Aus der Medizinischen Universitätsklinik

der

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br. Abteilung Innere Medizin I – Hämatologie und Onkologie Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. R. Mertelsmann

Die Rolle von extrazellulärem ATP bei der Entstehung der akuten Graft-versus-Host Erkrankung

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

> der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.

> > Vorgelegt 2011 von Konrad Wilhelm geboren in Stuttgart

Dekan: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Hubert E. Blum 1. Gutachter: Herr PD Dr. Robert Zeiser 2. Gutachter: Frau PD Dr. Silke Laßmann Jahr der Promotion: 2011 Dem wissenschaftlichen Fortschritt

Inhaltsverzeichnis

1.	Ein	leit	ung	7
1	.1.	Kn	ochenmark- und Stammzelltransplantationen	7
1	.2.	Gra	lft-versus-Host-Disease (GvHD)	8
	1.2	.1.	Phase 1 (Konditionierung)	8
	1.2	.2.	Phase 2 (Induktion und Expansion)	9
	1.2	.3.	Phase 3 (Effektor-Phase)	9
1	.3.	Gra	lft-versus-Tumor-Effekt	9
1	.4.	Ant	forderungen an Knochenmarktransplantationen:	9
1	.5.	Dai	nger Signals und purinerge Rezeptoren	. 10
1	.6.	Pu	rinerge Rezeptoren	. 10
1	.7.	Fra	gestellungen dieser Dissertation:	. 11
2.	Ma	teri	alien	12
2	2.1.	Gei	räte	.12
2	2.2.	Rea	agenzien	.13
2	2.3	Me	nschliche Prohen	.13
2	2.4.	Tie	rstämme	.14
-	2.4	1	Mäuse	14
2	2.1	Zel	llinien	14
-	25	1	Tierische Zelllinien	14
	2.5	2	Humane Zelllinien	15
2	2.5	.2. 701	Ikulturmedien und -seren	15
2		Cha	multur meulen und seren imministrationen in seren imministrationen in seren imministrationen in seren imministr	16
2	2.2	Rea	aktionssystemsätze (Kits)	17
2	0	Ant	tikörnar	17
-	29	1	Primärantikörner Anti-Maus	17
	2.7	.1. 2	Primärantikörper Anti-Human	18
	2.9	.2. २	Sekundäre Antikörper / Strentavidin	18
2	2.5	.J. Iał	ormatarial	18
2	·····	Но	rctallung gabrauchsfartigar I ösungan	20
-	21	1 1	Modium:	20
	2.1	1.1.	D7 Madium	. 20
	2.1	1.2.	DZ-Meuluili:	. 20
2	2.1) 1 7	1.3. ED	rAc5-ruilei	. 20
2	.12.	ED	v Flogramme	. 20
3.	Me	tho	den	.21
3	8.1.	Gvl	HD-Modell	.21
	3.1	.1.	Bestrahlung der Mäuse	21
	3.1	.2.	Gewinnung der T-Zellen	22
	3.1	.3.	Gewinnung des Knochenmarks	22
	3.1	.4.	Transplantation	23
	3.1	.5.	Zellzahlen bei verschiedenen Transplantationsmodellen	23
	3.1	.6.	Behandlung der transplantierten Tiere	23
3	8.2.	Me	ssung der T-Zell-Expansion mit der Biolumineszenz-Kamera	. 24
	3.2	.1.	Grundlagen	24
	3.2	.2.	Prozedur:	. 24
3	8.3.	AT]	P-Messungen	. 24
	3.3	.1.	Gewinnung von muriner peritonealer Spülflüssigkeit	. 24
	3.3	.2.	In vitro ATP-Freisetzung in HaCaT-/Epithelzellen und PBMZ-Kulturen:	. 25
	3.3	.3.	In vivo Detektion von freiem ATP mittels Biolumineszenz	. 25
	3.3	.4.	Ex vivo Biolumineszenz-Imaging zur Detektion von freiem ATP	. 25
3	8.4 .	Gv	Г-Effekt (Graft versus Tumor): B-Zell-Lymphommodell mit A20-Zellen	. 25
	3.4	.1.	Transplantation	26

3.5. H	istopathologische Auswertung durch konventionelle und	
Immun	fluoreszenzmikroskopie	. 26
3.5.1.	Sektion der Mäuse und Fixierung der Organe	. 26
3.5.2.	Herstellung von Gefrierschnitten	. 26
3.5.3.	Färbungen	. 26
3.5.4.	Auswertung der histomorphologischen Präparate	. 27
3.6. Ir	vitro Proliferationsversuche – Lymphozytenstimulationsmodell = Mixed	
Lympho	ocyte Reactions (MLR)	. 27
3.6.1.	Gewinnung und Vorbehandlung der Responderzellen	. 27
3.6.2.	Vorbehandlung der Stimulatorzellen	. 28
3.6.3.	Gewinnung von dendritischen Zellen aus Knochenmark (Bone marrow derived	
dentr	itic cells, BMDZ)	. 28
3.6.4.	Vorinkubation Responder-/Stimulatorzellen und Kultur	. 28
3.7. U	ntersuchung des Einflusses von PPADS auf die T-Zell-Vitalität	. 28
3.7.1.	Durchführung Annexin V/PI-Färbung	. 28
3.8. Z	vtokin-Messungen	.29
3.9. D	urchflusszytometrische (FACS-) Analyse der P2X ₇ R-Expression auf humanen	
Zellen		29
391	Gewinnung von mononukleären Zellen (MNZ) durch Ficoll-Paque-Isolierung	29
3 10 5	tatistische Analyse	30
5.10. 50		. 50
4. Ergel	onisse	.31
4.1. F	reies ATP	.31
4.1.1.	Einführung	. 31
4.1.2	Human: ATP-Spiegel in Aszites von GvHD-Patienten und nicht-GvHD-Patienten	31
413	Tiermodell' Einfluss von Bestrahlung auf ATP-Freisetzung	32
414	Tiermodell: Freies ATP nach allogener Stammzelltransplantation	32
42 Fi	influss von unsnezifischer P2X-Rezentor-Blockade auf GvHD im Tiermodell	35
421	Finführung	35
4.2.1.	Üharlahan	. 35
4.2.2.	T-Zollproliferation	. 35
4.2.3.	Histonathologische Graduierung der CyHD	. 30
4.2.4.	influss modikamontösor D2VD-Blockado auf alloantigon stimuliorto T-7oll-	. 57
T.J. L.	minuss meuramentoser r 2AR-Diockade au anoantigen stimuler te 1-Zen-	20
FIOIIIEI	Einführung	20
4.3.1.		. 39
4.3.2.	T-Zellproliferation und Apoptose	. 39
4.3.3.	Zytokinspiegel	.40
4.4. E	influss der PZX-Blockade auf den Graft-versus-Tumor Effekt im Mausmodell.	.41
4.4.1.	Einfuhrung.	.41
4.4.2.	Proliferation bzw. Abstoßung von Tumorzellen	.41
4.4.3.	Uberleben	. 42
4.5. Ei	influss von aGvHD auf die Expression von P2X7R auf RNA- und Proteinebene .	. 43
4.5.1.	Einführung	. 43
4.5.2.	Expression des P2X ₇ -Rezeptors (murin)	. 43
4.5.3.	Expression des P2X7-Rezeptors (human)	. 45
4.6. Ei	influss von P2X7-Defizienz bzwBlockade auf GvHD	. 45
4.6.1.	Einführung	. 45
4.6.2.	Uberleben	. 45
4.6.3.	Histopathologische Graduierung der GvHD	. 46
		4-
5. DISKI	15S10N	.47
5.1. A	TP als danger signal	.47
5.2. B	lockade von P2-Rezeptoren	. 48
5.2.1.	Rolle von purinergen Rezeptoren	. 48
5.2.2.	In vivo:	. 48

5.2.3. In vitro	48
5.3. Graft-versus-Tumor-Effekt	. 49
5.4. Rolle des P2X ₇ -Rezeptors	. 50
5.5. Zusammenfassung und Ausblick	. 51
6. Anhang	53
6.1. Abkürzungsverzeichnis	. 53
6.2. Patientencharakteristika Abbildung 1a	. 55
6.2.1. Gruppe A Patienten ohne alloHZT	55
6.2.2. Gruppe B Patienten mit Aszites nach alloHZT ohne akute GvHD	56
6.2.3. Gruppe C Patienten mit Aszites nach alloHZT und Entwicklung einer akuten GvH 56	ID
6.3. Patientencharakteristika Abbildung 6c	. 57
6.3.1. Patienten mit alloHZT ohne GvHD	57
6.3.2. Patienten mit alloHZT und GvHD	57
6.4. Abbildungsverzeichnis	. 59
7. Literaturverzeichnis	60
Danksagung	65
Curriculum vitae	66

1. Einleitung

1.1. Knochenmark- und Stammzelltransplantationen

Seit den 1970er Jahren findet die Transplantation von Knochenmark bzw. Stammzellen aus dem peripheren Blut verbreitet Anwendung. Hauptindikationen sind lebensbedrohliche und insbesondere maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems wie die akute myeloische Leukämie (AML), das multiple Myelom (MM), die chronische myeloische Leukämie usw., aber auch einige solide Tumoren wie z.B. das metastasierende Nierenzellkarzinom (Schrezenmeier et al. 2009). Das Prinzip der Transplantation besteht aus der Infusion von Stammzellen des blutbildenden Systems in den vorbehandelten Empfängerorganismus.

Die Stammzellen können dabei auf verschiedene Weise gewonnen werden: Der klassische Weg war die Verwendung von Knochenmarkaspiraten des Spenders. Um die hiermit verbundene Morbidität des Spenders (Schmerzen, Narkoserisiko) zu verringern, werden die hämatopoetischen Stammzellen heutzutage meist aus dem peripheren Blut gewonnen (PBSZ = periphere Blutstammzellen). Zur Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut wird der Spender zunächst mit G-CSF (Colony stimulating factor) behandelt und die gewünschten Zellen anschließend mittels Leukapherese gewonnen (Bosi und Bartolozzi 2010). Versuche gibt es auch mit der Transplantation von Stammzellen, die aus Nabelschnurblut gewonnen wurden (Jacobsohn und Vogelsang 2007).

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Typen von Stammzelltransplantationen. Zum einen gibt es die autologe Stammzelltransplantation, bei der Spender und Empfänger identisch sind. Sie findet z.B. Anwendung nach Hochdosischemotherapie im Rahmen der kombinierten Therapie verschiedener Erkrankungen, bei der es zu einer Zerstörung des blutbildenden Systems kommt. 2009 wurde diese Art der Transplantation in Deutschland bei mehr als 2500 Patienten durchgeführt.

Der zweite Typ von Stammzelltransplantationen ist die allogene Stammzelltransplantation, bei der Spender und Empfänger nicht identisch sind. Hier können entweder Geschwisterspender oder Fremdspender in Frage kommen. Die Indikation für die allogene Stammzelltransplantation wurde 2009 in Deutschland bei etwa 2400 Patienten gestellt (Schrezenmeier et al. 2009). Die Transplantation kann nur gelingen, wenn das Immunsystem des Empfängers durch eine entsprechende Vorbehandlung (Konditionierung) ausgeschaltet wurde; ansonsten werden die fremden Zellen abgestoßen und es kommt nicht zum Anwachsen des Transplantats. Die Konditionierungstherapie kann aus einer Hochdosischemotherapie, einer myeloablativen Bestrahlung oder einer Kombination beider Methoden bestehen (Harousseau 2007). Wenn dennoch Immunzellen im Empfängerorganismus verbleiben, kann eine Abstoßung des Transplantats folgen, welche dann eine medikamentöse Immunsuppression nötig macht.

Insbesondere bei der allogenen Stammzelltransplantation bestehen erhebliche therapieassoziierte Risiken:

Zunächst gehören hierzu die Risiken der myeloablativen Chemotherapie/Bestrahlung wie Durchfall, Erbrechen, Übelkeit, Entzündungen der Schleimhäute/Stomatitis, Haarausfall und organspezifische Nebenwirkungen der Zytostatika.

Vor allem in der ersten Zeit nach Transplantation bzw. bei zusätzlicher Anwendung von Immunsuppressiva sind Infektionen eine große Gefahr. Die Patienten haben durch die Myeloablation ihr eigenes Immunsystem verloren und sind durch die starke Abwehrschwäche aufgrund der Leukopenie anfällig für Infektionserkrankungen durch Bakterien, Pilze und opportunistische Erreger wie CMV.

Eine weitere Gefahr bei der allogenen Stammzelltransplantation ergibt sich durch das mögliche Auftreten der Graft-versus-Host-disease.

1.2. Graft-versus-Host-Disease (GvHD)

Eine spezifische therapieassoziierte Gefahr bei der Transplantation von allogenen Stammzellen stellt die Graft-versus-Host-Disease (Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion) dar. Hierbei handelt es sich um eine entzündliche Reaktion der vom angewachsenen Transplantat gebildeten Spenderimmunzellen auf den Kontakt mit Empfängerantigenen, welche als "fremd" erkannt werden. Bei der akuten Form (aGvHD) innerhalb der ersten 100 Tage sind vor allem die Epithelien von Haut, Darm und Leber, seltener der Lunge, Ziel der fortschreitenden vom Immunsystem vermittelten Entzündungsreaktion.

Bei der Spender-Empfängerkombination der allogenen Stammzelltransplantation sind folgende Kriterien als Risikofaktoren für eine aGvHD ausgemacht worden: Nichtverwandte Spender, Spender ohne Übereinstimmung im HLA-System (=mismatch), höheres Alter des Spenders, höheres Alter des Empfängers und bestimmte Konditionierungsprotokolle (Jacobsohn und Vogelsang 2007).

Je nach Quellenangaben erleiden zwischen 30% (bei HLA-identischen Spender-/Empfängerkombinationen) und 65% (bei HLA-nicht-identischen Kombinationen) der transplantierten Patienten eine GvHD. Präventiv wird eine Prophylaxe beispielsweise mit Cyclosporin A und Mycophenolat mofetil (MMF) oder MTX durchgeführt, wodurch allerdings das Infektionsrisiko steigt. Zur Behandlung der GvHD stehen zur Zeit Glukokortikoide sowie Antikörper gegen Lymphozyten oder deren Zytokine zur Verfügung.

Erklärungen zur Pathogenese der GvHD gehen von drei Phasen aus:

1.2.1. Phase 1 (Konditionierung)

Die erste Phase ist vorgegeben durch die Schäden an Empfängerorganen wie z.B. der Darmschleimhaut, Leber und anderen Organen. Aktivierte Zellen der geschädigten Organe geben verschiedene proinflammatorische Zytokine ab, wie z.B. Interleukin-1, TNF- α , GM-CSF und Interferon- γ .

Durch Dysregulationen bei der Freisetzung dieser Zytokine werden Adhäsionsmoleküle hochreguliert und verstärkt MHC-Antigene des Empfängers exprimiert, so dass alloreaktive Spender-T-Zellen auf mehr histoinkompatible Antigene treffen. Die Korrelation von Konditionierungsmethoden und GvHD-Risiko wurde sowohl in menschlichen Knochenmarktransplantationen als auch im Tiermodell gezeigt (Hakan et al. 2001).

1.2.2. Phase 2 (Induktion und Expansion)

Die Empfängerantigene werden von Spender T-Zellen erkannt, diese werden dadurch aktiviert und zur Proliferation und Differenzierung angeregt. Dabei erkennen immunkompetente Spender-T-Zellen Empfänger-Antigene, die von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) im Rahmen des Major-Histokompatibilitäts-Systems präsentiert werden. Bei Unterschieden im Major-Histokompatibilitätssystem zwischen Spender und Empfänger fällt die Immunantwort sehr stark aus, bei HLA-identischen Spender-Empfänger-Kombinationen kommt es durch Unterschiede im Minor-System zu einer schwächer ausgeprägten GvHD (Hakan et al. 2001).

Die Aktivierung der T-Zellen ist hierbei abhängig vom initialen Aktivierungsstatus der T-Zellen sowie von kostimulatorischen Signalen, welche von den APZ ausgehen, wie z.B. CD80 oder CD86. Eine Inaktivierung der APZ kann eine GvHD vermindern (Guinan et al. 1999).

1.2.3. Phase 3 (Effektor-Phase)

In dieser Phase binden die aktivierten Spender T-Zellen an Empfängerzellen und setzen verschiedene zytotoxische Ereignisse in Gang. Sowohl CD4+ als auch CD8+ Zellen setzen Zytokine wie IL-2, GM-CSF, TNF- α und IFN- γ frei. Diese Zytokine können dann andere T-Zellen oder Monozyten, natürliche Killerzellen oder vergleichbare Zelltypen aktivieren, welche direkte Entzündungsreaktionen an den betroffenen Empfängerstrukturen hervorrufen.

1.3. Graft-versus-Tumor-Effekt

Vor dem Hintergrund der schädlichen Wirkungen von alloreaktiven T-Zellen aus dem Spenderknochenmark gab es Versuche, diese T-Zellen aus den zur Transplantation vorgesehenen Infusionen zu entfernen. Allerdings resultierte dies nicht in einer Verbesserung der Empfängermorbidität. Verantwortlich hierfür ist der erwünschte Graft-versus-Tumor-Effekt: Bei Transplantation von komplettem Knochenmark (inklusive T-Zellen) erkennen Spender-T-Zellen (insbesondere CD8+) auch nach vorangegangenen Therapien wie z.B. Hochdosischemotherapien verbliebene Tumorzellen und vernichten diese. Bei Transplantation von T-Zell-depletiertem Knochenmark können diese residuierenden Tumorzellen erneut proliferieren, mit der Folge eines Tumorrezidivs (Goldman Jm Fau - Gale et al.). Zudem kann auch das Anwachsen eines T-Zell-depletierten Transplantats durch verbliebene Empfänger-T-Zellen gefährdet sein (Martin et al. 1988), so dass das Gesamtüberleben durch T-Zell-depletierte Transplantate nicht verbessert werden konnte.

1.4. Anforderungen an Knochenmarktransplantationen:

Aus dem Beschriebenen ergeben sich folgende Anforderungen an das optimale Gelingen einer Therapie durch Knochenmarktransplantationen: Zunächst muss das Anwachsen (engraftment) des Transplantats sichergestellt werden. Die sekundäre Morbidität durch eine nötige Immunsuppression oder GvHD sollte gering sein. Hierfür ist unter anderem die Immunrekonstitution nötig. Bei geringer Gefahr der GvHD-Ausbildung muss eine erfolgreiche Therapiestrategie dennoch eine intakte Tumorvernichtung über den Graft-versus-Tumor-Effekt beinhalten, um Tumorrezidive zu vermeiden.

1.5. Danger Signals und purinerge Rezeptoren

Danger signals (Gefahrensignale), welche bei Zellschaden freigesetzt werden, können exzessive durch das Immunsystem vermittelte Gewebeschädigung verursachen, wie man es bei der akuten Graft-versus-host disease (GvHD), der Abstoßung von allogenen Transplantaten oder beim SIRS (systemic inflammatory response syndrome) findet. Für solche Danger signals sind verschiedene Anforderungen formuliert worden. Zum einen müssen mögliche Danger signals bei Zellschaden rasch verfügbar sein, d.h. am ehesten handelt es sich um intrazellulär in hoher Konzentration verfügbare Moleküle. Extrazellulär sollten sie in Abwesenheit von zellulärem Stress entsprechend niedrig konzentriert sein. Zellen des Immunsystems müssen extrazelluläre Rezeptoren für das mögliche Signalmolekül haben, um Reaktionen hervorrufen zu können, und nicht zuletzt muss es sich um Moleküle handeln, die extrazellulär rasch abgebaut werden, um häufige überschießende Reaktionen zu vermeiden (Virgilio 2007).

Diese Voraussetzungen treffen auf Adenosin-Triphosphat (ATP) zu, dessen Rolle als Botenstoff neben seiner Wichtigkeit als Energieträger in den letzten Jahren zunehmend ersichtlich wurde.

ATP könnte als danger signal wirken, wenn es von untergehenden Zellen freigesetzt wird, da es unter physiologischen Bedingungen im Extrazellulärraum nur in geringen Konzentrationen vorkommt (Zimmermann 2000) und verschiedene Rezeptorenfamilien für ATP auf Immunzellen exprimiert werden. Im Normalfall wird extrazelluläres ATP rasch von CD39 und CD73 verstoffwechselt, so dass auch die Anforderung der schnellen Eliminierung gegeben ist.

1.6. Purinerge Rezeptoren

Es sind zwei Familien von purinergen Rezeptoren bekannt. Bei den Rezeptoren der Familie P2X (P2X₁-P2X₇) handelt es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle, die durch ATP aktiviert werden. Bei kurz andauernder Bindung von ATP wird die Bildung von IL-1b, IL-6 und TNF induziert, eine länger dauernde Bindung verursacht Apoptose (Ferrari et al. 1997).

Die Rezeptoren der Familie P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ & P2Y₁₄) hingegen werden durch ATP, ADP, UTP, UDP oder UDP-Glukose aktiviert und vermitteln G-Protein gekoppelt die Produktion von TNF, IL-8 oder PGE2 (Warny et al. 2001). Ein bekannter Vertreter ist der P2Y₁₂-Rezeptor, dessen Blockade durch Clopidogrel die Thrombozytenaggregation vermindert.

2007 zeigten Idzko und Kollegen, dass extrazellulärem ATP als Aktivator von dendritischen Zellen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der allergischen Entzündungsreaktion im Rahmen des allergischen Asthma zukommt (Idzko et al. 2007).

Insbesondere der P2X₇-Rezeptor scheint hierbei eine tragende Rolle zu spielen, da seine Aktivierung durch ATP zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-1 sowie TNF führt (Ferrari et al. 2006).

1.7. Fragestellungen dieser Dissertation:

Die im GvHD-Setting zu beobachtenden systemischen Entzündungsreaktionen zeigen klinisch und physiologisch auffällige Ähnlichkeiten zu den bei Sepsis oder schwerem Trauma vorkommenden Abläufen, welche zum SIRS (Schneider et al. 2006) beitragen. Dies führte zu der Hypothese, dass diesen Vorgängen der Gewebeschaden und die anschließende Freisetzung von Gefahrensignalen (danger signals) als molekulare Mediatoren gemeinsam sind. Deshalb könnte ein besseres Verständnis der Rolle dieser endogenen Gefahrensignale helfen, überschießenden Entzündungsprozessen bei verschiedenen Krankheitsentitäten vorzubeugen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von ATP als danger signal im Zusammenhang mit der Entstehung der akuten Graft-versus-Host-Disease nach allogener Knochenmarktransplantation. Die Arbeitshypothese geht dabei davon aus, dass der Zellschaden im Rahmen der nötigen Konditionierungstherapien vor allogener KMT zur Freisetzung von intrazellulärem ATP führt. Dieses ATP könnte an purinerge Rezeptoren von Immunzellen binden, dort zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen führen und somit zur Entstehung der akuten Graft-versus-Host-disease beitragen. Hierfür sollte zunächst die mögliche Freisetzung von ATP bei der Konditionierung und das Expressionsmuster purinerger Rezeptoren auf Zellen des Immunsystems untersucht werden. Anschließend soll durch Blockade dieser Rezeptoren ihre Rolle bei der Entstehung der GvHD und ein möglicher Einfluss dieser Blockade auf den Graft-versus-Tumor-Effekt und die Immunrekonstitution evaluiert werden.

2. Materialien

2.1. Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
-20 °C Gefrierschrank		Bosch
-80 °C Gefrierschrank		Heraeus
Autoklav		Vaculab-S3000
Bestrahlungsanlage		CIS Bio International IBL 637
Bestrahlungsbox		Werkhof Universitätsklinik Freiburg
Bioluminiszenzkamera	IVIS100 charge-coupled device (CCD) imaging system	Xenogen, Alameda, CA
Brutschrank		Heraeus
Durchflusszytometer	CyAn ADP	Dako Cytomation
Durchflusszytometer	FACSanto II	BD
Einfrierboxen		Nalgene Freezy Boy
Eismaschine		Ziegra
Feinwaage		Sartorius CL420
Kühlschränke		Liebherr
Lichtmikroskop		Olympus CX2
Mehrkanalpipette		Eppendorf
Pipetten		Gilson
Pipettierhilfe		Integra Bioscience Pipetboy acu
Präparierbesteck		Aesculap
Sterilbank		Heraeus LaminAir 2448

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Stickstofftank		Air Liquide
Vortexer		Heidolph Reax 2000
Zellsorter	MoFlo High speed cell sorter	Dako Cytomation
Zellzählkammer		Brand Neubauer Improved Bright-line
Zentrifugen		Heraeus Varifuge 3.0
		Heraeus Multifuge 3
		Heraeus Biofuge 13
Kryotom		Leica
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2	Zeiss, Jena, Deutschland

2.2. Reagenzien

Name	Verwendung	Hersteller/Bezug
KN-62	Spezifische Blockade P2X7R	AG Scientific Inc., USA
PPADS = 4-[[4-Formyl-5- hydroxy-6-methyl-3- [(phosphonooxy)methyl]-2- pyridinyl]azo]-1,3-benzene- disulfonic acid	Unspezifische Blockade P2R	Sigma-Aldrich, Deutschland

PPADS blockiert unspezifisch P2-Rezeptoren und wurde in diesem Zusammenhang schon häufig eingesetzt (Lambrecht et al. 1992). KN-62 blockiert spezifisch den P2X₇-Rezeptor (Friedle et al.).

2.3. Menschliche Proben

Alle Proben wurden nach Zulassung des Studienprotokolls durch das Ethik-Komitee der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg und nach schriftlicher Zustimmung gesammelt. Aszites (siehe Tabellen 1-1 bis 1-3 im Anhang) bzw. Blutproben (siehe Tabellen 2-1 und 2-2 im Anhang) wurden von Patienten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (alloHZT) bzw. mit anderen Ursachen für Aszites, oder von gesunden Spendern gesammelt. Das GvHD-Grading erfolgte histopathologisch.

2.4. Tierstämme

2.4.1. Mäuse

Stamm	Beschreibung	Bezug
BALB/c	H-2K ^d , Thy-1.2	Charles River Laboratory
C57Bl/6	H-2K ^b , Thy-1.2	Züchtung in der Tierhaltung der
C57Bl/6 Luc⁺	H-2K ^b , Thy-1.2	Universität Freiburg
FVB/N	H-2K9, Thy-1.2	
C57Bl/6 P2X ₇ R-/-	Knockout für P2X7R	Jackson Laboratory (Sulzburg, Germany)

Die verwendeten Tierstämme werden in der Tierhaltung des ZKF (Zentrum für klinische Forschung) der Universität Freiburg unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) gezüchtet bzw. gehalten. Die Mäuse waren bei Nutzung zwischen 6 und 12 Wochen alt. Die Luziferase-exprimierenden (luc⁺)transgenen Mäuse der Linie FVB/N L2G85 sind zuvor beschrieben worden (Cao et al. 2004) und wurden über mehr als 14 Generationen auf die C57Bl/6 Linie zurück gekreuzt. Alle Tierexperimente wurden erst nach Genehmigung eines Tierschutzantrags durch die Universität Freiburg durchgeführt.

2.5. Zelllinien

2.5.1. Tierische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
A20 Wild Type	B-Zell-Lymphom-Zelllinie	Center for Clinical Science Research, Stanford University School of Medicine
A20-luc+	B-Zell-Lymphom-Zelllinie transgen für Luziferase	Center for Clinical Science Research, Stanford University School of Medicine

Zelllinie	Beschreibung	Verwendung	Referenz/Bezug		
HaCaT	Spontan immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie	ATP-Freisetzung nach Stimulation mit PBMZ	ATCC, Manassas, VA, USA		
Jurkat	E6-1 Klon, immortalisierte T-Lymphozyten Zelllinie	ATP-Freisetzung nach Stimulation mit PBMZ	ATCC, Manassas, VA, USA		
PBMZ	Gewinnung durch Ficoll- Paque Isolation (s.u.)	Stimulatorzellen	Gesunde freiwillige Spender		
PME	Zellen mit Plasma- membrangekoppelter Luziferase	ATP-Messungen in vivo	Pellegati, P Dep. of Experimental and Diagnostic Medicine, Interdisciplinary Center for the Study of Inflammation, University of Ferrara, Ferrara, Italy.		

2.5.2. Humane Zelllinien

HaCaT Zellen und Jurkat Zellen wurden in RPMI aufbewahrt. PBMZ (periphere mononukleäre Blutzellen) von gesunden freiwilligen Spendern wurden durch Ficoll-Paque Isolation gewonnen (ausführlich im Methodenteil beschrieben).

2.6. Zellkulturmedien und -seren

Produkt	Produktangaben	Hersteller/Bezugsangabe
RPMI 1640 + L-Glutamin 1X		Gibco
Fetal Bovine Serum (FBS)		Gibco, Life Sciences, Grand Island, NY
Fetal Calf Serum (FCS)		Gibco
Optimem Medium 1X		Gibco
GM-CSF		R&D Systems

2.7. Chemikalien

Produkt	Verwendung	Hersteller/Bezug
Annexin V		BD
Albumin, bovine		Sigma-Aldrich
Ampicillin		Sigma-Aldrich
Aqua ad iniectabilia		B. Braun
BSA 30%		Sigma-Aldrich
CellWASH		BD
Ciprofloxacin		Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Sigma
HybriMax		
Ethanol		J. T. Baker
FACS Lysing solution		BD
Forene (Isofluran)		Abbott
Humanalbumin Kabi 20%		Octapharma
Luziferin		BioSYNTH
ОСТ	Einbettmedium	Tissue Tek Sakura
Penicillin/ Streptomycin		Gibco
Phosphate-Buffered Saline (PBS)		Gibco
PI		Sigma-Aldrich, BD
Trypan Blue 0,4%		Invitrogen
Eosin		Thermo Scientific
Mayer's Hämatoxylin		Dako
Roti Histokitt		Roth

Materialien

Produkt	Verwendung	Hersteller/Bezug
Ficoll (Pancoll)		PAN

2.8. Reaktionssystemsätze (Kits)

Name	Zweck/Verwendung	Hersteller
Vybrant CFDA SE Tracer kit	CFSE Proliferationsmessung	Molekular Probes, Eugene OR
Mouse Inflammation kit	ZytokinmessungenperCytometric beat array	BD Deutschland
ATPlite assay	ATP-Messungen	Perkin Elmer, Rodgau- Juegesheim, Deutschland

2.9. Antikörper

2.9.1. Primärantikörper Anti-Maus

Name	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
CD4	RM4-5	Rat IgG2a k	Pacific blue	BioLegend
CD4	GK1.5	Rat IgG2b k Alexa Fluor 647		BioLegend
CD4	GK1.5	Rat IgG2b k	FITC	BioLegend
CD8 α	53-6.7	Rat IgG2a k	АРС	Bioscience
CD25	PC61	Rat IgG1λ	PE	BioLegend
NK1.1	PK136	Mouse IgG2a k	АРС	BioLegend
NK1.1	PK136	Mouse IgG2a k	PE	BioLegend
Anti firefly- luziferase		Goat Polyclonal	FITC	LS-C71810-Life Span Bioscience
Anti P2X7R		Rabbit polyclonal (anti human, anti mouse)	FITC	Sigma

Name	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
Anti-P2X7R (extrazellulär)		Rabbit polyclonal (anti human, anti mouse)	FITC	Alomone labs
CD14	MfP9	Mouse IgG2b k	APC	BD
CD45	2D1	Mouse IgG1 k	APC-H7	BD
lgG1 k isotype Kontrolle	MOPC-21	Mouse IgG1 k	FITC	BD

2.9.2. Primärantikörper Anti-Human

2.9.3. Sekundäre Antikörper / Streptavidin

Name	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
Donkey Anti goat			FITC	Santa Cruz
Goat Anti Rabbit IgG (H+L)			Biotin	Jackson- Immunoresearch Lab
Streptavidin			Per CP-Cy5	BD
Streptavidin			АРС	BD

2.10. Labormaterial

Produkt	Hersteller
15 ml Conical Tubes	BD Falcon
50 ml Conical Tubes	BD Falcon
6-well Zellkultur-Platten, steril, mit Rundboden oder Flachboden	Becton Dickinson Discovery Labware
96-well Zellkultur-Platten, steril, mit Rundboden oder Flachboden	Becton Dickinson Discovery Labware
Aufziehkanüle, stumpf	B. Braun

Produkt		Hersteller
Bakterienkulturschalen, 100 mm		Greiner
Cryomold Standard		Sakura
Deckgläser		rL
Einfrierröhrchen (Cryogenic Vials) 1,0 ml		Corning
Einmal-Skalpelle		Feather
Filterpapier		Whatman
Kanülen, steril, verschiedene Größen		B. Braun
Kunststoffpipettenspitzen, steril, verschiedene Größen		Corning
MACS LS Säule		Milteny Biotec
MACS Multistand		Milteny Biotec
Objektträger	Superfrost/Plus	Fisher Scientific, Hampton, NH
Parafilm M		American National Can
Pipettenspitzen mit Filter, steril, verschiedene Größen		Biozym
Polystyrol-Rundbodenröhrchen "FACS"		BD Falcon
Reagiergefäße 1,5 ml + 2 ml		Eppendorf
Spritzen, steril, verschiedene Größen		B. Braun
Zellkulturflaschen, steril, verschiedene Größen		Greiner
Zellkulturschalen, steril, verschiedene Größen		Greiner

Produkt	Hersteller
Zellsieb 100 μm	BD Falcon

2.11. Herstellung gebrauchsfertiger Lösungen

2.11.1. Medium:

- RPMI 1640 1x + L-Glutamin
- Penicillin/Streptomycin 1%
- FCS 10%

2.11.2. DZ-Medium:

- RPMI 160
- 2 mM L- Glutamin
- 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin

2.11.3. FACS-Puffer

- 500 ml PBS
- 12,5 ml Humanalbumin Kabi (20%)

2.12. EDV Programme

Produkt	Nutzung	Firma
EndNote X3	Literaturverwaltung	Thomson
FlowJo v6.4.3	Auswertung FACS-Daten	Treestar
IgorProCarbon	Bioluminiszenzdaten	WaveMetrics, Lake Oswego, OR
Living ImageSoftware	Bioluminiszenzdaten	Caliper
Photoshop CS7	Erstellung von Grafiken	Adobe
Prim	Erstellung von Graphen	GraphPAD
Summit v4.3		Dako Cytomation

3. Methoden

3.1. GvHD-Modell

Für die Auslösung einer GvHD ist ein Transplantationsmodell nötig. Hierfür wurden die Empfängertiere zunächst myeloablativ bestrahlt (Konditionierungstherapie), anschließend wurde ihnen Knochenmark und die für die Auslösung der GvHD essentiellen T-Zellen (CD4⁺ oder CD8⁺) einer MHC (major histocompatibility complex) Klasse 1 und 2 differenten Maus durch Injektion in die Schwanzvene oder in den retroorbitalen Venenplexus verabreicht. Bei diesem vorbeschriebenen Modell (Zeiser et al. 2006) wurden die unten stehenden Kombinationen von unterschiedlichen Maustypen verwendet. Alle Kombinationen haben nicht-kompatible MHCs im HLA-System, d.h. es handelt sich um ein major mismatch und damit um ein besonders aggressives Transplantationsmodel.



3.1.1. Bestrahlung der Mäuse

Die Bestrahlung der Mäuse erfolgte nach bereits publiziertem Schema (Beilhack et al. 2005) als Konditionierungstherapie vor der Knochenmarktransplantantion (KMT) in der Core Facility der Universität Freiburg (ZKF). Hierfür wurden die Mäuse im Abstand von 4 Stunden zwei Mal mit jeweils 4,5 Gy bestrahlt. Die Gesamtdosis von 9 Gy war durch Vorversuche als für die Myeloablation ausreichend ermittelt worden. Die genaue Bestrahlungsdauer für das Erreichen dieser Dosis wird von Mitarbeitern des ZKF ständig neu berechnet und betrug 2009 mit der dort vorhandenen Caesiumquelle zwei Mal 414 Sekunden. Als Bestrahlungsgefäß wurde von Technikern des ZKF eigens ein Bestrahlungsrondell hergestellt, welches in 12 Kammern unterteilt ist und durch die fixe Anordnung der Mäuse und zusätzliche Rotation im Bestrahlungsgerät garantiert, dass jede bestrahlte Maus die gleiche Dosis erhält.

3.1.2. Gewinnung der T-Zellen

Für die Auslösung einer GvHD ist die Gabe von CD4⁺ beziehungsweise CD8⁺ Zellen essentiell (Li et al. 2009). Da diese im Knochenmark von Mäusen in nur geringen Mengen enthalten sind, müssen zusätzliche T-Zellen aus der Milz isoliert und injiziert werden. Die verabreichte Dosis variierte je nach Transplantationsmodell zwischen 3 x 10⁵ und 1 x 10⁶ Zellen pro Maus. Mit dieser Dosis konnte eine GvHD zuverlässig induziert werden.

Die Spendermäuse wurden nach Betäubung mit Isofluran durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde mit Hilfe eines sterilen Skalpells der Bauchraum eröffnet und die Milz entnommen. Diese wurde in eine Petrischale mit sterilem PBS gelegt und mit einer sterilen Schere in mehrere Teile zerkleinert. Danach erfolgte die Homogenisierung durch Zerdrücken der Milzstücke mit dem Stempel einer Spritze in einem Zellsieb. Die so erhaltenen Splenozyten wurden mehrmals mit PBS gewaschen und hinterher in 1 ml Medium aufgenommen.

Die Extraktion von CD4⁺ und CD8⁺-Zellen erfolgte mittels MACS (Magnetic cell separation). Bei diesem Zellseparationssystem bedient man sich magnetischer Beads und einer magnetischen Säule. Im Einzelnen wurde dabei wie folgt vorgegangen:

- Die gezählten Splenozyten waschen und in etwa 500 µl Puffer aufnehmen
- Jeweils 10 μl CD4- und CD8-Beads/107 Zellen zu den Zellen geben, vortexen
- 25 min bei 4 °C inkubieren
- Zur Abtrennung nicht gebundener Beads die Zellen mit 20 ml Puffer waschen, zentrifugieren und den Überstand abnehmen
- Die Zellen in 1 ml Puffer (PBS) aufnehmen und auf die vorher mit 3 ml PBS befeuchtete Säule geben
- Nachdem die Zellsuspension durch die Säule gelaufen ist, diese nacheinander mit 3 x 3 ml PBS spülen, um Zellen ohne magnetische Beads aus der Säule zu waschen.
- Erneut 3 ml PBS auf die Säule geben, die Säule vom Magnet trennen, sofort den Spritzenstempel aufsetzen und die positiv selektionierten Zellen in ein neues Tube spritzen.

Die so gewonnenen CD4⁺ / CD8⁺ Zellen wurden gezählt und in der jeweils gewünschten Zahl in 50 µl PBS aufgenommen.

3.1.3. Gewinnung des Knochenmarks

Nach Entnahme der Milz wurden bei den gleichen Mäusen die unteren Extremitäten mit sterilen Skalpellen von Fell, Haut und Muskeln befreit, bis der Knochen vollständig freilag. Daraufhin wurde das Femur aus dem Hüftgelenk gelöst und das Kniegelenk durchtrennt.

Femur und Tibia wurden in eine Petrischale mit sterilem PBS gelegt und am proximalen und distalen Ende mit einem sterilen Skalpell eröffnet.

Die Herauslösung des Knochenmarks erfolgte nun mit einer sterilen Spritze, wobei die Knochen mehrmals von proximal nach distal mit dem sich in der Petrischale befindlichen sterilen PBS durchgespült wurden.

Anschließend wurden die gewonnen Zellen gezählt, gewaschen und in einer Konzentration von 5 x 10^6 pro 50 µl in sterilem Medium aufgenommen.

3.1.4. Transplantation

Die vorher aufgereinigten und genau auf die gewünschten Zellzahlen eingestellten Zellen wurden nun in die Empfängertiere injiziert. Dabei wurden in sterile Insulinspritzen für die Knochenmarkkontrollen jeweils 50 μ l Knochenmarksuspension und 50 μ l steriles Medium, für die GvHD-Mäuse je 50 μ l T-Zellen und 50 μ l Knochenmarkzellen aufgezogen, so dass jede Maus am Ende ein Volumen von 100 μ l erhielt. Die Injektion erfolgte in die Schwanzvene.

Spender	Empfänger	Knochenmark-Zellen	T-Zellen	
C57BL/6	BALB/c	5 x 10 ⁶	3 x 10 ⁵	
FVB/N	BALB/c	5 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	
BALB/c	C57BL/6	5 x 10 ⁶	3 x 10 ⁵	

3.1.5. Zellzahlen bei verschiedenen Transplantationsmodellen

Da die HLA-Kombinationen bei den verschiedenen Spender-Empfänger-Konstellationen unterschiedlich aggressiv sind und deshalb die für das Auslösen einer GvHD nötige T-Zellmenge variiert, muss deren Dosis angepasst werden.

3.1.6. Behandlung der transplantierten Tiere

Um den Einfluss der Blockade von purinergen Rezeptoren auf Überleben und T-Zellproliferation bzw. migration zu untersuchen, wurden die Rezeptoren je nach gewünschter Kombination wie folgt blockiert: Entweder wurden die T-Zellen vor Injektion für 3 h in PBS mit 10 μ M PPADS (vs. ohne PPADS in der Kontrollgruppe) vorinkubiert oder den Empfängertieren nach Transplantation über 10 Tage einmal täglich 10 μ M PPADS in 100 μ l PBS intraperitoneal injiziert (vs. Injektion von gleichem Volumen PBS ohne PPADS). Alternativ wurden T-Zellen von P2X₇R-/- Mäusen bzw. solche Tiere als Empfänger von Wildtyp-T-Zellen benutzt.

Alle Injektionen erfolgten mit sterilen Insulinspritzen.

3.2. Messung der T-Zell-Expansion mit der Biolumineszenz-Kamera

3.2.1. Grundlagen

Die Erfassung der Expansion der T-Zellen mit Hilfe der Biolumineszenz-Kamera stellt einen indirekten Marker für die Entwicklung beziehungsweise das Fortschreiten der GvHD dar, da die GvHD unter anderem durch die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen ausgelöst wird. Sie ist deswegen eine sinnvolle Methode, um die Erkrankung der Tiere nicht-invasiv und in-vivo beobachten zu können.

Die Verfolgung von transplantierten T-Zellen wurde erst durch die Herstellung Luziferase-transgener Zellen möglich. Das bedeutet, dass diese Zellen transgen für ein Gen des Glühwürmchens (firefly -Lampyridae) sind, welches für das Enzym Luziferase kodiert. Die Luziferase katalysiert mit Hilfe von Sauerstoff die Oxidation von Luziferin. Dabei kommt es zur Aussendung von Photonen.

Das Luziferase-Gen steht in den Zellen luc-transgener Mäuse unter der Kontrolle des ß-Aktin-Promotors und wird deswegen wie der Zytoskelettbestandteil ß-Aktin ständig exprimiert.

Durch die Injektion von T-Zellen luc-transgener Mäuse kann man folglich nach exogener Zugabe von Luziferin eine Aussendung von Photonen in den Empfängertieren messen. Die Lokalisation der T-Zellen und die der T-Zellmenge proportionale Quantität der Photonen kann mit der Biolumineszenz-Kamera erfasst und mit entsprechender Software (Living Image) ausgewertet werden.

3.2.2. Prozedur:

Analog zu der von Zeiser et al. 2008 beschriebenen Vorgehensweise wurde den transplantierten Tieren jeweils 10 μg/g KG Luziferin intraperitoneal injiziert. Anschließend wurden sie mit Isofluran narkotisiert und 10 min nach Injektion in narkotisiertem Zustand in der Biolumineszenz-Kamera (IVIS200 charge-coupled device (CCD) imaging system von Xenogen, Alameda, CA) positioniert. Hier wurde über 5 Minuten die Photonenmenge in Photonen/Sekunde/ cm² gemessen. Die Imaging Daten wurden analysiert und quantifiziert mit Living ImageSoftware (Xenogen) und IgorProCarbon (WaveMetrics, Lake Oswego, OR).

3.3. ATP-Messungen

Eisgekühlte Proben von muriner peritonealer Spülflüssigkeit, humanem Aszites oder Überständen aus Zellkulturen wurden bei 4 °C zentrifugiert und die Überstände für die ATP-Messungen benutzt. Die ATP-Spiegel wurden mit der ATPlite Untersuchung (Perkin Elmer, Rodgau-Juegesheim, Deutschland) durch Tobias Müller (AG Idzko) bestimmt. Dabei wurde der im angewendeten Herstellerprotokoll vorgesehene Lyseschritt der Zellen ausgelassen, um keine Verunreinigung durch intrazelluläres ATP zu verursachen.

3.3.1. Gewinnung von muriner peritonealer Spülflüssigkeit

Für die Gewinnung von peritonealer Spülflüssigkeit bei Mäusen wurden diese nach Betäubung mit Isofluran durch zervikale Dislokation geopfert und anschließend mit einer sterilen Schere die Bauchhaut eröffnet. Anschließend wurden mit einer Spritze 100 μ l PBS in die Bauchhöhle eingebracht, manuell verteilt und nach ca. 30 Sekunden wieder abgezogen. Die so gewonnene Spülflüssigkeit wurde bis zur ATP-Messung bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.2. In vitro ATP-Freisetzung in HaCaT-/Epithelzellen und PBMZ-Kulturen:

Zur Messung der ATP-Freisetzung bei allogener Stimulation von humanen Zellen wurden insgesamt 2 x 10⁵ Zellen/Well in flach vertieften 96-Well-Platten kultiviert. Dabei wurden HaCaT- oder Epithelzellen mit allogenen PBMZ stimuliert und folgende Zellmengen benutzt: 1:1 Verhältnis (jeweils 1 x 10⁵ Zellen), 1:0,5 Verhältnis (HaCaT- oder Epithelzellen : PBMZs – 133 000 : 67 000), 1:0,1 Verhältnis (HaCaT- oder Epithelzellen : PBMZs – 133 000 : 67 000), 1:0,1 Verhältnis (HaCaT- oder Epithelzellen : PBMZ – 180 000 : 18 000). Nach 48 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die darin enthaltene ATP-Menge gemessen.

3.3.3. In vivo Detektion von freiem ATP mittels Biolumineszenz

Eine von Pellegatti et al. 2008 beschriebene an die Plasmamembran gekoppelte Luziferase erlaubt die Detektion und Lokalisation von extrazellulärem ATP in vivo. Diese Zellen verteilen sich im ganzen Körper und senden nach Luziferingabe Photonen aus. Die hierfür nötige Oxidierung von Luziferin benötigt ATP als Energielieferant.

$$LH_2 + O_2 + ATP \xrightarrow{Luciferase} oxy-L + CO_2 + AMP + PP_i + hv$$

Bei den zumeist genutzten luc-transgenen Zellen befindet sich die Luziferase intrazellulär, wo genug ATP für die Reaktion zur Verfügung steht. Da sich die Luziferase der PME-Zellen an der Außenseite der Membran befindet, steht das intrazelluläre ATP nicht zur Verfügung, so dass die Reaktion nur in Anwesenheit von freiem ATP möglich ist und dieses somit nachweisbar wird. Für diese Messungen wurden 2 x 10⁶ Zellen mit einer Plasmamembran gekoppelten Luziferase (PME-Zellen) in die Schwanzvene injiziert und die Empfängermäuse nach alloHZT untersucht. Das Imaging erfolgte wie oben für die T-Zell-Expansion beschrieben.

3.3.4. Ex vivo Biolumineszenz-Imaging zur Detektion von freiem ATP

Um die Freisetzung von ATP gezielt in dem GvHD-Zielorgan Gastrointestinaltrakt zu untersuchen, wurde bei den oben genannten Empfängern von PME-Zellen an Tag 10 ein ex vivo imaging des Gastrointestinaltraktes durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere 10 Minuten nach intraperitonealer Luziferin-Injektion und Betäubung mit Isofluran geopfert, der Gastrointestinaltrakt isoliert und sofort mit der Bioluminiszenzkamera die Photonenmenge gemessen.

3.4. GvT-Effekt (Graft versus Tumor): B-Zell-Lymphommodell mit A20-Zellen

Um die GvT Aktivität der transplantierten Donor T-Zellen zu untersuchen, wurde eine Luziferase-tragende A20 B-Zell-Lymphom-Zelllinie verwendet, bei der im Vorfeld gezeigt wurde, dass sie primär das Knochenmark und sekundär die Milz und andere lymphatische Organe infiltriert (Zeiser et al. 2006).

Die Gewinnung des Knochenmarks und der Splenozyten erfolgte wie oben. Die A20-Zellen wurden am Tag der Transplantation aus der Zellkultur entnommen und auf 5 x 10^5 Zellen pro 50 µl PBS eingestellt.

3.4.1. Transplantation

Die Empfängertiere wurden nach der Bestrahlung mit Isofluran betäubt und die A20-Zellen mit sterilen Insulinspritzen in den retroorbitalen venösen Plexus der Empfängertiere injiziert. Am selben Tag wurden 5 x 10⁶ Knochenmarkzellen in die Schwanzvene und zwei Tage später zusätzlich 3 x 10⁵ CD4⁺ / CD8⁺ Zellen injiziert.

Das Anwachsen der Luziferase-exprimierenden Lymphomzellen in den Empfängertieren konnte mit Hilfe der Biolumineszenz beobachtet werden.

3.5. Histopathologische Auswertung durch konventionelle und Immunfluoreszenzmikroskopie

3.5.1. Sektion der Mäuse und Fixierung der Organe

Tiere aus den Interventionsgruppen und aus den Kontrollgruppen wurden an Tag 7 geopfert und Proben von Dünndarm und Kolon entnommen. Diese wurden sofort in OCT Einbettmedium in Plastikförmchen gelegt und auf Trockeneis zum Einfrieren gebracht. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

3.5.2. Herstellung von Gefrierschnitten

Die Herstellung von Gefrierschnitten von 5 μ m Dicke erfolgte mit einem Kryotom im Institut für Pathologie der Universität Freiburg. Sie wurden auf positiv geladene vorgereinigte Objektträger verbracht und bei -80 °C gelagert.

3.5.3. Färbungen

Für morphologische Analysen wurden die Schnitte mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Dafür wurde wie folgt vorgegangen:

- 40 sek in Hämatoxylin-Lösung färben
- 1 min in H20 bläuen
- 50 sek in Eosin färben
- 1 min in 70% Ethanol reinigen und dehydrieren
- 1 min in 100% Ethanol reinigen und dehydrieren
- 1 min in Xylen stellen

Die gefärbten Schnitte wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Für die immunhistochemischen Auswertungen wurden die Gewebe mit polyklonalen Kaninchen anti-P2X₇R-Antikörpern von Abcam gefärbt, gefolgt von biotingekoppeltem sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper (Jackson Immunoresearch Europe) und einem sekundären Streptavidin-AP Detektionssystem (Daco).

3.5.4. Auswertung der histomorphologischen Präparate

Die Präparate wurden verblindet und zu Frau Dr. Gerlach aus dem Institut für Pathologie der Universit⁻⁻åtsklinik Freiburg geschickt, welche die Auswertung der gefärbten Schnitte auf einem Zeiss-Mikroskop (Axioplan 2, Jena, Deutschland) vornahm. Als Standardobjektive wurden 20x/numerische Apertur 0,45 und 40x/numerische Apertur 0,60 benutzt. Die mikroskopischen Photos wurden mit einer Spot Digitalkamera aufgenommen.

Die intestinale GVHD wurde nach einem 2004 publizierten histopathologischen Scoring System (Kaplan et al. 2004) auf der Basis der Krypten-Apoptosen und der Inflammation gemessen:

	0	1	2	3	4
Krypten- Apoptosen	Keine bis wenig	Gelegentlich apoptotische Körperchen pro 10 Krypten	Einige apoptotische Körperchen pro 10 Krypten	Die Mehrheit der Krypten enthält ein apoptotisches Körperchen	Die Mehrheit der Krypten enthält >1 apoptotische Körperchen
Inflammation	Keine	Mild	Moderat	Schwer, ohne Ulzeration	Schwer, mit Ulzeration

3.6. In vitro Proliferationsversuche – Lymphozytenstimulationsmodell = Mixed Lymphocyte Reactions (MLR)

Um den Einfluss der Blockade von P2XR bzw. P2X₇R auf die Proliferation und Apoptose von T-Zellen zu untersuchen, wurden Mixed Lymphocyte Reactions in verschiedenen Kombinationen durchgeführt. Hierfür wurden CD4+-Zellen aus C57Bl/6 Mäusen als Responder und Splenozyten oder dendritische Zellen (DZ) aus BALB/c Mäusen als Stimulatoren benutzt.

3.6.1. Gewinnung und Vorbehandlung der Responderzellen

Hierfür wurden Milzen wie oben beschrieben präpariert und anschließend die gewünschten CD4+-Zellen durch positive Selektion unter der Verwendung von magnetischer Zellseparation (MACS, s.o.) angereichert.

3.6.1.1. CFSE-Färbung

Die Färbung von Lymphozyten mit CFSE stellt eine etablierte und häufig genutzte Methode dar, um die Proliferation von Lymphozyten sowohl in vivo als auch in vitro zu messen (Quah et al. 2007). Wie oben beschrieben wurden CD4+-Zellen angereichert und vor Kultur mit CFSE gefärbt.

Dafür wurden 1 x 10⁷/ml T-Zellen in einfachem PBS (phosphate-buffered saline) suspendiert und mit dem Vybrant CFDA SE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) Tracer kit (Molekular Probes, Eugene OR) mit einer Endkonzentration von 5 μ M für exakt 6 Minuten bei 37° C inkubiert. Sofort nach der

Färbung wurden die Zellen zweimal im 5-fachen Volumen eiskalten RPMI plus 10% FBS (Gibco, Life Sciences, Grand Island, NY) gewaschen, anschließend in PBS resuspendiert, gezählt und auf 2 x 10^5 Zellen pro 100 µl Medium eingestellt.

3.6.2. Vorbehandlung der Stimulatorzellen

BALB/c Splenozyten oder dendritische Zellen wurden in einer Petrischale mit einer Dosis von 30 Gy in der oben beschrieben Caesiumquelle bestrahlt. Anschließend wurden sie gewaschen, gezählt und auf 2 x 10^5 , 4 x 10^5 und 2 x 10^6 pro 100 µl Medium eingestellt.

3.6.3. Gewinnung von dendritischen Zellen aus Knochenmark (Bone marrow derived dentritic cells, BMDZ)

Einzelzellsuspensionen aus Knochenmark von BALB/c-Mäusen wurden isoliert und 5 x 10⁶ Zellen/ml in DZ-Medium inkubiert und die DZ-Maturation durch GM-CSF (10 ng/ml) über 7 Tage stimuliert, wie von Reichardt et al. 2008 vorbeschrieben. Dabei wurden die Zellen in jeweils 10 ml DZ-Medium in Petrischalen von 10 cm Durchmesser inkubiert. An Tag 3 und 5 wurden 10 ml frisches Medium (versetzt mit 100 ng GM-CFS) hinzugegeben und die so gewonnenen dendritischen Zellen an Tag 7-9 verwendet.

3.6.4. Vorinkubation Responder-/Stimulatorzellen und Kultur

Je nach gewünschter Kombination wurden entweder die Responder- oder die Stimulatorzellen mit 10 μM PPADS, 1 μM KN-62 oder Kulturmedium für drei Stunden vorinkubiert oder das Reagenz während der kompletten Kulturzeit direkt in die Wells zugegeben.

Insgesamt 2 x 10⁵ T-Zellen/Well wurden in flachbodigen 96-Well-Platten kultiviert und mit Splenozyten oder DZs im Verhältnis 1:1, 1:2 oder 1:10 stimuliert. Das Kulturmedium bestand aus RPMI 1640 ergänzt mit L-Glutamin (2 mM), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (0,1 mg/ml), 2-Mercaptoethanol (5 x 10⁻⁵M) und 10% fetalem Kalbserum. Nach 48 h Inkubation bei 37°C und 5% CO2 wurden die T-Zellen gesammelt und mittels FACS die CFSE-Konzentration gemessen.

3.7. Untersuchung des Einflusses von PPADS auf die T-Zell-Vitalität

Um den Einfluss von PPADS auf das Überleben zu untersuchen, wurden CD4⁺ T-Zellen bei 5% CO₂ und 37°C mit oder ohne PPADS in einer Konzentration von 2 x 10⁵ T-Zellen/ml Kulturmedium inkubiert. PPADS (10 μ M) wurde zu 2 x 10⁵ T-Zellen pro flachbodigem Well in 96-Well-Platten zugefügt. Der Anteil von apoptotischen (Annexin V/PI doppelt positiven) Zellen wurde 2, 4 und 6 h nach Exposition mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

3.7.1. Durchführung Annexin V/PI-Färbung

Für die Färbung mit Annexin V wurde im Wesentlichen nach Herstellerprotokoll (BD) vorgegangen:

- Entnahme von 250 μl aus jedem Ansatz, entsprechend 500.000 Zellen
- Zentrifugieren
- Aufnahme in eisgekühlten Annexin V binding buffer (5 x 10^5 Zellen in $100 \ \mu$ l)

- Zugabe von 1,5 µl Annexin V FITC
- Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss
- Zugabe von 100 μl binding buffer und 1 μl PI direkt vor Messung

3.8. Zytokin-Messungen

Die Spiegel von IL-6, IL-12, IL-10, MCP-1, TNF und IFN-γ wurden aus Serum oder Zellkulturüberstand mit dem FACS-basierten CBA Inflammation kit (BD, Deutschland) gemessen. Dabei wurde streng nach Herstellerprotokoll verfahren.

3.9. Durchflusszytometrische (FACS-) Analyse der P2X₇R-Expression auf humanen Zellen

100 µl humanes peripheres Blut wurden bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss für 20 min entweder mit anti-P2X₇R (extrazellulär) FITC-Ak (10 µl einer 0,1 µg/µl Lösung) bzw. IgG1 κ Isotyp Kontroll-FITC (5 µl, BD) inkubiert oder ungefärbt gelassen. Zu jedem Tube wurden außerdem CD14-APC (5 µl, BD) und CD45-APC-H7 (5 µl, BD) hinzugefügt. Nach Lyse der Erythrozyten (FACS lysing solution, BD) und einem zusätzlichen Waschschritt (CellWASH, BD) wurden die Monozyten (CD14⁺.) und Leukozyten insgesamt (CD45⁺) mit einem FACSanto II Durchflusszytometer (BD) auf P2X₇R-Expression untersucht. Die MFI-Werte (Mittlere Fluoreszenzintensität) für P2X₇R und IgG wurden um die Hintergrundfluoreszenz bereinigt, indem die MFI ungefärbter Zellen von ihnen subtrahiert wurde.

3.9.1. Gewinnung von mononukleären Zellen (MNZ) durch Ficoll-Paque-Isolierung

Um mononukleäre Zellen anzureichern, wurde frisch abgenommenes humanes Blut mit PBS verdünnt (1 ml Blut für 5 ml PBS) und vorsichtig auf eine Schicht von 5 ml Ficoll (Pancoll von PAN) pipettiert. Anschließend wurde für 20 min bei 2800 Umdrehungen ohne Bremse zentrifugiert. Durch dieses Standardverfahren (Lan et al. 2007) entstehen mehrere Schichten (siehe Abbildung).



Der Interphasenring mit den mononukleären Zellen wurde abgenommen und die Zellsuspension in einem neuen Röhrchen mit PBS gewaschen. Nach Abnahme des Überstandes erhält man eine hoch konzentrierte Suspension von mononukleären Zellen.

3.10. Statistische Analyse

Unterschiede im Überleben der Versuchstiere (Kaplan-Meier-Überlebens Kurven) wurden durch den "logrank"-Test analysiert. Für den Vergleich von Proliferation, konventionellen luc-transgenen T-Zellen, Zytokinen, mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI), Photonen/Sekunde, GvHD Histopathologie Scores und Quantitativer Realtime PCR wurde der "two tailed Student's t"-Test des arithmetischen Mittels verwendet. Ein p-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Freies ATP

4.1.1. Einführung

Um die Rolle purinerger Rezeptoren in Zusammengang mit GvHD zu untersuchen, sollte zunächst festgestellt werden, in welchem Ausmaß der Agonist an diesen Rezeptoren - das Adenosintriphosphat (ATP) - im Setting der Transplantation bzw. der akuten GvHD vorkommt. Extrazelluläres ATP wird von verletzten und nekrotischen Zellen freigesetzt (Di Virgilio 2005; Granstein et al. 2005).

4.1.2. Human: ATP-Spiegel in Aszites von GvHD-Patienten und nicht-GvHD-Patienten

Patienten nach alloHZT entwickeln häufig einen Aszites, zumeist im Rahmen einer Hypoalbuminämie. Unter der Hypothese, dass im Rahmen einer GvHD des Gastrointestinaltraktes intraperitoneal Zellen untergehen und eventuell vermehrt freies ATP im umgebenden Aszites zu finden sein könnte, wurden ATP-Spiegel im Aszites von verschiedenen Patienten bestimmt.

Zunächst wurde Aszites von Patienten gesammelt, die mit einer alloHZT behandelt worden waren und entweder eine GvHD entwickelten oder nicht. Zum Vergleich wurde Aszites von Patienten gesammelt, die keine alloHZT empfangen hatten und deren Aszites anderer Genese war (siehe Tabelle 1-1 bis 1-3 im Anhang für genaue Patientenbeschreibungen)

Abbildung 1a veranschaulicht, dass die ATP-Spiegel in der Peritonealflüssigkeit von Patienten mit aGvHD (Gruppenbezeichnung GvHD) signifikant höher sind als im Aszites von Patienten ohne GvHD. Die ATP-Spiegel im Aszites von Patienten nach alloHZT ohne aGvHD-Entwicklung (HZT) und von Patienten mit Aszites aus anderen Gründen (keine HZT) waren etwa gleich hoch.



Abbildung 1a: ATP Spiegel im Aszites

Es wurde Aszites gesammelt von drei Patientengruppen: Eine Gruppe hatte keine allogene Stammzelltransplantation erhalten (keine HZT). Die Patienten der Gruppe zwei hatten nach allogener Stammzelltransplantation Aszites ohne GvHD entwickelt (HZT), in der Gruppe drei waren Patienten mit Aszites und GvHD nach Transplantation zusammengefasst (GvHD). Jedes Symbol in der Abbildung bezeichnet einen Patienten, * markiert einen p-Wert < 0,01. Einzelheiten zu den Patienten in Tabelle 1 im Anhang.

4.1.3. Tiermodell: Einfluss von Bestrahlung auf ATP-Freisetzung

Im Mausmodell ist vor der Transplantation von Knochenmark eine induktive myeloablative Bestrahlung nötig, da bei einem intakten Empfängerimmunsystem die transplantierten Zellen abgestoßen werden und ein Anwachsen des allogenen Knochenmarks nicht möglich ist (Peffault de Latour et al. 2008). Es ist bekannt, dass ionisierende Strahlen zu DNA-Schäden führen. Da Zellen in der Ruhephase (G0-Phase) wesentlich weniger vulnerabel auf Strahlung reagieren als z.B. beim Übergang der G1 zur S-Phase (Johnson et al. 2010), sind insbesondere Gewebe mit schnell sich teilenden Zellen von Strahlenschäden betroffen. Dies sind in erster Linie die hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks, aber auch die sich ständig regenerierenden Epithelien des Gastrointestinaltraktes (Ong et al. 2010). Deshalb stand die Hypothese im Raum, dass es bei dem verwendeten Mausmodell bereits durch die induktive Bestrahlung noch vor alloHZT und GvHD zur Freisetzung von ATP aus geschädigten Zellen des Gastrointestinaltraktes kommen könnte.

Im zur Überprüfung dieser Hypothese durchgeführten Versuch (Abbildung 1b) wurden in der peritonealen Spülflüssigkeit von bestrahlten Mäusen (Gruppenbezeichnung GKB +) tatsächlich signifikant höhere ATP-Spiegel nachgewiesen als bei unbehandelten Tieren (GKB -).



Abbildung 1b: ATP-Spiegel in peritonealer Spülflüssigkeit bei Zustand nach Bestrahlung

Bei unbehandelten (-) oder Ganzkörperbestrahlten (+ GKB; 9 Gy γ-Bestrahlung 24h vor Peritoneallavage) Mäusen wurde mit 100 μl PBS eine Peritoneallavage durchgeführt und in der damit gewonnenen Peritonealflüssigkeit die ATP-Spiegel bestimmt. Jedes Symbol steht für eine Maus. Unbehandelte n=13, Bestrahlte n=16.

4.1.4. Tiermodell: Freies ATP nach allogener Stammzelltransplantation

Um die Lokalisation von freiem ATP nach alloHZT nachverfolgen zu können, wurden PME Zellen mit einer membranständigen Luziferase Mäusen in die Schwanzvene injiziert. Diese Zellen verteilen sich im ganzen Körper und senden nach Luziferingabe Photonen aus. Die hierfür nötige Oxidierung von Luziferin benötigt ATP als Energielieferant. Bei den meisten benutzten luc-transgenen Zellen befindet sich die Luziferase intrazellulär, wo genug ATP für die Reaktion zur Verfügung steht. Da sich die Luziferase der PME-Zellen an der Außenseite der Membran befindet, kann das intrazelluläre ATP nicht als Reaktionspartner wirken, so dass die Reaktion nur in Anwesenheit von freiem ATP möglich ist und dieses somit nachweisbar wird (Pellegatti et al. 2008). Freies ATP spricht wie oben beschrieben für Zelluntergang in dieser Körperregion, verursacht z.B. durch Trauma oder Entzündung. Aus Abbildung 1c und 1d wird ersichtlich, dass ATP nach Bestrahlung und Knochenmarktransplantation im Abdominalbereich extrazellulär akkumuliert und dieser Effekt früher und stärker auftritt, wenn zusätzlich auch die für die GvHD verantwortlichen T-Zellen gegeben werden. Ohne Bestrahlung oder Knochenmarktransplantation ist hingegen kein freies ATP nachweisbar. Das Signal im Schwanzbereich der Maus in der mittleren Spalte an Tag 2 weist auf freies ATP bzw. Zelluntergang in diesem Bereich hin, vermutlich verursacht durch eine traumatische Injektion.



Abbildung 1c: Lokalisation von freiem ATP nach Knochenmarktransplantation PME luc⁺ Reporterzellen zum Nachweis von freiem ATP wurden Mäusen intravenös verabreicht. Diese waren entweder unbehandelt (linke Spalte, "PME+"), bestrahlt und knochenmarktransplantiert ohne T-Zellen ("PME+, KMT+") oder mit T-Zellen ("PME+, KMT+, TZ+"). An verschiedenen Tagen wurden die Mäuse mit der Bioluminiszenzkamera untersucht.

Das Photonensignal ist proportional zur Menge des freien ATPs und wurde auch quantitativ ausgewertet. Hierbei wurden signifikant höhere Werte in der GvHD-Gruppe ("KM + TZ") gefunden, verglichen mit der Gruppe ohne T-Zellgabe (siehe Abbildung 1d).



Abbildung 1d: Quantifizierung der Photonen

Bei jedem Imaging wurden die Photonen quantitativ erfasst und die Kurvenverläufe für die verschiedenen Gruppen erstellt. Mit * sind signifikante Unterschiede zwischen den Kurven KM (nur Knochenmarkgabe) und KM+TZ (Knochenmark und T-Zellgabe) bezeichnet, die einen p-Wert <0,05 haben.

Um die Freisetzung von ATP gezielt in dem GvHD-Zielorgan Darm untersuchen zu können, wurden Mäuse aus den oben beschriebenen Gruppen an Tag 10 geopfert und sofort ein Biolumineszenz-Imaging der isolierten Gastrointestinalregion durchgeführt. Hierbei bestätigte sich, dass in den Gruppen nach Bestrahlung und Knochenmarktransplantation sowie insbesondere nach zusätzlicher T-Zellgabe (also bei GvHD-Entwicklung) im Bereich der Darmwand und der mesenterialen Lymphknoten extrazelluläres ATP vorhanden ist (Abbildung e).



Abbildung 1e: Ex vivo Imaging der Gastrointestinalregion zur Detektion von freiem ATP

PME luc⁺ Reporterzellen wurden Mäusen intravenös verabreicht. Diese waren entweder unbehandelt (linke Spalte, "PME"), bestrahlt und Knochenmarktransplantiert ohne T-Zellen ("KM + PME") oder mit T-Zellen ("KM/TZ + PME"). An Tag 10 erfolgte das ex vivo Imaging.

4.2. Einfluss von unspezifischer P2X-Rezeptor-Blockade auf GvHD im Tiermodell

4.2.1. Einführung

Mit PPADS steht ein Reagenz zur Verfügung, mit dem die Rezeptorfamilie P2X breit blockiert werden kann (Lambrecht et al. 1992). Um den Einfluss dieser Blockade auf das Überleben und den Schweregrad der GvHD zu untersuchen, wurden Mäuse nach zwei vorbeschriebenen (Zeiser et al. 2006) Modellen transplantiert. Die Gruppenbezeichnungen in diesem Kapitel bedeuten:

КМ	Tiere wurden bestrahlt und Knochenmark injiziert, ohne die bei Mäusen zur Induktion einer GvHD zusätzlich nötigen CD4+ T-Zellen.	Schwarze Linie
PBS	Tiere wurden bestrahlt, Knochenmark und T-Zellen zur GvHD-Induktion injiziert und anschließend über 10 Tage jeweils 100 μ l PBS intraperitoneal appliziert.	Blaue Linie
PPADS	Tiere wurden bestrahlt, Knochenmark und T-Zellen zur GvHD-Induktion injiziert und anschließend über 10 Tage 10 μ M PPADS in 100 μ l PBS intraperitoneal appliziert.	Rote Linie

4.2.2. Überleben

Bei den zwei untersuchten Transplantationsmodellen handelt es sich jeweils um major-mismatch Kombinationen, weshalb die Allogenität so aggressiv ist, dass zuverlässig eine GvHD induziert werden konnte, die sich klinisch durch Lethargie, Anorexie, Diarrhoe sowie Veränderungen des Fells (Struppigkeit) zeigte.

Bei ausschließlicher Gabe von Knochenmark ohne T-Zellen erkranken die Tiere nicht an einer GvHD, da im Knochenmark von Mäusen nicht genug zytotoxische T-Zellen vorhanden sind (Zeiser et al. 2006). Es überlebten 100%, was anzeigt, dass die Knochenmarktransplantation funktionierte und das Versterben der anderen Tiere tatsächlich an T-Zelleffekten liegt und nicht etwa an einem mangelhaften Anwachsen des Transplantats. Zuvor war mit einzelnen Mäusen bestätigt worden, dass die Bestrahlungsdosis zur Myeloablation ausreicht: Wenn nach Bestrahlung kein Ersatzknochenmark transplantiert wurde, verstarben diese Tiere innerhalb weniger Tage (Daten nicht gezeigt).

Bei Transplantation von Knochenmark und T-Zellen reduzierte sich die Überlebenszeit deutlich. Mit PBS (als Plazebo) behandelte Tiere starben in beiden Modellen zwischen Tag 6 und Tag 40 an GvHD. Bei intraperitonealer Applikation von PPADS verbesserte sich das Überleben:

Sowohl im Modell A (FVB/N \rightarrow BALB/c,) als auch im Modell B (C57Bl/6 \rightarrow BALB/c) war der Unterschied im Überleben zwischen den mit PPADS behandelten Tieren (Rote Linie) und den nur mit PBS behandelten (Blaue Linie) Tieren signifikant (p=0,010 im Modell A, p=0,04 im Modell B)



Abbildung 2a: Kaplan-Maierkurven des Überlebens nach alloHZT Mäuse erhielten nach myeloablativer Bestrahlung entweder nur Knochenmark ("KM") oder Knochenmark und T-Zellen zur Induktion einer GvHD. Diesen Mäusen wurde über 10 Tage entweder 10 μM PPADS in 100 μl PBS ("PPADS") oder nur PBS ("PBS") intraperitoneal injiziert. In Klammern ist jeweils die Zahl der entsprechend behandelten Tiere genannt.

Bei Mäusen, bei denen die PPADS-Injektionen erst ab Tag 6 begonnen wurden, konnte die verbesserte Überlebensdauer nicht festgestellt werden, so dass ATP-Effekte offensichtlich vor allem in der frühen Phase der GvHD eine Rolle spielen.

4.2.3. T-Zellproliferation

Um die Proliferation und Lokalisation von T-Zellen nach alloHZT in vivo nachverfolgen zu können, wurden für diese Untersuchungen Wildtyp Knochenmarkzellen (C57Bl/6) auf bestrahlte Empfänger (BALB/c) übertragen und zusätzlich luc-transgene T-Zellen injiziert. So konnte nach dem im Methodenteil beschriebenen Verfahren die Lokalisation und anhand der quantitativen Photonenauswertung auch die Proliferation der T-Zellen bestimmt werden.

Für diesen Versuch wurde den Mäusen wiederum entweder nur Knochenmark (Gruppenbezeichnung "BMT") oder zusätzlich die luc-transgenen CD4+ T-Zellen transplantiert. Den T-Zell-Empfängern wurde entweder PBS ("Tc PBS") oder PPADS ("Tc PPADS i.p.") über 10 Tage intraperitoneal injiziert, oder die T-Zellen vor Transplantation über 3 h mit 10 µM PPADS vorinkubiert ("PPADS praeincub"). Nur mit PBS behandelte Mäuse zeigen hierbei ein mit der Zeit ansteigendes Signal vor allem im Abdominalbereich sowie in den lymphatischen Organen Milz und Lymphknoten (Abbildung 2b). Mit PPADS behandelte Mäuse präsentieren im Vergleich hierzu ein deutlich schwächeres Signal und haben demnach an den entsprechenden Stellen auch weniger T-Zellen. Dieser Unterschied ist insbesondere in den frühen Aufnahmen (Tag 3 und Tag 5) deutlich und wurde in der quantitativen Auswertung der Photonenemission bestätigt (hier nicht gezeigt). Empfängertiere von Knochenmark ohne T-Zellen haben verständlicherweise kein Signal, da nur die T-Zellen von luc-transgenen Spendern entnommen wurden, während das Knochenmark aus Wildtyp-Spendern stammt. Bei einigen Mäusen kann man bei den letzten Aufnahmen vor Versterben eine Abschwächung des Signals feststellen. Es ist dabei nicht von einer Verringerung der T-Zellmenge auszugehen, sondern eher von einer Verlangsamung von Körperfunktionen und -kreislauf bei den stark geschwächten Tieren, so dass die Verteilung und der Metabolismus des Luziferin bei ausgeprägtem Krankheitszustand verändert ist und die Signalintensität nicht mehr optimal mit der Anzahl der luc⁺ Zellen (hier den T-Zellen) korreliert.



Abbildung 2b: T-Zellproliferation und Lokalisation nach alloHZT

Mäusen wurde nach Bestrahlung entweder nur Knochenmark ("BMT") verabreicht oder zusätzlich Luziferase-transgene T-Zellen. Diese T-Zellen waren entweder für 3h mit dem breiten P2X-Rezeptorblocker vorbehandelt worden ("Tc PPADS praeincub.") oder den Empfängermäusen wurde über 10 Tage PPADS (10 µM in 100 µl PBS – "Tc PPADS i.p.") oder nur 100 µl PBS ("Tc PBS") intraperitoneal injiziert. Biolumineszenz-Imaging erfolgte wie im Methodenteil beschrieben zu verschiedenen Zeitpunkten.

4.2.4. Histopathologische Graduierung der GvHD

Um den Schweregrad der aufgetretenen akuten GvHD einzuschätzen, wurden wie im Methodenteil erläutert Gefrierschnitte von Frau Dr. Gerlach aus dem pathologischen Institut der Universität Freiburg ausgewertet (Abbildung 2c). Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die Blockade von P2X-Rezeptoren mit PPADS gemessen am Entzündungs- und Apoptosegrad eine signifikante Reduktion der akuten GvHD-Aktivität nach sich zieht.



Abbildung 2c: Histopathologische Auswertung der akuten GvHD

Die gezeigten Daten sind gepoolt aus drei Experimenten. Es wurde nach dem im Methodenteil beschriebenen Score graduiert. Links: Grad der Entzündung. Rechts: Apoptose-Score

Dennoch wurde bei Beobachtung der überlebenden Tiere deutlich, dass auch die mit PPADS behandelten Tiere nicht unbeeinträchtigt von der T-Zellgabe blieben. Langzeitüberleber (siehe Abbildung 2a) zeigten deutliche Veränderungen des Fells bis hin zum Ausfall ganzer Haarbüschel. Dies sind Zeichen einer chronischen GvHD (Zhang et al. 2006). Um auch diese Folgeerkrankung der alloHZT objektivieren zu können, wurden Langzeitüberleber an Tag 85 geopfert und Hautbiopsien histologisch untersucht. Für diese Auswertung kamen nur Mäuse aus den Gruppen mit einfacher Knochenmarktransplantation ohne T-Zellgabe bzw. mit T-Zellgabe und PPADS-Behandlung in Frage, da in der Kontrollgruppe (mit PBS behandelt) keine Maus diesen Zeitpunkt nach Transplantation erlebte.

Es zeigte sich bei den Mäusen ohne T-Zellgabe eine intakte Haut mit Haarfollikeln (siehe Abbildung 2d, links). Im Vergleichsschnitt einer mit T-Zellen und PPADS behandelten Maus sieht man einen Verlust solcher Haarfollikel. Im rechten Teil der Abbildung 2d wurden der Schweregrad der chronischen GvHD nach einem Score bestehend aus 5 Parametern eingeteilt: Epidermale Atrophie, Verlust von Fett und Haarfollikeln, erhöhte Kollagendichte in der Dermis sowie Entzündung. Auch hier sieht man eine deutlich erhöhte Aktivität einer chronischen GvHD in der Gruppe mit T-Zellen und PPADS-Behandlung verglichen mit der Kontrollgruppe, welche nur Knochenmark erhielt.



Abbildung 2d: Histopathologische Einteilung der chronischen GvHD

Hautbiopsien wurden an Tag 85 nach Transplantation entnommen.

Links: * kennzeichnet Haarfollikel in der intakten Haut einer Maus, welche eine Knochenmarktransplantation ohne zusätzliche T-Zellgabe unterzogen worden war. Darunter ein Vergleichsschnitt einer Maus, die zusätzlich mit T-Zellen und PPADS-Gabe behandelt worden war.

Rechts: Vergleich der chronischen GvHD-Aktivität mit einem Score. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert.

4.3. Einfluss medikamentöser P2XR-Blockade auf alloantigen stimulierte T-Zell-Proliferation, Apoptoserate sowie MCP-1 und IFN-γ-Sekretion in vitro

4.3.1. Einführung

Um die alloantigene Situation der major-mismatch-Transplantation in vitro nachzustellen, wurde wie im Methodenteil beschrieben ein Lymphozytenstimulationsmodell (Mixed lymphocyte reaction) benutzt: CD4+- Zellen aus Milzen von C57Bl/6-Mäusen wurden per MACS angereichert und für 96 Stunden mit BMDZ (Bone marrow derived dendritic cells) von BALB/c-Mäusen als Stimulatorzellen koinkubiert. Dabei wurden die Verhältnisse CD4+-Responder : BMDZ Stimulatorzellen 1:1 sowie 1:2 benutzt. PPADS wurde in den entsprechenden Gruppen direkt der Kultur beigefügt. Um eine Proliferation der Stimulatorzellen auszuschließen, wurden diese vor Inkubation bestrahlt.

4.3.2. T-Zellproliferation und Apoptose

Zur Untersuchung der T-Zellproliferation mit dem beschriebenen Prinzip wurden die T-Zellen vor der Inkubation mit den Stimulatorzellen mit CFSE gefärbt und die Zellen nach 96 Stunden Koinkubation per FACS untersucht. Die CFSE-Fluoreszenzintensität einer Zelle schwächt sich bei Teilung dieser Zelle in jeder Tochtergeneration weiter ab, so dass eine größere Anzahl von Intensitätsgipfeln und ein abgeschwächtes Signal auf Proliferation schließen lassen. In Abbildung 3a sieht man insbesondere in der nicht mit PPADS behandelten Gruppe bei Stimulation mit der doppelten Anzahl BMDZ zwei hohe Gipfel mit sehr schwacher CFSE-Intensität. Dies spricht für einen sehr hohen Anteil an proliferierten CD4⁺⁻ Zellen, während in der mit PPADS koinkubierten Gruppe deutlich weniger Proliferation zu sehen ist.



Abbildung 3a: Proliferation und Apoptoseverhalten von T-Zellen nach Stimulation mit BMDZ und PPADS-Blockade Links: Im Ansatz für die oberen Reihen waren CFSE-gefärbte CD4+-Zellen von C57Bl/6-Mäusen für 96 Stunden mit bestrahlten BMDZ von BALB/c-Mäusen im Verhältnis 1:1 und 1:2 in Kulturmedium inkubiert worden. Unten wurde zusätzlich PPADS (10 μM) zur Blockade der P2X-Rezeptoren in das Kulturmedium gegeben. Die CFSE-Fluoreszenzintensität ist nach rechts aufgetragen, eine hohe Intensität spricht für geringe Proliferation, da in jeder Tochtergeneration ein schwächeres Signal zu erwarten ist. **Rechts:** T-Zellen (C57Bl/6) wurden für 96 Stunden mit der gleichen Anzahl bestrahlter Splenozyten von BALB/c-Mäusen inkubiert und anschließend der Anteil apoptotischer Zellen mit Annexin V/PI bestimmt. Als apoptotisch wurden doppelt positive Zellen angesehen.

Um auszuschließen, dass die verminderte Proliferation der T-Zellen durch eine erhöhte Apoptoserate bei PPADS-Exposition verursacht ist, wurden Zellen aus einem ähnlichen Ansatz (T-Zellstimulation mit allogenen Splenozyten) mit einer Annexin-PI-Färbung auf ihr Apoptoseverhalten untersucht. Dabei wurde kein Unterschied zwischen PPADS exponierten und nicht exponierten Zellen gefunden. Somit ist die verminderte Proliferation nicht auf zytotoxische Effekte durch das PPADS, sondern am ehesten auf anerge Effekte der P2X-Blockade zurückzuführen.

4.3.3. Zytokinspiegel

MCP-1 und IFN- γ sind beide als proinflammatorische Zytokine bekannt: MCP-1 wurde unter anderem als Aktivator der systemischen Entzündung bei alveolärer Hypoxie beschrieben (Chao et al. 2010). Die Rolle von IFN- γ im Rahmen der GvHD und der Überlebensvorteil bei Unterdrückung seiner Ausschüttung ist ebenfalls bekannt (Park et al. 2010).

Der Einfluss von PPADS auf die Konzentration dieser beiden Zytokine ist daher von großem Interesse. Für die Messung wurde ein Lymphozytenstimulationsmodell wie oben beschrieben genutzt und nach 48 Stunden die Zytokinspiegel im Überstand gemessen. Für beide Zytokine fanden sich unter Blockade der P2X-Rezeptoren mit PPADS signifikant niedrigere Konzentrationen.



Abbildung 3b: Einfluss von PPADS auf die Zytokinproduktion

Es wurden CD4+-Zellen für 48 Stunden mit bestrahlten BMDZ in reinem Kulturmedium oder Medium plus PPADS inkubiert. Die Zytokinspiegel für MCP-1 (links) und IFN-γ (rechts) im Überstand wurden anschließend mit dem Mouse inflammation kit (siehe Methoden) gemessen und in pg/ml aufgetragen

4.4. Einfluss der P2X-Blockade auf den Graft-versus-Tumor Effekt im Mausmodell

4.4.1. Einführung

Spender T-Zellen (insbesondere CD8⁺) sind nicht nur für die gravierende Nebenwirkung GvHD verantwortlich, sondern auch für den gewünschten Graft-versus-Tumor Effekt (Ringden et al. 2009), d.h. nach Chemotherapie verbliebene Tumorzellen werden von den zytotoxischen Spender T-Zellen als Fremdantigen bekämpft und das Risiko eines Rezidivs somit minimiert. Bei früheren Versuchen, die GvHD z.B. durch Transplantation von T-Zell-depletiertem Knochenmark oder starke Immunsuppression zu verhindern, zeigte sich eine Abschwächung des GvT-Effekts mit entsprechender Verschlechterung der Gesamtmortalität (Kolb 2008). Bei Manipulationen an der T-Zellwirkung ist daher neben der Änderung der GvHD-Aktivität auch der GvT-Effekt ein wichtiger Untersuchungsparameter.

4.4.2. Proliferation bzw. Abstoßung von Tumorzellen

Dafür wurden Mäusen nach Bestrahlung und Knochenmarktransplantation A20 luc⁺ B-Zell-Lymphomzellen injiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Lokalisation und Proliferation der Lymphomzellen per BLI bestimmt. Hierbei zeigt sich wie erwartet, dass das Lymphom in Mäusen ohne zusätzliche T-Zellgabe ("KM + A20") insbesondere im Bereich der zervikalen und inguinalen Lymphknoten anwächst und es zu einer Progredienz der Signalintensität (entsprechend der Proliferation) kommt (Abbildung 4a, 4b).



Abbildung 4a: Einfluss von P2X-Rezeptorblockade auf Graft-versus-Tumor-Effekt Es wurde wie im Methodenteil beschrieben eine Knochenmarktransplantation vorgenommen (C57Bl/6 \rightarrow BALB/c). An Tag 0 nach Bestrahlung wurden 5 x 10⁵ A20 luc⁺ Lymphomzellen und Knochenmarkzellen i.v. injiziert. In einer Gruppe ("KM + A20") wurden keine zusätzlichen T-Zellen gegeben, während in den beiden anderen Gruppen zusätzliche T-Zellen (3 x 10e5) an Tag 3 gegeben und die Mäuse entweder über 10 Tage mit PBS ("TZ + PBS") oder PPADS ("TZ + PPADS") i.p. behandelt wurden. Die repräsentative BLI an Tag 7 und Tag 14 zeigt das Tumorwachstum.

Bei zusätzlicher T-Zellgabe ("TZ + PBS") sieht man an Tag 7 zunächst ein Anwachsen des Lymphoms, welches an Tag 12 optisch nicht mehr detektierbar ist (Abb. 4a), d.h. es kommt zu einer Abstoßung des Tumors. Den gleichen Verlauf sieht man bei zusätzlicher Behandlung mit PPADS i.p. über 10 Tage (TZ + PPADS). Bei alleiniger T-Zellgabe (mittlere Spalte) erscheint das Fell an Tag 14 allerdings deutlich

struppiger als bei der PPADS-Maus, ein Hinweis auf den schlechten Zustand der Maus durch die beginnende GvHD.

Auch in der quantitativen Auswertung der emittierten Photonen (Abb. 4b) sieht man in den Gruppen mit T-Zellgabe nach einem initialen Signalanstieg (= Tumorproliferation) eine Abschwächung des Signals bis auf das Niveau einer Maus ohne A20 luc⁺ Zellen (KM), welche zur Messung der Hintergrundstrahlung eingesetzt wurde. Hierbei ist kein Unterschied im Signalverlauf für die Gruppe mit T-Zellgabe und der Gruppe mit zusätzlicher PPADS-Behandlung zu sehen. Nur in der Gruppe mit A20-Zellen und Knochenmark ohne T-Zelltransplantation wächst das Lymphom an und proliferiert bis zum Versterben der Tiere.



Abbildung 4b: Einfluss von PPADS auf GvT-Effekt

Die Tumorproliferation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten per BLI gemessen. Hier sieht man die Signalstärke in Photonen/Sekunde/Maus. Es wurden die Daten von 2 verschiedenen Experimenten kombiniert. Es wurden BALB/c Mäuse in folgenden Gruppen untersucht: Bestrahlung und Knochenmarktransplantation (KM), zusätzliche A20 luc⁺ Gabe (KM + A20) oder zusätzliche TZ-Gabe (A20 + TZ + PBS). A20 + TZ + PPADS bezeichnet die Gruppe, die zusätzlich noch mit PPADS behandelt wurde.

4.4.3. Überleben

Beim Überleben der Mäuse in den unterschiedlichen Gruppen sieht man, dass Mäuse nach





Knochenmarktransplantation und A20-Gabe schnell versterben (Abb. 4c, schwarze Kurve). Bei zusätzlicher Gabe von T-Zellen (blaue Kurve) gelingt die Tumorabstoßung (siehe oben, Abb. 4a+b), allerdings starben die Tiere ebenfalls rasch mit klinischen Zeichen einer akuten GvHD (Lethargie, struppiges Fell, Durchfall). In der Gruppe der mit PPADS behandelten Tiere (rote Kurve) überlebt ein großer Teil der Mäuse länger, verglichen mit der Tc + PBS-Gruppe ist die Verlängerung mit einem p-Wert von 0,024 signifikant.

Als Kontrolle, ob die Knochenmarktransplantation funktioniert, wurden zusätzlich Mäuse bestrahlt und nur mit MHC differenten Knochenmark transplantiert. Diese Tiere überleben alle (grüne Kurve).

4.5. Einfluss von aGvHD auf die Expression von P2X₇R auf RNA- und Proteinebene

4.5.1. Einführung

Insbesondere von dem P2X₇-Rezeptor ist bekannt, dass seine Aktivierung mit ATP zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen führt (Ferrari et al. 2006; Lister et al. 2007) und Mäuse mit einer genetischen Defizienz für diesen Rezeptor (Knockout-Mäuse) eine veränderte Zytokinproduktion haben (Solle et al. 2001). Deshalb sollten nach den oben vorgestellten Versuchen zur breiten Blockade der P2X-Rezeptorfamilie mit PPADS nun gezielt die Auswirkungen einer selektiven Blockade des P2X₇-Rezeptors untersucht werden.

4.5.2. Expression des P2X₇-Rezeptors (murin)

Die Expression des P2X₇-Rezeptors wurde wie im Methodenteil beschrieben in Leber, Lunge, Milz und Thymus gemessen. Die Unterschiede in der Expression wurden bei unbehandelten, ausschließlich mit Bestrahlung und Knochenmarkzellen behandelten Tieren sowie GvHD-Tieren (Induktion durch zusätzliche T-Zellgabe) bestimmt. Hierfür wurde wie oben beschrieben das GvHD-Modell C57Bl/6 \rightarrow BALB/c benutzt und die Organe an Tag 8 nach Transplantation entnommen, homogenisiert und entweder die RNA-Menge des Rezeptors mit quantitativer PCR bestimmt, oder das Protein selbst in Organschnitten immunhistochemisch angefärbt.

In Abbildung 5a ist gezeigt, dass die RNA-Menge für den P2X₇-Rezeptor in den untersuchten Homogenisaten aus Tieren mit aGvHD (KM + TZ) jeweils deutlich höher ist als in Tieren nach Knochenmarktransplantation ohne T-Zellgabe (KM). Bei komplett unbehandelten Tieren (Unbehandelt) sind die RNA-Mengen etwa gleich hoch wie in der Knochenmarkgruppe. Dies trifft nicht für den Thymus zu, wo die RNA-Menge bei unbehandelten Tieren signifikant niedriger ist als bei den Tieren, die eine Knochenmarktransplantion erhalten hatten.



Abbildung 5a: Einfluss von aGvHD auf die Expression von P2X₇R-RNA Am 8. Tag nach Knochenmarktransplantation wurden die Organe entnommen, homogenisiert und mit quantitativer PCR die RNA-Mengen bestimmt. Ein * bezeichnet signifikante Unterschiede (p-Wert < 0,05), NS bedeutet "nicht signifikant". Untersucht wurden Organe aus unbehandelten (Unbehandelt), nach Bestrahlung Knochenmarktransplantierten (KM) und von zusätzlich mit T-Zellen behandelten GvHD-Tieren (KM + TZ).

Auch immunhistochemisch konnte eine erhöhte Expression von P2X₇-Rezeptorprotein in an GvHD erkrankten Mäusen nachgewiesen werden. In Abbildung 5b sind Schnitte aus dem Kolon und der Leber von GvHD-Tieren (KM + TZ, untere Reihe) und ausschließlich mit Knochenmark transplantierten Mäusen ohne GvHD (KM, obere Reihe) gezeigt. Die Färbung für den P2X₇-Rezeptor erfolgte wie im Methodenteil beschrieben und zeigt sich rot. In den GvHD-Tieren sieht man eine deutlich verstärkte Anfärbung.



50 µm

Abbildung 5b: Immunhistochemischer Nachweis von P2X7R-Protein

Links sieht man Schnitte aus dem Kolon von Knochenmarktransplantierten Tieren (KM, oben) und zusätzlich mit T-Zellen behandelten Tieren (KM + TZ, unten), rechts Schnitte aus der Leber der gleichen Tiere. Immunhistochemisch wurde der P2X₇-Rezeptor (Rot, alkalische Phosphatase) gefärbt, eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Die Aufnahmen erfolgten bei einer Vergrößerung von 500x.

4.5.3. Expression des P2X₇-Rezeptors (human)

Auch humane Zellen wurden auf die P2X₇R-Expression untersucht. Hierfür wurden PBMZ (Periphere Monozytäre Zellen aus dem Blut) von gesunden Spendern (healthy), von Patienten nach alloHZT ohne Entwicklung einer GvHD (HCT) oder mit Entwicklung einer GvHD (GvHD) benutzt. Die Zellen wurden durch Ficoll-Paque-Isolation aus dem Blut gewonnen (siehe Methoden). Die RNA-Bestimmung für den P2X₇-Rezeptor ergab eine signifikant erhöhte Expression in den Zellen von an GvHD erkrankten Patienten, während sie bei transplantierten Patienten ohne GvHD etwa so hoch war wie bei gesunden Spendern (Abbildung 5c).



Abbildung 5c: Expression von P2X₇R-RNA in humanen Zellen Aus dem Blut von gesunden Spendern (healthy), und alloHZ-transplantierten Patienten mit (GvHD) oder ohne GvHD (HCT) wurden mononukleäre Zellen gewonnen und die RNA-Expression für den P2X₇-Rezeptor mit quantitativer PCR gemessen. Jede Markierung

repräsentiert einen Patienten/Spender. Einzelheiten zu den Patienten sind im Anhang zu finden (Tabelle 2-1 und 2-2)

4.6. Einfluss von P2X7-Defizienz bzw. –Blockade auf GvHD

4.6.1. Einführung

Um den Einfluss des P2X₇-Rezeptors auf die Entwicklung und den Schweregrad einer GvHD zu untersuchen, wurden P2X₇R-/--Tiere (= Mäuse mit einer genetischen Defizienz für diesen Rezeptor) als Spender oder Empfänger für Transplantationsversuche wie oben beschrieben benutzt bzw. der Rezeptor mit dem spezifischen Blocker KN-62 medikamentös ausgeschaltet. Dabei wurde analog zur breiten P2XR-Blockade (mit PPADS, siehe oben) 1 μ M KN-62 über 10 Tage nach alloHZT täglich intraperitoneal appliziert.

4.6.2. Überleben

In Abbildung 6a wird ersichtlich, dass P2X₇R-Defizienz auf Empfängerseite im Vergleich zu Wildtyp-Empfängern zu einem signifikant verlängertem Überleben führt (p-Wert = 0,032). Ebenso verlängert sich das Überleben bei medikamentöser Blockade des P2X₇R (p-Wert = 0,024). P2X₇-Defizienz in den Spender T-Zellen führt hingegen zu einem schnelleren Versterben der Tiere.



Abbildung 6a: Einfluss von P2X7-Defizienz bzw. -Blockade auf das Überleben nach alloHZT

Nach Bestrahlung wurde Knochenmark von BALB/c auf C57Bl/6-Wildtyp-Mäuse transplantiert (KM) und zusätzlich T-Zellen von Wildtyp-Mäusen i.v. injiziert und die Mäuse entweder nur nachbeobachtet (Empfänger wt) oder ihnen über 10 Tage je 1 µM KN-62 zur medikamentösen Blockade des P2X₇-Rezeptors i.p. verabreicht (KN-62 i.p.). Alternativ wurden T-Zellen von P2X₇-defizienten Spendermäusern gegeben (Spender P2X₇R-/-). Umgekehrt wurde auch die Kombination von Knochenmarktransplantation und Wildtyp T-Zellen auf P2X₇-defiziente Empfänger getestet (Empfänger P2X₇R-/-). In Klammern ist die Anzahl der Tiere in den jeweiligen Gruppen angegeben.

4.6.3. Histopathologische Graduierung der GvHD

Die histopathologische Auswertung erfolgte mit dem gleichen score wie oben. Der Schweregrad der GvHD in den GvHD-Zielorganen Leber, Dünndarm und Kolon ist bei P2X₇R^{-/-}-Empfängern signifikant niedriger als bei Wildtypempfängern (siehe Abbildung 6b).



Abbildung 6b: Histopathologischer Schweregrad der GvHD bei Wildtyp- und P2X₇-defizienten Empfängern Gepoolte Auswertung der GvHD-Zielorgane Leber, Dünndarm und Kolon.

5. Diskussion

5.1. ATP als danger signal

Die Rolle von ATP als danger signal ist in einer Vielzahl von Modellen beschrieben worden. So zeigten Cintra-Francischinelli et al. 2010, dass die Freisetzung von ATP nach Schlangenbissen über purinerge Rezeptoren zu einer Amplifikation des Zellschadens sowie einer verstärkten Schmerzreaktion führt.

Yilmaz et al. 2010 wiesen nach, dass die Aktivierung des Nalp3-Inflammasoms und damit die Entzündungsreaktion bei gingivalen Infektionen mit Porphyromonas gingivalis ATP-abhängig ist. Dieser Zusammenhang ist auch von Latz 2010 publiziert worden.

Bours et al. 2006 konnte dokumentierten, dass purinerge Signale, insbesondere vermittelt durch ATP und sein Abbauprodukt Adenosin, eine Vielzahl von immunstimulierenden und –regulatorischen Effekten hervorrufen können. Hanley et al. 2004 beschrieben die verstärkte Produktion des proinflammatorischen Zytokins Il-6 durch Makrophagen bei erhöhten extrazellulären Konzentrationen von ATP.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen einen Einfluss von ATP auch auf die Entwicklung einer GvHD nach allogener Knochenmarktransplantation nahe. Es wurde gezeigt, dass aus verletzten oder nekrotischen Zellen (Di Virgilio 2005; Granstein et al. 2005) freigesetztes ATP in der Peritonealflüssigkeit von GvHD-Patienten im Vergleich zu Patienten ohne GvHD akkumuliert und im Mausmodell wurde deutlich, dass bereits die zur Myeloablation nötige Induktionstherapie mit ionisierender Strahlung zu erhöhten ATP-Leveln in der Peritonealflüssigkeit führt. Zusätzlich konnte in Mäusen mit experimentell induzierter GvHD nach alloHZT mit Hilfe von Detektionszellen mit einer plasmamembranständigen Luziferase eine Akkumulation von ATP vor allem im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Bei Knochenmarktransplantation ohne zusätzliche T-Zellgabe fiel die ATP-Freisetzung deutlicher schwächer aus, so dass anzunehmen ist, dass ein kleiner Teil des Zellschadens durch die Bestrahlung hervorgerufen wird, der Hauptanteil allerdings erst durch die Alloreaktivität (nach T-Zellgabe) verursacht wird. Das heißt, dass einerseits bereits die Induktionstherapie mit der Freisetzung von ATP aus geschädigten Zellen (hier des Epithels des Gastrointestinaltraktes) ein Ausgangspunkt von ATP-vermittelten Effekten sein könnte, andererseits aber eine weitaus größere ATP-Freisetzung stattfindet, wenn epitheliale Zellen das Ziel allogener Effektorzellen werden. Dieses ATP könnte als Trigger für eine Entzündungsreaktion wirken bzw. eine beginnende Entzündungsreaktion unterhalten oder verstärken im Sinne einer positiven Rückkopplung.

Es ist bekannt, dass für die Entwicklung der GvHD im Darm pathogenetisch vorrangig lymphatisches Gewebe verantwortlich ist (Anderson et al. 2008; Hill und Ferrara 2000). Hierbei spielt unter anderem die Interaktion von aktivierten APZ und Spender T-Zellen eine Rolle. Räumlich gesehen scheint die ATP-Freisetzung genau in dieser Mikroumgebung stattzufinden, was als weiterer Hinweis auf die Wichtigkeit von ATP für diese Vorgänge gewertet werden kann.

Die erhöhten ATP-Spiegel wurden in zwei verschiedenen GvHD Mausmodellen gefunden und waren somit nicht modellabhängig.

5.2. Blockade von P2-Rezeptoren

5.2.1. Rolle von purinergen Rezeptoren

Es ist aus verschiedenen Krankheitsmodellen bekannt, dass purinerge Rezeptoren proinflammatorische Effekte vermitteln können. D'Ambrosi et al. 2009 stellten eine Hochregulation von purinergen Rezeptoren im Zusammenhang mit der amyotrophischen Lateralsklerose fest, welche zu vermehrter Zytotoxizität mit anschließendem Untergang von neuronalen Zelllinien führte. Insbesondere der P2X₇-Rezeptor ist als Vermittler von z.T. pathologischen Entzündungsgeschehen bekannt, so z.B. als Stimulator von aktivierten natürlichen Killerzellen bei der Autoimmunhepatitis (Kawamura et al. 2006). Ferrari et al. 2006 beschrieben die Rolle des P2X₇-Rezeptors für die Produktion des proinflamatorischen Zytokins Il-1beta und Idzko et al. 2007 dokumentierten den Einfluss von P2-Rezeptoren auf die Entzündungsprozesse bei allergischem Asthma. In den nachstehend diskutierten Experimenten wurde der Einfluss der Breitspektrumblockade von P2-Rezeptoren und der spezifischen P2X₇R-Blockade auf die aGvHD untersucht.

5.2.2. In vivo:

Per Biolumineszenz wurden Unterschiede in der Proliferation Luc-transgener T-Zellen gefunden. Dabei zeigt sich bei nur mit PBS behandelten Tieren eine frühere und deutlichere T-Zellproliferation als in den mit dem Breitspektrumblocker PPADS behandelten Gruppen. Offensichtlich hat PPADS also vor allem in der frühen Phase der GvHD-Entwicklung einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von CD4⁺ Zellen. Dass die ATP-Effekte vor allem in der Frühphase der Krankheit zum Tragen kommen, bestätigt sich auch dadurch, dass keine Verbesserung der Überlebensdauer festgestellt werden konnte, wenn mit den PPADS-Injektionen erst ab Tag 6 begonnen wurde.

Bei der histopathologischen Auswertung zeigte sich eine verminderte Aktivität von akuter GvHD, wenn die P2X-Rezeptoren durch PPADS blockiert wurden. Allerdings entwickelten Langzeitüberleber aus der PPADS-Gruppe Zeichen einer chronischen GvHD der Haut. Dies und auch die Tatsache, dass trotz insgesamt verlängertem Überleben die meisten Tiere dennoch versterben, spricht dafür, dass das Immunsystem durch die medikamentöse P2-Rezeptorblockade nicht komplett ausgeschaltet wurde. Dies könnte sich klinisch günstig auswirken, da residuelle Tumorzellen und Infekterreger eliminiert werden können.

5.2.3. In vitro

In vitro bestätigte sich der negative Einfluss von PPADS auf die T-Zellproliferation. Dass hierbei das PPADS nicht durch eine rein toxische Wirkung T-Zellen vernichtet, konnte durch die konstant niedrige Apoptoserate bewiesen werden, die sich von der Rate bei unbehandelten T-Zellen nicht unterscheidet.

PPADS reduzierte in vitro außerdem die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine MCP-1 und IFN-γ. Von IFN-γ ist bekannt, dass es vor allem bei Schädigungen des Thymus im Rahmen der akuten GvHD eine Rolle spielt (Hauri-Hohl et al. 2007). Es kommt durch die Blockade der P2-Rezeptoren also nicht zu einer toxischen Wirkung mit Vernichtung der T-Zellen, sondern zu anergen Effekten mit Verminderung von Zytokinfreisetzung und Unterbindung von proinflammatorischen Signalwegen, welche für die Entwicklung einer akuten GvHD nötig sind.

5.3. Graft-versus-Tumor-Effekt

Verschiedene Methoden zur Reduktion der akuten GvHD wurden bereits untersucht. Die Reduktion der GvHD ist dabei durch verschiedene Mechanismen möglich, z.B. durch T-Zelldepletion oder medikamentöse Immunsuppression (Ringden et al. 2009). Diese Methoden haben das Problem gemeinsam, dass sie zwar die Morbidität einer aGvHD verhindern, allerdings auch den gewünschten Graftversus-Tumor-Effekt (Abstoßung von nach Chemotherapie verbliebenen Tumorzellen) blockieren.

Übereinstimmend mit oben geäußerter Annahme, dass die Blockade der ATP-Effekte das Immunsystem nicht komplett ausschaltet, wurde eine intakte Tumorabstoßung der Luziferase-transgenen A20-Lymphomlinie unter P2-Rezeptorblockade gefunden. Dies wird demonstriert durch die Biolumineszenzaufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten und der quantitativen Auswertung der Photonenemission durch die luc⁺ A20-Zellen.

Dabei ist auf den BLI-Bildern an Tag 7 in allen Gruppen ein Tumorsignal erkennbar. Dies kann als Qualitätskontrolle für die maligne Potenz der Tumorzellen und das Funktionieren des Modells gesehen werden: Sie wachsen an den typischen Lokalisationen (inguinale und zervikale Lymphknoten, Knochenmark) an und proliferieren in der Gruppe ohne T-Zellgabe auch weiter. Das Verschwinden des Signals in beiden T-Zellgruppen ist Beweis für die Vernichtung des Tumors und zeigt, dass die Blockade der P2-Rezeptoren keinen signifikanten Einfluss auf diesen Effekt zu haben scheint.

Bei der Auswertung der Überlebenskurven dieser Gruppen fällt auf, dass Tiere der Gruppe mit Knochenmark und A20-Lymphomzellen rasch versterben, offensichtlich an dem ständig weiterwachsenden Tumor. Die Tiere mit zusätzlicher T-Zellgabe und PBS-Behandlung stoßen den Tumor zwar ab (siehe BLI), sterben aber dennoch früh mit Zeichen der akuten GvHD. Tiere mit PPADS-Behandlung stoßen den Tumor ab und leben länger, da sie wie oben beschrieben vor der akuten GvHD geschützt sind.

Die Erklärung für die intakte Tumorabstoßung bei reduzierter GvHD-Aktivität könnte in der unterschiedlichen Expression von purinergen Rezeptoren auf verschiedenen Zellen liegen. Auf den für die zytotoxische Tumorabstoßung wichtigen CD8⁺ Zellen ist zumindest der P2X₇-Rezeptor nur marginal exprimiert (Heiss et al. 2008), so dass ATP bei ihrer Aktivierung für den GvT-Effekt vermutlich keine Rolle spielt.

Es gibt bereits andere Untersuchungen, in denen die GvHD bei erhaltener Tumorabstoßung reduziert werden konnte: Edinger et al. 2003 gelang dies durch einen erhöhten Anteil von regulatorischen CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen im Transplantat. In nach Abschluss der experimentellen Phase dieser Doktorarbeit durchgeführten Folgeexperimenten wurde nachgewiesen, dass die Blockade von purinergen Rezeptoren zu einer verstärkten Proliferation von CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen führt (Wilhelm et al. 2010), so dass auch dies zusätzlich zu der erhaltenen Tumorabstoßung beitragen könnte.

5.4. Rolle des P2X₇-Rezeptors

Der P2X₇-Rezeptor ist im Zusammenhang mit Entzündungsgeschehen besonders interessant, da seine Aktivierung zur erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IFN- γ sowie IL-1 führt (Bulanova et al. 2009), wobei diese auch bei der Entwicklung einer GvHD beteiligt sind (Arnold et al. 2002; Hill et al. 1999; Wang et al. 2009).

Zunächst ist dieser Rezeptor auf Zellen von verschiedenen GvHD Zielorganen exprimiert, was sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene in Mäusen und auf humanen PBMZ nachgeprüft wurde. Zudem führt eine GvHD nach alloHZT zu einer erhöhten Expression, was darauf hindeutet, dass die Expression bei GvHD hochreguliert wird und somit die durch diesen Rezeptor vermittelten Effekte verstärkt werden.

Deshalb bot er sich an für in vivo-Untersuchungen mit P2X₇R-defizienten Mäusen bzw. medikamentöser Blockade des Rezeptors mit Kn-62.

Bei verschiedenen Transplantationskombinationen fand sich ein Überlebensvorteil sowie ein niedrigerer histopathologischer GvHD-Grad in Leber, Dünndarm und Kolon bei P2X₇R-defizienten Empfängern bzw. selektiver medikamentöser Blockade des Rezeptors im Vergleich zu Wildtypempfängern.

Bei Transplantation von P2X₇R-defizienten Spender T-Zellen hingegen starben die Empfängertiere sogar früher als bei Gabe von Wildtyp-T-Zellen. Dies lässt mechanistisch auf einen protektiven Effekt der P2X₇R-Defizienz auf Empfängerseite schließen.

Auf Grundlage der vorliegenden Daten sind folgende Vorgänge bei der Entwicklung einer akuten GvHD wahrscheinlich: Nach der induktiven myeloablativen Ganzkörperbestrahlung der Mäuse wird ATP aus untergehenden Zellen in den Extrazellulärraum freigesetzt und aktiviert den P2X₇-Rezeptor, vermutlich auf lokalen APZs. Dies entfesselt eine Kaskade von proinflammatorischen Ereignissen mit unter anderem einer erhöhten IFN-γ-Produktion sowie einer Expansion von Spender-T-Zellen. Bei Entwicklung einer GvHD kommt es zusätzlich zu einer Hochregulation der P2X₇-Expression auf verschiedenen Organen, so dass APZ stärker auf die proinflammatorischen Effekte von freiem ATP reagieren und es zu positiven Feedback-Signalen kommt.

In Makrophagen stellt die Aktivierung von P2X₇-Rezeptoren ein Ko-Signal für die Aktivierung des Inflammasoms dar und ist ein essentieller Mediator für den Synergismus zwischen ATP und TLR-Liganden bei der Maturation und Freisetzung von bioaktiven Zytokinen (Chen und Brosnan 2006; Kanneganti et al. 2007).

Klinische Daten einer eingeschränkten Zahl von Patienten mit einem Polymorphismus des P2X₇R-Gens (A1513C) zeigten einen Zusammenhang mit dem Auftreten von Infektionen und reduziertem Überleben nach alloHZT (Lee et al. 2007), was für einen Einfluss des P2X₇R auf den Transplantationserfolg spricht.

Zusätzlich zu den hier erhobenen und interpretierten Daten sind folgende Fragen zu klären: Ist der P2X₇-Rezeptor für alle oben gezeigte vielversprechenden Effekte der breiten P2-Rezeptorblockade verantwortlich, oder ist ein Zusammenspiel verschiedener purinerger Rezeptoren dafür ursächlich? Für eine eventuelle therapeutische Anwendung ist es im Hinblick auf eventuelle Nebenwirkungen wichtig, so punktuell wie möglich in den Organismus einzugreifen. Deshalb war es interessant, in weitergehenden Versuchen für den P2X₇-Rezeptor die gleichen Untersuchungen wie für die breite P2-Rezeptorblockade durchzuführen. Experimente zur T-Zellproliferation in vivo und in vitro sowie Messungen zum Einfluss der P2X₇R-Defizienz auf die Spiegel proinflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine im Serum der transplantierten Tiere bzw. in vitro wurden nach Abschluss der Experimente für diese Dissertation durchgeführt. Dabei wurde auch bei spezifischer singulärer Blockade des P2X₇-Rezeptors eine Reduktion der GvHD-Aktivität bei erhaltener Tumorabstoßung erreicht (Wilhelm et al. 2010). Weitergehend wurde ein negativer Effekt der Blockade von P2-Rezeptoren auf die Immunrekonstitution nach alloHZT ausgeschlossen und gezeigt, dass sich die Zahl der vor GvHD schützenden regulatorischen CD4+FoxP3+-T-Zellen dabei erhöht.

5.5. Zusammenfassung und Ausblick

Die akute Graft-versus-Host-Disease ist eine wesentliche Nebenwirkung der allogenen Transplantation von Blutstammzellen, deren Entwicklung durch CD4⁺ und CD8⁺ Zellen vermittelt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Versuche im Mausmodell eine Relevanz von ATP-induzierter Aktivierung des purinergen Rezeptors P2X₇R für die Entwicklung einer GvHD festgestellt. Es wurde gezeigt, dass die Konzentration von ATP im Extrazellulärraum nach der für die Transplantation notwendigen Induktionstherapie (durch Bestrahlung oder Hochdosischemotherapie) erhöht ist. Der physiologische Metabolit ATP kann als endogenes Gefahrensignal aufgefasst werden, dass bei Freisetzung in den Extrazellulärraum durch Aktivierung von Empfänger-APZ schädliche Effekte verursacht. Es wurde gezeigt, dass eine breite Blockade der purinergen Rezeptorfamilie P2X sowie eine spezifische Blockade des P2X₇R bzw. die Defizienz für diesen Rezeptor die GvHD vermindert.

Die intakte Abstoßung eines B-Zell-Lymphoms bei Behandlung mit einem Breitspektrum P2R-Blocker zeigt, dass eine Signalweiterleitung über purinerge Rezeptoren nicht für den Graft-versus-Tumor-Effekt nötig ist. In Zusammenschau mit den zusätzlichen aus menschlichen Materialien gewonnenen Daten sind diese Erkenntnisse möglicherweise von großer klinischer Relevanz, da eine pharmakologische Inhibition des P2X₇-Rezeptors überschießende vom Immunsystem vermittelte Gewebeschädigungen reduzieren und damit den Behandlungserfolg bei Patienten mit GvHD-Risiko, aber auch bei Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen oder beim SIRS verbessern könnte.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

aGvHD	Akute Graft-versus-host disease
alloHZT	Allogene hämatopoetische
	Stammzelltransplantation
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
АТР	Adenosin-Triphosphat
BD	Becton Dickinson
BLI	Biolumineszenz-Imaging
BMDZ	Bone marrow derived dendritic cells = Dendritische Zellen des Knochenmarks
CD	Cluster of differentiation
DZ	Dendritische Zellen
FACS	Fluorescence activated cell sorting = Durchflusszytometrie
GKB	Ganzkörperbestrahlung
GvL	Graft-versus-Leukämie
GvT	Graft-versus-Tumor
IL	Interleukin
КМ	Knochenmark
MACS	Magnetische Zellseparation
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
РВМZ	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate-buffered saline

SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
TNF	Tumornekrosefaktor

6.2. Patientencharakteristika Abbildung 1a

PIN	Krankheit	Grund für Aszites
A1	MM, Nieren- und Leberinsuffizienz	Nephrotisches Syndrom mit Hypoproteinämie
A2	Leberzirrhose (alkoholisch)	НА
A3	Dekompensierte Herzinsuffizienz	Flüssigkeitsretention
A4	Leberzirrhose, Hepatitis B	НА
A5	Leberzirrhose (alkoholisch)	НА
A6	Leberzirrhose (alkoholisch)	НА
A7	Peritonealkarzinose bei CUP (carcinoma of unknown primary)	Irritation der Peritonealhöhle durch maligne Zellen
A8	Leberzirrhose (alkoholisch)	НА
A9	Nierenversagen	Nephrotisches Syndrom mit Hypoproteinämie
A10	Nierenversagen	Nephrotisches Syndrom mit Hypoproteinämie
A11	Leberzirrhose (alkoholisch)	НА
A12	Maligner Aszites (Pankreas-Karzinom)	Irritation der Peritonealhöhle durch maligne Zellen
A13	Leberzirrhose (alkoholisch),	HA, Flüssigkeitsretention
	Dekompensierte Herzinsuffizienz	
A14	Leberzirrhose (alkoholisch)	НА
A15	Leberzirrhose (alkoholisch)	НА
A16	Leberzirrhose (alkoholisch)	НА
A17	Hepatozelluläres Karzinom, Leberzirrhose	НА

6.2.1. Gruppe A Patienten ohne alloHZT

A18	Leberzirrhose (alkoholisch)	НА
-----	-----------------------------	----

Tabelle 1-1

PIN	Krankheit	Tag nach alloHZT	Spender	Grund für Aszites
B1	AML	34	MUD	НА
B2	ММ	94	Sib	НА
B3	T-PLL	13	MUD	НА

6.2.2. Gruppe B Patienten mit Aszites nach alloHZT ohne akute GvHD

Tabelle 1-2

6.2.3. Gruppe C	Patienten mit Aszites nach alloHZT und Entwicklung einer
akuten GvHD	

PIN	Krankheit	Tag nach allo- HCT	Spender	GvHD- Lokus	GvHD- Grad	Grund für Aszites
C1	ABL	61	MUD	Darm	4	НА
C2	AML	73	MUD	Darm	4	НА
С3	MDS	147	Sib	Darm	3-4	Nephrotisches Syndrom
C4	SAA	87	MUD	Darm	4	НА
C5	AML	157	Sib	Darm	3-4	НА
C6	T PLL	532	MUD	Leber, Darm	3	НА

Tabelle 1-3

Abkürzungen: PIN= Patienten-Identifikationsnummer, Sib= sibling donor, MUD= matched unrelated donor, alloHZT= allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation, AML= Akute myeloische Leukämie, MM= Multiples Myelom, T-PLL= T Prolymphozytenleukämie, ABL= akute biphenotypische Leukämie, MDS= Myelodysplastisches Syndrom, SAA= Schwere (severe) Aplastische Anämie, HA= Hypoalbuminämie

6.3. Patientencharakteristika Abbildung 6c

PIN	Krankheit	Tag nach alloHZT	Spender
D1	AML	196	MUD
D2	ALL	19	MUD
D3	ALL	24	Sib
D4	B-NHL	35	MUD
D5	AML	19	Sib
D6	T-NHL	20	MUD
D7	ММ	22	Sib
D8	AML	86	MUD
D9	AML	41	Sib
D10	B-NHL	47	MUD
D11	AML	27	Sib
D12	AML	48	MUD
D13	ALL	36	MUD
D14	AML	52	MUD

6.3.1. Patienten mit alloHZT ohne GvHD

Tabelle 2-1

6.3.2. Patienten mit alloHZT und GvHD

PIN	Krankheit	Tag nach alloHZT	Spen der	GvHD-Lokus	GVHD- Grad
E1	AML	157	Sib	Darm	3-4
E2	CML	55	Sib	Darm	4

E3	B-NHL	86	MUD	Leber	3
E4	CML	104	Sib	Darm, Haut, Augen	3-4
E5	MDS	27	MUD	Haut	2-3
E6	AML	42	MUD	Darm	3
E7	MDS	153	Sib	Darm	3-4

Tabelle 2-2

Abkürzungen: PIN= Patienten-Identifikationsnummer, Sib= sibling donor, MUD= matched unrelated donor, alloHZT= allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation, AML= Akute myeloische Leukämie, MM= Multiples Myelom, T-PLL= T Prolymphozytenleukämie, ABL= akute biphenotypische Leukämie, MDS= Myelodysplastisches Syndrom, SAA= Schwere (Severe) Aplastische Anämie, ALL= Akute lymphoblastische Leukämie, B-NHL=B Non-Hodgkin Lymphom, T-NHL=T Non-Hodgkin Lymphom, CML= chronische myeloische Leukämie

6.4. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1a:	ATP Spiegel im Aszites	S. 33
Abbildung 1b:	ATP-Spiegel in peritonealer Spülflüssigkeit bei Zustand nach Bestrahlung	S. 34
Abbildung 1c:	Lokalisation von freiem ATP nach Knochenmarktransplantation	S. 35
Abbildung 1d	Quantifizierung der Photonen	S. 36
Abbildung 1e:	Ex vivo Imaging der Gastrointestinalregion zur Detektion von freiem ATP	S. 36
Abbildung 2a:	Kaplan-Maierkurven des Überlebens nach alloHZT	S. 38
Abbildung 2b:	T-Zellproliferation und Lokalisation nach alloHZT	S. 39
Abbildung 2c:	Histopathologische Auswertung der akuten GvHD	S. 40
Abbildung 2d:	Histopathologische Einteilung der chronischen GvHD	S. 41
Abbildung 3a:	Proliferation und Apoptoseverhalten von T-Zellen nach Stimulation mit BMDZ und PPADS-Blockade	S. 42
Abbildung 3b:	Einfluss von PPADS auf die Zytokinproduktion	S. 42
Abblidung 4a:	Einfluss von P2X-Rezeptorblockade auf Graft-versus-Tumor-Effekt	S. 43
Abbildung 4b:	Einfluss von PPADS auf GvT-Effekt	S. 44
Abbildung 4c:	Überleben mit A20-Lymphomzellen	S. 44
Abbildung 5a:	Einfluss von aGvHD auf die Expression von P2X7R-RNA	S. 46
Abbildung 5b:	Immunhistochemischer Nachweis von P2X7R-Protein	S. 46
Abbildung 5c:	Expression von P2X ₇ R-RNA in humanen Zellen	S. 47
Abbildung 6a:	Einfluss von P2X7-Defizienz bzw. –Blockade auf das Überleben nach alloHZT	S. 48
Abbildung 6b:	Histopathologischer Schweregrad der GvHD bei Wildtyp- und P2X7-defizienten Empfängern	S. 48

7. Literaturverzeichnis

 Anderson, B. E., P. A. Taylor, J. M. McNiff, D. Jain, A. J. Demetris, A. Panoskaltsis-Mortari, A. Ager, B.
 R. Blazar, W. D. Shlomchik und M. J. Shlomchik (2008). Effects of donor T-cell trafficking and priming site on graft-versus-host disease induction by naive and memory phenotype CD4 T cells. Blood. May 15;111(10):5242-51.

2. Arnold, D., C. Wasem, P. Juillard, P. Graber, I. Cima, C. Frutschi, S. Herren, S. Jakob, S. Alouani, C. Mueller, Y. Chvatchko und T. Brunner (2002). IL-18-independent cytotoxic T lymphocyte activation and IFN-gamma production during experimental acute graft-versus-host disease. Int Immunol. May;14(5):503-11.

Beilhack, A., S. Schulz, J. Baker, G. F. Beilhack, C. B. Wieland, E. I. Herman, E. M. Baker, Y. A. Cao, C.
H. Contag und R. S. Negrin (2005). In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. Blood. Aug 1;106(3):1113-22.

4. Bosi, A. und B. Bartolozzi (2010). Safety of bone marrow stem cell donation: a review. Transplant Proc. Jul-Aug;42(6):2192-4.

5. Bours, M. J., E. L. Swennen, F. Di Virgilio, B. N. Cronstein und P. C. Dagnelie (2006). Adenosine 5'triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacol Ther. Nov;112(2):358-404.

6. Bulanova, E., V. Budagian, Z. Orinska, F. Koch-Nolte, F. Haag und S. Bulfone-Paus (2009). ATP induces P2X7 receptor-independent cytokine and chemokine expression through P2X1 and P2X3 receptors in murine mast cells. J Leukoc Biol. Apr;85(4):692-702.

Cao, Y. A., A. J. Wagers, A. Beilhack, J. Dusich, M. H. Bachmann, R. S. Negrin, I. L. Weissman und C. H.
 Contag (2004). Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells. Proc Natl Acad
 Sci U S A. Jan 6;101(1):221-6.

8. Chao, J., P. Donham, N. van Rooijen, J. G. Wood und N. C. Gonzalez (2010). MCP-1/CCL2 Released from Alveolar Macrophages Mediates the Systemic Inflammation of Acute Alveolar Hypoxia. Am J Respir Cell Mol Biol. Sep 2.

9. Chen, L. und C. F. Brosnan (2006). Regulation of immune response by P2X7 receptor. Crit Rev Immunol.26(6):499-513.

Cintra-Francischinelli, M., P. Caccin, A. Chiavegato, P. Pizzo, G. Carmignoto, Y. Angulo, B. Lomonte,
 J. M. Gutierrez und C. Montecucco (2010). Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. Proc Natl Acad Sci U S A. Aug 10;107(32):14140-5.

11. D'Ambrosi, N., P. Finocchi, S. Apolloni, M. Cozzolino, A. Ferri, V. Padovano, G. Pietrini, M. T. Carri und C. Volonte (2009). The proinflammatory action of microglial P2 receptors is enhanced in SOD1 models for amyotrophic lateral sclerosis. J Immunol. Oct 1;183(7):4648-56.

12. Di Virgilio, F. (2005). Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. Purinergic Signal. Sep;1(3):205-9.

13. Edinger, M., P. Hoffmann, J. Ermann, K. Drago, C. G. Fathman, S. Strober und R. S. Negrin (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. Nat Med. Sep;9(9):1144-50.

14. Ferrari, D., P. Chiozzi, S. Falzoni, S. Hanau und F. Di Virgilio (1997). Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. J Exp Med. Feb 3;185(3):579-82.

15. Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, R. M. Lemoli, A. Curti, M. Idzko, E. Panther und F. Di Virgilio (2006). The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. J Immunol. Apr 1;176(7):3877-83.

16. Friedle, S. A., M. A. Curet und J. J. Watters Recent patents on novel P2X(7) receptor antagonists and their potential for reducing central nervous system inflammation. Recent Pat CNS Drug Discov. Jan;5(1):35-45.

17. Goldman Jm Fau - Gale, R. P., M. M. Gale Rp Fau - Horowitz, J. C. Horowitz Mm Fau - Biggs, R. E. Biggs Jc Fau - Champlin, E. Champlin Re Fau - Gluckman, R. G. Gluckman E Fau - Hoffmann, S. J. Hoffmann Rg Fau - Jacobsen, A. M. Jacobsen Sj Fau - Marmont, P. B. Marmont Am Fau - McGlave, P. B. McGlave und et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. (0003-4819 (Print)).

18. Granstein, R. D., W. Ding, J. Huang, A. Holzer, R. L. Gallo, A. Di Nardo und J. A. Wagner (2005). Augmentation of cutaneous immune responses by ATP gamma S: purinergic agonists define a novel class of immunologic adjuvants. J Immunol. Jun 15;174(12):7725-31.

 Guinan, E. C., V. A. Boussiotis, D. Neuberg, L. L. Brennan, N. Hirano, L. M. Nadler und J. G. Gribben (1999). Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts. N Engl J Med.340(22):1704-14.

20. Hakan, G., C. H. Ibrahim und J. C. Nelson (2001). Acute graft-vs-host disease: Pathobiology and management. Experimental hematology.29(3):259-277.

21. Hanley, P. J., B. Musset, V. Renigunta, S. H. Limberg, A. H. Dalpke, R. Sus, K. M. Heeg, R. Preisig-Muller und J. Daut (2004). Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca2+ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. Jun 22;101(25):9479-84.

22. Harousseau, J. L. (2007). Role of stem cell transplantation. Hematol Oncol Clin North Am. Dec;21(6):1157-74, x.

Hauri-Hohl, M. M., M. P. Keller, J. Gill, K. Hafen, E. Pachlatko, T. Boulay, A. Peter, G. A. Hollander und
W. Krenger (2007). Donor T-cell alloreactivity against host thymic epithelium limits T-cell development
after bone marrow transplantation. Blood. May 1;109(9):4080-8.

24. Heiss, K., N. Janner, B. Mahnss, V. Schumacher, F. Koch-Nolte, F. Haag und H. W. Mittrucker (2008). High sensitivity of intestinal CD8+ T cells to nucleotides indicates P2X7 as a regulator for intestinal T cell responses. J Immunol. Sep 15;181(6):3861-9. 25. Hill, G. R., T. Teshima, A. Gerbitz, L. Pan, K. R. Cooke, Y. S. Brinson, J. M. Crawford und J. L. Ferrara (1999). Differential roles of IL-1 and TNF-alpha on graft-versus-host disease and graft versus leukemia. J Clin Invest. Aug;104(4):459-67.

26. Hill, G. R. und J. L. Ferrara (2000). The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. Blood. May 1;95(9):2754-9.

27. Idzko, M., H. Hammad, M. van Nimwegen, M. Kool, M. A. Willart, F. Muskens, H. C. Hoogsteden, W. Luttmann, D. Ferrari, F. Di Virgilio, J. C. Virchow, Jr. und B. N. Lambrecht (2007). Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. Nat Med. Aug;13(8):913-9.

28. Jacobsohn, D. A. und G. B. Vogelsang (2007). Acute graft versus host disease. Orphanet J Rare Dis.2:35.

29. Johnson, S. M., C. D. Torrice, J. F. Bell, K. B. Monahan, Q. Jiang, Y. Wang, M. R. Ramsey, J. Jin, K. K. Wong, L. Su, D. Zhou und N. E. Sharpless (2010). Mitigation of hematologic radiation toxicity in mice through pharmacological quiescence induced by CDK4/6 inhibition. J Clin Invest. Jul 1;120(7):2528-36.

30. Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi, Y. G. Kim, G. Chen, J. H. Park, L. Franchi, P. Vandenabeele und G. Nunez (2007). Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. Immunity. Apr;26(4):433-43.

31. Kaplan, D. H., B. E. Anderson, J. M. McNiff, D. Jain, M. J. Shlomchik und W. D. Shlomchik (2004). Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype. J Immunol. Nov 1;173(9):5467-75.

32. Kawamura, H., F. Aswad, M. Minagawa, S. Govindarajan und G. Dennert (2006). P2X7 receptors regulate NKT cells in autoimmune hepatitis. J Immunol. Feb 15;176(4):2152-60.

33. Kolb, H. J. (2008). Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. Blood. Dec 1;112(12):4371-83.

34. Lambrecht, G., T. Friebe, U. Grimm, U. Windscheif, E. Bungardt, C. Hildebrandt, H. G. Baumert, G. Spatz-Kumbel und E. Mutschler (1992). PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses. Eur J Pharmacol. Jul 7;217(2-3):217-9.

35. Lan, K., S. C. Verma, M. Murakami, B. Bajaj und E. S. Robertson (2007). Isolation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Curr Protoc Microbiol. Aug;Appendix 4:Appendix 4C.

36. Latz, E. (2010). The inflammasomes: mechanisms of activation and function. Curr Opin Immunol. Feb;22(1):28-33.

37. Lee, K. H., S. S. Park, I. Kim, J. H. Kim, E. K. Ra, S. S. Yoon, Y. C. Hong, S. Park und B. K. Kim (2007). P2X7 receptor polymorphism and clinical outcomes in HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Haematologica. May;92(5):651-7.

38. Li, J. M., C. R. Giver, Y. Lu, M. S. Hossain, M. Akhtari und E. K. Waller (2009). Separating graft-versus-leukemia from graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Immunotherapy. Jul 1;1(4):599-621. 39. Lister, M. F., J. Sharkey, D. A. Sawatzky, J. P. Hodgkiss, D. J. Davidson, A. G. Rossi und K. Finlayson (2007). The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. J Inflamm (Lond).4:5.

40. Martin, P. J., J. A. Hansen, B. Torok-Storb, D. Durnam, D. Przepiorka, J. O'Quigley, J. Sanders, K. M. Sullivan, R. P. Witherspoon, H. J. Deeg und et al. (1988). Graft failure in patients receiving T cell-depleted HLA-identical allogeneic marrow transplants. Bone Marrow Transplant. Sep;3(5):445-56.

41. Ong, Z. Y., R. J. Gibson, J. M. Bowen, A. M. Stringer, J. M. Darby, R. M. Logan, A. S. Yeoh und D. M. Keefe (2010). Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. Radiat Oncol.5:22.

42. Park, H. B., K. Oh, N. Garmaa, M. W. Seo, O. J. Byoun, H. Y. Lee und D. S. Lee (2010). CP-690550, a Janus kinase inhibitor, suppresses CD4+ T-cell-mediated acute graft-versus-host disease by inhibiting the interferon-gamma pathway. Transplantation. Oct 27;90(8):825-35.

43. Peffault de Latour, R., A. Cabrespine-Faugeras und J. O. Bay (2008). [Ten years of changes in conditioning regimen for allogenic hematopoietic stem cell transplantation in adults]. Bull Cancer. Jan;95(1):87-97.

44. Pellegatti, P., L. Raffaghello, G. Bianchi, F. Piccardi, V. Pistoia und F. Di Virgilio (2008). Increased Level of Extracellular ATP at Tumor Sites: <italic>In Vivo</italic> Imaging with Plasma Membrane Luciferase. PLoS ONE.3(7):e2599.

45. Quah, B. J., H. S. Warren und C. R. Parish (2007). Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. Nat Protoc.2(9):2049-56.

46. Reichardt, W., C. Durr, D. von Elverfeldt, E. Juttner, U. V. Gerlach, M. Yamada, B. Smith, R. S. Negrin und R. Zeiser (2008). Impact of mammalian target of rapamycin inhibition on lymphoid homing and tolerogenic function of nanoparticle-labeled dendritic cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. J Immunol. Oct 1;181(7):4770-9.

47. Ringden, O., H. Karlsson, R. Olsson, B. Omazic und M. Uhlin (2009). The allogeneic graft-versuscancer effect. Br J Haematol. Dec;147(5):614-33.

48. Schneider, E. M., K. Vorlaender, X. Ma, W. Du und M. Weiss (2006). Role of ATP in traumaassociated cytokine release and apoptosis by P2X7 ion channel stimulation. Ann N Y Acad Sci. Dec;1090:245-52.

49. Schrezenmeier, P. D. H., P. D. D. W. Beelen, D. D. C. Müller und P. D. H. Ottinger (2009). Jahresbericht DRST Deutsches Register für Stammzelltransplantationen.

50. Solle, M., J. Labasi, D. G. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B. H. Koller, R. J. Griffiths und C. A. Gabel (2001). Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. J Biol Chem. Jan 5;276(1):125-32.

51. Virgilio, F. D. (2007). Purinergic signalling in the immune system. A brief update. Purinergic Signalling.3:1–3.

52. Wang, H., W. Asavaroengchai, B. Y. Yeap, M. G. Wang, S. Wang, M. Sykes und Y. G. Yang (2009). Paradoxical effects of IFN-gamma in graft-versus-host disease reflect promotion of lymphohematopoietic graft-versus-host reactions and inhibition of epithelial tissue injury. Blood. Apr 9;113(15):3612-9.

53. Warny, M., S. Aboudola, S. C. Robson, J. Sevigny, D. Communi, S. P. Soltoff und C. P. Kelly (2001). P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide. J Biol Chem. Jul 13;276(28):26051-6.

54. Wilhelm, K., J. Ganesan, T. Muller, C. Durr, M. Grimm, A. Beilhack, C. D. Krempl, S. Sorichter, U. V. Gerlach, E. Juttner, A. Zerweck, F. Gartner, P. Pellegatti, F. Di Virgilio, D. Ferrari, N. Kambham, P. Fisch, J. Finke, M. Idzko und R. Zeiser (2010). Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. Nat Med. Dec;16(12):1434-8.

55. Yilmaz, O., A. A. Sater, L. Yao, T. Koutouzis, M. Pettengill und D. M. Ojcius (2010). ATP-dependent activation of an inflammasome in primary gingival epithelial cells infected by Porphyromonas gingivalis. Cell Microbiol. Feb;12(2):188-98.

56. Zeiser, R., V. H. Nguyen, A. Beilhack, M. Buess, S. Schulz, J. Baker, C. H. Contag und R. S. Negrin (2006). Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. Blood. Jul 1;108(1):390-9.

57. Zeiser, R., D. B. Leveson-Gower, E. A. Zambricki, N. Kambham, A. Beilhack, J. Loh, J. Z. Hou und R. S. Negrin (2008). Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. Blood. Jan 1;111(1):453-62.

58. Zhang, C., I. Todorov, Z. Zhang, Y. Liu, F. Kandeel, S. Forman, S. Strober und D. Zeng (2006). Donor CD4+ T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestations. Blood. Apr 1;107(7):2993-3001.

59. Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. Nov;362(4-5):299-309.

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich recht herzlich bei den folgenden Personen, die für das Gelingen dieser Arbeit unersetzlich waren.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Robert Zeiser aus der Medizinischen Klinik I der Universität Freiburg für die interessante Aufgabenstellung und die stets exzellente Betreuung. Es hat mich gefreut, Robert, mit Dir zusammen zu arbeiten. Du hast großen Anteil am Erwachen meines wissenschaftlichen Ehrgeizes und wirst mir in dieser Hinsicht ein Vorbild bleiben. Insbesondere bedanke ich mich auch für die über diese Doktorarbeit hinausgehende menschliche und berufliche Beratung und Förderung.

Frau PD Dr. S. Laßmann aus dem Institut für Pathologie der Universitätsklinik Freiburg danke ich für die Zweitkorrektur der Arbeit.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Marco Idzko aus der Medizinischen Klinik, Abteilung Pneumologie der Universität Freiburg für die Bereitstellung der P2X₇KO-Mäuse sowie der Expertise über purinerge Rezeptoren, der stets weiterführenden Diskussion der Ergebnisse und die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit. Seinen Mitarbeitern Herrn Dr. Tobias Müller und Frau Melanie Grimm gilt mein Dank für die ATP-Messungen sowie die PCR-Messungen der Expression purinerger Rezeptoren.

Für die pathologische Auswertung der Gefrierschnitte gebührt mein Dank Frau Dr. Ulrike Gerlach aus dem pathologischen Institut der Universitätsklinik Freiburg.

Herr Prof. Dr. J. Finke aus der Medizinischen Klinik I stand als kompetenter Ratgeber zur Seite und ich bedanke mich an dieser Stelle für die geduldige Diskussion der Ergebnisse in den gemeinsamen Laborbesprechungen. Ich freue mich, dass ich diese Doktorarbeit in der Medizinischen Klinik I von Herrn Prof. Dr. R. Mertelsmann schreiben konnte.

Ich danke der gesamten AG Zeiser sowie den Mitarbeitern des Labors Nothnagel für die immer hilfsbereite Unterstützung und Hilfe bei der technischen Durchführung der Experimente. Insbesondere möchte ich hier Herrn Dipl.-Biologen Christoph Dürr und Frau Sophie Krüger nennen, die mir als absolutem Laborneuling geduldig Fragen beantworteten und ohne deren Hilfe und Rat vieles so nicht möglich gewesen wäre. Ich freue mich, dass das Projekt nach meinem Ausscheiden von Frau Jayanthi Ganesan weitergeführt wurde und so eine Publikation möglich wurde.

Vielen Dank meiner ganzen Familie für das Ermöglichen des Medizinstudiums und für die Unterstützung.

Curriculum vitae

Diese persönlichen Angaben sind nicht Bestandteil der Onlineversion dieser Dissertation.