sorten der 6,5 µm großen MagPlex® Mikropartikel verwendet (13, 26, 33, 55). Die Kopplung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Luminex Corp., Austin, TX, USA). Dazu wurden anti-C3 (*Bead Region 13*, mAklon 2991, 1,7 µg), anti-C5a-desArg (*Bead Region 26*, C17/5, 25 µg), anti-Properrdin (*Bead Region 33*, mAklon-1340, 25 µg) und anti-Properrdin (*Bead Region 55*, mAklon-1, 25 µg, 50 µg, 75 µg) mit  $1,25 \cdot 10^6$  *Beads* pro Region gekoppelt. Am Ende wurde die Lösung auf eine Konzentration von 2000 Mikropartikeln pro µl eingestellt (Gallenkamp et al. 2018).

### 2.2.7 Biotinylierung Ziege anti-Properrdin

Zum Start der Reaktion wurden 50 µl NaHCO<sub>3</sub>, 10 µl Biotin-NHS und 500 µg Antikörper (pAk goat anti-Properrdin) gemischt und mit 1x PBS auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt. Nach Inkubation bei Überkopfrotation (RT, 70 min) wurde die Reaktion durch die Zugabe von 10 µl NaN<sub>3</sub> abgestoppt. Der Antikörper wurde mittels PD-10 Desalting Columns (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers filtriert. Abschließend wurde der biotinylierte Antikörper auf eine Endkonzentration von 0,4 mg/ml eingestellt.

### 2.2.8 Multiplex-Assay

Die Multiplex-Assays wurden bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss auf einer schwarzen 96-well Platte mit klarem, flachem Boden (cat.: 3603, Corning Incorporated, New York, USA) durchgeführt. Die Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Schütteln (600 rpm) (Pauly et al. 2009). [Zytokin Assay (IL-6, IL-8, CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11, IFN-γ); Komplement Assay (C3a, C5a, EGFR); Properrdin Assay (C3a, C5a, Properrdin)]

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde jeder Vertiefung 200 µl Blockierungspuffer zugegeben, danach 2000 mit den spezifischen Fängerantikörpern gekoppelten *Beads* pro Analyt und Vertiefung. Nach einem Waschschrift wurden 50 µl der in Probenpuffer verdünnten Proben zugefügt und inkubiert (Zytokin/ Komplement über Nacht, Properrdin 2 h). Danach wurde gewaschen und jede Vertiefung mit den entsprechenden Detektionsantikörpern inkubiert (1 µl 20x Detektionsantikörper, mAklon 474-biotin anti-C3a, G25/2-biotin anti-C5a 100 ng, pAk-biotin goat anti-Properrdin 333,3 ng; Zytokin 30 min, Komplement/ Properrdin 1h). Nach einem weiteren Waschschrift wurde SA-PE-PJRS-25

zugegeben und inkubiert (Zytokin 50 ng, 10 min; Komplement/ Properdin 100 ng, 30 min). Die Platte wurde gewaschen und jeweils 125 µl Lesepuffer zugegeben. Die Platte wurde mit Hilfe des MAGPIX Multiplex Reader ausgewertet und die Ergebnisse mit GraphPad Prism 6 ausgewertet.

Zur Darstellung der Standardkurven des neu entwickelten Multiplex-Assays wurde die Standardkurve an fünf verschiedenen Tagen gemessen und die Mittelwerte mittels nichtlinearer Regression als sigmoidale Kurve dargestellt. Für die Berechnung des unteren Plateaus (*bottom*) und der Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) wurde folgende Formel verwendet:

$$Bottom = m_B + 5 * SD_B$$

$m_B$  = Mittelwert aus 5 Blindwerten (Lesepuffer)

$SD$  = Standardabweichung der 5 Blindwerte

Dabei wurde der *bottom* in mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) und das LOD in [ng/ml] angegeben. Für die mittlere effektive Konzentration  $EC_{50}$  und das obere Plateau (Top) wurden die von der Software berechneten Werte verwendet. Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit des Multiplex-Assay wurde die Varianz berechnet. Hierfür wurde eine Probe fünfmal gemessen und das Verhältnis aus Standardabweichung und Mittelwert ermittelt:

$$v = \frac{\text{Standardabweichung } (c_1 - c_5)}{\text{Mittelwert } (c_1 - c_5)} * 100\%$$

$v$  = Varianz

$c_1 - c_5$  = Messwerte 1 -5 einer Probe

Für die Intra-Assay-Varianz wurde eine Probe der Standardkurve an einem Tag, in einem Assay fünfmal gemessen, zur Bestimmung der Inter-Assay-Varianz wurde die Probe an fünf verschiedenen Tagen gemessen.

### 2.2.9 ELISA

Zur Analyse und Detektion von humanem Properdin und zur Erstellung einer Standardkurve wurde die Methode des Sandwich-ELISA verwendet. Dazu wurde eine MaxiSorp Immuno-Platte über Nacht mit einem Fängerantikörper (1 µg/ml, mAk1 anti-Properdin, 50 µl pro Vertiefung, in PBS) bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde dreimal gewaschen (200 µl pro

Vertiefung, PBST) und mit Blockierungspuffer (200 µl pro Vertiefung) versetzt, zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen. Nach Inkubation (1h, RT) wurde erneut dreimal mit PBST gewaschen. Properdin (Quidel A412) wurde in Blockierungspuffer verdünnt, in einer 1:3 Verdünnungsreihe auf die Platte gegeben (0,014 µg/ml – 10 µg/ml, 50 µl pro Vertiefung) und inkubiert (1h, RT). Nach erneutem Waschen zum Entfernen nicht gebundenen Antigens wurde das Properdin mittels des Detektionsantikörpers mAk1340-biotin (2 µg/ml, 50 µl pro Vertiefung, in Blockierungspuffer) an einer anderen Stelle gebunden. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde gewaschen und in Blockierungspuffer verdünntes SA-POD (1:2500, 50 µl pro Vertiefung) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen (sechsmal, 200 µl pro Vertiefung, PBST) wurde zur Detektion TMB (100 µl pro Vertiefung) hinzugegeben und die Platte lichtgeschützt ca. 15 Minuten entwickelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 M HCL (100 µl pro Vertiefung) verwendet. Das durch die Peroxidase gelb gefärbte TMB wurde nun mit Hilfe eines Photometers (Varioskan, Thermo Fisher Scientific Inc.) bei 450nm detektiert.

#### **2.2.10 Statistik**

Zur Datenerfassung wurde die Software Excel 2013 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) und SPSS 24 (IBM, North Castle, New York, USA). Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant angesehen.

Zur Analyse der Daten wurden der Wilcoxon-Test, der Fishers-Exakt-Test und das Modell der linearen Regressionsanalyse eingesetzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patientencharakteristika und klinische Untersuchungsdaten

##### 3.1.1 Charakterisierung der Patientenkohorte

In die Studie wurden 22 Patienten der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III und Augenheilkunde des Universitätsklinikums Regensburg eingeschlossen, welche sowohl zur Erstuntersuchung (E) als auch zur Folgeuntersuchung (FU) nach einer allogenen SZT in der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde zur Untersuchung vorgestellt wurden. Die Patientencharakteristika werden in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12. Charakterisierung der Patientenkohorte**

Charakteristik	Häufigkeit/ Zeitraum
<b>Patienten gesamt</b>	22
<b>Frauen, n (%)</b>	8 (36%)
<b>Männer, n (%)</b>	14 (64%)
<b>Alter (bei SZT), in Jahren</b>	
<b>Median (Spannweite)</b>	55,5 (21-67)
<b>Mittelwert ± Standardabweichung</b>	52,1 ± 12,5
<b>Diagnose Grunderkrankung, n (%)</b>	
<b>AML (akute myeloische Leukämie)</b>	10 (45,5%)
<b>ALL (akute lymphatische Leukämie)</b>	1 (4,5%)
<b>CLL (chronisch lymphatische Leukämie)</b>	1 (4,5%)
<b>CML (chronisch myeloische Leukämie)</b>	2 (9,1%)
<b>Plasmozytom</b>	1 (4,5%)
<b>NHL (non-Hodgkin-Lymphom)</b>	1 (4,5%)
<b>MDS (myelodysplastisches Syndrom)</b>	4 (18,2%)
<b>MPS (myeloproliferatives Syndrom)</b>	1 (4,5%)
<b>blastisch plasmazytoide dendritische</b>	1 (4,5%)
<b>Zellneoplasie</b>	
<b>Stammzellquelle, n (%)</b>	
<b>Peripheres Blut</b>	19 (86,4%)
<b>Knochenmark</b>	3 (13,6%)
<b>Zeit vor SZT (E), in Tagen</b>	
<b>Median (Spannweite)</b>	49,5 (16-160)
<b>Mittelwert ± Standardabweichung</b>	57,7 ± 32,4
<b>Zeit nach SZT (FU), in Tagen</b>	
<b>Median (Spannweite)</b>	132 (42-340)
<b>Mittelwert ± Standardabweichung</b>	136,1 ± 72,3

<b>Spenderart, n (%)</b>	
<b>HLA-ident</b>	19 (86,4%)
<b>HLA-MM</b>	2 (9,1%)
<b>Haploident</b>	1 (4,5%)
<b>GvHD-Befall der Organe bei FU, n (%)</b>	
<b>Haut</b>	14 (63,6%)
<b>Darm</b>	11 (50%)
<b>Leber</b>	2 (9,1%)
<b>Mundschleimhaut</b>	2 (9,1%)
<b>Auge</b>	2 (9,1%)
<b>Konditionierungsregime Intensität, n (%)</b>	
<b>Klassisch</b>	4 (18,2%)
<b>Reduziert</b>	18 (81,2%)

AML: akute myeloische Leukämie, ALL: akute lymphatische Leukämie, CLL: chronische lymphatische Leukämie, CML: chronische myeloische Leukämie, NHL: non-Hodgkin-Lymphom, MDS: myelodysplastisches Syndrom, MPS: myeloproliferatives Syndrom, HLA-MM: HLA-*mismatch*

### 3.1.2 Analyse der klinischen Untersuchungsergebnisse

Im Rahmen der allogenen Stammzelltransplantation finden regelmäßig ophthalmologische Untersuchungen statt, um frühzeitig pathologische Veränderungen detektieren zu können. In Tabelle 13 sind die Durchschnittswerte der hierbei festgestellten Untersuchungsbefunde aller 22 Patienten vor und nach Stammzelltransplantation dargestellt.

**Tabelle 13. Analyse der klinischen Untersuchungsergebnisse**

	<b>Vor SZT (E)</b>		<b>Nach SZT (FU)</b>		<b>p-Wert</b>
<b>Anzahl Patienten</b>	22		22		
<b>Anzahl analysierter</b>	44		44		
<b>Augen</b>					
<b>Visus</b>	0,95 ± 0,17		0,95 ± 0,16		0,8036
<b>Tensio (mmHg)</b>	15,3 ± 2,3		14,8 ± 2,5		0,1287
<b>Schirmer I (mm)</b>	17,2 ± 12,7		12,0 ± 10,6		0,0269
<b>Schirmer II (mm)</b>	12,5 ± 10,1		10 ± 8,2		0,5456
<b>TBUT (s)</b>	7,5 ± 5,1		6,2 ± 5,1		0,0627
<b>OSDI</b>	6,3 ± 9,9		10,7 ± 11,7		0,0408
	Pathologisch verändert	Keine Pathologie	Pathologisch verändert	Keine Pathologie	
<b>Augenlid</b>	12	32	28	16	0,0012
<b>LIPCOF</b>	14	30	30	14	0,0013

	Pathologisch verändert	Keine Pathologie	Pathologisch verändert	Keine Pathologie	
<b>Bindehaut</b>	2	42	1	43	1
<b>Hornhaut</b>	2	42	0	44	0,4943
<b>Linse</b>	18	26	23	21	0,2853

Die Werte der Untersuchung von Visus, Tensio, Schirmer I, Schirmer II, TBUT und OSDI wurden mithilfe des Wilcoxon-Test miteinander verglichen. Dabei zeigt sich eine statistisch signifikante Verringerung der Schirmer I-Laufweite in der FU im Vergleich zur Erstuntersuchung. Diese Tendenz zeigt sich auch bei Betrachtung der Schirmer II-Laufweite, allerdings fällt der Unterschied hier nicht statistisch signifikant aus. Bei Betrachtung von Visus und Augeninnendruck zeigen sich keine Tendenzen zwischen E und FU. Die TBUT ist bei der FU verringert im Vergleich zur E, allerdings fällt der Unterschied nicht signifikant aus. Der Wert des OSDI-Fragebogens hat bei der FU statistisch signifikant zugenommen.

Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung von Augenlidern, LIPCOF, Bindehaut, Hornhaut und Linse wurden mithilfe des Fishers-Exakt-Test analysiert. Im Bereich der Augenlider zeigt sich hier eine statistisch signifikante Zunahme des Auftretens einer Blepharitis. Parallel dazu ist auch eine statistisch signifikante Vermehrung von LIPCOFs zu sehen. Bei genauerer Betrachtung der Bindehaut und der Hornhaut zeigte sich klinisch kein Unterschied bei der FU. Bei Untersuchung der Linse an der Spaltlampe zeigten sich tendenziell vermehrt Linsentrübungen, jedoch ohne statistische Signifikanz.

## **3.2 Analyse der Tränenfilme**

### **3.2.1 Überprüfung der Proteinisolationmethode**

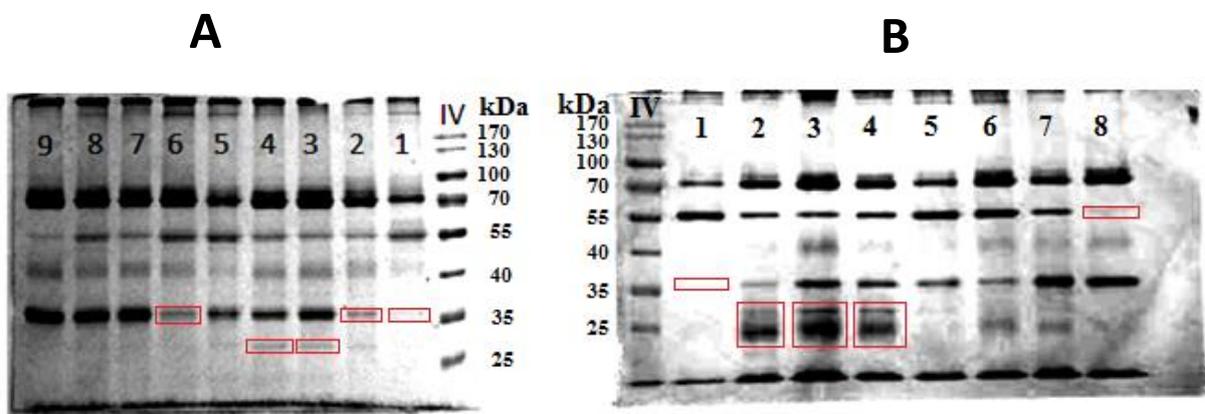
#### **3.2.1.1 Wahl der Methode zur Tränengewinnung**

Zur Analyse von Proteinen des Tränenfilms sind zwei Methoden zur Sammlung des Probenmaterials etabliert. Eine Methode beinhaltet die direkte Gewinnung von Tränenflüssigkeit mittels einer Glaskapillare, weshalb diese Methode der realen Tränenfilmzusammensetzung am nächsten kommt. Allerdings bedeutet diese Methode für den Patienten eine zusätzliche Untersuchung im Rahmen der Diagnostik des trockenen Auges. Sie ist bei Patienten mit Keratokonjunktivitis sicca teilweise schwierig anzuwenden, da nur geringe Mengen Tränenfilm vorhanden sind. In der vorliegenden Arbeit wurde daher

Tränenfilm mit der alternativen Methode, der Gewinnung von Tränenfilm durch Schirmer-Streifen, gewonnen. Diese Untersuchung ist in der Routine-Diagnostik des trockenen Auges zur Messung der Tränensekretion bereits enthalten und bedeutet daher für die Patienten keine zusätzliche Untersuchung. Die Schirmer-Streifen werden anschließend nach einem Proteinisoliationsprotokoll behandelt (Posa et al. 2013).

### 3.2.1.2 Testung der Proteinisoliationsmethode

Der Ablauf der Proteinisoliationsmethode wurde in dieser Arbeit anhand gesunder Probanden überprüft. Dazu wurden in einer SDS-PAGE 10 µg aus Schirmer-Streifen isolierte Tränenproteine eingesetzt und der Größe nach aufgetrennt. Durch nachfolgende Färbung mit Coomassie InstantBlue (Abbildung 2A) bzw. Silber (Abbildung 2B) wurden die Proteine sichtbar gemacht. Dadurch wurde bewiesen, dass mithilfe dieser Methode Proteine für weitere Analysen in Lösung gebracht werden können. Jedoch finden sich bereits bei Proben gesunder Probanden auffällige Unterschiede in ihrer Zusammensetzung, welche in Abbildung 2A und Abbildung 2B hervorgehoben sind. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass die Zusammensetzung des Tränenfilms individuell große Unterschiede aufweisen kann.

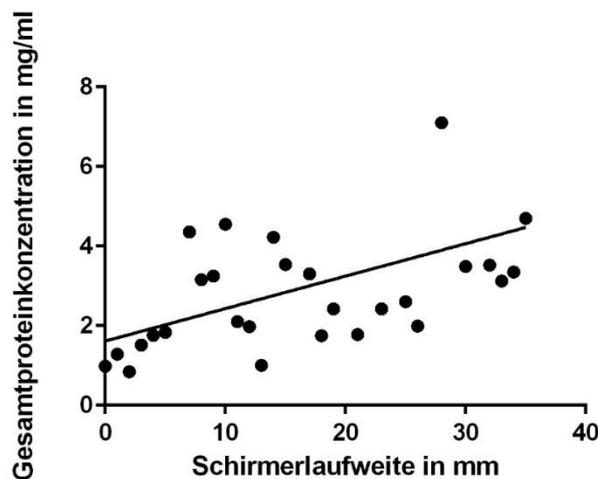


**Abbildung 2. Nachweis isolierter Proteine aus Schirmer-Proben mittels SDS-PAGE**

Aus Schirmer-Streifen gesunder Probanden isolierte Proteine (eingesetzte Menge 10 µg) wurden mittels einer SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt. (A) zeigt das Bild eines mit Coomassie Blue gefärbten Polyacrylamid-Gels, wobei von links nach rechts neun Proben gesunder Probanden und ein Marker IV zu sehen sind. (B) Silberfärbung eines Polyacrylamidgels, wobei von links nach rechts ein Marker IV und acht Proben gesunder Probanden aufgetragen sind. Somit ist bewiesen, dass Proteine aus den Schirmer-Streifen mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode isoliert werden können. Des Weiteren zeigen (A) und (B), dass auch bei gesunden Personen Unterschiede in der Proteinzusammensetzung des Tränenfilms beobachtbar sind.

### 3.2.1.3 Verhältnis zwischen isolierter Proteinmenge und Schirmer-Laufweite

Zur Überprüfung der in einem Schirmer I-Streifen von Patienten nach allogener SZT enthaltenen Gesamtproteinkonzentration wurden die mit dem Spectrophotometer gemessenen Konzentrationen der in Lösung gebrachten Proteine gegen die entsprechende Laufweite des Schirmers-Streifens aufgetragen. Hierfür ergibt sich nur ein schwacher linearer Zusammenhang ( $R^2 = 0,19$ ). Dies legt nahe, dass die aus einem Schirmer-Streifen isolierte Proteinmenge nicht von der Menge der Tränenflüssigkeit, sondern von anderen Faktoren abhängt. Der Großteil der Konzentrationen lag im Bereich zwischen 1 und 4 mg/ml.



**Abbildung 3. Beziehung zwischen Schirmer-Laufweite und gemessener Gesamtproteinkonzentration**

Die Legende zeigt das Verhältnis der Proteinkonzentration der in Lösung befindlichen Tränenproteine zu der Schirmer-Laufweite der Probe. Nach Anwendung von linearer Regression zeigt sich keine starke Abhängigkeit der zwei Variablen ( $R^2 = 0,19$ ).

### 3.2.1.4 Behandlung von Zytokinstandards mit der Proteinisolationmethode

Zytokine (IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ ) sind Peptide, die die Zelldifferenzierung, Entzündung und Immunantwort regulieren (Venkatesha et al. 2014). Chemokine (CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11) sind durch ihre Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren an der Regulation von Homöostase, Organentwicklung und Immunantwort beteiligt (Yapa et al. 2017). Um Rückschlüsse auf die Stabilität der untersuchten Zytokine und Chemokine (s.o.) zu ziehen wurde der kommerzielle Standard der Firma Bio-Rad mit Zytokinassay Probepuffer in Lösung gebracht und mithilfe des Proteinisolationsschemas behandelt. Durch Berechnung der

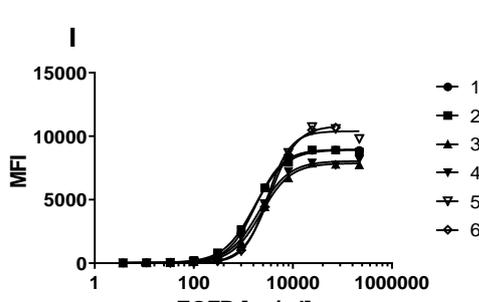
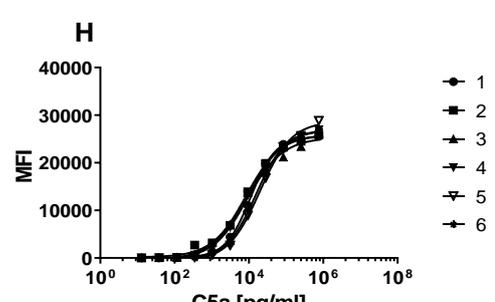
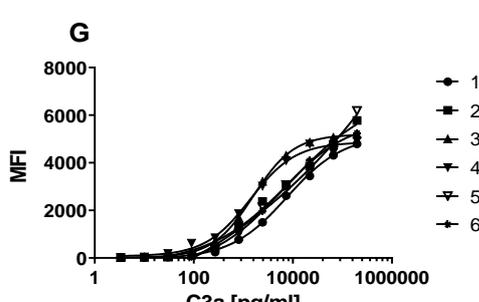
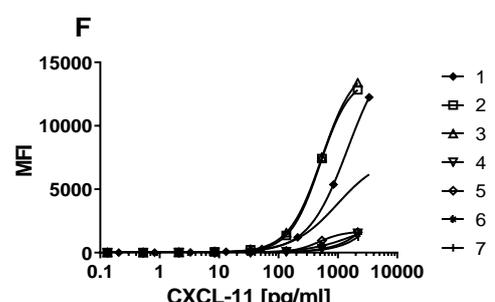
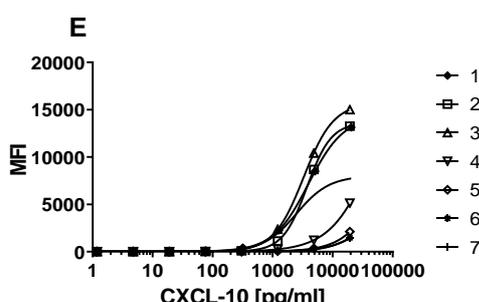
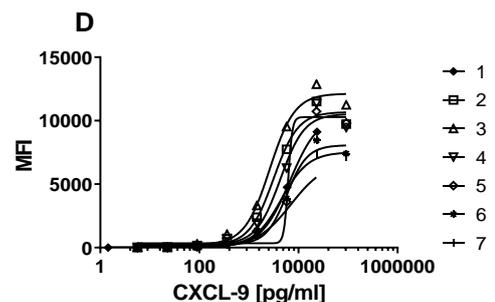
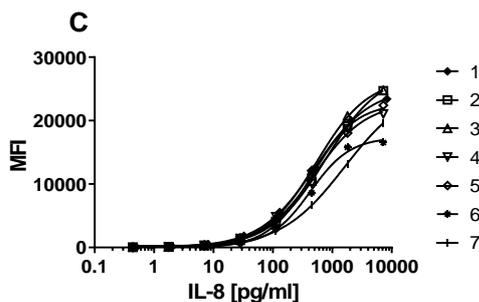
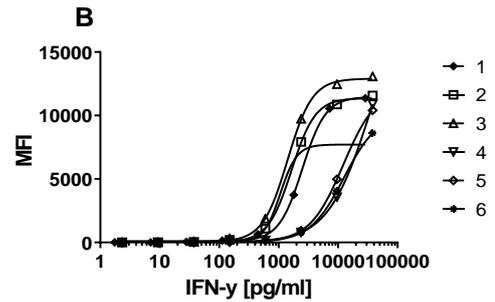
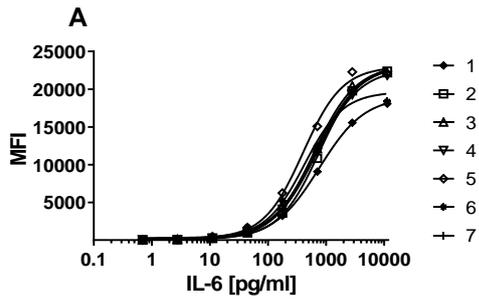
Wiederfindungsrate konnte ein Rückschluss auf die Validität der Ergebnisse dieser Arbeit gezogen werden. Dazu wurden die gemessenen Konzentrationen des behandelten Standards mit den Konzentrationen des unbehandelten Standards verglichen. Tabelle 14 zeigt, dass nach diesem Vorgang IFN- $\gamma$  nicht mehr messbar ist. Während sich die Konzentrationen für IL-6, IL-8, CXCL-9 und CXCL-11 in einem Bereich von 45 – 94 % wiederfinden lassen, ist das für CXCL-10 erreichte Ergebnis von 145,9 % vermutlich auf einen Fehler in der Versuchsdurchführung zurückzuführen.

**Tabelle 14. Wiederfindungsrate der Zytokine in behandeltem Standard**

	IFN- $\gamma$	IL-6	IL-8	CXCL-9	CXCL-10	CXCL-11
<b>Wiederfindungsrate</b>	1,5 %	60,8 %	94,0 %	45,7 %	145,9 %	65,6 %

### 3.2.2 Überprüfung der Reproduzierbarkeit der verwendeten Assays

Das Ziel dieser Studie war die Etablierung neuer Biomarker für die Diagnostik der okulären GvHD nach SZT auf der Basis einer Multiplextechnologie. Eine verlässliche Quantifizierung der Biomarker basiert auf einer reliablen Reproduzierbarkeit der eingesetzten Assays, weshalb dies getestet und validiert wurde. Um die gemessenen Signalstärken der einzelnen Proteine auf ihre entsprechende Konzentration zurückzuführen, wurde bei jeder Messung eine Standardkurve mitgeführt. Für die Vermessung der Chemokine und Zytokine (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11) wurde das Human Chemokine Lyophilisat (Bio-Rad) nach der entsprechenden Anleitung (Bio-Rad) rekonstruiert. Der Standard wurde am selben Tag verwendet und für weitere Experimente in 60  $\mu$ l Aliquots bei -80 °C aufbewahrt. Die Konzentrationen der Chemokin und Zytokin Standardkurven sind Abbildung 4 zu entnehmen. Für IL-6 und IL-8 zeigt sich eine gute Reproduzierbarkeit der Standardkurven, weshalb diese in dieser Arbeit zur Konzentrationsberechnung herangezogen wurden. Allerdings konnte IL-6 in den Patientenproben nicht in quantifizierbarer Menge nachgewiesen werden. EGFR wurde aus dem Human Cancer Standard Lyophilisat (Bio-Rad) rekonstruiert. Diesem Mix wurden dann C3a- und C5a-Antigene zugegeben. Die den Standardkurven entsprechenden Konzentrationen sind Abbildung 4G-I zu entnehmen. Bei den Standardkurven lässt sich eine gute Reproduzierbarkeit erkennen. Somit konnten die gemessenen Werte der Patientenproben für diese drei Proteine anhand der Standardkurven quantifiziert werden.



#### Abbildung 4. Reproduzierbarkeit der Standardkurven

(A) bis (I) zeigen jeweils 6-7 Standardkurven der Proteine, welche jeweils an unterschiedlichen Tagen gemessen wurden. Die Standardkurven sind wie folgt konzipiert: (A) IL-6 (0,69 – 11348 pg/ml), (B) IFN- $\gamma$  (1,75 – 38306 pg/ml), (C) IL-8 (0,44 – 8332 pg/ml), (D) CXCL-9 (1,44 – 92569 pg/ml), (E) CXCL-10 (1,18 – 20375 pg/ml), (F) CXCL-11 (0,13 – 3370 pg/ml), (G) C3a (3,34 – 197500 pg/ml), (H) C5a (12,9 – 759300 pg/ml), (I) EGFR (3,73 – 220291 pg/ml). Für die Verwendung zur Konzentrationsberechnung wurden (C), (G), (H) und (I) verwendet.

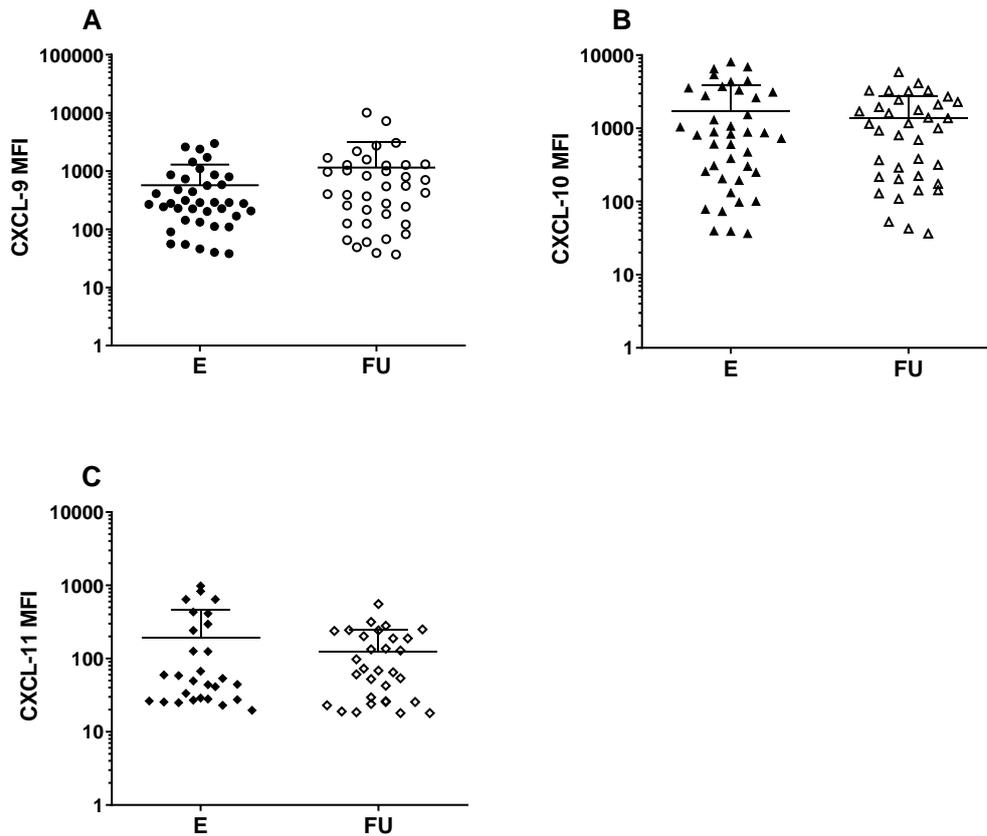
Die Standardkurven für CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 waren nicht reproduzierbar, weshalb keine Konzentrationen ermittelt werden konnten. Stattdessen wurden im Folgenden die MFI-Werte zum Vergleich zwischen E und FU herangezogen. Um sicherzustellen, dass die hohe Varianz der Standardkurven auf die Standardproben, und nicht auf die restlichen Komponenten (Antikörper, SA-PE) sowie die Durchführung des Assays zurückzuführen ist, wurde die Interassayvarianz anhand einer Patientenprobe bestimmt. Diese wurde an fünf verschiedenen Tagen vermessen (Tabelle 15). Die Ergebnisse standen in Übereinstimmung mit der von Bio-Rad für den Assay angegebenen Interassayvarianz ( $\leq 20\%$ ). Somit konnten die bei E und FU eines Patienten gemessenen Signalstärken miteinander verglichen werden, da von der Richtigkeit des Assays ausgegangen wurde.

**Tabelle 15. Interassayvarianz**

	IL-6	IL-8	CXCL-9	CXCL-10	CXCL-11
<b>Interassayvarianz</b>	24,1 %	9,9 %	18,9 %	13,5 %	14,9 %

#### 3.2.3 Vergleich der gemessenen Zytokin- und Chemokin-Werte zwischen Erstuntersuchung und Folgeuntersuchung

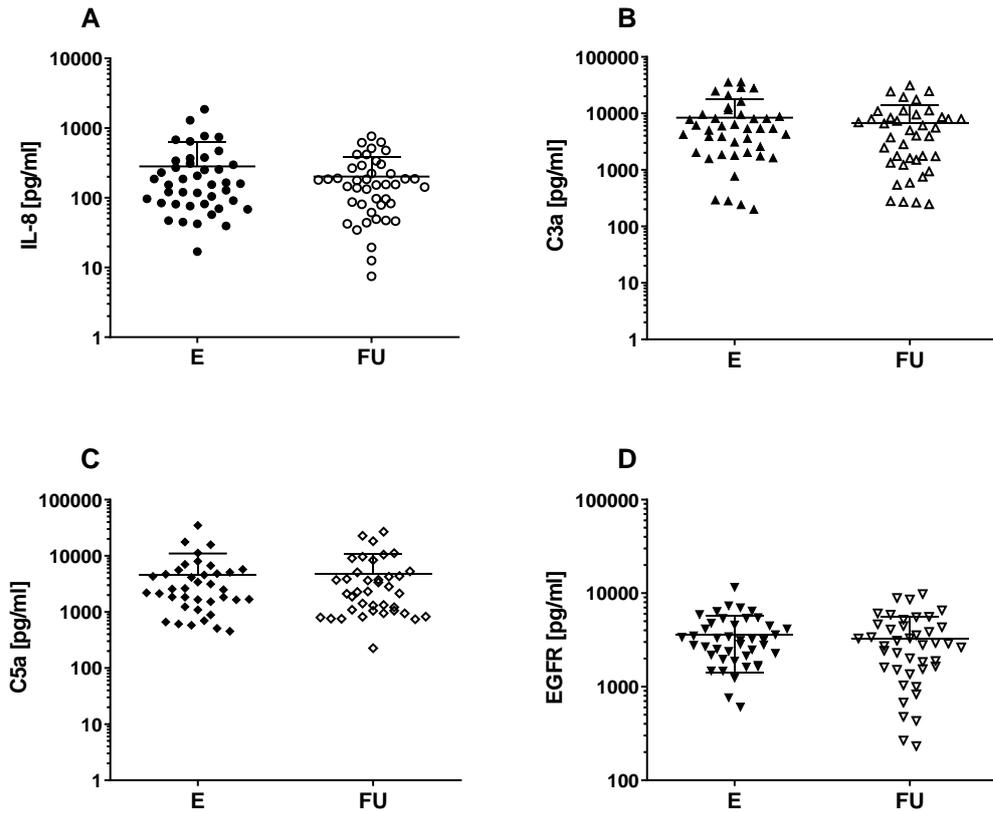
Um die zuvor beschriebenen Proteine als mögliche Biomarker zur Beurteilung des Verlaufs einer GvHD im Rahmen einer Stammzelltransplantation zu evaluieren, wurde, mit Doppelbestimmung der jeweiligen Proben, die relative Proteinmenge in den Schirmer I-Streifen der 22 Patienten vor und nach SZT bestimmt. CXCL-9 (Abbildung 5A) zeigte eine leichte Zunahme der Signalstärke nach SZT, während CXCL-10 und CXCL-11 (Abbildung 5B, C) tendenziell eher abnahmen. Die Konzentrationen von IL-8, C3a, C5a und EGFR (Abbildung 6D, E, F, G) wiesen kaum Veränderungen zwischen E und FU auf, waren aber geringfügig abnehmend. Keines der untersuchten Proteine zeigte eine statistisch signifikante Änderung zwischen E und FU.



**Abbildung 5. Vergleich der gemessenen Standardwerte zwischen E und FU (MFI)**

(A) bis (C) zeigen den Vergleich der gemessenen Signalwerte der Chemokine. In einem Diagramm sind unter E bzw. FU jeweils die Ergebnisse aller linken und rechten Augen zusammengefasst (jeweils  $n = 22$ ). (A) bis (C) zeigen die MFI Werte der Chemokine CXCL-9, 10 und 11, welche folgende Streuweite aufweisen: CXCL-9 E (38 – 2980), CXCL-9 FU (36,75 – 10063), CXCL-10 E (36,5 – 8063), CXCL-10 FU (36,5 – 5842), CXCL-11 E (20 – 980), CXCL-11 FU (18 – 554). Keines der Proteine zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen E und FU.

\*  $p < 0,05$  (gepaarter, zweiseitiger Wilcoxon-Test)



**Abbildung 6. Vergleich der gemessenen Werte zwischen E und FU (pg/ml)**

(A) bis (D) zeigen den Vergleich der gemessenen Signalwerte der Chemokine und Komplementproteine. In einem Diagramm sind unter E bzw. FU jeweils die Ergebnisse aller linken und rechten Augen zusammengefasst. (A) bis (D) stellt die Konzentrationen von IL-8, C3a, C5a und EGFR dar, mit folgender Streuweite: IL-8 E (17 – 1858 pg/ml), IL-8 FU (7,5 – 763 pg/ml), C3a E (199 – 35724 pg/ml), C3a FU (246 – 31117 pg/ml), C5a E (452 – 34835 pg/ml), C5a FU (225 – 26827 pg/ml), EGFR E (605 – 11565 pg/ml), EGFR FU (265 – 9802 pg/ml). Keines der Proteine zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen E und FU.

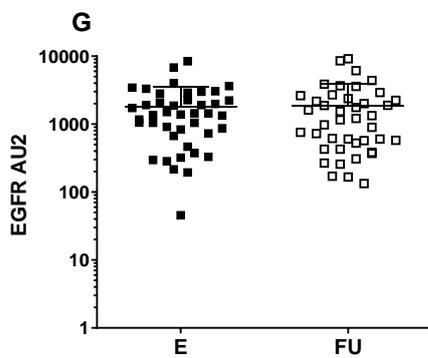
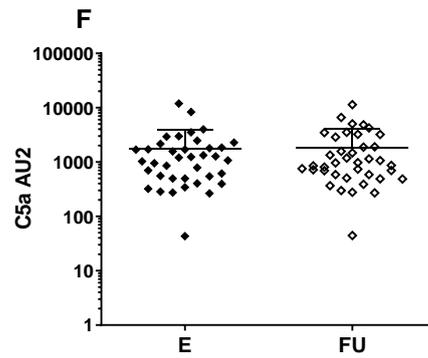
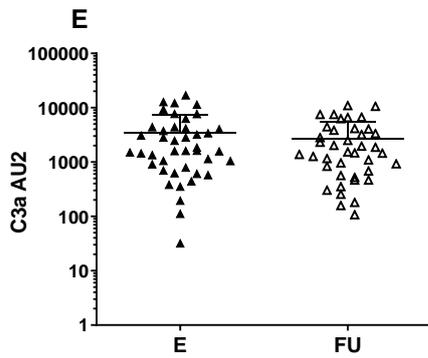
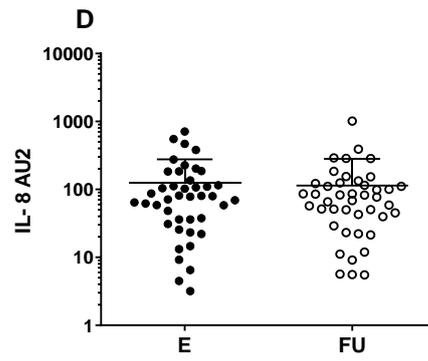
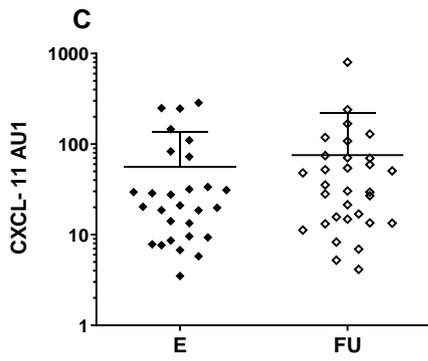
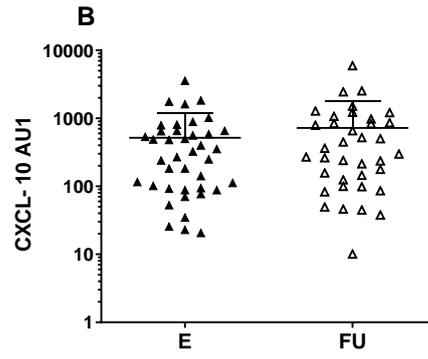
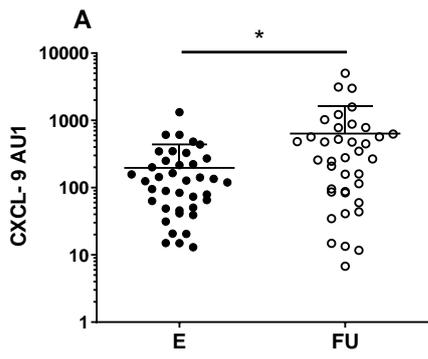
\*  $p < 0,05$  (gepaarter, zweiseitiger Wilcoxon-Test)

Während mithilfe der Glaskapillarmethode zum Sammeln des Tränenfilms für alle Proben eine gleiche Grundmenge an Tränenflüssigkeit garantiert werden konnte, wurden bei der Schirmer-Methode zum Sammeln von Tränenflüssigkeit unterschiedliche Mengen an Tränenflüssigkeit bei den Patienten gewonnen aufgrund der unterschiedlichen Schirmer-Laufweite. Um dieses Problem zu beheben, wurde versucht, mithilfe der in einem Schirmer-Streifen gemessenen Gesamtproteinkonzentration eine Referenzgröße (*arbitrary unit* (AU)) herzustellen.

$$AU1 = \frac{MFI}{\text{Gesamtproteinkonzentration Schirmer Probe} \left[ \frac{mg}{ml} \right]}$$

$$AU2 = \frac{\text{gemessene Proteinkonzentration} \left[ \frac{pg}{ml} \right]}{\text{Gesamtproteinkonzentration Schirmer Probe} \left[ \frac{mg}{ml} \right]}$$

Die anhand dieser Formeln berechneten Werte sind in Abbildung 7 dargestellt. Es zeigte sich für CXCL-9 (Abbildung 7A) eine statistisch signifikante Zunahme zwischen der E und FU ( $p < 0,05$ ). Auch für die Chemokine CXCL-10 und CXCL-11 (Abbildung 7B, 7C) konnte eine Zunahme festgestellt werden, jedoch ohne statistische Signifikanz. IL-8, C5a und EGFR (Abbildung 7D, 7F, 7G) wiesen keine sichtbare Veränderung zwischen den verschiedenen Untersuchungen auf. C3a (Abbildung 7E) zeigte eine statistisch nicht signifikante Erniedrigung des AU2 Wertes bei der FU.



## Abbildung 7. Vergleich von E und FU bezogen auf die gemessene Gesamtproteinkonzentration.

(A) bis (G) zeigen die MFI und [pg/ml] Werte aus Abbildung 5 und Abbildung 6 bezogen auf die in den Schirmerproben gemessenen Gesamtproteinkonzentrationen. Die Streuweite der gemessenen Proteine ist wie folgt: CXCL-9 E (13 – 1319 AU1), CXCL-9 FU (6,8 – 5000 AU1), CXCL-10 E (20,6 – 3568 AU1), CXCL-10 FU (10 – 5935 AU1), CXCL-11 E (3,5 – 285 AU1), CXCL-11 FU (4,1 – 802 AU1), IL-8 E (3,2 – 712 AU2), IL-8 F1 (5,5 – 1011 AU2), C3a E (32 – 16931 AU2), C3a FU (107 – 10916 AU2), C5a E (43,3 – 11930 AU2), C5a FU (44,4 – 11367 AU2), EGFR E (45,5 – 8442 AU2), EGFR FU (134 – 9153 AU2). (A) CXCL-9 zeigt eine signifikante Erhöhung von E zu FU. (B) – (I) Die Ergebnisse weisen nur Tendenzen auf, aber keine signifikanten Unterschiede.

\*  $p < 0,05$  (gepaarter, zweiseitiger Wilcoxon-Test)

### 3.2.4 Reevaluierung der Proteinisolationmethode

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit gemessenen Proteinmengen (Abbildung 5, Abbildung 6, Abbildung 7) stimmten nicht mit bereits publizierten Werten überein (Cocho et al. 2016; Riemens et al. 2012). In diesen Studien wurden andere Methoden als in dieser Arbeit verwendet. Deshalb wurde zur kritischen Hinterfragung die hier verwendete Methode zur Proteinisolation aus Schirmer-Streifen erneut evaluiert (Green-Church et al. 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits ein Human Chemokine Standard nach dem Proteinisolutionsprotokoll behandelt. Es zeigte sich, dass IFN- $\gamma$  dabei nicht messbar war und die restlichen Chemokine und Zytokine eine akzeptable Wiederfindungsrate zeigten.

Nun wurden 25  $\mu$ l der Human Chemokine Standardlösung auf einen Schirmer-Streifen getropft und dieser nach dem Proteinisolationsschema (s. 2.2.2) behandelt. Diese Probe wurde dann parallel mit dem dafür verwendeten Human Chemokine Standard analysiert und die Wiederfindungsrate gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Es zeigte sich eine sehr niedrige Wiederfindungsrate der Chemokine und Zytokine im Rahmen der Proteinextraktion aus Schirmer-Streifen.

**Tabelle 16. Wiederfindungsrate einer Standardschirmerprobe nach dem Proteinisolationsschema**

	IL-6	IL-8	CXCL-9	CXCL-10	CXCL-11
<b>Wiederfindungsrate</b>	1,3 %	2,8 %	1,1 %	3,1 %	3,6 %

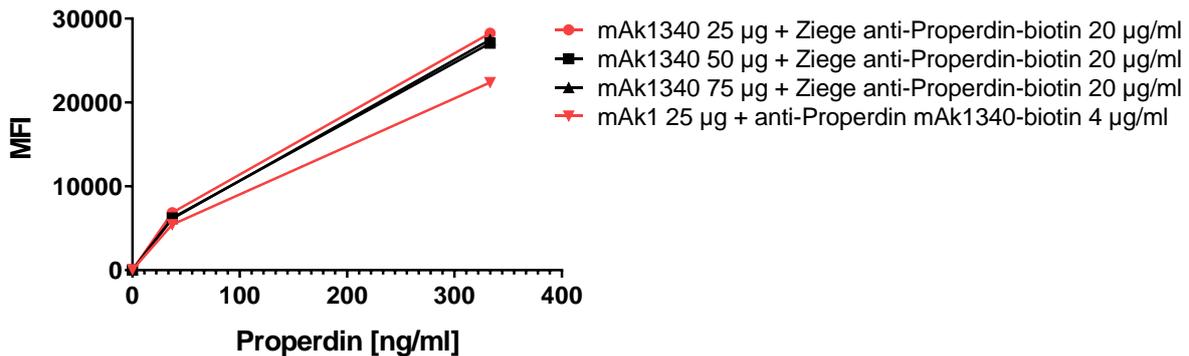
### 3.3 Etablierung eines Multiplex-Assays

Das Komplementsystem besteht aus mehr als 20 verschiedenen Plasmaproteinen wie C1 – C9 oder inhibierenden Faktoren wie Faktor H oder Faktor I. Als einzige komplementsystemstabilisierende Komponente kommt Properdin eine besondere Bedeutung zu. Ein System zur simultanen Detektion von C3a und C5a wurde bereits etabliert und in der vorliegenden Arbeit zur Analyse der Schirmer-Streifen verwendet (Gallenkamp et al. 2018). C3a und C5a spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Regulation alloreaktiver T-Zellen (Cravedi et al. 2013). Ein Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Systems zur simultanen Detektion von C3a, C5a und Properdin aus geringen Probenvolumina mithilfe der MAGPIX Technologie von Luminex.

#### 3.3.1 Auswahl des Fängerantikörpers

Als Voraussetzung für die Etablierung eines simultanen Detektionssystems für C3a, C5a und Properdin wurden zuerst die optimalen Bedingungen für die Einzeldetektion von Properdin eruiert. Dafür wurden verschiedene Mengen und Spezifitäten von Fängerantikörpern an unterschiedliche *Bead*-Regionen (33, 55) gekoppelt, durch einen spezifischen Detektionsantikörper erfasst und die Messwerte miteinander verglichen. *Bead*-Region 33 wurde dafür mit unterschiedlichen Mengen (25 µg, 50 µg, 75 µg) mAk1340 beladen und mit einem biotinylierten, polyklonalen Detektionsantikörper Ziege anti-Properdin-biotin (20 µg/ml) kombiniert. *Bead*-Region 55 wurde mit mAk1 (25 µg) gekoppelt, zur Detektion wurde anti-Properdin mAk1340-biotin (4 µg/ml) verwendet.

Die Messwerte von *Bead*-Region 33 (Abbildung 8) zeigten vergleichbare Signalstärken für die unterschiedlichen eingesetzten Antikörpermengen, sowohl für die maximale Signalstärke als auch für das Hintergrundsignal. Bei *Bead*-Region 55 zeigten sich vergleichbare MFI-Werte mit *Bead*-Region 33 (Abbildung 8). Für die folgenden Optimierungsprozesse wurden beide *Bead*-Sorten mit der geringsten Antikörpermenge (25 µg) verwendet.

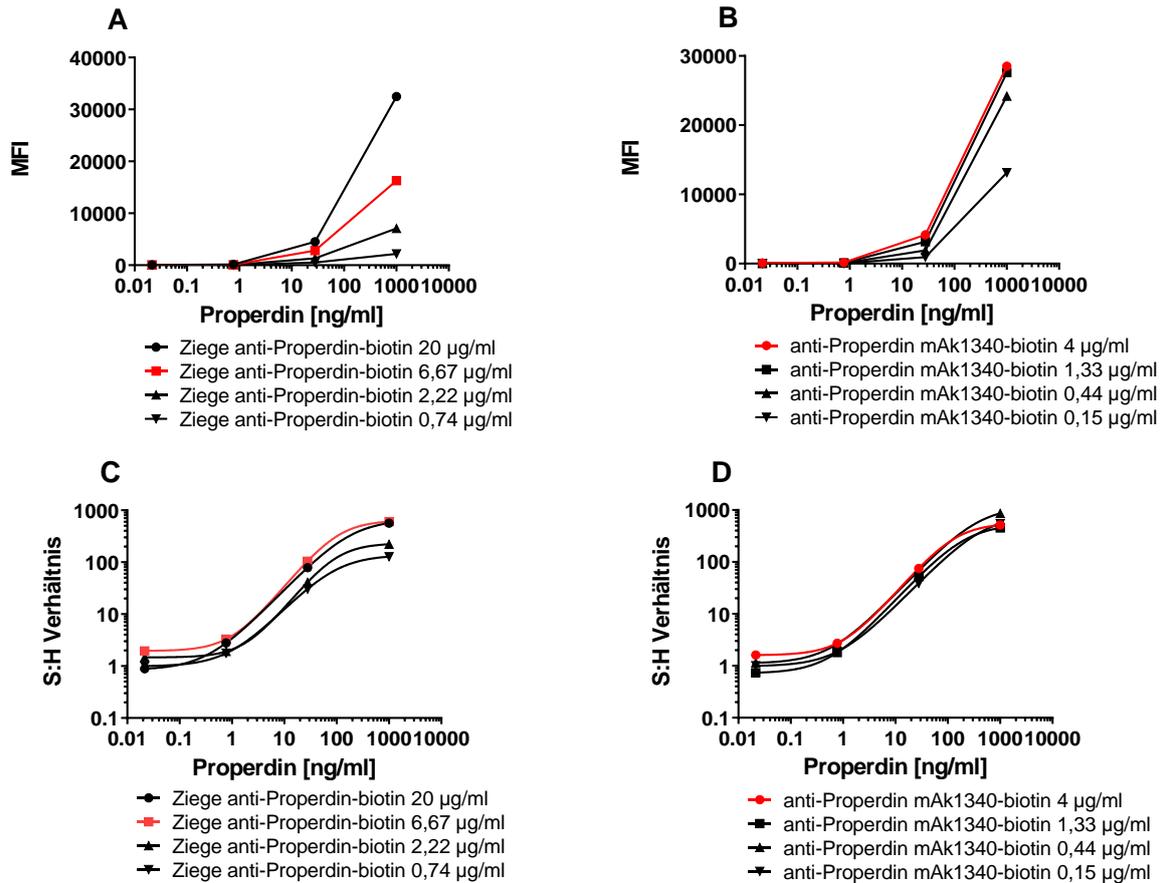


**Abbildung 8. Properdin-Singleplex mit unterschiedlichen Fänger-Ak und -mengen.**

Die Abbildung zeigt die konzentrationsabhängige Bestimmung der Stärke des Messsignals bei der Detektion von Properdin mittels unterschiedlicher Fänger- und Detektionsantikörperkombinationen. Der Fängerantikörper mAk1340 (Region 33) wurde mit 25 µg, 50 µg oder 75 µg, der Fängerantikörper mAk1 (Region 55) mit 25 µg an Multiplexbeads gekoppelt. Properdin wurde in einer Konzentrationsreihe von 37-333 ng/ml inkubiert. Die Detektionsantikörper Ziege anti-Propredin-biotin (20 µg/ml) und anti-Propredin mAk1340-biotin (4 µg/ml) wurden zum Nachweis eingesetzt. Properdin wurde bei allen Antikörperkombinationen mit einer ähnlichen Nachweisgrenze detektiert. Für die weitere Etablierung wurden die rot markierten Kombinationen mAk1340 (25 µg) und Ziege anti-Propredin-biotin, bzw. mAk1 (25 µg) und anti-Propredin mAk1340-biotin als Reagenzienpaare ausgewählt.

### 3.3.2 Auswahl der Detektionsbedingungen

Für die weitere Etablierung des Properdin-Singleplex wurde die eingesetzte Menge an Detektionsantikörper variiert und der Einfluss auf die Sensitivität des Assay überprüft. Dabei wurde mAk1340 mit Ziege anti-Propredin-biotin (20 µg/ml, 6,67 µg/ml, 2,22 µg/ml, 0,74 µg/ml) und mAk1 mit anti-Propredin mAk1340-biotin (4 µg/ml, 1,33 µg/ml, 0,44 µg/ml, 0,15 µg/ml) kombiniert. Der Versuch wurde anhand einer Properdin-Standardkurve (0,02 – 1000 ng/ml, 1:36) durchgeführt. Mit der eingesetzten Menge an Detektionsantikörper nahm auch die gemessene Signalstärke zu (Abbildung 9A, 9B). Aufgrund des dazu parallelen Anstiegs des unspezifischen Hintergrundwertes wurde zur Bestimmung der optimalen Konfiguration das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis herangezogen, welches als Maß für die Sensitivität eines Assays gilt (Abbildung 9C, 9D). Betrachtet wurde v.a. das Detektionspotential bei geringen Konzentrationen von Properdin (0,02 ng/ml). Nach Analyse der Sensitivität und des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses bei unterschiedlichen Antikörpermengen wurde die weitere Etablierung mit Ziege anti-Propredin-biotin (6,67 µg/ml) und anti-Propredin mAk1340-biotin (4 µg/ml) durchgeführt.



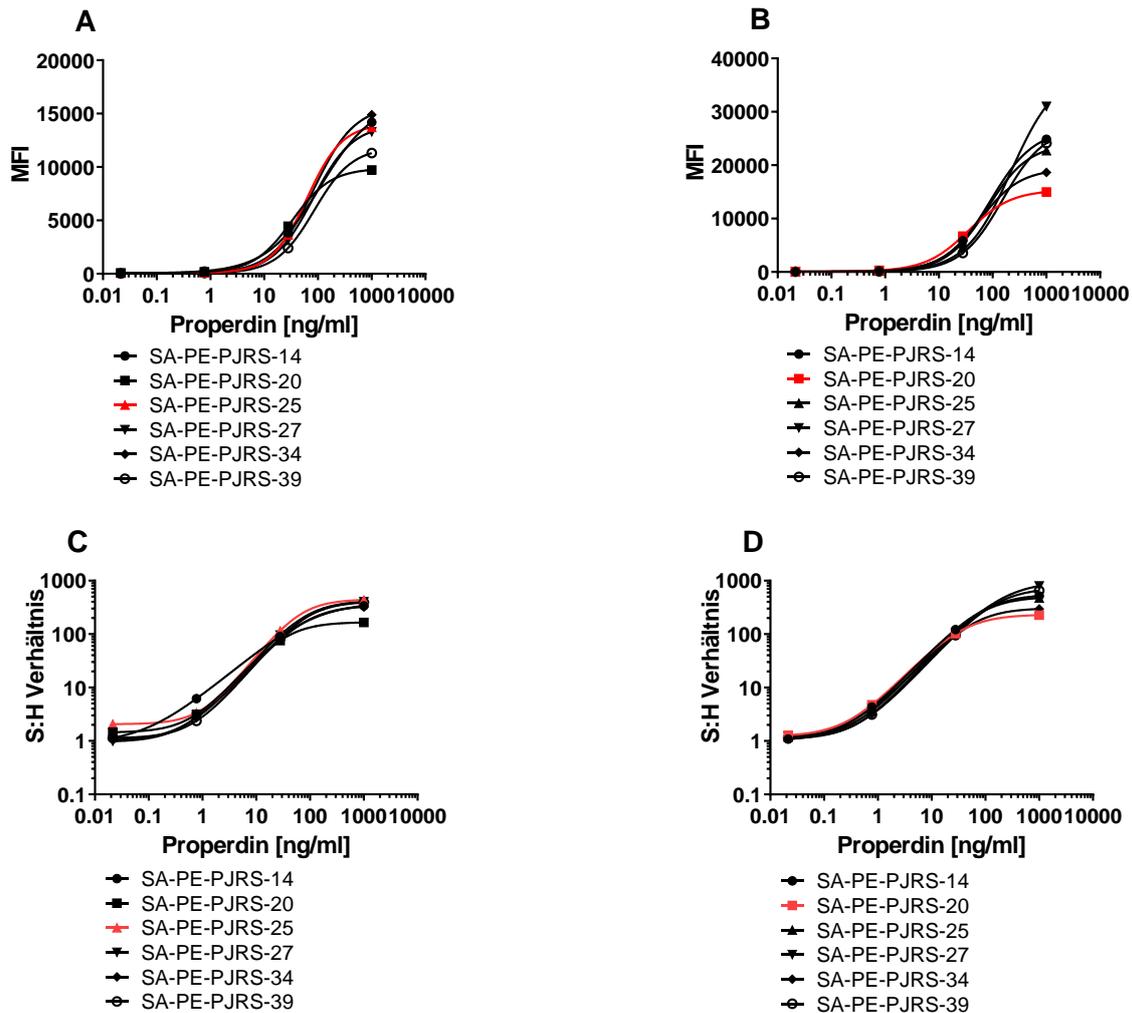
## Abbildung 9. Properdin-Singleplex-Optimierung mittels verschiedener Detektionsantikörpermengen

Der Nachweis von Properdin wurde mittels einer Verdünnungsreihe (0,02 – 1000 ng/ml, 1:36) durch Variation der Detektionbedingungen im Singleplex optimiert. (A, C) Unterschiedliche Konzentrationen des Detektionsantikörper Ziege anti-Properdin-biotin (0,74-20 µg/ml) wurden in Kombination mit dem an Beads immobilisierten Fängerantikörper mAk1340 verwendet. (B, D) Der Detektionsantikörper anti-Properdin mAk1340-biotin (1,15-4 µg/ml) wurde mit immobilisiertem mAk1 kombiniert. (A, B) Die Menge des eingesetzten Detektionsantikörpers resultierte in einer Zunahme der Signalstärke bei allen getesteten Varianten. (C, D) Das Signal zu Hintergrundverhältnis (S:H Verhältnis) zeigte das jeweilige sensitivste Nachweissignal für die Antikörperkombinationen (C) mAk1340 mit Ziege anti-Properdin-biotin (6,67 µg/ml) und (D) mAk1 mit anti-Properdin mAk1340-biotin (4 µg/ml). Die rot markierten Bedingungen wurden für die weitere Assayetablierung verwendet.

S:H Verhältnis = Standard zu Hintergrund Verhältnis

### 3.3.3 Auswahl des Streptavidin-Phycoerythrin

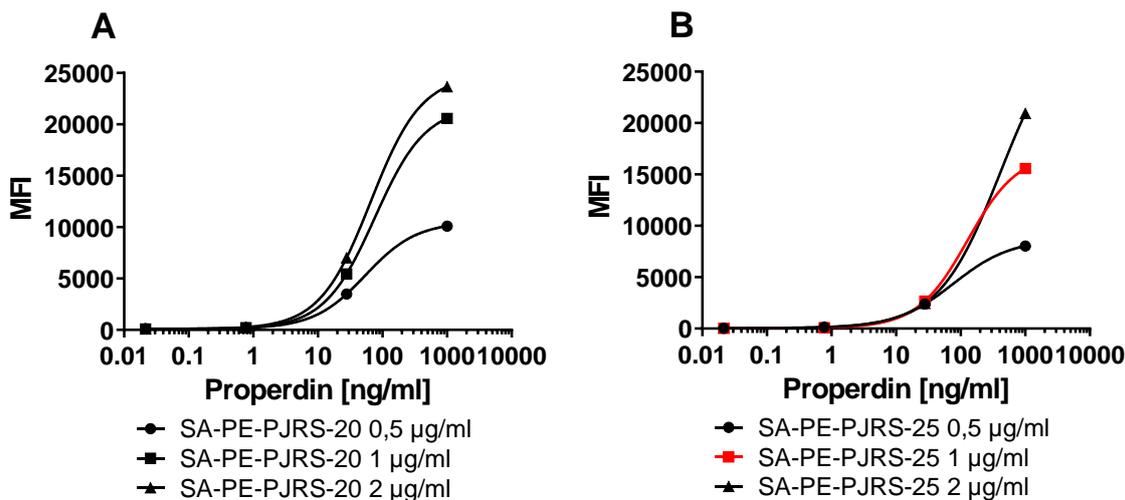
Um das gebundene Properdin detektieren zu können wurde SA-PE verwendet. Dabei bindet Streptavidin an das Biotin des Detektionsantikörpers und das Fluoreszenzsignal von Phycoerythrin kann gemessen werden. Je nach Kopplungsverhältnis und eingesetzter Menge von SA-PE kann sich das gemessene Signal unterscheiden. Dazu wurden die bisher festgelegten Reagenzienpaare (3.3.1, 3.3.2) mit verschiedenen SA-PE Konjugaten (PJRS-14, 20, 25, 27, 34, 39) (1 µg/ml) kombiniert. Die gemessenen Standardkurven (0,02 – 1000 ng/ml, 1:36) zeigten einen sigmoidalen Verlauf mit oberem und unterm Plateau. Für mAk1340 + Ziege anti-Properdin-biotin zeigten sich keine bedeutsamen Unterschiede bei Betrachtung der gemessenen Signalstärken. Durch Heranziehen des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses konnte SA-PE-PJRS-25 als bestes erfasst werden (Abbildung 10A, 10C). Bei mAk1 + anti-Properdin mAk1340-biotin stachen SA-PE-PJRS-27 mit einer hohen und SA-PE-PJRS-20 mit einer geringen gemessenen Signalstärke heraus (Abbildung 10B). Bei Betrachtung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses verliefen die Kurven nahezu parallel, weshalb SA-PE-PJRS-20, trotz seiner geringeren Signalstärke, aufgrund des besseren Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses bei den Konzentrationen 0,02 ng/ml und 0,77 ng/ml weiterverwendet wurde (Abbildung 10D).



### Abbildung 10. Variation des SA-PE

Die Bestimmung von Properdin mittels einer Verdünnungsreihe (0,02 – 1000 ng/ml, 1:36) wurde durch Variation des SA-PE optimiert. Dafür wurden 6 verschiedene SA-PE mit den bekannten Antikörperkombinationen mAk1340 + Ziege anti-Properdin-biotin (A, C) bzw. mAk1 + anti-Properdin mAk1340-biotin (B, D) kombiniert. (A) und (B) zeigten zum Teil stark unterschiedliche maximale Signalstärken, bei allerdings ähnlich guter Nachweisgrenze. (C, D) Die Signal zu Hintergrund Verhältnisse lieferten das sensitivste Nachweissignal für die Reagenzienkombinationen (C) mAk1340 + Ziege anti-Properdin-biotin + SA-PE-PJRS-25 und (D) mAk1 + anti-Properdin mAk1340-biotin + SA-PE-PJRS-20. Die rot markierten Bedingungen wurden für die weitere Assayetablierung verwendet.

Nach Auswahl des SA-PE Konjugates (Abbildung 10) wurde nun zur weiteren Optimierung die eingesetzte SA-PE Konzentration variiert (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml). Die gemessenen Standardkurven (0,02 – 1000 ng/ml, 1:36) wiesen einen sigmoidalen Verlauf auf, wobei die gemessene Signalstärke mit der SA-PE Konzentration zunahm. Die Konzentration 0,5 µg/ml zeigte deutlich niedrigere MFI-Werte als 1 µg/ml oder 2 µg/ml. Da 1 µg/ml und 2 µg/ml vergleichbare Kurven lieferten, wurde im Folgenden die Konzentration 1 µg/ml verwendet.



**Abbildung 11. Ermittlung der optimalen SA-PE Konzentration**

Der Nachweis von Properdin wurde mittels einer Verdünnungsreihe (0,02 – 1000 ng/ml, 1:36) durch Variation der SA-PE Konzentration optimiert. Die Antikörperpaare (A) mAk1 + anti-Properdin mAk1340-biotin und (B) mAk1340 + Ziege anti-Properdin-biotin wurden mit unterschiedlichen Mengen (A) SA-PE-PJRS-20 (0,5 – 2 µg/ml) bzw. (B) SA-PE-PJRS-25 (0,5 – 2 µg/ml) kombiniert. (A, B) Die Konzentrationen 1 µg/ml und 2 µg/ml wiesen ähnlich hohe Signalstärken auf, während die Signalstärke der Konzentration 0,5 µg/ml im Vergleich dazu abfiel. In folgenden Versuchen wurde mit der Konzentration 1,0 µg/ml weitergearbeitet. Die rot markierten Bedingungen wurden für die weitere Assayetablierung verwendet.

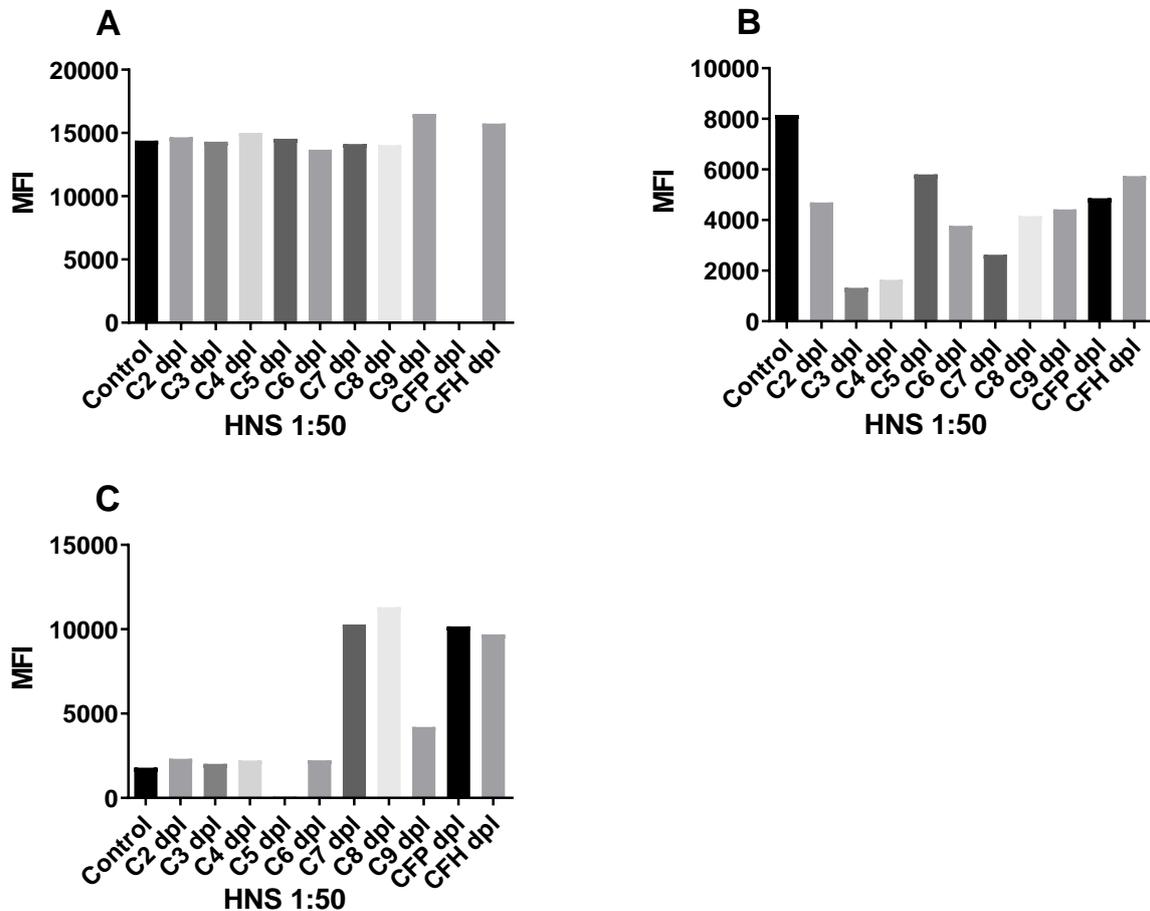
Die optimalen Bedingungen des Singleplex-Propertdin-Assays wurden nun mit denen von C3a und C5a kombiniert. Zur genaueren Charakterisierung des Multiplex-Assays wurden die Spezifität, die Sensitivität und die Varianz gemessen. Für die Detektion von C3a und C5a wurden bereits etablierte Antikörper verwendet (Gallenkamp et al. 2018).

**Tabelle 17. Bedingungen des Properdin Multiplex-Assay**

	C3a	C5a	Properdin
<b>Bead-Region</b>	13	26	33
<b>Fängerantikörper</b>	mAk Klon 2991	C17/5	mAk1340
<b>Konzentration</b>	3,4 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
<b>Detektionsantikörper</b>	mAk 474-biotin	G25/2-biotin	Ziege anti-Properdin-biotin
<b>Konzentration</b>	2 µg/ml	2 µg/ml	6,67 µg/ml
<b>SA-PE</b>	PJRS-25	PJRS-25	PJRS-25
<b>Konzentration</b>	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
<b>Verdünnungspuffer</b>	BPEF	BPEF	BPEF
<b>Probenvolumen</b>	50 µl	50 µl	50 µl

### 3.3.4 Spezifitätsanalyse

Die neu etablierte Konfiguration (Tabelle 17) zum simultanen Nachweis von C3a, C5a und Properdin aus 50 µl Proben wurde mittels 1:50 verdünnter Seren hinsichtlich der Spezifität getestet: HNS (Kontrollserum, C2 depletiertes (dpl) – C9dpl Serum, Properdin-dpl Serum und CFHdpl Serum). Die Antikörper zur Detektion von Properdin (Abbildung 12A) zeigten eine hohe Spezifität. Properdin wurde in allen Seren, außer im Properdin-dpl Serum im oberen Plateaubereich nachgewiesen. Auch bei der Detektion von C5a (Abbildung 12C) konnte von einer hohen Spezifität der Antikörper ausgegangen werden. Die Signalstärke variierte zwischen den verschiedenen HNS und bei der C5dpl Probe konnte wie erwartet kein C5a nachgewiesen werden. Bei der C3a Messung wies das C3dpl HNS die geringste Signalstärke auf (Abbildung 12B). Auffallend war, dass die gemessene Signalstärke bei der 1:50 Verdünnung noch deutlich über dem eigentlich erwarteten Blindwert lag.



### Abbildung 12. Spezifitätsüberprüfung des Multiplex-Assays

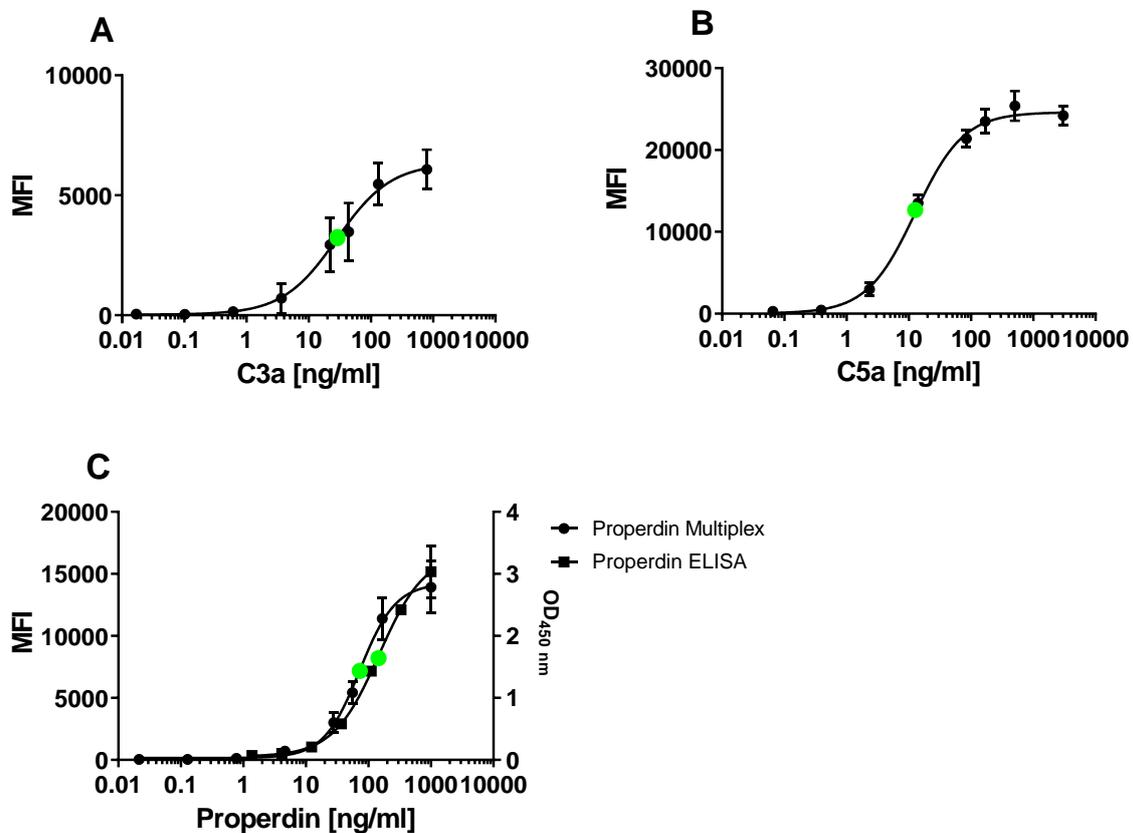
Die Legende zeigt die Spezifität der Antikörper bei der Messung unterschiedlicher 1:50 verdünnter HNS. (A) Im Properdin depletierten Serum konnte kein Properdin nachgewiesen werden, während in den restlichen Seren Properdin im oberen Plateaubereich registriert wurde. (B) Bei der Messung von C3a konnte dieses in 1:50 verdünnten HNS nachgewiesen werden. Im C3 depletierten Serum wurde bei einer 1:50 Verdünnung noch C3a detektiert, aber weniger als in den restlichen Proben. (C) Die Signalstärke von C5a variierte bei der Messung der verschiedenen Proben. Im C5 depletierten Serum konnte kein C5a nachgewiesen werden.

### 3.3.5 Sensitivitätsbestimmung

Eine wichtige Größe zur Beschreibung eines Immunoassays ist die Sensitivität. Zur Sensitivitätsbestimmung wurde eine gemischte Standardkurve (C3a 0,02 – 790 ng/ml, C5a 0,07 – 3037 ng/ml, Properdin 0,02 – 1000 ng/ml) an fünf verschiedenen Tagen gemessen und die Ergebnisse in Abbildung 13 anhand sigmoidaler Graphen visualisiert. Für Properdin wurde vergleichend die Standardkurve eines Sandwich-ELISA aufgetragen, welche nahezu

parallel zu der Multiplex-Standardkurve verlief. Als untere Nachweisgrenze wurde für C3a 0,11 ng/ml bestimmt, für C5a 0,04 ng/ml und für Properdin 0,32 ng/ml.

Eine weitere wichtige Größe zur Beschreibung eines Immunoassays ist die  $EC_{50}$  (mittlere effektive Konzentration). Gemeint ist damit die Konzentration, bei der halbmaximale MFI-Werte gemessen werden. Diese wurden in Abbildung 13 mit einem grünen Punkt markiert und beliefen sich auf  $EC_{50}(\text{C3a Multiplex}) = 28,3 \text{ ng/ml}$ ,  $EC_{50}(\text{C5a Multiplex}) = 12,7 \text{ ng/ml}$ ,  $EC_{50}(\text{Properdin Multiplex}) = 72,5 \text{ ng/ml}$  und  $EC_{50}(\text{Properdin ELISA}) = 147,8 \text{ ng/ml}$ . Es zeigte sich, dass der  $EC_{50}$ -Wert beim Properdin ELISA erst bei einer doppelt so hohen Konzentration wie beim Properdin Multiplex erreicht wurde.



**Abbildung 13. Sensitivität des Multiplexassays**

Die Legende zeigt die Mittelwerte aus fünf Standardkurven mit Standardabweichung der Werte für die Bestimmung von C3a, C5a und Properdin im Multiplex, sowie eine Vergleichsstandardkurve eines Sandwich-ELISA für Properdin. Der grüne Punkt markiert die jeweiligen  $EC_{50}$  Werte der Standardkurven. (A) Gezeigt ist die Standardkurve (0,017 – 790 ng/ml) für C3a. In (B) ist die Standardkurve von C5a (0,065 – 3037,2 ng/ml) dargestellt. (C) zeigt vergleichend die Multiplexstandardkurve von Properdin (0,021 – 1000 ng/ml) und die Sandwich-ELISA Standardkurve (1,37 – 1000 ng/ml). Die Multiplexkurve, aufgetragen in MFI-Werten, und die Sandwich-ELISA-Kurve, gemessen in  $OD_{450nm}$ -Werten, zeigen eine vergleichbare Sensitivität.

### 3.3.6 Varianzanalyse

Die Varianz eines Immunoassays ist ein Richtwert für die Reproduzierbarkeit und die Reliabilität. Sie wurde sowohl in verdünntem HNS als auch in aus Schirmer-Streifen isolierten Tränenproteinen bestimmt. Zur Bestimmung der Intraassayvarianz wurden die Proben fünf- (HNS) bzw. viermal (Tränenproteine) innerhalb eines Assays gemessen. Für die Interassayvarianz wurden die Proben an fünf (HNS) bzw. vier (Tränenproteine) Tagen vermessen und die Werte verglichen. Die ermittelten Ergebnisse sind Tabelle 18 zu entnehmen.

**Tabelle 18. Inter- und Intraassayvarianz des Multiplex-Assays**

	C3a	C5a	Properdin
<b>Interassayvarianz (humanes Serum 1/100 in BPEF)</b>	66,4 %	57,3 %	5,1 %
<b>Intraassayvarianz (humanes Serum 1/500 in BPEF)</b>	2,7 %	6,0 %	3,0 %
<b>Interassayvarianz (isolierte Schirmer-Proteine in H<sub>2</sub>O bidest.)</b>	5,0 %	12,1 %	21,5 %
<b>Intraassayvarianz (isolierte Schirmer-Proteine in H<sub>2</sub>O bidest. )</b>	9,0 %	2,8 %	5,8 %

### 3.3.7 Zusammenfassung des C3a, C5a und Properdin Assays

Nach Etablierung des Assays wurde dieser zum Nachweis der C3a-, C5a- und Properdinkonzentration in verschiedenen humanen Proben angewendet. In HNS (1:100, 1:500) konnten alle drei Komponenten im deutlich messbaren Bereich nachgewiesen werden, während bei humanem Plasma (1:300) nur Properdin detektierbar war. In Urin konnte keines der Analyte gefunden werden. Es wurde vergleichend eine Sputumprobe eines Nichtraucherers mit der eines Rauchers verglichen. C3a, C5a und Properdin konnte beide Male gemessen werden. Außerdem war die beim Rauchersputum gemessene Signalstärke von allen 3 Analyten deutlich höher als beim Nichtraucherersputum. Bei der Überprüfung von Kammerwasser und Proteinen aus Schirmer-Streifen wurden ähnlich hohe Werte gemessen.

Zum Abschluss gibt Tabelle 19 einen Überblick über die für den C3a, C5a, Properdin Multiplex Assay ermittelten Kenngrößen. Es sind die Nachweisgrenze, das untere und das obere Plateau, sowie die mittlere effektive Konzentration aufgeführt.

**Tabelle 19. Kennzahlen des Multiplex-Assay**

Kennzahl	C3a	C5a	Properdin
<b>Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i>, LOD)</b>	0,11 ng/ml	0,04 ng/ml	0,32 ng/ml
<b>Unteres Plateau der Standardkurve (<i>bottom</i>)</b>	42,3	52,8	74,6
<b>Oberes Plateau der Standardkurve (<i>top</i>)</b>	6337	24610	14254
<b>Mittlere effektive Konzentration (EC<sub>50</sub>)</b>	28,3 ng/ml	12,7 ng/ml	72,5 ng/ml

## 4 Diskussion

Die Transplantation von Knochenmark oder Stammzellen ist eine potentiell kurative Behandlung verschiedenster maligner und nicht maligner hämatologischer Erkrankungen (Cotliar 2017). Eine der Hauptkomplikationen dieser Therapie ist die Entstehung einer akuten oder chronischen Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD). Diese manifestiert sich meist an der Haut, der Leber, dem Gastrointestinaltrakt oder den Augen (Lin und Cavanagh 2015). Die Pathophysiologie der akuten GvHD ist sehr gut bekannt. Es kommt dabei in einem komplexen, kaskadenartigen Ablauf zu einer Beeinflussung der Organoberflächen durch T-Zellen mithilfe von Interleukinen, IFN- $\gamma$  und vieler anderer Zytokine (Ferrara und Reddy 2006b). Die Pathophysiologie der chronischen GvHD ist weniger gut verstanden aufgrund des Fehlens passender experimenteller Modelle. Ein Hauptmerkmal sind fibrotische, autoimmun wirkende Veränderungen der Organe (Toubai et al. 2008). Die okuläre GvHD ist eine vorwiegend chronische Erkrankung, welche Symptome des trockenen Auges hervorruft. Sie kann über entzündliche Veränderung der Augen und ihrer Adnexe zu einer Verschlechterung der Sehkraft und zur vollständigen Erblindung führen (Dietrich-Ntoukas und Steven 2015). In verschiedensten Studien wurden bereits Zytokine als mögliche Biomarker beschrieben. Die in dieser Arbeit untersuchten CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11 (Yoon et al. 2010), IL-6, IFN- $\gamma$  (Lee et al. 2013; Riemens et al. 2012), IL-8, EGFR (Cocho et al. 2016) wurden in bisherigen Veröffentlichungen stets verglichen zwischen gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit einer diagnostizierten okulären GvHD. C3a und C5a wurden bereits in Tränenflüssigkeit detektiert, allerdings noch nicht als möglicher Biomarker der okulären GvHD betrachtet (Gallenkamp et al. 2018). Diese Proteine wurden in der vorliegenden Arbeit bei Patienten vor und nach allogener SZT bestimmt, um mögliche Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf ziehen zu können. In einem anderen Teil der Arbeit wurde der bereits bestehende Duplex-Assay zur simultanen Detektion von C3a und C5a durch Kombination mit Properdin erweitert, um Properdin in späteren Studien ebenfalls analysieren zu können.

### 4.1 Klinische Untersuchung

In den klinischen Untersuchungen der Patienten vor und nach allogener SZT konnten in dem beobachteten Zeitraum bereits erste klinische Veränderungen nachgewiesen werden. Die Schirmer I-Laufweite als Maß für die Tränensekretion ist in dieser Arbeit bereits in dem beobachteten Zeitraum von im Median 132 Tagen nach der allogenen SZT signifikant

verringert. Aus vorherigen Publikationen ist bekannt, dass die Schirmer-Laufweite bei Patienten mit okulärer GvHD im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich reduziert ist (Cocho et al. 2016), weshalb die Schirmer-Laufweite in den bisherigen Diagnosekriterien des NIH (Ogawa et al. 2013) eine wesentliche Rolle spielte.

Die in der Literatur beschriebene Schirmer I-Laufweite bei Patienten mit okulärer GvHD ist ( $3,68 \pm 2,90$ ) zwar deutlich niedriger als in der vorliegenden Arbeit ( $12,0 \pm 10,6$ ) (Cocho et al. 2016). Dies ist jedoch dadurch zu erklären, dass die hier untersuchten Patienten zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt nach der allogenen SZT nachuntersucht wurden, an dem ein wesentlicher Teil der Patienten noch keine – zumindest nicht klinisch - nachweisbare okuläre GvHD aufwies. Auch die TBUT ist zu diesem frühen Zeitpunkt der FU im Durchschnitt um 1,3 s zur E verringert. Sowohl die vor als auch nach SZT gemessenen Werte befinden sich noch im physiologischen Bereich, dennoch handelt es sich um einen starken tendenziellen Rückgang. Bei Patienten mit okulärer GvHD ist sie signifikant verringert. In der vorliegenden Arbeit konnte dies jedoch auch für Patienten gezeigt werden, die nach der allo-SZT noch keine okuläre GvHD aufwiesen. Auch der OSDI-Score ist in der vorliegenden Arbeit (E:  $6,3 \pm 9,9$ ; FU:  $10,7 \pm 11,7$ ) bereits bei der FU signifikant erhöht, was eine schon relativ früh nach der allogenen SZT auftretende Zunahme der subjektiven okulären Beschwerden und damit einhergehende Einschränkung der Lebensqualität bedeutet. Auch diesbezüglich ist aus Vorarbeiten bekannt, dass Patienten mit einer manifesten okulären GvHD einen höheren OSDI-Score aufwiesen (keine oGvHD  $3,2 \pm 3,6$ ; GvHD:  $17,6 \pm 7,7$ ) (Jung et al. 2015), nicht aber, dass dieses Phänomen auch ohne eine klinisch diagnostizierte okuläre GvHD besteht. Wichtige Bestandteile bisheriger Studien sind die Testung des kornealen Fluoreszeinstaining und die Untersuchung der konjunktivalen Hyperämie. Diese zeigten zwischen gesunden und kranken Probanden signifikante Unterschiede (Jung et al. 2015; Cocho et al. 2016). Dahingegen konnte in der vorliegenden Arbeit in dem bisher untersuchten Zeitraum noch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen E und FU festgestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikant vermehrtes Auftreten einer Blepharitis der Augenlider und von LIPCOFs festgestellt. Dieses Phänomen wurde in bisher publizierten Studien noch nicht genauer untersucht. Eine Blepharitis sowie LIPCOFs sind auch in milder Ausprägung klinische Veränderungen, die die Beschwerden des trockenen Auges sowie folgende schwerere klinische Veränderungen wie korneale Veränderungen nach sich ziehen können (Nassar et al. 2013; Lang et al. 2016). Daher sollte das Auftreten dieser Pathologien in zukünftigen Untersuchungen weiter beobachtet werden. Bei den anderen im Rahmen der klinischen Untersuchung festgestellten Befunden wie dem Visus, dem Augeninnendruck oder

dem Bindehaut-, Hornhaut- und Linsenstatus zeigten sich keine Unterschiede zwischen E und FU. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass zu einem noch relativ frühen Zeitpunkt nach der allogenen SZT auch bei Patienten ohne eine manifeste okuläre GvHD bereits erste klinische Veränderungen auftreten, die allerdings noch keine schweren klinischen Folgen (im Sinne beispielsweise einer Verletzung der kornealen Integrität) nach sich ziehen.

## **4.2 Studiensetting**

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Studie handelt es sich um eine prospektive Studie. Die Patienten wurden sowohl vor als auch nach der Stammzelltransplantation in der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde vorgestellt. Dabei wurde die Menge an im Tränenfilm nachweisbaren Proteinen im Zeitverlauf untersucht, unabhängig von der Diagnose einer okulären GvHD. Dies steht im Gegensatz zu den bisher durchgeführten Biomarkerstudien. Diese sind in Form einer Querschnittstudie angelegt, bei der Patienten mit einer okulären GvHD mit gesunden Probanden verglichen wurden (Cocho et al. 2016; Jung et al. 2015). Ein Problem dieser Arbeiten ist, dass nur eine Momentaufnahme analysiert wird und keine Aussage über einen möglichen zeitlichen Verlauf getroffen werden kann. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Zeitraum nach allogener SZT ist zum jetzigen Zeitpunkt noch begrenzt (Median 132 Tage nach SZT). Zu diesem Zeitpunkt wurde jedoch bei bereits zwei Patienten eine okuläre GvHD diagnostiziert. Um zu detektieren, wie viele der untersuchten Patienten insgesamt und in welchem Zeitraum diese Patienten eine okuläre GvHD entwickeln, ist eine längerfristige Beobachtung notwendig. In der Studie von Cocho et. al betrug die durchschnittliche Dauer zwischen Stammzelltransplantation und der Diagnose einer okulären cGvHD 13,5 Monate (Cocho et al. 2016). In einer anderen Studie betrug der Median der Zeit zwischen Stammzelltransplantation und Probengewinnung im Rahmen der Studie sogar 37 Monate (Riemens et al. 2012). Um zu analysieren, wie viele Patienten und in welchem Zeitraum die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten eine okuläre GvHD entwickeln, ist ein längerer Beobachtungszeitraum nach allogener SZT notwendig.

## **4.3 Analyse der Schirmer-Proben**

### **4.3.1 Vergleich verschiedener Proteingewinnungsmethoden**

Zur Isolierung von Proteinen aus Tränenflüssigkeit sind verschiedene Methoden beschrieben. Allgemein kann zwischen der Glaskapillarmethode und der Schirmer-Methode unterschieden werden. Inwieweit sich die Methoden voneinander, aber auch innerhalb der jeweiligen

Methode unterscheiden, wird im Folgenden diskutiert. Die Gewinnung der jeweiligen Schirmer-Proben wurde immer durchgeführt wie unter 2.2.1 beschrieben.

2008 untersuchten Green-Church et al. das Tränenfilmproteom. Dazu verwendeten sie die Proteinisolationmethode aus Schirmer-Streifen (analog zu 2.2.2) und die Glaskapillarmethode parallel zum späteren Vergleich der Ergebnisse. Bei der Glaskapillare entfiel die Inkubation mit 100 µl 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (1h, RT). Die restlichen Schritte wurden parallel ausgeführt. Mithilfe der Glaskapillare (Fassungsvermögen 5 µl) wurde ca. 7 µg/µl Protein in der Tränenflüssigkeit detektiert. Für die durch Schirmer-Streifen gewonnenen Tränenproteine konnte nur eine Gesamtmenge pro Schirmer-Streifen angegeben werden (120 µg pro Schirmer), da diese Methode keine Aussage zu der gesammelten Flüssigkeitsmenge zulässt. Deshalb wurden für die weiteren Untersuchungen mehrere Glaskapillaren gepoolt, während dies bei den Schirmer-Proben nicht nötig war. Tendenziell wurde in den Schirmer-Proben mehr Proteine vermutet, was sich durch die erhöhte Anzahl verschiedener gefundener Proteine begründen lässt (84 vs. 43). Eine mögliche Ursache hierfür wäre der Kontakt des Schirmer-Streifens mit dem Epithel der Bindehaut (Green-Church et al. 2008).

Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte die Wiederfindungsrate von Zytokinen und Matrix-Metalloproteasen bei ihrer Isolation aus Schirmer-Streifen (VanDerMeid et al. 2011). Dazu wurde für die untersuchten Analyten eine Standardprobe hergestellt und 20 µl davon auf einen Schirmer-Streifen gegeben, sowie 20 µl in ein anderes Reaktionsgefäß gegeben und beide Proben über Nacht bei -20 °C gelagert. Zur Isolation der Proteine am nächsten Tag wurden beide Proben analog behandelt. Generell zeigte sich die Tendenz, dass bei der Isolation aus Schirmer-Streifen deutliche Mengen an Proteinen zurückblieben. So zeigten IL-4, IL-10 und IL-13 Wiederfindungsraten von unter 30 %. IL-10 konnte teilweise gar nicht mehr nachgewiesen werden (VanDerMeid et al. 2011). Für IL-6 und IL-8, welche in dieser Dissertation analysiert wurden, konnte eine Wiederfindungsrate von knapp 70 % erreicht werden. Während in der vorliegenden Arbeit die Messung einer IL-6 Standardkurve möglich war (Abbildung 4A), konnte kein IL-6 im Proteinextrakt aus Schirmer-Streifen gemessen werden. IL-8 konnte hingegen mithilfe einer Standardkurve aus den aus Schirmer-Streifen isolierten Tränenproteinen quantifiziert werden.

Die Ergebnisse beruhen auf einer Dreifachbestimmung. Es kann somit nicht sicher davon ausgegangen werden, dass bei der Isolation immer eine bestimmte Menge an Protein isoliert werden kann. Dies müsste in Zukunft noch eingehender analysiert werden.

In der Arbeit von Posa et. al ging es um den Vergleich der Effektivität beider Methoden. Während die bisher beschriebenen Methoden zur Isolation der Proteine aus den Schirmer-Streifen auf Inkubation mit verschiedenen Lösungsmitteln beruhen, wurde hier ein Schirmer-Streifen in einem Reaktionsgefäß zentrifugiert und die gewonnene Flüssigkeitsmenge in ein anderes Reaktionsgefäß überführt. Bei der Glaskapillare wurde die gesammelte Tränenflüssigkeit mithilfe einer Eppendorf-Pipette in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch Analyse mittels eines Bradford-Assays wurde bei beiden Methoden eine Proteinmenge von ca. 5 µg/µl gemessen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch erneutes Befeuchten (15 µl PBS) und Wiederholung des Isolationsschrittes erneut Proteine aus dem Schirmer-Streifen isoliert werden konnten. Dies legt nahe, dass, um möglichst realitätsnahe Werte zu erzielen, der Proteinisolationsschritt mehrfach durchgeführt werden sollte. Außerdem kam die Arbeitsgruppe zu dem Ergebnis, dass von den Probanden die Tränenfilmgewinnung mittels Schirmer-Streifen als deutlich angenehmer empfunden wurde. So wurde der Streifen kaum als Fremdkörper wahrgenommen, während die Glaskapillare sowohl verstärktes Misstrauen des Probanden erregte, als auch zu einer stärkeren Reizung der Augen führte (Posa et al. 2013). Es wäre somit wünschenswert, die Schirmer-Methode als verlässliche Methode zur Isolation von Proteinen aus dem Tränenfilm zu etablieren. Dafür müssten in Zukunft vergleichende Versuche hierzu durchgeführt werden, um die Methoden zu optimieren.

Unter der Annahme, dass die gemessenen Chemokin-, Zytokin- und Komplementfaktorkonzentrationen von der Gesamtproteinkonzentration eines Schirmer-Streifens abhängen, wurde überprüft, ob die Gesamtproteinkonzentration mit der Menge an Tränenflüssigkeit, repräsentiert durch die Schirmer-Laufweite, korreliert. Dies wäre ein einfacher zu bestimmender Referenzwert als die Bestimmung der Menge an Tränenflüssigkeit anhand der Schirmer-Laufweite, da auch bei Schirmer-Laufweiten von 0 – 1 mm Proteinkonzentrationen gemessen werden können, was vermutlich auf den Kontakt des Schirmer-Streifens mit der Bindehaut zurückzuführen ist. Die Korrelation zwischen Gesamtproteinkonzentration und Schirmer-Laufweite erwies sich aber als schwach ( $R^2 = 0,19$ ).

In Anlehnung an die in VanDerMeid et al. beschriebenen Ergebnissen wurde auch in dieser Arbeit der Einfluss der Extraktionsmethode auf den verwendeten Standard untersucht (VanDerMeid et al. 2011). Dazu wurde der lyophilisierte Standard (Bio-Rad) in Zytokin-Assay Probenpuffer gelöst und danach ein 50 µl Aliquot entsprechend der Proteinisolationmethode (2.2.2) behandelt. Parallel dazu wurde ein unbehandeltes 50 µl

Aliquot des Standards zur Kontrolle mitgeführt, die Ergebnisse zeigt Tabelle 14. Während der Wert von CXCL-10 (145,9 %) als Messfehler bzw. Ausreißer gewertet werden kann, fällt auf, dass IL-6 (60,8 %) eine deutlich schlechtere Wiederfindungsrate und IL-8 (94,0 %) eine ähnliche wie in VanDerMeid et al. beschrieben zeigt (VanDerMeid et al. 2011). Die Wiederfindungsraten von CXCL-9 (45,7 %) und CXCL-11 (65,6 %) sind auch geringer als die durchschnittlich von VanDerMeid et. al erreichten Ergebnisse (VanDerMeid et al. 2011). IFN- $\gamma$  wird mit der hier verwendeten Methode überhaupt nicht wiedergefunden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass sich durch die Behandlung seine Struktur so ändert, dass die Antikörper nicht mehr an die entsprechenden Epitope binden können.

#### **4.3.2 Analyse der untersuchten Biomarker**

Die Untersuchung möglicher Biomarker der okulären GvHD bzw. des trockenen Auges ist schon seit längerer Zeit Gegenstand der ophthalmologischen Forschung. Zumeist wurde dabei die Glaskapillarmethode zum Sammeln von Tränenflüssigkeit verwendet. Während alle in dieser Arbeit untersuchten Zytokine und Chemokine bereits Erwähnung als mögliche Biomarker fanden, ist die Überprüfung der Komplementproteine C3a und C5a noch nicht beschrieben worden (Cocho et al. 2015, 2016; Yoon et al. 2010; Jung et al. 2015). In den erwähnten Publikationen wurden stets die Konzentrationen der untersuchten Proteine angegeben, weshalb auch hier versucht wurde, die Analyten mithilfe von bei jeder Messung mitgeführten Standardkurven zu quantifizieren. Infolge der Instabilität der Standardkurven (Abbildung 4) der Zytokine wurde deshalb durch eigene Messung die Interassayvarianz überprüft. Da die Interassayvarianz gute Ergebnisse zeigte (Tabelle 15), konnten alle Analyten untersucht werden, da es bei der Untersuchung um einen Vergleich der Ergebnisse vor und nach allogener SZT ging. Aufgrund der Standardkurvenproblematik (Abbildung 4) dieser Arbeit können nicht alle Proteinkonzentrationen mit denen in der Literatur verglichen werden. Unter der Annahme, dass die Untersuchung nach der Stammzelltransplantation den pathologischen Augenzustand widerspiegelt, werden die Ergebnistendenzen dieser Arbeit anhand der Literatur diskutiert.

IFN- $\gamma$  konnte, wie in Tabelle 14 gezeigt, nach Behandlung mit der Proteinisolationmethode nicht mehr nachgewiesen werden. In der Literatur ist es als möglicher Biomarker der okulären GvHD beschrieben. Die jeweils bestimmten Konzentrationen unterscheiden sich aber deutlich. So war die durchschnittliche IFN- $\gamma$  Konzentration im Tränenfilm von cGvHD Patienten, welche zu 90 % auch an einer okulären Beteiligung litten, bei 5 pg/ml

(Glaskapillarmethode) (Jung et al. 2015), während der Median in einer anderen Studie bei Patienten mit okulärer GvHD bei 572 pg/ml (Schirmer-Methode) lag (Riemens et al. 2012). In beiden Studien konnte IFN- $\gamma$  nur bei erkrankten Probanden festgestellt werden, während die gesunden Kontrollpersonen kein IFN- $\gamma$  in ihrer Tränenflüssigkeit aufwiesen.

IL-6 ist als proinflammatorisches Zytokin ein wichtiger Vermittler der verschiedenen Komponenten des Immunsystems. Bisher bewegten sich die durchschnittlich im Tränenfilm nachgewiesenen Konzentrationen zwischen 100 pg/ml und 500 pg/ml. IL-6 war dabei im Tränenfilm von Patienten mit GvHD deutlich, aber nicht immer signifikant höher als bei den gesunden Kontrollpersonen. Auffällig war, dass IL-6 bei gesunden Kontrollpersonen nur sehr selten in quantifizierbaren Mengen gefunden wurde (Riemens et al. 2012; Jung et al. 2015; Cocho et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte IL-6 in keiner der Patientenproben detektiert werden, was damit zusammenhängen könnte, dass deren Augen noch nicht deutlich pathologisch verändert waren.

IL-8 wird v.a. von Epithelzellen ausgeschüttet und ist als Botenstoff an der Rekrutierung von Entzündungszellen in das Gewebe beteiligt. Bei der okulären GvHD zeigt es eine starke Reaktion auf die im Rahmen der Krankheit voranschreitende Entzündung und ist daher ein interessanter potentieller Biomarker für dieses Krankheitsbild. So stieg seine Konzentration signifikant von durchschnittlich 400 pg/ml bei gesunden Probanden auf im Mittel 7000 pg/ml bei den Patienten mit okulärer GvHD (Cocho et al. 2016). Die in der vorliegenden Arbeit im Tränenfilm gemessenen Konzentrationen lagen überwiegend im Bereich zwischen 200 pg/ml und 300 pg/ml, sowohl bei E als auch bei FU. Dies stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Werten von gesunden Probanden überein. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine nicht signifikante Abnahme der Konzentration von IL-8 von der Erstuntersuchung zur Folgeuntersuchung. Dieses gegenläufige Ergebnis könnte sich durch die geringe Probengröße erklären lassen.

CXCL-9, -10 und -11 bilden eine Einheit bei der Modulation des Immunsystems. Ihre Hauptaufgabe ist die Modulation von Migration und Adhäsion verschiedener Immunzellen. Sie wurden bisher noch nicht im Rahmen der okulären GvHD untersucht, zeigten aber gute Biomarkerqualitäten bei der Beschreibung der Keratokonjunktivitis sicca sowohl bei Sjögren-Syndrom, als auch bei Patienten mit Keratokonjunktivitis sicca ohne Sjögren-Syndrom. Die im Tränenfilm gemessenen Konzentrationen lagen für CXCL-9, -10 und -11 bei 1100 pg/ml, 24000 pg/ml und 900 pg/ml (Yoon et al. 2010). Alle drei Marker waren signifikant erhöht im

Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Im Gegensatz dazu verhalten sich die Marker in dieser Arbeit unterschiedlich. So kommt es zu einem Anstieg von CXCL-9, aber zu einem Abfall von CXCL-10 und CXCL-11. Dieses Phänomen wurde bisher noch nicht beschrieben. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die geringe Stichprobengröße sein. Eine andere Möglichkeit ist, dass die verschiedenen Chemokine unterschiedlich gut aus den Schirmer-Streifen isoliert werden können. Die gemessenen Proteinkonzentrationen für CXCL-9, -10 und -11 wurden auf die in den Schirmer-Streifen gemessene Gesamtproteinkonzentration bezogen und erneut analysiert. Hier zeigt sich nun für CXCL-9, 10 und 11 eine gemeinsame Tendenz, übereinstimmend mit der bekannten Literatur. CXCL-9 ist dabei zwischen E und FU signifikant erhöht (Abbildung 7).

C3a und C5a sind Anaphylatoxine und Spaltprodukte der Komplementfaktoren C3 und C5. Ihre Beteiligung an der okulären GvHD wurde bisher noch nicht erforscht. Allerdings ist das Komplementsystem als ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems beteiligt an der Regulation von T-Zellproliferation, deren Aktivierung und Differenzierung. Somit ist das Komplementsystem auch an der Regulation von GvH Reaktionen beteiligt (Kwan et al. 2012). Die im Tränenfilm gemessenen C3a Konzentrationen reichten von 0,1 – 35,7 ng/ml, was mit bisherigen Ergebnissen übereinstimmt (Ballow et al. 1985). C5a konnte erst kürzlich erstmals in Tränenflüssigkeit mit einer Durchschnittskonzentration von 1,4 ng/ml nachgewiesen werden, was in der hier gemessenen Spannweite (0,2 – 34 ng/ml) liegt (Gallenkamp et al. 2018). Bei Vergleich der Konzentrationen von C3a und C5a im Tränenfilm der Patienten bei E und FU zeigte sich keine signifikante Änderung der Konzentration der Komplementfaktoren im Tränenfilm.

Der epidermale Wachstumsrezeptor (EGFR) nimmt als Biomarker eine besondere Rolle ein. Während die meisten Zytokine und Entzündungsfaktoren im Rahmen einer GvHD hochreguliert sind, ist sowohl EGF als auch sein Rezeptor EGFR signifikant erniedrigt (Cocho et al. 2015, 2016). Zwischen E und FU konnte nur eine leichte, wenn auch nicht statistisch signifikante Erniedrigung Verringerung der Konzentration an EGFR im Tränenfilm detektiert werden.

Diese Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass sich im Tränenfilm der Patienten bei der FU nach allogener SZT bereits Änderung der Chemokin- und Zytokin-Zusammensetzung zeigen. Die hier erhaltenen Resultate der Tränenfilmanalysen weichen von den Ergebnissen bisheriger Arbeiten ab. Dies ist jedoch vermutlich dadurch zu erklären, dass diese Arbeiten den Tränenfilm von Patienten mit klinisch manifester okulärer GvHD

untersuchten. In der vorliegenden Arbeit wurde der Tränenfilm aller Patienten nach allo-SZT unabhängig vom Auftreten einer okulären GvHD untersucht, um das Potential dieser Marker zur Frühdetektion einer okulären GvHD zu eruieren. Daher hatte ein Großteil der Patienten in dem hier untersuchten Patientenkollektiv bei der FU noch keine klinisch diagnostizierte okuläre GvHD. Auch hier ist festzuhalten, dass sich auf molekularer Ebene offensichtlich schon Veränderungen zeigen, die sich in der Tränenfilmanalyse nachweisen lassen.

Eine andere Möglichkeit, warum die Ergebnisse nicht mit der Literatur übereinstimmen, ist, dass mit der Proteinisolationmethode zwar Proteine aus den Schirmer-Streifen isoliert werden können, aber die Wiederfindungsrate v.a. für die Zytokine nicht befriedigend ist. Daher wurde ein Schirmer-Streifen mit Proteinstandard versetzt und nach dem Proteinisolationsschema behandelt, um die Wiederfindungsrate zu bestimmen. Diese war für die Zytokine extrem gering (Tabelle 16). Allerdings konnten in der Literatur bereits Wiederfindungsraten von Zytokinen bestimmt werden, die zumindest im Bereich von > 30% lagen (VanDerMeid et al. 2011).

#### **4.4 Etablierung eines Multiplex-Assays**

Properdin ist ein Bestandteil des Komplementsystems, welcher den alternativen Komplementaktivierungsweg durch Stabilisierung des C3a-Konvertase-Komplexes unterstützt. Es wurde bereits als möglicher Risikofaktor für die Entstehung von Hornhautentzündungen beschrieben (Mondino et al. 1980). Außerdem ist bekannt, dass das Komplementsystem eine wichtige Rolle in der Regulation der T-Zell Differenzierung spielt und somit auch bei der Entstehung alloreaktiver T-Zellen bei allogener SZT (Bora et al. 2008; Cravedi et al. 2013; Kwan et al. 2012).

##### **4.4.1 Vergleich des Detektionsbereichs des C3a, C5a, Properdin Multiplex-Assay mit bereits etablierten Nachweisverfahren**

In der Arbeit wurden die Graphen der drei Komplementfaktoren als sigmoidale Kurven dargestellt (Abbildung 13). C3a und C5a zeigen einen linearen Kurvenverlauf zwischen 1 ng/ml und 100 ng/ml, Properdin zwischen 10 ng/ml und 200 ng/ml. In diesen Bereich fallen auch jeweils die  $EC_{50}$ -Werte von C3a (28,3 ng/ml), C5a (12,7 ng/ml) und Properdin (72,5 ng/ml). Während die quantifizierbaren Bereiche gut mit vorherigen Ergebnissen übereinstimmen, unterscheiden sich die  $EC_{50}$ -Werte deutlich voneinander (Wörle 2015).

Ursächlich für diesen Unterschied könnte sowohl die Addition von Properdin als auch ein verändertes Probenvolumen oder Puffersystem sein. Als Puffer wurde 1 % BSA/PBS mit Zusatz geringer Mengen EDTA und Futan verwendet. Futan als Serinproteasehemmer verhindert eine unspezifische Aktivierung verschiedenster Proteasen. EDTA als Komplexbildner bindet in den Proben enthaltenes Kalzium und verhindert somit eine Aktivierung des Komplementsystems. Bei Betrachtung der unteren Nachweisgrenze zeigen sich sehr gute Ergebnisse (Tabelle 19). Für C3a ist das LOD besser als in herkömmlichen ELISAs beschrieben (Multiplex 0,11 ng/ml; ELISA 0,405 ng/ml). Auch der quantifizierbare Bereich erstreckt sich über eine größere Breite (Multiplex 1 – 100 ng/ml; ELISA 10 – 40 ng/ml) (Burger et al. 1987; van de Graaf et al. 1992).

Die Nachweisgrenze von C5a konnte innerhalb weniger Jahre durch Verbesserung der verwendeten Methoden von 4 ng/ml auf 0,02 ng/ml gesenkt werden (Kunkel et al. 1983; Schulze und Götze 1986; Oppermann et al. 1991). Im Multiplex Setting dieser Arbeit wurde mit 0,04 ng/ml ein Ergebnis nahe der niedrigsten bekannten Nachweisgrenze erreicht und außerdem das LOD des Duplex-Assays verbessert (0,45 ng/ml) (Wörle 2015).

Die generierten Werte für Properdin werden mit einem käuflichen Properdin ELISA (Hycult) verglichen. Es wird ein LOD von 0,31 ng/ml angegeben, was mit der Nachweisgrenze des Multiplex übereinstimmt (0,32 ng/ml). Allerdings sind die im Kit enthaltenen Standards für einen Bereich zwischen 0,31 ng/ml und 20 ng/ml konzipiert, während der Standard im Multiplex einen größeren Bereich erfasst (0,02 ng/ml – 1000 ng/ml). Außerdem ist der im Multiplex erreichte, gut quantifizierbare Bereich (10 – 200 ng/ml) größer als der des herkömmlichen ELISA-Kits, sodass mithilfe des Multiplex-Assays eine größere Bandbreite an Konzentrationen analysiert werden kann. Die maximalen Signalstärken von C3a (6337 MFI), C5a (24610 MFI) und Properdin (14254 MFI) unterscheiden sich um den Faktor 2 bzw. 4 voneinander. Der Unterschied zwischen C3a und C5a ist vermutlich auf die geringere Menge an Fängerantikörper zurückzuführen, während der Unterschied zwischen C5a und Properdin aus unterschiedlichen Affinitäten der Antikörper resultieren könnte. Die sich unterscheidenden LODs (Tabelle 19) sind vermutlich auch auf unterschiedliche Affinitäten der verwendeten Antikörper zurückzuführen.

#### 4.4.2 Spezifität und Varianz des C3a, C5a, Properdin Multiplex-Assays

Ein wichtiger Punkt bei der Etablierung eines Assays für mehrere Komponenten ist die Vermeidung von Kreuzreaktionen der Proteine untereinander. Bereits in früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die zur Bestimmung von C3a, C5a und Properdin verwendeten Antikörper individuell eine gute Spezifität für das entsprechende Analyt aufweisen (Wörle 2015; Pauly et al. 2014). Für das Multiplex-Setting wurde nun die Kombination (mAk1340 + Ziege anti-Properdin-biotin) auf mögliche Kreuzreaktionen untersucht.

Dazu wurde der Multiplex-Assay an 1:50 verdünnten HNS getestet, bei denen je ein Komplementfaktor depletiert war (Abbildung 12). Dabei konnte C5a und Properdin in allen HNS nachgewiesen werden, außer in den entsprechenden C5adpl und CFPdpl Seren. Die Antikörper zeigen somit eine gute Spezifität zu ihren jeweiligen Analyten. C3a konnte dagegen in allen 1:50 verdünnten Seren nachgewiesen werden, auch in dem C3adpl HNS. Es wurde bereits früher beschrieben, dass die C3a Antikörper auch teilweise C5a erkennen und das C3adpl Serum erst ab einer Verdünnung von 1:100 erwartet niedrige Signale liefert (Wörle 2015). Für den neu etablierten Assay wurden nun die in Tabelle 17 beschriebenen Umstände verwendet. Allerdings sollte in Zukunft der Assay noch eingehender auf seine Spezifität untersucht werden, v.a. was die Bestimmung von C3a in verdünnten HNS angeht.

Die Varianz des neuen Multiplex-Assays wurde durch Messung von HNS und Tränenproteinen bestimmt. Während die Intraassayvarianz von 1:500 verdünntem HNS sehr gute Werte aufweist, sind die Interassayvarianzen bei den 1:100 verdünnten HNS sehr viel höher (Tabelle 18). Dies ist vermutlich auf Pipettierfehler bei der Probenzubereitung zurückzuführen. Es wurde täglich eine neue 1:100 Verdünnung hergestellt. Die Bestimmung der Interassayvarianz sollte in Zukunft erneut durchgeführt werden. Außerdem sollte 1:500 verdünntes HNS verwendet werden, da im 1:100 verdünnten Serum die Properdinkonzentration im oberen Plateaubereich liegt und somit keine verlässliche Aussage über dessen Varianz gemacht werden kann. Bei der Intraassayvarianz von in Wasser gelösten Tränenproteinen sind die erzielten Ergebnisse mit 2,8 % - 9,0 % im gewünschten Bereich. Auch die Interassayvarianz liegt mit 5,0 % - 21,5 % innerhalb akzeptabler Grenzen. Hier könnte noch versucht werden, die Varianz von Properdin durch Variation der Assaybedingungen zu verbessern.

#### **4.4.3 Durchführbarkeit in verschiedenen Probenmaterialien**

Der Assay wurde auf seine Durchführbarkeit in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten geprüft, wobei Sputum, Kammerwasser und Urin untersucht wurde. Messbare Mengen C3a, C5a und CFP wurden dabei sowohl in Sputum als auch in Kammerwasser entdeckt, während in Urin keine Proteine detektiert wurden. Auffällig war dabei, dass die Konzentrationen der untersuchten Proteine bei dem Raucher-Sputum deutlich höher waren als bei dem Nichtraucher-Sputum (Faktor 2 – 4).

Während der Duplex-Assay für C3a und C5a in der vorliegenden Arbeit bereits zur Analyse des Tränenfilms eingesetzt wurde, soll in folgenden Studien der Multiplex-Assay aus C3a, C5a und Properdin verwendet werden zur Analyse von Properdin auf sein mögliches Potential als Biomarker der okulären GvHD.

## 5 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die allogene, hämatopoetische Stammzelltransplantation stellt eine Therapieoption für viele hämatologische Erkrankungen dar. Sie kann jedoch zur Entwicklung einer GvHD führen. Die okuläre GvHD, die meist als chronische GvHD auftritt, ist eine sehr häufig auftretende Komplikation nach einer allogenen Stammzelltransplantation. Klinisch führt sie im Wesentlichen zu einer sehr schweren Form der Keratokonjunktivitis sicca und bedeutet für die betroffenen Patienten oft eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, frühe Veränderungen auf klinischer und laborchemischer Ebene nach einer allogener Stammzelltransplantation zu detektieren, um langfristig eine frühzeitigere Diagnosestellung und Therapieeinleitung bei Patienten mit einer drohenden bzw. manifesten okulären GvHD zu ermöglichen. Hierzu wurden die Augen von Patienten vor und nach allogener Stammzelltransplantation klinisch untersucht sowie deren Tränenfilm laborchemisch analysiert.

**Material und Methoden:** Insgesamt wurden 22 Patienten vor und nach allogener Stammzelltransplantation augenärztlich untersucht. Hierbei wurden die Tensio-, Schirmer I-, Schirmer II-, TBUT- und OSDI- Werte, sowie Pathologien von Augenlidern, Bindehaut, Hornhaut und Linse erfasst. Aus den jeweiligen Schirmer I-Streifen wurden Tränenfilmproteine isoliert (Green-Church et al. 2008) und die darin enthaltene Menge an IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11, C3a, C5a und EGFR gemessen. Außerdem wurde ein neuer Multiplex-Assay entwickelt, welcher die Komplementfaktoren C3a, C5a und Properdin umfasst und in zukünftigen Analysen eingesetzt werden kann.

**Ergebnisse:** Zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung nach allogener Stammzelltransplantation (Median 132 Tagen) wurde bei zwei Patienten (9 %) bereits eine okuläre GvHD diagnostiziert. Die Betrachtung der klinischen Untersuchungsergebnisse zeigt einen statistisch signifikanten Rückgang der Schirmer I-Laufweite ( $p = 0,0269$ ) bei der Folgeuntersuchung im Vergleich zur Erstuntersuchung vor allogener Stammzelltransplantation. Außerdem kam es zu einer signifikanten Zunahme der subjektiven Beschwerden im OSDI Score ( $p = 0,0408$ ) sowie einem signifikant vermehrten Auftreten von Pathologien der Augenlider im Sinne einer Blepharitis ( $p = 0,0012$ ) sowie von LIPCOFs ( $p = 0,0013$ ).

Die kritische Reevaluation der verwendeten Proteinisolationmethode zeigte Wiederfindungsraten von unter 5 % nach Anwendung auf einem mit einer Standardlösung

behandelten Schirmer-Streifen (Green-Church et al. 2008). Dies verhindert eine reliable Interpretation der gemessenen Werte, auch wenn diese Tendenzen einer Zunahme der gemessenen Proteine zwischen Erstuntersuchung und Folgeuntersuchung zeigen (Abbildung 7A).

Mit der Etablierung des C3a, C5a und Properdin Multiplex-Assays wurde ein neues Messinstrument für die Zukunft entwickelt. Er besitzt eine niedrigere Nachweisgrenze als herkömmliche ELISAs (C3a 0,11 ng/ml, C5a 0,04 ng/ml, Properdin 0,32 ng/ml), eine geringe Interassayvarianz (C3a 5,0 %, C5a 12,1 %, Properdin 21,5 %) sowie eine geringe Intraassayvarianz (C3a 9,0 %, C5a 2,8 %, Properdin 5,8 %).

**Fazit und Ausblick:** Schon zu einem relativ frühen Zeitpunkt nach einer allogenen Stammzelltransplantation lassen sich klinisch messbare Veränderungen der okulären Strukturen und Funktionen detektieren, auch unabhängig von der Diagnose einer okulären GvHD. Die Tränenfilmanalyse zur Detektion von Biomarkern gestaltet sich durch geringe Probenvolumina und bisher niedrige Reproduzierbarkeiten zum jetzigen Zeitpunkt als noch unzureichend.

Um zu evaluieren, in welchem Zeitraum, bei welchen Patienten und in welchem Ausmaß es zu einem Auftreten einer manifesten okulären GvHD kommt, ist ein noch längerer Nachbeobachtungszeitraum notwendig. In der Zukunft sollte die in der vorliegenden Arbeit angewandte Proteinisolationmethode aus Tränenfilmen weiter optimiert werden, durch Weiterentwicklung des Isolationsprotokolls selbst und ggf. durch Umstellung der Gewinnung des Tränenfilms durch Glaskapillaren

## 6 Literaturverzeichnis

- Anasetti, Claudio; Logan, Brent R.; Lee, Stephanie J.; Waller, Edmund K.; Weisdorf, Daniel J.; Wingard, John R. et al. (2012): Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. In: *The New England journal of medicine* 367 (16), S. 1487–1496. DOI: 10.1056/NEJMoal203517.
- Baird, Kristin; Pavletic, Steven Z. (2006): Chronic graft versus host disease. In: *Current opinion in hematology* 13 (6), S. 426–435. DOI: 10.1097/01.moh.0000245689.47333.ff.
- Ballen, Karen K.; Spitzer, Thomas R.; Yeap, Beow Y.; McAfee, Steven; Dey, Bimalangshu R.; Attar, Eyal et al. (2007): Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 13 (1), S. 82–89. DOI: 10.1016/j.bbmt.2006.08.041.
- Ballow, M.; Donshik, P. C.; Mendelson, L. (1985): Complement proteins and C3 anaphylatoxin in the tears of patients with conjunctivitis. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 76 (3), S. 473–476.
- Barrett, A. J. (1997): Mechanisms of the graft-versus-leukemia reaction. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 15 (4), S. 248–258. DOI: 10.1002/stem.150248.
- Billingham, R. E. (1966): The biology of graft-versus-host reactions. In: *Harvey lectures* 62, S. 21–78.
- Blaise, D.; Kuentz, M.; Fortanier, C.; Bourhis, J. H.; Milpied, N.; Sutton, L. et al. (2000): Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18 (3), S. 537–546. DOI: 10.1200/JCO.2000.18.3.537.
- Blume, Karl G.; Forman, Stephen J.; Appelbaum, Frederick R. (Hg.) (2008): Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. 3., Auflage. New York, NY: John Wiley & Sons.
- Bora, Nalini S.; Jha, Purushottam; Bora, Puran S. (2008): The role of complement in ocular pathology. In: *Seminars in immunopathology* 30 (2), S. 85–95. DOI: 10.1007/s00281-008-0110-y.
- Budowle, B.; Chakraborty, R.; Giusti, A. M.; Eisenberg, A. J.; Allen, R. C. (1991): Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. In: *American journal of human genetics* 48 (1), S. 137–144.
- Burger, R.; Bader, A.; Kirschfink, M.; Rother, U.; Schrod, L.; Wörner, I.; Zilow, G. (1987): Functional analysis and quantification of the complement C3 derived anaphylatoxin C3a with a monoclonal antibody. In: *Clinical and experimental immunology* 68 (3), S. 703–711.
- Chen, Yihe; Chauhan, Sunil K.; Saban, Daniel R.; Sadrai, Zahra; Okanobo, Andre; Dana, Reza (2011): Interferon- $\gamma$ -secreting NK cells promote induction of dry eye disease. In: *Journal of leukocyte biology* 89 (6), S. 965–972. DOI: 10.1189/jlb.1110611.

Cocho, Lidia; Fernandez, Itziar; Calonge, Margarita; Martinez, Veronica; Gonzalez-Garcia, Maria J.; Caballero, Dolores et al. (2015): Gene Expression-Based Predictive Models of Graft Versus Host Disease-Associated Dry Eye. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 56 (8), S. 4570–4581. DOI: 10.1167/iovs.15-16736.

Cocho, Lidia; Fernandez, Itziar; Calonge, Margarita; Martinez, Veronica; Gonzalez-Garcia, Maria J.; Caballero, Dolores et al. (2016): Biomarkers in Ocular Chronic Graft Versus Host Disease. Tear Cytokine- and Chemokine-Based Predictive Model. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 57 (2), S. 746–758. DOI: 10.1167/iovs.15-18615.

Cotliar, Jonathan A. (2017): Atlas of Graft-versus-Host Disease. Approaches to Diagnosis and Treatment. Cham: Springer International Publishing.

Cravedi, P.; Leventhal, J.; Lakhani, P.; Ward, S. C.; Donovan, M. J.; Heeger, P. S. (2013): Immune cell-derived C3a and C5a costimulate human T cell alloimmunity. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 13 (10), S. 2530–2539. DOI: 10.1111/ajt.12405.

Cutler, Corey; Kim, Haesook T.; Bindra, Bhavjot; Sarantopoulos, Stefanie; Ho, Vincent T.; Chen, Yi-Bin et al. (2013): Rituximab prophylaxis prevents corticosteroid-requiring chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: results of a phase 2 trial. In: *Blood* 122 (8), S. 1510–1517. DOI: 10.1182/blood-2013-04-495895.

Degn, S. E.; Thiel, S. (2013): Humoral pattern recognition and the complement system. In: *Scandinavian journal of immunology* 78 (2), S. 181–193. DOI: 10.1111/sji.12070.

Dietrich-Ntoukas, T.; Steven, P. (2015): Okuläre Graft-versus-Host-Disease. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 112 (12), 1027-38; quiz 1039-40. DOI: 10.1007/s00347-015-0149-9.

Dietrich-Ntoukas, Tina; Cursiefen, Claus; Westekemper, Henrike; Eberwein, Philipp; Reinhard, Thomas; Bertz, Hartmut et al. (2012): Diagnosis and treatment of ocular chronic graft-versus-host disease: report from the German-Austrian-Swiss Consensus Conference on Clinical Practice in chronic GVHD. In: *Cornea* 31 (3), S. 299–310. DOI: 10.1097/ICO.0b013e318226bf97.

Ferrara, J. L. (2000): Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors. In: *Journal of hematology & stem cell research* 9 (3), S. 299–306. DOI: 10.1089/15258160050079407.

Ferrara, James L. M.; Reddy, Pavan (2006a): Pathophysiology of graft-versus-host disease. In: *Seminars in hematology* 43 (1), S. 3–10. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2005.09.001.

Ferrara, James L. M.; Reddy, Pavan (2006b): Pathophysiology of graft-versus-host disease. In: *Seminars in hematology* 43 (1), S. 3–10. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2005.09.001.

Filipovich, Alexandra H.; Weisdorf, Daniel; Pavletic, Steven; Socie, Gerard; Wingard, John R.; Lee, Stephanie J. et al. (2005): National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of*

*the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 11 (12), S. 945–956. DOI: 10.1016/j.bbmt.2005.09.004.

Gallenkamp, Juliane; Spanier, Gerrit; Wörle, Elisabeth; Englbrecht, Markus; Kirschfink, Michael; Greslechner, Roman et al. (2018): A novel multiplex detection array revealed systemic complement activation in oral squamous cell carcinoma. In: *Oncotarget* 9 (3). DOI: 10.18632/oncotarget.22963.

Giralt, S.; Estey, E.; Albitar, M.; van Besien, K.; Rondon, G.; Anderlini, P. et al. (1997): Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. In: *Blood* 89 (12), S. 4531–4536.

Gluckman, E.; Rocha, V.; Boyer-Chammard, A.; Locatelli, F.; Arcese, W.; Pasquini, R. et al. (1997): Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. In: *The New England journal of medicine* 337 (6), S. 373–381. DOI: 10.1056/NEJM199708073370602.

Goker, H.; Haznedaroglu, I. C.; Chao, N. J. (2001): Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. In: *Experimental hematology* 29 (3), S. 259–277.

Goulmy, E.; Schipper, R.; Pool, J.; Blokland, E.; Falkenburg, J. H.; Vossen, J. et al. (1996): Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. In: *The New England journal of medicine* 334 (5), S. 281–285. DOI: 10.1056/NEJM199602013340501.

Gratwohl, Alois; Niederwieser, Dietger (2012): History of hematopoietic stem cell transplantation. Evolution and perspectives. In: *Current problems in dermatology* 43, S. 81–90. DOI: 10.1159/000335266.

Green-Church, Kari B.; Nichols, Kelly K.; Kleinholz, Nan M.; Zhang, Liwen; Nichols, Jason J. (2008): Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. In: *Molecular vision* 14, S. 456–470.

Hayashida, J-N; Nakamura, S.; Toyoshima, T.; Moriyama, M.; Sasaki, M.; Kawamura, E. et al. (2013): Possible involvement of cytokines, chemokines and chemokine receptors in the initiation and progression of chronic GVHD. In: *Bone marrow transplantation* 48 (1), S. 115–123. DOI: 10.1038/bmt.2012.100.

Holler, E.; Kolb, H. J.; Möller, A.; Kempeni, J.; Liesenfeld, S.; Pechumer, H. et al. (1990): Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. In: *Blood* 75 (4), S. 1011–1016.

Im, A.; Hakim, F. T.; Pavletic, S. Z. (2017): Novel targets in the treatment of chronic graft-versus-host disease. In: *Leukemia* 31 (3), S. 543–554. DOI: 10.1038/leu.2016.367.

Jagasia, Madan H.; Greinix, Hildegard T.; Arora, Mukta; Williams, Kirsten M.; Wolff, Daniel; Cowen, Edward W. et al. (2015): National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. In: *Biology of blood and marrow*

*transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 21 (3), 389-401.e1. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.12.001.

Jiang, Y. Z.; Barrett, A. J.; Goldman, J. M.; Mavroudis, D. A. (1997): Association of natural killer cell immune recovery with a graft-versus-leukemia effect independent of graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. In: *Annals of hematology* 74 (1), S. 1–6.

Jung, Ji Won; Han, Soo Jung; Song, Mi Kyung; Kim, Tae-im; Kim, Eung Kweon; Min, Yoo Hong et al. (2015): Tear Cytokines as Biomarkers for Chronic Graft-versus-Host Disease. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 21 (12), S. 2079–2085. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.08.020.

Kägi, D.; Vignaux, F.; Ledermann, B.; Bürki, K.; Depraetere, V.; Nagata, S. et al. (1994): Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. In: *Science (New York, N.Y.)* 265 (5171), S. 528–530.

Kerty, E.; Vigander, K.; Flage, T.; Brinch, L. (1999): Ocular findings in allogeneic stem cell transplantation without total body irradiation. In: *Ophthalmology* 106 (7), S. 1334–1338. DOI: 10.1016/S0161-6420(99)00720-4.

Kolb, H. J.; Schattenberg, A.; Goldman, J. M.; Hertenstein, B.; Jacobsen, N.; Arcese, W. et al. (1995): Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. In: *Blood* 86 (5), S. 2041–2050.

Korngold, R.; Sprent, J. (1987): T cell subsets and graft-versus-host disease. In: *Transplantation* 44 (3), S. 335–339.

Kunkel, S. L.; Manderino, G. L.; Marasco, W.; Kaercher, K.; Hirata, A. A.; Ward, P. A. (1983): A specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of human C5a antigen. In: *Journal of immunological methods* 62 (3), S. 305–314.

Kwan, Wing-Hong; Hashimoto, Daigo; Paz-Artal, Estela; Ostrow, Katya; Greter, Melanie; Raedler, Hugo et al. (2012): Antigen-presenting cell-derived complement modulates graft-versus-host disease. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (6), S. 2234–2238. DOI: 10.1172/JCI61019.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.

Lang, Gerhard K.; Lang, Gabriele E.; Cursiefen, Claus; Heiligenhaus, Arnd (Hg.) (2016): Schlaglicht Augenheilkunde: Entzündliche Augenerkrankungen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Lee, Sang Yeop; Han, Soo Jung; Nam, Sang Min; Yoon, Sang Chul; Ahn, Ji Min; Kim, Tae-im et al. (2013): Analysis of tear cytokines and clinical correlations in Sjogren syndrome dry eye patients and non-Sjogren syndrome dry eye patients. In: *American journal of ophthalmology* 156 (2), 247-253.e1. DOI: 10.1016/j.ajo.2013.04.003.

Lee, Stephanie J. (2017): Classification systems for chronic graft-versus-host disease. In: *Blood* 129 (1), S. 30–37. DOI: 10.1182/blood-2016-07-686642.

- Lin, Xihui; Cavanagh, Harrison Dwight (2015): Ocular manifestations of graft-versus-host disease. 10 years' experience. In: *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 9, S. 1209–1213. DOI: 10.2147/OPTH.S84704.
- Majhail, Navneet S.; Farnia, Stephanie H.; Carpenter, Paul A.; Champlin, Richard E.; Crawford, Stephen; Marks, David I. et al. (2015): Indications for Autologous and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 21 (11), S. 1863–1869. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.07.032.
- Markiewski, Maciej M.; Lambris, John D. (2007): The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. In: *The American journal of pathology* 171 (3), S. 715–727. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070166.
- Melis, Joost P. M.; Strumane, Kristin; Ruuls, Sigrid R.; Beurskens, Frank J.; Schuurman, Janine; Parren, Paul W. H. I. (2015): Complement in therapy and disease. Regulating the complement system with antibody-based therapeutics. In: *Molecular immunology* 67 (2 Pt A), S. 117–130. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.01.028.
- Mondino, B. J.; Ratajczak, H. V.; Goldberg, D. B.; Schanzlin, D. J.; Brown, S. I. (1980): Alternate and classical pathway components of complement in the normal cornea. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 98 (2), S. 346–349.
- Munir, Saleha Z.; Aylward, James (2017): A Review of Ocular Graft-Versus-Host Disease. In: *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry* 94 (5), S. 545–555. DOI: 10.1097/OPX.0000000000001071.
- Nassar, Amr; Tabbara, Khalid F.; Aljurf, Mahmoud (2013): Ocular manifestations of graft-versus-host disease. In: *Saudi journal of ophthalmology : official journal of the Saudi Ophthalmological Society* 27 (3), S. 215–222. DOI: 10.1016/j.sjopt.2013.06.007.
- Nassiri, Nariman; Eslani, Medi; Panahi, Nekoo; Mehravaran, Shiva; Ziaei, Alireza; Djalilian, Ali R. (2013): Ocular graft versus host disease following allogeneic stem cell transplantation. A review of current knowledge and recommendations. In: *Journal of ophthalmic & vision research* 8 (4), S. 351–358.
- Nguyen, Cuong; Cornelius, Janet; Singson, Eric; Killedar, Smruti; Cha, Seunghee; Peck, Ammon B. (2006): Role of complement and B lymphocytes in Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy of NOD.B10-H2b mice. In: *Molecular immunology* 43 (9), S. 1332–1339. DOI: 10.1016/j.molimm.2005.09.003.
- Noble, B. A.; Loh, R. S. K.; MacLennan, S.; Pesudovs, K.; Reynolds, A.; Bridges, L. R. et al. (2004): Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomised controlled crossover trial for ocular surface disease. In: *The British journal of ophthalmology* 88 (5), S. 647–652.
- Ogawa, Y.; Okamoto, S.; Mori, T.; Yamada, M.; Mashima, Y.; Watanabe, R. et al. (2003): Autologous serum eye drops for the treatment of severe dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease. In: *Bone marrow transplantation* 31 (7), S. 579–583. DOI: 10.1038/sj.bmt.1703862.

- Ogawa, Y.; Okamoto, S.; Wakui, M.; Watanabe, R.; Yamada, M.; Yoshino, M. et al. (1999): Dry eye after haematopoietic stem cell transplantation. In: *The British journal of ophthalmology* 83 (10), S. 1125–1130.
- Ogawa, Yoko; Kim, Stella K.; Dana, Reza; Clayton, Janine; Jain, Sandeep; Rosenblatt, Mark I. et al. (2013): International Chronic Ocular Graft-vs-Host-Disease (GVHD) Consensus Group: proposed diagnostic criteria for chronic GVHD (Part I). In: *Scientific reports* 3, S. 3419. DOI: 10.1038/srep03419.
- Oppermann, M.; Schulze, M.; Götze, O. (1991): A sensitive enzyme immunoassay for the quantitation of human C5a/C5a(desArg) anaphylatoxin using a monoclonal antibody with specificity for a neoepitope. In: *Complement and inflammation* 8 (1), S. 13–24.
- Paczesny, Sophie; Hakim, Frances T.; Pidala, Joseph; Cooke, Kenneth R.; Lathrop, Julia; Griffith, Linda M. et al. (2015): National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. III. The 2014 Biomarker Working Group Report. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 21 (5), S. 780–792. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.01.003.
- Palathumpat, V.; Dejbakhsh-Jones, S.; Strober, S. (1995): The role of purified CD8+ T cells in graft-versus-leukemia activity and engraftment after allogeneic bone marrow transplantation. In: *Transplantation* 60 (4), S. 355–361.
- Pauly, Diana; Kirchner, Sebastian; Stoermann, Britta; Schreiber, Tanja; Kaulfuss, Stefan; Schade, Rüdiger et al. (2009): Simultaneous quantification of five bacterial and plant toxins from complex matrices using a multiplexed fluorescent magnetic suspension assay. In: *The Analyst* 134 (10), S. 2028–2039. DOI: 10.1039/b911525k.
- Pauly, Diana; Nagel, Benedikt M.; Reinders, Jörg; Killian, Tobias; Wulf, Matthias; Ackermann, Susanne et al. (2014): A novel antibody against human properdin inhibits the alternative complement system and specifically detects properdin from blood samples. In: *PloS one* 9 (5), e96371. DOI: 10.1371/journal.pone.0096371.
- Posa, Andreas; Bräuer, Lars; Schicht, Martin; Garreis, Fabian; Beileke, Stephanie; Paulsen, Friedrich (2013): Schirmer strip vs. capillary tube method: non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. In: *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 195 (2), S. 137–142. DOI: 10.1016/j.aanat.2012.10.001.
- Ricklin, Daniel; Lambris, John D. (2013): Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (8), S. 3831–3838. DOI: 10.4049/jimmunol.1203487.
- Riemens, Anjo; Stoyanova, Elena; Rothova, Aniki; Kuiper, Jonas (2012): Cytokines in tear fluid of patients with ocular graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. In: *Molecular vision* 18, S. 797–802.
- Ritchie, David; Seconi, Janet; Wood, Catherine; Walton, Julie; Watt, Victoria (2005): Prospective monitoring of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma to predict the onset of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation.

In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 11 (9), S. 706–712. DOI: 10.1016/j.bbmt.2005.05.015.

Rocha, Vanderson; Labopin, Myriam; Sanz, Guillermo; Arcese, William; Schwerdtfeger, Rainer; Bosi, Alberto et al. (2004): Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. In: *The New England journal of medicine* 351 (22), S. 2276–2285. DOI: 10.1056/NEJMoa041469.

Rus, V.; Svetic, A.; Nguyen, P.; Gause, W. C.; Via, C. S. (1995): Kinetics of Th1 and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-versus-host disease. Regulatory role of donor CD8+ T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 155 (5), S. 2396–2406.

Schiffman, R. M.; Christianson, M. D.; Jacobsen, G.; Hirsch, J. D.; Reis, B. L. (2000): Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 118 (5), S. 615–621.

Schulze, M.; Götze, O. (1986): A sensitive ELISA for the quantitation of human C5a in blood plasma using a monoclonal antibody. In: *Complement (Basel, Switzerland)* 3 (1), S. 25–39.

Siebelmann, S.; Jing, B.; Cursiefen, C.; Steven, P. (2015): Nicht invasive Diagnostik der okularen Graft-versus-Host-Erkrankung. In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 232 (5), S. 652–657. DOI: 10.1055/s-0035-1545830.

Terakura, S.; Kuwatsuka, Y.; Yamasaki, S.; Wake, A.; Kanda, J.; Inamoto, Y. et al. (2017): GvHD prophylaxis after single-unit reduced intensity conditioning cord blood transplantation in adults with acute leukemia. In: *Bone marrow transplantation* 52 (9), S. 1261–1267. DOI: 10.1038/bmt.2017.116.

Teshima, Takanori; Ordemann, Rainer; Reddy, Pavan; Gagin, Svetlana; Liu, Chen; Cooke, Kenneth R.; Ferrara, James L. M. (2002): Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. In: *Nature medicine* 8 (6), S. 575–581. DOI: 10.1038/nm0602-575.

Thomas, E.; Storb, R.; Clift, R. A.; Fefer, A.; Johnson, F. L.; Neiman, P. E. et al. (1975): Bone-marrow transplantation (first of two parts). In: *The New England journal of medicine* 292 (16), S. 832–843. DOI: 10.1056/NEJM197504172921605.

Toubai, Tomomi; Sun, Yaping; Reddy, Pavan (2008): GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? In: *Best practice & research. Clinical haematology* 21 (2), S. 101–117. DOI: 10.1016/j.beha.2008.02.005.

Tutschka, P. J.; Copelan, E. A.; Klein, J. P. (1987): Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. In: *Blood* 70 (5), S. 1382–1388.

van de Graaf, E. A.; Jansen, H. M.; Bakker, M. M.; Alberts, C.; Eeftinck Schattenkerk, J. K.; Out, T. A. (1992): ELISA of complement C3a in bronchoalveolar lavage fluid. In: *Journal of immunological methods* 147 (2), S. 241–250.

VanDerMeid, Karl R.; Su, Stephanie P.; Krenzer, Kathleen L.; Ward, Keith W.; Zhang, Jin-Zhong (2011): A method to extract cytokines and matrix metalloproteinases from Schirmer strips and analyze using Luminex. In: *Molecular vision* 17, S. 1056–1063.

- Venkatesha, Shivaprasad H.; Dudics, Steven; Acharya, Bodhraj; Moudgil, Kamal D. (2014): Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy. In: *International journal of molecular sciences* 16 (1), S. 887–906. DOI: 10.3390/ijms16010887.
- Verneris, Michael R.; Lee, Stephanie J.; Ahn, Kwang Woo; Wang, Hai-Lin; Battiwalla, Minoo; Inamoto, Yoshihiro et al. (2015): HLA Mismatch Is Associated with Worse Outcomes after Unrelated Donor Reduced-Intensity Conditioning Hematopoietic Cell Transplantation: An Analysis from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 21 (10), S. 1783–1789. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.05.028.
- Vukić, Tamara; Robinson Smith, Sean; Ljubas Kelečić, Dina; Desnica, Lana; Prenc, Ema; Pulanić, Dražen et al. (2016): Joint and fascial chronic graft-vs-host disease: correlations with clinical and laboratory parameters. In: *Croatian medical journal* 57 (3), S. 266–275.
- Wagner, J. E.; Kernan, N. A.; Steinbuch, M.; Broxmeyer, H. E.; Gluckman, E. (1995): Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. In: *Lancet (London, England)* 346 (8969), S. 214–219.
- Wang, Yulian; Lai, Peilong; Chen, Xiaomei; He, Chang; Huang, Xin; Geng, Suxia et al. (2017): Attenuation of cGVHD by C5a/C5aR blockade is associated with increased frequency of Treg. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 3603. DOI: 10.1038/s41598-017-03700-1.
- Wörle, Elisabeth (2015): DIE LOKALE BETEILIGUNG DES KOMPLEMENTSYSTEMS AN DER PATHOLOGIE DES OFFENWINKELGLAUKOMS Bachelorarbeit Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin Universität Regensburg vorgelegt von Elisabeth Johanna Viera Wörle Die lokale Beteiligung des Komplementsystems an der Pathologie des Offenwinkelglaukoms.
- Yang, Shi-feng; Xue, Wu-jun; Lu, Wan-hong; Xie, Li-yi; Yin, Ai-ping; Zheng, Jin et al. (2015): Induction of tolerance and prolongation of islet allograft survival by syngeneic hematopoietic stem cell transplantation in mice. In: *Transplant immunology* 33 (2), S. 130–139. DOI: 10.1016/j.trim.2015.08.004.
- Yapa, Sharinie; Mulla, Omar; Green, Victoria; England, James; Greenman, John (2017): The Role of Chemokines in Thyroid Carcinoma. In: *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. DOI: 10.1089/thy.2016.0660.
- Yoon, Kyung-Chul; Park, Chang-Soo; You, In-Cheon; Choi, Hwan-Jun; Lee, Kwang-Hoon; Im, Seong-Kyu et al. (2010): Expression of CXCL9, -10, -11, and CXCR3 in the tear film and ocular surface of patients with dry eye syndrome. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 51 (2), S. 643–650. DOI: 10.1167/iovs.09-3425.
- Zaucha, J. M.; Gooley, T.; Bensinger, W. I.; Heimfeld, S.; Chauncey, T. R.; Zaucha, R. et al. (2001): CD34 cell dose in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cell grafts affects engraftment kinetics and development of extensive chronic graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplantation. In: *Blood* 98 (12), S. 3221–3227.
- Zeiser, R.; Burchert, A.; Lengerke, C.; Verbeek, M.; Maas-Bauer, K.; Metzelder, S. K. et al. (2015): Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem

cell transplantation: a multicenter survey. In: *Leukemia* 29 (10), S. 2062–2068. DOI: 10.1038/leu.2015.212.

Zipfel, Peter F.; Skerka, Christine (2009): Complement regulators and inhibitory proteins. In: *Nature reviews. Immunology* 9 (10), S. 729–740. DOI: 10.1038/nri2620.

Zorn, Emmanuel; Kim, Haesook T.; Lee, Stephanie J.; Floyd, Blair H.; Litsa, Despina; Arumugarajah, Sankari et al. (2005): Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. In: *Blood* 106 (8), S. 2903–2911. DOI: 10.1182/blood-2005-03-1257.

## 7 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Horst Helbig, Chefarzt der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universität Regensburg, bedanken, für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen sowie für seine freundliche Hilfe und Unterstützung während des gesamten Zeitraums.

Herrn Prof. Dr. med. Daniel Wolff möchte ich herzlich danken für das Überlassen der Patientendaten sowie für die Übernahme der Rolle des Zweitgutachters.

Mein besonderer Dank geht an Dr. rer. nat. Diana Pauly und Dr. med. Regine Braun für ihre stets hervorragende Betreuung und ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Für ihre fachliche und emotionale Unterstützung während schwieriger Phasen der Arbeit bin ich ihnen sehr dankbar.

Ein großer Dank geht auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundliche Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft bei allen Laborarbeiten sowie ihre wertvollen Anregungen, welche wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich mich beim gesamten Personal der Augenklinik bedanken, welches durch das Sammeln der Probematerialien und durch die klinische Untersuchung der Patienten diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kommilitonen, welche mich während der gesamten Zeit der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben und mir stets zu neuer Motivation verhalfen.

Meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich ganz besonders herzlich danken für die aufmerksame, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines gesamten Studiums. Ohne ihre Hilfe wäre all dies nicht möglich gewesen.

## 8 Lebenslauf

# Markus Englbrecht

---

### Persönliche Daten

Adresse	Birket 4, 84152 Mengkofen, Deutschland
Email	M.Englbrecht2@gmx.de
Telefon	+49 (0) 8774 278
Geburtsdatum und -ort	05.04.1995, Landshut
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

2005-2013	Abitur, Gymnasium Dingolfing
2001-2005	Volksschule Aitrachtal, Mengkofen

### Hochschulausbildung

2013 – 2019	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
11/2019	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2018	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2015	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 2016	Dissertation in der Abteilung für Augenheilkunde bei Prof. Dr. Horst Helbig zum Thema: „Analyse der Tränenflüssigkeit von Patienten vor und nach allogener Stammzelltransplantation zur Detektion neuer Biomarker der <i>Graft-versus-Host</i> Erkrankung“

### Famulaturen und Praktisches Jahr

11/2018 – 10/2019	1. PJ-Tertial: Chirurgie am Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg 2. PJ-Tertial: Innere Medizin am Universitätsklinikum Regensburg 3. PJ-Tertial: Psychiatrie am Bezirksklinikum Regensburg
02/2018	Famulatur Psychiatrie am Bezirksklinikum Regensburg
09/2016	Famulatur Neurochirurgie am Universitätsklinikum Regensburg
08/2016	Famulatur Allgemeinmedizin in Mengkofen
02/2016	Famulatur Innere Medizin am Klinikum Mallersdorf

### Soziales Engagement

Seit 2011	Mitglied der FFW Süßkofen
Seit 2011	Mitglied der KLJB Hagenau
2013-2017	Schriftführer der KLJB Hagenau

### Interessen/ Hobbies

Gitarre, Basketball, Joggen

Birket, 13.01.2020