

Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin

Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer

**Untersuchungen zur Prävention
der Graft-versus-Host Erkrankung im murinen Modell
durch den Einsatz neuer synthetischer Peptide**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Barbara Ann Röllinghoff
aus
Tübingen**

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichtstatter: Professor Dr. P.-G. Schlegel
2. Berichtstatter: Professor Dr. H. Einsele

Für meine Eltern

*We dance round in a ring and suppose
but the secret sits in the middle and knows...*

Robert Frost

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Allogene Knochenmark-und Stammzelltransplantation in der Pädiatrie	1
1.2 Die Graft-versus-Host Erkrankung (GVHD)	2
1.3 Immunologische Grundlagen	4
1.3.1 Die Entstehung der T-Zellantwort.....	4
1.3.2 Minor Histokompatibilitätsantigene (mHA _g).....	6
1.3.3 Superantigene.....	8
1.4 Möglichkeiten der Prävention einer GVHD in Forschung und Klinik	10
1.5 Fragestellung	13
2 Material	14
2.1 Glaswaren	14
2.2 Geräte	14
2.3 Puffer und Lösungen	15
2.4 Herstellung von Gebrauchslösungen	17
2.5 Verwendete synthetisch hergestellte Peptide	17
2.5.1 Peptidsynthese.....	17
2.5.2 Die Vorhersage von T-Zellepitopen mit Hilfe der Internetdatenbank SYFPEITHI.....	18
2.5.3 Charakterisierung einzelner Peptide.....	18
2.6 Seren	20
2.7 Verwendete Antikörper	21
2.8 Sonstige Materialien	22
2.9 Verwendete Tierstämme	22
2.10 Mikroskop	23

3 Methoden	25
3.1 Bestrahlung der Mäuse	25
3.2 Allogene Knochenmarktransplantation der Mäuse	25
3.2.1 Gewinnung des Knochenmark.....	25
3.2.2 Gewinnung der Milzzellen.....	26
3.2.3 Transplantation.....	26
3.3 Behandlung der transplantierten Mäuse	27
3.4 Nachweisparameter der Graft-versus-Host Erkrankung	27
3.5 Sektion der Mäuse und Fixierung der Organe	28
3.6 Herstellung von Gefrierschnitten	28
3.7 Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten	29
3.8 Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Gefrierschnitten	31
3.9 Kontrollfärbungen	31
3.10 Semiquantitative Beurteilung der gefärbten Schnitte	32
3.11 Digitale Bildverarbeitung und computergesteuerte Auswertung	32
4 Ergebnisse	34
4.1 Prävention der GVHD durch den Einsatz synthetisch her- gestellter allelspezifischer Peptide im murinen Modell	34
4.2 Effekte der Applikation synthetisch hergestellter definierter Peptide auf die Induktion makroskopischer GVHD im Modell B10.D2? Balb/c (H-2^d)	35
4.3 Gewichtsverläufe nach Knochenmarktransplantation von Balb/c-Mäusen	37
4.4 Immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten des Kolon knochenmarktransplantierter Mäuse	38
4.4.1 Immunhistochemische Färbung von CD4 im Kolon.....	39
4.4.2 Immunhistochemische Färbung von CD8 im Kolon.....	41
4.4.3 Immunhistochemische Färbung von α 4-Integrin (CD49d) im Kolon.....	43
4.4.4 Immunhistochemische Färbung von VCAM-1 im Kolon....	45

4.5 Immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten des Ileum	
knochenmarktransplantierte Mäuse.....	46
4.5.1 Immunhistochemische Färbung von CD4 im Ileum.....	46
4.5.2 Immunhistochemische Färbung von CD8 im Ileum.....	49
4.5.3 Immunhistochemische Färbung von α 4-Integrin im Ileum..	51
4.5.4 Immunhistochemische Färbung von VCAM-1 im Ileum.....	52
4.6 Immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten der Haut	
knochenmarktransplantierte Mäuse.....	54
4.6.1 Immunhistochemische Färbung von CD4 in der Haut.....	54
4.6.2 Immunhistochemische Färbung von CD8 in der Haut.....	56
4.7 Computergestützte Auswertung der immunhistochemischen	
Färbung (CD4) des Kolon knochenmarktransplantierte	
Mäuse.....	58
4.8 Immunfluoreszenzdoppelfärbung CD3/CD4 von Gefrier-	
schnitten des Ileum knochenmarktransplantierte Mäuse.....	59
5 Diskussion	60
5.1 Methodik.....	60
5.1.1 Wahl des Modells.....	60
5.1.2 Wahl der Auswertungsmethode.....	61
5.1.3 Wahl der untersuchten Oberflächenmarker.....	62
5.2 Ergebnisse mit MHC-Klasse II bindenden allelspezifischen	
Peptiden.....	65
5.2.1 Grundlagen.....	65
5.2.2 Mögliche Wirkungsweisen der eingesetzten HLA-spezi-	
fischen Peptide.....	67
5.3 Vergleich der eingesetzten Peptide CLIP, Cop-CLIP 10 und	
APE 20 zur Prävention der GVHD.....	72
5.4 Prävention der GVHD über Blockade einer Superantigen-	
induzierten T-Zellantwort durch die Peptide TCR oder	
APE-Spacer-TCR?.....	76
5.5 Ausblick.....	78

6 Zusammenfassung	80
7 Abkürzungsverzeichnis	82
8 Literaturverzeichnis	83

1 Einleitung

1.1 Allogene Knochenmark- und Stammzelltransplantation in der Pädiatrie

Seit 1968 erstmals erfolgreich allogene Stammzelltransplantationen bei Kindern mit angeborenen Immundefekten durchgeführt wurden, haben inzwischen unzählige Patienten mit malignen und non-malignen Erkrankungen von dieser effektiven Therapiemöglichkeit profitiert (Bach et al., 1968; Gatti et al., 1968). Laufende Schätzungen gehen von weltweit 30.000-40.000 Stammzelltransplantationen pro Jahr aus - bei kontinuierlicher Zunahme.

Im Rahmen interdisziplinärer Therapiekonzepte, die je nach Grunderkrankung auch Elemente wie Chemotherapie, Tumorsektion und Strahlentherapie beinhalten, wurde die Knochenmark- und Stammzelltransplantation in den 70er Jahren vor allem bei nicht-malignen Störungen des hämatopoetischen Systems (aplastische Anämien und angeborene Immundefekte) eingesetzt. Heutzutage bilden Kinder und Jugendliche mit akuten und chronischen Leukämien sowie disseminierten soliden Tumoren die Hauptzielgruppe (Niethammer et al., 1996). Verglichen mit der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit nach konventioneller Therapie profitieren vor allem Patienten in erster oder zweiter Remission akuter Leukämien von dieser Therapieoption. Im Bereich solider Tumoren hat sich die Transplantation autologer Stammzellen inzwischen auch zur Therapie des metastasierten Neuroblastoms bei Kindern jenseits des ersten Lebensjahres oder bei Kindern mit Amplifikation des n-myc Gens durchgesetzt. Es ist Gegenstand intensiver klinischer Studien, inwieweit sich auch Patienten mit anderen disseminierten Tumoren (generalisiertes Ewing-Sarkom, Rhabdomyosarkom) als Kandidaten für die Stammzelltransplantation qualifizieren (Michon und Schleiermacher, 1999; Kanold et al., 2000).

Als autologe Transplantation wird die Reinfusion eigener, während einer Remission entnommener Knochenmarks- oder Blutstammzellen bezeichnet, während man unter allogener Transplantation die Transplantation von Material eines immungenetisch

fremden Spenders versteht. Das Prinzip der allogenen Knochenmarktransplantation besteht in der Transfusion hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark (Knochenmarkstammzellen) oder aus dem peripheren Blut (periphere Blutstammzellen) gesunder Spender in den vorbehandelten Empfänger. Die Wahl zwischen peripheren Blut- oder Knochenmarkzellen als Stammzellquelle orientiert sich am Nutzen-Risiko-Profil des Spenders und Empfängers, wobei sich in den letzten Jahren einige Vorteile zugunsten der peripheren Blutstammzelltransplantation abzeichnen. Hier sind vor allem ein schnelleres Anwachsen (engl. "engraftment") des Transplantats und das Fehlen eines Narkoserisikos für den Spender zu nennen. Seitdem die Mobilisierung der Stammzellen in das periphere Blut durch Behandlung mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wesentlich erleichtert wurde, besteht außerdem die Möglichkeit der wiederholten Gewinnung, die auch im Kindesalter schon durchführbar ist (Watanabe et al., 2000).

1.2 Die Graft-versus-Host-Erkrankung (GVHD)

Die akute und chronische Transplantat-gegen-Empfänger Erkrankung (engl. "Graft-versus-Host-Disease", GVHD) ist eine lebensbedrohliche Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation von Geschwisterspendern und von nichtverwandten Spendern.

Der Begriff der Graft-versus-Host-Disease wurde erstmalig 1958 von Simonsen in Tierstudien eingeführt und beschreibt eine T-Zell-vermittelte Reaktion gegen Zielgewebe des Empfängers (Simonsen, 1962; Korngold und Sprent, 1987b; Berger et al., 1994). Unter den verschiedenen im Knochenmark- oder Stammzelltransplantat enthaltenen Zellpopulationen, die unter anderem für das Anwachsen des Transplantats von großer Bedeutung sind, erkennen immunkompetente Spender-T-Zellen allogene Oberflächenantigene auf Empfängerzellen als fremd, werden aktiviert und reagieren mit klonaler Expansion, die die Ausbildung entzündlicher Prozesse zur Folge hat.

1966 definierte Billingham erstmals in seinen "Harvey lectures" die drei entscheidenden und auch heute noch zutreffenden immunologischen Voraussetzungen für die Entwicklung einer 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).

Zum klinischen Erscheinungsbild der akuten GVHD, die man pathophysiologisch in drei Phasen unterteilen kann, kommt es schließlich innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation. Über proinflammatorische Veränderungen der Endothel- und Epithelzellen des Empfängergewebes getriggert, erkennen reife T-Zellen, die im allogenen Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantat enthalten sind, dieses Empfängergewebe als fremd. Die verschiedenen Mechanismen der T-Zellaktivierung führen letztendlich zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (v.a IL-1, IL-2, TNF- α und IFN- γ) mit entzündlichen Reaktionen der Zielorgane Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber, die je nach Grad der Gewebsinkompatibilität, der Zahl der transplantierten T-Zellen und des Alters des Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt sein können (Holler et al., 1990; Ferrara et al., 1991). Insofern wird die akute GVHD nach neuesten Modellvorstellungen als Störung im Zytokinnetzwerk betrachtet (Mosman et al., 1986; Sad et al., 1995; Krenger et al., 1996).

Im Gegensatz zur akuten Form der GVHD imponiert die chronische Variante als ein autoimmunähnliches Syndrom, das ab Tag 100 nach Transplantation auftritt. Die chronische Form kann sowohl auf dem Boden einer akuten GVHD als auch de novo entstehen.

Als eine der Hauptkomplikationen der allogenen Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation liegt die Häufigkeit der GVHD trotz HLA-Identität und intensiver immunsuppressiver Therapie je nach Studie zwischen 10 und 80%. Balduzzi untersuchte 88 Kinder, die mit Stammzellen von nichtverwandten Spendern behandelt wurden, wobei 46 Patienten Transplantate von HLA-identischen Spendern und 42 Patienten Transplantate mit inkompatiblen Nebenhistokompatibilitätsantigenen (mHAg) erhielten. Die Inzidenz der akuten GVHD betrug in dieser Serie 83% in der HLA-identischen Gruppe und 98% in der mHAg-inkompatiblen Gruppe. 60% der Kinder entwickelten eine chronische GVHD (Balduzzi et al., 1995). Nach einer anderen Studie mit Stammzelltransplantationen von HLA-identischen Geschwisterspendern

entwickelten 13% der transplantierten Kinder unter 10 Jahren, 28% der Jugendlichen zwischen 10 und 19 Jahren und 42-46% der Erwachsenen eine chronische GVHD (Klingebl und Schlegel, 1998).

1.3 Immunologische Grundlagen

1.3.1 Die Entstehung der T-Zell Antwort

Ursächlich für die Auslösung einer Immunantwort im Zusammenhang mit der GVHD ist die Erkennung von alloenen Oberflächenantigenen durch immunkompetente Spender-T-Zellen. An diesem Erkennungsprozess sind vor allem die Major-Histokompatibilitäts-Komplexe (MHC; beim Menschen wird synonym der Begriff HLA verwendet) des Empfängerorgans beteiligt, die die individuelle immunologische Identität definieren. MHCs werden von einer Anzahl an Genen kodiert, die innerhalb eines kontinuierlichen Genabschnitts von ca. 3,5 MBp auf dem Chromosom 6 organisiert sind. Dieser Genabschnitt ist hoch polymorph, wobei beim Menschen von jedem der beiden vorhandenen Chromosomen (paternal und maternal) je drei Individuen-spezifische Allele für die sogenannten MHC-I und MHC-II Moleküle abgelesen werden. Hierbei stellen Klasse-I MHC-Komplexe transmembrane Glykoproteine dar, welche auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden und zuvor intrazellulär prozessierte endogene Peptidantigene cytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$ -Zellen) präsentieren (Song et al., 1996). Im Gegensatz dazu werden exogene Peptidantigene nach intrazellulärer Prozessierung von Klasse-II MHC-Molekülen vorwiegend T-Helferzellen ($CD4^+$ -Zellen) präsentiert (Abb. 1.1 A). Diese MHC-II Moleküle werden dabei fast ausschließlich von sogenannten „professionellen“ antigenpräsentierenden-Zellen, wie Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen auf ihrer Oberfläche exprimiert (Klein und Sato, 2000).

Die entstehenden Komplexe aus Klasse-I respektive Klasse-II MHC-Molekül und gebundenem Peptid stellen antigene Determinanten dar, welche von T-Zellen über deren T-Zell Rezeptor (TCR) erkannt werden. Dieser TCR setzt sich aus zwei Ketten

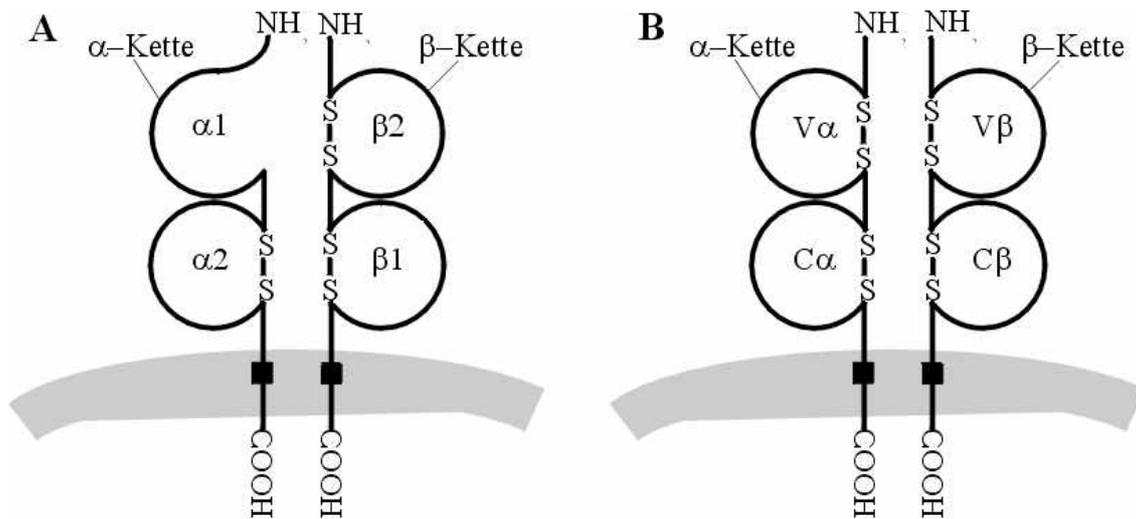


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des MHC-II-Moleküls (A) und des T-Zell Rezeptors (B)

zusammen (ca. 95 % aus einer α - und β - und ca. 5 % aus einer γ - und δ -Kette), wobei beide Ketten über eine intermolekulare Disulfidbrücke ein funktionelles Heterodimer bilden (Abbildung 1.1 B). Die für die TCR-Untereinheiten kodierenden Gene sind in Form einer multigenen Familie organisiert, wobei analog zu den Immunglobulinen verschiedene Gensegmente durch Rekombinationsprozesse und alternatives Splicing zu den TCR-Genprodukten mit folglich hoher Diversität (bis zu 160 Milliarden Kombinationsmöglichkeiten) rearrangiert werden (Ashwell und Klausner, 1990). Die so entstehenden hochvariablen T-Zell Klone erkennen spezifisch ein Antigen, welches ihnen als antigenes Peptid durch die MHC-Komplexe präsentiert wird. T-Zell-Klone, die körpereigene Peptide erkennen, werden durch negative und positive Selektion während der Reifung des Immunsystems deletiert, wodurch gewährleistet ist, daß nur der Kontakt mit einem als „fremd“ erkannten Antigen-HLA-Molekül-Komplex zur Aktivierung reifer T-Zellen führt (Blackman et al., 1990; Ransdell und Fowlkes, 1990).

Zusätzlich benötigen reife T-Zellen neben diesem antigen-spezifischen Signal, das über den T-Zellrezeptor vermittelt wird, zur vollständigen Aktivierung ein weiteres, sogenanntes kostimulatorisches Signal. Dieses wird durch definierte Rezeptoren über die Antigen-präsentierende Zelle an die murine oder humane T-Zelle vermittelt und erfordert direkten Zell-Zell-Kontakt. Verschiedene Rezeptoren sind als potentielle kostimulatorische Moleküle erarbeitet worden, insbesondere Transmembranrezeptoren

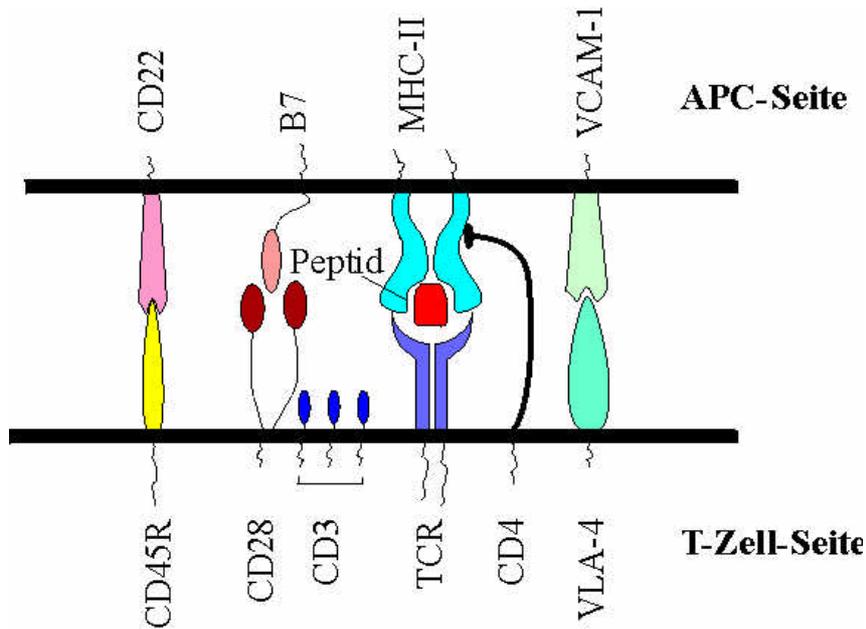


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Wechselwirkung von T-Helfer Zeller und Antigen präsentierender Zelle

mit eigener Signaltransduktion wie CD2, CD28, CD45R und VLA4 (Abb. 1.2). Auch der TCR selbst ist in den CD3-Komplex integriert, von dem kostimulatorische Signale ausgehen. Da auch die T-Zellaktivierung im Rahmen der Induktionsphase der akuten GVHD komplexe kostimulatorische Signale beinhaltet, ergeben sich erfolgversprechende experimentelle Ansätze zur Prävention dieser T-Zell-vermittelten Erkrankung über die Blockade dieser Signale. (Weiss und Imboden, 1987; Damle et al., 1992; Tanaka et al., 2000).

1.3.2 Minor Histokompatibilitäts-Antigene (mHAg)

Selbst in Transplantationssettings, in denen nach HLA-Typisierung MHC-Differenzen ausgeschlossen werden konnten, treten zu einem gewissen Prozentsatz Graft-versus-Host Reaktionen auf. Für diese Abstoßungsreaktionen nach HLA-identischer Transplantation werden die Minor-Histokompatibilitätsantigene (mHAg) verantwortlich gemacht (Den Haan, 1995), die nach neueren Erkenntnissen Peptidsequenzen darstellen,

die von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche Antigen-präsentierender Zellen präsentiert werden (Wallny und Rammensee, 1990; Simpson, 1998).

Während im Mausgenom über 40 verschiedene Minor-Histokompatibilitätsloci beschrieben werden (Roopenian et al., 1993), ist es derzeit Gegenstand der Forschung, auch für humane mHAg kodierende Gene zu identifizieren. Es ist beschrieben, daß in bestimmten Fällen integrierte retrovirale Genomsequenzen für das mH-Genprodukt kodieren oder dessen Expression kontrollieren, während nach Wettstein et al. auch DNA-(Papova) Viren für mHAg kodieren können (Simpson, 1987; Wettstein et al., 1988).

Eine Vielzahl von Minor-Antigenen weisen eine spezifische Gewebsverteilung auf (Griem et al., 1991). Eine im Menschen sowie in der Maus je nach Spender-Empfänger-Konstellation vorliegende Gewebsspezifität der GVHD-induzierten Läsionen ist möglicherweise Folge dieser lokalisierten mHAg-Anordnung und könnte eine Ursache des Organotropismus der GVHD darstellen. Im Gegensatz zu MHC-Antigenen, die sowohl T- als auch B- Zell-Antworten induzieren, ist die Immunantwort auf mHAg ausschließlich T-Zell-vermittelt (Perreault et al., 1990). Ausserdem ist die Erkennung der Peptidfragmente nur im Zusammenhang mit dem MHC-Molekül möglich, ein Vorgang, der auch als "MHC-Restriktion" bezeichnet wird. Interessanterweise resultiert die Immunisierung von Mäusen mit unterschiedlichen mHAg in einer limitierten T-Zell-vermittelten Immunantwort, die nur gegen bestimmte, sogenannte "immundominante" mHAg gerichtet ist, während die Mehrzahl der fremden mHAg keine T-Zell-Aktivierung auslöst (Wettstein, 1986). Da Perreault et al. 1996 zeigen konnten, daß schon ein einziges immundominantes mHAg bei ansonsten völlig identischem genetischen Hintergrund ausreicht, um eine GVHD im murinen Modell auslösen zu können, eröffnen sich auch hier neue Wege der GVHD-Prävention: durch Verabreichung HLA-spezifischer Peptide, die mit den immundominanten mHAg um die antigenpräsentierende Bindungsstelle des MHC konkurrieren, könnte Toleranz der Spender T-Zellen gegenüber den immundominanten mHAg des Empfängers erzielt und somit eine sehr effektive GVHD Prävention erreicht werden.

1.3.3 Superantigene

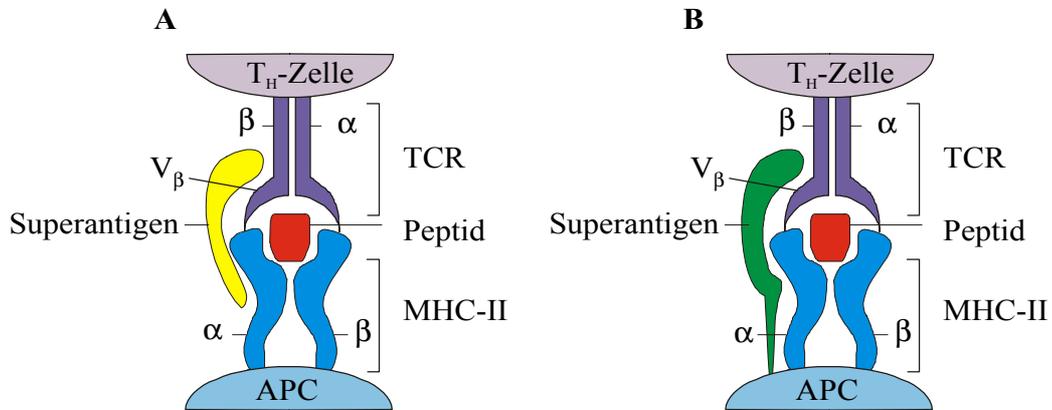


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Spangenkomplexes zwischen Superantigen, Antigenpräsentierender Zelle und T-Zelle.

A: Exogenes Superantigen

B: Endogenes Superantigen

Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, kodieren bestimmte retrovirale Genomsequenzen für Minor-Histokompatibilitätsantigene. Ähnlich diesen berichtet Festenstein 1973 erstmalig über Substanzen mit stark stimulierendem Effekt auf Lymphozyten, die von ihm als “Minor Lymphozyte-stimulating“ Antigene (Mls-Ag) bezeichnet werden. Heute als Superantigene bekannt, stellen sie eine Gruppe viraler und bakterieller Antigene dar, die unter Ausbildung einer Art Spangenkomplexes (Abbildung 1) gleichzeitig an die Aussenseite der V_β-Domäne des T-Zellrezeptors und an die α₁-Kette des Klasse-II MHC-Moleküls binden und sich insofern in verschiedenen Aspekten von herkömmlichen Antigenen unterscheiden. Es wurde inzwischen eine große Anzahl ganz unterschiedlicher Superantigene identifiziert, die den zwei Subklassen der exogenen und endogenen Superantigene zugeordnet werden können (Abb. 1.3).

Exogene Superantigene (Abb. 1.3 A) entsprechen löslichen Proteinen, die von Bakterien sezerniert werden. Hierzu zählt eine Vielzahl von Exotoxinen grampositiver Bakterien, wie verschiedene Staphylokokken-Enterotoxine, die für Lebensmittel-Intoxikationen

verantwortlich gemacht werden, sowie das "Toxic-shock-syndrome" Toxin 1, das vor allem bei jüngeren Frauen zu akut einsetzendem Fieber und Schocksymptomatik führen kann (Bohach et al, 1996).

Endogene Superantigene (Abb. 1.3 B) sind Zellmembranproteine, die durch in das Genom integrierte Retroviren, wie das Epstein-Barr-Virus oder Nukleokapsidproteine des Rabies-Virus, kodiert werden (Lafon et al., 1994; Sutkowski et al., 1996). Entsprechend wurden 1991 von Choi et al im Mausmodell sogenannte Mouse mammary tumor viruses (Mtv's) beschrieben, die auch für Superantigene im hier verwendeten Mausmodell kodieren. Nach Miconnet et al., 1995, sind diese Mtv-Superantigene in der Lage, durch Aktivierung spezifischer V β -Familien im murinen Modell eine massive T-Zellproliferation zu induzieren und so eine durch mHAg initiierte GVHD entscheidend zu verstärken.

Endogenen und exogenen Superantigenen ist gemeinsam, daß ihre Erkennung durch den T-Zellrezeptor fast ausschließlich mit Hilfe der variablen Region an der Aussenseite der TCR- β -Kette (V β) erfolgt, die normalerweise nicht in die Antigenerkennung durch T-Zellen miteinbezogen ist (Fields et al., 1996). Dies führt zur Aktivierung spezifischer V β -Familien und somit zu einer polyklonalen T-Zell-Antwort mit einem Repertoire von bis zu 10-50% aktivierter T-Zellen, während im Gegensatz dazu konventionelle Antigene nur von einer geringen Anzahl an T-Zellrezeptoren in einer spezifischen Peptid-MHC-Kombination erkannt werden können. Die massive T-Zellaktivierung durch Superantigene führt zu einer exzessiven Immunantwort mit Freisetzung fieber- und entzündungsauslösender Zytokine, die im Mausmodell durch noch nicht ganz geklärte Mechanismen nach wenigen Tagen die Elimination der entsprechenden T-Zellen zur Folge hat. (Kawabe und Ochi, 1991; Lussow und MacDonald, 1994).

Peptidantigene sowie Superantigene werden mit Hilfe des MHC-II-Komplexes den T-Zellen präsentiert. Superantigene werden jedoch als weiteres Unterscheidungsmerkmal nicht von antigenpräsentierenden Zellen phagozytiert und prozessiert, um in der antigenpräsentierenden Grube präsentiert zu werden, sondern binden vielmehr als

intaktes Protein ausserhalb der konventionellen peptidbindenden Grube (Jardetzky et al., 1994).

2000 beschreiben Arad et al. die Entdeckung einer in verschiedenen Superantigenen konservierten Peptidsequenz, die ausserhalb der Bindungsdomänen zum MHC-II-Molekül und zum T-Zellrezeptor liegt und in in-vitro wie in in-vivo Studien durch kompetitiven Antagonismus in der Lage zu sein scheint, eine Superantigen-induzierte T-Zellaktivierung zu blockieren. Dieser Peptidantagonist kommt als TCR-Motiv in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz, um mögliche Effekte einer durch Superantigene verstärkten GVHD zu studieren.

1.4 Möglichkeiten der Prävention einer GVHD in Forschung und Klinik

Ein Ziel der Forschung ist es seit langem, eine effektive Prophylaxe für die GVHD zu entwickeln, die solange angewendet werden soll, bis sich eine T-Zell Toleranz eingestellt hat. Auf pharmakologischer Ebene haben sich verschiedene Immunsuppressiva etabliert, die einzeln oder in Kombination eingesetzt werden. In den meisten pädiatrischen Zentren werden Ciclosporin A und/oder Methotrexat bevorzugt, je nach Verlauf ergänzt durch Prednison, FK 506, Rapamycin und Mycophenolatmofetil (Peters et al., 2000). Limitiert wird der Einsatz hauptsächlich durch den generalisierten Effekt der Immunsuppression, der eine erhöhte Infektionsrate zur Folge hat.

Ein anderer präventiver Ansatz besteht in der Entfernung der T-Lymphozyten aus dem Transplantat oder die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen spezifische Antigene der T-Zellen. Da diese Spender-T-Lymphozyten jedoch auch für die Ausschaltung restlicher Leukämiezellen von Bedeutung zu sein scheinen (engl. "Graft-versus-leukemia effect") und als Folge die Zahl der Leukämie rezidive sowie der Transplantatabstoßungen anstieg, wurde diese Therapiemöglichkeit inzwischen wieder verlassen (Martin et al., 1985; Goldmann et al., 1988; Marmont et al., 1991).

Ist es trotz weltweiter Spender-Datenbanknetzwerke nicht möglich, einen HLA-identischen Spender zu finden, besteht ein aktueller Therapieansatz in der Transplantation hochaufgereinigter CD34+ Vorläuferzellen, die als Megadosis (ca. $20 \times 10^6/\text{kg KG}$) über HLA-Barrieren hinweg verabreicht werden (Reisner und Martelli, 2000; Handgretinger et al., 2001). Diese Vorläuferzellen überwinden als eine Art „Veto-Zellen“ die HLA-Barriere. Wie bereits oben erwähnt, ist jedoch durch die vorherige Elimination der T-Zellen auch das Risiko für einen Rückfall sowie für schwere Infektionen nach Transplantation erhöht.

Trotz HLA-Identität, teilweiser T-Zell-Depletion und intensiver immunsuppressiver Therapie erkranken je nach Studie jedoch immer noch zwischen 10 und 80% der transplantierten Patienten (Balduzzi et al., 1995; Klingebiel und Schlegel, 1998). Nachdem die Mechanismen der Antigen-Erkennung durch T-Zellen und die unterschiedlichen Wege der T-Zellaktivierung inzwischen immer besser verstanden werden, bieten sich zusätzlich neue Möglichkeiten, spezifisch auf der Ebene der Interaktion von T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle einzugreifen. So wurde in verschiedenen Tierexperimenten erfolgreich demonstriert, daß eine Blockade der kostimulatorischen Signale (Abb. 1.2) die Bildung einer GVHD erfolgreich verhindern konnte (Tanaka et al., 2000). Zusätzlich ist die Triade aus T-Zellrezeptor, Antigen und Klasse-II MHC-Molekül zu einem besonders attraktiven Ansatzpunkt für Immunintervention und T-Zell-Modulation im Rahmen einer GVHD-Prophylaxe geworden. In Zusammenhang mit diesem Protein-Komplex ist eine Vielzahl gezielter immunmodulatorischer Eingriffe durch die immunologische Grundlagenforschung möglich geworden.

So führt die Administration synthetisch hergestellter Peptide zur Konkurrenz von Peptidantigenen (Adorini et al., 1991), die, von MHC-II Molekülen präsentiert, für die Induktion einer GVHD verantwortlich gemacht werden. In diesem Zusammenhang charakterisierte bereits 1971 die Arbeitsgruppe um Sela (Teitelbaum et al., 1971) ein synthetisches, randomisiertes Peptid (genannt Cop 1 oder GLAT), welches erfolgreich die T-Zell-vermittelte experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis, eine Modell-erkrankung für die humane Form der Multiplen Sklerose, in Mäusen und beim

Menschen (Johnson et al., 1995) zu unterdrücken vermag. Inzwischen stellt Cop 1 als immunmodulatorisch wirksames Medikament eine effektive Alternative im Rahmen der Immuntherapie der Multiplen Sklerose bei Unverträglichkeit der Betainterferon-Behandlung dar (Johnson et al., 2000). Es konnte von Schlegel et al. 1996 gezeigt werden, daß dieses Peptid konzeptionell auch im Rahmen einer GVHD Prophylaxe einsetzbar ist. Durch die randomisierte Anordnung der Aminosäuren zeigt GLAT Spezifität für differente MHC-Klasse II Allele bei Maus und Mensch, eine Bindung an Klasse I findet hingegen nicht statt.

Neuere Konzepte streben in diesem Zusammenhang die Konstruktion allelspezifischer Peptide an, die aufgrund höherer Bindungsaffinität zum MHC-II Molekül eine mögliche Verbesserung der gezielten GVHD-Prophylaxe ermöglichen sollen. Somit hat auch die zuverlässige Vorhersage und Identifikation von HLA Klasse-I und -II restringierten T-Zellepitopen als Grundlage für zahlreiche aktuelle Bereiche medizinisch-immunologischer Forschung immer mehr an Bedeutung gewonnen. Einen wesentlichen Beitrag zur Identifikation dieser MHC-Liganden und Peptidmotive stellt die von Rammensee et al. 1999 erarbeitete und laufend erweiterte Internetdatenbank SYFPEITHI dar. Abhängig von HLA- und gesuchtem Haplotyp werden hier entsprechende Liganden nach Affinitätsgrad zum MHC-Molekül geordnet und so eine Vorhersage der T-Zellepitope wesentlich erleichtert. Mit Hilfe dieser Datenbank wurden für die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme mit dem Hintergrund H2-A^d entsprechende Peptidantagonisten konstruiert, um anschließend ihre Wirkung im Zusammenhang einer GVHD-Prophylaxe nach allogener Knochenmarktransplantation zu testen.

1.5 Fragestellung

Die sich in den letzten Jahren rasant entwickelnden Erkenntnisse auf dem Gebiet der Immunologie, die insbesondere zu einem vertieften Verständnis der molekularen Mechanismen der Antigenerkennung und T-Zellaktivierung führten, sollen im Rahmen dieser Arbeit umgesetzt werden, um in einem murinen Modellsystem neue Ansätze für immunmodulatorische Eingriffe zur Prävention der GVHD zu untersuchen.

Es soll dabei durch den Einsatz verschiedener Peptide der Prozess der MHC-abhängigen „Fremd“-Antigenerkennung, der zur Induktion der GVHD führt, unterbunden werden. Im Einzelnen werden dabei folgende Zielsetzungen bearbeitet:

1. Es soll untersucht werden, ob der Einsatz prädiktiver allelspezifischer Peptide mit hoher Affinität für Klasse-II MHC-Moleküle eine künstlich erzeugte GVHD über minor Histokompatibilitäts-Barrieren hinweg abschwächt oder verhindert.
2. Durch die Applikation von Peptiden unterschiedlicher Länge sollen mögliche sterische Effekte nach deren Bindung an das MHC-Molekül und eine daraus resultierende Modulation der GVHD Antwort geklärt werden.
3. Außerdem soll getestet werden, ob die Verwendung bifunktionaler Peptide, die simultan mit Klasse-II MHC-Molekülen und T-Zellrezeptor wechselwirken, eine durch Superantigene verstärkte GVHD positiv beeinflussen können.

Das den Versuchen zugrundeliegende Modell B10.D2→Balb/c ist in der Literatur gut etabliert (Hamilton, 1987; Schlegel et al., 1995) und kommt der HLA-identischen Fremdspondertransplantation sehr nahe. Da in diesem Modell hauptsächlich die CD4⁺-Subfraktion und weniger die CD8⁺-T-Lymphozyten für die Induktion der GVHD in lethal bestrahlten Empfänger-mäusen verantwortlich ist, eignet es sich besonders für die Untersuchung mit Klasse-II MHC bindenden Peptiden. Um die Effekte der in dieser Arbeit verwendeten Peptide zu untersuchen, trägt der Balb/c Empfänger-Mäusestamm ferner endogen Mtv-kodierte (engl. "mouse mammary tumor virus") Superantigene auf der Zelloberfläche, für die B10.D2-Spendermäuse keine Toleranz besitzen.

2 Material

2.1 Glaswaren

Tabelle 2.1-Glaswaren

Artikel	Produktangaben	Bezugsquelle
Färbegläser mit Färbegestell	200ml, Platz für 10 Objektträger (#H552.1, #H554.1)	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Superfrost/Plus, 25*75*1mm #041300	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläser	24*40 mm, 24*60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig

2.2 Geräte

Tabelle 2.2-Geräte

Geräte	Gerätetyp	Hersteller
Hämatologie Automat	Advia™ 120	Bayer, München
Cryocut	CM 3000	Leica Instruments GmbH, Nussloch
Cryocut	Cryocut E	Leica Instruments GmbH, Nussloch
Linearbeschleuniger	Linac	Electra, Hamburg
Laborwaage	LP 2200, 5 g-2200 g	Sartorius
Eppendorf-Zentrifuge	Nr. 5412	Eppendorf, Hamburg

2.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.3-Puffer und Lösungen

Produkt	Produktangaben	Hersteller/Bezugsangabe
Aceton	(#1.00014.1000)	Merck, Darmstadt
80% Alkohol	Vergällt	Universitätsapotheker Tübingen
BSA	Bovine Serum Albumin, 7,5%, steril	Gibco, Eggenstein
Citifluor	Montagemittel/Fluoreszenzmikroskopie (#R1320)	Plano, Wetzlar
Diethylether	(#8297.1)	Roth, Karlsruhe
Einbettmedium	Tissue Freezing Medium (#020108926)	Leica Instruments GmbH, Nussloch
Essigsäure	(#1.00063)	Merck, Darmstadt
FCS	Seromed [®] Fetal Bovine Serum, steril (#S 0115)	Biochrom KG, Berlin
Freund's Adjuvant	Inkomplett, 10 ml (#F5506), Lot: 020K8934	Sigma, St. Louis, MO, USA
Gelatine	(#22151)	Serva, Heidelberg
L-Glutamin	Seromed [®] 200 mM, steril (#K0282)	Biochrom KG, Berlin
Glycerin	(# G8773)	Sigma, Steinheim
Heparin	Vetren [®] (100 IE/ml)	Byk-Gulden, Konstanz
Kühlflüssigkeit	Flüssiger Stickstoff	
Lyse-Buffer	Pro Liter 8,29 g Ammoniumchlorid, 1 g Kaliumhydrogencarbonat, 0,0368g Komplexon III, steril	Universitätsapotheker Tübingen

Produkt	Produktangaben	Hersteller/Bezugsangabe
Mayer's Hämalaun-Lsg	MHS-16, 500 ml	Sigma, St. Louis, MO, USA
Nagellack	Klarlack	
Natriumacetat- Puffer	(#S8625)	Sigma, St. Louis, MO, USA
N,N-Dimethyl- formamid	(#6251.1)	Roth, Karlsruhe
PBS	Spezial, steril (# 1903)	Gibco, Eggenstein
Penicillin/ Streptomycin	Penicillin 10 000 U/Streptomycin 10000 µg/ml, Seromed [®] , (#A2213)	Biochrom KG, Berlin
Streptavidin- Lösung	Streptavidin und HRP biotinyliert (RPN 1051, Lot # 95060)	Amersham, Buckinghamshire, UK
Streptavidin- FITC	(#13024D)	PharMingen, Heidelberg
Substratlösung AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol (# A-5754)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Wasserstoff- Peroxid	H ₂ O ₂ , 30% (#7209)	Merck, Darmstadt
Zellkultur- Medium	RPMI 1640	Gibco, Eggenstein

2.4 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	2 M Natriumacetat 39,5 % (v/v) und 2 M Essigsäure 10,5% (v/v) in H ₂ O auf pH 5,2 einstellen.
Substratlösung AEC	4 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) in 0,5 ml N,N-Dimethylformamid lösen, mit 9,5 ml Natriumacetat-Puffer versetzen und filtrieren (Minisart, Porengrösse 0,2 µm), bis die Lösung klar wird. Unmittelbar vor der Verwendung 5 µl 30 %H ₂ O ₂ pro 10ml Ansatz zugeben.
Zellkulturmedium	In 500 ml RPMI 1640-Medium 50 ml hitzeinaktiviertes FCS, 5 ml Penicillin (10 000 U/l) / Streptomycin (10 000 µg/ml) und 5 ml L-Glutaminlösung (200 mM) steril pipettieren. Endkonzentrationen: 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/mg Streptomycin.

2.5 Verwendete synthetisch hergestellte Peptide

2.5.1 Peptidsynthese

Die in dieser Arbeit zum Einsatz kommenden Peptide wurden mir freundlicherweise von Johannes T. Wessels (Universitätskinderklinik Tübingen) zur Verfügung gestellt. Die Peptide wurden mittels Festphasen-Peptidsynthese nach Merrifield synthetisiert und die Reinheit und Identität mittels HPLC und Massenspektrometrie (MALDI) verifiziert. Abschließend wurde das zunächst in Pulverform vorliegende Endprodukt in PBS gelöst und für die Injektion steril filtriert.

2.5.2 Die Vorhersage von T-Zellepitopen mit Hilfe der Internetdatenbank SYFPEITHI

Mit Hilfe der Internetdatenbank SYFPEITHI wurden für die verwendeten Mausstämme mit dem genetischen Hintergrund H2-A^d die entsprechenden Liganden gesucht. Es zeigte sich, daß im H2-A^d-System auf Position 1 bevorzugt die von ihrer Charakteristik her hydrophil polaren Aminosäuren Serin (S), Threonin (T) oder Tyrosin (Y) neben einigen anderen vorkommen. Auf der Ankerposition 4 scheint das Vorkommen von aliphatisch hydrophoben AS wie Valin (V), Leucin (L), Isoleucin (I) oder Alanin (A) besonders günstig zu sein. An der Ankerposition 6 gibt die Datenbank ebenfalls das Vorkommen von Alanin (A) und Valin (V) als günstig an. Damit ergibt sich mittels SYFPEITHI-Abfrage als besonders guter Ligand für murines H2-A^d die Sequenz des Apolipoproteins E 268-284 *WANLMEKIQASVATNPI*. Die entsprechenden Ankerpositionen wurden hier fettgedruckt dargestellt. Als zweiter wichtiger H2-A^d bindender Ligand wurde das ebenfalls mittels SYFPEITHI vorhergesagte Peptid *KPVSQMRMATPLLMRPM*, Position 85-101 der Invarianten Kette, synthetisiert und verwendet. Hier ist allerdings der Anker an Position 6 mit der aliphatischen Aminosäure Prolin eher ungünstig.

Diese und weitere in dieser Arbeit verwendete Peptide werden im nächsten Absatz genauer beschrieben.

2.5.3 Charakterisierung einzelner Peptide

I. GLAT

Der Copolymer GLAT ist ein synthetisch erstelltes randomisiertes Polymer aus den L-Aminosäuren E, K, A und Y im festen molaren Verhältnis von 1.9 : 4.7 : 6.0 : 1. GLAT besitzt ein mittleres Molekulargewicht von 6-8,5 kDa. Durch die randomisierte Anordnung der Aminosäuren (AS) E, K, A und Y zeigt GLAT Spezifität für differente MHC-Allele bei Maus und Mensch.

II. CLIP

Bei dem Peptid CLIP handelt es sich um ein 17 AS langes Peptid mit der Sequenz

KPV-SQM-RMA-TPL-LMR-PM

Die CLIP-Sequenz wurde mittels der Datenbank SYFPEITHI als Bindungsmotiv für murines H2-A^d ermittelt. Es handelt sich dabei um das Gegenstück zu den AS 85-101 der invarianten Kette des Klasse-II MHC-Komplexes.

III. Cop-CLIP 10

Zur Herstellung des Peptids Cop-CLIP 10 wurde ein CLIP-Motiv nach beiden Seiten um 10 randomisierte AS verlängert:

r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-KPS-VQM-RMA-TPL-LMR-PM-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r

(r steht hierbei für eine randomisierte Aminosäure E, K, A oder Y, somit handelt es sich beidseitig um bindenden Peptidsequenzen).

IV. APE-20

Das Peptid APE-20 enthält die Sequenz 268-283 WAN-LME-KIQ-ASV-ATN-P des Apolipoproteins E. Es ist nach der Motivvorhersage der SYFPEITHI-Datenbank ein sehr geeigneter Ligand für murines H2-A^d. Dieses Hauptmotiv wurde nach beiden Seiten um je 20 definierte AS verlängert. Es ergibt sich dadurch folgende Sequenz:

PHD-NPH-PDP-HHP-PHP-HPD-PH- WAN-LME-KIQ-ASV-ATN-P- PHD-NPH-PDP-HHP-PHP-HPD-PH

Das Peptid aus 56 AS hat ein Molekulargewicht von 6358 Dalton. Die Wahl der AS für die N- und C-terminale Flankierung des Motivs erfolgte in strenger Anlehnung an die AS des GLAT, also an E, K, A und Y. Die Aminosäure Glutaminsäure (E) als saure AS wurde durch die saure AS Asparaginsäure (D) ersetzt, die basische AS Lysin (K) durch die ebenfalls schwach basische AS Histidin (H), die aliphatische AS Alanin (A) wurde gegen Prolin (P), ebenfalls aliphatisch, ausgetauscht. Durch den Tausch der vierten in GLAT befindlichen AS Tyrosin (Y) als hydrophil polare AS gegen Asparagin (N) wurden die charakteristischen Eigenschaften der in GLAT befindlichen AS genau übernommen und ein Motiv für die Flanken entworfen, das auch in den molaren Verhältnissen der AS zueinander GLAT widerspiegelt. Durch die Verwendung der AS D, H, P und N konnten jedoch nach der Ligandenvorhersage für den murinen MHC-II Liganden H2-A^d bis auf die AS H und D auf Position 1 andere Bindungsstellen vor allem auf den Positionen 4 und 6 ausgeschlossen werden. Es ist so wahrscheinlich, daß das

Motiv trotz der T-ähnlichen Flanken als Ligand zum murinen MHC-II fungiert, allerdings ohne Bindungen im Flanken-Bereich einzugehen.

V. APE-Spacer-TCR

Bei diesem Peptid folgt auf das Hauptmotiv APE nur einseitig am C-terminalen Ende die bereits bekannte Flanke von APE-20. Nach dieser, als Spacer fungierenden Verlängerung, folgt ein dem Peptidantagonisten p12 (Arad et al. 2000) entsprechendes Bindungsmotiv, das bis auf 3 AS der Sequenz 150-161 des SEB entspricht. Die AS-Sequenz für dieses Peptid lautet damit:

WAN-LME-KIQ-ASV-ATN-P-PHD-NPH-PDP-HHP-PHP-HPD-PH-YNK-KKA-TVQ-ELD

Das Peptid aus 47 AS hat ein Molekulargewicht von 5387 Da.

VI. TCR

Bei diesem Peptid mit nur 12 AS Länge handelt es sich um das bereits unter V. vorgestellte T-Zellrezeptor-bindende Motiv mit der Sequenz

YNK-KKA-TVQ-ELD

und einem Molekulargewicht von 1436 Da.

VII. Kontrollen

Hen Egg Lysozym (HEL) wurde von der Firma Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen und dient als unspezifisch bindende Negativ-Kontrolle. Außerdem wurde als Null-Kontrolle Phosphate-buffered Saline (PBS) eingesetzt.

2.6 Seren

Kaninchenserum (normal), (#X0902), DAKO A/S, Dänemark

Ziegen Serum, (#G-9023, Lot 046H8904), Sigma, USA, St. Louis, MO 63178

2.7 Verwendete Antikörper

Tabelle 2.4-Erstantikörper

Antikörper gegen	Klon	Ig-Subklasse	Katalog-Nr.	Hersteller	Konzentration (mg/ml)
CD3, R-PE konjugiert	145-2C11	Hamster IgG	553060 (01085A)	PharMingen	0,5 mg/ml
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 25	7D4	Ratte IgM _{2a}	01091D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD-49 VLA-4	9C10	Ratte IgG _{2a}	01731D	PharMingen	0,5 mg/ml
CD-106 VCAM-1	429 (MVCAM.A)	Ratte IgG _{2a}	01811D	PharMingen	0,5 mg/ml

Tabelle 2.5-Biotinylierter Zweitantikörper

Antikörper gegen	Klon	Spezies	Katalog-Nr.	Hersteller	Konzentration (mg/ml)
Ratte IgG		Hase	E468, Lot.#068(101) Lot.#118(101)	DAKO	1,3 mg/ml

2.8 Sonstige Materialien

Tabelle 2.6-Sonstige Materialien

Produkt	Hersteller/Beschreibung
Aluminiumförmchen	Konfektförmchen zum Einfrieren und Aufbewahren der Organe
Dewar Thermoskanne	(#A630.1) Roth, Karlsruhe
Feuchte Kammer	Plastikgefäß mit Deckel, mit feuchten Tüchern ausgelegt
Insulin- Spritzen	0,5 ml, 12,7 mm Länge (#02062496) Becton Dickinson
MBT PAP-Pen	(#29.78.40000) Multimed Wicker GmbH, Kirchheim Teck
Präparierbesteck	(#0829.1) Roth, Karlsruhe
Sterile Filter	Cell Strainer, 100 µm Porengröße, Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA
Sterile Filter	Minisart steril, Porengröße 0,2 µm (#17597K), Sartorius AG, Göttingen

2.9 Verwendete Tierstämme

Tabelle 2.7-Verwendete Tierstämme

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

Die Arbeit wurde mit Mäusen der Stämme B10.D2/nSnJ und Balb/c durchgeführt, die alle von „The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA“, bezogen wurden. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet.

HLA-identische Mausmodelle der GVHD mit Differenzen der Nebenhistokompatibilitätsantigene sind von klinischer Relevanz, da sie der Konstellation einer humanen Knochenmarktransplantation mit HLA-Kompatibilität entsprechen. Die in dieser Untersuchung verwendeten Mausstämme B10.D2/nSnJ und Balb/c sind beide H-2d (entspricht HLA Klasse I und II des Menschen). Sie unterscheiden sich jedoch in mehreren Nebenhistokompatibilitätsantigenen (Hamilton, 1987; Korngold und 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-Histokompatibilitätsantigene als auch die Superantigene als fremd erkannt und eine Immunantwort in Form einer GVHD induziert.

Alle Mäuse waren zum Zeitpunkt der Transplantation ungefähr 12 Wochen alt und wurden in sterilen Käfigen in einer Hepa-filtrierten Kabine (Scantainer Typ C-110, Fa. Scanbur A/S, Lellinge, Koge, Dänemark) bei 22°C, kontrollierter Luftumwälzung und natürlichem Tag-Nacht-Wechsel gehalten. Sie erhielten autoklaviertes Futter und autoklaviertes Wasser ad libitum, versetzt mit Bactrim[®] Roche Sirup für Kinder (20 ml Sirup/l Wasser, 160 mg Trimethoprim und 800 mg Sulfamethoxazol pro Liter Wasser). Alle Versuche wurden entsprechend einem vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigten Tierschutzantrag durchgeführt.

2.10 Mikroskop

Für die licht- und fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen und Aufnahmen kam das Olympus BX60 System-Mikroskop mit 10-facher Okularvergrößerung (Olympus WH10x/22) und Plan-Achromat-Objektiven in den Vergrößerungen 10x, 20x und 40x zum Einsatz. Das aufgesetzte Kamerasystem (eine RGB-Videokamera, Modell CF-15 MC mit Multicontrol Einheit MCU-II, Firma Kappa Meßtechnik GmbH) vergrößerte nochmals um den Faktor 2. Zusätzlich wurde bei den lichtmikroskopischen Arbeiten ein spezieller Blaufilter verwendet.

Die Anregungsstrahlung der Fluoreszenzmikroskopie wurde durch eine Quecksilberdampfampe hergestellt. In den verwendeten Filtersystemen sind Anregungsfilter (optimale Anregung des Fluorochroms zur Fluoreszenz) und Sperrfilter (unterdrücken überschüssiges Erregerlicht und lassen nur längerwelliges Fluoreszenzlicht durch) integriert. (Filter der Firma Olympus, Hamburg: U-MNU („narrow ultrawide“), U-MWG („wide green“) und U-MWIB („wide interference band“)).

Da an das Olympus Mikroskop BX60 zeitweilig nur eine Schwarz-Weiß-Kamera angeschlossen war, wurde für die lichtmikroskopischen Aufnahmen, die zusätzlich digital weiterverarbeitet und computergesteuert ausgewertet wurden, ein Carl Zeiss Photomikroskop aus den 60er Jahren verwendet. Für die digitale Bildverarbeitung wurde an dieses Mikroskop mit 3,2-facher Okular- und 10-, 20- und 40-facher Objektivvergrößerung eine hochauflösende Digitalfarbkamera (Digitale Fotokamera DP 10, Bildauflösung 1280 x 1024 Pixel, Fa. Olympus, Hamburg) angeschlossen. Zur Bildarchivierung und computergesteuerten Auswertung stand als weitere Komponente des Systems die Software DP-SOFT (Fa. SIS, Münster) zur Verfügung.

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 Unterstützung seiner Mitarbeiter. Zur Konditionierung vor Knochenmarktransplantation wurden die Empfängermäuse fraktioniert im Abstand von 8 Stunden zweimal mit je 5 Gy (2x 712 Monitoreinheiten) mit einem Linearbeschleuniger (Linac G, Fa. Electra, Hamburg) bestrahlt. Die Gesamtdosis von 10 Gy war unter gegebenen Versuchsbedingungen in Vorversuchen als Strahlendosis ermittelt worden.

Als Bestrahlungskäfig wurde ein Typ-III-Käfig bis zu einer Höhe von 8 cm mit sterilem Streu gefüllt. Durch eingepasste Plexiglaseinsätze und eine 2 cm dicke Plexiglasabdeckung wurden die Tiere in der beabsichtigten Ebene gehalten. Dosis-Inhomogenitäten durch Streustrahlung oder eine Veränderung des Abstandes von der Strahlenquelle wurden mit dieser Anordnung möglichst vermieden.

3.2 Allogene Knochenmarktransplantation der Mäuse

3.2.1 Gewinnung des Knochenmarks

Spendermäuse wurden in der CO₂-Box bis zum Atemstillstand narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation euthanasiert. Nach der Milzentnahme wurden die unteren Extremitäten von Haut befreit, entfernt und in sterilem PBS auf Eis gelegt. Durch diese Technik der Präparation sollte vermieden werden, daß die Röhrenknochen schon vorzeitig geöffnet wurden. Mit Hilfe eines Skalpells wurden die Knochen von den umgebenden Muskeln befreit, mit sterilem Besteck Femur und Tibia an beiden

Enden geöffnet und das Knochenmark mit einer 1 ml Spritze steril in eine vorbereitete Petrischale mit Zellkulturmedium (Kapitel 2.4) gespült. Die Zellen wurden 2x in diesem Medium gewaschen und mit je 400 x g 10 Minuten bei 10°C abzentrifugiert. Zur intravenösen Applikation wurden die Zellen in einer Endkonzentration von 50×10^6 pro ml Knochenmarkszellsuspension in zusatzfreiem Medium (RPMI 1640, Gibco) aufgenommen.

3.2.2 Gewinnung der Milzzellen

Die GVHD wird durch eine Kombination von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen ausgelöst, die in ausreichender Menge transplantiert werden müssen. Aufgrund des niedrigen T-Zellgehaltes im Knochenmark der Maus im Vergleich zum Menschen muß zur Induktion der GVHD in diesem Tiermodell die Konzentration an 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. Nach Homogenisierung durch einen Maschenfilter wurde die Milzzellsuspension über einen sterilen Filter mit 100 µm Porengröße pipettiert und anschließend einmal mit supplementierten Medium (Kapitel 2.4) gewaschen. Die Lyse der mit enthaltenen Erythrozyten erfolgte in 3-5 ml hypotonem Lysepuffer nach Standardrichtlinien, gefolgt von zwei weiteren Waschschritten. Die Zellzahl wurde auf eine Endkonzentration von 500×10^6 Milzzellen pro ml eingestellt und der Milzzellsuspension 5 µl Heparin pro ml Suspension (Vetren[®], 100 IE/ml) zugegeben.

3.2.3 Transplantation

In eine sterile 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 Milzzell- Suspension (100×10^6 Milzzellen) vorsichtig aufgezogen. Somit wurden insgesamt 10×10^6 Knochenmarkzellen und 100×10^6 Milzzellen in einem Endvolumen von 500 µl

luftblasenfrei in die Schwanzvene der unter Rotlicht erwärmten Empfängermaus appliziert.

3.3 Behandlung der transplantierten Tiere

Die Empfängertiere wurden täglich mit einem der synthetisch hergestellten Peptide CLIP, Cop-CLIP 10, APE 20, APE-Spacer-TCR, TCR, GLAT oder einer der Negativkontrollen PBS oder HEL behandelt. Die Peptide wurden in der angegebenen Dosierung in einem Volumen von 200 µl intraperitoneal appliziert. Die Behandlung wurde an Tag -1 vor Transplantation begonnen und für die folgenden 30 Tage fortgesetzt. Einmal pro Woche wurden die Peptide mit 0,1 ml inkomplettem Freund's Adjuvant (Firma Sigma, St. Louis, USA) gemischt und als intraperitoneale Depotdosis verabreicht. Es wurde mit einer Gruppengröße von 5 Mäusen pro Peptid gearbeitet.

3.4 Nachweisparameter der Graft-versus-Host Erkrankung

Da sich schon ungefähr ab Tag 21 nach Transplantation bei erkrankten Mäusen makroskopisch deutliche Zeichen einer GVHD festmachen lassen, wurde ein Nachbeobachtungszeitraum von 30 Tagen gewählt, um die Tiere auf klinische und histologische Zeichen der GVHD zu untersuchen. Zur Beurteilung des klinischen Ausprägungsgrades wurden folgende Parameter herangezogen:

- Allgemeinzustand
- Verlust an Körpergewicht
- Ausmaß der für eine GVHD typischen makroskopischen Hautveränderungen (Haarausfall, Erythem mit Schuppenbildung). Diese äußerlich sichtbaren Zeichen der Erkrankung wurden in einer Skala (von minimal 0 bis maximal 8 Punkten) bewertet, wobei sich die Einteilung auf die verschiedenen involvierten Körperpartien bezog (Schlegel et al., 1995). Die Gesamtpunktzahl wurde durch die Addition der Punktebewertung von 4 einzelnen Körperpartien ermittelt.

Die mögliche maximale Punktzahl je Körperpartie ist in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Bewertete Körperpartie	mögliche, maximale Punktzahl
Kopf	1
Hals	1
Rücken	3
Bauch	3

3.5 Sektion der Mäuse und Fixierung der Organe

An Tag 30 wurden mit einer digitalen Kamera Aufnahmen von allen noch lebenden Tieren angefertigt. Die Mäuse wurden in Äther bis zum Atemstillstand narkotisiert, dann wurde das Fell mit 80% Äthanol desinfiziert und das Tier schließlich durch Herzpunktion entblutet, um unspezifischen Bindungen bei der später durchgeführten Immunhistochemie vorzubeugen.

Die für die Histologie eingeplanten Organe wurden entnommen, in die mit Einbettmedium vorgefüllten Aluminiumförmchen gelegt und nach ca. 5 Minuten eingefroren. Dazu wurde flüssiger Stickstoff in ein Dewar-Gefäß mit Metallblöcken als Kälteleiter gegeben. Die Förmchen wurden nun auf diese Metallblöcke gestellt (Temperatur ca. -60°C), bis der Inhalt zu einem Block durchgefroren war. Diese tiefen Temperaturen waren erforderlich, um die Bildung von Eiskristallen im Gewebe zu verhindern. Bis zur endgültigen Aufarbeitung wurden die Organe bei -80°C aufbewahrt.

3.6 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 und ein Cryotom der Medizinischen

Universitätsklinik Tübingen/Arbeitsgruppe Prof. Dr. Michael Gregor verwendet werden. Die auf Trockeneis transportierten Organblöcke wurden auf Präparatehalter platziert und mit Hilfe von Einbettmedium (Kapitel 2.3) in der Kammer des Gefriermikrotoms auf die Halter gefroren. Bei einer Kammertemperatur von -25°C und Objekttemperaturen von -10°C bis -15°C wurden Schnitte mit der Dicke von $10\ \mu\text{m}$ angefertigt. Diese wurden auf elektrostatisch vorbehandelte Objektträger (Superfrost/Plus) aufgenommen und mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgte die Fixierung der Schnitte in 4°C kaltem Aceton für 8 Minuten. Nach kurzem Trocknen wurden die Objektträger in Aluminiumfolie gewickelt und bei -20°C bis zur Färbung gelagert.

3.7 Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten

Die in dieser Arbeit verwendete Technik der ABC-Immunperoxidase-Färbung wurde zuerst von Hsu et al. beschrieben (Hsu et al., 1981). Diese Methode beruht auf der hohen Bindungsaffinität von Avidin, einem Hühnereiweiß-Glykoprotein, an das Vitamin Biotin. Da Avidin vier Bindungsstellen für Biotin aufweist, wirkt der hier verwendete, bereits präformierte Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex als Verstärker und führt so zu einer außerordentlich hohen Sensitivität dieser Methode. Außerdem bleicht die Färbung im Gegensatz zur Immunfluoreszenz nur langsam aus.

Zunächst erfolgte die Markierung der zu untersuchenden Oberflächenmoleküle durch einen monoklonalen Erstantikörper. Nach Entfernen des nichtgebundenen Primärantikörpers durch Waschen wurde der histologische Schnitt mit einem zweiten Antikörper (monoklonal oder polyklonal) inkubiert, der gegen den Erstantikörper gerichtet und mit mehreren Biotinmolekülen gekoppelt ist. An diese Biotinmoleküle bindet im nächsten Schritt ein Komplex aus Streptavidin und biotinylierter Peroxidase. Dieses Enzym katalysiert anschließend nach Zugabe von H_2O_2 die Umwandlung des zugegebenen Substrates 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) zu einem farbigen Pigment. Die Verdünnung des Erstantikörpers wurde nach Hersteller- (PharMingen) und Literaturangaben (Korngold und Sprent, 1987a) gewählt. Für die Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden verschiedene Verdünnungen (1:50, 1:100, 1:200, 1:400)

getestet. Da sich im Färbeverhalten kein deutlicher Unterschied zeigte, wurde die Verdünnung 1:50 für alle weiteren Färbungen gewählt, da mit dieser Konzentration bereits Vorversuche in unserer Gruppe durchgeführt worden waren. Um eventuellen unspezifischen Hintergrundfärbungen vorzubeugen, wurde bei allen Färbungen, wie von Hsu beschrieben (Hsu et al., 1981), mit 3 %igem Serum in PBS vorinkubiert. Durch Zugabe von 1% BSA (Bovine Serum Albumin) zur Zweitantikörperverdünnung konnten unspezifische Färbungen weiter verhindert werden.

Die Färbung wurde bei Raumtemperatur gemäß folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Objektträger auftauen
2. Schnitte mit dem ImmunoPen umranden, um die Antikörperverdünnungen auf dem Präparat zu halten
3. 10 Minuten in PBS waschen
4. Objektträger in eine feuchte Kammer transferieren und 30 Minuten mit 3% Ziegen- bzw. Kaninchenserum inkubieren
5. Serum kurz mit PBS abwaschen
6. 50-80 µl Erstantikörper (1:100 in PBS verdünnt) 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
7. 10 Minuten in PBS waschen
8. 50-80 µl biotinylierter Zweitantikörper (1:50 in PBS mit 1 % BSA verdünnt) 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
9. 10 Minuten in PBS waschen
10. 50-80 µl Streptavidin-Peroxidase (1:200 in PBS verdünnt) 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
11. 10 Minuten in PBS waschen
12. Objektträger auf ein weißes Papier legen, Substratlösung auf die Objekte geben und Farbreaktion beobachten. Inkubationszeit ca. 8-15 Minuten (Substratlösung: 4 mg AEC in 0,5 ml N,N-Dimethylformamid lösen; mit 9,5 ml Natriumacetatpuffer (0,1 M, pH 5,2) versetzen; steril filtrieren, bis die Lösung weiß wird; unmittelbar vor der Verwendung 5 µl H₂O₂ 30 % dazugeben)
13. Reaktion in PBS stoppen

14. Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun
15. Objekte mit erwärmter Glycerin-Gelatine eindecken
16. Objektträger reinigen und Deckglas mit Nagellack versiegeln

3.8 Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Gefrierschnitten

- 1-9. Schritte 1-9 werden durchgeführt, wie sie bereits unter 3.7 beschrieben wurden. Zusätzlich werden die Gefrierschnitte bei Schritt 6 mit 50 µl eines zweiten, direkt mit einem Fluorochrom konjugierten Erstantikörper (1:100 in PBS verdünnt) inkubiert. Ab Schritt 6 erfolgten alle weiteren Inkubationsschritte dann im Dunkeln. Eine eventuell auftretende Kreuzreaktivität des mit einem Fluorochrom konjugierten Erstantikörpers mit dem biotinylierten Zweitantikörper konnte durch sorgfältige Produktauswahl (Erstantikörper entstammen jeweils einer unterschiedlichen Spezies) und Ersatz des unkonjugierten Erstantikörpers durch PBS als Negativkontrolle in mehreren Kontrollschnitten vermieden werden.
10. 50-80 µl z.B. FITC-markierte Streptavidin-Peroxidase (1:200 in PBS) verdünnt für 45-60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkel inkubieren
11. 2 x 10 Minuten im Dunkeln mit PBS waschen
12. mit Citifluor R eindecken. Citifluor bleibt flüssig. Bis zur Betrachtung am Mikroskop Objekte im Dunkeln und evtl. bei 4° C aufbewahren.

In der vorliegenden Arbeit wurden histologische Schnittpräparate des Ileums allogenen knochenmarktransplantierte Mäuse für die Oberflächenantigene CD3 (PE konjugiert) und CD4 (mittels FITC-markierter Streptavidin-Peroxidase) Doppel-Immunfluoreszenz gefärbt.

3.9 Kontrollfärbungen

Als Negativkontrollen wurden bei jeder zu färbenden Charge mehrere Schnitte verwendet. Der Erst- bzw. der Zweitantikörper 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.

3.10 Semiquantitative Beurteilung der gefärbten Schnitte

Positiv gefärbte Gewebsstrukturen (durch Umwandlung des Substrates AEC zu einem roten Pigment) wurden in den histologischen Schnitten nach der Häufigkeit ihres Vorkommens bewertet. Nun erfolgte eine **semiquantitative** Einteilung in *keine*, *schwache*, *mittlere* oder *starke* Expression. Für jede behandelte Maus wurden von jedem Organ für jeden Antikörper zwei bzw. drei Schnitte gefärbt, in verschiedenen Bildausschnitten bewertet und zu einer Gesamtaussage zusammengefasst. Verglichen wurden dabei in einer Serie jeweils nur histologische Schnitte eines Organs und nur für den jeweils verwendeten Antikörper.

3.11 Digitale Bildverarbeitung und computergesteuerte Auswertung

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 und mit Hilfe der entsprechender Software konnte nun das von der Mikroskopkamera produzierte Signal direkt auf dem Computer mitbetrachtet und gespeichert werden. Diese Methode ermöglichte eine normierte Bildanalyse der angefärbten Gefrierschnitte, vor allem, da mehrere Bilder gleichzeitig nebeneinander betrachtet und verglichen werden konnten. Außerdem ist eine Nachbearbeitung der digitalen Bilder in Bezug auf Kontrast, Helligkeit, Ausrichtung des Bildes und farblicher Angleichung der Hintergründe möglich. Dazu wurde das Programm Thumbs Plus 3.21g-R von Phillips Crews (Cerious Software Inc., USA) verwendet.

Zusätzlich wurde ein Teil der histologischen Schnitte (Kolon, Färbung des Oberflächenantigens CD4) mit Hilfe des Programmes DP-SOFT (Fa. SIS, Münster)

computergesteuert ausgewertet. Nachdem ein bestimmter Farbinsitätsbereich (hier ein Rotbereich, entsprechend den positiv gefärbten Gewebsstrukturen, und ein Graubereich, entsprechend dem nicht mit Gewebe bedeckten Bildausschnitt) festgelegt wurde, errechnet die verwendete Software den prozentualen Flächenanteil für genau diese Intensitäten bezogen auf die Gesamtfläche des entsprechenden Bildausschnittes. Auf diese Weise wurden pro histologischem Schnitt jeweils fünf repräsentative Bildausschnitte gleicher Größe ausgewählt und computergesteuert ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Prävention der GVHD durch den Einsatz synthetisch hergestellter allelspezifischer Peptide im murinen Modell

Antigen-spezifische T-Zellaktivierung tritt auf, sobald der T-Zellrezeptor (TCR) antigene Peptidfragmente in der Grube von Klasse-I oder Klasse-II MHC-Molekülen als fremd erkennt (Rothbard und Gefer, 1991). Diese antigenen Differenzen zwischen Spender und Empfänger existieren als sogenannte Nebenhistokompatibilitätsantigene, die für die Entwicklung einer GVHD auch nach HLA-identischer Stammzelltransplantation verantwortlich gemacht werden. Ziel der durchgeführten Versuche war es, zu testen, ob durch die Gabe von definierten Klasse-II MHC bindenden Peptiden nach Transplantation die Entwicklung einer GVHD im murinen System blockiert werden kann. Zum Einsatz kamen sechs verschiedene synthetisch hergestellte Peptide (Kapitel 2.5) mit unterschiedlicher Länge und hoher Bindungsaffinität zum Klasse-II MHC-Komplex. Es wurde dann in einem in vivo Mausmodell die Auswirkung dieser Peptide auf die Immunantwort nach einer Transplantation sowie ihr Einsatz hinsichtlich einer möglichen GVHD Prävention getestet. Hierzu wurden die transplantierten Tiere mit den allel-spezifischen Peptiden CLIP, Cop-CLIP 10, APE-20 und APE-Spacer-TCR und als Vergleich mit dem randomisierten Copolymer GLAT behandelt, mit dem schon in früheren Versuchen eine effektive Prävention der GVHD erreicht werden konnte (Schlegel et al., 1996). Das angewandte Mausmodell B10D2 → BALB/c wurde gewählt, da es der HLA-identischen Knochenmarktransplantation beim Menschen entspricht: beide Mausstämme sind vom Typ H-2^d (entspricht HLA Klasse I und II des Menschen), unterscheiden sich jedoch in mehreren Nebenhistokompatibilitätsantigenen (Hamilton, 1987; Korngold und Sprent, 1987b).

4.2 Effekte der Applikation synthetisch hergestellter definierter Peptide auf die Induktion makroskopischer GVHD im Modell B10.D2 ® BALB/c (H-2^d)

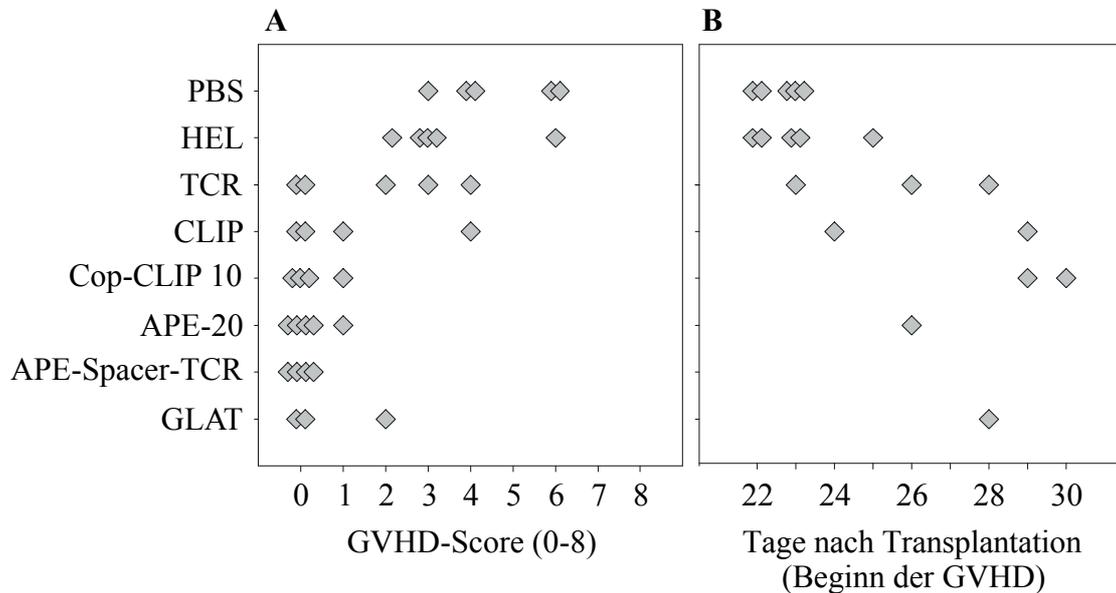


Abbildung 4.1:

Effekt der Behandlung mit synthetischen Peptiden auf die Induktion der GVHD im Modell B10.D2 ® BALB/c

A: Maximaler Ausprägungsgrad der GVHD in den experimentellen Gruppen (n=5)

Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer transplantierten Maus, untersucht an Tag 30 nach Transplantation. Der mediane Schweregrad betrug für die einzelnen Gruppen: 4 für PBS; 3 für HEL; 2 für TCR; 0,5 für CLIP; 0 für Cop-CLIP 10; 0 für APE-20; 0 für APE-Spacer-TCR; 0 für GLAT.

B: Beginn der GVHD in den experimentellen Gruppen (n=5)

Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus.

Die Inzidenz der GVHD in den einzelnen Gruppe betrug : 5/5 für PBS (medianer Beginn 21 Tage); 5/5 für HEL (medianer Beginn 23 Tage); 3/5 für TCR (medianer Beginn 26 Tage); 2/4 für CLIP (medianer Beginn 26,5 Tage); 2/4 für Cop-CLIP 10 (medianer Beginn 29,5 Tage); 1/5 für APE 20 (medianer Beginn 26 Tage); 0/5 für APE-Spacer-TCR; 1/3 für GLAT (medianer Beginn 28 Tage).

Ziel der Versuche war es, zu testen, ob durch Einsatz von Klasse-II MHC-bindenden Peptiden nach HLA-identischer Transplantation die Entwicklung einer GVHD im murinen System modifiziert bzw. verhindert werden kann. Die transplantierten Tiere erhielten über einen Zeitraum von 30 Tagen nach Transplantation täglich 200 µg der in PBS gelösten Peptide intraperitoneal appliziert und wurden auf klinische Zeichen der GVHD hin beobachtet und untersucht. Als Kontrollen dienten entweder nicht transplantierte Mäuse oder Kontrollmäuse, die nach Transplantation entweder mit PBS oder HEL, einem unspezifisch bindenden Kontrollpeptid, behandelt wurden.

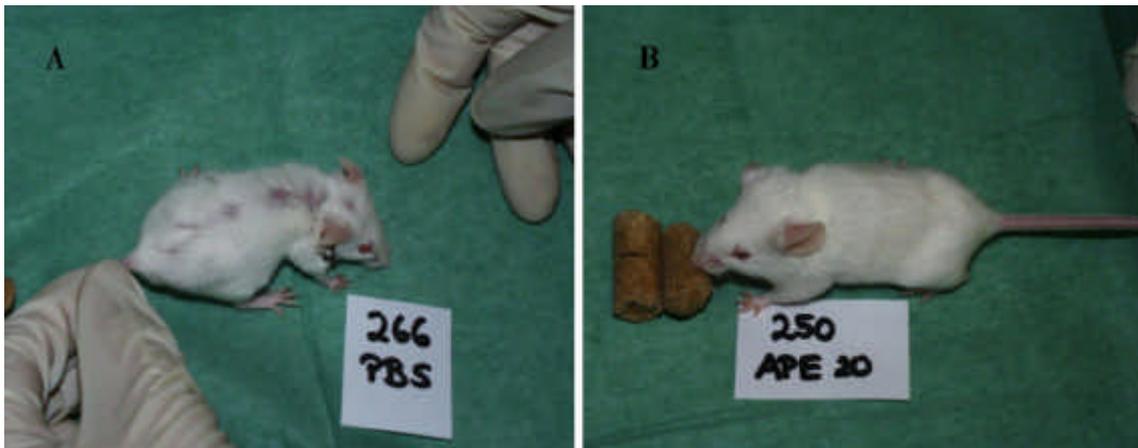


Abbildung 4.2:

Versuchstiere am Tag 30 nach Transplantation.

A.: Kontrollmaus, behandelt mit PBS. B.: Versuchsmouse, behandelt mit APE-20.

Daten aus den durchgeführten Experimenten zeigen, daß die Inzidenz der GVHD in den beiden transplantierten Kontrollgruppen jeweils 100% betrug. Wie auch in Abbildung 4.1 dargestellt, erkrankten alle 5 der mit PBS oder HEL behandelten Mäuse. Der Schweregrad der Erkrankung, gemessen an einem GVHD score von 0 bis 8 (Kapitel 3.4), ergab für die mit PBS behandelte Gruppe einen Median von 4 und für die mit HEL behandelte Tiergruppe einen Median von 3. Die Erkrankung manifestierte sich in den vorliegenden Experimenten klinisch vor allem durch Verlust des Fells (Abb. 4.2). Erste Symptome traten an Tag 22 bei 7 von 10 Kontrollmäusen an Hinterkopf und dorsalem Hals auf. An Tag 25 zeigten alle Tiere dieser Kontrollgruppen Anzeichen der GVHD, wobei sich der Fellverlust progredient über den Hinterkopf und Hals auf Rücken und Bauch der Tiere ausbreitete. Zusätzlich kam es an den betroffenen Hautabschnitten zur Ausbildung von erythematösen und schuppigen Läsionen, begleitet von Gewichtsverlust und Verschlechterung des Allgemeinzustandes. Auch Diarrhoe wurde zeitweise beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte in den mit den definierten allel-spezifischen Peptiden behandelten Versuchsgruppen die Induktion der GVHD teilweise verhindert werden: für das nur 17 Aminosäuren lange Peptid CLIP ergab sich eine Inzidenz von 2/4, und in der mit dem T-Zellrezeptorbindungsmotiv, genannt TCR, behandelten Versuchsgruppe erkrankten nur 3 von 5 Tieren. Der Schweregrad der GVHD lag mit

Medianen von 0,5 für CLIP und 2 für die mit TCR behandelte Gruppe weit unter den Werten der Kontrollgruppen. Ein noch deutlicheres Ergebnis zeigte sich für die Tiergruppen, die mit den länger-kettigen Peptiden behandelt worden waren. Die Applikation der Peptide Cop-CLIP 10 und APE-20 reduzierte die Inzidenz der GVHD von 100% in den Kontrollmäusen auf 50 % (2/4) respektive 20 % (1/5) in den mit Cop-CLIP 10 oder APE-20 behandelten Tieren. Keine Maus, der das Peptid APE-Spacer-TCR über den gesamten Zeitraum appliziert worden war, zeigte an Tag 30 nach Transplantation makroskopisch sichtbare Zeichen einer GVHD. Auch der Schweregrad der Erkrankung konnte mit Medianen von 0 für Cop-CLIP 10, 0 für APE-20 und 0 für das Peptid APE-Spacer-TCR im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich reduziert werden. Im Vergleich dazu erkrankte nach Applikation des randomisierten Copolymers GLAT eine von drei Mäusen, der Median für den GVHD score betrug 0. Alle Ergebnisse sind nochmals in Abbildung 4.1 zusammengefasst.

4.3 Gewichtsverläufe nach Knochenmarkstransplantation von Balb/c-Mäusen

Wie schon von Chao (1994) beschrieben, hat eine sich entwickelnde GVHD nach Knochenmarkstransplantation auf das hämatopoetische System beim Menschen im Vergleich zu den charakteristischen Zielorganen der Erkrankung nur geringfügige Auswirkungen. Allerdings ist eine persistierende Thrombozytopenie eine häufige Manifestationsform. Im murinen System hingegen wird der Status der Hämatopoese, der sich vor allem in Verlust an Körpergewicht und somit in charakteristischen Gewichtskurven widerspiegelt, häufig als klinischer Parameter für die Entwicklung einer GVHD herangezogen.

In den hier durchgeführten Versuchen verloren Kontrollmäuse wie auch die mit Peptiden behandelten Mäuse als Zeichen der Aplasie nach letaler Bestrahlung in den ersten 3-5 Tagen nach Transplantation zunächst kontinuierlich an Gewicht. Durch Anwachsen des Transplantats mit beginnendem „engraftment“ verbesserte sich der Allgemeinzustand der Tiere und sie nahmen wieder an Gewicht zu. Ab Tag 25 allerdings begannen die Gewichtskurven zu differieren, da die Kontrollgruppen (behandelt mit PBS bzw. mit HEL) durch die beginnende GVHD erneut an Gewicht zu

verlieren begannen, während sich die Versuchsgruppen der mit den untersuchten Peptiden behandelten Tiere stetig erholten und an Gewicht zunahm (in Abbildung 4.3 exemplarisch dargestellt für die Behandlung mit Cop-CLIP 10, GLAT und HEL).

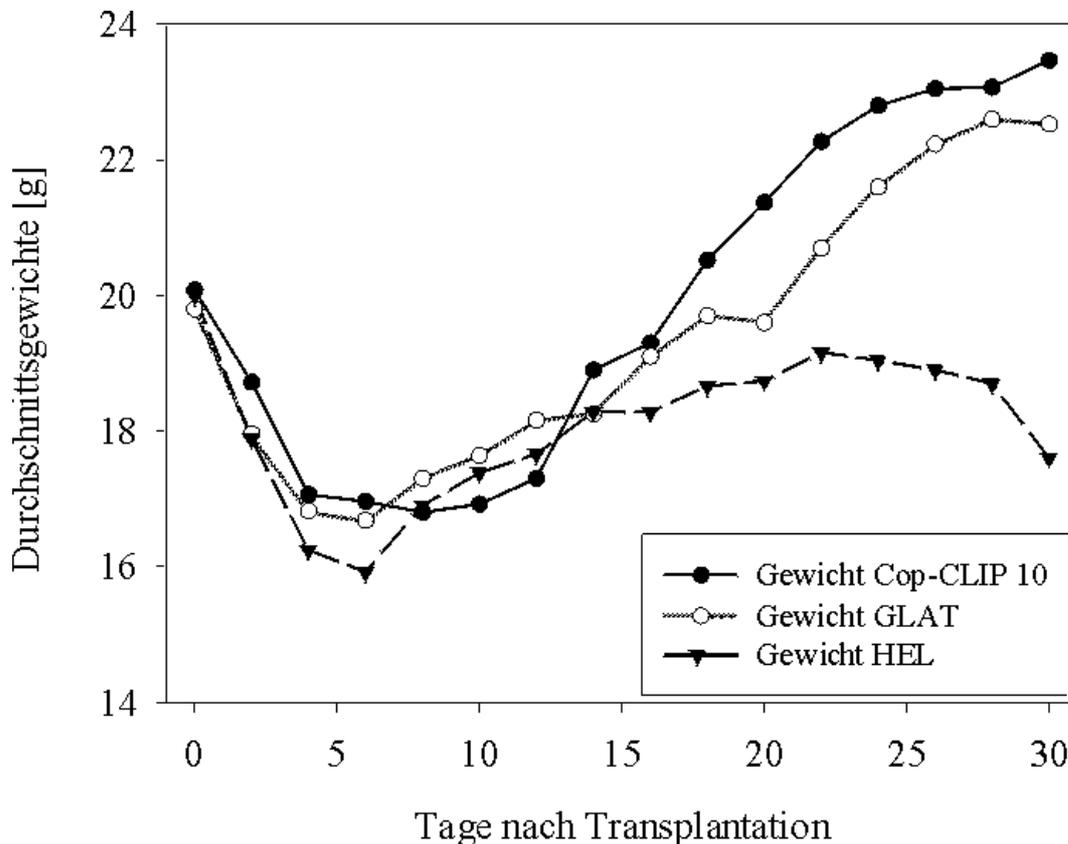


Abbildung 4.3:
Gewichtverläufe von Balb/c-Mäusen nach allogener Knochenmarkstransplantation und anschließender Behandlung mit den Peptiden Cop-CLIP 10, GLAT und HEL. Jedes dargestellte Ereignis repräsentiert den Mittelwert der jeweiligen Gruppe (n=5).

4.4 Immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten des Kolon knochenmarktransplantierter Mäuse

Schon Sale et al. konnten 1984 zeigen, daß eine akute GVHD pathologisch zur selektiven Epithelzerstörung und Inflammation der Zielorgane Haut, Leber und Intestinaltrakt führt. Je nach gewähltem Mausmodell und somit unterschiedlichen Nebenhistokompatibilitätsantigen-Differenzen sind an diesen Gewebsreaktionen, neben

der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und anderen Effektormechanismen, CD4⁺ und/oder CD8⁺ Spender- T-Lymphozyten beteiligt (Berger et. al., 1994). Im Intestinum findet man dabei eine massive Einwanderung entzündlicher Zellen in die Submucosa, welche meist eine Zerstörung des Kryptenepithels und fleckenförmige oder diffuse muköse Ulzerationen zur Folge hat.

Durch immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten der transplantierten Mäuse sollte untersucht werden, inwieweit die zum Einsatz gekommenen Peptide (Kapitel 2.5) eine T-Zellinfiltration vermindern und so das Ausmaß einer GvHD histologisch zu beeinflussen vermochten.

4.4.1 Immunhistochemische Färbung von CD4 im Kolon

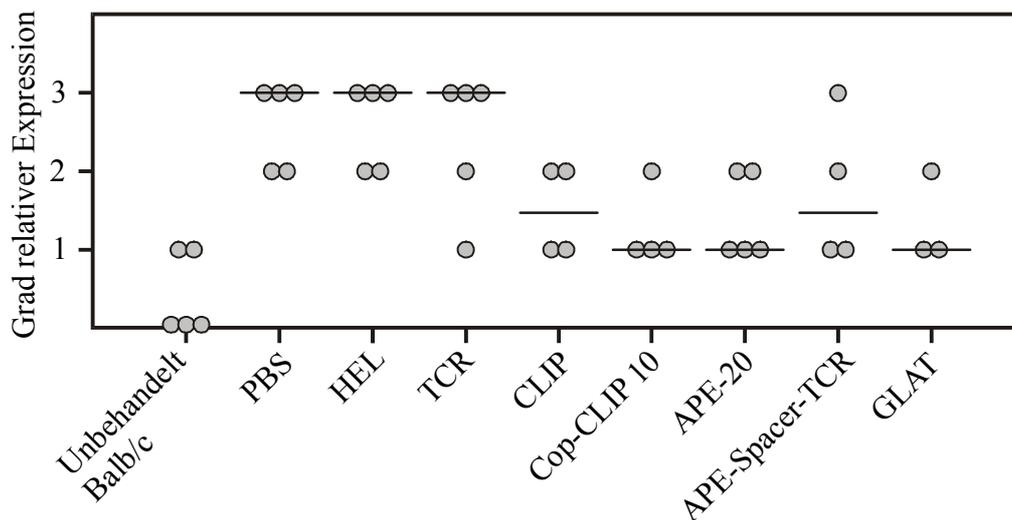


Abbildung 4.4:

Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD4 im Kolon.

Grad relativer Expression angegeben als 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, behandelt mit dem angegebenen Peptid und untersucht in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

Die Expression des Oberflächenantigens CD4 spiegelt das Verhalten der T-Helfer-Lymphozyten wieder. Im Gegensatz zu den unbehandelten Balb/c-Mäusen, die keine oder eine nur schwache Färbung CD4 positiver Zellen zeigten, ergab sich für die Kontroll-Tiergruppe (PBS behandelt) eine starke Expression immunreaktiver Zellen (Abb. 4.4). Dabei war auffällig, daß eine große Anzahl positiv gefärbter Lymphozyten, häufig in Zellaggregaten angeordnet, nicht nur in der Lamina propria, sondern auch in

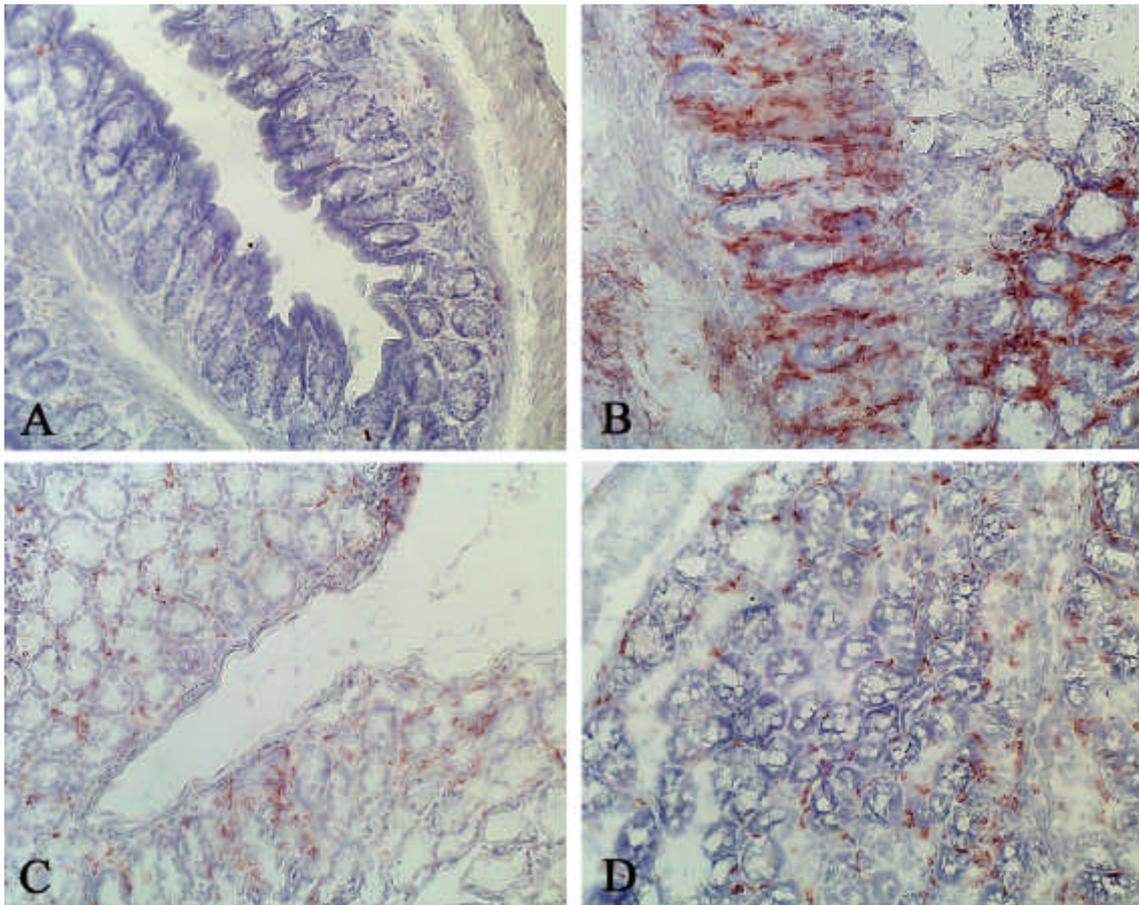


Abbildung 4.5:

Kryoschnitte des Kolons, immunhistochemische Färbung von CD4.

A.: Unbehandeltes Tier, B.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit PBS, C.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit APE-20, D.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit GLAT. (40 fache Vergrößerung)

der Submucosa des Kolons zu finden waren (Abb.4.5). Auch die Applikation der unspezifisch bindenden Peptid-Kontrolle HEL führte nach Transplantation zu einem hohen Expressionsgrad immunreaktiver Zellen. Beide Ergebnisse spiegeln die Beobachtungen wieder, die schon durch makroskopische Untersuchung der Tiere gewonnen worden waren: die Inzidenz der GVHD betrug in den mit PBS und HEL behandelten Kontrolltieren jeweils 100 %. Auch die Behandlung mit dem T-Zellrezeptorbindungsmotiv, genannt TCR, konnte eine Einwanderung inflammatorischer Zellen in die Lamina propria nicht verhindern, denn auch dort konnte eine starke Expression von CD4 festgestellt werden. Es war auffällig, daß positive Zellcluster vor allem nahe der Tunica muscularis mucosae zu finden waren, und sich auch einige längliche und verzweigte Zellen immunreaktiv verhielten. Im Gegensatz

dazu zeigte sich nach Behandlung mit dem Peptid CLIP nur ein schwacher bis mittlerer Expressionsgrad, und vor allem die Applikation der längerkettigen Peptide Cop-CLIP 10, APE-20 und APE-Spacer-TCR führte zu stark verminderter T-Zellinfiltration und nur geringer Anzahl immunreaktiver Zellen, teils vereinzelt in der Lamina propria, teils in den Peyerschen Plaques (Abb. 4.5): Wiederum waren auch hier vereinzelt Zellen mit verzweigten Ausläufern für CD4 positiv gefärbt. In der mit dem randomisierten Copolymer GLAT behandelten Versuchsgruppe lagen CD4 positive Zellen nur in geringer Anzahl verstreut in der Lamina propria des Kolon vor.

4.4.2 Immunhistochemische Färbung von CD8 im Kolon

Das Oberflächenantigen CD8 wird von zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert. In den histologischen Untersuchungen der Mäuse fanden sich solche CD8 positiven Zellen vor allem in der Lamina propria des Kolons (Abb. 4.7), wobei insgesamt betrachtet weniger CD8- als CD4-positive T-Zellen im Darmgewebe vorlagen. Für die beiden mit den Kontrollen PBS und HEL behandelten Tiergruppen zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Balb/c-Mäusen eine mittel- bis starke (PBS) respektive mittlere (HEL) Färbung immunreaktiver Zellen (Abb. 4.6). Auch nach Behandlung mit dem T-Zell-rezeptor-Bindungsmotiv TCR war eine ähnlich große Anzahl positiv gefärbter Lympho-

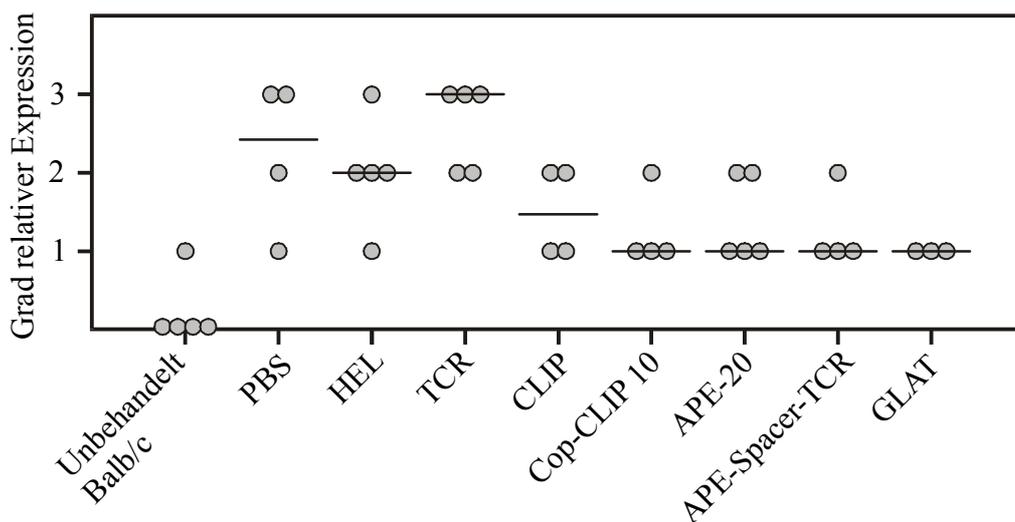
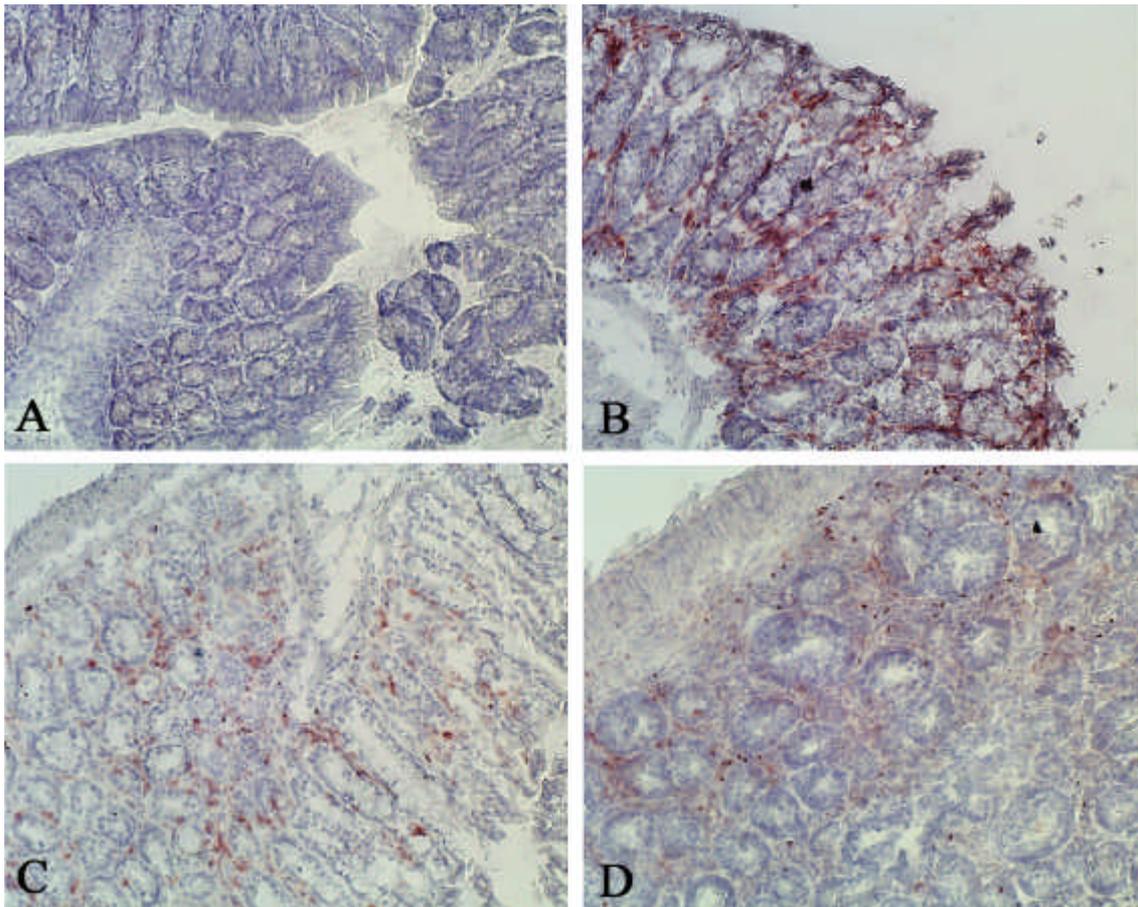


Abbildung 4.6:
Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD8 im Kolon.

Grad relativer Expression angegeben als 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, behandelt mit dem angegebenen Peptid und untersucht in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

**Abbildung 4.7:****Kryoschnitte des Kolon, immunhistochemische Färbung von CD8.**

A.: Unbehandeltes Tier, B.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit TCR, C.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit CLIP, D.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit APE-Spacer-TCR

zyten, wiederum vor allem in der Lamina propria des Kolons, zu finden (Abb. 4.7). Im Gegensatz dazu lagen die Werte, die sich nach Applikation der länger-kettigen Peptide Cop-CLIP 10, APE-20 und APE-Spacer-TCR ergaben, deutlich unter den Ergebnissen der Kontrollgruppen. Die Behandlung konnte bei allen drei Tiergruppen die Einwanderung inflammatorischer Zellen soweit vermindern, daß es nur zu einer schwachen Expression verstreut in der Lamina propria liegender positiv gefärbter T-Lymphozyten kam. Teilweise wurden auch immunreaktive Zellen in Peyerschen Plaques gefunden, so vor allem für die Peptide APE-20 und APE-Spacer-TCR (Abb.4.7). Auch die Applikation des mit nur 17 Aminosäuren zählenden und somit relativ kurzen Peptids CLIP führte zu einer Verringerung CD8-positiver Zellen, die teils verstreut und teils in Clustern vorlagen. Für das randomisierte Copolymer GLAT ergab

sich eine noch geringere Anzahl an detektierbaren T-Lymphozyten.

4.4.3 Immunhistochemische Färbung von $\alpha 4$ -Integrin (CD49d) im Kolon

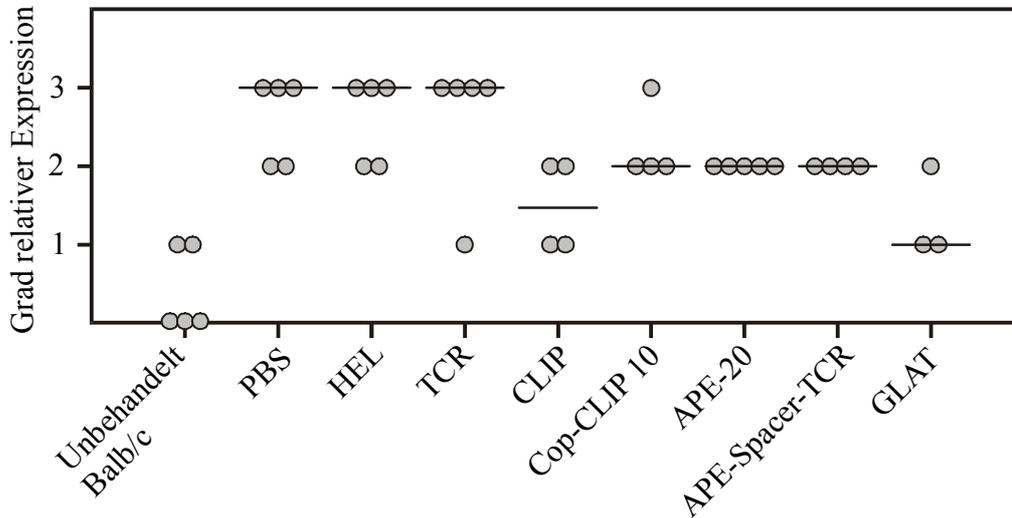


Abbildung 4.8:

Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von $\alpha 4$ -Integrin im Kolon.

Grad relativer Expression angegeben als 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, behandelt mit dem angegebenen Peptid und untersucht in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

$\alpha 4$ -Integrin wurde von Lymphozyten in der Lamina propria, in der Submucosa und in Peyerschen Plaques exprimiert. Insgesamt betrachtet zeigte sich für $\alpha 4$ -Integrin in der Lamina propria des Kolons ein höheres relatives Expressionsniveau als für CD4 oder CD8 im gleichen Gewebe (Abb. 4.8). Im Gegensatz zu den nicht transplantierten Negativkontrollen der Balb/c-Mäuse, für die sich keine oder nur eine sehr geringe Expression immunreaktiver Zellen ergab, fand sich in den beiden Kontrollgruppen der mit PBS und HEL behandelten Tiere jeweils eine starke Expression von $\alpha 4$ -Integrin, wobei auffällig war, daß immunreaktive Zellen häufig als positive Cluster in der Lamina propria und auch in der Submucosa angeordnet waren, und sich nach Behandlung mit der unspezifisch bindenden Kontrolle HEL auch Zellen in Peyerschen Plaques immunreaktiv verhielten. Auch nach Applikation des kurzen T-Zellrezeptorbindungsmotivs TCR zeigte sich weiterhin eine als stark gewertete Expression von CD49d, da eine große Anzahl positiver Zellen meist in Zellaggregaten nahe der Tunica muscularis mucosae und auch in der Submucosa zu finden waren

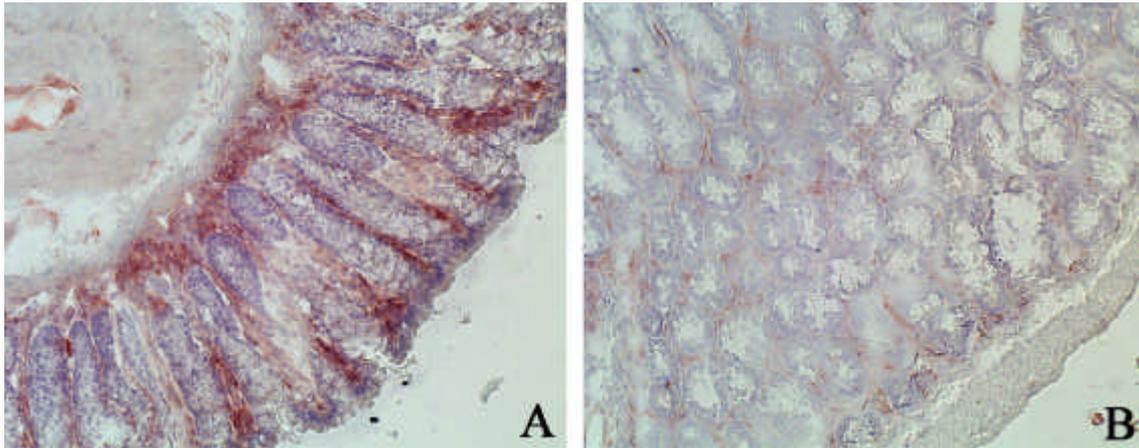


Abbildung 4.9:

Kryoschnitte des Kolon, immunhistochemische Färbung von CD49d.

A.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit TCR, B.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit CLIP.

(Abb. 4.9). α 4-Integrin wurde nach Behandlung mit den längerkettigen Peptiden Cop-CLIP 10, APE-20 und APE-Spacer-TCR in als mittelgradig gewertetem Maße exprimiert, wobei positive Zellen verstreut in den Zotten und Peyerschen Plaques zu sehen waren. Im Gegensatz dazu ergab sich für die Peptide CLIP und GLAT eine deutliche Abnahme der Expression von CD49d, sowohl im Vergleich zu den Kontrollgruppen als auch zu den anderen untersuchten Peptiden (Abb. 4.8). So konnte nach Applikation des kurzen Peptides CLIP nur noch eine gering bis mittelgradige Anzahl immunreaktiver Zellen und im Falle von GLAT eine als gering gewertete Expression einzelner verstreut liegender α 4-Integrin positiv gefärbter Zellen festgestellt werden.

4.4.4 Immunhistochemische Färbung von VCAM-1 im Kolon

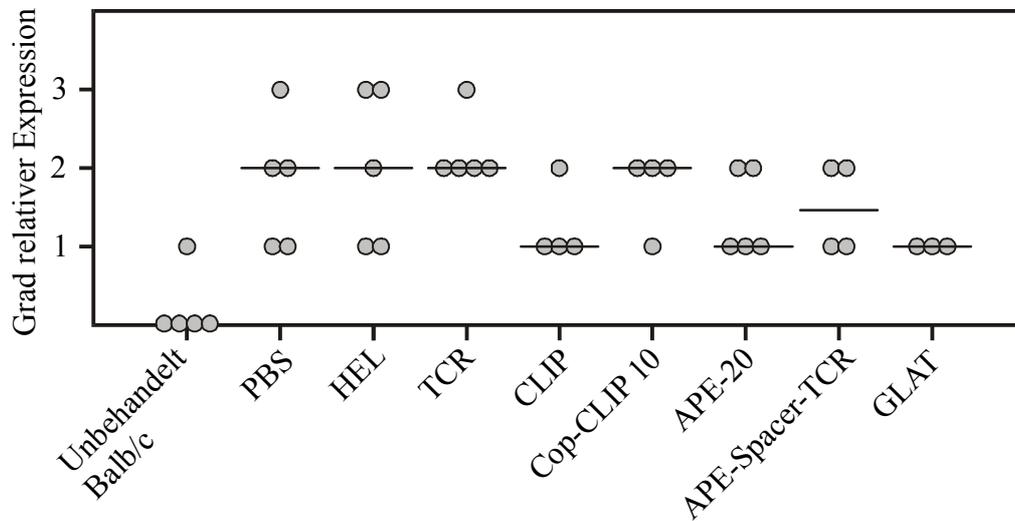


Abbildung 4.10:

Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von VCAM-1 im Kolon.

Grad relativer Expression angegeben als 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, behandelt mit dem angegebenen Peptid und untersucht in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

In der Lamina propria, in der Submucosa und auch in Peyerschen Plaques des Kolons fanden sich spezifisch gefärbte Zellen für VCAM-1 („Vascular cell adhesion molecule“, CD106), allerdings in allen acht Versuchsgruppen in geringerer Anzahl als nach immunhistochemischer Färbung gegen α 4-Integrin. Außerdem ergaben sich beim Vergleich der Peptide untereinander nur geringgradige Unterschiede in der Expressionsstärke von VCAM-1 (Abb. 4.10). Nach Behandlung mit den Kontrollen PBS und HEL zeigte sich in beiden Tiergruppen jeweils nur eine mittlere Expressionsstärke, wobei auffällig war, daß positive Zellen häufig innerhalb der Peyerschen Plaques und ansonsten in Form von Zellclustern in der die Glandulae intestinales umgebenden Lamina propria zu finden waren. Im Vergleich dazu ergab auch die Behandlung mit dem T-Zellrezeptorbindungsmotiv TCR und dem Peptid CLIP keine wesentlichen Unterschiede, denn auch hier wurden immunreaktive Zellen in mittelgradiger Anzahl exprimiert (Abb. 4.11). In der Versuchsgruppe, die mit dem Peptid APE-Spacer-TCR behandelt worden war, zeigte sich ein gering bis mittelgradiger Expressionsgrad immunreaktiver Zellen, die hauptsächlich nahe der Tunica muscularis mucosae und auch in der Submucosa zu finden waren. Als schwache

Expression wurde das Vorkommen nur einzelner, verstreut in der Lamina propria liegender Zellen gewertet, wie es sich nach Behandlung mit dem kurzen CLIP-Peptid, mit APE-20 und mit dem randomisierten Copolymer GLAT zeigte. Für die unbehandelten Mäuse des Tierstammes Balb/c ergab sich eine sehr geringe Anzahl immunreaktiver Zellen.

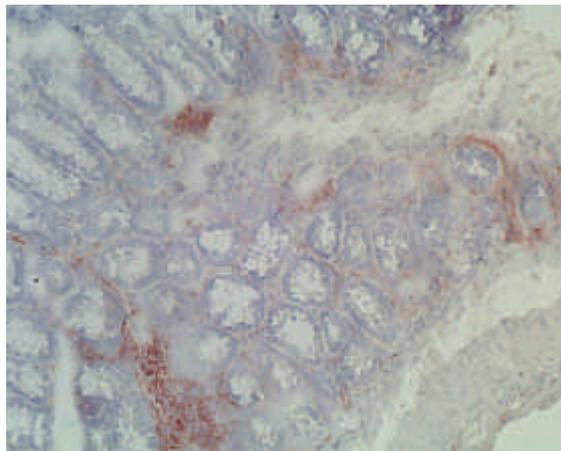


Abbildung 4.11:
Kryoschnitt des Kolon, immunhistochemische Färbung von CD 106.
Transplantierte Tier, Behandlung mit CLIP.

4.5 Immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten des Ileum knochenmarktransplantierte Mäuse

4.5.1 Immunhistochemische Färbung von CD4 im Ileum

CD4 wurde von T-Helfer-Lymphozyten exprimiert, die vor allem in der die Dünndarmzotten und die Glandulae intestinales umgebenden Lamina propria sowie auch in Peyerschen Plaques zu finden waren. Insgesamt lagen mehr CD4-positive T-Zellen in der Lamina propria des Ileum als in der Lamina propria des Kolon vor. Im Kolon der unbehandelten Mäuse des Tierstammes Balb/c fanden sich nur vereinzelt positive Zellen für CD4. In den beiden transplantierten Kontrollgruppen (PBS und HEL behandelt) zeigte sich jeweils eine starke Expression des T-Zellmarkers CD4 und somit eine massive Einwanderung inflammatorischer Zellen, die sich vor allem

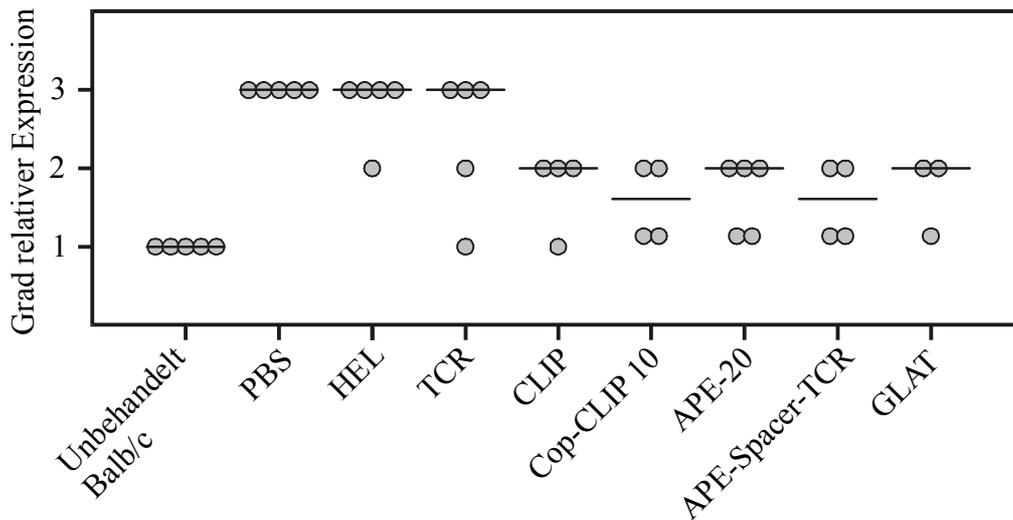


Abbildung 4.12:

Immunhistochemische Färbung von CD4 im Ileum.

Grad relativer Expression angegeben als 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, behandelt mit dem angegebenen Peptid und untersucht in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

nahe der Lamina muscularis mucosae in positiven Zellaggregaten anordneten (Abb. 4.13). Beide Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen, die schon durch makroskopische Untersuchung der Tiere gewonnen worden waren (Abschnitt 4.2). Auch nach Applikation des TCR-Peptids zeigte sich ein ähnliches Ergebnis und somit ein hoher Expressionsgrad. Hingegen zeigte sich im Ileum der Tiere, die mit dem Peptid CLIP behandelt worden waren, nur noch eine mittelgradige Anzahl immunreaktiver Zellen in der Lamina propria (Abb. 4.12), und auch durch Applikation der länger-kettigen Peptide Cop-CLIP 10, APE-20 und APE-Spacer-TCR konnte die Expression von CD4 und somit die T-Zellinfiltration im Vergleich zu den Kontrollgruppen gesenkt werden. So konnte ein nur noch mittelstarker Expressionsgrad beim Einsatz des Peptids APE-20 und eine jeweils schwach- bis mittelgradige Expression mit nur vereinzelt liegenden Zellen für die Peptide Cop-CLIP-10 und APE-Spacer-TCR beobachtet werden. In der mit dem Copolymer GLAT behandelten Versuchsgruppe lagen immunreaktive Zellen noch in mittlerer Expressionsstärke vor (Abb. 4.12).

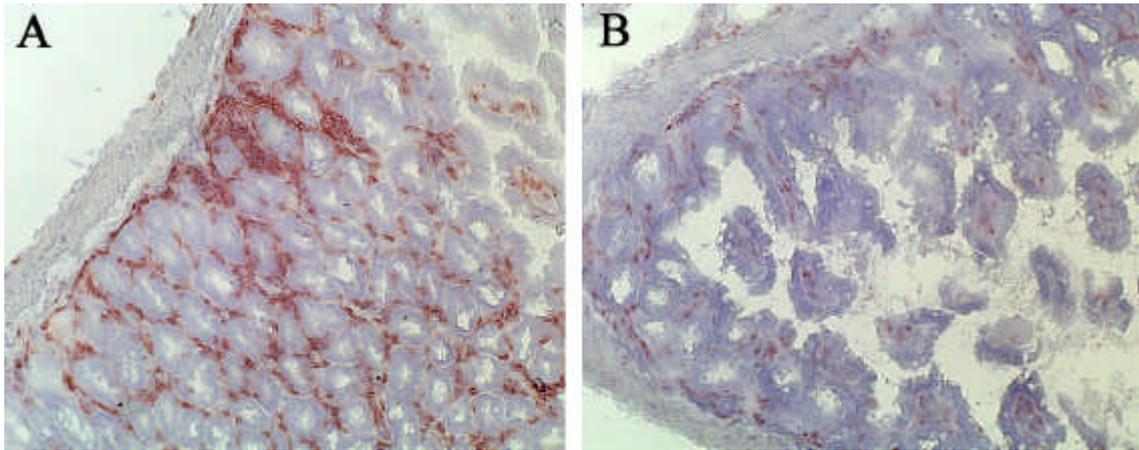


Abbildung 4.13:

Kryoschnitt des Ileum, immunhistochemische Färbung von CD4.

A.: Transplantierte Tier, Behandlung mit HEL, B.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit APE-20.

4.5.2 Immunhistochemische Färbung von CD8 im Ileum

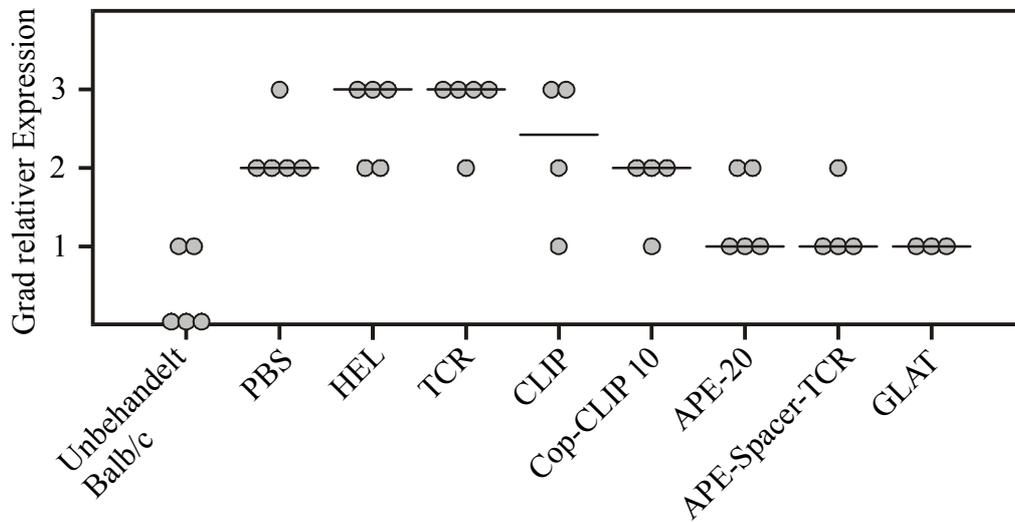


Abbildung 4.14:

Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD8 im Ileum.

Grad relativer Expression angegeben als 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, behandelt mit dem angegebenen Peptid und untersucht in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet

Allgemein waren CD8⁺ immunreaktive Zellen vor allem in der Lamina propria, aber auch in der Submucosa und in Peyerschen Plaques des Ileums zu finden. Im Vergleich zu der untransplantierten Negativkontrolle, für die sich keine oder nur eine sehr geringe Expression von CD8 ergab, führte die Transplantation bei der Kontrolle (PBS) zu einer mittleren Anzahl CD8 positiver Zellen, die sich vor allem in Zellclustern nahe der Tunica muscularis mucosae und in Peyerschen Plaques befanden (Abb. 4.15). Ein hoher Expressionsgrad des Oberflächenantigens CD8 und somit eine massive Einwanderung inflammatorischer Zellen fand sich auch nach Behandlung mit der Kontrolle HEL, wobei sich auch hier die Zellen bevorzugt in Zellaggregaten anordneten. Eine ähnlich große Anzahl und somit starke Expression immunreaktiver Zellen, wiederum hauptsächlich in Clustern nahe der Tunica muscularis mucosae zu finden, war auch noch nach Applikation der Peptide CLIP und TCR zu beobachten. Vereinzelt zeigten sich auch in der Submucosa des Ileums positive Zellen. Im Gegensatz dazu ergab sich nach Behandlung mit Cop-CLIP 10 ein nur noch mittlerer Expressionsgrad für CD8, und vor allem die Applikation der längeren Peptide APE-20 und APE-Spacer-TCR

fürte zu stark verminderter T-Zellinfiltration und somit geringer Anzahl immunreaktiver Zellen, die teils in Aggregaten, teils einzeln verstreut in der Lamina propria und in Peyerschen Plaques des Ileums zu finden waren. Auch in der mit dem randomisierten Copolymer GLAT behandelten Versuchsgruppe lagen positive Zellen nur vereinzelt in einem niedrigen Expressionsgrad vor. Alle Daten sind nochmals in Abbildung 4.14 zusammengefasst.

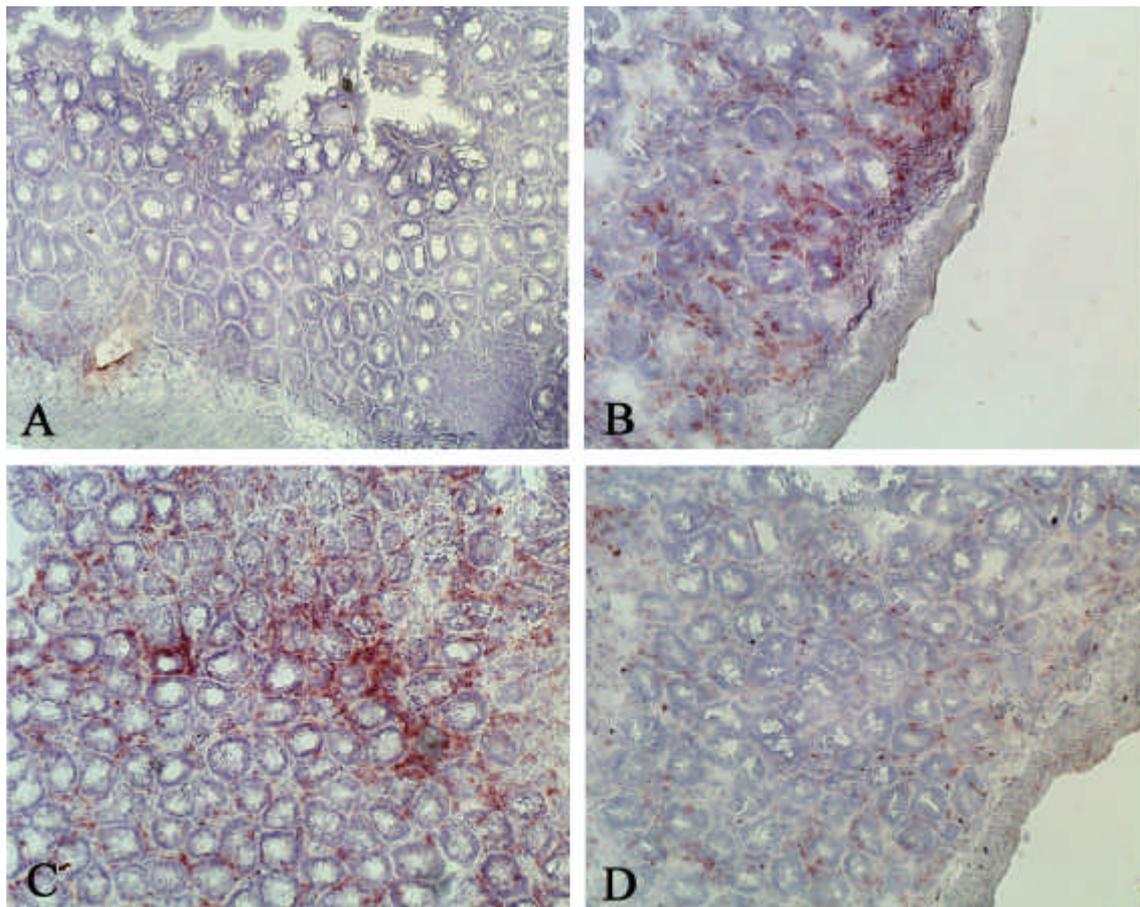


Abbildung 4.15:

Kryoschnitte des Ileum, immunhistochemische Färbung von CD8.

A.: Unbehandeltes Tier, B.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit PBS, C.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit TCR, D.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit GLAT.

4.5.3 Immunhistochemische Färbung von $\alpha 4$ -Integrin im Ileum

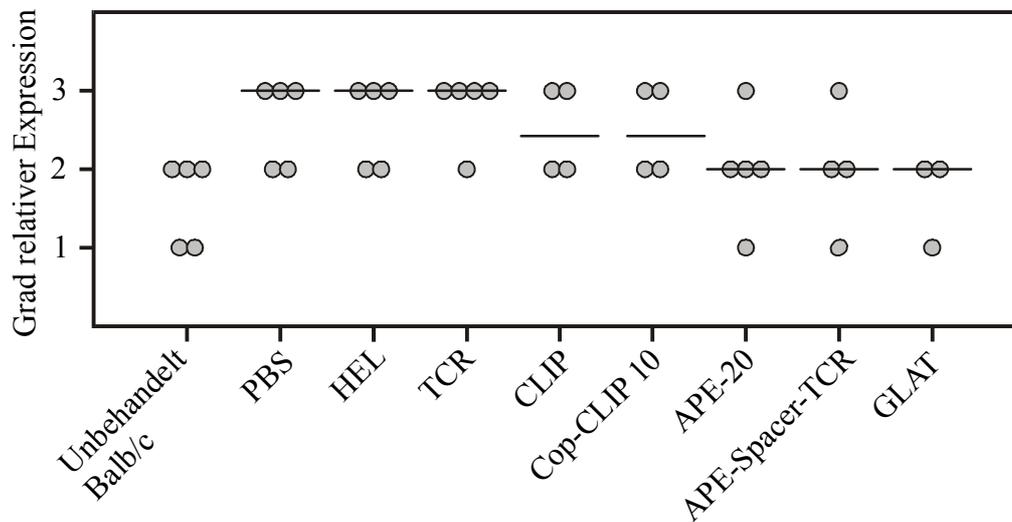


Abbildung 4.16:

Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von $\alpha 4$ -Integrin im Colon.

Grad relativer Expression angegeben als 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, behandelt mit dem angegebenen Peptid und untersucht in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

Positive Zellen für $\alpha 4$ -Integrin wurden in der Lamina propria und teilweise auch in Peyerschen Plaques des Ileum gefunden. Insgesamt betrachtet lag das Expressionsniveau von $\alpha 4$ -Integrin hier deutlich über dem Niveau von CD4, CD8 oder VCAM-1 im Gewebe des gleichen Organs, wobei auffällig war, daß schon in der Lamina propria des Ileum einer unbehandelten B10.D2-Maus immunreaktive Zellen in mittlerer Expressionsstärke vorlagen (Daten nicht gezeigt), und auch die Negativkontrollen der Balb/c-Mäuse bereits einen mittleren Expressionsgrad zeigten. Somit ergab sich für die Versuchsgruppen, die mit den Kontrollen PBS und HEL behandelt worden waren, ein als stark gewerteter Expressionsgrad positiver Zellen (Abb. 4.16), wobei diese häufig innerhalb der Peyerschen Plaques zu finden waren. Auch nach Behandlung mit dem Peptid TCR zeigte sich ein quantitativ ähnliches Ergebnis. Immunreaktive Zellen ordneten sich hier meist in Aggregaten nahe der Tunica muscularis mucosae an (Abb. 4.17). Nur leichte Differenzen im Vergleich zu den Kontrollgruppen ergaben sich nach Behandlung mit den Peptiden CLIP und Cop-CLIP 10; hier wurde eine mittelgradige bis starke Expression positiver Zellen gefunden. Deutlicher waren die Ergebnisse in den Versuchsgruppen, die mit den längeren Peptiden

APE-20 und APE-Spacer-TCR behandelt worden waren: es ergab sich für beide Gruppen ein mittlerer Expressionsgrad mit immunreaktiven Zellen, die vor allem nahe der Tunica muscularis mucosae und in Peyerschen Plaques lagen. Auch in der mit dem randomisierten Copolymer GLAT behandelten Gruppe fand sich nur noch eine mittelstarke Expression α 4-Integrin-positiver Zellen.

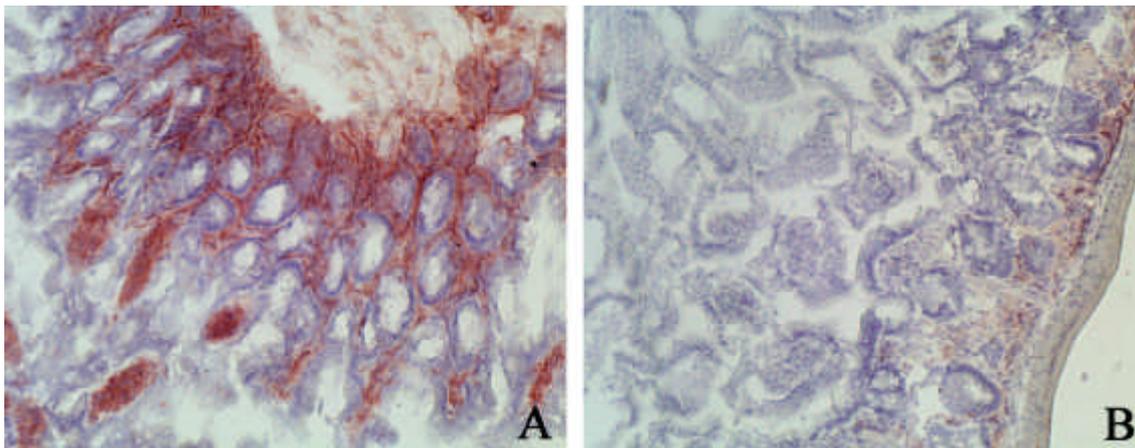


Abbildung 4.17:

Kryoschnitte des Ileum, immunhistochemische Färbung von CD49d.

A.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit TCR, B.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit APE-Spacer-TCR

4.5.4 Immunhistochemische Färbung von VCAM-1 im Ileum

Insgesamt betrachtet lagen weniger VCAM-1- als α 4-Integrin-positive Zellen in der Lamina propria des Ileum vor. Außerdem zeigten sich für den Vergleich der acht Peptide untereinander nur geringgradige Unterschiede in den jeweiligen Expressionsgraden (Abb. 4.18). Es war auffällig, daß auch in den Kontrollgruppen (PBS und HEL) nur eine schwache Expression VCAM-1-positiver Zellen vor allem in der Lamina propria des Ileum zu beobachten war. Diese Beobachtung unterscheidet sich damit deutlich von zuvor beschriebenen Ergebnissen. Dort war es in den Kontrollgruppen zu einer massiven Einwanderung inflammatorischer Zellen gekommen, was sich in mittleren bis hohen Expressionsgraden widerspiegelte. Auch in der mit dem Peptid CLIP behandelten Tiergruppe zeigte sich eine nur schwache Expression von VCAM-1. Die Behandlung mit dem T-Zellrezeptorbindungsmotiv TCR

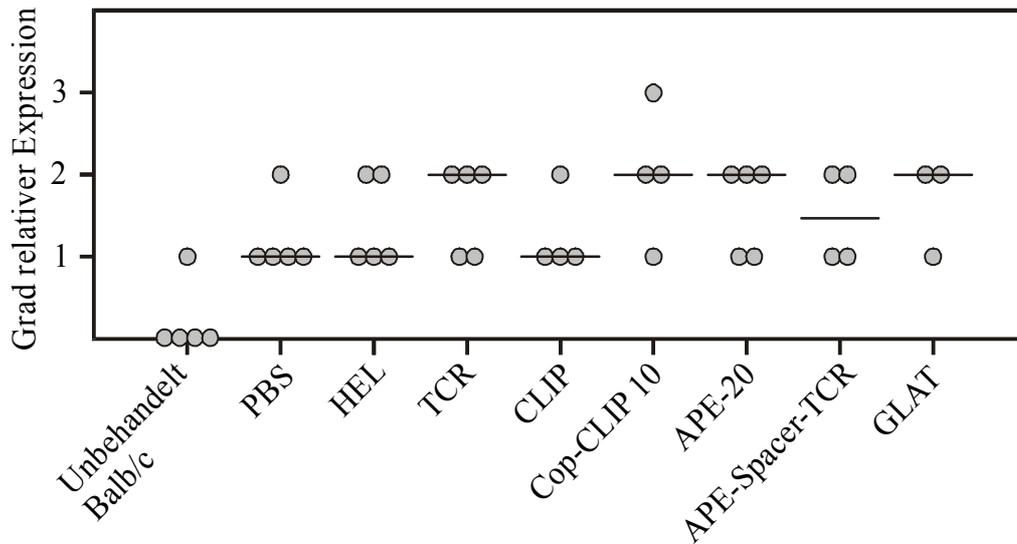


Abbildung 4.18:

Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von VCAM-1 im Ileum.

Grad relativer Expression angegeben als 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, behandelt mit dem angegebenen Peptid und untersucht in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

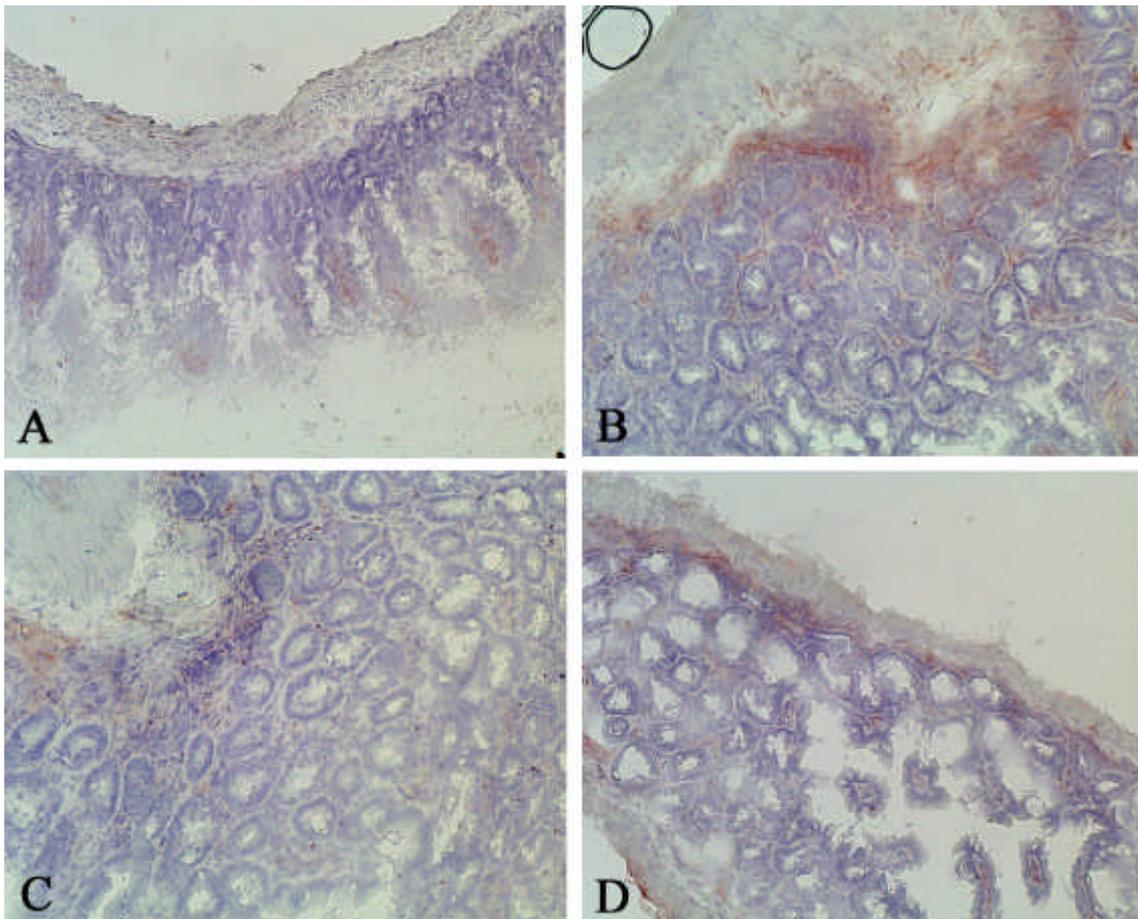


Abbildung 4.19:

Kryoschnitte des Ileum, immunhistochemische Färbung von CD49d.

A.: Unbehandeltes Tier, B.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit TCR, C.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit HEL, D.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit APE-20

und den längeren Peptiden Cop-CLIP 10, APE-20 und dem Copolymer GLAT hingegen führte zu einer jeweils mittelstarken Expression immunreaktiver Zellen, die vor allem lumenfern zwischen die Basalzellen der Mucosa infiltrierten (Abb. 4.19). Da die Anzahl der VCAM-1 positiven Zellen für die eben genannten Peptide im Vergleich zu den Kontrollpeptiden höher war, verhielten sich auch hier die Expressionsgrade eher spiegelbildlich zu den bisher gewonnenen Ergebnissen. In der mit dem Peptid APE-Spacer-TCR behandelten Tiergruppe zeigte sich eine schwache bis mittelgradige Expression VCAM-1 positiver Zellen, die häufig innerhalb der Peyerschen Plaques zu finden waren. Die Darmbiopsien der unbehandelten Mäuse (Balb/c) zeigten nur einzelne, sehr verstreut liegende immunreaktive Zellen.

4.6 Immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten der Haut knochenmarktransplantierte Mäuse

Nach Hamilton und Parkman (1983) repräsentiert sich eine akute GVHD im Zielorgan Haut histologisch durch eine Einwanderung inflammatorischer Zellen, mononukleären Zellinfiltraten in der Dermis und dyskeratotischen und vakuolisierten Zellen in der Epidermis. Durch immunhistochemische Analyse von Hautbiopsien transplantierte Balb/c-Mäuse sollte untersucht werden, inwieweit die zum Einsatz kommenden Peptide (Kapitel 2.5) eine T-Zellinfiltration vermindern und die beschriebenen pathologischen Veränderungen im Zielorgan Haut zu beeinflussen vermochten.

4.6.1 Immunhistochemische Färbung von CD4 in der Haut

Das von T-Helferzellen exprimierte Oberflächenantigen CD4 wurde vor allem in der Dermis und Epidermis, teilweise aber auch in der Subcutis gefunden. Im Gegensatz zu den Darmbiopsien der unbehandelten Tiere (keine oder nur schwache Expression von CD4) ergab sich für die mit den Kontrollen PBS und HEL behandelten Tiere, den Ergebnissen der makroskopischen Untersuchungen entsprechend, für beide Gruppen jeweils ein starker Expressionsgrad. Die Hautbiopsien der Mäuse aus der mit PBS behandelten Kontrollgruppe wiesen dabei vereinzelt vakuolisierte Zellen in der

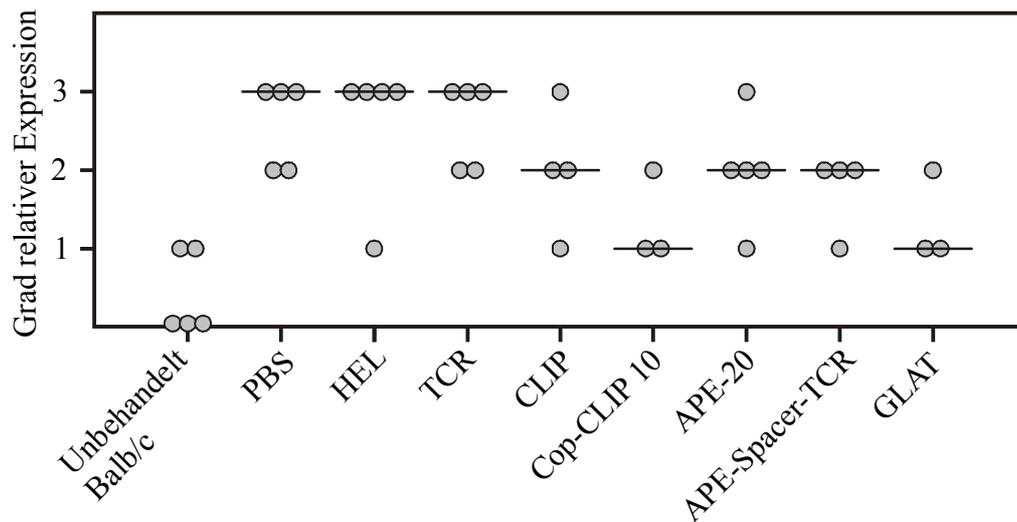


Abbildung 4.20:

Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD4 in der Haut.

Grad relativer Expression angegeben als 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, behandelt mit dem angegebenen Peptid und untersucht in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

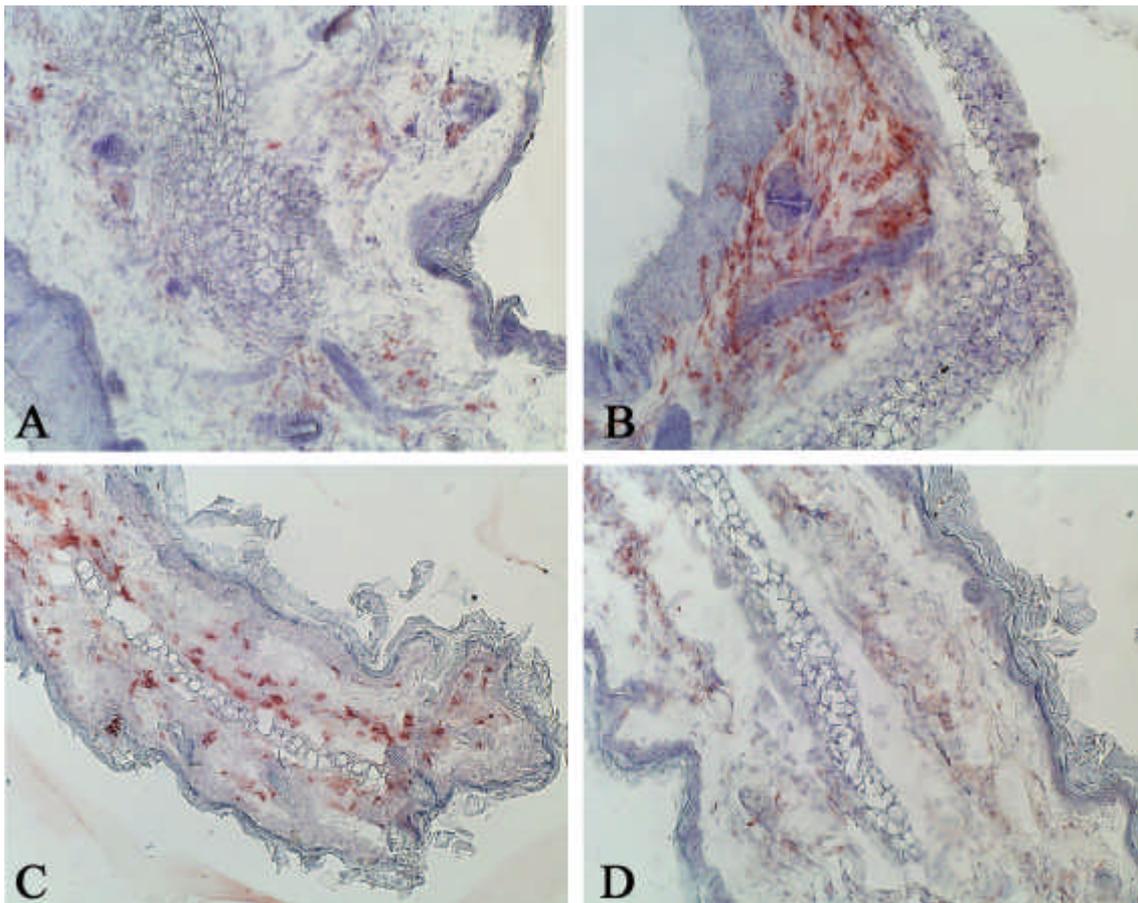


Abbildung 4.21:

Kryoschnitte der Haut, immunhistochemische Färbung von CD4.

A.: Unbehandeltes Tier, B.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit HEL, C.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit CLIP, D.: Transplantiertes Tier, Behandlung mit APE-Spacer-TCR

Epidermis, teils die Haarfollikel umgebende, inflammatorische Zellinfiltrate in der Dermis und einige positive Zellen auch in der Subcutis auf. Nach Applikation des unspezifisch bindenden HEL lagen immunreaktive Zellen vor allem in der Dermis und Epidermis vor (Abb. 4.21). Es wurden auch einzelne längliche und verzweigte Zellen für CD4 positiv gefärbt. Auch die Behandlung mit dem T-Zellrezeptorbindungsmotiv konnte die Einwanderung inflammatorischer Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen nicht entscheidend vermindern und führte zur Bildung lymphozytärer Aggregate vor allem in der Dermis. Hingegen kam es nach Applikation des kurzen Peptids CLIP zu einem nur noch als mittelgradig bewerteten Expressionsgrad immunreaktiver Zellen vor allem in der Dermis, und auch die Behandlung mit den längeren Peptiden APE-20 und APE-Spacer-TCR führte zu einem ähnlichen Ergebnis mit vereinzelt in der Dermis liegenden AEC gefärbten Zellen. Eine noch deutlichere Minderung CD4 positiver und somit inflammatorischer Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen ergab sich für das Peptid Cop-CLIP 10 und für das Copolymer GLAT, wobei nur ganz verstreut in der Dermis und Epidermis immunreaktive Zellen zu finden waren. Diese Ergebnisse sind in Abb. 4.20 zusammengefaßt.

4.6.2 Immunhistochemische Färbung von CD8 in der Haut

Die Expression von CD8 spiegelt das Verhalten der zytotoxischen T-Lymphozyten wider. In den repräsentativen Hautbiopsien wurden immunreaktive Zellen vor allem in der Dermis und Subcutis gefunden. Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, in deren Kolon sich keine oder nur sehr vereinzelt CD8 positive Zellen fanden, kam es in der transplantierten Kontrollgruppe (PBS) zu massiver Einwanderung inflammatorischer Zellen vor allem in die Dermis und verstreut auch in die Subcutis, und somit zu einer starken Expression CD8 positiver Zellen. Die Applikation der unspezifisch bindenden Kontrolle HEL führte ebenfalls zu einer als mittelstark gewerteten Infiltration CD8 positiver Zellen, wobei hier auffällig war, daß immunreaktive Zellen häufig vor allem um die Haarfollikel herum angeordnet waren. Eine ähnlich große Anzahl immunreaktiver Zellen, teils in der Dermis, teils in der Subcutis zu finden, ergab sich nach Behandlung mit dem kurzen T-Zellrezeptorbindungsmotiv TCR. Im Gegensatz dazu konnten in den mit den Peptiden CLIP, Cop-CLIP 10, APE-20, APE-Spacer-TCR

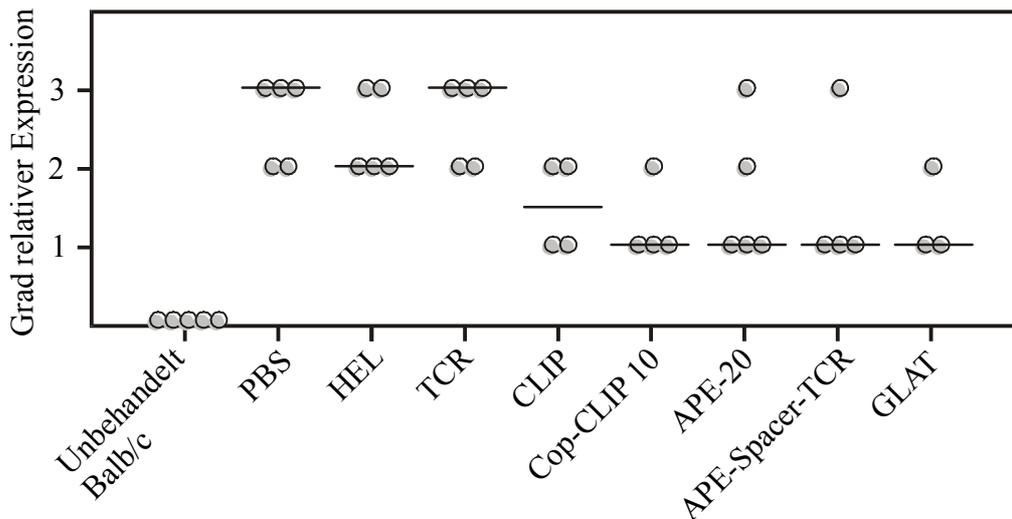


Abbildung 4.22:

Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD8 in der Haut.

Grad relativer Expression angegeben als 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Expression. Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer Maus, behandelt mit dem angegebenen Peptid und untersucht in zwei Gefrierschnitten. Die Mediane der Gruppen sind als Balken eingezeichnet.

und GLAT behandelten Versuchsgruppen histologische Veränderungen im Sinne einer GvHD und somit eine T-Zellinfiltration deutlich vermindert werden. Nach Applikation des kurzen Peptides CLIP kam es zu einem schwachen bis mittelstarken Expressionsgrad vereinzelt in der Dermis liegender CD8 positiver Zellen, und in der mit Cop-CLIP 10 behandelten Gruppe zeigte sich eine nur schwache Expression mit häufig um die Haarfollikel herum angeordneten Zellen. Darüber hinaus waren auch einzelne immunreaktive Zellen in der Dermis und Epidermis zu finden. Auch die Behandlung mit APE-20, APE-Spacer-TCR (hier waren CD8 positive Zellen wiederum vor allem um die Haarwurzeln herum angeordnet) und dem randomisierten Copolymer GLAT führte nur zu einer schwachen Expression von CD8 und wies in den Hautbiopsien nur vereinzelte positiv gefärbte Zellen auf. Alle Ergebnisse sind nochmals in Abb. 4.22 zusammengefaßt.

4.7 Computergestützte Auswertung der immunhistochemischen Färbungen (CD4) des Kolon knochenmarktransplantierte Mäuse

Ein Teil der histologischen Schnitte (Kolon, Färbung des Oberflächenantigens CD4) wurde zusätzlich computergestützt ausgewertet. Nach Festlegung der entsprechenden Farbintensitätsbereiche für positiv gefärbte Gewebsstrukturen (Schwellenwertdefinition) berechnete die verwendete Software den prozentualen und somit relativen Flächenanteil genau dieser Intensitäten bezogen auf die Gesamtfläche der entsprechenden Bildausschnitte (Kapitel 3.11).

Für Gewebeschnitte der unbehandelte Tiere des Mäusestamms Balb/c ergab sich ein relativer Rotanteil von $0,19 \pm 0,1$. Gewebeschnitte von Mäusen, die die Kontrollpeptide PBS und HEL erhalten hatten, zeigten relative Rotanteile von $3,15 \pm 1,84$ beziehungsweise $2,67 \pm 1,4$.

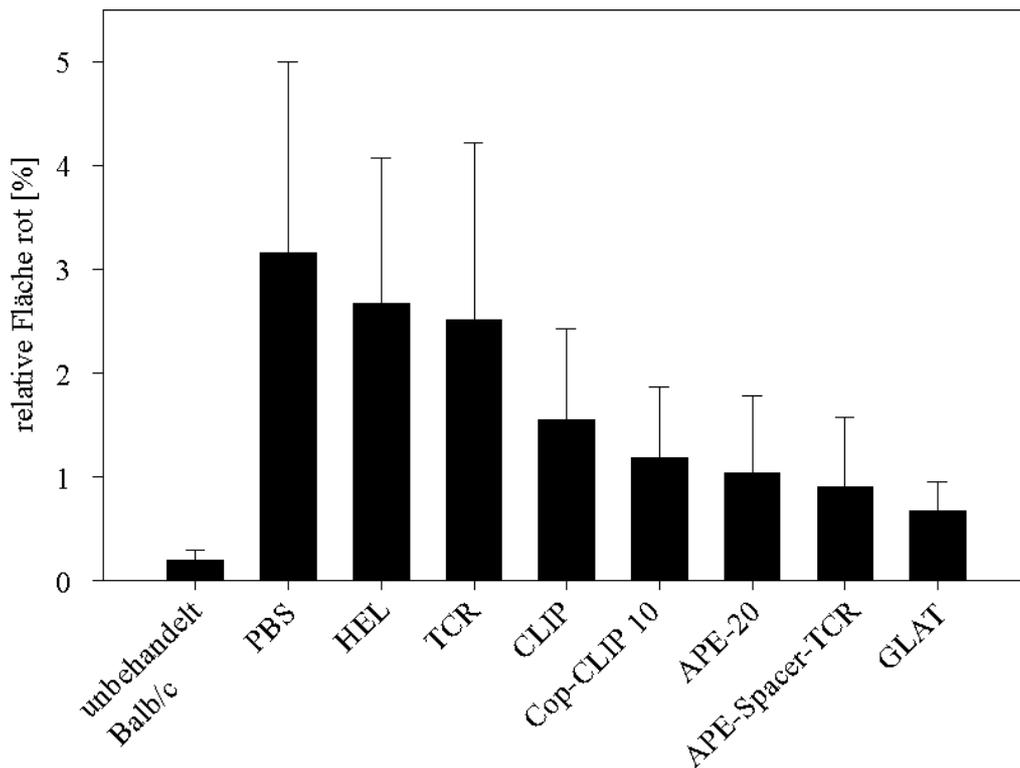


Abbildung 4.23:

Computergestützte Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD4 im Kolon.

Der Grad relativer Expression ist angegeben als Prozent der Fläche positiv gefärbter Zellen bezogen auf die durch Zellen bedeckte Gesamtfläche im Gefrierschnitt, wobei unbedeckte Flächen im Gefrierschnitt vorher subtrahiert worden waren. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert einer Tiergruppe, behandelt mit dem angegebenen Peptid ($n = 3$ bis 5 Tiere). Pro Tier wurden 5 repräsentative Ausschnitte im Gewebeschnitt gewählt, mittels des Computerprogramms DP-SOFT (Fa. SIS, Münster) ausgewertet und abschließend die Werte über die jeweilige Tiergruppe gemittelt. Der Fehler ist dargestellt als Standardabweichung ($s(n-1)$).

Für die eingesetzten synthetischen allelspezifischen Peptide ergaben sich relative Rotanteile von $2,51 \pm 1,7$ für das Peptid TCR, $1,55 \pm 0,88$ für das Peptid CLIP, $1,18 \pm 0,68$ für Cop-CLIP 10, $1,04 \pm 0,74$ für APE-20, $0,9 \pm 0,67$ für APE-Spacer-TCR und $0,67 \pm 0,28$ für das randomisierte Copolymer GLAT. Diese Auswertung spiegelt größtenteils die Ergebnisse wider, die über die semiquantitative Beurteilung der gefärbten Schnitte manuell gewonnen worden waren. Für das 56 Aminosäuren lange Peptid APE-20 und für das bifunktional mit Klasse-II MHC-Komplex und T-Zellrezeptor interagierende Peptid APE-Spacer-TCR ergaben sich damit die geringsten relativen Rotanteile und somit niedrigsten T-Zellinfiltrationen, wobei nahezu die Werte für das als Vergleichspeptid eingesetzte Copolymer GLAT erreicht wurden. Alle Ergebnisse sind nochmals in Abbildung 4.23 zusammengefasst.

4.8 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung CD3/CD4 von Gefrierschnitten des Ileum knochenmarktransplantiertter Mäuse

Histologische Schnittpräparate des Ileum transplantiertter Tiere wurden Doppel-Immunfluoreszenz-gefärbt (Kapitel 3.8). Ausgewählt wurden die Oberflächenantigene CD3 und CD4. Ergebnisse dieser Färbeserie, deren Ergebnisse nicht im Einzelnen dargestellt werden, bestätigen die immunhistochemischen Färbungsergebnisse in Abschnitt 4.5.1 .

5 Diskussion

5.1 Methodik

5.1.1 Wahl des Modells

Viele Fortschritte im Bereich der immunologischen Grundlagenforschung, die zu einem tieferen Verständnis komplexer zellulärer Interaktionen und weiterer fundamentaler Mechanismen des Immunsystems geführt haben, und so klinische Interventionen im Bereich diverser humaner Erkrankungen erst ermöglichten, basieren zu einem großen Teil auf Studien, in denen tierexperimentelle Modelle zur Anwendung kamen. Diese *in vivo* Ansätze ermöglichen es, komplizierte pathophysiologische Prozesse auch im Zusammenhang mit der GVHD im Detail zu untersuchen, wobei es im Gegensatz zu *in vitro* Studien im lebenden Modell gelingt, auch komplexere Interaktionen im einzelnen Individuum zu erfassen. Somit ist eine Annäherung an die Wirklichkeit auch experimentell sehr viel eher gegeben. Für den Immunologen ist oft die Maus das Tier der Wahl, da ihr genetischer Hintergrund genau charakterisiert ist, und insofern einzelne Variablen bei ansonsten konstanten Studienbedingungen gezielt verändert und die Auswirkungen untersucht werden können. Allerdings weisen diese *in vivo* Systeme auch Grenzen auf, da Daten aus dem Tiermodell nicht immer auf den Menschen übertragbar sind. Solche Diskrepanzen zwischen Mausmodell und Mensch finden sich auch in Zusammenhang mit der hier vorliegenden Arbeit.

So konnten Busch et al. 1990 zeigen, daß unterschiedliche Klasse-II MHC Allele bei der Maus ein sehr strenges Bindungsmotiv aufweisen, während beim Menschen bei verschiedenen Klasse-II Allelen ein deutlich degeneriertes Bindungsmotiv beobachtet werden kann. Als weiteres Beispiel differiert nach Korngold und Sprent (1987b) je nach verwendeten Mausstämmen die für eine GVHD ursächliche Untergruppe der T-Zellen (CD4⁺- oder CD8⁺- Zellen), wobei im Gegensatz dazu fast ausnahmslos die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen für die Induktion einer GVHD beim Menschen verantwortlich sind. Desweiteren ist zu beachten, daß das murine Knochenmark im Vergleich zum Menschen eine geringere Anzahl T-Zellen enthält und in Transplantationsstudien, in denen bewußt eine GVHD ausgelöst werden soll, die

fehlenden T-Zellen aus Milz oder Lymphknoten zusätzlich appliziert werden müssen. Als ein weiterer wichtiger Unterschied fehlt dem erwachsenen Menschen die im Mausmodell vorhandene positive und negative Selektion der Zellen des Immunsystems im Thymus.

5.1.2 Wahl der Auswertungsmethode

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem ersten Auswertungsschritt makroskopisch der klinische Ausprägungsgrad der GVHD in der zu untersuchenden Maus beurteilt. Die Einteilung erfolgte nach Schweregrad (eingeteilt auf einem Score von 0 bis maximal 8) und nach Gewichtsverlauf.

Zur mikroskopischen Quantifizierung von T-Zellantworten *in vivo* als Korrelat der GVHD bieten sich verschiedene Methoden an: die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die untersuchten Zellen werden im Dunkelfeld nach Größe und Granularität beurteilt. Desweiteren kann mittels PCR sehr sensitiv die klonale Expansion von T-Zellen über die Bestimmung bestimmter V β -Subtypen bestimmt werden. Eine Technik, die in dieser Arbeit Anwendung findet und es hervorragend ermöglicht, Zellen gewebsspezifisch quantitativ als auch qualitativ nachzuweisen, ist die Immunhistochemie. Ziel immunhistochemischer Methoden sind Nachweis und Identifikation antigener Komponenten in Zellen oder Gewebsschnitten durch spezifische Antikörper, die durch Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme oder Isotope markiert sind. Mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern können einzelne Zellen mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden, allerdings 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. Um die Vorteile der beiden letztgenannten Methoden zu vereinen, wurden sie in dieser Arbeit in Kombination eingesetzt, um die GVHD induzierte T-Zellantwort zu untersuchen.

Positiv gefärbte Gewebsstrukturen wurden in den Schnitten nach der Häufigkeit ihres Vorkommens bewertet. Es folgte eine semiquantitative Einteilung in keine, schwache, mittlere oder starke Expression. In Abhängigkeit von Erfahrung und Subjektivität des Untersuchers ist eine solche semiquantitative Bewertung dennoch kritisch zu betrachten. Insofern wurde in dieser Arbeit zusätzlich eine computergestützte Auswertung angeschlossen. Zwar müssen auch hier aus technischen Gründen möglichst repräsentative Bildausschnitte sowie die als positiv zu bewertende Farbinsintensität zuvor ausgewählt werden, dennoch verspricht diese Methode ein sehr viel höheres Maß an Objektivität und Unabhängigkeit vom Untersucher.

5.1.3 Wahl der untersuchten Oberflächenmarker

T-Zellen sind als Vermittler zellulärer Immunreaktionen wesentlich an der Auslösung und am Ausprägungsgrad der GVHD beteiligt. Eine T-Zell-Depletion des Transplantats verringert die Inzidenz und mildert die Symptome der Erkrankung deutlich (Korngold und Sprent, 1978; Prentice et al., 1984). Nach Korngold und Sprent (1987b) wird die GVHD im Transplantationsmodell der Mausstämmen B10.D2→Balb/c hauptsächlich durch L3T4⁺-Zellen (CD4-äquivalent) und weniger durch Lyt2⁺-Zellen (CD8-äquivalent) ausgelöst, sofern sie in ausreichender Menge transplantiert werden. Es wurde außerdem gezeigt, daß die Transplantation einer Kombination aus beiden T-Zell-Subpopulationen zur Verstärkung der GVHD führte (Hamilton, 1987). In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Infiltration CD4- und CD8-positiver T-Zellen in die Zielorgane der GVHD in immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten quantitativ und qualitativ beurteilt, sowie eine mögliche Minderung der positiv gefärbten Zellen durch den Einsatz der synthetischen Peptide.

Die vollständige Aktivierung von T-Zellen erfordert neben der Interaktion des T-Zellrezeptors mit seinem spezifischen Antigen, einem in der Grube des HLA-Moleküls präsentierten Peptids, ein weiteres sogenanntes kostimulatorisches Signal. Erst die Anwesenheit eines solchen zweiten Signals, das durch Interaktion eines Rezeptors auf der T-Zelle mit einem spezifischen Liganden auf der präsentierenden

Zelle vermittelt wird, führt entweder zur vollständigen Aktivierung der T-Lymphozyten mit nachfolgender Proliferation und klonaler Expansion oder zu einem Zustand der T-Zell-Anergie, der die T-Zellen unempfindlich für weitere Antigen-spezifische Signale macht (Schwartz, 1990; Hardning et al., 1992; Gimmi et al., 1993). Es sind inzwischen einige dieser Rezeptor/Ligandpaare bekannt, wobei es interessanterweise vom jeweiligen Aktivierungsgrad der verantwortlichen T-Zellsubpopulation (ruhend oder aktiviert) abhängig ist, welches kostimulatorische Signal im Rahmen der Induktionsphase der GVHD zur T-Zellaktivierung benötigt wird (Damle et al. 1992; Tanaka et al. 2000).

Ein bekannter kostimulatorischer Faktor auf Antigen präsentierenden Zellen ist VCAM-1 ("Vascular cell adhesion molecule", CD106), welcher erstmals 1989 molekularbiologisch charakterisiert werden konnte (Osborn et al., 1989). Das Protein gehört zur Immunglobulin Gen-Superfamilie und wurde von den Autoren als Adhäsionsmolekül beschrieben. VCAM-1 wird von aktivierten Endothelien, von dendritischen Zellen sowie von Makrophagen in Milz und Thymus exprimiert (Rice et al., 1990), wobei eine Stimulation von Endothelzellen *in vitro* mit TNF- α , IFN- γ und IL-1 zur vermehrten Expression dieses Adhäsionsmoleküls führt (Osborn et al., 1989). Da Burger (2000) zeigen konnte, daß allogene (B10.D2 \rightarrow Balb/c) und syngene (Balb/c \rightarrow Balb/c) transplantierte Kontrolltiere früh nach Transplantation eine verstärkte Expression von VCAM-1 aufweisen, wobei diese bei den allogenen transplantierten Mäusen persistiert, ist die verstärkte (Haut, Leber) bzw. verlängerte Expression (Ileum, Kolon) von VCAM-1 daher ein wichtiger Marker zur Beurteilung einer GVHD nach allogener Knochenmarktransplantation und wurde aus diesem Grund in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Einen wichtigen Hinweis für die besondere Bedeutung von VCAM-1 im Rahmen der GVHD-Induktion lieferte eine Untersuchung von Schlegel et al. (1995). Hier konnte gezeigt werden, daß durch Blockade von VCAM-1 mittels eines monoklonalen Anti-VCAM-1-Antikörpers über 5 Wochen nach allogener Knochenmarktransplantation (Mausstämme B10.D2 \rightarrow Balb/c) eine Reduktion der auftretenden GVHD von 100 % in der Kontrollgruppe auf 53 % in der behandelten Gruppe erreicht werden konnte. Damit sank die Letalität von 100 % auf 40 % ab. Auch in anderen immunologischen Erkrankungen wird VCAM-1 eine entscheidende Rolle in

der Pathophysiologie zugeschrieben. Als Beispiele seien eine jeweils vermehrte Expression von VCAM-1 in den erkrankten Hautarealen bei Psoriasis (Veale et al., 1995) und in murinen Modellen der chronischen Colitis (Sans et al., 1999) genannt. Die Färbungen von VCAM-1 beschränken sich in dieser Arbeit auf die Zielorgane Kolon und Ileum, da nach Burger (2000) in der Haut die maximale Expressionsstärke für VCAM-1 an Tag 9 dokumentiert wird, und somit für den hier untersuchten Zeitpunkt Tag 30 zu früh liegt.

Als weiteres in den immunhistochemischen Färbungen gewähltes Oberflächenantigen wurde in dieser Arbeit die Expression von VLA-4 (engl. "very late activation antigen", CD49d/CD29) untersucht, das auf Thymozyten, Lymphozyten, Monozyten, aktivierten T-Zellen und anderen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Hemler et al., 1987a; Hemler et al., 1987b). Als Ligand der Antigen-präsentierenden Zelle für VLA-4 dient unter anderem VCAM-1; außerdem interagiert dieser Rezeptor mit Fibronectin (Elices et al., 1990). Wie bereits oben diskutiert, ist VCAM-1 ein entscheidender Faktor für die Induktion der murinen GVHD. Da die Untersuchungen von Burger (2000) zeigten, daß sich der Einfluß von VCAM-1 auch im Expressionsmuster des Rezeptors VLA-4 widerspiegelte und als immunhistochemisches Korrelat der GVHD gewertet werden kann, schien es sinnvoll, auch VLA-4 in die Untersuchungen dieser Arbeit miteinzubeziehen. So konnten mögliche präventive Effekte der eingesetzten Peptide auf das Ausmaß der GVHD in Form einer Minderung VLA-4-positiver Zellen gemessen werden. Auch hier wurden gezielt die Organe Ileum und Kolon für die Färbungen ausgewählt, da dort die Expression im Verlauf einer GVHD besonders stark erhöht ist (Burger, 2000). Da aus technischen Gründen kein monoklonaler Antikörper spezifisch für das Heterodimer VLA-4 eingesetzt werden konnte, wurde ein anti- $\alpha 4$ -Integrin-Antikörper verwendet. Damit wurden neben VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ -Integrin) auch das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin auf Lymphozyten (ebenso ein Rezeptor von VCAM-1 und Fibronectin) erfaßt (Berlin et al., 1993). Einschränkend muß jedoch gesagt werden, daß nach Blockierungsstudien von Schlegel et al. (1995) mit anti-VLA-4 ($\alpha 4$ -Untereinheit) über 5 Wochen nach allogener Knochenmarkstransplantation (Modell B10.D2→Balb/c) das Eintreten der GVHD zwar verzögert, sich allerdings kein Einfluß auf die Inzidenz sowie die GVHD assoziierte Mortalität zeigte. Möglicherweise spielt das $\alpha 4$ -Integrin als Teil des Heterodimers VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ -Integrin) eine geringere Rolle in der Pathogenese der

GVHD, und die Infiltration der Zielorgane mit α_4 -Integrin positiven Zellen würde damit nur eine Reaktion auf vorangegangene Gewebeschädigung widerspiegeln.

5.2 Ergebnisse mit MHC-Klasse II bindenden allelspezifischen Peptiden

5.2.1 Grundlagen

Intensive Forschungsbemühungen der vergangenen Jahre ermöglichten ein vertieftes Verständnis komplexer immunologischer Vorgänge wie Antigen-Prozessierung und -Präsentation, die über verschiedene Mechanismen zur Antigen-Erkennung durch spezifische T-Zellen mit nachfolgender Aktivierung und Spezialisierung beitragen können. Nach essentiellen, noch intrazellulär stattfindenden Schritten wie Proteolyse eines Antigens durch Proteasomen und Komplexbildung mit MHC-Molekülen, dienen die auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen exprimierte Peptid-MHC-Komplexe als Liganden für den α/β -T-Zellrezeptor von $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen. Konsekutiv erfolgt zusammen mit einem kostimulatorischen Signal die Aktivierung spezifischer T-Zell-Klone mit nachfolgender Expansion und Proliferation. Neuere Erkenntnisse in diesen Bereichen ermöglichten die Entwicklung unterschiedlichster Strategien zur Vermeidung einer GVHD.

Ein Angriffspunkt hierbei ist die Unterdrückung kostimulatorischer Signale (Tanaka et al., 2000). So konnten beispielsweise Schlegel et al. 1995 zeigen, daß die Administration spezifischer Anti-VCAM-1 Antikörper nach HLA-identischer Transplantation im murinen Modell durch Maskierung dieses kostimulatorischen Signals eine Prävention der GVHD ermöglichte. Neben diesen erfolgversprechenden Ansätzen zeigten Shlomchik et al. (1999) mit β_2 -Mikroglobulin Knock-out Mäusen sowie mit anti- β -CD11c Integrin Antikörpern zur Deletion muriner dendritischer Zellen eindeutig, daß auch die Blockade oder Deletion der Empfänger-Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) die Induktion der GVHD erfolgreich unterdrücken konnte.

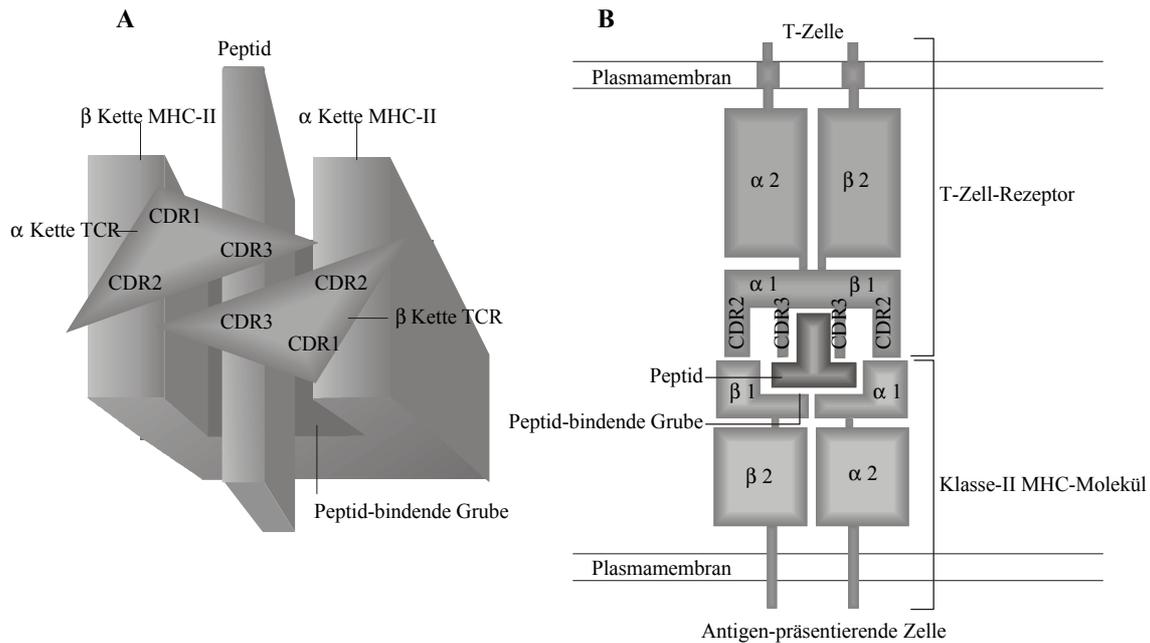


Abbildung 5.1:
Schematische Darstellung der Interaktion des T-Zellrezeptors mit dem Klasse-II MHC-Peptid-Komplex.

A: Aufsicht, B: Querschnitt

Einen weiteren, besonders attraktiven Angriffspunkt zur selektiven Immunintervention und T-Zellmodulation stellt die Triade aus antigenem Peptid, MHC-Molekül und T-Zellrezeptor dar. Wie auch in der vorliegenden Arbeit untersucht und im weiteren diskutiert, führt die Administration synthetisch hergestellter Peptide über unterschiedliche Wirkmechanismen zur Blockade der Bindungstriade und damit zur Suppression der GVHD (Abb. 5.1).

Auf Grundlage der Arbeit von Korngold und Sprent (1987b), nach der 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, konzentrieren sich die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit auf die Interaktion von T-Zellen mit Antigenen, die von Klasse-II MHC Molekülen präsentiert werden. Demzufolge werden in den Wettbewerbsstudien Peptide untersucht, die MHC-II spezifisch sind.

Das Auftreten der Graft-versus-Host Erkrankung im auch hier eingesetzten HLA-identischen Spender-Empfänger-Modell wird nach neueren Erkenntnissen über Peptidantigene des Empfängers, sogenannte Minor-Histokompatibilitätsantigene (mHAg), die im Kontext entsprechender MHC-Moleküle durch Spender-T-Zellen als fremd erkannt werden, mitverursacht. Während im Mausgenom über 40 verschiedene Minor-Histokompatibilitätsloci beschrieben werden (Roopenian et al., 1993), ist es derzeit Gegenstand der Forschung, auch für humane mHAg kodierende Gene zu identifizieren. Es ist beschrieben, daß in bestimmten Fällen integrierte retrovirale Genomsequenzen für das mH-Genprodukt kodieren oder dessen Expression kontrollieren, während nach Wettstein et al. auch DNA-(Papova)Viren für mHAg kodieren können (Simpson, 1987; Wettstein et al., 1988). Die Bedeutung der mHAg für die Entstehung einer GVHD wird deutlich im Zusammenhang mit Studien von Perreault et al. (1996), die zeigen konnten, daß schon ein einziges immundominantes mHAg bei sonst völlig identischem genetischen Hintergrund ausreichend für die Induktion der GVHD sein kann. Fontaine et al. führten 2001 eine Serie von Experimenten durch, die demonstrierten, daß die Injektion spezifischer, gegen ein immundominantes mHAg gerichteter T-Lymphozyten Graft-versus-Leukemia Effekte zeigten, ohne gleichzeitig eine GVHD zu verursachen. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung basieren auf der gegenwärtigen Modellvorstellung, nach der mHAg Peptidsequenzen darstellen, die einer Vielzahl zellulärer Proteine entstammen können und in den hier durchgeführten Versuchen über die Applikation synthetisch hergestellter Peptide als Agentien zur Immunmodulation kompetitiv aus ihrer Bindungsstelle zum Klasse-II MHC-Molekül verdrängt werden.

5.2.2 Mögliche Wirkungsweisen der eingesetzten HLA-spezifischen Peptide

Immunsuppression durch Klasse-II MHC-bindende Peptide wurde bereits in einer Reihe experimenteller Systeme getestet, um die Effekte auf eine mögliche T-Zellaktivierung *in vivo* zu untersuchen. Diesen tierexperimentellen Modellen humaner Erkrankungen, wie rheumatoide Arthritis, experimentelle allergische Enzephalomyelitis oder GVHD ist gemeinsam, daß es sich um T-Zellvermittelte Erkrankungen handelt, die die Prozesse

der Antigenerkennung sowie der klonalen Expansion und Amplifikation durchlaufen. Es ist derzeit Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen, Erklärungsmodelle für die Wirkung dieser Inhibitor-Peptide zu entwickeln, wobei verschiedene immunsuppressive Mechanismen denkbar sind. Erwähnenswert ist, daß je nach gewähltem T-Zell-vermitteltem Erkrankungsmodell und eingesetztem Inhibitor-Peptid einzelne Mechanismen nicht strikt zu trennen, sondern vielmehr fließende Übergänge erkennbar sind und somit häufig eine Kombination unterschiedlicher Wirkungsmechanismen in Betracht gezogen werden muss.

Eine grundsätzliche Voraussetzung für die Wirkungsenfaltung aller hier untersuchten Peptide ist zunächst die sogenannte „passive“ MHC-Rezeptor-Blockade. Durch in-vivo Administration inhibitorischer Peptide mit hoher Affinität für Klasse-II MHC-Moleküle werden zuvor prozessierte antigene Peptide, wie z. B. die oben erwähnten mHAg, kompetitiv aus der Antigen-Bindungsstelle verdrängt und so die Antigen-Präsentation und Aktivierung MHC-II restringierter T-Zellen selektiv moduliert (Guery et al., 1992). Basierend auf den Erkenntnissen der letzten Jahre können die Inhibitor-Peptide grundsätzlich in zwei Untergruppen aufgeteilt werden, je nachdem ob sie strukturelle Homologie zum krankheitsinduzierenden Antigen zeigen oder strukturell unverwandt sind (Tabelle 5.1).

Homolog zum Antigen	Nicht-homolog zum Antigen
MHC-Blockade	MHC-Blockade
T-Zell-Toleranz	Immundominanz
Veränderungen im Zytokinprofil	
Veränderungen auf T-Zellrezeptorebene	
Induktion spezifischer Suppressorzellen	

Tabelle 5.1: Mögliche immunsuppressive Mechanismen der Inhibitor-Peptide (nach Adorini, 1992)

In Modellen, in denen Inhibitor-Peptid und induzierendes Peptid strukturelle Homologie zeigen, ist zu beachten, daß im Besonderen antigen-spezifische eher als MHC-spezifische Mechanismen zu einer Blockade der T-Zellaktivierung führen können (Adorini, 1992). Diese zusätzlichen antigen-spezifischen Mechanismen beinhalten unter anderem die Induktion spezifischer Suppressor-Zellen, die Produktion immunmodulierender Zytokine, die Induktion kreuzreaktiver Toleranz auf Ebene des T-Zell-Rezeptors oder Änderungen im T-Zell-Rezeptor Übertragungsweg mit nachfolgender T-Zell-Anergie. Auch Effekte einer bereits bestehenden T-Zell-Toleranz können zum Tragen kommen.

I. T-Zell-Toleranz

Für endogen schon vorhandene Peptidsequenzen ist anzunehmen, daß diese den Mechanismus der T-Zell-Erkennung und –Aktivierung umgehen, da infolge positiver und negativer Selektion während physiologischer Reifungsvorgänge im Thymus spezifische T-Zellrezeptoren eliminiert wurden. Solche Peptide werden als „Selbst“ erkannt und demzufolge immuntoleriert. Ein Beispiel hierfür ist das Peptid CLIP (Peptidsequenz 85-101 der invarianten Kette des murinen Haplotyps H2-A^d), das während der Antigen-Prozessierung in präendosomalen Kompartimenten eine vorzeitige Peptidbeladung des MHC-Komplexes verhindert und über eine Chaperon-Funktion das Zusammenfügen und den Transport weiterer MHC-Klasse II α - und β -Ketten fördert

(Pieters et al., 1991; Ferrari et al., 1997). Insofern ist bei Applikation dieses Peptides die Nutzung einer bereits bestehenden T-Zell-Toleranz in Betracht zu ziehen.

II. Veränderung im Zytokin-Profil

Interessanterweise scheint es trotz Induktion aktiver T-Zell-Antworten infolge Antigen-Erkennung möglich, ein Stadium funktioneller T-Zell-Toleranz zu erreichen, ein Phänomen, das auch als „Zytokin-Shift“ bezeichnet wird. Schon 1991 zeigten Evavold und Allen, daß durch Substitution einer einzigen Aminosäure in einer antigenen Peptidsequenz nicht nur die Rate der T-Zellproliferation moduliert wurde, sondern vor allem ein Veränderung im Zytokin-Profil zu beobachten war. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Modellvorstellung, nach der innerhalb des CD4-Zellkompartimentes zwei verschiedene T-Zell-Subpopulationen existieren, die sich durch ihr Zytokin-Muster unterscheiden. Je nach antigenem Stimulus sezernieren Th1 Zellen vornehmlich IL-2 und IFN- γ , wobei diese entzündungsauslösende Antwort häufig mit Transplantat-Abstoßung, Autoimmunerkrankungen oder einer GVHD assoziiert ist, während eine Th2-Antwort über IL-4- und IL-10-Produktion zu einer Abschwächung inflammatorischer Gewebsveränderungen und somit zu einem Stadium funktioneller Toleranz führen kann (Mosman und Sad, 1996; Rothen et al., 1996; Sarzotti, 1997). Für den in der vorliegenden Arbeit als Vergleich eingesetzten Copolymer GLAT wurde 1997 gezeigt, daß nicht nur die Sekretion von Pro-GVHD Zytokinen gehemmt, sondern über die Produktion von Th2 Zytokinen (vornehmlich IL-4) möglicherweise wesentlich zur Abschwächung der GVHD beigetragen werden konnte (Aharoni et al., 1997).

III. Induktion von Suppressorzellen

Da die Administration von GLAT keine generelle Immunsuppression zur Folge hat, wie es möglicherweise für Antigene zu erwarten wäre, die einzig über eine passive MHC-Blockade operieren, ist anzunehmen, daß zusätzliche Wirkungsmechanismen in Betracht zu ziehen sind, über die das Peptid seine therapeutischen Effekte entfaltet. Analog zu GLAT beschrieben Fridkis-Hareli et al. 1994 für Cop 1, das äußerst effektiv die T-Zell vermittelte experimentelle Autoimmunenzephalitis, eine Modellerkrankung für die humane Form der Multiplen Sklerose, im murinen System unterdrückt, die Induktion regulatorischer Suppressorzellen, die spezifisch gegen krankheitsinduzierende

Antigene gerichtet zu sein scheinen und somit präventive Wirkung zeigten. Bemerkenswerterweise wurde bereits in Untersuchungen von 1989 auch für die Peptidsequenz 1-17 des hier als Kontrollpeptid eingesetzten HEL ein Status unerwarteter T-Zell Toleranz demonstriert, der mit einer T-Suppressorzell-induzierenden Determinante dieses Peptids erklärt wurde (Gammon und Sercarz, 1989).

IV. Intervention auf T-Zell-Rezeptorebene

Im Fall struktureller Verwandtschaft zwischen Inhibitor und krankheitsinduzierendem Antigen beschrieben Sloan-Lancaster et al. 1993 erstmalig ein Phänomen, nach dem Änderungen im T-Zell-Rezeptor-Signalübertragungsweg, beispielsweise aufgrund inadäquater kostimulatorischer Signale oder Administration eines Inhibitor-Peptides, den Status der T-Zell-Anergie zur Folge hatten. Je nach antigenem Stimulus kam es zur Teilaktivierung der T-Zellen mit Ausführung einiger Effektorfunktionen ohne klonale Proliferation oder sogar zu einem Zustand der völligen Anergie. Diese T-Zell-Anergie als Folge inadäquater Stimulation ist interessanterweise charakterisiert durch eine Modulation des Zelloberflächen-Phänotyps spezifischer T-Zell-Klone mit reduzierter Expression von TCR-CD3 Komplexen, womit die Affinität von TCR/Ligand-Interaktionen nicht nur die Kapazität zur Induktion von Anergie, sondern auch qualitative Unterschiede dieser Funktion zu beeinflussen scheint (Tsitoura et al., 1996).

Eine 1999 veröffentlichte Studie stellt jedoch dieses Konzept, nach dem eine T-Zell-Anergie ausschließlich als Folge inadäquater Stimulation anzusehen ist, zumindest teilweise in Frage und beschreibt einen alternativen, bisher unbekanntem Prozess. Als Folge antigen-induzierter T-Zell-Aktivierung einschließlich Zytokin-Produktion und T-Zellproliferation wird ein transienter, bis zu 6 Tage dauernder Status der T-Zell-Hyporeaktivität beschrieben, der eine weitere antigene Stimulation verhindern soll. Dieser Zustand der aktivierungsinduzierten T-Zell-Anergie scheint nicht Folge mangelnder Kostimulation, Beeinträchtigung frühzeitiger Prozesse der Signaltransduktion oder Konsequenz einer veränderten Expression von TCR-CD3 Komplexen zu sein und stellt somit nach Meinung der Autoren einen bisher unbekanntem, regulatorischen Feed-back-Mechanismus des Immunsystems dar, der die Expansion spezifischer T-Lymphozyten und Gedächtniszellen als Konsequenz

kontinuierlicher Antigen-Präsentation limitieren kann (De Mattia et al., 1999). Allerdings wurde gezeigt, daß naive T-Zellen, wie sie auch im hier eingesetzten murinen Modell vorrangig vorhanden sind, ganz im Gegensatz zu antigen-erfahrenen T-Lymphozyten des erwachsenen Menschen, auf diesen Mechanismus der aktivierungsinduzierten Anergie nicht ansprechen und somit dieses Vorstellungsmodell nur bei Applikation von Peptidantagonisten zur Prävention einer humanen GVHD in Betracht gezogen werden sollte.

V. Immundominanz

Im Falle nicht homologer Peptid-Antagonisten kommt neben dem Mechanismus der passiven MHC-Blockade auch die Möglichkeit der Immundominanz in Betracht. Dieser Prozess, bei dem unterschiedlich stark immunogen wirkende Antigene bei gleichzeitiger Präsentation einer Hierarchie entsprechend erkannt werden, hat zur Folge, daß „dominante“ Antigene präferentiell die Stimulation ihrer Inhibitor-spezifischen T-Zellen auslösen, wobei zugleich die T-Zell-Antwort auf andere „subdominante“ Antigene supprimiert wird (Gammon und Sercarz, 1989; Gautam et al., 1992; Yewdell und Bennink, 1999). Dieser Mechanismus der Immundominanz, der die Fähigkeit wenig dominanter Epitope herabsetzt, effektive T-Zellantworten in vivo zu induzieren, ist nach Gammon und Sercarz (1989) vor allem abhängig von der Anzahl der in den MHC-Bindungsstellen präsentierten antigenen Determinanten, wobei nach Schlegel (1999) schon eine partielle Aufsättigung der Klasse-II Bindungsstellen ausreichend für eine deutliche Prävention der GVHD war.

5.3 Vergleich der eingesetzten Peptide CLIP, Cop-CLIP 10 und APE-20 zur Prävention der GVHD

Die oben genannten Erklärungsmodelle legen unterschiedliche Mechanismen nahe, mit denen die in dieser Arbeit eingesetzten Inhibitor-Peptide die Induktion der GVHD verhindern können. Vor diesem Hintergrund ist jedoch zu beachten, daß je nach eingesetztem Peptid einzelne Wirkungsmechanismen nicht strikt zu trennen, sondern vielmehr fließende Übergänge erkennbar sind und somit eine direkte Zuordnung von

Peptid zu einer spezifischen Wirkungsweise häufig nicht möglich erscheint. Desweiteren soll ein Vergleich der Peptide in Bezug auf andere Lösungsansätze diskutiert werden.

Das Grundgerüst, d.h. die Basis-Aminosäuresequenz der untersuchten Peptide basierte auf Primärstrukturvorhersagen der Internetdatenbank SYFPEITHI, mit der so allelspezifische Peptide mit besonders hoher Affinität zu entsprechenden Klasse-II MHC-Molekülen konstruiert werden konnten. Im einzelnen ist dies das Motiv CLIP, entsprechend der Aminosäuresequenz 85-101 der invarianten Kette des murinen H-2A^d, sowie das Motiv APE, entsprechend der Aminosäuresequenz 268-283 des murinen Apolipoproteins E. Um desweiteren bindungsspezifische als auch sterische Längeneffekte der applizierten Peptide beurteilen zu können, wurden diese beiden Grundmotive durch flankierende Sequenzen (Cop-CLIP 10 mit beidseitig bindenden Peptidsequenzen und APE-20 mit beidseitig nichtbindenden Peptidsequenzen, siehe Kapitel 2.5.3) modifiziert. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigten nach Auswertung der klinischer Befunde und der immunhistochemischen Analyse von Gewebeschnitten, daß diese Klasse-II bindenden Peptide erfolgreich zur Prävention der GVHD eingesetzt werden können. Die Bindung der Inhibitor-Peptide an Klasse-II MHC war somit Voraussetzung für die Blockade der GVHD. Als Vergleich hierzu zeigten das Peptid HEL, eine unspezifisch bindende Negativ-Kontrolle (Kapitel 2.5.3), sowie die Null-Kontrolle (Lösungspuffer PBS) keinen Effekt. Das synthetische Copolymer GLAT (L-Glu, L-Ala, L-Lys und L-Tyr, Kapitel 2.5.3), das sich durch promiskuöse Bindungsaffinität für eine Vielzahl von Klasse-II Molekülen auszeichnet und dessen Effekte schon in Studien der vergangenen Jahre ausführlich beschrieben wurden (Teitelbaum et al., 1971; Fridkis-Hareli et al., 1994; Schlegel et al., 1996), kam als Positivkontrolle in den Untersuchungen dieser Arbeit zum Einsatz und zeigte entsprechend den Vorraussagen eine deutliche Abnahme GVHD-spezifischer Effekte. Bemerkenswerterweise konnte durch keines der Peptide eine vollständige Prävention der GVHD erreicht werden. Dies ist möglicherweise erklärbar über die fehlende Blockade MHC-I spezifischer Antigen-Präsentation, die eine Ursache für verbleibende T-Zellaktivität darstellen könnte. Desweiteren kann die Beobachtung einer nicht vollständigen Prävention auch über eine begrenzte Halbwertszeit der Peptide erklärt werden. Die HLA-Spezifität und eine damit verbundene verzögerte Dissoziation eines

Peptids vom MHC-Molekül sollte zwar nach Adams und Humphreys (1995) die Halbwertszeit erhöhen, allerdings ist eine mögliche Einschränkung der Wirkung der hier applizierten Peptide durch körpereigenen Abbau in der Maus nach den vorliegenden Ergebnissen nicht auszuschließen. Somit scheint es schwierig, eine dauerhafte Besetzung der Bindungsstellen *in vivo* und folglich eine vollständige Prävention in allen Tieren zu erreichen.

Die hier vorgestellten *in-vivo* Daten korrelieren mit der Arbeitshypothese, daß allelspezifische Peptidinhibitoren aufgrund ihrer hohen Affinität für Klasse-II MHC Moleküle die Antigen-Präsentation verhindern und so für eine begrenzte Zeit nach Transplantation die Ausprägung der gegen minor Histokompatibilitätsantigene gerichteten GVHD im murinen Modell B10.D2 → Balb/c reduzieren können. Angelehnt an die Wirkungsmodelle nach Adorini (1992, s. Tabelle 1) kommt als grundsätzlicher Wirkmechanismus der hier eingesetzten strukturhomologen Peptide CLIP, Cop-CLIP 10 und APE 20 die passive MHC-Blockade in Frage. Zusätzlich müssen weitere Mechanismen in Betracht gezogen werden, über die diese Peptide die Induktion der GVHD verhindern können. Die semiquantitative und auch die computergestützte Auswertung der immunhistochemischen Färbungen in den untersuchten Organen Kolon, Ileum und Haut zeigte jeweils eine deutliche Reduktion der T-Zell-Infiltration. Insofern sollte eine Änderung im T-Zell-Rezeptor-Signalübertragungsweg mit konsekutiver Blockade der klonalen Expansion und Amplifikation von T-Effektor-Zellen in Betracht gezogen werden. Da sich außerdem die Basissequenz dieser Inhibitorpeptide homolog zu endogenen, in der Empfängermaus schon vorhandenen MHC-II präsentierten Peptidsequenzen verhält, ist es außerdem denkbar, daß diese als „Selbst“ erkannt werden, und somit der Mechanismus der T-Zellerkennung und –aktivierung umgangen wird (T-Zell-Toleranz).

Allerdings werden bei Einsatz der verschiedenen Inhibitor-Peptide wesentliche Unterschiede in der Effektivität der Prävention sichtbar, die nicht allein auf der Grundlage obiger Modelle diskutiert werden können. Die Ergebnisse mit den Peptiden CLIP (16 Aminosäuren Länge), Cop-CLIP 10 (36 Aminosäuren Länge) und APE 20 (56 Aminosäuren Länge) legen nahe, daß zusätzlich zu einer Interaktion dieser Peptide mit

dem T-Zell-Klasse-II MHC-Antigenerkennungsprozess sterische Effekte nach Bindung an das MHC-Molekül für eine Modulation der GVHD verantwortlich sind. Klinische Beobachtung der transplantierten Tiere sowie die Auswertung der immunhistochemischen Gewebefärbungen zeigen, daß die Effektivität der GVHD-Prävention positiv mit der Länge der applizierten Peptide korrelierte. Dieses Phänomen läßt sich einerseits durch einen einfachen Längeneffekt mit konsekutiver Störung der Interaktion von MHC-Molekül und T-Zellrezeptor auch ausserhalb der Antigen-Bindungsstelle, andererseits durch eine mögliche Blockade kostimulatorischer Signale erklären. Nach Miconnet et al. (1995) können Superantigene wesentlich zu einer Verstärkung vor allem der hochakuten Phase der GVHD beitragen. Insofern ist als weiterer Längeneffekt der eingesetzten Peptide Cop-CLIP 10 und APE-20 eine Maskierung der Superantigen-Bindungsstellen durch die aus dem MHC-Molekül herausragenden Sequenzabschnitte und somit eine Modulation des GVDH-Ausprägungsgrades möglich. Ein solches Vorstellungsmodell wird gestützt durch Daten, wonach bei Belegung von Klasse-II MHC-Bindungsstellen antigenpräsentierender Zellen mit langen Polypeptiden keine Superantigen-Bindung mehr zu demonstrieren war (Busch et al., 1996; Lavoie et al., 1997).

Eine Differenzierung zwischen Cop-CLIP 10 (seitliche Aminosäuresequenzen analog zu GLAT; Bindung möglich) und APE 20 (seitliche Aminosäuresequenzen nicht bindend) bezüglich der Effektivität ihrer Wirkung ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich.

Insgesamt läßt sich im Vergleich zum sehr gut untersuchten und dokumentierten GLAT, dem hier verwendeten Vergleichspeptid, sagen, daß auch das wirkungsvollste hier eingesetzte Peptid nur bedingt das Ausmaß der Blockade durch GLAT zu erreichen vermag. Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß der Einsatz HLA-spezifischer Peptide wie CLIP, APE und ihrer Derivate mit hoher Affinität für einen ganz bestimmten Haplotyp (hier H2-A^d) kein promiskuöses Bindungsverhalten zeigen und damit im Gegensatz zu GLAT (Fridkis-Hareli et al. 1994; Aharoni et al., 1997; Aharoni et al., 1999) eine Kombination verschiedener Wirkungsweisen bei diesen Peptiden nicht in zum Tragen kommen kann.

5.4 Prävention der GVHD über Blockade einer Superantigen-induzierten T-Zellantwort durch die Peptide TCR oder APE-Spacer-TCR?

Superantigene stellen eine Gruppe viraler und bakterieller Antigene dar, die unter Ausbildung einer Art Spangenkomplexes gleichzeitig an die Aussenseite der V β -Domäne des T-Zellrezeptors und an die α_1 -Kette des MHC-Klasse II Moleküls binden. Ihre Erkennung durch den T-Zellrezeptor erfolgt fast ausschließlich mit Hilfe der variablen Region an der Aussenseite der TCR- β -Kette (V β) inklusive der CDR 1, 2 und 4 loops, die normalerweise nicht an der Antigenerkennung durch T-Zellen mitbeteiligt ist (Fields et al., 1996). Dies führt zur Aktivierung all jener T-Zellen, die das entsprechende V β -Segment exprimieren, und somit zu einer polyklonalen T-Zellantwort mit einem Repertoire von bis zu 10-50 % aktivierter T-Zellen, während im Gegensatz dazu konventionelle Antigene nur in einer spezifischen Peptid-MHC-Kombination von einer viel geringeren Anzahl an T-Zellrezeptoren erkannt werden können.

Eine Untergruppe endogener Superantigene stellen die Mtv-(engl. "mouse mammary tumor virus") kodierte Superantigene dar, die auch in den hier zum Einsatz kommenden Empfänger-mäusen Balb/c (H-2^d, Mtv-7, Mtv-1⁺, Mtv-6⁺, Mtv-13⁺) zusätzliche antigene Determinanten darstellen. Miconnet et al. beschrieben 1995, daß die letale GVHD im murinen Modell, ausgelöst vor allem durch minor Histokompatibilitätsantigen-Differenzen, durch endogene Mtv-Sequenzen im Empfänger-Genom massiv verstärkt werden kann. Dieser durch virale Superantigene induzierte, vor allem an Tag 3 bis 7 nach Transplantation auftretende Effekt scheint maßgeblich auf einer gesteigerten Zytokin-Produktion durch die aktivierten T-Zellen zu beruhen, wobei beispielsweise die Sekretion von TNF- α und IFN- γ direkt zur Verstärkung GVHD induzierter Gewebsläsionen in Haut und Darm beitragen kann. Desweiteren wird eine vermehrte Expression von Klasse-II MHC-Molekülen mit konsekutiv erhöhter Präsentation von Minor-Histokompatibilitätsantigenen und somit ansteigenden Konzentrationen spezifisch aktivierter T-Lymphozyten ausgelöst.

Arad et al. berichteten 2000 von der Synthese eines Peptidantagonisten p12, der bis auf 3 Aminosäuren der Sequenz 150-161 des SEB entspricht, und interessanterweise weder

mit dem Klasse-II MHC-Molekül noch mit dem TCR interagiert. Die Applikation dieses Peptids konnte dennoch die über bakterielle Superantigene getriggerte Expression und nachfolgende Sekretion bestimmter Entzündungsmediatoren (IL-2, TNF- β und IFN- γ) entscheidend vermindern und somit die Ausbildung eines toxischen Schocks im murinen Modell verhindern. Da auch der akuten GVHD wie anfangs beschrieben eine Störung im Zytokin-Netzwerk zugrunde liegt, die Erkrankung in den hier vorliegenden Untersuchungen über Mtv-kodierte Superantigene verstärkt wird und diese ebenso wie der durch Superantigene induzierte toxische Schock eine T-Zellvermittelte Erkrankung darstellt, ergeben sich somit die Rationales für die Synthese und den Einsatz der in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Peptide zur Prävention der GVHD. Die Peptide TCR und APE-Spacer-TCR (Kapitel 2.5.3) wurden entsprechend der Peptidsequenz des Antagonisten p12 der Arbeitsgruppe Arad et al. (2000) synthetisiert.

Im Vergleich zu den anderen in der vorliegenden Arbeit getesteten Peptiden zeigte die Applikation des Peptids APE-Spacer-TCR während eines definierten, zeitlich begrenzten Rahmens nach Transplantation in der Prävention der durch minor Antigene induzierten und durch Mtv-kodierte Superantigene verstärkten GVHD im Modell B10.D2 \rightarrow Balb/c die höchste Effektivität. Keines der mit APE-Spacer-TCR behandelten Tiere zeigte klinische Zeichen einer GVHD und auch in den Untersuchungen der immunhistochemisch gefärbten Gewebsschnitte waren in dieser Zielgruppe die größten Effekte zu beobachten. Obwohl ein eindeutiger Wirkungsmechanismus mit dem hier verwendeten Studienaufbau nicht identifiziert werden kann, stehen die vorgestellten Daten im Einklang mit der Arbeitshypothese, daß das bifunktionale APE-Spacer-TCR Peptid zusätzlich zu einer Blockade der Antigen-Präsentation über Klasse-II MHC-Moleküle eine durch Mtv-kodierte Superantigene induzierte verstärkte T-Zellantwort und somit die Ausprägung der GVHD zu reduzieren vermag. Da auch Superantigenvermittelte Immunantworten von der Anwesenheit kostimulatorischer Signale, wie LFA-1/ICAM-1 oder einer Signalvermittlung über den CD28-Rezeptor abhängig sind (Dohlsten et al., 1991; Fraser et al., 1992; Saha et al., 1996), ist ein weiteres mögliches Erklärungsmodell die sterische Maskierung dieser kostimulatorischen Signale mit konsekutiver Abschwächung der T-Zellaktivierung. Durch die Interaktion von MHC-

Klasse II Komplex mit Superantigen und TCR kommt es außerdem zu Veränderungen der Signalqualität, wie einer Reduktion der Calcium-Mobilisation und anderer Signale (Gaugler et al., 1991; Webb et al., 1994; Weber et al., 1995). Somit ist durch die Applikation der Peptide eine Modulation dieser Signale im Sinne eines Antagonismus denkbar.

Bemerkenswert ist allerdings, daß das Peptid TCR, dessen Wirkung nur auf T-Zellrezeptor-Seite über eine Blockade der Interaktion mit dem Superantigen erklärt werden kann, keinerlei präventive Effekte hinsichtlich der Induktion einer über Superantigene verstärkten GVHD zeigte. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die erfolgreiche Prävention der durch minor Antigene vermittelten GVHD, die zusätzlich über eine Superantigen-induzierte T-Zellaktivierung verstärkt wird, wahrscheinlich über zwei sich ergänzende Mechanismen abläuft. Einerseits erfolgt eine Kompetition des durch den MHC-Komplex präsentierten mHAg durch das applizierte Peptid (über das APE-Motiv), desweiteren ist eine Blockade der Superantigen-vermittelten Effekte durch Interaktion ausserhalb der antigenpräsentierenden Grube (über das TCR-Motiv) in Betracht zu ziehen.

5.5 Ausblick

Die in vivo Daten der hier vorliegenden Untersuchung sind konsistent mit der Arbeitshypothese, daß die eingesetzten allelspezifischen Peptide aufgrund ihrer hohen Affinität für Klasse-II MHC Moleküle (Typ H-2^d) die Antigenpräsentation verhindern. Ihre Applikation über einen begrenzten Zeitraum nach Transplantation vermag die Induktion der gegen minor Antigene gerichteten GVHD im murinen Modell in unterschiedlichem Ausmaß zu reduzieren.

Einschränkend ist zu sagen, daß bei einem Versuchsaufbau von jeweils 5 Tieren/ingesetztem Peptid zwar eine größere Vielfalt möglicher Wirkungsmechanismen getestet werden konnte, aus den gewonnenen Daten jedoch sicherlich nur Anhaltspunkte zur Effektivität der jeweiligen Versuchsgruppen gewonnen werden

können. Insofern sollen diese Untersuchungen Anstoß geben für weitere Versuchsserien, um ganz gezielt die wirkungsvollsten der hier eingesetzten Peptide, wie APE-Spacer-TCR, in ihren Auswirkungen auf die GVHD mit einer größeren Anzahl an Tieren zu verifizieren. Zusätzlich wäre es sinnvoll, die einzelnen funktionellen Domänen von APE-Spacer-TCR im direkten Vergleich zu untersuchen, um somit die hier vorgestellten hypothetischen Wirkmechanismen weiter zu untermauern. Da nach Miconnet et al. 1995 die höchsten Raten einer T-Zellinfiltration der durch Superantigene verstärkten GVHD an Tag 3 bis 7 stattfinden, sollten außerdem weitere Untersuchungen geplant werden, die genau diesen frühen Zeitraum nach Transplantation erfassen.

Schließlich stellt sich die Frage der klinischen Anwendung von Peptiden als pharmakologisch wirksame Substanzen. Es handelt sich hierbei um Wirkstoffe mit guter Reproduzierbarkeit, die einer Analytik schnell zugänglich und mittels moderner Syntheseautomaten relativ einfach herstellbar sind. Studien, die im Rahmen der Multiple Sklerose Forschung mit dem Copolymer GLAT beispielsweise von Baumhefner et al. 1988 durchgeführt wurden, zeigen, daß sowohl subkutan verabreichte Tagesdosen von 15 mg als auch intramuskulär verabreichte Dosen von 20 mg/Tag ohne nennenswerte Nebenwirkungen vom Menschen vertragen wurden. Insofern sollte auch die Anwendung allelspezifischer Peptide, wie sie auch in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, problemlos möglich sein.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten tragen zu neuen Erkenntnissen über eine gezielte Manipulation der Immunantwort im Rahmen einer GVHD in vivo bei, sollen somit ein tieferes Verständnis zur Pathophysiologie dieser Erkrankung liefern und letztendlich Anstoß zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze geben.

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. In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde modellhaft untersucht, ob durch gezielte Modulation des T-Zell-Antigenerkennungsprozesses die Graft-versus-Host Erkrankung im murinen Modell verhindert werden kann. Durch den Einsatz prädiktiver allelspezifischer Peptide unterschiedlicher Länge mit hoher Affinität für Klasse-II MHC-Moleküle wurden Auswirkungen auf die Antigenerkennung im murinen Modell, mögliche sterische Effekte und eine daraus resultierende Blockade der GVHD-Antwort im Detail untersucht. Desweiteren wurden mittels Applikation bifunktionaler Peptide mögliche Einflüsse auf eine durch Superantigene verstärkte GVHD getestet.

Die GVHD wurde durch Transplantation von Knochenmarksstammzellen und Milzzellen eines mHAg-(Nebenhistokompatibilitätsantigen-) inkompatiblen Mäusestamms (B10.D2→Balb/c) ausgelöst. Autolog transplantierte Mäuse (Balb/c→Balb/c) dienten als Kontrollgruppen. Die Applikation einer unspezifisch bindenden Negativkontrolle sowie einer Leerkontrolle zeigte keinen Effekt. Als Vergleichspeptid wurde der randomisierte Copolymer GLAT eingesetzt, dessen inhibitorische Wirkung auf die Induktion einer GVHD in vivo schon in früheren Studien eingehend demonstriert werden konnte. Das Ausmaß der GVHD wurde makroskopisch nach dem Auftreten klinischer Zeichen der transplantierten Tiere bewertet. Nachfolgend wurden histologische Präparate aus Ileum, Colon und Haut gewonnen und Gefrierschnitte mit der ABC-Immunperoxidase-Technik gefärbt. Die Expression GVHD-assoziiierter Moleküle wurde in den Schnitten semiquantitativ sowie computergestützt bewertet.

Die in vivo Daten der hier vorliegenden Untersuchung sind konsistent mit der Arbeitshypothese, daß die eingesetzten allelspezifischen Peptide aufgrund ihrer hohen Affinität für Klasse-II MHC-Moleküle (Typ H-2^d) die Antigenpräsentation verhindern. Ihre Applikation über einen zeitlich begrenzten Zeitraum nach Transplantation vermag somit die Induktion der gegen minor Antigene gerichteten GVHD im murinen Modell

deutlich zu reduzieren. Die Ergebnisse mit den Peptiden CLIP (16 Aminosäuren Länge), Cop-CLIP 10 (36 Aminosäuren Länge) und APE 20 (56 Aminosäuren Länge) zeigen, daß die Effektivität der GVHD-Prävention positiv mit der Länge der applizierten Peptide korrelierte. Zusätzlich zu einer Interaktion dieser Peptide mit dem T-Zell- Klasse-II MHC-Antigenerkennungsprozess macht dies sterische Effekte wahrscheinlich.

Die Applikation des Peptids APE-Spacer-TCR, für das neben der Wechselwirkung mit dem Klasse-II MHC-Molekül auch Interaktionen mit Superantigen-vermittelten Prozessen angenommen werden, zeigte in der Prävention der über minor Antigene induzierten und durch Mtv-kodierte Superantigene verstärkten GVHD die höchste Effektivität. Obwohl ein eindeutiger Wirkungsmechanismus nicht endgültig bewiesen werden konnte, ist auf Basis der hier präsentierten Daten vorstellbar, daß dieses Peptid seine Wirkung in der Tat bifunktionell entfaltet und somit besonders deutlich die Ausprägung der GVHD zu reduzieren vermag.

Die hier im murinen Modell der GVHD gewonnenen Daten tragen zu neuen Erkenntnissen über eine gezielte Modulation der T-Zellvermittelten Immunantwort bei und sollen somit Anstoß zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze im Rahmen der GVHD-Prävention geben.

7 Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APC	“Antigen presenting cells“
APE	Apolipoprotein E
CD	“clusters of differentiation“
CMV	Cytomegalie-Virus
CTL	“cytotoxic T-cells“
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Cell Sorter
GVHD	Graft-versus-Host Erkrankung
HEL	“hen egg lysozyme“
HLA	“human leukocyte antigen“
HPLC	High performance liquid chromatography
ICAM-1	“intercellular adhesion molecule –1“
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1	Interleukin-1
KMT	Knochenmarktransplantation
LFA-1	“lymphocyte function-associated antigen-1“
MALDI	Matrix associated laser desorption and ionisation
mHA _g	Nebenhistokompatibilitätsantigen, “Minor histocompatibility antigen“
MHC	Haupthistokompatibilitätsantigen, “Major histocompatibility complex“
MLC	“mixed lymphocyte culture“
Mls-Ag	“minor lymphocyte –stimulating“ Antigen
Mtv	“mouse mammary tumor virus“
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
SEA/SEB	Staphylokokken-Superantigen A und B
SYFPEITHI	Internet-Datenbank, erarbeitet von Rammensee et al., 1999, abrufbar unter http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/ .
TCR	“T-cell receptor“
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
VCAM-1	“vascular cell adhesion molecule-1“, (CD106)
VLA-4	“very late activation molecule-1“

8 Literaturverzeichnis

1. Adams, S., Humphreys, R.E. (1995). Invariant chain peptides enhancing or inhibiting the presentation of antigenic peptides by major histocompatibility complex class II molecules. *Eur J Immunol* 25, 1693-1702
2. Adorini, L. (1992). Selective suppression of T-cell activation by administration of MHC class II-binding peptides. *Transplantation Proceedings* 24, 14-16
3. Adorini, L., Moreno, J., Momburg, F., Hämmerling, G.J., Guery, J.C., Valli, A., Fuchs, S. (1991). Exogenous peptides compete for the presentation of endogenous antigens to major histocompatibility complex class II-restricted T cells. *J Exp Med* 174, 945-948
4. Aharoni, R., Schlegel, P.G., Teitelbaum, D., Roikhel-Karpov, O., Chen, Y., Arnon, R., Sela, M., Chao, N.J. (1997). Studies on the mechanism and specificity of the effect of the synthetic random copolymer GLAT on graft-versus-host disease. *Immunology letters* 58, 79-87
5. Aharoni, R., Teitelbaum, D., Arnon, R., Sela, M. (1999). Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 634-639
6. Arad, G., Levy, R., Hillman, D., Kaempfer, R. (2000). Superantigen antagonist protects against lethal shock and defines a new domain for T-cell activation. *Nature Medicine* 6, 414-421
7. Ashwell, J.D., Klausner, R.D. (1990). Genetic and mutational analysis of T-cell antigen receptor. *Ann. Rev. Immunol.* 8, 139-167
8. Bach, F.H., Albertini, R.J., Joo, P., Anderson, J.L., Bortin, M.M. (1968). Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 2, 1364-1366
9. Balduzzi, A., Gooley, T., Anasetti, C., Sanders, J.E., Martin, P.J., Petersdorf, E. W., Appelbaum, F.R., Buckner, C.D., Matthews, D., Storb, R. (1995). Unrelated donor marrow transplantation in children. *Blood* 86, 3247-3256
10. Baumhefner, R.W., Tourtellotte, W.W., Syndulko, K., Shapshak, P., Osborne, M., Rubinsthein, G. (1988). Copolymer 1 as therapy for multiple sclerosis. *Neurology* 38, 69-72
11. 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

12. Berlin, C., Berg, E.L., Briskin, M.J., Andrew, D.P., Kilshaw, P.J., Holzmann, B., Weissman, I.L., Hamann, A., Butcher, E.C. (1993). Alpha4beta7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MadCAM-1. *Cell* 74, 185
13. Billingham, R.E. (1966). The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* 62, 21-78
14. Blackman, M., Kappler, J., Marrack, P. (1990). The role of T cell receptors in positive and negative selection of developing T cells. *Science* 248, 1335-1341
15. Bohach, G.A., Stauffacher, C.V., Ohlendorf, D.H., Chi, J.Y., Vath, G.M., Schlievert, P.M. (1996). The staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin family. *Adv Exp Med Biol* 391, 131-154
16. Burger, G. (2000). Adhäsionsmoleküle im Rahmen der GVHD. Dissertation medizinische Fakultät Universität Tübingen.
17. Busch, R., Cloutier, I., Sekaly, R.P., Hammerling, G.J. (1996). Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 15, 418-428
18. Busch, R., Strang, G., Howland, K., Rothbard, J.B. (1990). Degenerate binding of immunogenic peptides to HLA-DR proteins on B cell surfaces. *Int Immunol* 2, 443-451
19. Chao, N.J. (1994). Graft-versus-host disease. R. G. Landes Company Austin
20. Choi, Y., Kappler, J.W., Marrack P. (1991). A superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumor virus. *Nature* 350, 203-207
21. Damle, N.K., Klussman, K., Linsey, P.S., Aruffo, A. (1992). Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM.1, LFA-3 and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+ T-Lymphocytes. *J Immunol* 148, 1985-1992
22. De Mattia, F., Chomez, S., Van Laethem, F., Moulin, V., Urbain, J., Moser, M., Leo, O., Andris, F. (1999). Antigen-experienced T cells undergo a transient phase of unresponsiveness following optimal stimulation. *The Journal of Immunology* 163, 5929-5936
23. Den Haan, J.M.M., Sherman, N.E., Blokland, E., Huczko, E., Koning, F., Drijfhout, J.W., Skipper, J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Engelhard, V.H., Goulmy, E. (1995). Identification of a Graft Versus Host Disease-Associated Human Minor Histocompatibility Antigen. *Science* 268, 1476-1480
24. Dohlsten, M., Hedlund, G., Lando, P.A., Trowsdale, J., Altmann, D., Patarroyo, M., Fischer, H., and Kalland, T. (1991). Role of the adhesion

- molecule ICAM-1 (CD54) in staphylococcal enterotoxin-mediated cytotoxicity. *Eur.J.Immunol.* *21*, 131-135
25. Elices, M.J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M.E., 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
 26. Evavold, B.D. und Allen, P.M. (1991). Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science* *252*, 1308-10
 27. Ferrara, J.L.M. und Deeg, H.J. (1991). Graft-versus-host disease. In: Mechanisms of disease. Epstein, F.H. (Hersg.). *The New England Journal of Medicine* *324*, 667-674
 28. Ferrari, G., Knight, A.M., Watts, C., Pieters, J. (1997). Distinct intracellular compartments involved in invariant chain degradation and antigenic peptide loading of MHC class II molecule. *J Cell Biol* *139*, 1433-1446
 29. Festenstein, H. (1973). Immunogenetic and biological aspects of in vitro lymphocyte allotransformation (MLR) in the mouse. *Transpl. Rev.* *15*, 62
 30. Fields, B.A., Malchiodi, E.L., Li, H., Ysern, X., Stauffacher, C.V., Schlievert, P.M., Karjalainen, K., Mariuzza, R.A. (1996). Crystal structure of a T-cell receptor β -chain complexed with a superantigen. *Nature* *384*, 188-192
 31. Fontaine, P., Roy-Proulx, G., Knafo, L., Baron, C., Roy, D.C., Perreault, C. (2001). Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nature Medicine* *7*, 789-794
 32. Fraser, J.D., Newton, M.E., Weiss, A. (1992). CD28 and T cell antigen receptor signal transduction coordinately regulate interleukin 2 gene expression in response to superantigen stimulation. *J. Exp. Med.* *175*, 1131-1134
 33. Fridkis-Hareli, M., Teitelbaum, D., Gurevich, E., Pecht, I., Brautbar, C., Kwon, O.J., Brenner, T., Arnon, R., Sela, M. (1994). Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells-specificity and promiscuity. *Proc Natl Acad Sci USA* *91*, 4872-4876
 34. Gammon, G., Sercarz, E. (1989). How some T cells escape tolerance induction. *Nature* *342*, 183-185
 35. Gatti, R.A., Meuwissen, H.J., Allen, H.D., Hong, R., Good, R.A. (1968). Immunological reconstitution of sex-linked immunological deficiency. *Lancet* *2*, 1366-1369

36. Gaugler, B., Langlet, C., Martin, J.M., Schmitt-Verhulst, A.M., Guimezanes, A. (1991). Evidence for quantitative and qualitative differences in functional activation of Mls-reactive T cell clones and hybridomas by antigen or TcR/CD3 antibodies. *Eur. J. Immunol.* 21, 2581-258
37. Gautam, A.M., Pearson, C.I., Sinha, A.A., Smilek, D.E., Steinman, L., McDevitt, H.O. (1992). Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by a nonimmunogenic non-self peptide that binds to I-A^{u1}. *The Journal of Immunology* 148, 3049-3054
38. Gimmi, C.D., Freeman, G.J., Gribben, J.G., Gray, G., Nadler, L.M. (1993). Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6586-6590
39. Goldmann, J.M., Gale, R.P., Horowitz, M M. (1988). Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: Increased risk of relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med* 108, 806-814
40. Griem, P., Wallny, H.J., Falk, K., Röttschke, O., Schönrich, G., Hämmerling, G., Rammensee, H.G. (1991). Uneven tissue distribution of minor histocompatibility proteins versus peptides is caused by MHC expression. *Cell* 65, 633-640
41. Guery, J.C., Sette, A., Leighton, J., Dragomir, A., Adorini, L. (1992). Selective immunosuppression by administration of major histocompatibility complex (MHC) class II-binding peptides. I. evidence for in vivo MHC blockade preventing T cell activation. *J Exp Med* 175, 1345-1352.
42. Hamilton, B.L. (1987). L3T4-positive T-cells participate in the induction of graft-versus-host disease in response to minor histocompatibility antigens. *J.Immunol.*139,2511-2515
43. Hamilton, B.L. and Parkman, R. (1983). Acute and chronic graft-versus-host disease induced by minor histocompatibility antigens in mice. *Transplantation* 36, 150-155
44. Handgretinger, R., Klingebiel, T., Lang, P., Schumm, M., Neu, S., Geiselhart, A., Bader, P., Schlegel, P.G., Greil, J., Stachel, D., Herzog, R.J., Niethammer, D. (2001). Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34+ progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplantation* 27, 777-783
45. Hardning, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulet, D.H., Allison, J.P. (1992) CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356, 607-609
46. Hemler, M.E., Huang, C., 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

47. Hemler, M.E., Huang, C., Takada, Y., Schwarz, L., Strominger, J.L., Clabby, M.L. (1987b). Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides. *J Biol Chem* 262, 11478-11485
48. Holler, E., Kolb, H.J., Möller, A., Kempeni, J., Liesenfeld, S., Pechumer, H., Lehmacher, W., Ruckdeschel, G., Gleixner, B., Riedner, C., Lederose, G., Brehm, G., Mittermüller, J., Wilmanns, W. (1990). Increased serum levels of tumor necrosis factor α precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood* 75, 1011-1016
49. 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
50. Jardetzky, T.S., Brown, J.H., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Chi, Y., Stauffacher, C., Strominger, J.L., Wiley, D.C. (1994). Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 368, 711-718
51. Johnson K.P, Brooks B.R, Ford C.C, Goodman A, Guarnaccia J, Lisak R.P, Myers L.W, Panitch H.S, Pruitt A, Rose J.W, Kachuck N, Wolinsky J.S, and the Copolymer-1 Multiple Sclerosis Study Group.(2000). Sustained clinical benefit of glatiramer acetate in relapsing multiple sclerosis patients observed for 6 years. *Multiple Sclerosis* 6, 255-266.
52. Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P. Myers, L.W., Panitch, H.S., Rose, J.W., Schiffer, R.B., Vollmer, T., Weiner, L.P., Wolinsky, J.S. (1995). Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 45, 1268-1276
53. Kanold, J., Yakouben, K., Tchirkov, A., Carret, A., Vannier, J., LeGall, E., Bordigoni, P., Demeocq, F. (2000). Long-term results of CD 34+ cell transplantation in children with neuroblastoma. *Medical and Pediatric Oncology* 35, 1-7
54. Kawabe, Y. und Ochi, A. (1991). Programmed cell death and extrathymic reduction of V β 8+ CD4+ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature* 349, 245-248
55. Klein, J., Sato, A. (2000). The HLA-System. First of two parts. Review article. *The New England Journal of Medicine* 343, 702-709
56. Klingebiel, T., Schlegel, P.G. (1998). GVHD: overview on pathophysiology, incidence, clinical and biological features. *Bone Marrow Transplant* 21 Suppl. 2, 45-49

57. Korngold, B., 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
58. Korngold, R. and Sprent, J. (1987a). T cell subsets and graft-versus-host disease. *Transplantation* *44*, 335-339
59. Korngold, R., 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
60. Krenger W., Ferrara, J.L. (1996). Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol Res* *15*, 50-73
61. Lafon, M., Scott-Algara, D., Marche, P.N., Cazenave, P.A., Jouvin-Marche, E. (1994). Neonatal deletion and selective expansion of mouse T-cells by exposure to rabies virus nucleocapsid superantigen. *J Exp Med* *180*, 1207-1215
62. Lavoie, P.M., Thibodeau, J., Cloutier, I., Busch, R., Sekaly, R.P. (1997). Selective binding of bacterial toxins to major histocompatibility complex class II-expressing cells is controlled by invariant chain and HLA-DM. *Proc Natl Acad Sci USA* *94*, 6892-6897
63. Lussow, A.R., MacDonald, H.R. (1994). Differential effects of superantigen-induced "anergy" on priming and effector stages of a T-cell dependent antibody response. *Eur J Immunol* *24*, 445-449.
64. Marmont, A.M., Horowitz, M.M., Gale, R.P. (1991). T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood*, *78*, 2120-2130
65. Martin, P.J., Hansen, J.A., Buckner, C.D. (1985). Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. *Blood* *66*, 664-672
66. Michon, J., Schleiermacher, G. (1999). Autologous haematopoietic stem cell transplantation for paediatric solid tumors. *Bailliere's Clinical Haematology* *12*, 247-259
67. 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*,364-3290
68. Mosman, T.R., Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* *17*, 138-147
69. Mosman, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffmann, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* *136*, 2348-2357

70. Niethammer, D., Klingebiel, T., Ebell, W., Henze, G., Paolucci, P., Riehm, H. (1996). Which children do benefit from bone marrow transplant? The EBMT PaediatricDiseases Working party. *Bone Marrow Transplant Suppl. 2*, 43-46
71. Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., 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
72. Perreault, C., Decary, F., Brochu, S., Gyger, M., Belanger, R., Roy, D. (1990). Minor histocompatibility antigens. *Blood 76*, 1269-1280
73. Perreault, C., Jutras, J., Roy, D.C., Filep, J.G., Brochu, S. (1996). Identification of an Immunodominant Mouse Minor Histocompatibility Antigen (MiHA). *J. Clin. Invest. 98*, 622-628
74. Peters, C., Minkov, M., Gadner, H., Klingebiel, T., Vossen, J., Locatelli, F., Cornish, J., Ortega, J., Bekasi, A., Souillet, G., Stary, J., Niethammer, D. (2000). Statement of current majority practices in graft-versus-host disease prophylaxis and treatment in children. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Working Party Paediatric Diseases and the International BFM Study Group--Subcommittee Bone Marrow Transplantation (IBFM-SG). *Bone Marrow Transplant 26*, 405-411
75. Pieters, J., Horstmann, H., Bakke, O., Griffiths, G., Lipp, J. (1991). Intracellular transport and localization of major histocompatibility complex class II molecules and associated invariant chain. *J Cell Biol 115*, 1213-1223
76. Prentice, H.G., Janossy, G., Price-Jones, L., Trejdosiewicz, L.K., Panjwani, D., Graphakos, S., Ivory, K., Blacklock, H.A., Gilmore, M.J.M.L., Tidman, N., Skeggs, D.B.L., Ball, S., Patterson, J., Hoffbrand, A.V. (1984). Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients. *The Lancet 1*, 472-476
77. Rammensee, H.G., Bachmann, J., Emmerich, N.N., Bachor, O.A., Stevanovic, S. (1999) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics 50*, 213-219
78. Ransdell, F., Fowlkes, B.J. (1990). Clonal deletion versus clonal energy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science 248*, 1342-1348
79. Reisner, Y., Martelli, M.F. (2000). Tolerance induction by megadose transplants of CD 34+ stem cells: a new option for leukemia patients without an HLA-matched donor. *Current Opinion in Immunology 12*, 536-541
80. Rice, G.E., Munro, J.M., Bevilacqua, M.P. (1990). Inducible cell adhesion molecule 110 (INCAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/CD18-independent adhesion mechanism. *J Exp Med 171*, 1369-1374

81. Roehen, M., Racke, M., Shevach, E.M. (1996). IL-4-induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune diseases. *Immunol Today* 17, 225-231
82. Roopenian, D.C., Christianson, G.J., Davis, A.P., Zuberi, A.R., Mobraaten, L.E. (1993). The genetic origin of minor histocompatibility antigens. *Immunogenetics* 38, 131-140
83. Rothbard, J.B. and Geftter, M.L. (1991). Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 527
84. Sad, S., Marcotte, R., Mosmann, T.R. (1995). Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2, 271-279
85. Saha, B., Harlan, D.M., Lee, K.P., June, C.H., Abe, R. (1996). Protection against lethal toxic shock by targeted disruption of the CD28 gene. *J. Exp. Med.* 183, 2675-2680
86. Sale, G.E. (1984). Pathology and recent pathogenetic studies in human graft-versus-host disease. *Surv Synth Pathol Res* 3, 235-53
87. Sans, M., Panes, J., Ardite, E., Elizalde, J.I., Arce, Y., Elena, M., Palacin, A., Fernandez-Checa, J.C., Anderson, D.C., Lobb, R., Pique, J.M. (1999). VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 116, 874-883
88. Sarzotti, M. (1997). Immunologic tolerance. *Current opinion in Hematology* 4, 48-52
89. Schlegel, P.G. (1999) Untersuchungen zu neuen immunologischen Ansätzen der Prävention der Graft-versus-Host Erkrankung im murinen Modell. Habilitationsschrift, Universitäts-Kinderklinik Tübingen.
90. Schlegel, P.G., Aharoni, R., Chen, Y., Chen, J., Teitelbaum, D., Arnon, R., Sela, M., Chao, N.J. (1996). A synthetic random basic copolymer with promiscuous binding to class II major histocompatibility complex molecules inhibits T-cell proliferative responses to ajor and minor histocompatibility antigens *in vitro* and confers the capacity to prevent murine graft-versus-host disease *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 5061-5066
91. 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.
92. Schwartz, R.H. (1990). A cell culture model for T-Lymphocyte clonal anergy. *Science* 248, 1349

93. Shlomchik, W.D., Couzens, M.S., Tang, C.B., McNiff, J., Robert, M.E., Liu, J., Shlomchik, M.J., Emerson, S.G. (1999). Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285, 412-415
94. Simonsen, M. (1962). Graft-versus-host-reaction. Their natural history and applicability of tool of research. *Prog Allergy* 6, 349
95. Simpson, E. (1987). Non-H-2 histocompatibility antigens: Can they be retroviral products? *Immunol Today* 8, 176
96. Simpson, E. (1998). Minor transplantation antigens: Mouse models for human host-versus-graft, graft-versus-host and graft-versus-leukemia reactions. *Arch Immunol Ther Exp* 46, 331-339
97. Sloan-Lancaster, J., Evavold, B.D., Allen, P.M. (1993). Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* 363, 156-159
98. Song, R., Harding, C.V. (1996). Roles of proteasomes, transpoter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J Immunol* 156, 4128-4190
99. Sutkowski, N., Palkama, T., Ciurli, C., Sekaly, R.P., Thorley-Lawson, D.A., Huber, B.T. (1996). An Epstein-Barr virus-associated superantigen. *J Exp Med* 184, 971-980
100. Tanaka, J., Asaka, M. und Imamura, M. (2000) T-cell cosignalling molecules in graft-versus-host disease. *Ann. Hematol.* 79, 283-290
101. Teitelbaum, D., Meshorer, A., Hirshfeld, T. Arnon, R., Sela, M. (1971). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol* 1, 242-248
102. Tsitoura, D.C., Holter, W., Cerwenka, A., Gelder, C.M., Lamb, J.R. (1996). Induction of anergy in human T helper 0 cells by stimulation with altered T cell antigen receptor ligands. *Journal of Immunology* 156, 2801-2808
103. Veale, D., Rogers, S., Fitzgerald, O. (1995). Immunolocalization of adhesion molecules in psoriatic arthritis, psoriatic and normal skin. *Br J Dermatol* 132, 32-38
104. Wallny, H.J., Rammensee, H.G. (1990). Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide. *Nature* 343, 275-278
105. Watanabe, T., Kajiume, T., Abe, T., Kawano, Y., Iwai, A., Iwai, T., Takaue, Y., Kuroda, Y. (2000). Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in children with hematologic malignancies from HLA-matched siblings. *Medical and Pediatric Oncology* 34, 171-176

106. Webb, S.R., Hutchinson, J., Hayden, K., Sprent, J. (1994). Expansion/deletion of major T-cells exposed to endogenous superantigens in vivo. *J. Immunol.* *152*, 586-597
107. Weber, G.F., Abromson-Leeman, S., Cantor, H. (1995). Signaling pathways coupled to T cell receptor ligation by MMTV superantigen leading to transient activation and programmed cell death. *Immunity* *2*, 363-372
108. Weiss, A., Imboden, J.B. (1987). Cell surface molecules and early events involved in human T Lymphocyte activation. *Adv Immunol* *41*, 1-38
109. Wettstein, P.J. (1986). Immunodominance in the T-cell response to multiple non-H-2 histocompatibility antigens. Observation of a hierarchy among dominant antigens. *Immunogenetics*, *24*, 24
110. Wettstein, P.J., Jewett, L., Faas, S., Brinster, R.L., Knowles, B.B. (1988). SV40 T-antigen is a histocompatibility antigen of SV40-transgenic mice. *Immunogenetics* *27*, 436
111. Yewdell, J.W., Bennink, J.R. (1999). Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu Rev Immunol* *17*, 51-88

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den folgenden Personen bedanken, ohne deren Einsatz diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre: an erster Stelle gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Professor Dr. Paul-Gerhardt Schlegel, Universitätskinderklinik Würzburg, sowohl für die interessante Aufgabenstellung als auch für seine wertvolle fachliche und menschliche Unterstützung.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Johannes T. Wessels, Universitätskinderklinik Tübingen, dessen Dissertation "Inhibierung Superantigen-induzierter T-Zellproliferation durch neue synthetische Peptide" eine wesentliche Grundlage dieser Arbeit darstellt, der mir als Betreuer in vielen Situationen mit Rat und Tat zur Seite stand und mich vor allem in die Technik des Mikroskopierens und der Immunhistochemie einführte. Herrn Peter Weber, Universitätskinderklinik Tübingen, möchte ich ganz herzlich danken für die tatkräftige Unterstützung in allen Fragen der digitalen Bildverarbeitung und Fragen rund um den Computer sowie für seine Mithilfe beim Anfertigen von Abbildungen. Mein weiterer Dank gilt der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Marlies Knipper, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Universität Tübingen, sowie der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Michael Gregor, medizinische Abteilung der Universitätsklinik Tübingen, für die Möglichkeit der Benutzung des Gefriermikrotoms. Den Mitarbeitern der Abteilung Strahlentherapie von Herrn Professor Dr. Michael Bamberg möchte ich danken für die Unterstützung bei der Bestrahlung der Mäuse.

Von Herzen gilt mein Dank Herrn Dr. Burkhardt Schütt, Universitätskinderklinik Tübingen- seine Ratschläge haben mir oft sehr weitergeholfen. Vielen Dank meinen Eltern für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung!

Lebenslauf

Barbara Ann Röllinghoff
geboren am 23. Oktober 1975 in Tübingen
ledig
Tochter von Dr. med. Wilhelm Röllinghoff (Internist)
und Gabriele Röllinghoff geb. Scheinfuss (staatl. gepr. Übersetzerin)

Schulbildung

1982-1986 Grundschule im Grauleshof in Aalen
1986-1995 Schubart-Gymnasium in Aalen,
Abschluss: Abitur

Studium

April 1996-November 2002 Studium der Medizin an der Universität Tübingen
 Ärztliche Vorprüfung: 27.03.1998
 Erstes Staatsexamen: 23.03.1999
 Zweites Staatsexamen: 12.09.2001
 Drittes Staatsexamen: 28.11.2002

Oktober 2001-September 2002 Praktisches Jahr an den Städtischen Kliniken Esslingen:
 22.10.2001-10.02.2002 im Fach Pädiatrie
 11.02.2002-31.05.2002 im Fach Chirurgie, teils im
 Ausland (Australien)
 01.06.2002-22.09.2002 im Fach Innere Medizin (Schweiz)

Doktorarbeit

Seit Januar 2000 an der Universitätskinderklinik Tübingen in der
 Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel,
 teils im Rahmen eines Urlaubssemesters

 Thema: Untersuchungen zur Prävention der Graft-versus-
 Host Erkrankung im murinen Modell durch den Einsatz neuer
 synthetischer Peptide.

Juni 2000 Teilnahme an der 13. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung
 für Leukämieforschung in Wilsede, Lüneburger Heide

Famulaturen/Praktika

- Juli/August 1995 Krankenpflegepraktikum an der VIRNGRUND-Klinik
Ellwangen
- August 1998 Famulatur auf der Kardiologischen Abteilung/Innere Medizin
des OSTALB-Klinikums Aalen
- September 1999 Famulatur in einer internistischen Praxis in Aalen

Auslandsaufenthalte

- September 1995-März 1996 Au-pair-Aufenthalt in Philadelphia/USA
- Oktober 1999-Januar 2000 Famulatur in der Pädiatrie, Chirurgie und Notaufnahme des
Campbelltown-Hospital in Sydney/ Australien
- April/Mai 2002 2.Hälfte des PJ-Tertials Chirurgie am Royal Melbourne
Hospital in Melbourne/Australien
- Juni-September 2002 PJ-Tertial Innere Medizin am Kantonalen Spital
Altstätten/Schweiz