

Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer

**Analyse des Expressionsmusters
selektierter Adhäsionsmoleküle im Rahmen der murinen
Graft-versus-Host Erkrankung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gudrun Burger
aus
Wangen im Allgäu
2002

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Gutachter: Professor Dr. P.-G. Schlegel

2. Gutachter: Professor Dr. W. Brugger

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	Seite
1.1	Graft-versus-Host Erkrankung	1
1.2	Adhäsionsmoleküle	3
1.3	Homing Rezeptoren	6
1.4	Kostimulatorische Moleküle	6
1.5	Durchflußzytometrie	8
1.6	Immunhistochemie	8
1.7	Aufgabenstellung	9
2	Material	
2.1	Allgemeines	10
2.2	Glaswaren	10
2.3	Geräte	10
2.4	Puffer und Lösungen	11
2.5	Herstellung von Gebrauchslösungen	12
2.6	Sonstige Materialien	13
2.7	Verwendete Antikörper	14
2.8	Verwendete Tierstämme	16
2.9	Mikroskop	17
3	Methoden	
3.1	Bestrahlung der Mäuse	18
3.2	Autologe und allogene Knochenmarktransplantation der Mäuse	18
	3.2.1 Gewinnung des Knochenmarks	18
	3.2.2 Gewinnung der Milzzellen	19
	3.2.3 Transplantation	19
3.3	Sektion der Mäuse und Fixierung der Organe	20
3.4	Durchflußzytometrie der Milzzellen	20
3.5	Herstellung von Gefrierschnitten	21
3.6	Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten	21

3	Methoden	Seite
3.7	Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten	24
3.8	Kontrollfärbungen	24
3.9	Semiquantitative Beurteilung der gefärbten Schnitte	25
3.10	Digitale Bildverarbeitung	25
4	Ergebnisse	
4.1	Gewichtsverläufe nach Knochenmarktransplantation	27
4.2	Induktion makroskopischer GvHD	27
4.3	Hämatopoetische Regeneration der Mäuse nach Knochenmarktransplantation	28
4.4	FACS Analysen von Milzzellen nach Knochenmarktransplantation	29
4.5	Immunhistochemische Analysen von Gefrierschnitten des Ileum knochenmarktransplantierter Mäuse	32
4.5.1	VCAM-1	32
4.5.2	ICAM-1	33
4.5.3	ICAM-2	34
4.5.4	α 4-Integrin	34
4.5.5	LFA-1	35
4.5.6	CD4	36
4.5.7	CD8	37
4.5.8	B7-1	37
4.5.9	B7-2	38
4.5.10	PECAM-1	38
4.5.11	E-Selektin	39
4.5.12	MAdCAM-1	39
4.5.13	β 7-Integrin	40
4.6	Immunhistochemische Analysen von Gefrierschnitten des Colon knochenmarktransplantierter Mäuse	41
4.6.1	VCAM-1	41
4.6.2	ICAM-1	41

4	Ergebnisse	Seite
	4.6.3 ICAM-2	42
	4.6.4 α 4-Integrin	42
	4.6.5 LFA-1	43
	4.6.6 CD4	43
	4.6.7 CD8	44
	4.6.8 B7-1	45
	4.6.9 B7-2	45
	4.6.10 PECAM-1	46
	4.6.11 E-Selektin	47
	4.6.12 MAdCAM-1	47
4.7	Immunhistochemische Analysen von Gefrierschnitten der Haut knochenmarktransplantierte Mäuse	48
	4.7.1 VCAM-1	48
	4.7.2 ICAM-1	49
	4.7.3 ICAM-2	50
	4.7.4 α 4-Integrin	50
	4.7.5 LFA-1	51
	4.7.6 CD4	52
	4.7.7 CD8	53
	4.7.8 B7-1	53
	4.7.9 B7-2	54
	4.7.10 PECAM-1	55
	4.7.11 E-Selektin	55
	4.7.12 MAdCAM-1	56
	4.7.13 β 7-Integrin	56
4.8	Immunhistochemische Analysen von Gefrierschnitten der Leber knochenmarktransplantierte Mäuse	58
	4.8.1 VCAM-1	58
	4.8.2 ICAM-1	59
	4.8.3 ICAM-2	59

4	Ergebnisse	Seite
4.8.4	α 4-Integrin	60
4.8.5	LFA-1	61
4.8.6	CD4	62
4.8.7	CD8	62
4.8.8	B7-1	63
4.8.9	B7-2	63
4.8.10	PECAM-1	64
4.8.11	E-Selektin	64
4.8.12	MAdCAM-1	65
4.8.13	β 7-Integrin	65
5	Diskussion	
5.1	Hämatopoetische Regeneration nach Knochenmarktransplantation	67
5.2	Durchflußzytometrische Analysen des Milzhomogenats nach Knochenmarktransplantation	67
5.3	Expression von CD4 und CD8 in den Zielorganen der GvHD	70
5.4	Expression von VCAM-1 in den Zielorganen der GvHD	73
5.5	Expression von α 4-Integrin in den Zielorganen der GvHD	76
5.6	Expression von MAdCAM-1 in den Zielorganen der GvHD	78
5.7	Expression von ICAM-1 in den Zielorganen der GvHD	79
5.8	Expression von ICAM-2 in den Zielorganen der GvHD	83
5.9	Expression von LFA-1 in den Zielorganen der GvHD	83
5.10	Expression von B7-1 und B7-2 in den Zielorganen der GvHD	86
5.11	Expression von E-Selektin in den Zielorganen der GvHD	90
5.12	Expression von PECAM-1 in den Zielorganen der GvHD	92
6	Zusammenfassung	95
7	Abkürzungsverzeichnis	97

	Seite
8 Literaturverzeichnis	98
9 Danksagung	109
10 Lebenslauf	110

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

G. Burger, J. Wessels, M. Eyrich, S. Lal, D. Niethammer and P.G. Schlegel (1999).
Analysis of the expression pattern of adhesion molecules in the murine intestine during
Graft-versus-Host Disease (GVHD). 15. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für
Immunologie (DGI) , Stuttgart. *Vortrag 03/1999*

G. Burger, J. Wessels, M. Eyrich, S. Lal, W. Budach, D. Niethammer, P.G. Schlegel
(1999). Expression pattern of adhesion molecules in the skin during murine GVHD.
Klinische Pädiatrie, 211, 1999, p.363. XII. Jahrestagung der Kind Philipp Stiftung für
Leukämieforschung, Wilsede. *Vortrag 06/1999*

P.G. Schlegel, G. Burger, J. Wessels, M. Eyrich, S. Lal, K. Schilbach, D. Niethammer
(1999). A sequential analysis of the expression pattern of adhesion molecules during
murine Graft-versus- Host Disease (GVHD). 41st Annual Meeting of the American
Society of Hematology (ASH), New Orleans. Blood 1999; 94 : 551a. *Poster 12/1999*

P.G. Schlegel, G. Burger, J. Wessels, M. Eyrich, K. Schilbach, D. Niethammer (2000).
A sequential analysis of the tissue expression of selected adhesion molecules during the
time course of murine GVHD. 8th Annual International Symposium on Recent Advances
in hematopoietic Stem Cell Transplantation, Univ. of San Diego and Univ. of
Heidelberg. *Poster 05/2000*

1 Einleitung

1.1 Graft-versus-Host Erkrankung

Seit 1975 hat die Zahl der allogenen Stammzelltransplantationen kontinuierlich zugenommen (Thomas et al., 1975). Hämatopoetische Stammzellen werden aus dem Knochenmark (Knochenmarkstammzellen) oder aus dem peripheren Blut (periphere Blutstammzellen) gesunder Spender gewonnen. Stammzelltransplantationen stellen eine wichtige therapeutische Option für viele Patienten mit malignen Erkrankungen (Akute oder Chronische Leukämien, Lymphome) und mit nicht-malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems (Thalassämie, Aplastische Anämie) dar. Derzeit wird in klinischen Studien untersucht, ob Patienten mit bestimmten Autoimmunerkrankungen (Systemischer Lupus erythemathodes) oder Patienten mit bestimmten soliden Tumoren (Mammakarzinom, Ovarialkarzinom) ebenfalls von dieser Therapie profitieren können.

Die akute und chronische Transplantat-gegen-Empfänger Erkrankung (engl. "Graft-versus-Host Disease", GvHD) ist eine lebensbedrohliche Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation von Geschwisterspendern oder von nichtverwandten Spendern. Sowohl die akute als auch die chronische GvHD ist eine T-Zell-vermittelte Reaktion gegen Zielgewebe des Empfängers (Berger et al., 1994; Korngold and Sprent, 1987a). Präferentiell sind die Zielorgane Darm, Haut und Leber betroffen. Die individuelle immunologische Identität wird in Form von Oberflächenproteinen, den Haupthistokompatibilitätsantigenen (engl. "Major histocompatibility complex", MHC) und den Nebenhistokompatibilitätsantigenen (engl. "Minor histocompatibility antigens", MiHA) zum Ausdruck gebracht. Beim Menschen wird MHC synonym für HLA (engl. "Human leukocyte antigen") verwandt. Transplantationsrelevante Loci sind dabei HLA-A, HLA-B und HLA-DRB1. Die akute GvHD wird durch immunkompetente T-Zellen des Spenders im Transplantat initiiert, die die Zelloberflächenantigene des Empfängers als fremd erkennen. Diese T-Zellen werden aktiviert und reagieren darauf mit klonaler Expansion. Zum klinischen Erscheinungsbild der akuten GvHD kommt es schließlich

innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation durch Spender T-Zellen, die Epithelien des Empfängers in der Epidermis, den intrahepatischen Gallengängen, sowie im Darm zerstören.

Im Gegensatz zur akuten Form der GVHD imponiert die chronische Variante als ein autoimmunähnliches Syndrom, das nach Tag 100 nach Transplantation auftritt.

Bereits 1966 beschrieb Billingham in seinen "Harvey lectures" die Voraussetzungen zur Entwicklung einer Transplantat-gegen-Empfänger Erkrankung (Graft-versus-Host Disease, GvHD): Das Transplantat muß immunkompetente Zellen enthalten, der Empfänger muß dem Transplantat als fremd erscheinen, und dem Empfänger muß es unmöglich sein, eine ausreichende Reaktion zur Zerstörung der transplantierten Zellen auszulösen (Billingham, 1966).

Zusätzliche Faktoren, die für die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen eine Rolle spielen sind die Grunderkrankung des Empfängers, vorausgegangene Infektionen (speziell CMV-Infektionen) und die Konditionierung (Strahlendosis, Art und Dosis angewandter Chemotherapeutika) . Sie führen zu proinflammatorischen Veränderungen der Endothel- und Epithelzellen mit erhöhter Ausschüttung von Zytokinen (TNF- α , Interleukin-1) und vermehrter Expression von Adhäsionsmolekülen.

Ein Ziel der Forschung ist es deshalb seit langem, eine effektive Prophylaxe für die GvHD zu entwickeln, die solange angewendet werden soll, bis sich eine T-Zell Toleranz eingestellt hat. Nach Stammzelltransplantation von HLA-identischen Geschwisterspendern entwickelten 13% der transplantierten Kinder unter 10 Jahren, 28% der Jugendlichen zwischen 10 und 19 Jahren und 42 bis 46% der Erwachsenen eine chronische GvHD (Klingebl and Schlegel, 1998). Balduzzi untersuchte 88 Kinder (Balduzzi et al., 1995) die Stammzellen von nichtverwandten Spendern erhielten. 46 Patienten erhielten Transplantate von HLA-identischen Spendern, und 42 Patienten erhielten Transplantate mit inkompatiblen Nebenhistokompatibilitätsantigenen (MiHA). Die Inzidenz von akuter GvHD betrug in dieser Serie 83% in der HLA-identischen Gruppe und 98% in der MiHA-inkompatiblen Gruppe. 60% der Kinder entwickelten eine chronische GvHD. Eine Untersuchung des IBMTR (International Bone Marrow Transplant Registry) an 6691 Patienten, die zwei Jahre nach allogener

Knochenmarkstransplantation lebten und kein Rezidiv entwickelt hatten, ergab, daß 25% eine akute GvHD und 43% eine chronische GvHD ausgebildet hatten. Insgesamt war die chronische GvHD mit 31% die zweithäufigste Todesursache nach Rezidiven bei den Langzeitüberlebenden, die im Mittel 80 Monate beobachtet wurden (Socie et al., 1999).

1.2 Adhäsionsmoleküle

Die Adhäsion von Leukozyten an das Epithel und die sich daran anschließende Wanderung durch die Gefäßwand im Rahmen entzündlicher Erkrankungen findet vor allem in postkapillären Venolen statt. Die sequentielle Kaskade molekularer Interaktionen zwischen T-Lymphozyten und Endothelzellen besteht aus 1.) initialem Kontakt und Rollen, 2.) Aktivierung, 3.) Haften und 4.) transendotheliale Migration (Diapedese) (Butcher and Picker, 1996).

Der erste Schritt (engl. "rolling") wird durch Selektine vermittelt (Bevilacqua et al., 1987). Endothelständiges E-Selektin bindet an Sialyl-Lewis^x Strukturen auf Leukozyten (Lowe et al., 1990), wobei diese Wechselwirkung nur von vorübergehender Natur ist. Hierbei werden Leukozyten im Blutfluß verlangsamt und können so das Endothel auf Diffusionsgradienten spezifischer löslicher Faktoren, wie Chemokine oder Zytokine, sezerniert von Endothelien oder von der extrazellulären Matrix (z.B. Interleukin-8 (Pruijt et al., 1998)), absuchen. Diese löslichen Faktoren führen zu einer Aktivierung. Fehlen solche Faktoren, so kommt es zu einer schnellen Lösung der Bindung (Schlegel, 1997).

In der zweiten Phase werden Integrine auf den rollenden Leukozyten verstärkt exprimiert. Diese sind heterodimere Transmembranproteine bestehend aus einer nicht-kovalent gebundenen α - und β -Kette. Die verstärkte Expression von Integrinen erhöht die Bindungsaktivität der zirkulierenden Leukozyten. Auf der Endothelseite erfolgt komplementär eine de-novo Expression von Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Familie (Henninger et al., 1997): ICAM-1¹⁾ (Sligh et al., 1993; Staunton et al., 1988), ICAM-2 (Staunton et al., 1989) und VCAM-1²⁾ (Osborn et al., 1989). Unter dem Einfluß lokal gebildeter Entzündungsfaktoren wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Interleukin-1 (IL-1) werden interzelluläre Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen zunehmend exprimiert.

Als nächster Schritt folgt nun die feste Adhäsion der aktivierten Leukozyten an das Endothel. Sie erfolgt bei Lymphozyten hauptsächlich über eine heterophile Bindung zwischen LFA-1³⁾ / ICAM-1 und LFA-1 / ICAM-2 (Staunton et al., 1989) oder über VLA-4⁴⁾ / VCAM-1 (Osborn et al., 1992; Vonderheide and Springer, 1992) bzw. über $\alpha_4\beta_7$ -Integrin/VCAM-1.

Nach der festen Adhäsion an das Endothel wandern Leukozyten entlang eines Gradienten chemotaktischer Faktoren (Fragmente des Komplementsystems, Leukotriene, Chemokine u.a.) in das Gewebe ein (Diapedese), wo sie lokal ihre Effektorfunktionen, wie Antigenerkennung oder Einleitung von Entzündungsreaktionen, ausführen können.

Fehlt eines der oben beschriebenen Signale, kann sich die sequentielle Kaskade molekularer Interaktionen zwischen T-Lymphozyten und Endothelzellen nicht ausbilden (Butcher and Picker, 1996).

¹⁾ ICAM (intercellular adhesion molecule)

²⁾ VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule)

³⁾ LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$ -Integrin, lymphocyte function associated antigen)

⁴⁾ VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ -Integrin, very late activation molecule)

Tabelle 1 – Adhäsionsmoleküle die an der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelien beteiligt sind. (Tabelle nach Janeway und Travers „Immunobiology“ 3rd.Edition, S.7:5)

Familie	Name	Gewebeverteilung	Ligand
Selektine Kohlenhydratbindende Proteine; initiieren Leukozyten-Endothel Interaktion	L-Selektin (CD62L)	Naive und einige Memory Lymphozyten; Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, Eosinophile	SLe ^x und SLe ^a , GlyCAM-1, MAdCAM-1
	P-Selektin (CD62P)	Aktiviertes Endothel und Plättchen	Sialyl Lewis ^x , PSGL-1
	E-Selektin (CD62E)	Aktiviertes Endothel	Sialyl Lewis ^x
Mucinähnliche vaskuläre Adressine Binden L-Selektin; initiieren Leukozyten-Endothel Interaktion	CD34	Endothel	L-Selektin
	GlyCAM-1	Hochendotheliale Venulen (HEV)	L-Selektin
	MAdCAM-1	HEV in intestinaler Mucosa	L-Selektin, Integrin $\alpha_4\beta_7$
Integrine Binden an Zelladhäsionsmoleküle und Matrix, führen zu starker Adhäsion	LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18)	Monozyten, T Zellen, Macrophagen, Neutrophile, Dendritische Zellen	ICAMs
	VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$, CD49d/CD29)	Lymphozyten, Monozyten, Macrophagen	VCAM-1
	$\alpha_4\beta_7$	Lymphozyten	MadCAM-1
Immunglobulin Superfamilie Verschieden Rollen in der Zelladhäsion; binden an Integrine	ICAM-1 (CD54)	Aktiviert Gefäße, Lymphozyten, Dendritische Zellen	LFA-1, Mac1
	ICAM-2 (CD102)	Ruhende Gefäße, Dendritische Zellen	LFA-1
	VCAM-1 (CD106)	Aktiviertes Endothel	VLA-4

1.3 Homing Rezeptoren und Adressine

Nach derzeitigen Modellvorstellungen erreichen Lymphozyten durch die Wechselwirkung von Zelladhäsionsmolekülen auf den Lymphozyten, den sogenannten Lymphozyten Homing Rezeptoren und solchen auf postkapillären Venolen, den vaskulären Adressinen, die verschiedenen Organe.

Die unterschiedliche Expression von Adhäsionsmolekülen kann verschiedene Untergruppen von T-Zellen in spezifische Lokalisationen des Körpers dirigieren. So weisen Adressine ein gewebespezifisches Verteilungsmuster auf und regulieren die organspezifische Zirkulation naiver und die Rezirkulation von Memory-T-Zell-Subpopulationen. Sie stellen damit ein molekulares Korrelat für den organspezifischen Tropismus von T-Zell-Subpopulationen dar. MAdCAM-1 (Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule) wurde ursprünglich mittels des monoklonalen Antikörpers MECA-367 als Adressin der Peyerschen Plaques und der Lamina propria der murinen intestinalen Mucosa charakterisiert (Nakache et al., 1989; Streeter et al., 1988). Memory-T-Lymphozyten die den Integrin-Liganden $\alpha_4\beta_7^{\text{hi}}$ tragen (Berlin et al., 1995; Berlin et al., 1993a), binden mittels MAdCAM-1 an hochendotheliale Venolen des Darms und tragen so zur Schleimhautimmunität bei. Naive T-Lymphozyten ($\alpha_4\beta_7^{\text{lo}}$) erhalten kaum Zugang zu den Peyerschen Plaques. Ein anderes Adressin ist beispielsweise E-cadherin, das $\alpha_e\beta_7$ tragende T-Zellen in Epithelien lenkt (Cepek et al., 1994; Higgins et al., 1998). Zellen die vorwiegend in die Haut wandern exprimieren CLA (cutaneous lymphocyte antigen) und binden wahrscheinlich an E-Selektin (Berg et al., 1991; Rossiter et al., 1994).

1.4 Kostimulatorische Moleküle

Effektor T-Zellen werden angeregt, wenn ihr antigenspezifischer T-Zell-Rezeptor ein Peptidfragment gebunden an Klasse I oder Klasse II MHC Molekül erkennt und der CD4 oder CD8 Korezeptor an den Peptid-MHC Komplex bindet. Dies allein reicht jedoch nicht aus, um naive T-Zellen zur Proliferation zu bewegen. Die antigenspezifische klonale Expansion bedarf eines zweiten, eines kostimulatorischen

Signals, von der antigenpräsentierenden Zelle (APC). Das kostimulatorische Signal ergänzt das antigenspezifische erste Signal und führt damit zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle mit Proliferation, IL-2 Produktion und Expression des Interleukin-2 Rezeptors (CD25). Ein fehlendes kostimulatorisches Signal führt zu Teilaktivierung oder zu einem Zustand langanhaltender Anergie der T-Zelle. Die am besten charakterisierten kostimulatorischen Moleküle sind B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86). Sie sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und werden auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. B7-1 und B7-2 binden an CD28 und stimulieren das Wachstum naiver T-Zellen. Gleichzeitig werden diese T-Zellen aktiviert und exprimieren nun CTLA-4, welches der Proliferation entgegenwirkt, und die T-Zellen weniger sensibel auf Antigenstimulation reagieren läßt. Andere potentiell kostimulatorische Moleküle sind ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1.

In Abhängigkeit des Aktivierungs- und Differenzierungsgrads der T-Zelle sind verschiedene Liganden auf der antigenpräsentierenden Zelle als potentielle kostimulatorische Moleküle erarbeitet worden. Die Bindung der T-Lymphozyten an spezifische Liganden führt zu einer unterschiedlichen Stimulation der T-Lymphozyten, auf die sie mit Proliferation und Zytokinexpression reagieren.

Tabelle 2 – Kostimulatorische Signale der T-Zell Aktivierung

Kostimulatorisches Molekül APC	Ligand T-Lymphozyt	Aktivierungsgrad- und Differenzierungsgrad des T- Lymphozyten.
B7-1 und B7-2	CD28 und CTLA-4	T-Zell Klone; aktivierte (CD45RO ⁺) T-Zellen
ICAM-1 und ICAM-2	LFA-1	Ruhende (CD45RA ⁺) T- Zellen
VCAM-1	VLA-4	Ruhende (CD45RA ⁺) T- Zellen

1.5 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Zellen können über die Lichtstreuung im Dunkelfeld nach ihrer Größe und Granularität beurteilt werden. In der Fluoreszenzbetriebsart werden Zelleigenschaften untersucht, die mit der Bindung von Fluorochromen über Antikörper an Oberflächenmoleküle assoziiert sind. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Untersuchung von Milzzellen verwendet, um so die neu einsetzende Hämatopoese nach Knochenmarktransplantation zu verfolgen, und um den Chimärismusstatus der allogenen transplantierten Mäuse zu bestimmen.

1.6 Immunhistochemie

Ziel immunhistochemischer Techniken sind Nachweis und Identifikation antigener Komponenten in Zellen oder Gewebsschnitten durch spezifische Antikörper, die durch Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme oder Isotope markiert sind. Voraussetzungen sind die Spezifität der verwendeten Antikörper und die Stabilität der nachzuweisenden antigenen Determinanten im Gewebe. Mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern können einzelne Zellen mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden. Leider ist es oft schwierig ihre anatomischen Lagebeziehungen im Gewebe zu verfolgen. Um die spezifisch gefärbten Zellen im Gewebeverband genau zu lokalisieren, bietet sich die Immunperoxidase Technik an, da zusätzlich das ungefärbte Gewebe gegengefärbt werden kann.

1.7 Aufgabenstellung

Eine Kaskade adhäsiver und kostimulatorischer Signale reguliert die T-Zell Aktivierung nach allogener Stammzelltransplantation. Erste Vorarbeiten zur Blockade von Adhäsions- und Kostimulationsmolekülen während der Induktionsphase der GvHD wurden in verschiedenen murinen Modellen durchgeführt. So führte die Behandlung mit Anti-VCAM-1 Antikörper zu einer Abnahme der Inzidenz der GvHD von 100% in der Kontrollgruppe auf 53% bei behandelten allogenen transplantierten Mäusen (Schlegel et al., 1995). In weiteren Experimenten führte die kombinatorische Blockade der LFA-1/ICAM-1 und CD28/B7 Interaktion zu einer deutlichen Reduktion der durch GvHD vermittelten Letalität bei Mäusen nach allogener Stammzelltransplantation (Blazar et al., 1995).

Die ersten oben genannten Erkenntnisse weisen auf die funktionelle Bedeutung einzelner Teilschritte in der GvHD-Induktion hin, ein Gesamtkonzept des Zusammenwirkens verschiedener Signale liegt jedoch bis heute nicht vor.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte prospektiv untersucht werden, welche Adhäsionsmoleküle und kostimulatorische Moleküle in den Zielorganen der GvHD zu bestimmten Zeitpunkten hochreguliert werden. Ferner sollte die Kinetik dieser Signale in den verschiedenen Krankheitsstadien der "Graft-versus-Host-Disease" untersucht werden. Das Ziel war die Erkennung möglicher typischer Expressionsmuster von Adhäsions- und Kostimulationsmolekülen im Rahmen der murinen GvHD.

2 Material

2.1 Allgemeines

Das zur Herstellung von Puffern und Lösungen verwendete Wasser war deionisiert und wurde über eine Millipore-Anlage filtriert.

2.2 Glaswaren

Tabelle 3 - Glaswaren

Artikel	Produktangaben	Bezugsquelle
Färbegläser mit Färbegestell	200 ml, Platz für 19 Objektträger (# H552.1,# H554.1)	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Superfrost/Plus, 25*75*1 mm	Menzel Gläser, Braunschweig
Deckgläser	18*18 mm, 24*32 mm, 24*40 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig

2.3 Geräte

Tabelle 4 - Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Hämatologie Automat	Advia™120	Bayer, München
Cryocut	CM 3000	Leica Instruments GmbH, Nussloch
Linearbeschleuniger	Linac	Electra, Hamburg
Durchflußzytometer	FACScan	Becton-Dickinson, Heidelberg

2.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 5 – Puffer und Lösungen

Produkt	Produktangaben	Hersteller/Bezugsquelle
Aceton	(#1.00014.1000)	Merck, Darmstadt
70 % Alkohol	Vergällt	Universitätsapotheke Tübingen
BSA	Bovine Serum Albumin, 7,5 % , steril	Gibco, Eggenstein
Citifluor	Montagemittel für die Fluoreszenzmikroskopie. (# R1320)	Plano, Wetzlar
Diethylether	(#8297.1)	Roth, Karlsruhe
Einbettmedium	OCT-embedding compound	Leica Instrumts GmbH, Nussloch
Essigsäure	(# 1.00063)	Merck, Darmstadt
FCS	Seromed® Fetal bovin serum, steril (#S0115)	Biochrom KG, Berlin
Gelatine	(# 22151)	Serva, Heidelberg
L-Glutamin	Seromed® 200mM, steril (#K0282)	Biochrom KG, Berlin
Glycerin	(# G8773)	Sigma, Steinheim
Heparin	Vetren® (100IE/ml)	Byk-Gulden, Konstanz
Kühlflüssigkeit	Flüssiger Stickstoff	
Lympholyte®-M	(# CL5035)	Cedarlane®, Hornby, Ontario, Kanada
Lysing Buffer	Pro Liter 8,29g Ammoniumchlorid, 1g Kaliumhydrogencarbonat, 0,0368g Komplexon III, steril	Universitätsapotheke Tübingen
Mayer's Hämalaunlösung	MHS-16	Sigma, St. Louis, MO, USA

Nagellack	Klarlack	
Natriumacetatpuffer	(# S8625)	Sigma, St. Louis, MO, SA
N,N-Dimethylformamid	(# 6251.1)	Roth, Karlsruhe
PBS	Spezial, steril. (# 1903)	Gibco, Eggenstein
Penicillin / Streptomycin	Penicillin 10000U/Streptomycin 10000µg/ml Seromed®, steril (#A2213)	Biochrom KG, Berlin
Streptavidin-Lösung	Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex. (RPN 1051, Lot # 95060)	Amersham, Buckinghamshire, UK.
Streptavidin-FITC	(#13024D)	PharMingen, Hamburg
Substratlösung AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol (# A- 5754)	Sigma
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂ 30% (# 7209)	Merck, Darmstadt
Zellkulturmedium	RPMI 1640	Gibco, Eppenstein

2.5 Herstellung von Gebrauchslösungen

Glycerin-Gelatine 7 g Gelatine mit 90 ml Aqua dest. mischen, im Wasserbad bei 40°C eine Stunde quellen lassen. Anschließend 50 ml Glycerin dazugeben.

Natriumacetatpuffer 1 M Lösung mit Essigsäure auf pH 5,2 einstellen.

Streptavidin-Lösung Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex
1:200 in PBS verdünnen.

Substratlösung AEC 4mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) in 0,5 ml N,N-

Dimethylformamid lösen, mit 9,5 ml Natriumacetat-Puffer versetzen und filtrieren (Minisart, steril, Porengröße 0,2 µm) bis die Lösung klar wird. Unmittelbar vor der Verwendung 5 µl 30 % H₂O₂ pro 10ml Ansatz zugeben.

Zellkulturmedium mit Zusätzen In 500ml RPMI 1640-Medium, 50ml hitzeinaktiviertes FCS, 5ml Penicillin (10000 U/l) /Streptomycin (10000 µg/ml) und 5ml L-Glutaminlösung (200mM) steril pipettieren. Endkonzentrationen: 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100µg/mg Streptomycin.

2.6 Sonstige Materialien

Tabelle 6 – Sonstige Materialien

Produkt	Hersteller/Beschreibung
Aluminiumförmchen	Förmchen wurden aus Aluminiumfolie gefaltet, für das Einfrieren und Aufbewahren der Organe.
Dewar Thermoskanne	(#A630.1) Roth, Karlsruhe
Feuchte Kammer	Plastikgefäß mit Deckel, das mit feuchten Tüchern ausgelegt wurde.
MBT PAP-Pen	(#29.78.40000) Multimed Wicker GmbH, Kirchheim Teck
Präparierbesteck	(#0829.1) Roth, Karlsruhe
Sterile Filter	Cell strainer 100µm Porengröße, Falcon, Becton Dickinson, New Jersey, USA
Sterile Filter	Minisart steril, Porengröße 0,2 µm (# 17597K), Sartorius AG, Göttingen

2.7 Verwendete Antikörper

Tabelle 7 - Erstantikörper

Antikörper gegen	Klon	Ig-Subklasse	Katalog-Nr.	Hersteller	Ist-Konzentration
CD 4	H 129.19	Ratte IgG _{2a}	09001D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD 8	53-6.7	Ratte IgG _{2a}	01041D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD 11a LFA-1	M 17/4	Ratte IgG _{2a}	08141D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD 28		syrischer Hamster IgG	16710D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD29 Integrin β_1 Kette	9EG7	Ratte IgG _{2a}	09351D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD 31 PECAM-1	Mec 13.3	Ratte IgG _{2a}	01951D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD 40	3/23	Ratte IgG _{2a}	09661D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD 40 L	MR1	armenischer Hamster IgG	09021D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD 49d VLA-4	9C10	Ratte IgG _{2a}	01731D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD 54 ICAM-1	3E2	armenischer Hamster IgG	01541D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD 62 E E-Selektin	10E9.6	Ratte IgG _{2a}	09521D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD 80 B7-1	1G10	Ratte IgG _{2a}	01941D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD 86 B7-2	GL1	Ratte IgG _{2a}	09271D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD 102 ICAM-2	3C4 (mIC2/4)	Ratte IgG _{2a}	01801D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD 106 VCAM-1	429 (MVCAM.A)	Ratte IgG _{2a}	01811D	PharMingen	0,5 mg/ml
MAdCAM-1	MECA-367	Ratte IgG _{2a}	09721D	PharMingen	0,5 mg/ml
Integrin β_7 Kette	M293	Ratte IgG _{2a}	09321D	PharMingen	0,5 mg/ml

Tabelle 8 – **Biotinylierte Zweitantikörper**

Antikörper gegen	Klon	Spezies	Katalog-Nr.	Hersteller	Ist-Konzentration
Ratte IgG (gesamtes Molekül)	über Affinität isoliert	Ziege	B7139 Lot. #106H8950 Lot. #28H9215	Sigma, Missouri USA	0,6 mg/ml
Ratte IgG		Hase	E468 Lot. #068(101) Lot. #118(101)	DAKO	1,3 mg/ml
Ratte IgG _{2a}	RG7/1.30	Maus	10092D	PharMingen	0,5 mg/ml
Armenischer Hamster IgG	G70-204, G94-56	Ziege	12102D	PharMingen	0,5 mg/ml
Syrischer Hamster IgG	G192-3	Ziege	12192D	PharMingen	0,5 mg/ml

Tabelle 9 – **FACS Antikörper**

Antikörper gegen	Fluorochrom	Klon	Katalog-Nr.	Hersteller	Ist-Konzentration
CD3	PE	145-2C11	01085A	PharMingen	0,2 mg/ml
CD4 (L3T4)	FITC	GK1.5	09424D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD8 (Ly-2)	FITC	53-6.7	01044D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD45R/B220	FITC	RA3-6B2	01124A	PharMingen	0,5 mg/ml
Ly-9.1	FITC	30C7	01194D	PharMingen	0,5 mg/ml
Pan NK-Cells	PE	DX5	09945B	PharMingen	0,2 mg/ml
Vβ3 TCR	PE	KJ25	01405A	PharMingen	0,2 mg/ml

2.8 Verwendete Tierstämme

	Autologe Knochenmarktransplantation	Allogene Knochenmarktransplantation
Spendermäuse	Balb/c	B10.D2/nSnJ
Empfängermäuse	Balb/c	Balb/c

Es wurden ausschließlich weibliche Mäuse verwendet. Beide Mäusestämme wurden von "The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA" bezogen. Mausmodelle der GvHD, die gegen Minorhistokompatibilitätsantigene gerichtet sind, sind von klinischer Relevanz, da bei der Knochenmarktransplantation beim Menschen Spender und Empfänger nach HLA-Kompatibilität ausgewählt werden. Die in dieser Untersuchung verwendeten Mäusestämme B10.D2/nSnJ und Balb/c sind H-2^d (entspricht HLA Klasse I und Klasse II des Menschen). Sie unterscheiden sich jedoch in mehreren Neben-Histokompatibilitäts-Antigenen (Hamilton, 1987; Korngold and Sprent, 1987b). Ferner trägt der Balb/c Mäusestamm endogen Mtv-kodierte (engl. "mouse mammary tumor virus") Superantigene auf der Zelloberfläche, für die B10.D2/nSnJ Mäuse keine Toleranz besitzen (Miconnet et al., 1995). Nach allogener Transplantation von B10.D2 Stammzellen in Balb/c Empfänger werden sowohl die Minor Histokompatibilitätsantigendifferenzen als auch diese Superantigene als fremd erkannt und eine Immunantwort in Form der akuten GvHD initiiert.

Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Transplantation 13 Wochen alt und wurden in sterilen Käfigen in einer Hepa-filtrierte Kabine (Scantainer Typ C-110, Fa. Scanbur A/S, Lellinge, Koge, Dänemark) bei 22°C, kontrollierter Luftumwälzung und 12 Stunden Tag-Nacht-Wechsel gehalten. Sie erhielten autoklaviertes Futter und autoklaviertes Wasser mit Bactrim® Roche Sirup für Kinder (20ml Sirup/l Wasser, 160mg Trimethoprim und 800mg Sulfamethoxazol pro Liter Wasser) versetzt ad libitum.

2.9 Mikroskop

Für die Licht- und Fluoreszenzaufnahmen wurde das Olympus BX60 System-Mikroskop mit 10facher Okularvergrößerung (Olympus WH10x/22) und folgenden Objektiven eingesetzt: Plan-Achromat-Objektive in den Vergrößerungen 10x, 20x und 40x. Die aufgesetzte RGB-Videokamera (Firma Kappa) vergrößert ihrerseits noch einmal um den Faktor 2. Für die lichtmikroskopischen Beobachtungen und Aufnahmen wurde ein spezieller Blaufilter verwendet.

Die Anregungsstrahlung der Fluoreszenzmikroskopie wurde durch eine Quecksilberdampfampe hergestellt. In den verwendeten Filtersystemen sind Erregerfilter (optimale Anregung des Fluorochrom zur Fluoreszenz) und Sperrfilter (unterdrückt überschüssiges Erregerlicht und läßt nur längerwelligeres Fluoreszenzlicht durch) integriert. Filter der Fa. Olympus, Hamburg: U-MNU ("narrow ultrawide"), U-MWG ("wide green"), U-MWIB ("wide interference band").

Kamerasystem	Modell CF-15 MC mit Multicontrol Einheit MCU-II, Firma Kappa Meßtechnik GmbH.
Videodigitalisierungskarte für PC	Framegrabber, Siemens MXB, Siemens Nixdorf GmbH Stuttgart
Personal Computer	Mainboard: ASUS TX97-XE Prozessor: P-233 MHZ Arbeitsspeicher: 128MB Videokarte: ELSA Winner 2000/Office, 8MB CD-ROM: 24x, TEAC CD-Writer: 8x, 2x, RICOH Festplatte: 1,6 GByte, SEAGATE Betriebssystem: MICROSOFT Windows NT 4.0
Bildauswertung:	Doku®-Analysis, SIS-Systeme Münster

3 Methoden

3.1 Bestrahlung der Mäuse

Die Bestrahlung der Mäuse erfolgte in der Abteilung Strahlentherapie der Universitätsklinik Tübingen mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Michael Bamberg und mit Unterstützung seiner Mitarbeiter. Die Empfängermause wurden zweimal, im Abstand von 8 Stunden mit einem Linearbeschleuniger (Linac, Fa. Electra, Hamburg), mit je 5 Gy (2x712 Monitoreinheiten) bestrahlt. Die fraktionierte Gesamtdosis von 10 Gy war unter gegebenen Versuchsbedingungen in Vorversuchen als letale Strahlendosis ermittelt worden. Als Strahlenquelle wurde ein Linearbeschleuniger (Linac) eingesetzt. Um Streustrahlung und damit verbundene Inhomogenität zu vermeiden, saßen die Tiere zur Bestrahlung einzeln. Als Bestrahlungskäfig wurde ein TypIII-Käfig 8 cm hoch mit steriler Streu befüllt. Darauf wurde nun ein Gitter aus Plexiglas gelegt, das genau mit dem 2 cm dicken Plexiglasdeckel abschließt.

Als Strahlenkontrolle wurden Mäuse bezeichnet, die wie oben bestrahlt wurden, jedoch keine Knochenmarktransplantation erhielten und an Tag 3 nach Transplantation euthanasiert und sezirt wurden.

3.2 Autologe und Allogene Knochenmarktransplantation der Mäuse

3.2.1 Gewinnung des Knochenmarks:

Spendermäuse wurden in Äther bis zum Atemstillstand narkotisiert, dann durch Genickbruch getötet. Vor dem Öffnen des Kadavers wurde das Fell der Maus mit 70 % Alkohol befeuchtet. Nun wurde die Milz entnommen und in sterilem Zellkulturmedium (RPMI 1640 Gibco) mit Zusätzen (10% FCS, L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin) auf Eis gelegt. Die unteren Extremitäten wurden von Haut befreit, großzügig mit Teilen des Beckens entfernt und in sterilem PBS auf Eis gelegt. Durch die Technik der Präparation sollte vermieden werden, daß die Röhrenknochen schon vorzeitig geöffnet wurden. In einer Schale mit 70 % Alkohol wurden die Knochen mit Hilfe eines Skalpells von den umgebenden Muskeln befreit und wieder in steriles PBS auf Eis gelegt. Mit sterilem

Besteck wurden Femur und Tibia an beiden Enden geöffnet und das Knochenmark mit einer 1 ml Spritze steril in eine vorbereitete Petrischale mit Zellkulturmedium gespült. Die Zellen wurden zwei mal in Medium mit 1 % FCS gewaschen und mit je 400 g, 10 min. bei 10°C abzentrifugiert. Zuletzt wurden die Zellen zur i.v. Applikation in Medium (RPMI 1640, Gibco) ohne Zusätze aufgenommen. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und anschließend auf die Endkonzentration von 50×10^6 Zellen pro ml Knochenmarkzellsuspension eingestellt.

3.2.2 Gewinnung der Milzzellen:

GvHD wird durch eine Kombination von CD4 und CD8 T-Zellen ausgelöst, die in ausreichender Menge transplantiert werden müssen. Da die Zahl der T-Zellen im Knochenmark der Maus (1-2%) im Vergleich zum Menschen gering ist, muß für dieses Tiermodell der GvHD die Konzentration von T-Zellen durch Zugabe von Milzzellen erhöht werden.

Die Milz wurde, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, entnommen und in sterilem Zellkulturmedium auf Eis gelegt. Sie wurde in einer Petrischale durch einen Maschenfilter homogenisiert, über einen sterilen Filter mit 100µm Porengröße gegeben und anschließend einmal in Medium gewaschen. Nach Abnehmen des Überstands wurden 3-5 ml lysierender Puffer auf das Pellet gegeben, welcher nach 3 min. Inkubation bei Raumtemperatur mit Medium mit 10% FCS verdünnt wurde. Nun wurden die Zellen zweimal in Medium mit 10% FCS gewaschen und mit je 400g, 10 min. bei 10°C zentrifugiert. Wie oben beschrieben, wurde die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt und auf eine Endkonzentration von 500×10^6 Milzzellen pro ml eingestellt. Der Milzzellsuspension wurde 5µl Heparin (Vetren®, 100IE/ml) pro ml Suspension zugegeben.

3.2.3 Transplantation:

In eine Tuberkulinspritze wurde zunächst 0,1 ml zusatzfreies RPMI 1640-Medium luftblasenfrei vorgelegt. In dieselbe Spritze wurden nacheinander 200 µl Knochenmarksuspension (10×10^6 Knochenmarkzellen) und 200 µl Milzzellsuspension (100×10^6 Milzzellen) aufgezogen. Es wurden insgesamt 0,5 ml Volumen i.v.

luftblasenfrei in die Schwanzvene der unter Rotlicht gewärmten Empfängermause appliziert.

3.3 Sektion der Mäuse und Fixierung der Organe

Mäuse wurden in Äther bis zum Atemstillstand narkotisiert, dann wurde das Fell mit 70 % Alkohol befeuchtet und das Tier schließlich durch Herzpunktion entblutet. Von den Blutproben wurde ein automatisches Differentialblutbild angefertigt. Die Milz wurde in steriles Zellkulturmedium auf Eis gegeben, um sie für die FACS Analyse aufarbeiten zu können. Die für die Histologie eingeplanten Organe wurden entnommen, in die mit Einbettmedium gefüllten Aluminiumförmchen gelegt und nach ca. 5 min. eingefroren. Dazu wurde flüssiger Stickstoff in ein Dewar Gefäß mit Metallblöcken als Kälteleiter gegeben. Die Förmchen wurden nun auf diese Metallblöcke (ca. -60°C) gestellt, bis der Inhalt zu einem Block durchgefroren war. Diese tiefen Temperaturen sind erforderlich, um die Bildung von Eiskristallen im Gewebe zu verhindern.

3.4 Durchflußzytometrie der Milzzellen

Die Milz jeder Maus wurde als einzelne Probe behandelt und in einer Petrischale durch ein Maschenfilter homogenisiert. Das Homogenat wurde durch ein Sieb (Cell strainer Falcon, Porengröße 100µm) gegeben und in 50ml Röhrchen 10min bei 400g und 10°C zentrifugiert, dekantiert und wieder in 5ml Medium aufgenommen. In ein 15ml Röhrchen wurde 5ml Lympholyte®-M, ein Ficoll für Mauszellen (Cedarline®, Hornby, Ontario, Kanada), vorgelegt und die Milzzellsuspension vorsichtig darüber geschichtet. Die anschließende Zentrifugation erfolgte 20min bei 1500g und 22°C. Die lymphozytenhaltige Interphase wurde mit einer Pasteurpipette entfernt und in ein neues Röhrchen transferiert, mit Medium verdünnt und 10min bei 800g und 20°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zwei mal mit Medium gewaschen und jeweils 10min bei 450g und 20°C zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt und die Suspension auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

In FACS-Röhrchen wurden nun 10µl Antikörper vorgelegt, 100µl Zellsuspension zugegeben und 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zellen wurden im Anschluß zweimal mit PBS gewaschen und 5min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Zum Schluß wurde der Überstand abgekippt, das Pellet aufgeschüttelt und die FACS-Analyse (Fluoreszenz-aktivierter Cell Sorter) durchgeführt.

3.5 Herstellung von Gefrierschnitten

Für das Anfertigen der Gefrierschnitte konnte freundlicherweise ein Gefriermikrotom der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Universitätsklinik Tübingen in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Marlies Knipper verwendet werden. Die auf Trockeneis transportierten Organblöcke wurden auf Präparatehalter plaziert und mit Hilfe von Einbettmedium in der Kammer des Gefriermikrotoms auf die Halter gefroren. Bei einer Kammertemperatur von -25°C und Objekttemperaturen von -10°C (Leber) bis -15°C (Ileum) wurden Schnitte mit der Dicke von 6 µm bis 10 µm angefertigt. Diese wurden auf elektrostatisch vorbehandelte Objektträger (Superfrost/Plus) aufgenommen und mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgte die Fixierung der Schnitte 8 min in 4°C kaltem Aceton. Nach kurzem Trocknen wurden die Objektträger in Aluminiumfolie eingewickelt und bei -20°C bis zur Färbung gelagert.

3.6 Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten

Die ABC Immunperoxidase Technik wurde zuerst von Hsu et al. beschrieben (Hsu et al., 1981). Der große Vorteil dieser Technik liegt in ihrer hohen Sensitivität durch den Verstärkereffekt des großen ABC Komplexes. Außerdem bleicht die Färbung im Gegensatz zur Immunfluoreszenz nur langsam aus. Bei dieser Methode, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, werden monoklonale Antikörper benutzt, um die gewünschten Moleküle auf Zelloberflächen zu markieren. Nach Entfernen des nichtgebundenen primären Antikörpers durch Waschen erfolgt die Inkubation mit einem zweiten Antikörper (monoklonal oder polyklonal), der gegen den Erstantikörper

gerichtet und mit mehreren Biotinmolekülen gekoppelt ist. An diese Biotinmoleküle bindet in einem nächsten Schritt ein Komplex aus Streptavidin und biotinylierter Peroxidase. Im folgenden Schritt katalysiert die Peroxidase unter Zugabe von H_2O_2 die Umwandlung des zugegebenen Substrates 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) zu einem farbigen Pigment (rot).

In allen Färbungen wurde 3%iges Serum in PBS zur Vorinkubation wie von Hsu beschrieben (Hsu et al., 1981) angewendet, um eventuelle unspezifische Hintergrundfärbungen zu verhindern. Die Verdünnung des Erstantikörpers wurde mit 1:100 aufgrund von Hersteller (PharMingen) - und Literaturangaben (Korngold and Sprent, 1987b; Streeter et al., 1988) gewählt. Es wurden verschiedene Zweitantikörper auf unspezifische Färbung getestet, und schließlich die unter Punkt 2.6 genannten Antikörper ausgewählt. Zweitantikörper wurden in verschiedenen Verdünnungen (1:50, 1:100, 1:200) getestet. Da kein deutlicher Unterschied im Färbeverhalten auffiel, wurde die Verdünnung 1:50 für alle weiteren Färbungen gewählt, da mit dieser Konzentration bereits Vorversuche in unserer Gruppe durchgeführt wurden. Durch Zugabe von 1% BSA (Bovine Serum Albumin) zur Zweitantikörperverdünnung konnten unspezifische Färbungen weiter verhindert werden. Es wurde außerdem getestet, ob Streptavidinperoxidase ohne vorherige Inkubation der Gefrierschnitte mit biotinyliertem Zweitantikörper, an Gewebsstrukturen bindet. Es kam dabei zu keiner Anfärbung.

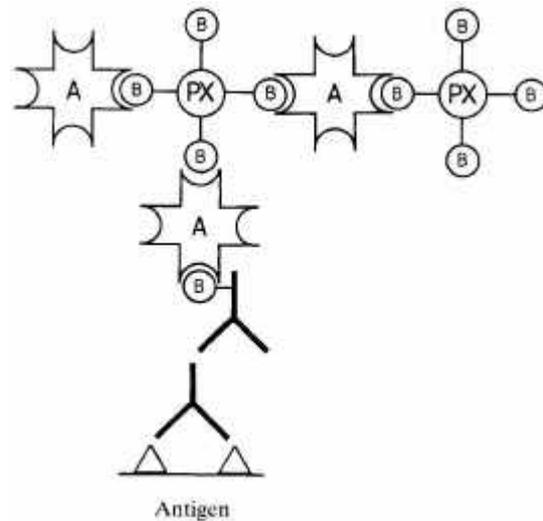


Abb.1: Bei der ABC-Methode wird ein Avidin(A)-Biotin(B)-Peroxidase(PX)-Komplex an einen biotinylierten (B) primären oder sekundären Antikörper unter Ausnützung der Affinität von Avidin zu Biotin gebunden. Die Peroxidase wird histochemisch nachgewiesen. Da mehrere Komplexe binden können, kann die Peroxidaskonzentration am Ort des Antigens gesteigert werden. (Abbildung nach Romeis – Mikroskopische Technik 17. Aufl., S. 258)

Die Färbung wird bei Raumtemperatur durchgeführt:

1. Objektträger auftauen
2. Schnitte mit dem ImmunoPen umranden, um Antikörperverdünnungen auf dem Präparat zu halten.
3. 10 min in PBS waschen
4. Objektträger in eine feuchte Kammer transferieren und 30 min mit 3 % Ziegen Serum bzw. Kaninchenserum in PBS inkubieren.
5. Serum kurz mit PBS abwaschen
6. 50-80 µl Erstantikörper (1:100 in PBS verdünnt) 45 min bei Raumtemperatur inkubieren.
7. 10 min in PBS waschen
8. 50-80 µl biotinylierter Zweitantikörper (1:50 in PBS mit 1% BSA verdünnt) 45 min bei Raumtemperatur inkubieren.
9. 10 min in PBS waschen
10. 50-80 µl Streptavidin-Peroxisdase (1:200 in PBS) verdünnt für 45-60 min bei

Raumtemperatur inkubieren.

11. 10 min in PBS waschen
12. Substratlösung auf die Objekte geben. Objektträger auf ein weißes Blatt Papier legen und Farbreaktion beobachten. Inkubationszeit ca. 8-15 min
13. Reaktion in PBS stoppen
14. Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun
15. Objekte mit erwärmter Glycerin-Gelatine eindecken
16. Objektträger reinigen und Deckglas mit Nagellack versiegeln

3.7 Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten

- 1-9. Schritte 1-9 werden durchgeführt wie sie bereits unter 3.6 beschrieben wurden.
10. 50-80 µl z.B. FITC-markierte Streptavidin-Peroxidase (1:200 in PBS) verdünnt für 45-60 min bei Raumtemperatur im Dunkel inkubieren.
11. 2 x 10 min im Dunkeln mit PBS waschen.
12. mit Citifluor® eindecken. Citifluor bleibt flüssig. Bis zur Betrachtung am Mikroskop Objekte im Dunkeln und evtl. bei 4°C aufbewahren.

3.8 Kontrollfärbungen

Als Negativkontrollen wurden bei jeder zu färbenden Charge mehrere Schnitte verwendet. Der Erstantikörper wurde durch PBS ersetzt und ansonsten gleich wie die regulär gefärbten Schnitte weiterbearbeitet. Auftretende unspezifische Färbung führte zur Nichtberücksichtigung bzw. zu einer erneuten Färbung der gesamten Charge.

3.9 Semiquantitative Beurteilung der gefärbten Schnitte

Positiv gefärbte Gewebsstrukturen (Substrat AEC, rot) wurden in den Schnitten nach der Häufigkeit ihres Vorkommens bewertet. Es erfolgte eine semiquantitative Einteilung in keine, schwache, mittlere oder starke Expression. Dabei wurden von jedem Organ pro Antikörper zwei Schnitte gefärbt, die beide betrachtet, in multiplen Bildausschnitten bewertet und zu einer Aussage zusammengefaßt wurden. Ein zweiter unabhängiger Untersucher bewertete zusätzlich ca. 400/7000 Schnitte ein weiteres Mal. Der Expressionsgrad eines Adhäsionsmoleküles wurde dabei in einer Serie jeweils nur innerhalb eines Organs zu den verschiedenen Zeitpunkten bei allogenen und autologen Tieren, Strahlenkontrollen und naiven (nicht-transplantierten) Tieren und nur für den jeweils verwendeten Antikörper verglichen.

3.10 Digitale Bildverarbeitung

Eine Videokamera der Firma Kappa wurde an eine Multi-Control-Einheit (MCU-II) angeschlossen, welche mit einem Videomonitor (Sony KX-14 CP1) über einen RGB-Eingang verbunden wurde. Nach Installation einer Digitalisierungskarte in den vorhandenen Computer wurde das SVHS-Signal aus der MCU-Einheit direkt mit der Videodigitalisierungskarte des PC verbunden. Mit entsprechender Software konnte nun das von der Mikroskopkamera produzierte Signal direkt auf dem Computer mitbetrachtet und gespeichert werden.

Diese Technik ermöglichte eine hervorragende Archivierung und Katalogisierung der ca. 7000 für diese Arbeit angefärbten Gefrierschnitte. Mehrere Bilder können nebeneinander betrachtet und verglichen werden. Außerdem sind die Weiterverarbeitung und Nachbearbeitung der Bilder möglich. In zukünftigen Arbeiten kann an die Digitalisierung eine computergesteuerte Auswertung angeschlossen werden. Vor allem bei Fluoreszenzaufnahmen ist das Verfahren der digitalen Bildbearbeitung eine große Hilfe. Durch die Einstellmöglichkeiten an der MCU-Einheit kann das momentan verwendete Fluoreszenzpräparat auf dem Computermonitor lichtgetreu ausgeleuchtet und so abgespeichert werden.

Eine Nachbearbeitung der digitalen Bilder erfolgte mit Hilfe eines zusätzlichen Programmes in bezug auf Kontrast, Helligkeit, Ausrichtung des Bildes und farbliche Angleichung der Hintergründe. Dazu wurde das Programm Thumbs Plus 3.21g-R von Phillips Crews (Cerious Software Inc., USA) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Gewichtsverläufe nach Knochenmarktransplantation von Balb/cJ Mäusen

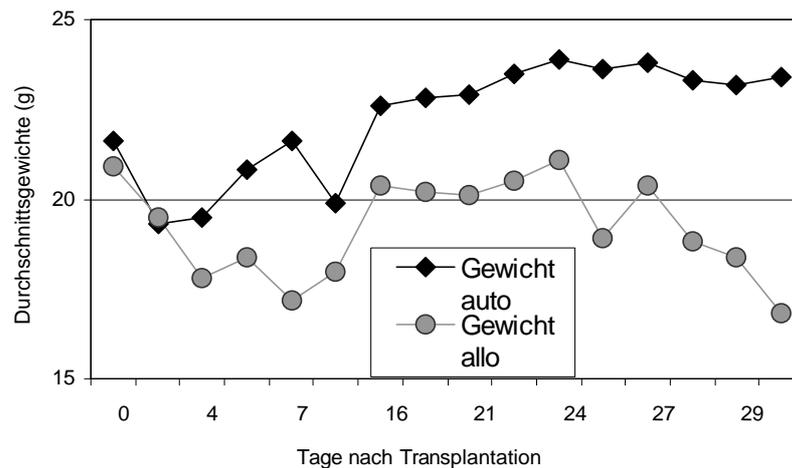


Abb.2: Gewichtsverläufe nach Knochenmarktransplantation von allogenen transplantierten (B10.D2 → Balb/cJ, Gruppenausgangsstärke n=34) bzw. autolog transplantierten (Balb/cJ → Balb/cJ, Gruppenausgangsstärke n=12) Mäusen. Durchschnittsgewichte sind aus zwei Experimenten gemittelt.

Die Gewichtskurven der Mäuse nach letaler Bestrahlung und anschließender Knochenmarktransplantation zeigten ein charakteristisches Muster. In den ersten Tagen, der Phase der Aplasie, nahmen sowohl autolog als auch allogene transplantierte Tiere an Gewicht ab. Durch das Anwachsen des Transplantats mit erneut einsetzender Hämatopoese verbesserte sich der Allgemeinzustand der Tiere, sie nahmen an Gewicht zu. Die autologe Gruppe nahm dabei stetig an Gewicht zu, während die allogene Gruppe durch die einsetzende GvHD ab Tag 26 erneut an Gewicht verlor.

4.2 Induktion makroskopischer GvHD

Die GvHD imponierte in den vorliegenden Experimenten klinisch durch Verlust des Fells. Erste Symptome traten an Tag 21 bei 10 von 16 Mäusen der allogenen

transplantierten Tieren an Hinterkopf und dorsalem Hals auf. An Tag 24 zeigten alle Tiere der allogenen Gruppe Anzeichen der GvHD. In den anschließenden Tagen setzte sich der Fellverlust über Hinterkopf und Hals an Rücken und Bauch der Tiere fort. Zusätzlich kam es an den felloosen Hautstellen zur Ausbildung von Erythemen, Hautabschuppungen und Läsionen, begleitet von einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes und von Gewichtsverlust.

4.3 Hämatopoetische Regeneration nach Knochenmarktransplantation

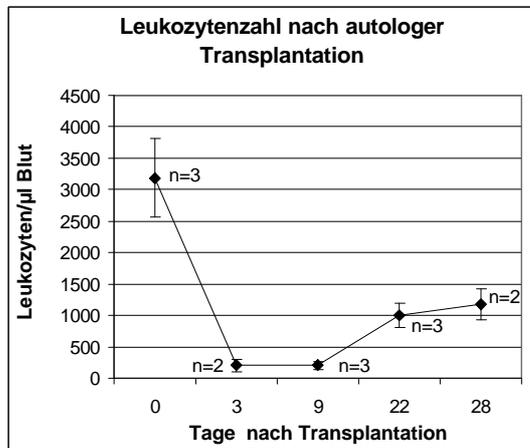


Abb.3: Leukozyten/µl Blut autolog transplantiertier Tiere. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

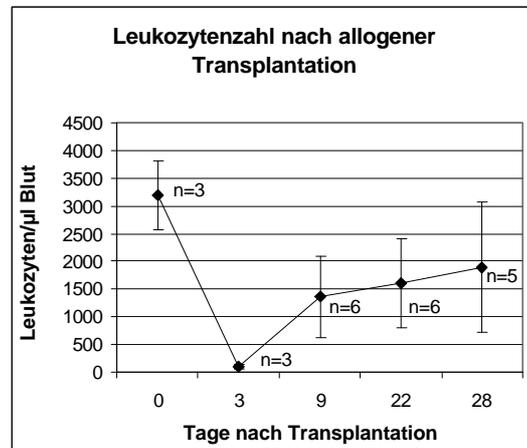


Abb.4: Leukozyten/µl Blut allogene transplantiertier Tiere. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

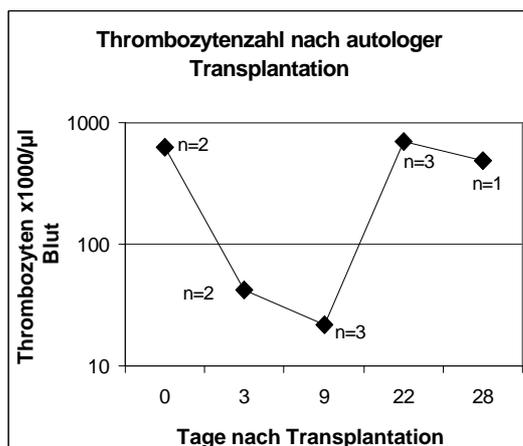


Abb.5: Thrombozyten $\times 10^3/\mu\text{l}$ Blut autolog transplantiertier Tiere. Angegeben sind Mittelwerte.

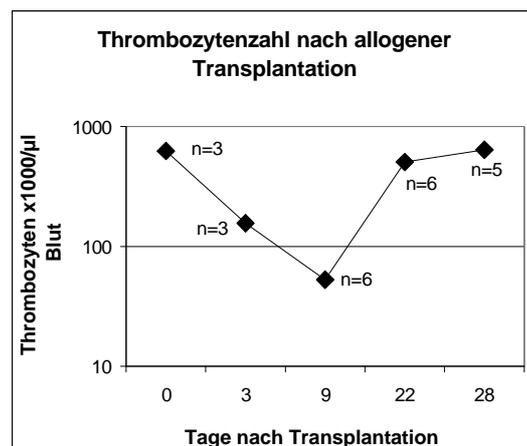


Abb.6: Thrombozyten $\times 10^3/\mu\text{l}$ Blut allogene transplantiertier Tiere. Angegeben sind Mittelwerte.

4.4 Durchflußzytometrische (FACS) Analysen von Milzzellen nach Knochenmarktransplantation

Im Folgenden sollte der zeitliche Verlauf der Regeneration einzelner Zellsubpopulationen nach autologer und allogener KMT untersucht werden. Es wurde Milz an Tag 9 und 22 nach Transplantation homogenisiert. Die mononukleären Zellen wurden nach Anreicherung über einen Dichtegradienten (Lympholyte) mit Einfach- oder Doppelmarkierung angefärbt und durchflußzytometrisch analysiert.

Aus dem Milzhomogenat wurde die Gesamtheit der zu untersuchden Lymphozyten über ihre Größe und Granularität ("forward sideward scatter") definiert. Angegebene Prozentzahlen bezogen sich auf Zellen in diesem sogenannten "Lymphozyten-Gate", bzw. Prozent der gezählten CD3+, CD4+ oder CD8+ Zellen.

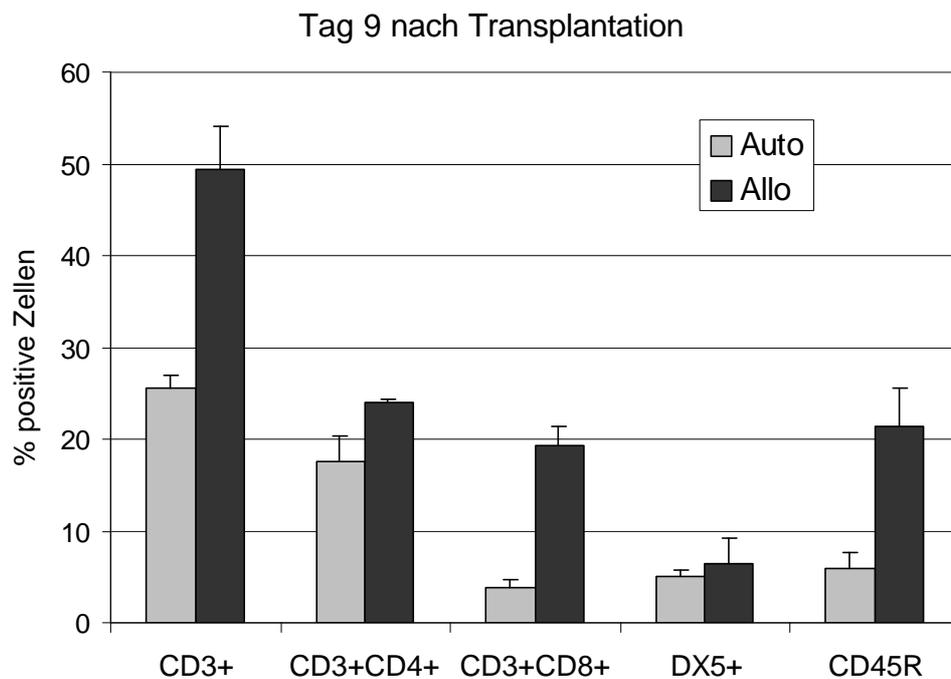


Abb.7: Prozent positive Zellen im Milzhomogenat bezogen auf das Lymphozyten-Gate. Angegeben sind Mittelwerte bei n=3 und Standardabweichungen. DX5 wurde als Marker für NK-Zellen, CD45R (B220) als Marker für B-Zellen verwendet.

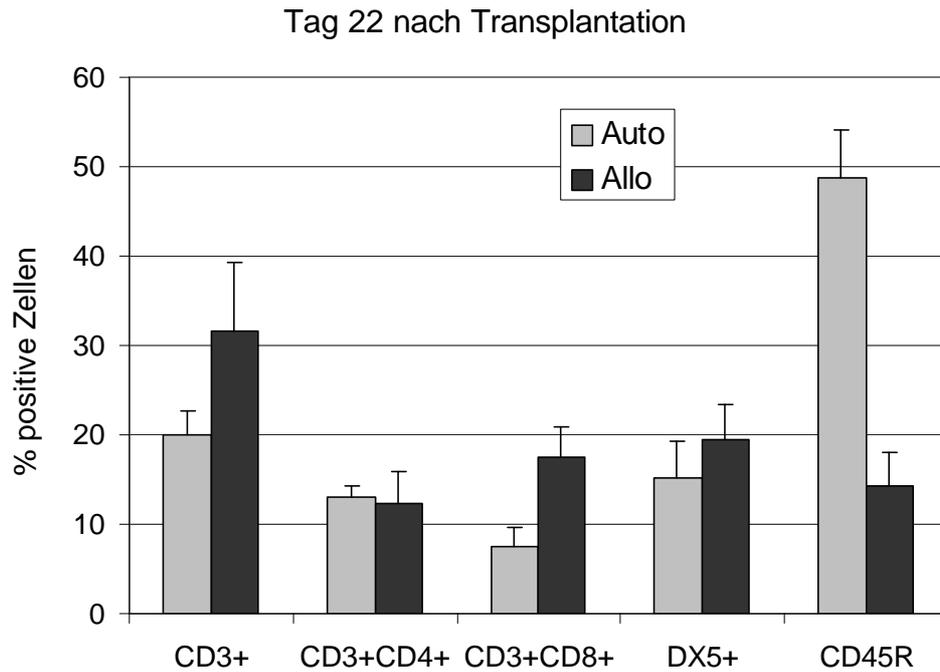


Abb.8: Prozent positive Zellen im Milzhomogenat bezogen auf das Lymphozyten-Gate. Angegeben sind Mittelwerte bei n=3, bzw. n=2 bei allo doppelpositiv für CD3+CD8+, allo DX5+ und allo CD45R. Angegeben sind weiterhin Standardabweichungen. DX5 wurde als Marker für NK-Zellen, CD45R (B220) als Marker für B-Zellen verwendet.

Expression von V β 3:

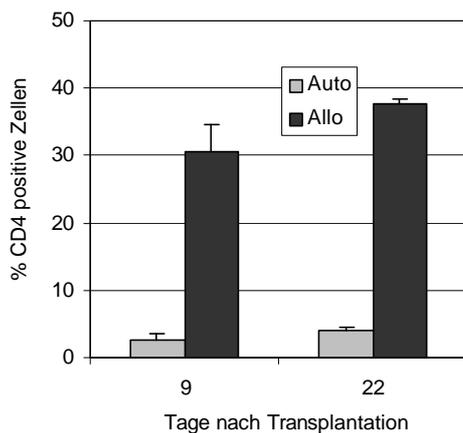


Abb.9: Prozent V β 3 positive Zellen im Milzhomogenat bezogen auf CD4 positive Zellen. Angegeben sind Mittelwerte bei n=3 an Tag 9, bzw.n=2 an Tag 22, und Standardabweichungen.

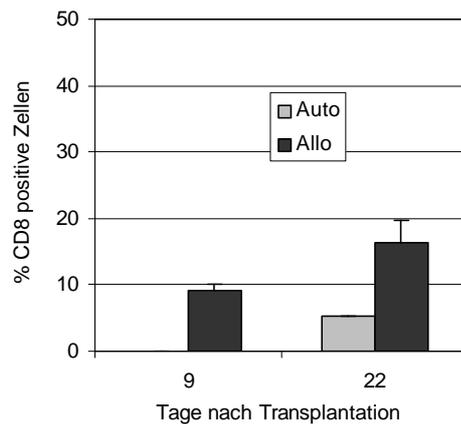


Abb.10: Prozent V β 3 positive Zellen im Milzhomogenat bezogen auf CD8 positive Zellen. Angegeben sind Mittelwerte bei n=3 an Tag 9, bzw.n=2 an Tag 22, und Standardabweichungen.

Expression von Ly9.1:

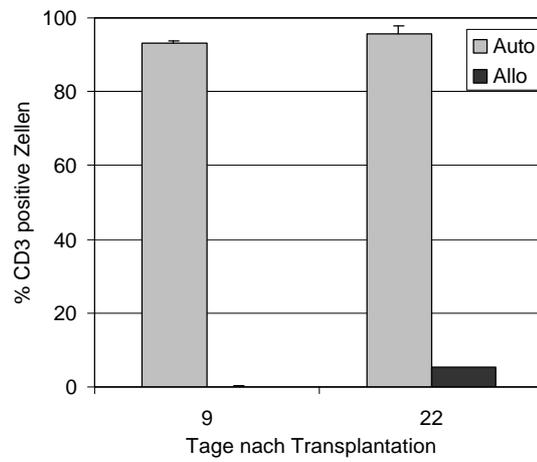


Abb.11: Prozent Ly9.1 positive Zellen im Milzhomogenat bezogen auf CD3 positive Zellen. Nur Balb/c Zellen tragen das Antigen Ly9.1 Die allogene Gruppe hat mit B10.D2 Zellen rekonstituiert. Angegeben sind Mittelwerte bei n=3, bzw.n=1 in der allogenen Gruppe an Tag 22, und Standardabweichungen.

4.5 Immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten des Ileum knochenmarktransplantiertter Mäuse

4.5.1 VCAM-1

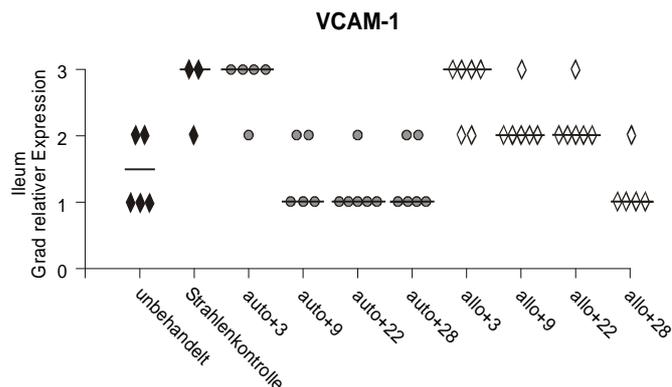


Abb.12: Immunhistochemische Färbung des Ileum. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

VCAM-1 wurde von Zellen in der Lamina propria, Submucosa und der Peyerschen Plaques des Darmes exprimiert. Bei unbehandelten Mäusen waren Zellen in den Peyerschen Plaques und in einzelnen Zotten immunreaktiv. An Tag 3 nach autologer sowie allogener Knochenmarktransplantation und auch in den Tieren der Strahlenkontrolle wurde VCAM-1 vermehrt exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt lagen in allen Zotten immunreaktive Zellen vor. Bei den allogenen transplantierten Tieren blieb die Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht, während in der autolog transplantierten Gruppe die Expression zum Ausgangsniveau zurückkehrte.

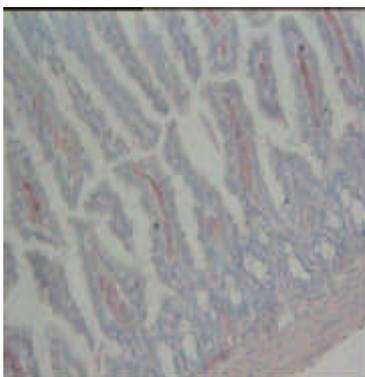


Abb.13: Ileum unbehandelt
Färbung: VCAM-1
10x Objektivvergrößerung

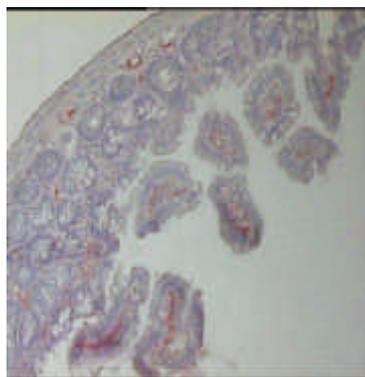


Abb.14: Ileum auto Tag 22
Färbung: VCAM-1
10x Objektivvergrößerung

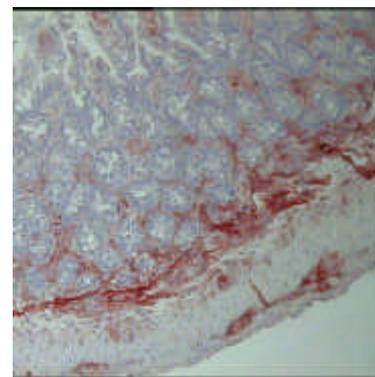


Abb.15: Ileum allo Tag 22
Färbung: VCAM-1
10x Objektivvergrößerung

4.5.7 CD8

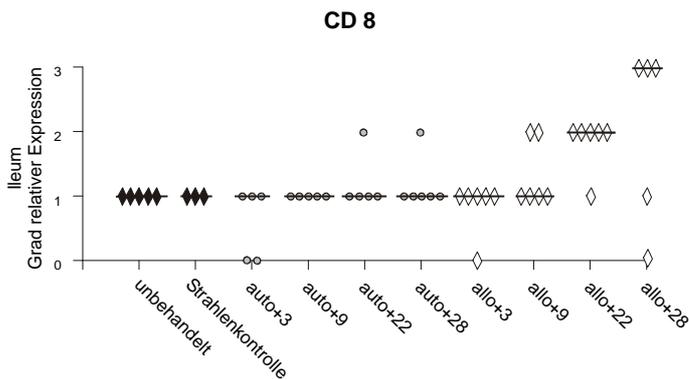


Abb.28: Immunhistochemische Färbung des Ileum. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

Insgesamt betrachtet lagen weniger CD8 als CD4 positive T-Zellen in der Lamina propria des Ileum vor. Auch an Tag 3 nach Transplantation verblieb eine schwache Expression in allen Gruppen. Ab Tag 22 stieg die Zahl der CD8 positiven T-Zellen in der allogenen transplantierten Gruppe deutlich an und erreichte an Tag 28 ihr Maximum.

4.5.8 B7-1

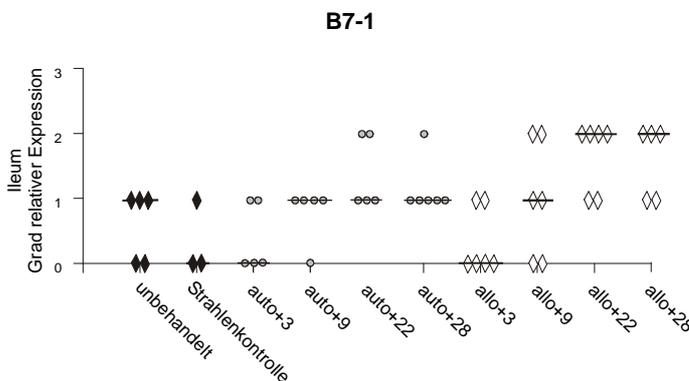


Abb.29: Immunhistochemische Färbung des Ileum. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

B7-1 wurde von Antigen-präsentierenden Zellen der Lamina propria und der Submucosa des Darmes exprimiert. Es fanden sich einzelne längliche Zellen mit Zellausläufern. B7-1 wurde im Ileum der allogenen Gruppe ab Tag 22 nach Transplantation leicht hochreguliert. Bei schwacher Expression (Grad 1) lagen die Zellen vereinzelt vor (ca. 2-5 positive Zellen pro Schnitt). Als mittlere Expression (Grad 2) wurde das Vorkommen von positiven Zellhaufen gewertet. Der Median der Expression verschob sich in der allogenen transplantierten Gruppe von einer schwachen Expression zu einer mittleren Expression

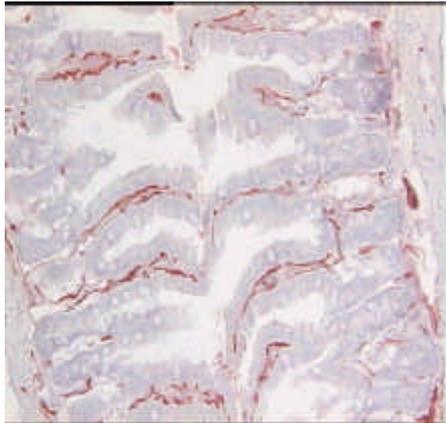


Abb.32: Ileum auto Tag 9
Färbung: PECAM-1
10x Objektivvergrößerung

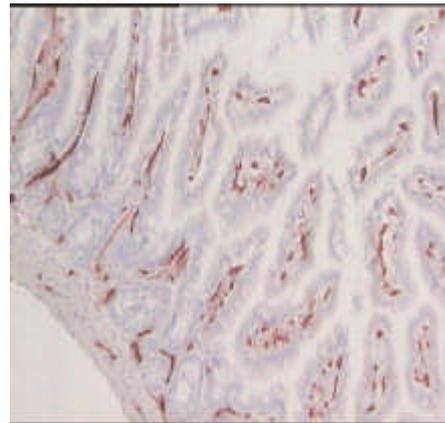


Abb.33: Ileum allo Tag 9
Färbung: PECAM-1
10x Objektivvergrößerung

4.5.11 E-Selektin

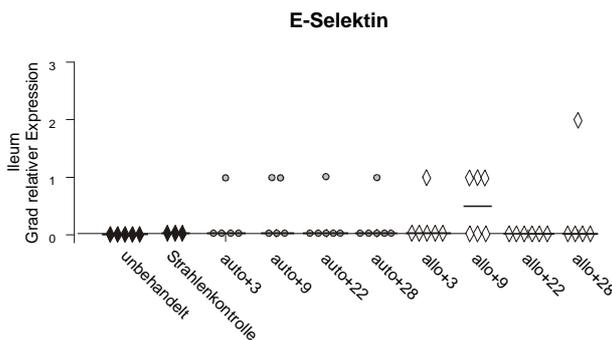


Abb.34: Immunhistochemische Färbung des Ileum. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

E-Selektin wurde in der vorliegenden Untersuchung nicht oder nur in Form von einzelnen positiven Zellen im Ileum der Maus vorgefunden.

4.5.12 MAdCAM-1

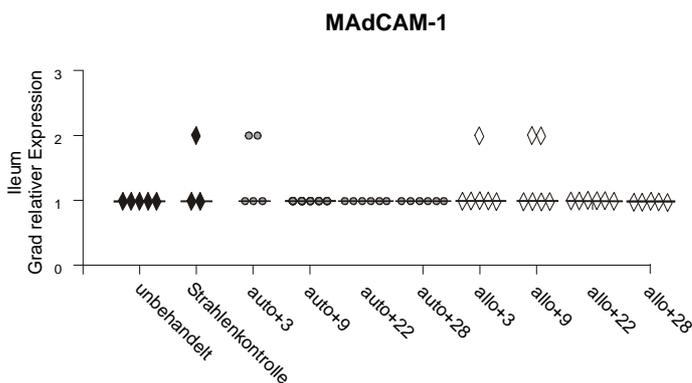


Abb.35: Immunhistochemische Färbung des Ileum. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

MAdCAM-1 wurde von hochendothelialen Venulen in der Lamina propria, den Peyerschen Plaques und in geringem Maße in der Tunica muscularis des Ileum exprimiert. Zu allen Zeitpunkten lag in allen Gruppen eine schwache Expression vor, die sich im Laufe der Untersuchung nicht ändert.

4.5.13 β 7-Integrin

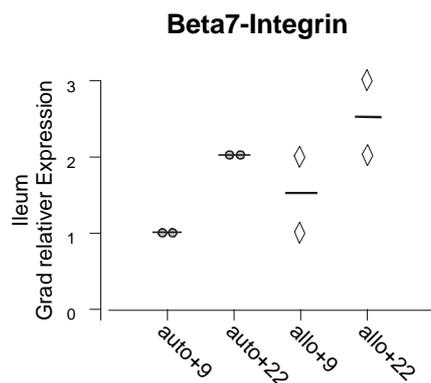


Abb.36: Immunhistochemische Färbung des Ileum. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet. Andere Zeitpunkte wurden nicht getestet.

In der Lamina propria des Ileum befanden sich immunreaktive Zellen für β 7-Integrin. In der autogenen Gruppe wurde β 7-Integrin im Bereich einer mittleren Expressionsstärke vorgefunden, die sich im zeitlichen Verlauf nicht änderte. Im Gegensatz dazu stieg die Expression in der allogenen transplantierten Gruppe ab Tag 22 stark an.

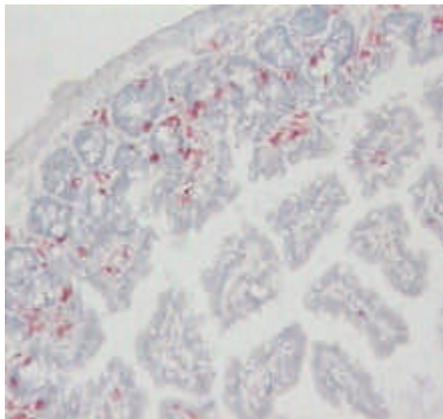


Abb.37: Ileum auto Tag 22
Färbung: β 7-Integrin
10x Objektivvergrößerung

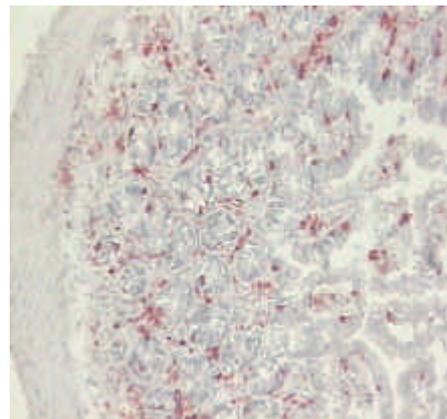


Abb.38: Ileum allo Tag 22
Färbung: β 7-Integrin
10x Objektivvergrößerung

4.6 Immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten des Colon knochenmarktransplantiertter Mäuse

4.6.1 VCAM-1

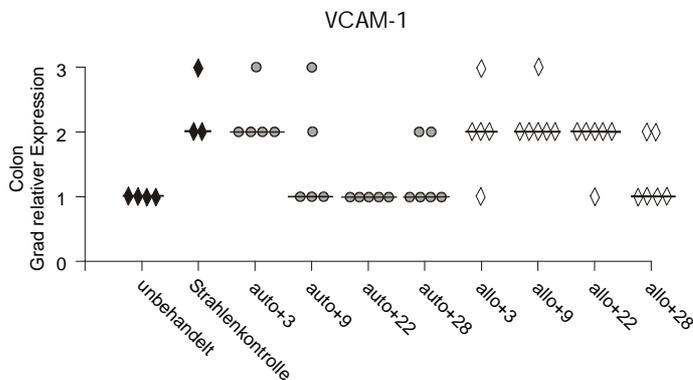


Abb.39: Immunhistochemische Färbung des Colon. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

Das sequentielle Expressionsmuster von VCAM-1 im Colon war ähnlich des im Ileum beobachteten Musters. Im Colon stieg die Expression an Tag 3 in Mäusen der Strahlenkontrolle, der autologen sowie der allogenen Gruppe an, wobei sie im Colon im Vergleich zu Ileum weniger deutlich ausfiel. Ab Tag 9 kehrte die Expression von VCAM-1 in der autologen Gruppe wieder auf den Ausgangswert einer schwachen Expression zurück, während die Expression in der allogenen Gruppe bis Tag 22 erhöht blieb und ab Tag 28 wieder absinkt.

4.6.2 ICAM-1

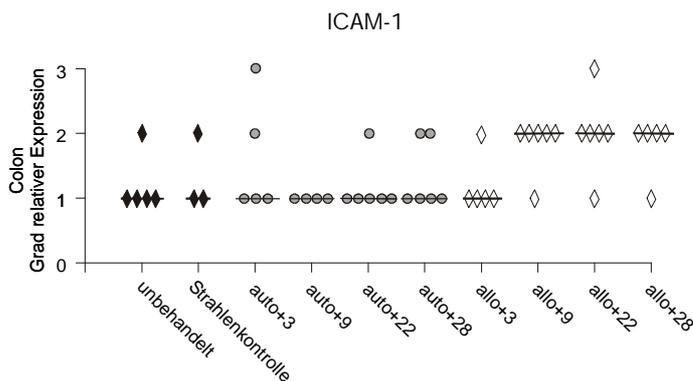


Abb.40: Immunhistochemische Färbung des Colon. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

Im Gegensatz zum Ileum blieb die Expression von ICAM-1 im Colon zu allen untersuchten Zeitpunkten in der autologen Gruppe sowie der Strahlenkontrolle auf einem niedrigen Niveau. In der allogenen transplantierten Gruppe stieg die Zahl der immunreaktiven Zellen ab Tag 9 auf eine mittlere Expressionsgrad an und verblieb dort bis zum Ende des Beobachtungszeitraums.

4.6.3 ICAM-2

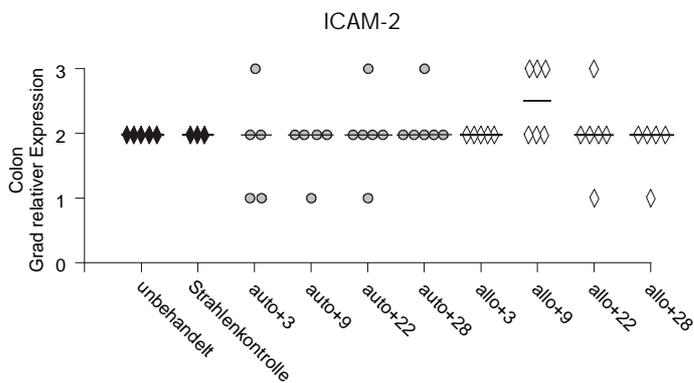


Abb.41: Immunhistochemische Färbung des Colon. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

Wie auch im Ileum wurde ICAM-2 im Colon konstitutiv exprimiert. Eine Kinetik der Expression in Abhängigkeit der Stammzelltransplantation war nicht zu beobachten.

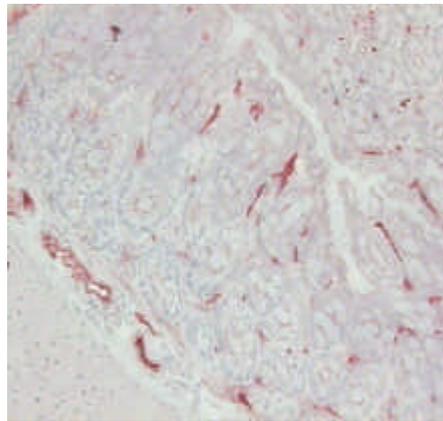


Abb.42: Colon allo Tag 22
Färbung: ICAM-2
10x Objektivvergrößerung

4.6.4 $\alpha 4$ -Integrin

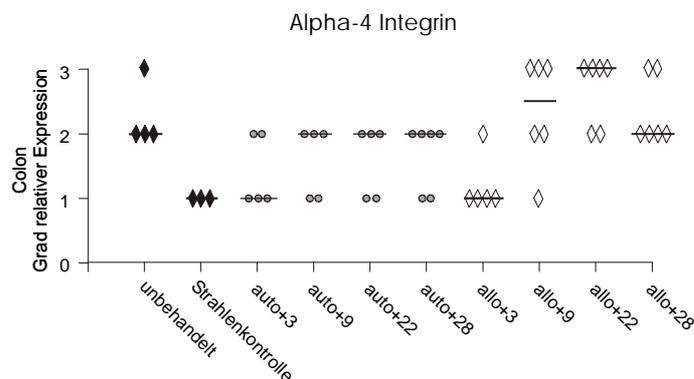


Abb.43: Immunhistochemische Färbung des Colon. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

Die Zahl der immunreaktiven Zellen in der Lamina propria des Colon nahm an Tag 3 in der Strahlenkontrolle, der autologen Gruppe sowie der allogenen Gruppe ab. Sie erholten sich bei den autolog transplantierten Tieren wieder ab Tag 9 und blieben auf

dem Niveau einer mittleren Expression bis Tag 28. In der allogenen Gruppe stieg die Zahl der immunreaktiven Zellen bereits ab Tag 9 über die der unbehandelten Gruppe an, um an Tag 28 wieder auf eine mittlere Expression abzusinken.

4.6.5 LFA-1

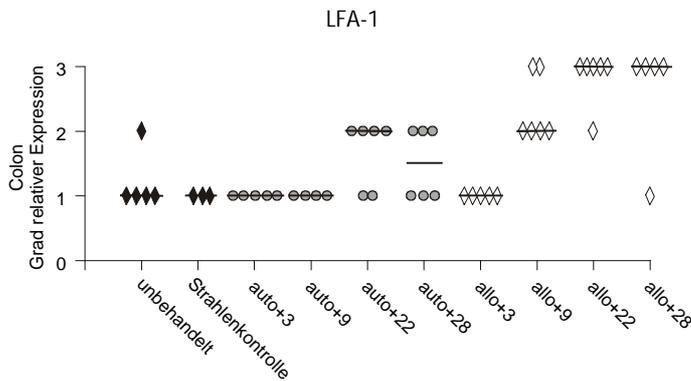


Abb.44: Immunhistochemische Färbung des Colon. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

LFA-1 positive Zellen lagen im Colon der unbehandelten Mäuse mit einer als schwach gewerteten Expression vor. In der autologen Gruppe stieg die Zahl der immunreaktiven Zellen ab Tag 9 auf eine mittlere Expression an. In der allogenen Gruppe stieg die Expression schon ab Tag 9 auf einen Wert an, der deutlich über dem Ausgangswert lag. An Tag 22 und Tag 28 nach Transplantation lag LFA-1 in der allogenen Gruppe stark exprimiert vor.

4.6.6 CD4

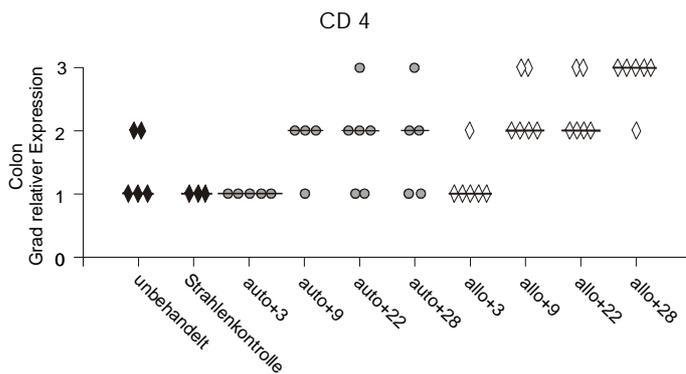


Abb.45: Immunhistochemische Färbung des Colon. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

CD4 positive Zellen lagen in der Lamina propria des Colon einer unbehandelten Maus mit einer schwachen Expression vor. In der autologen Gruppe stieg die Zahl der AEC gefärbten Zellen ab Tag 9 auf eine mittlere Expression an und verblieb dort bis Tag 28 nach Transplantation. Auch in der allogenen Gruppe stieg die Expression am Tag 9 und 22 auf eine mittlere Expression an und nahm an Tag 28 weiter zu.

4.6.11 E-Selektin

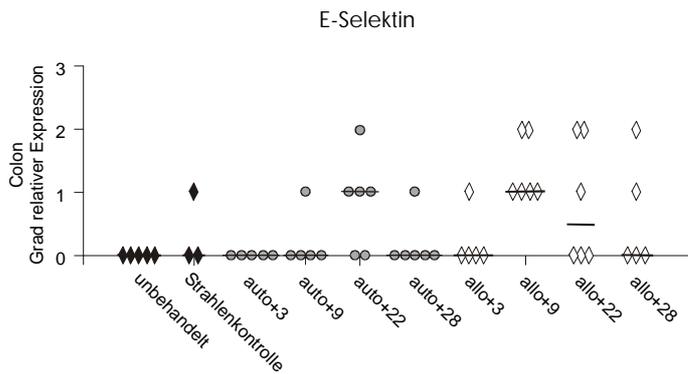


Abb.57: Immunhistochemische Färbung des Colon. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

E-Selektin wurde im Colon der unbehandelten Maus nicht exprimiert. An Tag 22 der autologen Gruppe und Tag 9 und 22 nach allogener Knochenmarktransplantation wurden vereinzelt immunreaktive längliche Zellen in der Submucosa vorgefunden.

4.6.12 MAdCAM-1

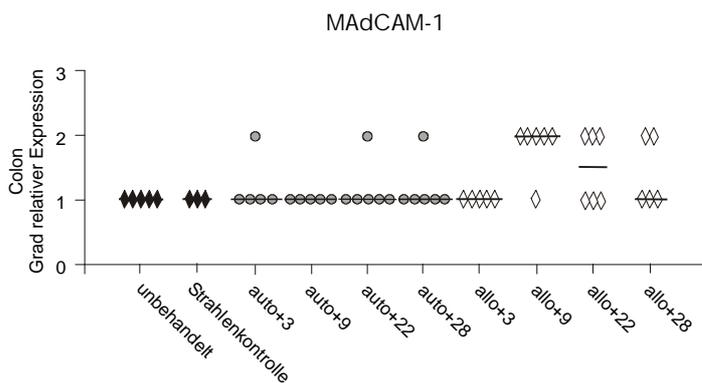


Abb.58: Immunhistochemische Färbung des Colon. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

Das Adressin MAdCAM-1 wurde im Colon schwach exprimiert. In der allogenen Gruppe stieg es an Tag 9 auf einen mittleren Expressionsgrad an und sankt bis Tag 28 wieder auf eine schwache Expression ab.

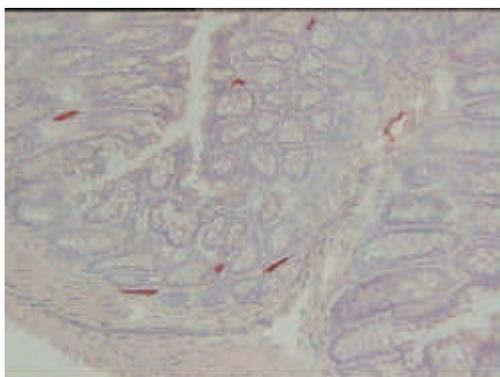


Abb.59: Colon auto Tag 9
Färbung: MAdCAM-1
10x Objektivvergrößerung

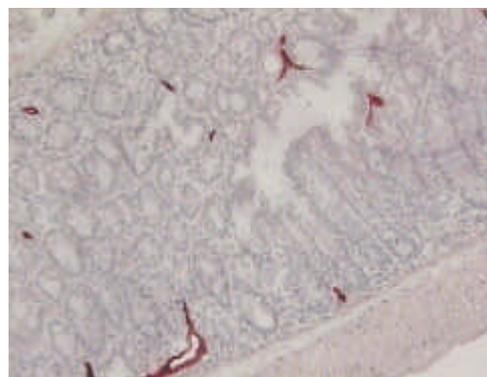


Abb.60: Colon allo Tag 9
Färbung: MAdCAM-1
10x Objektivvergrößerung

4.7 Immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten der Haut knochenmarktransplantiertter Mäuse

4.7.1 VCAM-1

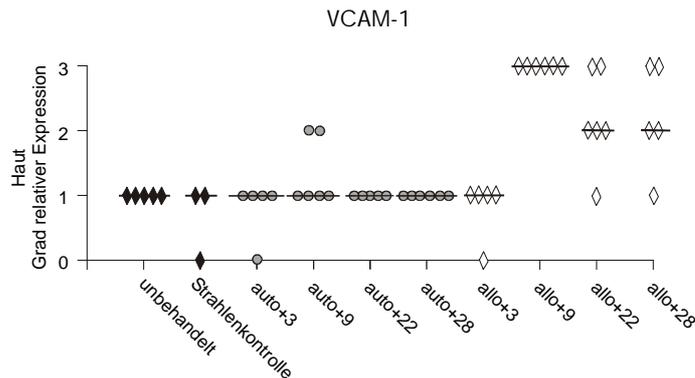


Abb.61: Immunhistochemische Färbung des Haut. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

VCAM-1 wurde in der Dermis und Subcutis der Haut schwach exprimiert. In der allogenen transplantierten Gruppe nahm die Zahl der positiven Zellen ab Tag 9 vor allem in der Dermis zu, und VCAM-1 wurde ab Tag 9 auch vereinzelt in der Epidermis exprimiert.

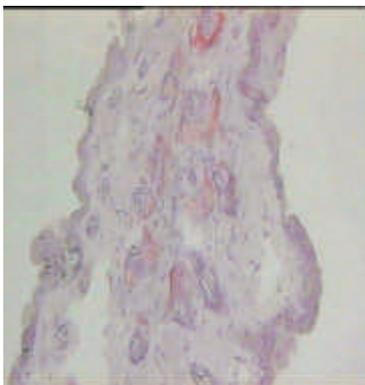


Abb.62: Haut unbehandelt
Färbung: VCAM-1
10x Objektivvergrößerung

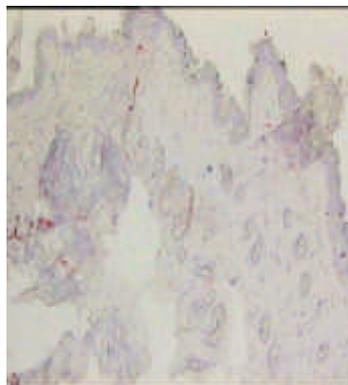


Abb.63: Haut auto Tag 9
Färbung: VCAM-1
10x Objektivvergrößerung

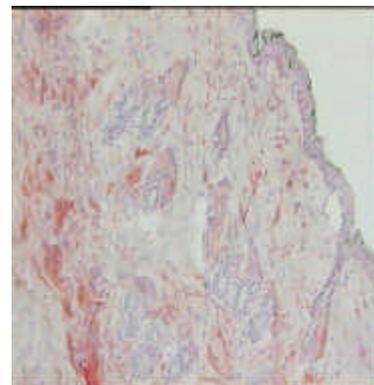


Abb.64: Haut allo Tag 9
Färbung: VCAM-1
10x Objektivvergrößerung

4.7.2 ICAM-1

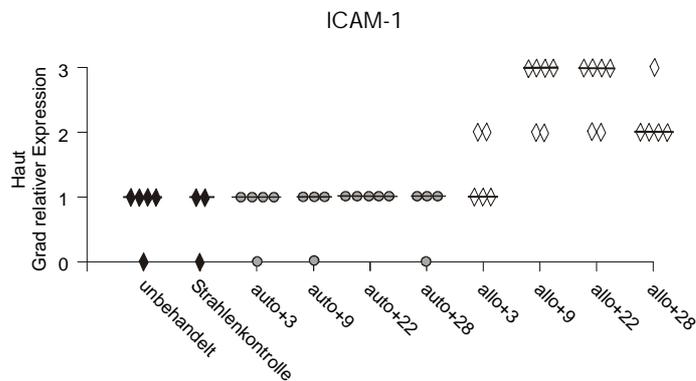


Abb.65: Immunhistochemische Färbung der Haut. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

ICAM-1 lag in der Dermis in Form von einzelnen, länglichen Zellen schwach exprimiert vor. In der allogenen Gruppe nahm die Expression ab Tag 9 deutlich zu. Die Zahl der immunreaktiven Zellen in der Dermis war im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen und den autolog transplantierten Mäusen in der allogenen Gruppe deutlich erhöht. Zusätzlich waren ab Tag 9 Keratinozyten der Epidermis immunreaktiv.

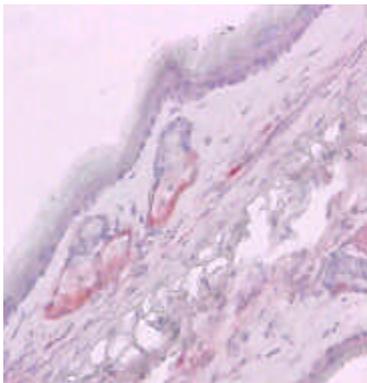


Abb.66: Haut unbehandelt
Färbung: ICAM-1
20x Objektivvergrößerung

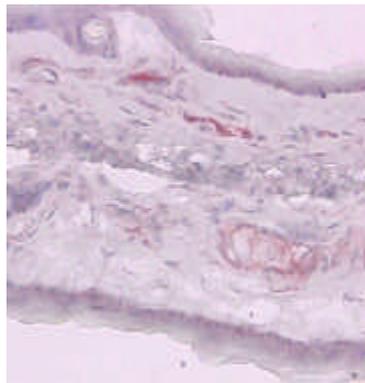


Abb.67: Haut auto Tag 28
Färbung: ICAM-1
20x Objektivvergrößerung

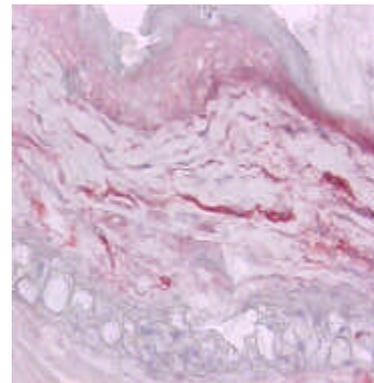


Abb.68: Haut allo Tag 28
Färbung: ICAM-1
20x Objektivvergrößerung

4.7.3 ICAM-2

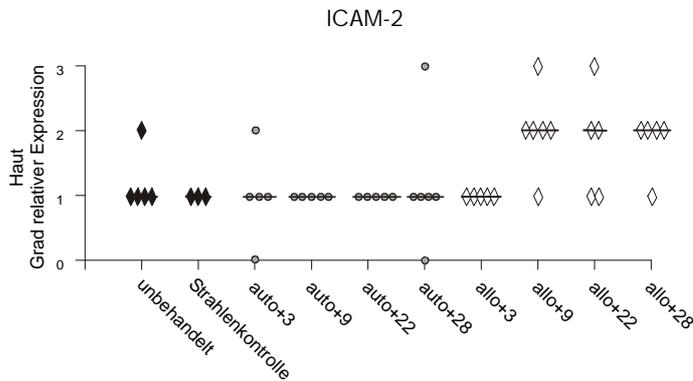


Abb.69: Immunhistochemische Färbung der Haut. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

ICAM-2 wurde vor allem in der Subcutis schwach exprimiert. Ab Tag 9 der allogenen Gruppe war ICAM-2 auch in der Dermis gefärbt und immunreaktive Zellen waren darüber hinaus in der Epidermis zu finden. Der Median der Expression stieg insgesamt in der allogenen transplantierten Gruppe ab Tag 9 von einer schwachen auf eine mittlere Expressionsgradeinteilung an.

4.7.4 α 4-Integrin

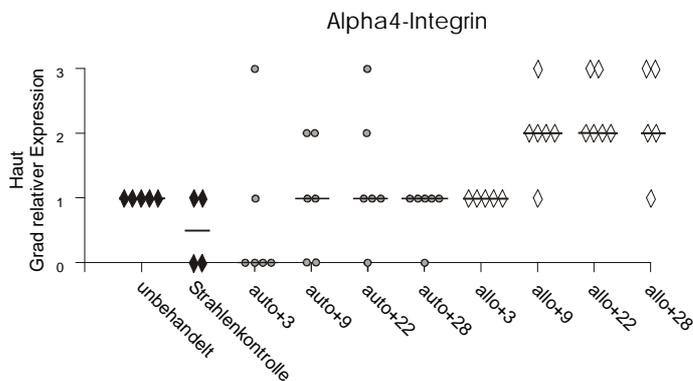


Abb.70: Immunhistochemische Färbung der Haut. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

In der Dermis wurden einzelne längliche und verzweigte Zellen für α 4-Integrin positiv gefärbt. In der Strahlenkontrolle sowie Tag 3 der autologen Gruppe sank die Expression ab, in einigen Schnitten konnten keine positiven Zellen mehr nachgewiesen werden. An Tag 9 der autologen Gruppe lag die Expression wieder konstant bei einer schwachen Expressionsstärke. In der allogenen transplantierten Gruppe nahm die Zahl der immunreaktiven Zellen ab Tag 9 zu und der Median der Expression verschob sich auf ein mittleres Niveau.

4.7.7 CD8

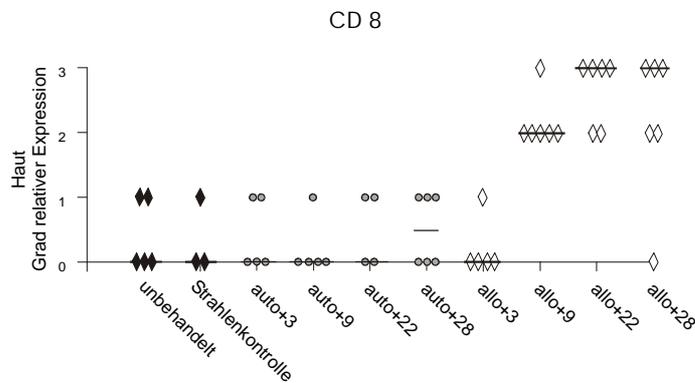


Abb.77: Immunhistochemische Färbung der Haut. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

CD8 positive Zellen lagen bei unbehandelten und autolog transplantierten Mäusen vereinzelt in der Dermis vor. Ab Tag 9 stieg die Zahl der CD8-positiven Zellen in der allogenen Gruppe stark an. Immunreaktive Zellen für CD8 waren ab Tag 9 in der Epidermis zu finden.

4.7.8 B7-1

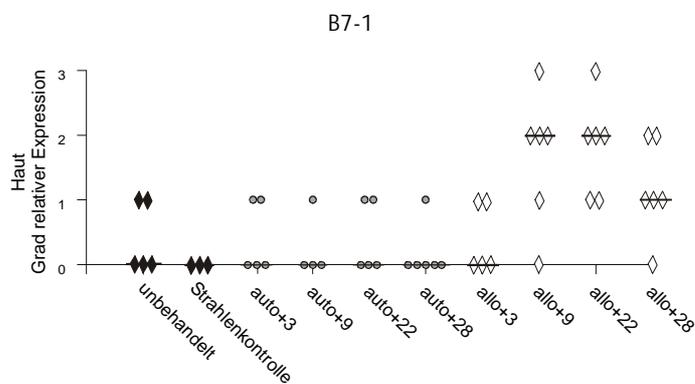


Abb.78: Immunhistochemische Färbung der Haut. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

In der Haut wurden in der gesamten autologen Gruppe und der allogenen transplantierten Gruppe an Tag 3 keine oder nur vereinzelt immunreaktive Zellen für B7-1 in der Dermis vorgefunden. Ab Tag 9 nach Transplantation nahm die Zahl positiv gefärbter Zellen in der allogenen transplantierten Gruppe deutlich zu. B7-1 positive Zellen waren ab Tag 9 nach allogener Transplantation sowohl in der Dermis als auch in der Epidermis zu finden.

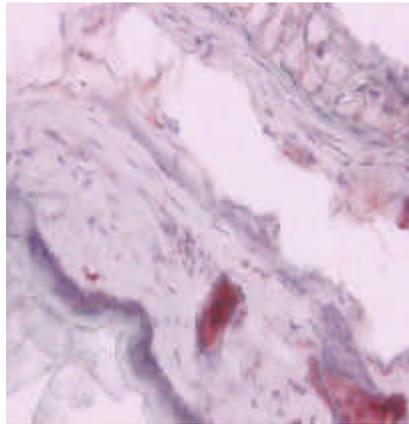


Abb.79: Haut auto Tag 22
Färbung: B7-1
20x Objektivvergrößerung

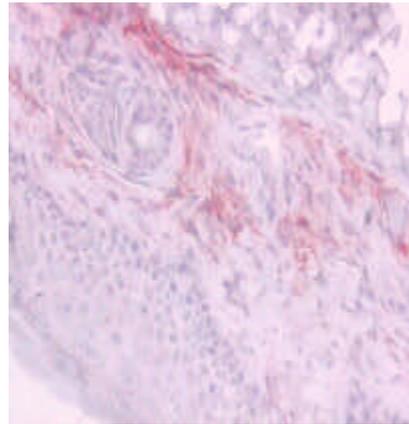


Abb.80: Haut allo Tag 22
Färbung: B7-1
20x Objektivvergrößerung

4.7.9 B7-2

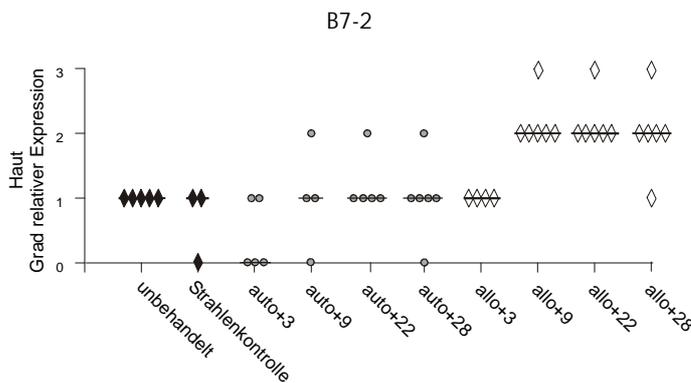


Abb.81: Immunhistochemische Färbung der Haut. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

In der Haut stieg die Expression ab Tag 9 nur in der allogenen Gruppe von einer schwachen auf eine mittlere Expressionsstärke an. Positiv gefärbte Zellen wurden ab Tag 9 der allogenen transplantierten Gruppe nicht nur in der Dermis sondern auch in der Epidermis beobachtet.

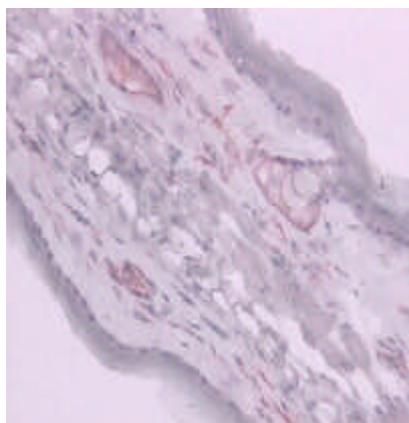


Abb.82: Haut auto Tag 22
Färbung: B7-2
20x Objektivvergrößerung

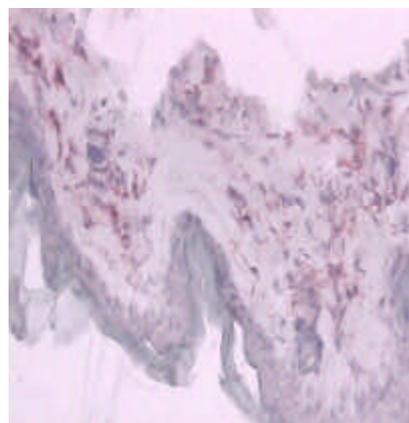


Abb.83: Haut allo Tag 22
Färbung: B7-2
20x Objektivvergrößerung

4.7.10 PECAM-1

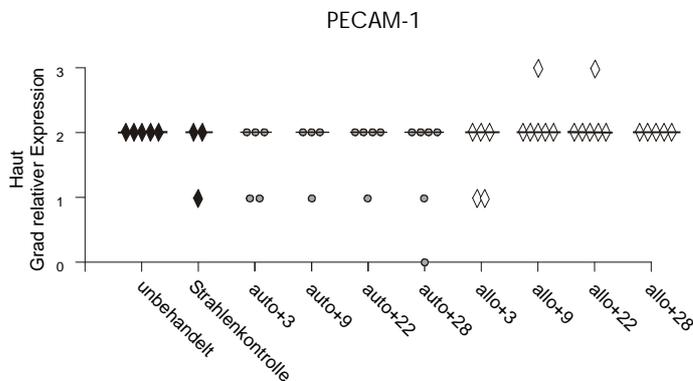


Abb.84: Immunhistochemische Färbung der Haut. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

PECAM-1 wurde auf Endothelzellen vor allem in der Subcutis, weniger in der Dermis der Haut exprimiert. Das Expressionsmuster blieb im gesamten Versuch konstant.

4.7.11 E-Selektin

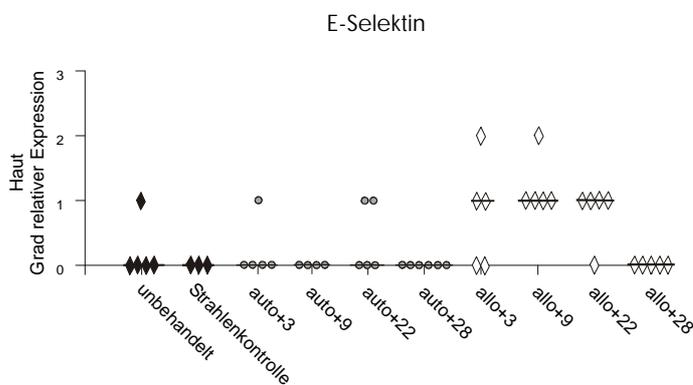


Abb.85: Immunhistochemische Färbung der Haut. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, untersucht zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

E-Selektin wurde in der Haut nicht oder nur vereinzelt exprimiert. Es gab keine deutliche Änderung des Expressionsmusters im Vergleich der unbehandelten mit transplantierten Tieren.

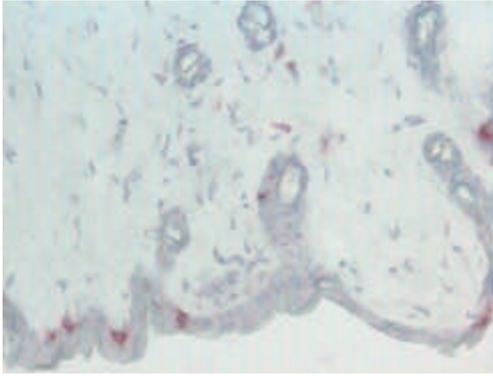


Abb.88: Haut allo Tag 3
Färbung: β -7 Integrin
20x Objektivvergrößerung



Abb.89: Haut auto Tag 28
Färbung: β -7 Integrin
60x Objektivvergrößerung

4.8.2 ICAM-1

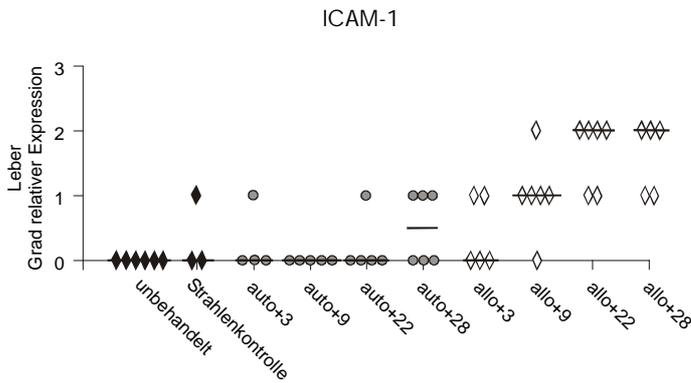


Abb.93: Immunhistochemische Färbung der Leber. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten untersucht. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

ICAM-1 war bei unbehandelten Mäusen und autolog transplantierten Mäusen nur bei einzelnen Tieren in Form von einzelnen Zellen in der Leber nachweisbar. In der allogenen Gruppe stieg die Expression an Tag 9 leicht an. Eine weitere Zunahme der Expression wurde an den Tagen 22 und 28 beobachtet. Immunreaktive Zellen traten im Endothel von Lebervenen (Pfeil Abb.95) und als reaktive Areale im Leberparenchym (Pfeil Abb.96) auf.



Abb.94: Leber auto Tag 22
Färbung: ICAM-1
10x Objektivvergrößerung

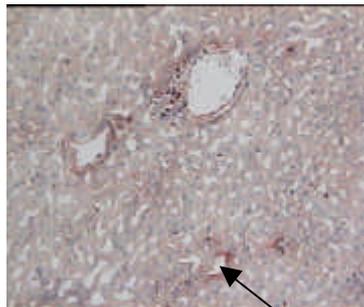


Abb.95: Leber allo Tag 22
Färbung: ICAM-1
10x Objektivvergrößerung

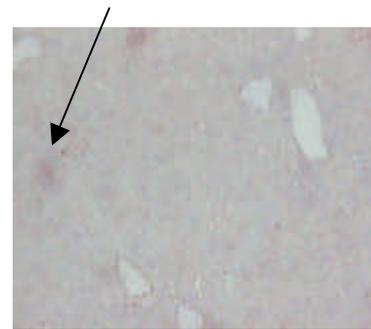


Abb.96: Leber allo Tag 22
Färbung: ICAM-1
10x Objektivvergrößerung

4.8.3 ICAM-2

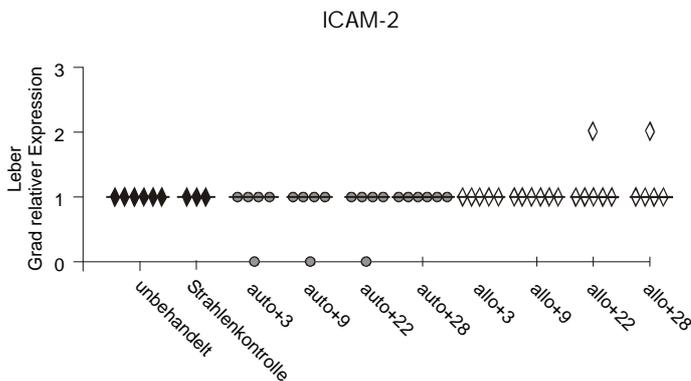


Abb.97: Immunhistochemische Färbung der Leber. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten untersucht. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

4.8.9 CD4

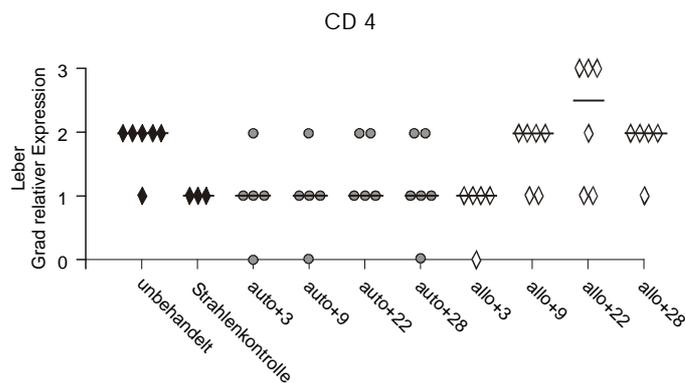


Abb.105: Immunhistochemische Färbung der Leber. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten untersucht. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

Immunreaktive Zellen für CD4 lagen einzeln im Leberparenchym und an Lebervenen vor. Die Expression fiel von einem mittleren Ausgangsniveau (unbehandelt) sowohl bei der Strahlenkontrolle, als auch den autolog sowie den allogenen transplantierten Tieren jeweils an Tag 3 auf ein schwaches Expressionsniveau ab. Ab Tag 9 nahm die Zahl der positiven Zellen der allogenen Gruppe wieder zu und erreichte den Ausgangswert der unbehandelten Kontrolle. An Tag 22 der allogenen Gruppe stieg der Wert über das Ausgangsniveau an. Bei starker Expression kamen vermehrt Lymphozytenaggregate an Blutgefäßen vor.

4.8.7 CD8

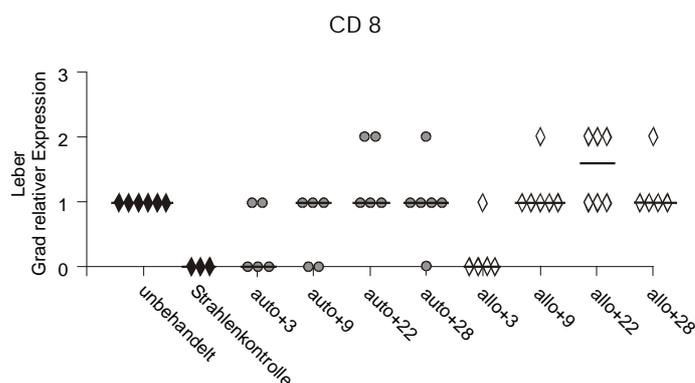


Abb.106: Immunhistochemische Färbung der Leber. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten untersucht. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

In der Leber lagen wesentlich weniger CD8 positive als CD4 positive Zellen vor. CD8 positive Zellen wurden vereinzelt im Leberparenchym der unbehandelten Maus vorgefunden. An Tag 3 nach Transplantation sank die Zahl der Zellen weiter ab und es konnten keine CD8 positiven Zellen mehr nachgewiesen werden. Ab Tag 9 wurden CD8 positive Zellen in der autologen Gruppe sowie der allogenen Gruppe wieder schwach exprimiert. An Tag 22 der allogenen Gruppe stieg die CD8 positive Zellpopulation weiter an.

4.8.8 B7-1

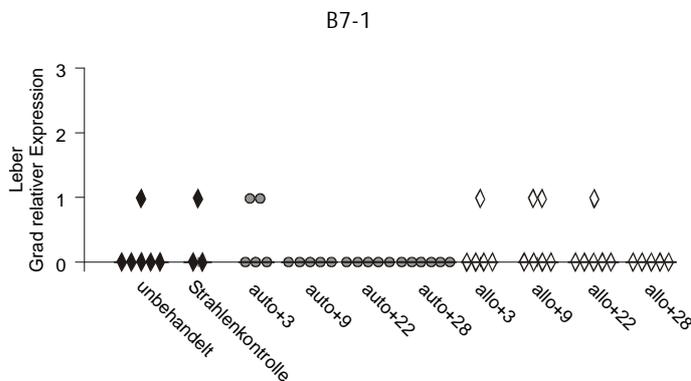


Abb.107: Immunhistochemische Färbung der Leber. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten untersucht. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

B7-1 positive Zellen wurden in der Leber nicht oder nur sporadisch exprimiert. Das Expressionsmuster änderte sich im Versuchsverlauf nicht.

B7-2

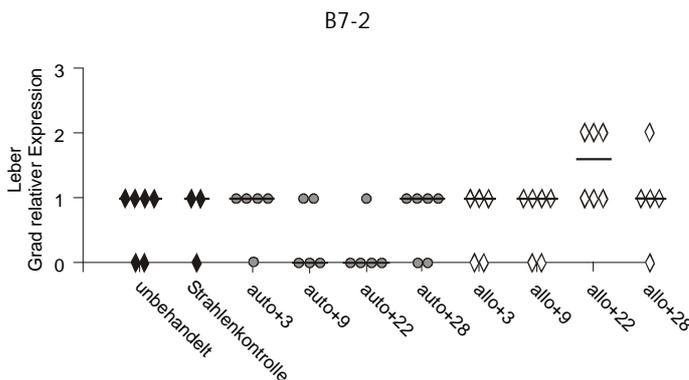


Abb.108: Immunhistochemische Färbung der Leber. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten untersucht. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

B7-2 wurde in der Leber schwach exprimiert, teilweise konnten keine immunreaktiven Zellen detektiert werden. B7-2 wurde in der immunhistochemischen Färbung als einzelne rot gefärbten Areale im Leberparenchym beobachtet, in denen Zellen nicht gegeneinander abgrenzbar waren. Nur in der allogenen transplantierten Gruppe stieg an Tag 22 die Zahl dieser immunreaktiven Gewebsareale an.

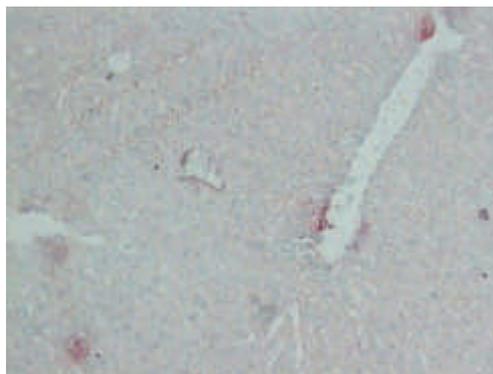


Abb.109: Leber allo Tag 22
Färbung: B7-2
10x Objektivvergrößerung

4.8.10 PECAM-1

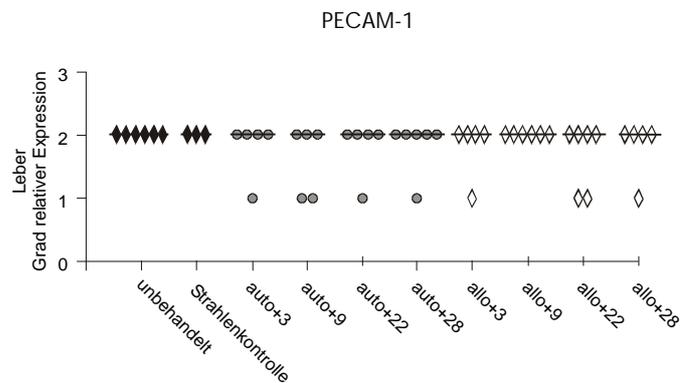


Abb.110: Immunhistochemische Färbung der Leber. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten untersucht. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

PECAM-1 wurde in der Leber konstitutiv exprimiert. Dabei waren sowohl das Endothel von Blutgefäßen als auch die Sinusoide immunreaktiv. Das Epithel der Gallengänge wurde hingegen nicht angefärbt.

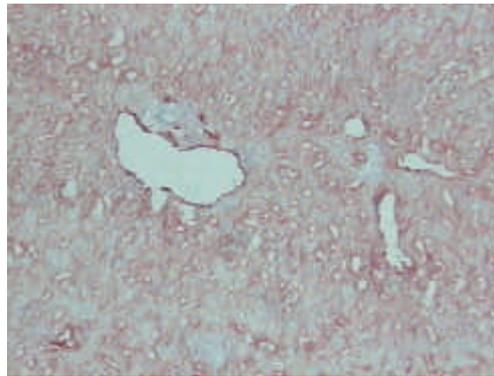


Abb.111: Leber allo Tag 22
Färbung: PECAM-1
10x Objektivvergrößerung

4.8.11 E-Selektin

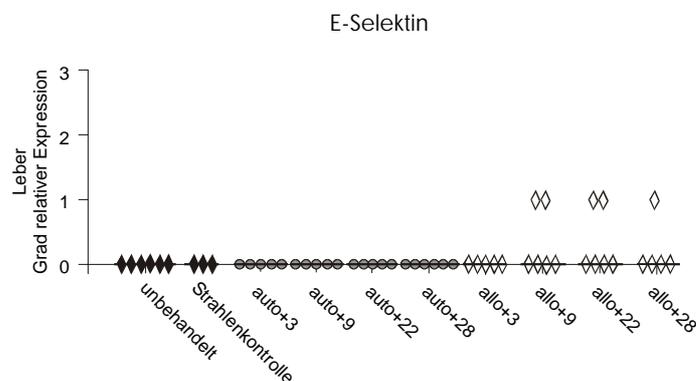


Abb.112: Immunhistochemische Färbung der Leber. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten untersucht. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

E-Selektin wurde in der Leber nicht exprimiert. In einzelnen Tieren der allogenen transplantierten Gruppe ab Tag 9 konnten vereinzelt positive Zellen in den Gefäßwand von Lebervenen gefunden werden.

4.8.12 MAdCAM-1

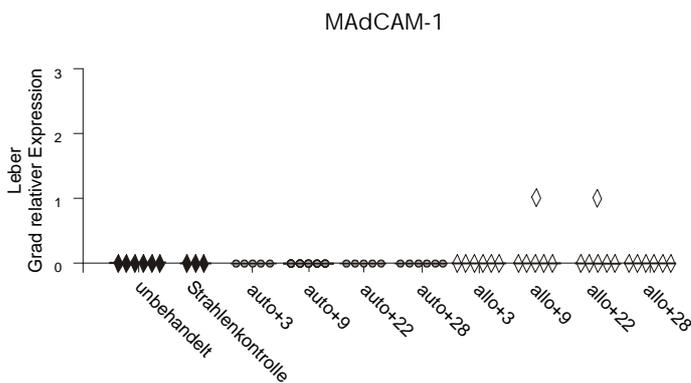


Abb.113: Immunhistochemische Färbung der Leber. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten untersucht. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

MAdCAM-1 wurde in der Leber nicht exprimiert. Bei zwei Tieren in der allogenen Gruppe waren wenige positive Zellen vorhanden.

β 7-Integrin

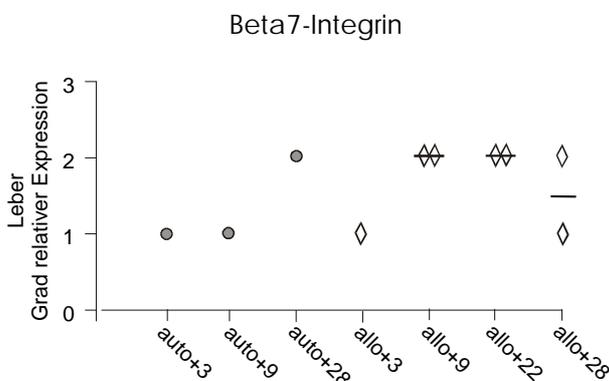


Abb.114: Immunhistochemische Färbung der Leber. Grad relativer Expression angegeben als: 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, zum angegebenen Zeitpunkt in zwei Gefrierschnitten untersucht. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet. Andere Zeitpunkte wurden nicht getestet.

Immunreaktive Zellen für β 7-Integrin wurden im Parenchym der Leber als einzeln liegende Zellen gefärbt. Im Vergleich zur autologen Gruppe stieg die Expression in der allogenen Gruppe ab Tag 9 von einem schwachen Nive auf ein mittleres Niveau an

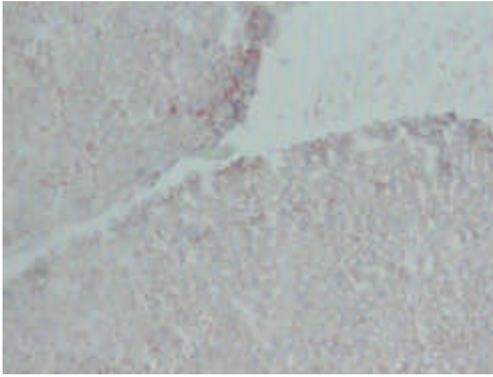


Abb.115: Leber auto Tag 3
Färbung: β 7-Integrin
10x Objektivvergrößerung

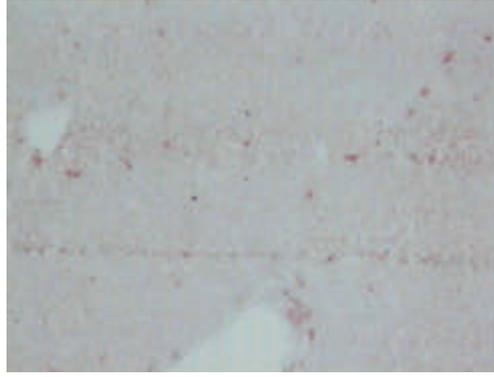


Abb.116: Leber allo Tag 22
Färbung: β 7-Integrin
10x Objektivvergrößerung

5 Diskussion

5.1 Hämatopoetische Regeneration nach Knochenmarktransplantation

Um die Regeneration der Hämatopoese nach Transplantation beurteilen zu können, wurde Vollblut der zum jeweiligem Zeitpunkt euthanasierten Mäuse mit dem Automaten Advia™120 untersucht. Beim Menschen folgt auf das Anwachsen des Knochenmarks normalerweise simultan die Rekonstitution der drei Blutzelllinien (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten), wobei die Thrombozyten typischerweise zuletzt die Normalwerte erreichen.

Zwischen Tag 3 und Tag 9 stiegen im allogenen Versuchsarm die Leukozytenzahlen von 107/ μ l (Mittelwert aus n=3) auf 1357/ μ l (Mittelwert aus n=6) an, während bei autolog transplantierten Tieren die Zahl der Leukozyten vergleichsweise langsam anstieg. In beiden Gruppen begann die Rekonstitution der Leukozyten zwischen Tag 3 und Tag 9 nach KMT, wobei keine der Gruppen bei Versuchsende den Ausgangswert vor KMT erreicht hat.

Die Thrombozytenzahlen fielen in beiden Gruppen bis Tag 9 ab. Die Rekonstitution setzte zwischen Tag 9 und 22 ein. An Tag 28 erreichte sowohl die autologe Gruppe als auch die allogene Gruppe die Ausgangswerte.

5.2 Durchflußzytometrische Analysen (FACS) des Milzzellhomogenats nach Knochenmarktransplantation

CD4⁺ T-Zellen dominierten zu einem frühen Zeitpunkt (Tag +9) über die Zahl der CD8⁺ Zellen. An Tag 9 übertraf die Zahl der CD4⁺ Zellen in der Milz allogenen transplantierten Tiere die der autolog transplantierten Tiere. An Tag 22 war jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu messen. Die Population der CD8⁺ Zellen im Milzhomogenat blieb bei allogenen transplantierten Mäusen über den Werten der autologen Kontrolltiere. Von diesen Ergebnissen in der Milz kann hingegen nur bedingt auf andere Organe geschlossen werden. Während der späteren Phasen GvHD ist die Milz

lymphopen, so daß die T-Zellzahlen in der Milz wahrscheinlich unter den Werten anderer Organe liegen. Typischerweise wird in von GvHD betroffenen Individuen eine Umkehr der CD4:CD8 Ratio (im peripheren Blut) beschrieben, die sich ebenfalls an Tag 22 in den vorliegenden Ergebnissen aus der Milz abzeichnete.

In der autologen Gruppe stieg die Zahl der B-Zellen (CD45/B220 positiv) von 6% an Tag 9 auf 49% an Tag 22 im Milzzellhomogenat an, während die Werte in der allogenen Gruppe von initial 21% an Tag 9 auf 14% an Tag 22 im Rahmen der GvHD abfielen. GvHD nach allogener KMT ist assoziiert mit einer Verlängerung der B-Zell-Rekonstitution und einer verminderten B-Zellfunktion (Falzarano et al., 1996). Der Abfall der B-Zellzahlen wird in den vorliegenden Ergebnissen deutlich und ist eine von mehreren Ursachen der GvHD-assoziierten Immunschwäche.

Die Zahl der NK-Zellen ("natural killer cells", DX5 positive Zellen in der FACS-Analyse) stieg in beiden Gruppen von Tag 9 auf Tag 22 an, wobei sie in der allogenen Gruppe etwas höher als in der autologen Gruppe lag. NK-Zellen sind an der Effektorphase der GvHD beteiligt. Eine Depletion von NK-Zellen im murinen GvHD-Modell C57BL/6→F1 (C57BL/6xDBA/2) führte zur Abmilderung der Symptome (Ellison et al., 1998). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Art der Transplantation (allogen versus autolog) im verwendeten Mausmodell (B10.D2→Balb/c bzw. Balb/c→Balb/c) keinen Einfluß auf die Rekonstitution der NK-Zellen hat.

Die in dieser Untersuchung verwendeten Mausstämme B10.D2/nSnJ und Balb/c sind H-2^d kompatibel (entspricht HLA Klasse I und Klasse II des Menschen). Sie unterscheiden sich jedoch in mehreren Minor Histokompatibilitäts-antigenen (Hamilton, 1987; Korngold and Sprent, 1987). Der Balb/c Mäusestamm trägt außerdem endogen Mtv-kodierte ("mouse mammary tumor virus") Superantigene auf der Zelloberfläche, für die B10.D2/nSnJ Mäuse keine Toleranz besitzen (Miconnet et al., 1995). Nach allogener Transplantation von B10.D2 Zellen in Balb/c Empfänger werden neben Minor Histokompatibilitäts-antigenen diese Superantigene ebenfalls als fremd erkannt. Es ist bekannt, daß diese endogenen Superantigene die Rate und den Schweregrad der GvHD erhöhen und bestimmte V β -Segemente der T-Zell-Rezeptoren vermehrt auftreten.

Die vorliegenden FACS Analysen zeigten zu allen untersuchten Zeitpunkten eine deutliche Überrepräsentation der V β 3-Familien in der Milz allogenen transplantierten Mäuse. Dies betraf sowohl die CD4⁺ als auch die CD8⁺ Zellen. Da diese Überrepräsentation in der autolog transplantierten Gruppe fehlte, kann das Vorkommen dieser Zellpopulationen als Marker der GvHD gewertet werden. Eine Abnahme der CD4/V β 3-Subpopulation in der allogenen Gruppe an Tag 22 könnte möglicherweise durch sich langsam entwickelnde Toleranz und die Deletion von Superantigen-reaktiven T-Zellen in den GvHD-Mäusen erklärt werden. Alternativ könnte es zur Migration aktivierter V β 3-Zellen in die Zielorgane der GvHD kommen. Die Zahl der V β 3⁺CD4⁺ T-Zellen reduzierte sich bereits an Tag 22 wieder, was mit der beobachteten Abnahme der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen in der Milz in Zusammenhang stehen könnte. Die Zahl der V β 3⁺ CD8⁺ T-Zellen blieb konstant zwischen 2-3% der Lymphozyten.

Ly9.1 ist ein Glykoprotein, das auf den Zelloberflächen von u.a. Balb/c Mäusen exprimiert wird. Es wurde in einer Doppelmarkierung mit einem CD3-Antikörper eingesetzt, um Hinweise auf den Chimärismusstatus der transplantierten Mäuse zu erhalten. Dabei waren 93-95% der T-Zellen autolog transplantierten Mäuse (Balb/c→Balb/c) Ly9.1 positiv und nur 0,1-5% der T-Zellen allogenen transplantierten Mäuse (B10.D2→Balb/c). Somit waren die Balb/c Empfängermäuse in der allogenen Gruppe mit B10.D2 Spenderzellen rekonstituiert. Daß die CD3⁺ Zellen der autologen Mäuse nicht zu 100% positiv für Ly9.1 sind, könnte daran liegen, daß nicht alle T-Zellen in den verschiedenen Reifestadien Ly9.1 tragen (Miller et al., 1985). Daß die allogenen transplantierten Tiere nicht völlig negativ für Ly9.1 waren, könnte darauf hinweisen, daß noch einige Empfängerzellen im Organssystem vorhanden sind, oder daß diese Prozentzahlen das Maß der unspezifischen Bindung dieses Antikörpers wiedergeben.

Zeichen der GvHD sind neben den typischen Gewichtsverläufen und den makroskopischen Befunden der Fell- und Hautveränderungen auch in den vorliegenden durchflußzytometrischen Bestimmungen zu finden. So sind eine Umkehr der CD4:CD8 Ratio, die Reduktion der B-Zellzahlen und die Überrepräsentation der V β 3-Segmente in den Tieren nach allogenen KMT Korrelate der GvHD.

5.3 Expression von CD4 und CD8 in den Zielorganen der GvHD

T-Zellen sind als Vermittler zellulärer Immunreaktionen entscheidend für die Auslösung und den Ausprägungsgrad der GvHD. Eine T-Zell Depletion des Transplantats verringert die Inzidenz und mildert die Symptome der Erkrankung deutlich ab (Korngold and Sprent, 1978; Prentice et al., 1984). Korngold beschreibt, daß die GvHD im Transplantationsmodell der Mausstämmen B10.D2→Balb/c hauptsächlich durch L3T4⁺ Zellen (CD4-äquivalent) und weniger durch Lyt2⁺ Zellen (CD8-äquivalent) ausgelöst wird, sofern sie in ausreichender Menge transplantiert werden (Korngold and Sprent, 1987). Es wurde außerdem gezeigt, daß die Transplantation einer Kombination aus beiden T-Zell-Subpopulationen zur Verstärkung der GvHD führte (Hamilton, 1987).

In der vorliegenden Studie wurde daher quantitativ und qualitativ die Infiltration CD4 und CD8 positiver T-Zellen in die Zielorgane der GvHD beurteilt.

Die Zahl CD4 positiver Zellen in der Lamina propria des Ileum nahm an Tag 3 in der Strahlenkontrolle, in der autologen Gruppe, sowie der allogenen Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab. In der Lamina propria des Colon blieb die CD4 Expression an Tag 3 in allen Gruppen auf einem schwachen Niveau. In der Haut der unbehandelten Mäuse lagen CD4⁺ Zellen vereinzelt in der Dermis vor. Eine Änderung der Zellzahl an Tag 3 wurde in keiner Gruppe beobachtet. In der Leber hingegen sank die Zahl der CD4⁺ Zellen an Tag 3 in allen Gruppen ab.

Somit spiegelt sich in Ileum und Leber mit einer Reduktion der CD4⁺ Zellen die systemische Aplasie wieder, die auch in Blutproben der untersuchten Mäuse nachgewiesen wurde. In Colon und Leber wurde CD4 vor Transplantation nur schwach exprimiert, und sank als Folge der Konditionierung nicht weiter ab, vereinzelt CD4 positive Zellen waren jedoch weiterhin in den Schnitten vorhanden.

Im Ileum stieg die Zahl CD4 positiver Zellen in der autolog transplantierten Gruppe bereits an Tag 9 nach Transplantation wieder auf ihr Ausgangsniveau an und verblieb dort bis zum Ende des Untersuchungszeitraums. In der allogenen transplantierten Gruppe erreichte die Zellzahl an Tag 9 ebenfalls ihr Ausgangsniveau, stieg in den folgenden Tagen jedoch weiter an, und unterstreicht somit eine Alloreaktivität, die ab Tag 22 eindeutig dokumentiert werden konnte. Im Colon wurde eine vermehrte Expression

CD4 positiver Zellen ab Tag 9 in der autologen Gruppe beobachtet, die bis zum Ende der Untersuchung anhielt. Dies könnte als Folge der Strahlenschäden und der darauffolgenden Hochregulation von beispielsweise VCAM-1 aufgetreten sein. In der allogenen transplantierten Gruppe stieg die CD4 T-Zellzahl an Tag 28 über das Niveau der autolog transplantierten Tiere an und unterstreicht die verstärkte Immunreaktion im Colon allogenen transplantierte Mäuse. In der Dermis blieb die Expression von CD4 in der autologen Gruppe schwach ausgeprägt. In der allogenen Gruppe stieg die Zahl CD4 positiver Zellen schon ab Tag 9 nach Transplantation deutlich an. Als Zeichen der akuten Entzündung waren positive Zellen neben der Dermis nunmehr auch in der Epidermis zu finden. In der Leber blieb die Zahl CD4 positiver Zellen in der autologen Gruppe unter dem Niveau der unbehandelten Tiere, und spiegelt somit die niedrigen systemisch vorkommenden Leukozyten und den fehlenden Nachweis einer Strahlenschädigung wieder. In der allogenen transplantierten Gruppe stiegen die Zahlen der immunreaktiven Zellen an Tag 9 wieder auf das Ausgangsniveau an und schienen an Tag 22 nach Transplantation darüber zu liegen.

Insgesamt zeichnet sich ein deutlicher Anstieg CD4 positiver T-Zellen als Folge der allogenen Transplantation in allen untersuchten Organen ab. Haut und Leber zeigten dabei bereits ab Tag 9, das Ileum ab Tag 22 und das Colon ab Tag 28 nach Transplantation eine erhöhte Zahl CD4 reaktiver Zellen in der immunhistochemischen Untersuchung.

Auf das Expressionsmuster CD8 positiver Zellen in Ileum, Colon und in der Haut schien die Konditionierung keinen Einfluß zu haben. In der Leber hingegen nahmen an Tag 3 nach Transplantation die CD8 positiven Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab. Die Zahl CD8 positiver Zellen im Leberparenchym gab an Tag 3 das Bild der Aplasie wieder.

In Ileum, Colon und Haut kam es nur in den allogenen transplantierten Gruppen zu einem deutlichen Anstieg CD8 positiver T-Zellen. In Colon und Haut der allogenen transplantierten Gruppe stiegen die Werte bereits an Tag 9 über die der autolog transplantierten Gruppe an, der Anstieg im Ileum der allogenen Gruppe erfolgte an Tag 22. In der Leber kam es an Tag 9 nach Transplantation in der autologen Gruppe zum

Anstieg CD8 positiver Zellen auf ihren Ausgangswert, auf dessen Niveau sie bis zum Versuchsende verblieben. In der allogenen transplantierten Gruppe erreichten die CD8 positiven Zellen ebenfalls an Tag 9 ihr Ausgangsniveau, stiegen an Tag 22 jedoch leicht darüber hinaus an.

Im Ileum stiegen CD4 und CD8 positive Zellen gemeinsam an Tag 22 nach allogener Transplantation über das Niveau der autologen Gruppe an. Im Unterschied zu unseren Ergebnissen zeigten FACS Analysen von Zellen des Intestinums, ohne Unterscheidung der verschiedenen Darmabschnitte, nach allogener Transplantation im selben Mausmodell, vor allem einen Anstieg CD4 positiver Zellen, wobei die CD8 positiven Zellen konstant blieben (Miconnet et al., 1998).

Im Colon waren in der allogenen Gruppe infiltrierende CD8 positive T-Zellen mit einem Anstieg an Tag 9 vor den infiltrierenden CD4 positiven Zellen mit einem Anstieg an Tag 28 zu beobachten. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Untersuchung an humanen Rektumbiopsien bei Patienten mit GvHD die einen Anstieg der T-Lymphozyten zeigten, der vor allem auf CD8 positiven Zellen zurückzuführen waren (Dilly and Sloane, 1987). Somit sind im Intestinal-Trakt beide T-Zell Subpopulationen an den Entzündungsprozessen im Rahmen der GvHD beteiligt.

In der Haut kommt es ab Tag 9 nach allogener Transplantation zu einem deutlichen Anstieg CD4 und CD8 positiver Zellen. Shiohara verhinderte kutane GvHD im murinen System durch lokale Applikation von anti-L3T4-Antikörper (CD4 äquivalent) (Shiohara et al., 1988) und bestätigt damit den Einfluß CD4 positiver Zellen auf die Induktion der GvHD.

In der Leber begann der Anstieg CD4 positiver Zellen nach allogener Stammzelltransplantation früher und ausgeprägter als der Anstieg CD8 positiver Zellen. Dieser Befund wird von Miconnet bestätigt (Miconnet et al., 1995). In der genannten Arbeit wurde in der frühen Phase der GvHD (Tag 7 nach allogener Transplantation) eine starke Infiltration CD4 positiver Zellen in der Leber beobachtet, während CD8 positive Zellen zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung niedrig waren, jedoch an Tag 14 nach Transplantation anstiegen (Miconnet et al., 1998).

Die vorliegenden Expressionsmuster von CD4 und CD8 in den Zielorganen der GvHD bestätigen die erwähnten Untersuchungen von Hamilton, wonach beide T-Zell Populationen zur Initiierung und Ausprägung der GvHD beitragen (Hamilton, 1987).

5.4. Expression von VCAM-1 in den Zielorganen der GvHD

VCAM-1 ("Vascular cell adhesion molecule", CD106) konnte erstmals 1989 molekularbiologisch charakterisiert werden (Osborn et al., 1989). Es gehört zur Immunglobulin Gen-Superfamilie und wurde bereits 1989 als Adhäsionsmolekül beschrieben. VCAM-1 wird von aktivierten Endothelien, von dendritischen Zellen sowie Makrophagen in Milz und Thymus exprimiert (Rice et al., 1990). Ruhendes Epithel zeigt keine oder nur eine schwache VCAM-1 Expression, die jedoch durch Zytokine wie IL-1 oder TNF- α angeregt werden kann. Die vollständige Aktivierung von T-Zellen erfordert neben der Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit seinem spezifischen Antigen, einem in der Grube des HLA-Moleküls präsentierten Peptid, ein weiteres sogenanntes kostimulatorisches Signal, das beispielsweise durch VCAM-1 oder ICAM-1 vermittelt werden kann.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Hochregulation von VCAM-1 im Ileum und Colon an Tag 3 in allen Gruppen (autolog, allogene und Strahlenkontrolle) beobachtet. Dies wurde als proinflammatorischer Effekt der Bestrahlung auf Epithelien und Endothelien gedeutet, da VCAM-1 sowohl in der autologen als auch der allogenen Gruppe als auch der Strahlenkontrolle hochreguliert wurde, und zu diesem Zeitpunkt noch keine entzündungsweisenden infiltrierenden T-Zellen im Darm zu finden waren. Untersuchungen in thorakal bestrahlten C57BL/6J Mäusen haben gezeigt, daß es zur Erhöhung von mRNA für VCAM-1 in der Lunge dieser Mäuse kam (Tsujino et al., 1999). Die Expression von VCAM-1 erreichte nach 12 Stunden ein Maximum und war auch nach einer Woche noch um 25% im Vergleich zur Kontrolle erhöht.

In unseren Untersuchungen wurden interessanterweise in der Haut und in der Leber keine verstärkte Expression von VCAM-1 als Bestrahlungseffekt nachgewiesen. Grund dafür könnte die verschiedene Sensitivität der Organe auf die Ganzkörperbestrahlung sein. Die Erneuerungsrate der Epithelzellen im menschlichen Darm beträgt ca. 36 Stunden, die Epidermis der Haut wird beim Menschen innerhalb von 30 Tagen ersetzt. Damit können sich Strahlenschäden im Darm schneller und massiver auswirken. In der Leber hingegen kommt es zu einem Anstieg von VCAM-1 an Tag 3 nur in der Strahlenkontrolle und kann somit nicht sicher als Bestrahlungseffekt gedeutet werden.

Um einen Artefakt auszuschließen, müßten weitere Tiere nach Bestrahlung untersucht werden.

Nachdem initial ein Anstieg von VCAM-1 an Tag 3 in Ileum und Colon zu beobachten war, kam es bereits an Tag 9 in der autologen Gruppe zur Rückbildung der Expression. In den allogenen Gruppen hingegen folgte ein deutlich verzögertes Abklingen von VCAM-1 in der Lamina propria, der Submucosa und den Peyerschen Plaques des Ileum und Colon. VCAM-1 scheint daher für den Beginn der murinen GvHD des Darms eine Rolle zu spielen. Da VCAM-1 schon vor der histologisch nachweisbaren Infiltration von T-Zellen in den Darm stark exprimiert vorliegt, könnte VCAM-1 für ein *kostimulatorisches Signal* verantwortlich sein, das die T-Zellreaktivität im Sinne einer GvHD deutlich verstärkt. Alternativ könnte die verstärkte Expression von VCAM-1 als *Adhäsionsmolekül* ursächlich für das Trafficking und die Infiltration alloreaktiver T-Zellen in das Ileum bzw. in das Colon sein.

In der Leber kommt es ab Tag 9 nur bei den allogenen transplantierten Mäusen zu einer vermehrten Expression von VCAM-1. VCAM-1 wurde auf Endothel von Lebervenen, sowie auf mononukleärer Zellen im Leberparenchym nachgewiesen. Howell (Howell et al., 1995) beschrieb im Mausmodell (B10.D2→Balb/c) durch GvHD ausgelöste entzündliche Infiltrate in den periportalen Feldern an Tag 7 nach Bestrahlung und Transplantation von T-Zellen. Die vermehrte Expression von VCAM-1 steht somit in einem engen Zusammenhang mit dem Erscheinen histologischer Zeichen der GvHD.

VCAM-1 wird konstitutiv auf einigen dendritischen Zellen in der Dermis und Subcutis exprimiert. Ein Anstieg war nur in der allogenen transplantierten Gruppe vor allem in der Dermis zu beobachten, wobei die maximale Expressionsstärke an Tag 9 dokumentiert wurde. Diese Ergebnisse bestätigen Berichte aus dem humanen System (Norton and Sloane, 1994). Norton untersuchte Haut von Patienten mit früher akuter GvHD und fand eine erhöhte Zahl VCAM-1 positiver dendritischer Zellen in der Dermis bei Patienten mit klinischen jedoch noch fehlenden histologischen Zeichen der GvHD, und bei Patienten mit bereits manifestierter GvHD. VCAM-1 wurde in der Haut weniger auf aktiviertem Endothel, sondern vielmehr auf Makrophagen exprimiert, dies könnte auf eine vornehmlich kostimulatorische Rolle von VCAM-1 bei der GvHD der Haut hinweisen.

Die verstärkte (Haut, Leber) bzw. verlängerte Expression (Ileum, Colon) von VCAM-1 kann daher als wichtiger Faktor in der Entwicklung der murinen GvHD nach allogener Knochenmarktransplantation gedeutet werden. Beweisend hierfür sind Untersuchungen von Schlegel (Schlegel et al., 1995). Die Blockade von VCAM-1 durch einen monoklonalen Anti-VCAM-1-Antikörper über 5 Wochen nach allogener Knochenmarktransplantation (Mausstämme: B10.D2 → Balb.c) führte dabei zur Reduktion der auftretenden GvHD von 100% in der Kontrollgruppe auf 53% in der behandelten Gruppe. Damit sank die Letalität von 100% auf 40% ab.

Eine pathophysiologische Rolle von VCAM-1 wird außerdem in anderen immunologischen Erkrankungen beschrieben. So beispielsweise in den erkrankten Hautarealen bei Psoriasis (Veale et al., 1995) und bei Modellen der chronischen Colitis (Sans et al., 1999) in denen VCAM-1 jeweils vermehrt exprimiert wird.

Eine Hemmung des Einflusses von VCAM-1 kann nicht nur durch blockierende Antikörper erfolgen (Schlegel et al., 1995), sondern auch durch VCAM-1 Transkriptionshemmstoffe, wie beispielsweise durch den selektiven Proteasominhibitor MG-341, der im murinen Modell einer chronischen Colitis untersucht wurde (Conner et al., 1997). Dabei wird selektiv das 26S Proteasom inhibiert, das unter anderem für die Aktivierung von NF- κ B verantwortlich ist, welches über die Bindung an Promotorregionen verschiedener Gene z.B. die Expression von VCAM-1 hochreguliert. Die Zahl der Bindungsstellen von VCAM-1 für VLA-4 (engl. "very late activation antigen) wird posttranskriptional durch alternatives Spleißen von mRNA reguliert (Vonderheide and Springer, 1992). Die entstandenen mRNAs kodieren unterschiedliche VCAM-1-Proteine, die sich in der Anzahl der Bindungsstellen für VLA-4 unterscheiden – Vcam-6D (eine Bindungsstelle) und Vcam-7D (zwei Bindungsstellen). Diese Mechanismen des alternativen Spleißens bleibt, aufgrund der Epitoperkennung des verwendeten Antikörpers gegen VCAM-1 (PharMingen 429(MVCAM.A), in der vorliegenden Arbeit unberücksichtigt. Aussagen die durch den verwendeten VCAM-1 spezifischen Antikörper ermittelt werden, können nur über die Verteilung von immunreaktiven Zellen im Gewebe eine Aussage machen, jedoch nicht über die Zahl der vorliegenden Bindungsstellen für VLA-4 oder die Dichte der VCAM-1 Moleküle auf einer Zelle.

5.5 Expression von $\alpha 4$ -Integrin in den Zielorganen der GvHD

VLA-4 (engl. "very late activation antigen, CD49d/CD29) ist ein heterodimeres $\alpha_4\beta_1$ -Integrin, welches auf Thymozyten, Lymphozyten, Monozyten, aktivierten T-Zellen und anderen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Hemler et al., 1987a). (Hemler et al., 1987b) VLA-4 interagiert mit VCAM-1 und Fibronectin (Elices et al., 1990). Darüber hinaus ist es an der Extravasation der Leukozyten aus dem Gefäßbett beteiligt. Wie bereits in Absatz 5.4 diskutiert, ist VCAM-1 ein wichtiger Faktor in der Entwicklung der murinen GvHD. So sollte in der vorliegenden Untersuchung weiter verfolgt werden, ob sich dieser Einfluß von VCAM-1 auch im Expressionsmuster des Liganden VLA-4 widerspiegelt. Aus technischen Gründen konnte kein monoklonaler Antikörper spezifisch für das Heterodimer VLA-4 eingesetzt werden. Es wurde deshalb ein Antikörper spezifisch für $\alpha 4$ -Integrin verwendet. Damit wurden VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ -Integrin) und das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf Lymphozyten (Ligand von MadCAM-1, VCAM-1 und Fibronectin) erfaßt (Berlin et al., 1993b).

Im Ileum und der Haut sank bei den autolog transplantierten Mäusen 3 Tage nach Transplantation die $\alpha 4$ -Integrin positive Zellzahl in Folge der Bestrahlung ab. Dies könnte Zeichen der Aplasie sein. Im Gegensatz dazu blieb die $\alpha 4$ -Integrin Expression im Ileum und der Haut der allogenen Gruppe an Tag 3 auf dem Niveau der unbehandelten Kontrolle, so daß hier neben der Aplasie bereits sehr früh allogene Stimuli auf die Gewebe wirken könnten. Im Colon sank die $\alpha 4$ -Expression in der autologen sowie der allogenen Gruppe an Tag 3 nach Transplantation als Folge der Konditionierung ab. In der Leber wirkte sich die Bestrahlung nur auf die Strahlenkontrolle aus. Durch die Gabe von T-Zellen mit dem Transplantat scheint der Abfall von $\alpha 4$ -Integrin tragenden Zellen in der Leber an Tag 3 der autologen sowie der allogenen Gruppe aufgehoben worden zu sein.

In Ileum, Colon und Haut stieg die $\alpha 4$ -Integrin positive Zellzahl in der autolog transplantierten Gruppe nach dem initialen Absinken bereits ab Tag 9 wieder auf ihr ursprüngliches Niveau an. Im Ileum der allogenen Gruppe stieg die $\alpha 4$ -Expression ab Tag 22 über das Niveau der autologen Kontrollgruppe, in Colon und Haut geschah dies bereits ab Tag 9 nach Knochenmarktransplantation. In der Leber ergab sich in der

autologen Gruppe im Versuchsverlauf keine Änderung der Anzahl an α_4 -positiven Zellen, wohingegen in der allogenen Gruppe die Zahl der α_4 -positiven Zellen ab Tag 9 nach Transplantation stark zunahm.

Zusammenfassend kann folgende Aussage getroffen werden: In den untersuchten Zielorganen der GvHD (Ileum, Colon, Haut, Leber) stieg nach allogener Knochenmarktransplantation die Zahl der α_4 -Integrin positiven Zellen deutlich an und steht damit in Einklang mit den Erkenntnissen aus der immunhistochemischen Untersuchung von VCAM-1. Damit liegen in den Organen allogener transplantierte Tiere vermehrt aktivierte T-Zellen im Vergleich zu autolog transplantierten Tieren vor, was als immunhistochemisches Korrelat der GvHD gewertet werden kann.

Blockierungsstudien von Schlegel et al. mit anti-VLA-4 (α_4 -Untereinheit) über 5 Wochen nach allogener Knochenmarktransplantation (Modell B10.D2→Balb/c) verzögerten das Eintreten der GvHD, jedoch hatte dies keinen Einfluß auf die Inzidenz der GvHD bzw. die Letalität (Schlegel et al., 1995). Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, daß α_4 -Integrin als Teil des Heterodimers VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ -Integrin) eine geringere Rolle in der Pathogenese der GvHD spielt. Die Infiltration der Zielorgane mit α_4 -Integrin positiven Zellen würde damit nur eine Reaktion auf vorausgegangene Gewebsschädigung widerspiegeln. Anti- α_4 -Integrin Antikörper verhinderten in Untersuchungen von Berlin den Eintritt ("Homing") von Lymphozyten in die Peyerschen Plaques des Darms und halfen, die Funktion von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin aufzuklären (Berlin et al., 1993b).

Um den relativen Beitrag von $\alpha_4\beta_1$ -Integrin (VLA-4) im Vergleich zu $\alpha_4\beta_7$ -Integrin im Rahmen der murinen GvHD aufzuzeigen, wurden einzelne Färbungen mit einem Antikörper spezifisch für die β_7 -Untereinheit durchgeführt. Dabei fiel im Ileum ab Tag 21 ein Anstieg von β_7 -positiven Zellen über das Niveau in der autolog transplantierten Gruppe auf. Im Ileum spielen für die Induktion der murinen GvHD sowohl VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ -Integrin) als auch $\alpha_4\beta_7$ -Integrin eine Rolle, da die Anzahl der β_7 -positiven Zellen ($\alpha_4\beta_7$) nicht alle α_4 -positiven Zellen in der parallel angefertigten α_4 -Summenfärbung (Summe aus $\alpha_4\beta_1$ - und $\alpha_4\beta_7$ -positiven Zellen) ausreichend erklären kann.

In der Haut wurden verzweigte β_7 -positive Zellen in der Epidermis und Dermis angefärbt, deren Zahl in der autologen Gruppe in Folge der Konditionierung an Tag 3 absank. In der allogenen Gruppe blieben die Zellzahlen während des gesamten Untersuchungszeitraums konstant. Da sich die Morphologie und Lage der β_7 -positiven Zellen in den angefertigten Färbungen (Abb.88 und Abb.89) deutlich von den α_4 -positiven Zellen unterscheidet, können die immunreaktiven Zellen weniger $\alpha_4\beta_7$ -Integrin als $\alpha_e\beta_7$ -Integrin zugeordnet werden. $\alpha_e\beta_7$ -Integrin wird von intraepithelialen Lymphozyten exprimiert und stellt in der Haut einen Liganden für das Adressin E-cadherin dar (Cepek et al., 1994; Higgins et al., 1998). In dieser Arbeit wird davon ausgegangen, daß die angefärbten α_4 -positiven Zellen in der Haut vorwiegend $\alpha_4\beta_1$ -Integrin (VLA-4) exprimierende Zellen darstellen.

In der Leber stieg ab Tag 9 in der allogenen Gruppe die Zahl β_7 -positiver Zellen über das Niveau der autologen Gruppe an. Somit spielen in der Leber für die murine GvHD VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ -Integrin) sowie $\alpha_4\beta_7$ -Integrin eine Rolle, wobei $\alpha_4\beta_1$ -Integrin aufgrund der weitaus höheren Anzahl an insgesamt α_4 -positiven Zellen die größere Bedeutung zugeordnet werden muß.

5.6. Expression von MAdCAM-1 in den Zielorganen der GvHD

1988 wurde von Streeter et al. der Antikörper Meca367 beschrieben, der die Bindung von Lymphozyten an hochendotheliale Venulen (HEV) der Peyerschen Plaques des Darmes hemmen konnte (Streeter et al., 1988). Das Antigen auf der Endothelseite wurde 1989 von derselben Gruppe analysiert und "mucosal vascular addressin cell adhesion molecule" (MAdCAM-1) genannt (Nakache et al., 1989). Picarella et al. beschreibt 1997 die Zunahme MAdCAM-1 positiver Venulen in durch T-Zelltransfer induzierter Colitis in SCID Mäusen (severe combined immuno defficiency) gegenüber unbehandelten Mäusen (Picarella et al., 1997). Bindungspartner für MAdCAM-1 auf der Seite der Leukozyten sind L-Selektin (Berg et al., 1993) und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin (Berlin et al., 1993a). Picarella behandelte die SCID-Mäuse mit monoklonalen Antikörpern spezifisch für β_7 -Integrin oder MAdCAM-1 alleine und in Kombination. Damit konnte er histologisch den Schweregrad der ausgelösten Colitis reduzieren, gekennzeichnet durch

eine Reduktion infiltrierender T-Lymphozyten in die Läsionen. Klinisch ergab sich jedoch keine Besserung der Symptome.

Es stellte sich daher die Frage, ob MAdCAM-1 eine Rolle in der Induktion der Darm-GvHD in unserem Mausmodell spielt.

Wie von Streeter beschrieben fanden wir mit immunhistochemischen Färbungen MAdCAM-1 auf HEV der Lamina propria des Ileum sowie des Colon exprimiert vor. Das Expressionsmuster erschien in allen untersuchten Gruppen, d.h. unbehandelten Mäusen, autolog und allogene transplantierten Mäusen gleich. Wir können eine Hochregulierung, wie sie Picarella et al. im Rahmen einer T-Zell induzierte Colitis bei SCID-Mäusen fand, mit den bisherigen Untersuchungen nicht bestätigen. Die Expression von MAdCAM-1 wurde bisher nur in HEV der Peyerschen Plaques und der Lamina propria, laktierenden Milchdrüsen (Tanneau et al., 1999), im entzündeten Pankreas (Hanninen et al., 1993) und auf Mantelzellen in der Milz (Kraal et al., 1995) beschrieben. Wir fanden zusätzlich wenige positive Zellen für MAdCAM-1 in der Subcutis, was zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe mit RT-PCR weitergehend geprüft wird.

Zusammenfassend ist dabei für MAdCAM-1 im Rahmen der Grenzen der eingesetzten Methoden und zu den definierten Zeitpunkten kein relevantes Expressionsmuster im vorliegenden Modell gefunden worden. Die Ergebnisse sprechen vielmehr dafür, daß über MAdCAM-1 alleine wenig Einfluß auf die GvHD genommen werden kann

5.7. Expression von ICAM-1 in den Zielorganen der GvHD

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD54) wurde 1988 molekularbiologisch beschrieben und der Immunglobulin Gen-Superfamilie zugeordnet (Rothlein et al., 1986; Staunton et al., 1988). Als Ligand von LFA-1 ($L\alpha\beta_2$ -Integrin, CD11a/CD18) auf Leukozyten, und Mac-1 (CD11b/CD18, CR3 – Komplement Rezeptor 3) auf myeloischen Zellen wird ICAM-1 auf Antigen-präsentierenden Zellen, Epithelzellen, Endothel und Fibroblasten exprimiert (Diamond et al., 1991; Dustin et al., 1986). Erkennen T-Zellen ihre spezifischen Antigene im Gewebe, so produzieren sie Zytokine

wie TNF- α oder IFN- γ , welche die ICAM-1 Expression in Endothelzellen stimulieren. Eine erhöhte Expressionsdichte von ICAM-1 auf Endothelzellen kann zur Bindung von Lymphozyten via LFA-1, bzw. Mac-1 auf myeloiden Zellen führen. Hierdurch nimmt die Einwanderung von Abwehrzellen in den Entzündungsherd zu (Dustin et al., 1988). Erst vor kurzem wurde beschrieben, daß ICAM-1 im Entzündungsgeschehen nicht nur für die feste Adhäsion und Transmigration, sondern auch für das vorübergehende Andocken ("Rolling") von Leukozyten verantwortlich ist (Steeber et al., 1999). Aufgrund der wichtigen Rolle von ICAM-1 im Rahmen der Entzündung sollte sein Expressionsmuster im zeitlichen Verlauf der murinen GvHD untersucht werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Hochregulation von ICAM-1 im Ileum an Tag 3 in allen Gruppen beobachtet. Dies wurde auf die Konditionierung (Bestrahlung) vor der Knochenmarktransplantation zurückgeführt, da ICAM-1 sowohl in der autologen als auch der allogenen Gruppe als auch der Strahlenkontrollgruppe vermehrt exprimiert wurde. Untersuchungen an thorakal bestrahlten C57BL/6J Mäusen zeigten, daß es zur Erhöhung von mRNA für ICAM-1 in der Lunge während der ersten Woche nach Bestrahlung kam. Bei Bestrahlung von humanen Endothelzellen *in vitro* kam es zur Induktion von ICAM-1 ohne den Einfluß von TNF- α oder IL-1 (Hallahan et al., 1996). Überraschenderweise wies das Colon keine Hochregulation von ICAM-1 an Tag 3 auf, ein Bestrahlungseffekt war in diesem Organ ebensowenig wie in der Haut oder der Leber ausgeprägt. Nach dem initialen Anstieg von ICAM-1 an Tag 3 in der Lamina propria des Ileum, kam es bereits an Tag 9 in der autologen Gruppe zur Rückbildung der Expression auf das Ausgangsniveau der unbehandelten Mäuse. In der allogenen transplantierten Gruppe verblieb ICAM-1 bis Versuchsende auf einem erhöhten Expressionsniveau. Da ICAM-1 schon vor der Infiltration von T-Zellen vermehrt exprimiert wurde, könnte dies auf eine vorwiegend kostimulatorische Rolle von ICAM-1 in der frühen Phase der GvHD hinweisen.

Im Colon wurde ICAM-1 in der autologen Gruppe konstant auf dem Endothel in der Lamina propria und in Peyerschen Plaques exprimiert. In der allogenen Gruppe stieg die Zahl der immunreaktiven Zellen für ICAM-1 ab Tag 9 an. Diese Ergebnisse unterstützen eine Untersuchung von humanen Duodenalbiopsien, in denen ebenfalls eine Hochregulation von ICAM-1 in GvHD Biopsien beobachtet wurde (Roy et al., 1993). Die erhöhte Expression von ICAM-1 auf Kapillaren und Makrophagen innerhalb

der Lamina propria von Ileum und Colon weisen auf eine Rolle von ICAM-1 bei der immunpathologischen Gewebeschädigung in der GvHD hin.

In der Haut fällt eine Hochregulation von ICAM-1 in der Dermis, sowie eine neu auftretende Expression von ICAM-1 auf Keratinozyten bei allogenen transplantierten Tieren ab Tag 9 nach Transplantation auf. In den autolog transplantierten Gruppen blieb das Expressionsmuster während des gesamten Versuchs konstant. Diese Ergebnisse bestätigen Berichte aus dem humanen System (Norton and Sloane, 1991), in welchen Hautbiopsien von an GvHD erkrankten Patienten mit Biopsien vor Transplantation und Biopsien unbehandelter Probanden verglichen wurden. Im Rahmen der GvHD traten in dieser Untersuchung vermehrt ICAM-1 positive Zellen sowie eine erhöhte Farbintensität auf Keratinozyten der Epidermis auf. In einer prospektiven Studie an humanen Hautbiopsien wurde gezeigt, daß ICAM-1 bereits in frühen Phasen der GvHD auf Keratinozyten hochreguliert wird (Norton and Sloane, 1994), d.h. schon bei klinischen Zeichen der GvHD ohne histopathologisches Korrelat wie Vakuolisierung, Zellnekrosen von epidermalen Basalzellen oder Lymphozyteninfiltrate.

In der Leber zeigte sich ab Tag 9 nach Transplantation ein Anstieg von ICAM-1 positiven Zellen im Endothel allogenen transplantierten Mäuse, sowie immunhistochemisch in Form von von immunreaktiven Arealen im Leberparenchym. Ein Maximum wurde an Tag 22 erreicht. Howell berichtete im selben Mausmodell (Mausstämme: B10.D2→Balb/c) von einem Anstieg ICAM-1 positiver Zellen zwischen Tag 7 und 14 an Endothel der Portalvenenäste, Gallengangsepithel und Makrophagen in der Leber (Howell et al., 1995). Die Behandlung mit anti-ICAM-1 Antikörper milderte signifikant die Entzündungserscheinungen in der Leber sowie die Schädigung der Gallengänge in der murinen GvHD (Howell et al., 1999). Auch im Rahmen der humanen GvHD wurde von erhöhter ICAM-1 Expression innerhalb der Leber berichtet, jedoch scheint sie unbeständiger bzw. variabler als im Mausmodell zu sein (Norton et al., 1992).

Die verlängerte Expression von ICAM-1 im Ileum, bzw. die verstärkte Expression von ICAM-1 in Colon, Haut und Leber bei allogenen transplantierten Mäusen kann als wichtiges Signal für die frühe Phase der GvHD gewertet werden. Beweisend hierfür sind auch Untersuchungen von Blazar (Blazar et al., 1995). Hierbei wurde eine optimale

Prävention der murinen GvHD (Mausmodell: C57BL/6→B10.BR) durch die Koblockade der CD28/CTLA-4:B7 und LFA-1:ICAM-1 Signalwege, durch ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne von CTLA-4 und humanem Immunglobulin (hCTLA-4-Ig) und durch einen monoklonalen Anti-LFA-1 Antikörper, erreicht. Anti-LFA-1 Antikörper und hCTLA-4-Ig wurden in der *in vitro* Präparation der Splenozyten vor Transplantation verwendet und ihre Gabe über 4 Wochen nach Transplantation fortgeführt. Damit wurde eine Reduktion der GvHD Letalität von 100% in der Kontrollgruppe auf 12% in der behandelten Gruppe erreicht, wobei anzumerken ist, daß die meisten Mäuse nicht frei von GvHD waren. So wiesen die Gewichtsverläufe weiter auf eine milde, subletale Verlaufsform der GvHD hin. Wurde zur Prävention der GvHD nur hCTLA-4 verwendet, so kam es zu 88% GvHD assoziierter Letalität.

Monoklonale Antikörper die die Funktion von ICAM-1 blockieren, haben auch in anderen Transplantationsmodellen zur Reduktion des Entzündungsgeschehens und der Immunantwort geführt, beispielsweise führte die Gabe von Anti-ICAM-1 Antikörper bei Herztransplantationen in Primaten zu einer Verlängerung der Überlebenszeit (Flavin et al., 1991), Langzeitüberleben wurde durch Gabe von Anti-ICAM-1 und Anti-LFA-1 Antikörper bei HLA-inkompatiblen Herztransplantationen im Mausmodell erreicht (Isobe et al., 1992) und schließlich wurde durch Blockade von ICAM-1 durch den entsprechenden Antikörper die T-Zell vermittelte Schädigung von Nierentransplantaten in einem Primatenmodell inhibiert (Cosimi et al., 1990).

Auch außerhalb der GvHD wurde im Rahmen verschiedener entzündlicher Prozesse die vermehrte Expression von ICAM-1 beobachtet, so beispielsweise in Mausmodellen der Kontaktdermatitis (McHale et al., 1999) und in betroffenen Hautarealen der humanen Psoriasis (Veale et al., 1995). Auch bei Patienten mit aktiver Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn wurden erhöhte lösliche ICAM-1 Plasmalevel gemessen (Patel et al., 1995).

Der Einfluß von ICAM-1 kann durch Antikörper wie Anti-ICAM-1 oder Anti-LFA-1 reduziert werden, aber auch Anti-TNF- α Antiserum verhindert die Hochregulation von ICAM-1 (McHale et al., 1999).

5.8 Expression von ICAM-2 in den Zielorganen der GvHD

ICAM-2 (intercellular adhesion molecule-2, CD102) repräsentiert ein weiteres Mitglied der Immunglobulin Gen-Superfamilie. Es wurde 1989 auf der Suche nach weiteren LFA-1 (CD11a/CD18) Liganden, neben dem bereits bekannten ICAM-1 (CD54), entdeckt (Staunton et al., 1989). ICAM-2 wird konstitutiv von Endothelien exprimiert, wird jedoch auch auf Antigen-präsentierenden Zellen beschrieben. Reife T-Zellen sind unabhängig von lokalen Stimuli, wie beispielsweise Infektionen, in allen Organen nachweisbar. Für ihre Verteilung könnte die adhäsive Interaktion von LFA-1 und ICAM-2 eine Rolle spielen.

In Ileum und Colon wurde ICAM-2 konstitutiv von Endothelien und dendritischen Zellen in der Lamina propria exprimiert. Die Art der Knochenmarktransplantation (allogen versus autolog) hatte keinen Einfluß auf das Expressionsmuster.

In der Leber wurde ICAM-2 von Endothelien einzelner Lebervenen exprimiert und durch die Transplantation nicht beeinflusst.

In der Haut nahm die Expression von ICAM-2 in der allogen transplantierten Gruppe ab Tag 9 zu. Icam-2 positive Zellen waren vermehrt in der Dermis, aber auch in der Epidermis zu finden. Dieser Anstieg läßt sich durch erhöhte Zahlen mononukleärer Zellen erklären, wie sie von Norton zur histopathologischen Charakterisierung der GvHD angeführt wurde (Norton and Sloane, 1994).

ICAM-2 spielt für die GvHD in unserem Mausmodell keine Rolle und ist somit kein potentieller Kandidat für eine Beeinflussung der GvHD durch in vivo Blockade.

5.9 Expression von LFA-1 in den Zielorganen der GvHD

LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$ -Integrin, CD11a/CD18, Lymphocyte function associated antigen one) wird ausschließlich auf Leukozyten exprimiert (Kurzinger et al., 1981). Alle T-Zellen exprimieren LFA-1, wobei das Level auf aktivierten T-Zellen ("armed") 2-4 fach höher als auf ruhenden T-Zellen ist. Durch diesen Mechanismus können T-Zellen länger und

fester an ihre Zielzellen binden, was beispielsweise zur Aktivierung von Makrophagen und B-Zellen notwendig ist. Im Gegensatz zu T-Zellen exprimieren Makrophagen LFA-1 nur in geprägten ("primed") und aktivierten Stadien (Strassmann et al., 1985).

Bei Immunreaktionen spielt LFA-1 eine entscheidende Rolle für die Adhäsion von Lymphozyten an Endothel über die Interaktion mit ICAM-1 und ICAM-2 (Staunton et al., 1989).

Wie bereits dargestellt wurde, steigt die Expression von ICAM-1 als Ligand von LFA-1 im Rahmen der GvHD in allen Zielorganen an. So war es für die vorliegende Untersuchung von besonderem Interesse zu überprüfen, ob sich das Expressionsmuster von ICAM-1 in der Expression von LFA-1 widerspiegelt.

In der Lamina propria des Ileum sank die Zahl der LFA-1 positiven Zellen an Tag 3 nach Transplantation in allen untersuchten Gruppen in Folge der Konditionierung ab. Dies wurde als Zeichen der abnehmenden Leukozytenzahlen in der Phase der Aplasie gewertet. Im Colon, der Haut und der Leber fehlte dieser Effekt, es konnte keine Änderung der immunreaktiven Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet werden. Die Beobachtung wird dadurch erschwert, daß in der jeweiligen Ausgangssituation wenig Lymphozyten vorliegen, was als schwache Expression gewertet wurde, wobei es in Folge nie zu einem völligen Fehlen von immunreaktiven Zellen im histologischen Schnitt kam.

Im Ileum der autologen Gruppe stieg die Zahl der LFA-1 positiven Zellen ab Tag 9 bereits wieder auf ihr ursprüngliches Niveau an. In allen untersuchten Organen der allogenen transplantierten Tiere stieg die LFA-1 Expression ab Tag 9 stark an und lag über dem Niveau der autologen Gruppe.

In Ileum und Colon spiegelt sich damit die im vorliegenden Experiment beobachtete Infiltration von Lymphozyten in die Lamina Propria, sowie die Aktivierung von Gewebsmakrophagen wieder, wie sie von Forbes in Untersuchungen an humanen Sigma-Biopsien von Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation beschrieben wurde (Forbes et al., 1995).

In der Haut liegt eine Infiltration von Lymphozyten vor, jedoch könnten durch eine beginnende Entzündung aktivierte Makrophagen auch de novo LFA-1 auf ihren Zelloberflächen exprimieren und damit zu diesem Anstieg in den allogenen transplantierten Tieren beitragen. Lymphozyten und Monozyten, die LFA-1

exprimieren, binden an ICAM-1 exprimierende Zellen wie beispielsweise Keratinozyten während der GvHD.

In einem Mausmodell für kutane GvHD (klonierte T-Zellen BB5→B6-Mäuse) konnte durch in vitro Behandlung von anschließend intradermal applizierten T-Zellen mit Anti-LFA-1 Antikörper die Ausprägung kutaner GvHD abgemildert werden (Shiohara et al., 1988). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei der in vivo Anwendung des Anti-LFA-1 Antikörpers, bevor T-Zellen intradermal injiziert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, daß LFA-1 Moleküle an der Invasion von T-Zellen in die Epidermis während der GvHD beteiligt sind.

In der Leber ist der starke Anstieg von LFA-1 durch parallel zu beobachtende ansteigende CD4 positive Zellen zu erklären, aber auch hier könnte eine Aktivierung von Makrophagen zur vermehrten Expression von LFA-1 führen. Im selben Mausmodell (Mausstämme: B10.D2→Balb/c) waren bei induzierter GvHD 60% der mononukleären Zellen in der Leber positiv für LFA-1. Hierbei wurde LFA-1 ebenfalls auf Kupfferschen Sternzellen in den Lebersinusoiden exprimiert (Howell et al., 1995). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß hepatische GvHD durch Donor T-Zellen über die LFA-1/ICAM-1 Interaktion induziert wird. Eine Behandlung der Mäuse in vivo mit Anti-LFA-1 Antikörper alleine führte zu einer Reduktion der entzündlichen Läsionen in der GvHD-Leber, doch änderte dies nichts am Verlauf der sekundär-sklerosierenden Cholangitis (Howell et al., 1999). Erst eine Kombination von Anti-LFA-1 und Anti-ICAM-1 Antikörpern führte zu einer signifikanten Reduktion der Läsionen sowie der Gallengangsschädigung verglichen mit der Behandlung mit Anti-LFA-1 bzw. Anti-ICAM-1 Antikörper alleine. Die Untersuchungen von Howell lassen vermuten, daß die Funktion von ICAM-1 und LFA-1 in der Entwicklung der GvHD in diesem Modell teilweise unabhängig voneinander sind, im Falle der gemeinsamen Blockierung jedoch synergistisch wirken.

Aufgrund seiner zentralen Rolle in der GvHD wurde LFA-1 von verschiedenen Forschungsgruppen zum Ziel ihrer Untersuchungen gemacht. So zeigte Harning in einem murinen Modell der GvHD (Mausstämme: C57Bl/6→BDF₁), durch Blockade von LFA-1 mittels eines monoklonalen Antikörper gegen CD11a über 10 Tage nach allogener Transplantation von Milzzellen, eine Reduktion der GvHD induzierten Letalität (Harning et al., 1991). Eine kombinatorische Blockade von LFA-1 und ICAM-

1 führte in diesem Modell zu keiner verbesserten Überlebensrate verglichen mit der Verwendung von Anti-LFA-1 Antikörper alleine. Eine Phase-II Studie bei Kindern mit ALL (Akute lymphatische Leukämie) nach partiell HLA-inkompatibler KMT untersuchte eine Strategie, nach der Knochenmark vor Transplantation T-Zell depletiert wurde und die Kinder Anti-LFA-1 sowie Anti-CD2 (LFA-2) Antikörper erhielten (Cavazzana-Calvo et al., 1996). Diese Methode konnte GvHD und Transplantatabstoßung unterdrücken, führte jedoch zu einer persistierenden Immunschwäche mit einer erhöhten Rate an letalen Infektionen und Rezidiven. In LAD (Leukocyte adhesion deficiency), einer vererbten Immunschwäche als Folge einer Mutation im Gen der β_2 -Kette (LFA-1= $\alpha_L\beta_2$ -Integrin), ist die Antwort auf Bakterien aufgrund der Störung der Neutrophilen- und Makrophagenfunktion schwer reduziert. Überraschenderweise kann die T-Zellantwort in diesen Patienten normal sein, da wahrscheinlich andere Adhäsionsmoleküle wie CD2 oder β_1 -Integrine exprimiert werden, womit sie das Fehlen von LFA-1 kompensieren (Anderson and Springer, 1987). Dies ist ein weiterer Hinweis, daß durch LFA-1 Blockade alleine in der GvHD kein zufriedenstellender Erfolg erzielt werden könnte, und eine Kombination verschiedener Strategien zur Unterdrückung der überschießenden Immunreaktion sinnvoll ist.

5.10 Expression von B7-1 und B7-2 in den Zielorganen der GvHD

Wichtige kostimulatorische Signale werden durch B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf Antigen-präsentierenden Zellen, d.h. dendritischen Zellen, B-Zellen und Monozyten, vermittelt. Das murine B7-1 wurde 1991 kloniert und ist ein homodimeres Mitglied der Immunglobulin Superfamilie (Freeman et al., 1991). B7-2 wurde 1993 von derselben Arbeitsgruppe entdeckt (Freeman et al., 1993). Funktionelle Unterschiede der beiden Moleküle sind bis heute nicht klar beschrieben. Auffallend ist jedoch, daß B7-2 mRNA konstitutiv auch auf unstimulierten B-Zellen exprimiert wird, während B7-1 nur in aktivierten B-Zellen vorkommt (Freeman et al., 1993; Lenschow et al., 1993).

Der korrespondierende Rezeptor für B7-Moleküle auf der T-Zelle ist CD28, durch ihre Interaktion werden T-Zellen zur Proliferation angeregt. Auf naiven T-Zellen ist CD28 der einzige Rezeptor für B7-Moleküle. Sobald T-Zellen jedoch aktiviert vorliegen

exprimieren sie zusätzlich CTLA-4, welches in stärkerem Maße B7-Moleküle bindet als CD28 und welches ein negatives Signal an die T-Zelle weitergibt. Die Bindung von CTLA-4 an B7-Moleküle wirkt der Proliferation entgegen und läßt die T-Zellen weniger sensibel auf Antigenstimulation reagieren (Liu and Janeway, 1992; Rudd, 1996). Die antigenspezifische klonale Expansion naiver T-Zellen benötigt die Bindung des T-Zell-Rezeptors an Peptid-MHC-Komplex und ein kostimulatorisches Signal auf derselben Antigen-präsentierenden Zelle. Eine Behinderung beispielsweise des B7-2 Signal führte zur Hemmung der T-Zellproliferation und der Zytokinproduktion (Hathcock et al., 1994). Für die vorliegende Studie stellte sich die Frage, ob durch immunhistochemische Methoden eine Rolle von B7-Molekülen in der GvHD nachgewiesen werden kann.

Betrachtet man die B7-Moleküle gemeinsam, so fällt das widersprüchliche Expressionsverhalten nach Bestrahlung auf. Die B7-1 Expression sank im Ileum an Tag 3 nach Transplantation sowohl in der allogenen der autologen Gruppe als auch der Strahlenkontrolle nach der Konditionierung ab, während in den anderen Organen kein Effekt beobachtet werden konnte. Die B7-2 Expression dagegen stieg in Ileum und Colon nach der Bestrahlung an Tag 3 in allen Gruppen an, in der Haut und in der Leber erfolgte kaum eine Veränderung der Expressionsstärke. Im Unterschied zu B7-1, kann B7-2 relativ schnell und in größerem Ausmaß durch Lipopolysaccharide hochreguliert werden (Lenschow et al., 1993). Es wäre deshalb denkbar, daß durch Schädigung des Darmepithels dessen Durchlässigkeit verändert worden sein könnte, und so vermehrt Antigen in die Lamina propria des Darmes gelangt sein könnte. Untersuchungen an dendritischen Zellen aus humaner Haut weisen darauf hin, daß B7-2 und nicht B7-1 durch das Zytokin GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) induziert werden kann (Mitra et al., 1995). GM-CSF ist einer der Faktoren, die die Funktion von dendritischen Zellen verstärken (wie z.B. IL-1, TNF- α) und von T-Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten eventuell nach Bestrahlung ausgeschüttet werden können

Im Ileum der allogenen transplantierten Mäuse stieg B7-1 an Tag 9 auf das Niveau, und erst ab Tag 22 über das Niveau der autologen Expressionsstärke an. Im Gegensatz zu B7-1 wurde B7-2 bereits nach der initialen Induktion durch die Konditionierung zu einem frühen Zeitpunkt verstärkt exprimiert (Tag 3) und verblieb in der allogenen Gruppe auf einem erhöhten Niveau, während die Expression von B7-2 in der autologen

Gruppe ab Tag 9 wieder auf das Ausgangsniveau abfiel. Somit spielen beide Moleküle, möglicherweise zu unterschiedlichen Zeitabschnitten, in der Pathogenese der GvHD des Ileum eine Rolle. Da B7-2 schon vor der Infiltration von T-Zellen im Gewebe hochreguliert vorliegt, könnte B7-2 zusammen mit VCAM-1 und ICAM-1 für ein kostimulatorisches Signal in der frühen Phase der GvHD verantwortlich sein.

Im Colon scheint B7-1 weder auf die Bestrahlung noch auf Einflüsse durch die KMT zu reagieren und blieb in allen Gruppen schwach in der Lamina propria, der Submucosa und den Peyerschen Plaques exprimiert. Nach dem initialen Anstieg von B7-2 an Tag 3, kam es bereits ab Tag 9 in der autolog transplantierten Gruppe zur Rückbildung der Expression. In der allogenen Gruppe verblieb die Expression auf einem erhöhten Niveau. Im Colon scheint B7-1 keinen Einfluß auf die GvHD assoziierte Gewebeschädigung zu haben. Dagegen wird B7-2 schon in den frühen Phasen der GvHD verstärkt exprimiert und kann die T-Zellreaktivität dadurch unterstützen.

In der Haut kommt es in der allogenen transplantierten Gruppe jeweils zu einem Anstieg von B7-1 und B7-2 an Tag 9 nach KMT. B7-1 sank an Tag 28 nach Transplantation bereits wieder ab, während B7-2 weiter verstärkt exprimiert wurde. Immunreaktive Zellen waren in der Dermis sowie ab Tag 9 in der allogenen Gruppe auch in der Epidermis zu finden. Das verstärkte Vorkommen B7-positiver Zellen spiegelt wahrscheinlich eine erhöhte Zahl mononukleärer Zellen wieder, die für die kutane GvHD charakteristisch sind (Norton and Sloane, 1994). Untersuchungen von humanen Hautbiopsien zeigten eine vermehrte Expression von B7-2 in Psoriasis, einer T-Zell vermittelten Erkrankung. In vitro exprimierten dendritische Zellen aus der Haut mehr B7-2 als B7-1. Diese Hierarchie der T-Zellstimulation bestätigte sich in Blockierungsstudien der Interaktion von dendritischen Zellen und T-Zellen durch anti-B7-1-Antikörper bzw. anti-B7-2-Antikörper, bei der B7-2 (CD86) über B7-1 (CD80) steht (Mitra et al., 1995).

In der Leber wurde B7-1 in unbehandelten Mäusen nur vereinzelt exprimiert, was sich weder durch die Bestrahlung noch die Art der Transplantation beeinflussen ließ. B7-1 scheint für die hepatische GvHD keine Rolle zu spielen. Auch für B7-2 zeichnet sich keine klare Änderung des Expressionsmusters nach Transplantation ab. Ein leichter Anstieg der B7-2 Expression war möglicherweise in der allogenen transplantierten Gruppe an Tag 22 zu beobachten, während die Expression an Tag 9 und 22 in der autologen

Gruppe teilweise ganz verschwand. Im Vergleich zur autologen Gruppe wurde B7-2 somit in der Leber der allogenen Tiere vermehrt exprimiert. B7-2 wurde im Rahmen der GvHD nur wenig hochreguliert und spielt für die Schädigungen durch GvHD in der Leber eine eher untergeordnete Rolle.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß B7-1 als kostimulatorisches Molekül in der GvHD in Ileum und Haut hochreguliert wird. Für Zeichen der GvHD in Colon und Leber jedoch müssen andere Moleküle eine Rolle spielen. B7-2 wurde ebenfalls in Ileum und Haut im Rahmen der GvHD deutlich vermehrt exprimiert. In Colon und Leber hingegen, war die Hochregulation schwächer ausgeprägt und spielt für die GvHD in diesen letztgenannten Organen vermutlich nur eine geringe Rolle.

In der Vergangenheit wurden B7:CD28 vermittelte Signalwege oft durch CTLA-4-Immunglobulin blockiert, da dies die B7-1 (CD80) und die B7-2 (CD86) Bindung an CD28 verhindert. Eine in vivo Gabe von Fusionsprotein hCTLA-4-Ig über 4 Wochen nach allogener KMT im murinen Modell (Mausstämme: C57BL/6→B10.BR) führte zu einer Reduktion der GvHD assoziierten Letalität von 100% auf bis zu 37%, wobei der Effekt der Blockade in verschiedenen Versuchen variierte und die Mäuse nicht frei von GvHD waren (Blazar et al., 1994). Aus diesem Grund führte Blazar in weiteren Versuchen eine Koblockade der LFA-1:Icam und CD28/CTLA-4:B7 Signalwege im murinen Modell der GvHD durch. Durch den kombinierten Ansatz wurde eine Reduktion der Sterblichkeitsrate auf 12% erreicht, doch auch hier konnte das Auftreten von GvHD nicht vollständig verhindert werden (Blazar et al., 1995). Eine Blockade durch monoklonale Antikörper gegen B7-1 und B7-2 jeweils alleine oder miteinander kombiniert im murinen GvHD Modell bewies, daß beide Moleküle für die Ausprägung der GvHD verantwortlich sind (Blazar et al., 1996). Außerdem wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, daß die Expression von B7-1 auf CD4 positiven Spender-T-Zellen wichtig für die Auslösung der GvHD ist.

Eine Schwierigkeit für die langfristige Blockade von B7-Molekülen nach allogener Transplantation ergibt sich aus der Beobachtung, daß die Expression dieser kostimulatorischen Moleküle eine zentrale Rolle für den GVL Effekt (Graft-versus-Leukemia Effekt, Transplantat gegen Leukämie Effekt) spielt (Blazar et al., 1997).

Weiterhin wurde vor kurzem gezeigt, daß auch eine spezifische Immunantwort gegen Tumorgewebe in nicht transplantierten Mäusen einer Kostimulation durch B7-1 und/oder B7-2 bedarf (Maric and Liu, 1999).

Eine frühe Blockade der CD28:B7-Interaktion mit Erhalt der CTLA-4:B7 Signale wäre sehr sinnvoll, während in späteren Phasen nach allogener Transplantation eine Blockade der CTLA-4:B7-Interaktion den GVL-Effekt evtl. nach späterer Infusion von Spender-T-Lymphozyten verstärken könnte (Blazar et al., 1999).

5.11 Expression von E-Selektin in den Zielorganen der GvHD

Die Akkumulation von Leukozyten an Orten der Entzündung bedarf einer lokalen Adhäsion von Leukozyten an die Endothelien von Blutgefäßen. Bereits 1987 wurde E-Selektin (Elam-1, CD62E) ein durch IL-1, TNF- α und LPS induzierbares endotheliales Leukozyten-Adhäsionsmolekül, identifiziert (Bevilacqua et al., 1987). E-Selektin erscheint einige Stunden nach Exposition von beispielsweise TNF- α auf Endothelzelloberflächen, wo es Epitope wie Sialyl-Lewis^x Strukturen auf Leukozyten erkennt (Lowe et al., 1990; Phillips et al., 1990). Die Interaktion von E-Selektin mit diesen Glykoproteinen führt zu einer reversiblen Adhärenz von mononukleären Zellen an die Gefäßwand, auf der diese nun langsam entlang rollen und die sie auf Antigene sowie Zytokine/Chemokine absuchen.

E-Selektin vermittelt den ersten Schritt der Kaskade von Interaktionen zu Migration von Leukozyten ins Gewebe. Es stellte sich daher die Frage, ob in der frühen Phase der GvHD ein Anstieg dieses Moleküls zu beobachten ist.

In unbehandelten Mäusen wurde in keinem der untersuchten Organe E-Selektin nachgewiesen. Ein Effekt aufgrund der Bestrahlung war ebenfalls in keinem der Organe zu beobachten.

Im Ileum konnten an Tag 9 nach allogener Transplantation einzelne Zellen in der Lamina propria angefärbt werden. Im Colon erfolgte ein leichter Anstieg von E-Selektin an Tag 9 und Tag 22 nach allogener Transplantation, wobei auch an Tag 22 der autologen Gruppe ein Anstieg zu verzeichnen war. Somit kann die erhöhte Expression im Colon nicht allein auf allogene Stimuli zurückgeführt werden. E-Selektin scheint für

die GvHD im Darm eine untergeordnete Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu zeigt Norton et al. an humanen Rektumbiopsien einen Anstieg E-Selektin positiven Endothels bei Patienten mit GvHD (Norton et al., 1992).

In der Haut ist eine neu auftretende Expression von E-Selektin positiven Zellen in der Dermis der allogenen Gruppe an Tag 3 bis Tag 22 nach Transplantation nachzuweisen. Es handelt sich dabei um einzelne Zellen, die nicht mit den massiven Veränderungen in der murinen GvHD korrelieren. Untersuchungen von Hautbiopsien an GvHD erkrankter Patienten zeigen eine Erhöhung von E-Selektin bei histologisch voll ausgeprägter GvHD (Norton et al., 1991).

In der Leber wurde E-Selektin nicht oder nur auf vereinzelt Zellen in Gefäßwänden exprimiert. Die Transplantation hatte keinen Einfluß auf das Expressionsmuster.

Ein Einfluß von E-Selektin auf die murine GvHD konnte durch die vorliegende Untersuchung nicht sicher nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit bestünde darin, daß eine erste Untersuchung der Organe an Tag 3 nach Transplantation zu spät sein könnte, um eine Hochregulation von E-Selektin nachweisen zu können. Untersuchungen an bestrahlten Endothelzellen in vitro zeigten eine vermehrte Expression von E-Selektin nach 2 Stunden, die bereits nach 20 Stunden wieder auf den Ausgangswert zurückgefallen war. Im Gegensatz dazu begann die Expression von ICAM-1 erst 16 Stunden nach Bestrahlung und blieb über Tag erhöht (Hallahan et al., 1996).

Die Bedeutung von E-Selektin muß kritisch diskutiert werden. So wurde vor kurzem bekannt, daß unter physiologischen Bedingungen vor allem L-Selektin und β 7-Integrin für die vorübergehende Adhäsion von Lymphozyten in Peyersche Plaques im Darm zuständig sind, wobei P-Selektin vielmehr für die Rekrutierung von Lymphozyten in die Schleimhaut verantwortlich ist (Kunkel et al., 1998). Der Bedeutung von E-Selektin wird weiter in Untersuchungen an "knock-out" Mäusen nachgegangen, bei denen Fehlen von E-Selektin zu *milden* Störungen in der Rekrutierung von Entzündungszellen führte, ein Fehlen von P-Selektin dagegen zu *moderaten* Störungen führte (Jung and Ley, 1999). E-Selektin alleine ist für die Verlangsamung von Leukozyten im Blutfluß verantwortlich, sein Fehlen kann jedoch von anderen Selektinen kompensiert werden. Kubes et al. erklärte, daß 90% des "Rollings" blockiert werden müßte, um einen

therapeutischen Effekt der verminderten Lymphozytenaggregation in Entzündungen zu erzielen (Kubes et al., 1995). Daher scheint E-Selektin für zukünftige Blockierungsstudien kein aussichtsreicher Kandidat zu sein.

5.12 Expression von PECAM-1 in den Zielorganen der GvHD

PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1, CD31) ist ein wichtiges Signal für die Migration von Leukozyten durch die Gefäßwand (Muller et al., 1993). Es wurde bereits 1990 kloniert und der Immunglobulin Gen-Superfamilie zugeordnet (Newman et al., 1990), wobei PECAM-1 von Thrombozyten, Monozyten, Neutrophilen Granulozyten und aktivierten T-Zellen exprimiert wird (Ohto et al., 1985). Außerdem wurde beschrieben, daß endotheliales PECAM-1 in großer Menge im Interzellularspalt exprimiert wird und nur ca. 15% davon auf der Endotheloberfläche (Muller et al., 1989), wodurch ein apikal-basaler Gradient von PECAM-1 an den Gefäßwänden aufgebaut werden kann. Dieses Adhäsionsmolekül kann homophile Interaktionen (PECAM-1/PECAM-1) (Tanaka et al., 1992) oder heterophile Interaktionen (PECAM-1/L α V β ₃-Integrin) (Piali et al., 1995) eingehen. Die Emigration der Leukozyten aus dem Blutgefäßbett erfolgt in verschiedenen Stadien: Erstens Kontakt und Rollen, zweitens der festen Adhäsion und im dritten Schritt die Transendotheliale Migration. Im vorliegenden Versuch sollte untersucht werden, ob die Expression von PECAM-1 durch die murine GvHD beeinflusst wird.

In Ileum, Haut und Leber wurde PECAM-1 konstitutiv exprimiert. Weder die Konditionierung noch die Art der Transplantation beeinflussten die Expression in diesen Organen. Dieses Ergebnis war überraschend. Durch die Einwanderung aktivierter T-Zellen in die Zielorgane der GvHD, bzw. die Proliferation von T-Zellen, wäre ein Anstieg von PECAM-1 positiven Zellen im Ileum zu erwarten gewesen. Auch in der Haut wäre durch den Anstieg mononukleärer Zellen im Rahmen der GvHD vielmehr ein Anstieg der PECAM-1 Expression zu verstehen. In der Leber exprimierten ein Großteil der Blutgefäße sowie Sinusoide bereits PECAM-1 in den unbehandelten Tieren, so daß ein weitere vergleichsweise geringer Anstieg durch die nachgewiesene Einwanderung

von T-Zellen während der GvHD eventuell durch die angewendete Methode schwer abzugrenzen ist.

Einzig im Colon stieg die Expression von PECAM-1 ab Tag 9 nach allogener KMT an, und spiegelt damit einen Effekt der GvHD wieder.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die PECAM-1 Expression durch die GvHD nur wenig beeinflußt wird, oder mit der angewendeten immunhistochemischen Methode nicht als regulierte Größe identifiziert werden konnte.

Daß abweichend von den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung CD31 dennoch eine Rolle für die Induktion der GvHD zukommt, konnte durch Gabe von CD31-Peptiden im selben murinen GvHD-Modell (Mausstämme: B10D2→BALB.c) gezeigt werden. Dabei wurde der Beginn der GvHD verzögert, die Ausprägung abgemildert und die GvHD assoziierte Letalität von 100% auf 86% 100 Tag nach allogener Transplantation gesenkt (Chen et al., 1997). Weiterhin belegen Blockierungsstudien von CD31 in vitro, dessen Rolle für die Emigration von Monozyten und Neutophile Granulozyten durch eine Schicht von Endothelzellen (Muller et al., 1993).

Interessanterweise ist CD31 als mHLA (Minorhistokompatibilitätsantigen) identifiziert worden. Der Polymorphismus dieses Adhäsionsmoleküls korrelierte signifikant mit dem Auftreten akuter GvHD in Menschen nach allogener KMT (Behar et al., 1996; Maruya et al., 1998), obwohl Arbeiten einer anderen Arbeitsgruppe diesen Unterschied nicht bestätigen konnten (Nichols et al., 1980). Es liegen derzeit keine Daten vor, ob dieser Polymorphismus auch in der Maus existiert.

PECAM-1 wird konstitutiv auf Endothel, Thrombozyten und den meisten Leukozyten exprimiert. In der GvHD ist die Adhäsion durch die bereits beschriebenen vermehrte Expression von beispielsweise VCAM-1, ICAM-1 und verschiedenen Integrinen wie LFA-1 oder α 4-Integrine erhöht, so daß allein dadurch mehr Zellen die Gelegenheit haben, ins Gewebe zu wandern. Wird CD31 blockiert, so wird die Emigration aus den Gefäßen verhindert, wobei Adhäsion weiter stattfindet und PECAM-1 vor der Blockade für diesen Effekt nicht hochreguliert sein muß. Demgegenüber steht, daß PECAM-1 nur auf wenigen isolierten Lymphozyten aus gesunden Spendern exprimiert wird (Muller et al., 1993), wohingegen Ohto et al. PECAM-1 auf aktivierten T-Zellen vorfindet (Ohto et

al., 1985), was in der vorliegenden Untersuchung nicht nachvollzogen werden konnte. Aktivierte, nicht ruhende, CD4⁺ T-Zellen können während der Migration endotheliale Faktoren wie CD54, CD62E und CD31, durch Ektozytose der Endothelzellmembran, aufnehmen (Brezinschek et al., 1999). Weiterhin ist die Expression von CD31 auf Lymphozyten assoziiert mit naiven CD8⁺ CD45RA⁺ Zellen (Elias et al., 1998).

6 Zusammenfassung

Die GvHD stellt eine lebensbedrohliche Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation dar. Sowohl die akute als auch die chronische GvHD ist eine T-Zell vermittelte Reaktion gegen Zielgewebe des Empfängers. Eine Kaskade adhäsiver und kostimulatorischer Signale regulieren die T-Zellaktivierung. Die Expression ausgewählter Adhäsionsmoleküle wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. GvHD wurde in einem murinen Modell durch Transplantation von Knochenmarkstammzellen und Milzzellen eines MiHA (Nebenhistokompatibilitätsantigen) inkompatiblen Mäusestamms ausgelöst (Modell: B10.D2→ Balb.c). Autolog transplantierte Mäuse dienten als Kontrollgruppe (Balb.c→ Balb.c). Die Gewebsexpression selektierter Adhäsionsmoleküle wurde zum Zeitpunkt der Aplasie (Tag 3 nach KMT), des Anwachsens des Transplantats (Tag 9 nach KMT), des Auftretens erster klinischer Zeichen der GvHD in der allogenen transplantierten Gruppe (Tag 22 nach KMT) und im Stadium fortgeschrittener GvHD (Tag 28 nach KMT) in den typischen Zielorganen der GvHD untersucht. Es wurden histologische Präparate aus Ileum, Colon, Leber und Haut gewonnen, und Gefrierschnitte mit der ABC Immunperoxidase Technik gefärbt. Die Expression GvHD assoziierter Moleküle wurde in den Schnitten semiquantitativ bewertet.

Im Ileum wurden VCAM-1, ICAM-1 und B7-2 ab Tag 3 nach allogener Stammzelltransplantation verstärkt exprimiert, während ein Anstieg von α 4-Integrin, LFA-1, B7-1 sowie CD4- und CD8-positiver T-Zellen erst ab Tag 9 bzw. Tag 22 nach Transplantation beobachtet wurde. Im Colon fanden sich bis auf ICAM-1, das erst ab Tag 9 nach allogener Stammzelltransplantation über das Niveau der autologen Kontrolle anstieg, dieselben Ergebnisse wie sie bereits im Ileum zu sehen waren. In der Haut stiegen VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, α 4-Integrin, LFA-1, B7-1 und B7-2 jeweils ab Tag 9 nach allogener Transplantation, parallel zum vermehrten Auftreten von CD4, bzw. CD8 positiven T-Zellen an. In der Leber wurde ein Anstieg von VCAM-1, ICAM-1, α 4-Integrin, LFA-1 und CD4 positiven Zellen ab Tag 9 deutlich, wobei keines der anderen untersuchten Moleküle sich in seiner Expression von der Kontrollgruppe unterschied.

Die Untersuchung von ICAM-2 ergab ausschließlich in der Haut ab Tag 9 einen GvHD assoziierten Anstieg. Für PECAM-1, E-Selektin und MAdCAM-1 konnte in keinem der untersuchten Organe eine GvHD assoziierte Veränderung im Expressionsmuster nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit festgestellten organspezifischen sowie zeitlichen Unterschiede in der Expression selektierter Adhäsionsmoleküle leisten einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie muriner GvHD. Darüber hinaus ist hiermit die Grundlage für therapeutische Blockierungsstudien zur GvHD-Prophylaxe geschaffen.

7 Abkürzungsverzeichnis

APC	”Antigen presenting cells”
CD	”clusters of differentiation”
CLA	”cutaneous lymphocyte antigen”
CMV	”Cytomegalovirus”
GM-CSF	”Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”
GvHD	”Graft-versus-Host Disease”
GVL	”Graft-versus-Leukemia”
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Cell Sorter
HEV	”High endothelial venules”
HLA	”Human leukocyte antigen”
IBMTR	”International Bone Marrow Transplant Registry”
ICAM-1	”Intercellular adhesion molecule-1”
ICAM-2	”Intercellular adhesion molecule-2”
IL-1	Interleukin-1
KMT	Knochenmarktransplantation
LAD	”Leukocyte adhesion deficiency”
LFA-1	”Lymphocyte function-associated antigen-1”
LPS	Lipopolysaccharid
MAdCAM-1	”Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1”
MHC	Haupthistokompatibilitätsantigen, ”Major histocompatibility complex”,
MiHA	Nebenhistokompatibilitätsantigen, ”Minor histocompatibility antigen”
m-RNA	”messenger RNA”
Mtv	”Mouse mammary tumor virus”
NF- κ B	”Nuclear factor- κ B”
NK-Zellen	”Natural killer cells”
PECAM-1	”Platelet endothelial cell adhesion molecule-1”
Sle ^a	Sialyl Lewis ^a Strukturen
SLe ^x	Sialyl Lewis ^x Strukturen
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
VLA-4	”Very late activation molecule-1”
VCAM-1	”Vascular cell adhesion molecule-1”

8 Literaturverzeichnis

1. Anderson, D.C. and Springer, T.A. (1987). Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu.Rev.Med.* 38:175-94, 175-194.
2. Balduzzi, A., Gooley, T., Anasetti, C., Sanders, J.E., Martin, P.J., Petersdorf, E.W., Appelbaum, F.R., Buckner, C.D., Matthews, D., and Storb, R. (1995). Unrelated donor marrow transplantation in children. *Blood* 86, 3247-3256.
3. Behar, E., Chao, N.J., Hiraki, D.D., Krishnaswamy, S., Brown, B.W., Zehnder, J.L., and Grumet, F.C. (1996). Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft- versus-host disease [see comments]. *N.Engl.J.Med.* 334, 286-291.
4. Berg, E.L., McEvoy, L.M., Berlin, C., Bargatze, R.F., and Butcher, E.C. (1993). L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1 [see comments]. *Nature* 366, 695-698.
5. Berg, E.L., Yoshino, T., Rott, L.S., Robinson, M.K., Warnock, R.A., Kishimoto, T.K., Picker, L.J., and Butcher, E.C. (1991). The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J.Exp.Med.* 174, 1461-1466.
6. Berger, M., Wettstein, P.J., and Korngold, R. (1994). T cell subsets involved in lethal graft-versus-host disease directed to immunodominant minor histocompatibility antigens. *Transplantation* 57, 1095-1102.
7. Berlin, C., Bargatze, R.F., Campbell, J.J., von, A.U., Szabo, M.C., Hasslen, S.R., Nelson, R.D., Berg, E.L., Erlandsen, S.L., and Butcher, E.C. (1995). alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 80, 413-422.
8. Berlin, C., Berg, E.L., Briskin, M.J., Andrew, D.P., Kilshaw, P.J., Holzmann, B., Weissman, I.L., Hamann, A., and Butcher, E.C. (1993a). Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74, 185-185.
9. Berlin, C., Berg, E.L., Briskin, M.J., Andrew, D.P., Kilshaw, P.J., Holzmann, B., Weissman, I.L., Hamann, A., and Butcher, E.C. (1993b). Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74, 185-185.
10. Bevilacqua, M.P., Poher, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S., and Gimbrone, M.A.J. (1987). Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84, 9238-9242.
11. Billingham, R.E. (1966). The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey.Lect.* 62:21-78, 21-78.

12. Blazar, B.R., Sharpe, A.H., Taylor, P.A., Panoskaltsis-Mortari, A., Gray, G.S., Korngold, R., and Vallera, D.A. (1996). Infusion of anti-B7.1 (CD80) and anti-B7.2 (CD86) monoclonal antibodies inhibits murine graft-versus-host disease lethality in part via direct effects on CD4+ and CD8+ T cells. *J.Immunol.* *157*, 3250-3259.
13. Blazar, B.R., Taylor, P.A., Boyer, M.W., Panoskaltsis-Mortari, A., Allison, J.P., and Vallera, D.A. (1997). CD28/B7 interactions are required for sustaining the graft-versus-leukemia effect of delayed post-bone marrow transplantation splenocyte infusion in murine recipients of myeloid or lymphoid leukemia cells. *J.Immunol.* *159*, 3460-3473.
14. Blazar, B.R., Taylor, P.A., Gray, G.S., and Vallera, D.A. (1994). The role of T cell subsets in regulating the in vivo efficacy of CTLA4-Ig in preventing graft-versus-host disease in recipients of fully MHC or multiple minor histocompatibility-disparate donor inocula. *Transplantation* *58*, 1422-1426.
15. Blazar, B.R., Taylor, P.A., Panoskaltsis-Mortari, A., Gray, G.S., and Vallera, D.A. (1995). Coblockade of the LFA1:ICAM and CD28/CTLA4:B7 pathways is a highly effective means of preventing acute lethal graft-versus-host disease induced by fully major histocompatibility complex-disparate donor grafts. *Blood* *85*, 2607-2618.
16. Blazar, B.R., Taylor, P.A., Panoskaltsis-Mortari, A., Sharpe, A.H., and Vallera, D.A. (1999). Opposing roles of CD28:B7 and CTLA-4:B7 pathways in regulating in vivo alloresponses in murine recipients of MHC disparate T cells. *J.Immunol.* *162*, 6368-6377.
17. Brezinschek, R.I., Oppenheimer-Marks, N., and Lipsky, P.E. (1999). Activated T cells acquire endothelial cell surface determinants during transendothelial migration. *J.Immunol.* *162*, 1677-1684.
18. Butcher, E.C. and Picker, L.J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* *272*, 60-66.
19. Cavazzana-Calvo, M., Bordigoni, P., Michel, G., Esperou, H., Souillet, G., Leblanc, T., Stephan, J.L., Vannier, J.P., Mechinaud, F., Reiffers, J., Vilmer, E., Landman-Parker, J., Benkerrou, M., Baruchel, A., Pico, J., Bernaudin, F., Bergeron, C., Plouvier, E., Thomas, C., Wijdenes, J., Lacour, B., Blanche, S., and Fischer, A. (1996). A phase II trial of partially incompatible bone marrow transplantation for high-risk acute lymphoblastic leukaemia in children: prevention of graft rejection with anti-LFA-1 and anti-CD2 antibodies. *Societe Francaise de Greffe de Moelle Osseuse. Br.J.Haematol.* *93*, 131-138.
20. Cepek, K.L., Shaw, S.K., Parker, C.M., Russell, G.J., Morrow, J.S., Rimm, D.L., and Brenner, M.B. (1994). Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* *372*, 190-193.

21. Chen, Y., Schlegel, P.G., Tran, N., Thompson, D., Zehnder, J.L., and Chao, N.J. (1997). Administration of a CD31-derived peptide delays the onset and significantly increases survival from lethal graft-versus-host disease. *Blood* 89, 1452-1459.
22. Conner, E.M., Brand, S., Davis, J.M., Laroux, F.S., Palombella, V.J., Fuseler, J.W., Kang, D.Y., Wolf, R.E., and Grisham, M.B. (1997). Proteasome inhibition attenuates nitric oxide synthase expression, VCAM-1 transcription and the development of chronic colitis. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 282, 1615-1622.
23. Cosimi, A.B., Conti, D., Delmonico, F.L., Preffer, F.I., Wee, S.L., Rothlein, R., Faanes, R., and Colvin, R.B. (1990). In vivo effects of monoclonal antibody to ICAM-1 (CD54) in nonhuman primates with renal allografts. *J.Immunol.* 144, 4604-4612.
24. Diamond, M.S., Staunton, D.E., Marlin, S.D., and Springer, T.A. (1991). Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 65, 961-971.
25. Dilly, S.A. and Sloane, J.P. (1987). Changes in rectal leucocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin.Exp.Immunol.* 67, 151-158.
26. Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A., and Springer, T.A. (1986). Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J.Immunol.* 137, 245-254.
27. Dustin, M.L., Staunton, D.E., and Springer, T.A. (1988). Supergene families meet in the immune system. *Immunol.Today* 9, 213-215.
28. Elias, C.G., Spellberg, J.P., Karan-Tamir, B., Lin, C.H., Wang, Y.J., McKenna, P.J., Muller, W.A., Zukowski, M.M., and Andrew, D.P. (1998). Ligation of CD31/PECAM-1 modulates the function of lymphocytes, monocytes and neutrophils. *Eur.J.Immunol.* 28, 1948-1958.
29. Elices, M.J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M.E., and Lobb, R.R. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60, 577-584.
30. Ellison, C.A., HayGlass, K.T., Fischer, J.M., Rector, E.S., MacDonald, G.C., and Gartner, J.G. (1998). Depletion of natural killer cells from the graft reduces interferon-gamma levels and lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha release in F1 hybrid mice with acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 66, 284-294.
31. Falzarano, G., Krenger, W., Snyder, K.M., Delmonte, J.J., Karandikar, M., and Ferrara, J.L. (1996). Suppression of B-cell proliferation to lipopolysaccharide is

- mediated through induction of the nitric oxide pathway by tumor necrosis factor- α in mice with acute graft-versus-host disease. *Blood* 87, 2853-2860.
32. Flavin, T., Ivens, K., Rothlein, R., Faanes, R., Clayberger, C., Billingham, M., and Starnes, V.A. (1991). Monoclonal antibodies against intercellular adhesion molecule 1 prolong cardiac allograft survival in cynomolgus monkeys. *Transplant.Proc.* 23, 533-534.
 33. Forbes, G.M., Erber, W.N., Herrmann, R.P., Davies, J.M., and Collins, B.J. (1995). Immunohistochemical changes in sigmoid colon after allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *J.Clin.Pathol.* 48, 308-313.
 34. Freeman, G.J., Gray, G.S., Gimmi, C.D., Lombard, D.B., Zhou, L.J., White, M., Fingerroth, J.D., Gribben, J.G., and Nadler, L.M. (1991). Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7. *J.Exp.Med.* 174, 625-631.
 35. Freeman, G.J., Gribben, J.G., Boussiotis, V.A., Ng, J.W., Restivo, V.A.J., Lombard, L.A., Gray, G.S., and Nadler, L.M. (1993). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation [see comments]. *Science* 262, 909-911.
 36. Hallahan, D., Kuchibhotla, J., and Wyble, C. (1996). Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium. *Cancer Res.* 56, 5150-5155.
 37. Hamilton, B.L. (1987). L3T4-positive T cells participate in the induction of graft-vs-host disease in response to minor histocompatibility antigens. *J.Immunol.* 139, 2511-2515.
 38. Hanninen, A., Taylor, C., Streeter, P.R., Stark, L.S., Sarte, J.M., Shizuru, J.A., Simell, O., and Michie, S.A. (1993). Vascular addressins are induced on islet vessels during insulinitis in nonobese diabetic mice and are involved in lymphoid cell binding to islet endothelium. *J.Clin.Invest.* 92, 2509-2515.
 39. Harning, R., Pelletier, J., Lubbe, K., Takei, F., and Merluzzi, V.J. (1991). Reduction in the severity of graft-versus-host disease and increased survival in allogenic mice by treatment with monoclonal antibodies to cell adhesion antigens LFA-1 α and MALA-2. *Transplantation* 52, 842-845.
 40. Hathcock, K.S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P., and Hodes, R.J. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J.Exp.Med.* 180, 631-640.
 41. Hemler, M.E., Huang, C., and Schwarz, L. (1987a). The VLA protein family. Characterization of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130,000 molecular weight beta subunit. *J.Biol.Chem.* 262, 3300-3309.

42. Hemler, M.E., Huang, C., Takada, Y., Schwarz, L., Strominger, J.L., and Clabby, M.L. (1987b). Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides. *J.Biol.Chem.* 262, 11478-11485.
43. Henninger, D.D., Panes, J., Eppihimer, M., Russell, J., Gerritsen, M., Anderson, D.C., and Granger, D.N. (1997). Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J.Immunol.* 158, 1825-1832.
44. Higgins, J.M., Mandlebrot, D.A., Shaw, S.K., Russell, G.J., Murphy, E.A., Chen, Y.T., Nelson, W.J., Parker, C.M., and Brenner, M.B. (1998). Direct and regulated interaction of integrin alphaEbeta7 with E-cadherin. *J.Cell Biol.* 140, 197-210.
45. Howell, C.D., De, V.D., Li, J., Stephens, J., and Giorno, R.C. (1995). Liver T cell subsets and adhesion molecules in murine graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 16, 139-145.
46. Howell, C.D., Li, J., and Chen, W. (1999). Role of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 during nonsuppurative destructive cholangitis in a mouse graft-versus-host disease model. *Hepatology* 29, 766-776.
47. Hsu, S.M., Raine, L., and Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J.Histochem.Cytochem.* 29, 577-580.
48. Isobe, M., Yagita, H., Okumura, K., and Ihara, A. (1992). Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* 255, 1125-1127.
49. Jung, U. and Ley, K. (1999). Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J.Immunol.* 162, 6755-6762.
50. Klingebiel, T. and Schlegel, P.G. (1998). GVHD: overview on pathophysiology, incidence, clinical and biological features. *Bone Marrow Transplant.* 21 Suppl 2:S45-9, S45-S49
51. Korngold, B. and Sprent, J. (1978). Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J.Exp.Med.* 148, 1687-1698.
52. Korngold, R. and Sprent, J. (1987a). T cell subsets and graft-versus-host disease. *Transplantation* 44, 335-339.
53. Korngold, R. and Sprent, J. (1987b). Variable capacity of L3T4+ T cells to cause lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers in mice. *J.Exp.Med.* 165, 1552-1564.

54. Kraal, G., Schornagel, K., Streeter, P.R., Holzmann, B., and Butcher, E.C. (1995). Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in the spleen. *Am.J.Pathol.* 147, 763-771.
55. Kubes, P., Jutila, M., and Payne, D. (1995). Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J.Clin.Invest.* 95, 2510-2519.
56. Kunkel, E.J., Ramos, C.L., Steeber, D.A., Muller, W., Wagner, N., Tedder, T.F., and Ley, K. (1998). The roles of L-selectin, beta 7 integrins, and P-selectin in leukocyte rolling and adhesion in high endothelial venules of Peyer's patches. *J.Immunol.* 161, 2449-2456.
57. Kurzinger, K., Reynolds, T., Germain, R.N., Davignon, D., Martz, E., and Springer, T.A. (1981). A novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): cellular distribution, quantitative expression, and structure. *J.Immunol.* 127, 596-602.
58. Lenschow, D.J., Su, G.H., Zuckerman, L.A., Nabavi, N., Jellis, C.L., Gray, G.S., Miller, J., and Bluestone, J.A. (1993). Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA- 4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90, 11054-11058.
59. Liu, Y. and Janeway, C.A.J. (1992). Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89, 3845-3849.
60. Lowe, J.B., Stoolman, L.M., Nair, R.P., Larsen, R.D., Berhend, T.L., and Marks, R.M. (1990). ELAM-1--dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell* 63, 475-484.
61. Maric, M. and Liu, Y. (1999). Strong cytotoxic T lymphocyte responses to a macrophage inflammatory protein 1alpha-expressing tumor: linkage between inflammation and specific immunity [In Process Citation]. *Cancer Res.* 59, 5549-5553.
62. Maruya, E., Saji, H., Seki, S., Fujii, Y., Kato, K., Kai, S., Hiraoka, A., Kawa, K., Hoshi, Y., Ito, K., Yokoyama, S., and Juji, T. (1998). Evidence that CD31, CD49b, and CD62L are immunodominant minor histocompatibility antigens in HLA identical sibling bone marrow transplants. *Blood* 92, 2169-2176.
63. McHale, J.F., Harari, O.A., Marshall, D., and Haskard, D.O. (1999). Vascular endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 at the onset of eliciting contact hypersensitivity in mice: evidence for a dominant role of TNF-alpha. *J.Immunol.* 162, 1648-1655.
64. Miconnet, I., de La, S.V., and Bruley-Rosset, M. (1998). Relative importance of CD4+ and CD8+ T cell repertoires in the development of acute graft-versus-host disease in a murine model of bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 21, 583-590.

65. Miconnet, I., Roger, T., Seman, M., and Bruley-Rosset, M. (1995). Critical role of endogenous Mtv in acute lethal graft-versus-host disease. *Eur.J.Immunol.* 25, 364-368.
66. Miller, B.A., Antognetti, G., and Springer, T.A. (1985). Identification of cell surface antigens present on murine hematopoietic stem cells. *J.Immunol.* 134, 3286-3290.
67. Mitra, R.S., Judge, T.A., Nestle, F.O., Turka, L.A., and Nickoloff, B.J. (1995). Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression. *J.Immunol.* 154, 2668-2677.
68. Muller, W.A., Ratti, C.M., McDonnell, S.L., and Cohn, Z.A. (1989). A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J.Exp.Med.* 170, 399-414.
69. Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X., and Phillips, D.M. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J.Exp.Med.* 178, 449-460.
70. Nakache, M., Berg, E.L., Streeter, P.R., and Butcher, E.C. (1989). The mucosal vascular addressin is a tissue-specific endothelial cell adhesion molecule for circulating lymphocytes. *Nature* 337, 179-181.
71. Newman, P.J., Berndt, M.C., Gorski, J., White, G.C., Lyman, S., Paddock, C., and Muller, W.A. (1990). PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247, 1219-1222.
72. Nichols, W.C., Antin, J.H., Lunetta, K.L., Terry, V.H., Hertel, C.E., Wheatley, M.A., Arnold, N.D., Siemieniak, D.R., Boehnke, M., and Ginsburg, D. (1988). Polymorphism of adhesion molecule CD31 is not a significant risk factor for graft-versus-host disease. *Blood* 88, 4429-4434.
73. Norton, J., al-Saffar, N., and Sloane, J.P. (1992). Adhesion molecule expression in human hepatic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 10, 153-156.
74. Norton, J. and Sloane, J.P. (1991). ICAM-1 expression on epidermal keratinocytes in cutaneous graft-versus-host disease. *Transplantation* 51, 1203-1206.
75. Norton, J. and Sloane, J.P. (1994). A prospective study of cellular and immunologic changes in skin of allogeneic bone marrow recipients. Relationship to clinical and histologic features of acute graft-versus-host disease. *Am.J.Clin.Pathol.* 101, 597-602.
76. Norton, J., Sloane, J.P., al-Saffar, N., and Haskard, D.O. (1991). Vessel associated adhesion molecules in normal skin and acute graft-versus-host disease. *J.Clin.Pathol.* 44, 586-591.

77. Norton, J., Sloane, J.P., al-Saffar, N., and Haskard, D.O. (1992). Expression of adhesion molecules in human intestinal graft-versus-host disease. *Clin.Exp.Immunol.* 87, 231-236.
78. Ohto, H., Maeda, H., Shibata, Y., Chen, R.F., Ozaki, Y., Higashihara, M., Takeuchi, A., and Tohyama, H. (1985). A novel leukocyte differentiation antigen: two monoclonal antibodies TM2 and TM3 define a 120-kd molecule present on neutrophils, monocytes, platelets, and activated lymphoblasts. *Blood* 66, 873-881.
79. Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., and Lobb, R. (1989). Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59, 1203-1211.
80. Osborn, L., Vassallo, C., and Benjamin, C.D. (1992). Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *J.Exp.Med.* 176, 99-107.
81. Patel, R.T., Pall, A.A., Adu, D., and Keighley, M.R. (1995). Circulating soluble adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 7, 1037-1041.
82. Phillips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C., Perez, M., Singhal, A.K., Hakomori, S., and Paulson, J.C. (1990). ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science* 250, 1130-1132.
83. Piali, L., Hammel, P., Uherek, C., Bachmann, F., Gisler, R.H., Dunon, D., and Imhof, B.A. (1995). CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J.Cell Biol.* 130, 451-460.
84. Picarella, D., Hurlbut, P., Rottman, J., Shi, X., Butcher, E., and Ringler, D.J. (1997). Monoclonal antibodies specific for beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RB^{high} CD4⁺ T cells. *J.Immunol.* 158, 2099-2106.
85. Prentice, H.G., Blacklock, H.A., Janossy, G., Gilmore, M.J., Price-Jones, L., Tidman, N., Trejdosiewicz, L.K., Skeggs, D.B., Panjwani, D., and Ball, S. (1984). Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients. *Lancet* 1, 472-476.
86. Pruijt, J.F., van, K.Y., Figdor, C.G., Lindley, I.J., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (1998). Anti-LFA-1 blocking antibodies prevent mobilization of hematopoietic progenitor cells induced by interleukin-8. *Blood* 91, 4099-4105.

87. Rice, G.E., Munro, J.M., and Bevilacqua, M.P. (1990). Inducible cell adhesion molecule 110 (ICAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/CD18-independent adhesion mechanism. *J.Exp.Med.* *171*, 1369-1374.
88. Rossiter, H., van, R.F., Mudde, G.C., Kalthoff, F., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Picker, L.J., and Kupper, T.S. (1994). Skin disease-related T cells bind to endothelial selectins: expression of cutaneous lymphocyte antigen (CLA) predicts E-selectin but not P-selectin binding. *Eur.J.Immunol.* *24*, 205-210.
89. Rothlein, R., Dustin, M.L., Marlin, S.D., and Springer, T.A. (1986). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J.Immunol.* *137*, 1270-1274.
90. Roy, J., Platt, J.L., and Weisdorf, D.J. (1993). The immunopathology of upper gastrointestinal acute graft-versus-host disease. Lymphoid cells and endothelial adhesion molecules. *Transplantation* *55*, 572-578.
91. Rudd, C.E. (1996). Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity.* *4*, 527-534.
92. Sans, M., Panes, J., Ardite, E., Elizalde, J.I., Arce, Y., Elena, M., Palacin, A., Fernandez-Checa, J.C., Anderson, D.C., Lobb, R., and Pique, J.M. (1999). VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* *116*, 874-883.
93. Schlegel, P.G. (1997). The role of adhesion and costimulation molecules in graft-versus-host disease. *Acta Haematol.* *97*, 105-117.
94. Schlegel, P.G., Vaysburd, M., Chen, Y., Butcher, E.C., and Chao, N.J. (1995). Inhibition of T cell costimulation by VCAM-1 prevents murine graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. *J.Immunol.* *155*, 3856-3865.
95. Shiohara, T., Moriya, N., Gotoh, C., Saizawa, K., and Nagashima, M. (1988). Locally administered monoclonal antibodies to lymphocyte function-associated antigen 1 and to L3T4 prevent cutaneous graft-vs-host disease. *J.Immunol.* *141*, 2261-2267.
96. Slich, J.E.J., Ballantyne, C.M., Rich, S.S., Hawkins, H.K., Smith, C.W., Bradley, A., and Beaudet, A.L. (1993). Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *90*, 8529-8533.
97. Socie, G., Stone, J.V., Wingard, J.R., Weisdorf, D., Henslee-Downey, P.J., Bredeson, C., Cahn, J.Y., Passweg, J.R., Rowlings, P.A., Schouten, H.C., Kolb, H.J., and Klein, J.P. (1999). Long-term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. Late Effects Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry [see comments]. *N.Engl.J.Med.* *341*, 14-21.

98. Staunton, D.E., Dustin, M.L., and Springer, T.A. (1989). Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339, 61-64.
99. Staunton, D.E., Marlin, S.D., Stratowa, C., Dustin, M.L., and Springer, T.A. (1988). Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 52, 925-933.
100. Steeber, D.A., Tang, M.L., Green, N.E., Zhang, X.Q., Sloane, J.E., and Tedder, T.F. (1999). Leukocyte entry into sites of inflammation requires overlapping interactions between the L-selectin and ICAM-1 pathways. *J.Immunol.* 163, 2176-2186.
101. Strassmann, G., Springer, T.A., Haskill, S.J., Miraglia, C.C., Lanier, L.L., and Adams, D.O. (1985). Antigens associated with the activation of murine mononuclear phagocytes in vivo: differential expression of lymphocyte function-associated antigen in the several stages of development. *Cell Immunol.* 94, 265-275.
102. Streeter, P.R., Berg, E.L., Rouse, B.T., Bargatze, R.F., and Butcher, E.C. (1988). A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* 331, 41-46.
103. Tanaka, Y., Albelda, S.M., Horgan, K.J., van, S.G., Shimizu, Y., Newman, W., Hallam, J., Newman, P.J., Buck, C.A., and Shaw, S. (1992). CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of beta 1 integrin-mediated adhesion. *J.Exp.Med.* 176, 245-253.
104. Tanneau, G.M., Oyant, L.H., Chevaleyre, C.C., and Salmon, H.P. (1999). Differential Recruitment of T- and IgA B-lymphocytes in the Developing Mammary Gland in Relation to Homing Receptors and Vascular Addressins. *J.Histochem.Cytochem.* 47, 1581-1592.
105. Thomas, E.D., Storb, R., Clift, R.A., Fefer, A., Johnson, L., Neiman, P.E., Lerner, K.G., Glucksberg, H., and Buckner, C.D. (1975). Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N.Engl.J.Med.* 292, 895-902.
106. Tsujino, K., Kodama, A., Kanaoka, N., Maruta, T., and Kono, M. (1999). Expression of pulmonary mRNA encoding ICAM-1, VCAM-1, and P-selectin following thoracic irradiation in mice [In Process Citation]. *Radiat.Med.* 17, 283-287.
107. Veale, D., Rogers, S., and Fitzgerald, O. (1995). Immunolocalization of adhesion molecules in psoriatic arthritis, psoriatic and normal skin. *Br.J.Dermatol.* 132, 32-38.
108. Vonderheide, R.H. and Springer, T.A. (1992). Lymphocyte adhesion through very late antigen 4: evidence for a novel binding site in the alternatively spliced

domain of vascular cell adhesion molecule 1 and an additional alpha 4 integrin counter-receptor on stimulated endothelium. *J.Exp.Med.* 175, 1433-1442.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Paul-Gerhardt Schlegel für die Überlassung des interessanten Themas und wertvollen wissenschaftlichen Rat.

Herrn Prof. Dr. Niethammer danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit in der Abteilung I der Kinderklinik durchführen zu können.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern für die angenehme Arbeitsatmosphäre in den Laboratorien der Kinderklinik bedanken.

Herrn Peter Weber danke ich für seine Hilfe beim Erstellen der Graphiken.

Mein Dank gilt dem *fortune*-Programm der Universität Tübingen, das mich im Rahmen des Projektes 283 vom 01.10.98 bis 31.03.99 gefördert hat.

10 Lebenslauf

Name	Gudrun Burger
Geburtsort	25.02.1970 Wangen im Allgäu
Schulbildung	1980-86 Realschule in Wangen im Allgäu 1991-94 Kolping Kolleg in Freiburg (Staatlich anerkannte Ersatzschule zur Erlangung der allgemeinen Hochschulreife)
Berufsausbildung	08.1986-06.1989 Ausbildung zur Biologielaborantin bei der Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach-Riss.
Berufstätigkeit	07.1989-06.1991 Biologielaborantin bei Dr. G. Friedrich, Pharmbiodyn, Freiburg-Denzlingen. 09.1994-11.1994 Biologielaborantin in der Abteilung Klinische Chemie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. 01-02.1995 Praktikantin im Forschungslabor der Abteilung für Knochenmarktransplantation der Stanford University, Kalifornien, USA. 05.1995-09.1996 „Clinical Research Assistant“ an der Stanford University, Abteilung Knochenmarktransplantation, Kalifornien, USA.
Universitätsausbildung	Seit 10.1996 Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. 02.09.1998 Ärztliche Vorprüfung 23.03.2000 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 09.97-08.00 Arbeit an der Dissertation im Fachbereich Humanmedizin an der Kinderklinik Tübingen, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Schlegel. 10.98-03.99 Förderung durch das <i>fortune</i> -Programm der Universität Tübingen, Projekt 283. 18.09.2001 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 07.11.2002 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung