

Patrick Will Marks
Dr. med.

Immunopathogenic profiling of secondary lymphedema stage progression in a novel and validated microsurgically-induced *in-vivo* murine model

Fach: Chirurgie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Christoph Hirche

Das sekundäre Lymphödem (SL) ist eine häufige Komplikation der modernen onkologischen Therapie, welche mit einer reduzierten Lebensqualität für Patienten und einer erheblichen Belastung für das Gesundheitssystem einhergeht. Die fehlende Verfügbarkeit eines zuverlässigen und validierten präklinischen Modells zur Untersuchung der Immunpathogenese hat Erforschungen der molekularen Mechanismen und die Entwicklung neuer Therapieansätze gegen das SL eingeschränkt. Folglich wird das SL derzeit als chronischer Zustand mit fortschreitendem Ödem, Fibrose, Anreicherung von Fettgewebe, Deformierung der Extremitäten und wiederkehrenden Weichteilinfektionen angesehen und vordergründlich symptomatisch therapiert.

Um neue Behandlungskonzepte zu entwickeln und das Verständnis über die zugrundeliegenden Pathomechanismen der SL-Chronifizierung durch Stadienprogression zu erweitern, bestand das erste Ziel darin, ein *in-vivo* Tiermodell zu etablieren und validieren, welches durch prä- und intraoperative, Fluoreszenz-navigierte Darstellung des Lymphsystems und mikrochirurgische Assistenz, die Induktion des SL sicher, stabil, repetitiv und ohne Strahlentherapie im rechten Hinterlauf der Ratte erlaubt. Der linke Hinterlauf verblieb als Kontrolle für translationale, klinische Zielparameter intakt. Im Gegensatz zu den bisherigen Modellen sollte das Tiermodell ohne Radiation generiert werden, um mögliche Komplikationen zu vermeiden und die pathophysiologischen Mechanismen der Immunpathogenese gezielt aufdecken zu können. In dieser Arbeit wurde ein *in-vivo* SL-Modell des rechten Hinterlaufs in 35 Ratten etabliert und mit translationalen, diagnostischen Kriterien und morphologisch-funktionellen Parametern validiert. Im intraindividuellen Vergleich wurde eine Langzeitstabilität des induzierten Lymphödems statistisch signifikant mit Volumenmessungen durch Wasserphletysmographie über mindestens 45 Tage nachgewiesen (entsprechend > 3 Jahren des Menschen). Ferner wurde eine statistisch signifikante Reduktion des lymphatischen Transportindex als Parameter der Dysfunktion durch eine neuartige VIS-Röntgen-Indocyaningrün Bildgebungstechnologie nachgewiesen. Mit dieser

Methodik konnte zum ersten Mal *in-vivo* die Stadienprogression durch histomorphologische Merkmale wie Fibrose, Adipogenese und chronische Inflammation repliziert und validiert werden. Zudem wurde eine Infiltration von Lymphozyten, Mastzellen und Stabilin-1-positiven Makrophagen in Hautproben des SL-Modells nachgewiesen und sowohl mit lokal und systemisch erhöhten (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α) als auch verringerten (INF- γ) Zytokinspiegeln korreliert. In Betracht der Ergebnisse, dass NF- $\kappa\beta$ auch im lymphödematösen Gewebe hochreguliert war, deuten diese Daten auf einen chronischen Inflammationszustand hin. Die konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopieanalyse zeigte, dass die Migration des SL Stadiums mit einer charakteristischen Subpopulation von α -SMA⁺/HSP-47⁺/vimentin⁺ Myofibroblasten zusammenhängt. Diese morphologisch veränderten, Lymphödem-assoziierte Fibroblasten (LAF), wurden mit erhöhten TGF- β 1-Serumspiegeln in späteren SL Stadien korreliert. Um die Assoziation von TGF- β 1 mit LAF und der Stadienprogression zu bestätigen, wurden diese Zellen aus Hautproben des SL-Modells isoliert. Die Expression von proinflammatorischen, profibrotischen und proliferativen Markern (α -SMA, E-cadherin, N-cadherin, HSP-47, β -Catenin, vimentin, and ZO-1) wurde durch doppelte Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Die in einem 3D-Hydrogel kultivierten LAF, zeigten sich phänotypisch äquivalent zu normalen Hautfibroblasten, welche mit TGF- β 1 stimuliert wurden. Im Gegensatz zu LAF und den mit TGF- β 1-stimulierten Fibroblasten, wiesen normale Hautfibroblasten in der 3D Kultur einen epithelialen Phänotyp (E-cadherin^{high}, N-cadherin^{low}, ZO-1^{high}) auf und zeigten weder Hinweise für eine Fibrogenese (HSP-47^{low}) noch für eine gesteigerte Proliferation (α -SMA^{low}/ β -Catenin^{low}). Funktionell waren LAF- und SL-Serum-stimulierte Fibroblasten in ihrem Wachstum proliferativer und invasiver als normale Fibroblasten unter hohem TGF- β 1 Stimulus. Basierend auf den hohen TGF- β 1-Serumspiegeln, dem invasiven Verhalten und dem profibrotischen, proliferativen und mesenchymalen LAF-Phänotyp wurde ein direkter Einfluss des TGF- β Signalwegs auf das Fortschreiten des SL-Stadiums vorausgesetzt. Zusätzliche Ergebnisse bekräftigten dies, da LAF *in-vitro* eine hochregulierte TGFBR2/Phospho-Smad Expression zeigten. Interessanterweise war die Smad7 Expression in LAF signifikant verringert, im Gegensatz zu TGF- β 1-stimulierten Fibroblasten, in denen der TGF- β Signalweg durch Smad7 inhibiert wurde. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass zusätzliche Pathomechanismen im generierten SL Milieu die LAF in einen chronischen Inflammationszustand programmierten. Nachdem *in-vivo* und *in-vitro* gezeigt wurde, dass die SL

bedingte Stadienprogression wahrscheinlich durch Smad-abhängige TGF- β -Signale und LAF vermittelt wird, folgte die Untersuchung eines möglichen Therapieansatzes mit einem experimentellen TGFBR1-Inhibitor (LY2157299). Interessanterweise führte die Behandlung mit LY2157299 zu einer Rückbildung des mesenchymalen und kollagenproduzierenden Phänotyps der LAF und TGF- β 1-stimulierten Fibroblasten. Durch Behandlung der Hautfibroblasten mit LY2157299 erwiesen sich diese als resistent gegen eine Umwandlung in LAF, trotz intensiver Stimulation mit TGF- β 1 und SL-Serum. Diesen Daten zufolge wären prophylaktische oder adjuvante Strategien mit LY2157299 denkbar, um den Einfluss des immunpathogenen TGF- β -lastigen Milieus auf Fibroblasten entgegenzuwirken. Eine ähnliche Inhibition wurde *in-vitro* beobachtet, als die Fibroblasten einem Überstand von Fettstammzellen (ADSC) ausgesetzt wurden. Solche Ergebnisse könnten weitere Erforschungen zum immunmodulatorischen Potenzial des ADSC-Sekretoms für die SL-Behandlung bahnen. Zuletzt wurde gezeigt, dass Lymphangiosarkomzellen zentrale Proteine des Smad-abhängigen Signalweges stark exprimieren. Dieser Befund bietet potenzielle therapeutische Ziele für die Behandlung dieses infiltrativen, pro-metastasierten und hochletalen Sarkoms. Das entwickelte und validierte SL-Modell ist das erste murine Modell am Hinterlauf, das mit translationalen Zielparametern und ohne Strahlentherapie die Merkmale des Fortschreitens der Stadienprogression *in-vivo* repliziert. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Stadienprogression durch einen dysregulierten TGF- β 1 Signalweg in Zusammenhang mit einem pathogenen Phänotyp von Myofibroblasten verursacht wird. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse dienen als *Proof of Concept* für die Entwicklung und Validierung des Effektes pharmakologischer und supermikrochirurgischer Therapien gegen das SL und dessen Mechanismen während der Stadienprogression.