

Strategien zur Prävention und Therapie endothelialer Schäden nach allogener Stammzelltransplantation

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen
Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin der
Universität Regensburg

vorgelegt von
Patricia-Ann Ewing Bartz aus Berlin

Februar 2004

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 6.2.2004

Diese Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. E. Holler

Prüfungsausschuss:

Prüfungsvorsitzende: Prof. Dr. R. Baumann

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Minuth

2. Gutachter: Prof. Dr. E. Holler

3. Gutachter: Prof. Dr. A. Kurtz

Tag der mündlichen Prüfung: 14.6.2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2000 bis Februar 2004 in der Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie des Klinikums der Universität Regensburg angefertigt. Das Projekt wurde gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG GE999/2-1+2-2).

Publikationen

Ewing P., Wilke A., Brockhoff G., Andreesen R., Eissner G., Holler E., Gerbitz, A.;
Isolation and transplantation of allogeneic pulmonary endothelium derived from GFP
transgenic mice;
Journal of immunological Methods 283 (2003) 307-315

Gerbitz A., Ewing P., Wilke A., Schubert T., Eissner G., Dietl B., Andreesen R.,
Cooke K.R., Holler E;
Induction of heme oxygenase I prior to conditioning results in improved survival and
reduced GvHD after experimental allogeneic bone marrow transplantation;
Journal of Blood and Bone Marrow Transplantation 2004; in press

Posterbeiträge

Ewing P., Wilke A., Eissner G., Andreesen R., Holler E., Gerbitz A.
Isolation, Characterization and Transplantation of Allogeneic Primary Pulmonary
Endothelial Cells in a Murine Bone Marrow Transplantation Model
Cellular Therapy, Regensburg, Germany 2003

P. Ewing, A. Wilke, G. Eissner, E. Holler and R. Andreesen, A. Gerbitz
Cobalt-Protoporphyrine Protects Endothelium Against Irradiation and Prolongs
Survival After Experimental Allogeneic BMT
ASH, Orlando, USA 2001

Abkürzungen

BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CD	“Cluster of differentiation”
CMV	Cytomegalievirus
CO	Kohlenmonoxid
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DiIAcLDL	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-dicarbocyanine perchlorate acetyliertes low density lipoprotein
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelzellen
ELISA	„Enzyme-linked immunosorbent assay“
ELS	“Endothelial leakage syndrome”
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer
FCS	Fötales Kälberserum
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Factor
GvHD	Spender gegen Empfänger Erkrankung (Graft versus host disease)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HO	Hämoxygenase
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN γ	Interferon γ
IL	Interleukin
IPS	Idiopathisches Pneumoniesyndrom
KMT	Knochenmarktransplantation
LPS	Lipopolysaccharid
MA	Mikroangiopathie
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MLR	Gemischte Lymphozytenreaktion
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	Periphere Blut mononukleäre Zellen
RT	Raumtemperatur
SZT	Stammzelltransplantation
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tx	Transplantation
VCAM	Vaskuläres zelluläres Adhäsionsmolekül
VOD	Lebervenenverschlusssyndrom (Veno occlusive disease)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Stammzelltransplantation.....	9
1.2	Graft-versus-host-disease.....	10
1.3	Endothelschaden nach allogener SZT	14
1.4	Hämoxygenase-1.....	17
1.5	Zielsetzung	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material	21
2.1.1	Geräte.....	21
2.1.2	Materialien	22
2.1.3	Medien und Zusätze	22
2.1.4	Chemikalien	23
2.1.5	Enzyme + Inhibitoren	24
2.1.6	Lösungen und Puffer	24
2.1.7	Antikörper, Seren und Marker	25
2.1.8	Mausstämme	26
2.2	Methoden	26
2.2.1	Transplantation	26
2.2.1.1	Isolierung von murinen Milzzellen.....	26
2.2.1.2	Isolierung von murinen Knochenmarkzellen	27
2.2.1.3	Injektion von Knochenmark- und Milzzellen.....	27
2.2.1.4	Bestrahlung der Mäuse.....	28
2.2.1.5	Bewertung der GvHD.....	28
2.2.2	Einbetten von Organen	29
2.2.3	Gewebeschnitte	30
2.2.4	Beschichtung von Zellkulturflaschen und Schalen mit Gelatine.....	30
2.2.5	Kernmarkierung: Einsatz von 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI).....	30
2.2.6	Zellen	31
2.2.7	Zellkultur	31
2.2.7.1	Kultivierung von Zellen.....	31
2.2.7.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	32

2.2.7.3	Nachweis von Mycoplasmen	33
2.2.8	Westernblot.....	33
2.2.8.1	Herstellung von Zelllysaten.....	33
2.2.8.2	Bestimmung des Proteingehaltes in den Zelllysaten	36
2.2.8.3	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-Page.....	37
2.2.8.4	Herstellung der Gele und elektrophoretische Auftrennung der Proteine	38
2.2.8.5	Blotting von Proteinen.....	39
2.2.8.6	Antikörpermarkierung.....	40
2.2.9	Resuspension von Protoporphyrin IX	42
2.2.10	Bestimmung von Zytokinen und LPS.....	43
2.2.11	Hämatoxylin/Eosin Färbung.....	43
2.2.12	Immunfluoreszenzuntersuchungen - Nachweis von Antikörpern	44
2.2.12.1	Durchflusszytometrische Analyse	44
2.2.12.2	Fluoreszenzmikroskopische Analysen	45
2.2.12.3	Immunhistologische Untersuchungen	46
2.2.12.4	LDL-Aufnahme.....	46
2.2.13	Zellisolierung.....	46
2.2.13.1	Isolierung von Peritonealmakrophagen	46
2.2.13.2	Isolierung von CD45 positiven Leberzellen.....	47
2.2.13.3	Isolierung von GFP positiven Lungenendothelzellen	48
2.2.13.4	Isolierung von CD3 positiven Milzzellen durch Negativseparation	50
2.2.13.5	Zytospins	51
2.2.14	LPS – Stimulation CD45 positiver Leberzellen	51
2.2.15	Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR).....	52
2.2.16	Statistik	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Schutz von Endothelien durch HO-1.....	53
3.1.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Induktion von HO-1	53
3.1.1.1	Induktion von HO-1 durch Metalloporphyrine und der Einfluss auf bestrahlungsinduzierte Apoptose.....	53
3.1.2	<i>In vivo</i> Untersuchungen von HO-1	60
3.1.2.1	HO-1 Induktion in Organen.....	60
3.1.2.2	HO-1 Induktion in CD45 positiven Leberzellen	62
3.1.2.3	HO-1 Induktion in Makrophagen	63

3.1.2.4	Allogene KMT bei CoPP behandelten Tieren	64
3.1.2.5	Serumzytokine nach allogener KMT	68
3.1.2.6	Expression von Aktivierungsmarkern auf Makrophagen und Stimulation von T-Zellen nach KMT	70
3.1.2.7	TNF-Sekretion von Makrophagen und CD45 positiven Leberzellen nach LPS Stimulation	71
3.2	Zelluläre Therapie	75
3.2.1	Isolierung und Transplantation primärer pulmonaler Endothelzellen	75
3.2.1.1	Isolierung von pulmonalen Endothelzellen durch LDL Aufnahme	76
3.2.1.2	CD31 und CD106 Expression auf pulmonalen Endothelzellen <i>in vivo</i>	77
3.2.1.3	Phänoypische Charakterisierung der isolierten pulmonalen Zellen	78
3.2.1.4	Transplantation von <i>ex vivo</i> expandierten Endothelzellen	81
4	Diskussion	83
5	Zusammenfassung	96
6	Literatur	97
7	Anhang	112
7.1	Anhang I	112
7.2	Anhang II	113

1 Einleitung

1.1 Stammzelltransplantation

Die Stammzelltransplantation (SZT) hat sich in den letzten Jahrzehnten bei der Behandlung maligner und nicht maligner Erkrankungen wie z.B. von Leukämien, soliden Tumoren, dem Wiskott-Aldrich-Syndrom, der Sichelzellenanämie oder von Autoimmunerkrankungen etabliert (Horowitz, 1999; Sullivan et al., 2000). Sie hat besonders bei akuten und chronischen Leukämien sowie anderen systemischen hämatologischen Erkrankungen einen hohen Stellenwert, da diese Erkrankungen in den meisten Fällen mit konventionellen Methoden wie Chemotherapie nicht heilbar sind (Ostendorf et al., 1997).

Ursprünglich wurde lediglich Knochenmark als Stammzellquelle für die Transplantation eingesetzt (Thomas et al., 1957). Inzwischen verwendet man aber auch Stammzellen aus peripherem Blut zur Transplantation. Hierfür werden die Stammzellen zunächst durch Gabe von G-CSF aus dem Knochenmark mobilisiert und anschließend aus dem Blut abgesammelt (Duhrsen et al., 1988; Stroncek et al., 1996). Eine weitere Möglichkeit ist die Isolierung von Stammzellen aus Nabelschnurblut (Cohen and Nagler, 2003). Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass aufgrund des kleinen Blutvolumens nur relativ geringe Zellmengen gesammelt werden können. Daher kommt diese Stammzellquelle nur für die Transplantation bei Kindern in Frage. Die Transplantation mit Nabelschnurblut wurde das erste Mal 1989 erfolgreich durchgeführt (Gluckman et al., 1990). Maß für die Konzentration an Stammzellen im Transplantat ist die Fraktion der CD34⁺ exprimierenden Zellen (Weißinger, 1999b).

Man unterscheidet zwischen autologer, syngener und allogener SZT (Ostendorf et al., 1997). Bei der autologen SZT werden dem Patienten vor Therapiebeginn bzw. während der Remission der Grunderkrankung Stammzellen entnommen. Diese werden ihm nach Strahlen- oder Hochdosismethode wieder zugeführt. Vorteil dieser Methode ist, dass nicht nach einem passenden Spender gesucht werden muss. Es sind auch keine immunologischen Komplikationen durch die Transplantation zu erwarten. Allerdings kann das Transplantat mit malignen Zellen kontaminiert sein, so dass das Risiko eines Rezidivs erhöht ist. Außerdem kann die Stammzellgewinnung durch eine Vortherapie beeinträchtigt sein (Weißinger, 1999a). Bei der syngenen SZT werden die Stammzellen von einem eineiigen Zwilling gewonnen.

Hierbei ergeben sich die gleichen Vorteile wie bei der autologen SZT. Zusätzlich ist das Transplantat nicht mit malignen Zellen kontaminiert. Bei der allogenen SZT stammen die Stammzellen von einem HLA identen Familien- oder einem HLA kompatiblen Fremdspender. Vorteil ist auch hier, dass das Transplantat nicht mit malignen Zellen kontaminiert sein kann. Allerdings ist nicht immer das geeignete Transplantat verfügbar, und es kann außerdem zu einer Reihe von Komplikationen kommen, von denen die Transplantat-gegen-Empfänger Reaktion (graft-versus-host disease = GvHD) im Anschluss näher beleuchtet werden soll.

Wie auch bei der Transplantation solider Organe kann es bei der allogenen SZT zu einer Abstoßung der Spenderstammzellen kommen. Der Empfänger muss daher immunsuppressiv vorbehandelt (konditioniert) werden. Es existieren verschiedene Protokolle zur Konditionierung. In Regensburg wird in der Regel mit einer Ganzkörperdosis von 8 – 12 Gy bestrahlt und zusätzlich Cyclophosphamid und Fludarabin verabreicht (Appelbaum, 1999). Neuerdings wird versucht, nicht myeloablativ zu konditionieren, wie z.B. in Seattle mit 2 Gy Bestrahlung und Fludarabingabe. Es kann auch auf die Ganzkörperbestrahlung ganz verzichtet und nur Fludarabin, BCNU und Melphalan verabreicht werden.

Das Problem der Konditionierung durch Bestrahlung sowie bei der Chemotherapie ist, dass es zum einen zu einer massiven Schädigung der sich rasch teilenden Gewebe wie z.B. Schleimhäute, Haare, Spermien und zum anderen zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Interleukin-1 (IL-1) kommt, die ihrerseits wiederum zytopathische Effekte vermitteln (Ferrara and Antin, 1999).

Teilweise kommt es nach SZT auch zu schweren Infektionen durch andauernde Immundefizienz, wobei zunächst die Neutropenie, später T-Zelldefekte verantwortlich sind (Holler et al., 2001a). Diese infektiösen Komplikationen können sowohl durch grampositive und gramnegative Bakterien als auch durch Pilze (z.B. Candida, Aspergillen) oder Viren (z.B. Viren der Herpesgruppe) verursacht werden (Weißinger, 1999a).

1.2 Graft-versus-host-disease

Die GvHD ist trotz medikamentöser Prophylaxe immer noch das Hauptproblem bei der allogenen SZT. Sie tritt bei ca. 30-60% aller Patienten in den ersten drei Monaten auf und ist in ihrer akuten Form für die hohe Frühmortalität nach allogener SZT ver-

antwortlich (Holler et al., 2001a). Die wichtigsten Organe, bei denen sich die GvHD manifestiert, sind Haut, Leber und Darm.

Wie bereits erwähnt, werden bei der allogenen SZT Stammzellen von einem Familien- oder einem nicht verwandten Fremdspender transplantiert. Damit es nicht zu schweren Immunreaktionen kommt, müssen Spender- und Empfängerzellen histokompatibel sein, d.h. es sollte kein Unterschied im Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex = MHC) vorhanden sein. Der MHC ist eine Region hochpolymorpher Gene, deren kodierte Proteine (= MHC Antigene) dem T-Zellrezeptor von T-Lymphozyten Antigene präsentieren und dadurch Immun- oder Abstoßungsreaktionen auslösen. Bereits in den vierziger Jahren wurde der MHC bei der Untersuchung der Abstoßung von Hauttransplantaten bei Mäusen entdeckt (Snell, 1948). Der humane MHC wird synonym als menschliches Leukozytenantigen (human leukocyte antigen = HLA) bezeichnet.

Das MHC- bzw. HLA-System wird in die Klassen I und II aufgeteilt. MHC I wird auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und dient in erster Linie der Präsentation von intrazellulären Peptidfragmenten (z.B. viralen Antigenen) an zytotoxische $CD8^+$ T-Lymphozyten (Abbas A.K and Lichtman A.H., 2003). MHC II hingegen befindet sich vor allem auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie dendritischen Zellen, aktivierten Makrophagen, B-Zellen, aktivierten T-Zellen, sowie Endothelzellen und präsentiert den $CD4^+$ T-Helferzellen exogene Antigenfragmente (z.B. von Bakterien).

Bei Transplantation von Zellen, deren MHC identisch mit denen des Empfängers sind, sind besonders Differenzen der Nebenhistokompatibilitätsantigene (Minor Histocompatibility Antigen = mHag) für die Entstehung der GvHD verantwortlich. mHag sind Peptide polymorpher intrazellulärer Proteine, die durch Gene auf dem Y-Chromosom und durch autosomale Gene kodiert werden. Sie werden auf der Zellmembran in Assoziation mit MHC Antigenen exprimiert und als Fremdanigene durch MHC spezifische T-Zellen erkannt (Mutis and Goulmy, 2002). mHag sind noch nicht so gut charakterisiert wie MHC Antigene, und es ist derzeit noch nicht klar, wie viele mHag existieren. Els Goulmy und Mitarbeiter konnten jedoch einige von ihnen charakterisieren (HA-1 bis HA-5) und zeigten, dass sie von T-Zellen in Assoziation mit den MHC Antigenen HLA-A1 und A2 erkannt werden (Goulmy, 1996). Allerdings scheinen nicht alle mHag eine Immunantwort auszulösen, und nur einige von ihnen korrelieren mit schwerer GvHD, z.B. HA-1 (Goulmy et al., 1996).

Wie groß der Einfluss von APCs und ihren exprimierten MHC auf die Entstehung von GvHD ist, konnte eindrucksvoll von Shlomchik und Mitarbeitern in einem MHC identen, aber mHag differenten Mausmodell gezeigt werden (Shlomchik et al., 1999). Mäuse, die APCs mit einem MHC I Defekt hatten, so dass diese nicht mehr in der Lage waren Antigene zu präsentieren, entwickelten keine GvHD nach Transplantation alloreaktiver T-Zellen. Auf der anderen Seite ist die Expression von MHC I und II auf nicht hämatopoetischen Zellen wie Epithel-, Endothel- und Parenchymzellen im Empfänger für die Entstehung akuter GvHD nicht notwendig (Teshima et al., 2002).

Während früher hauptsächlich zytotoxische T-Lymphozyten des Spenders als Mediatoren der GvHD angesehen wurden, weisen durchgeführte Untersuchungen der letzten Jahre auf eine zentrale Bedeutung proinflammatorischer Zytokine hin (Holler et al., 1990). Ferrara et al. sprechen in ihren Untersuchungen von einem regelrechten "Cytokine Storm" nach SZT (Antin and Ferrara, 1992; Ferrara, 1993; Krenger et al., 1997).

Nach dem derzeitigen Verständnis kann die Entstehung der GvHD als mehrstufiger Prozess betrachtet werden (Cooke et al., 2002):

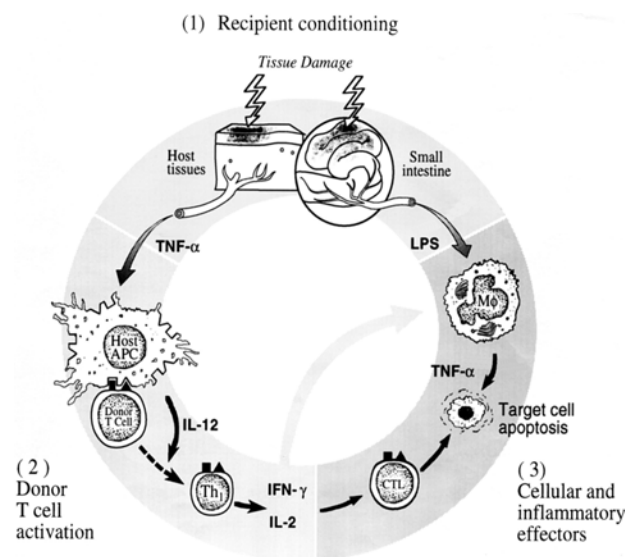


Abb. 1-1 : Entstehung der GvHD nach allogener SZT. Modifiziert nach (Hill et al., 1997b)

In der ersten Phase kommt es durch die Konditionierung des Empfängers zu Gewebeschäden, was zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF α führt. Dadurch werden APCs des Empfängers aktiviert, die ihrerseits Spender T-Zellen über Interleukin-12 (IL-12) aktivieren können. Außerdem kommt es durch die Schädigung der Mucosa im Darmtrakt zur Einschwemmung bakterieller Lipopolysaccharide (LPS). Dies wiederum aktiviert zusätzlich Monozyten/Makrophagen des

Empfängers zur Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$. Bei der Aktivierung von Spender T-Zellen durch allogene APCs und durch die durch die Konditionierung freigesetzten Zytokine in der zweiten Phase kommt es zur Sekretion von Zytokinen wie $\text{IFN}\gamma$ und Interleukin-2 (IL-2). Beide Zytokine aktivieren ihrerseits zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), Monozyten/Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese wirken als zelluläre und inflammatorische Effektoren und vermitteln Schäden am Empfängergerewebe (Hill et al., 1997a; Hill et al., 1998), was zur Freisetzung weiterer Zytokine führt. Es entsteht ein Teufelskreis im Sinne eines Zytokinsturms. Die GvHD steht also mit der Stärke der vorausgegangenen Konditionierung, mit der Anzahl an reifen, reaktiven T-Zellen und mit der Zahl der Differenzen beim MHC bzw. der mHag in Zusammenhang.

Per Definitionem entsteht die akute GvHD bis Tag 100 nach Transplantation und lässt sich für die klassischen GvH-Organ Leber, Haut und Darm nach Schweregrad 0-IV klassifizieren (Glucksberg et al., 1974; Thomas et al., 1975). In der Regel erfordert die GvHD ab Grad II eine immunsuppressive Behandlung. Eine Möglichkeit, GvHD präventiv zu verhindern, ist die T-Zelldepletion aus Spenderzellen oder die Isolierung CD34 positiver Zellen vor Transplantation. Es zeigt sich allerdings, dass es dadurch häufiger zu einer Transplantatabstoßung und zu einem häufigeren Rezidiv bei maligner Grunderkrankung kommt (Hale and Waldmann, 1994). Durch die Depletion entfällt auch der Transplantat-gegen-Leukämie Effekt (graft-versus-leukemia = GvL), da T-Zellen im Transplantat auch residuelle, maligne Zellen angreifen und so die Entstehung eines Rezidivs verhindern (Falkenburg et al., 1993; Truitt and Johnson, 1995). Zur Prävention bzw. Therapie von GvHD werden Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, FK506, Mycophenolat oder Methotrexat (MTX) eingesetzt. Auch Antithymozyten Globulin (ATG) zur *in vivo* T-Zelldepletion wird zur Therapie erfolgreich verwendet. Der präventive Einsatz von Anti- $\text{TNF}\alpha$ Antikörpern führt zu einer verzögerten Entstehung der GvHD und bestätigt den Zusammenhang von konditionierungsbedingter Zytokinfreisetzung und früher akuter GvHD (Holler et al., 1995).

Ein weiteres Problem nach SZT sind pulmonale Komplikationen, die bei über 50% aller Patienten auftreten und entweder konditionierungsbedingt oder durch immunologische Reaktionen zu Lungenfibrosen, Bronchiolitis obliterans oder dem idiopathischen Pneumoniesyndrom (IPS) führen können (Holler et al., 2001b). Letzteres ist charakterisiert durch die Anwesenheit interstieller und alveolarer Pneumonitis sowie

interstieller Fibrose in Abwesenheit infektiöser Organismen (Shankar and Cohen, 2001) und macht über 50% aller pulmonalen Komplikationen aus (Cordonnier et al., 1986; Meyers et al., 1982; Weiner et al., 1989). Obwohl IPS mit der Entstehung klinischer und experimenteller GvHD assoziiert ist (Cooke et al., 1996; Crawford et al., 1993), konnte der kausale Zusammenhang zwischen den beiden Komplikationen noch nicht bewiesen werden.

1.3 Endothelschaden nach allogener SZT

Dem Endothel kommt im Rahmen der allogenen SZT eine besondere Bedeutung zu. Es bildet die erste Barriere, die die Zellen des infundierten Spendermarks überwinden müssen. Unter inflammatorischen Bedingungen ist das Endothel an der Kontrolle der Immunantwort beteiligt und hat damit einen Einfluss auf die Regulation der Zellmigration und auf die Zytokinfreisetzung (Eissner et al., 2000b; Holler et al., 1997; Lindner et al., 1997b). Komplikationen wie Mikroangiopathie (MA), erhöhte Kapillarpermeabilität (endothelial leakage syndrome = ELS) oder Lebervenenverschlusssyndrom (VOD) nach Transplantation stehen in direkten Zusammenhang mit endothelialer Dysfunktion. Dabei ist besonders die VOD eine gefürchtete, weil meist tödliche Frühkomplikation der allogenen SZT (Nurnberger et al., 1998; Salat et al., 1997; Scrobohaci et al., 1991). Außerdem ist das Endothel Zielgewebe von alloreaktiven Spender T-Zellen. Dies führt bei akuter wie chronischer GvHD zu endothelialem Schaden und schließlich zum Verlust von Mikrogefäßen (Biedermann et al., 2002). Nicht zuletzt sind aufgrund gemeinsamer Stammzellen die Bildung von Endothel und Hämatopoese eng miteinander verbunden.

Wie bereits erwähnt, spielt die Konditionierung des Empfängers eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der GvHD. Dies gilt auch in Bezug auf das Endothel, da ionisierende Bestrahlung, TNF α , IFN γ , LPS und Zell-Zell-Interaktionen großen Einfluss auf dieses Gewebe haben (Eissner et al., 1995; Eissner et al., 1996). In einer Vielzahl von Untersuchungen wird immer wieder auf Schäden am Endothel durch Konditionierung hingewiesen (Paris et al., 2001; Richard et al., 1996; Testa et al., 1996). Auch ergaben sich aus dem Studium der generalisierten MA erste Hinweise auf die endothelpathogene Rolle von TNF α in Assoziation mit akuter GvHD (Hintermeier-Knabe et al., 1992; Holler et al., 1990).

In einer ganzen Reihe von Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* konnte gezeigt werden, dass Bestrahlung Endothelzellen (EC) in einen Zustand überführt, der in der

Literatur als Aktivierung bezeichnet wird. Hierzu gehören vor allem die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (CD54, CD106, CD62E), die verstärkte Expression von MHC I und II Molekülen sowie die Bildung verschiedener Zytokine (Behrends et al., 1994; Eissner et al., 1996; Hancock, 1997). Hinzu kommt, dass ionisierende Bestrahlung auch Apoptose an Endothelien induzieren kann und dass der Schaden durch LPS verstärkt wird (Eissner et al., 1995; Fuks et al., 1994; Langley et al., 1997; Paris et al., 2001).

LPS ist in der Lage, die durch Bestrahlung und freigesetzte Zytokine geschädigte Darmmucosa zu passieren (Nestel et al., 1992). Hierbei ist TNF α einer der Hauptmediatoren von LPS. Die Expression von ICAM-1 auf EC durch Bestrahlung kann in Gegenwart von LPS verstärkt werden, was auch die erhöhte Adhäsion von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) zur Folge hat (Eissner et al., 1996). LPS verstärkt außerdem die Expression von Membran-TNF α (Eissner et al., 1995).

Auch die Modulation der Fas Ligand (FasL) Expression auf Endothelzellen hat einen Einfluss auf die inflammatorische Wirkung von Leukozyten (Sata and Walsh, 1999). FasL kann die Infiltration von T-Zellen und Makrophagen verhindern. TNF α reguliert die FasL Expression herunter und vermindert dadurch die Zytotoxizität der Endothelzellen gegenüber Leukozyten, die nun verstärkt ins Zielgewebe migrieren können (Sata and Walsh, 1998). Immunsuppressiva wie Cyclosporin A oder FK506 verringern ebenfalls die FasL Expression. Umgekehrt sind aber viele Immunsuppressiva selbst endotheltoxisch und können so die immunologisch und inflammatorisch induzierten Schäden verstärken (Holler et al., 1989; Kochi et al., 2000). In der Organtransplantation wird dieser Toxizität eine Bedeutung für die transplantationsassoziierte Arteriosklerose beigemessen (Sata and Walsh, 1999).

IFN γ spielt eine besondere Rolle während der Induktionsphase der GvHD, da es Monozyten aktiviert, MHC I und II induziert und somit eine gesteigerte Antigenpräsentation hervorruft. Aktivierte Makrophagen und Monozyten sezernieren vermehrt TNF α , IL-1 und IL-6 als pro inflammatorische Zytokine. In sehr hohen Dosen kann IFN γ in Kombination mit TNF α Endothelzellapoptose hervorrufen (Ruegg et al., 1998), in jedem Fall aber wirkt es synergistisch zu IL-1 und TNF α bei der Aktivierung von Endothel (Lechleitner et al., 1998).

Das IPS ist, wie bereits erwähnt, eine häufige Komplikation nach allogener SZT. In murinen Transplantationsmodellen konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen Endothelschaden und IPS besteht. Nach allogener SZT kommt es in der

Lunge zu endothelialem Schaden, der den pathologischen Veränderungen in diesem Organ vorangeht (Gerbitz et al., 2000). Der Schaden entsteht sowohl durch Konditionierung als auch durch Infiltration alloreaktiver T-Zellen. Neben dem Endothelschaden kommt es auch zu verstärkter Endothelproliferation. Die Blockierung von TNF α nach allogener SZT führt auch zur Verringerung des Endothelschadens und des Schadens der Lunge (Gerbitz et al., 2003).

In der Maus konnte weiterhin gezeigt werden, dass das IPS nicht ohne Konditionierung entstehen kann, die Entwicklung von IPS strahlungsdosisabhängig und die Kinetik gegenüber den klassischen GvHD Organen verzögert ist, d.h. das IPS tritt erst zu späteren Zeitpunkten als GvHD auf und ist mit erhöhter Zytokinexpression wie IL-1 β , TNF α , IL-12 und IFN γ assoziiert (Shankar et al., 1999). Andere Untersuchungen zeigen auch, dass die Anwesenheit von T-Zellen bei der Entwicklung von IPS zwingend ist (Cooke et al., 1996; Cooke et al., 1998; Shankar et al., 1998). Die LPS- und TNF α -Konzentration ist in der Spülflüssigkeit nach bronchoalveolärer Lavage (BAL) bei Mäusen mit IPS erhöht (Cooke et al., 2000b). Dies konnte auch bei Patienten mit IPS nachgewiesen werden (Clark et al., 1999). TNF α ist als kritischer Mediator von Lungenschäden anzusehen (Clark et al., 1998; Holler et al., 1990; Piguet et al., 1989). Daher kann der rechtzeitige Einsatz von TNF-Antikörpern sowohl den Endothelzellschaden als auch das Fortschreiten des IPS verhindern (Holler et al., 2001b).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Endothel während und nach SZT einer ganzen Reihe von synergistisch wirkenden Stimuli ausgesetzt ist. Dies führt zur Aktivierung des Gewebes (Cines et al., 1998) und zur direkten Schädigung der Endothelzellen durch Bestrahlung, allogene PBMC sowie zytotoxische Mengen an proinflammatorischen Zytokinen und LPS. Die Reaktion des Endothels auf diese Vorgänge ist organspezifisch und bisher nicht in allen Einzelheiten verstanden. Werden nach einer mehrtägigen Konditionierungsphase dem Empfänger Knochenmarkzellen infundiert, so finden sich diese in einer Umgebung wieder, die nicht nur "fremd", sondern auch in höchstem Maße aktiviert und dereguliert ist. Das Endothel vermittelt unter den beschriebenen Umständen den ersten Kontakt mit dem neuen Organismus und beeinflusst so die Reaktion auf den Organismus.

1.4 Hämoxygenase-1

Hämoxygenase (HO) ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym beim Abbau von Häm (Kitada et al., 2001). Es kommt dabei zu einer Oxygenierung von Häm unter Verwendung von NADPH und O₂. Dabei entsteht Eisen³⁺, Kohlenmonoxid (CO) und Biliverdin. Letzteres wird durch die Biliverdin-Reduktase mit Hilfe von NADPH als Reduktionsmittel zu Bilirubin reduziert. Bilirubin ist ein effektives Antioxidans und schützt den Körper vor Hydroperoxydradikalen. Das freigesetzte Eisen wird in Ferritinmolekülen gespeichert. CO ist wahrscheinlich als sekundärer Mediator an verschiedenen Stoffwechselfunktionen beteiligt (Stryer, 1994).

Derzeit sind drei Isoformen der HO charakterisiert (Petrache et al., 2000). HO-2 wird ubiquitär exprimiert, findet sich aber besonders im zentralen Nervensystem, in den Hoden und dem vaskulären System wieder (Sugishima et al., 2000). HO-3 wird ebenfalls konstitutiv exprimiert, hat aber nur eine geringe Affinität zu Häm. Die Bedeutung von HO-3 ist derzeit noch nicht geklärt (McCoubrey, Jr. et al., 1997; Scapagnini et al., 2002). HO-1 wird besonders in der Milz konstitutiv exprimiert, ist ansonsten aber durch diverse Stimuli induzierbar. Die Induktion kann z.B. durch Bestrahlung, Hyperoxie, Hypoxie, Wasserstoffperoxyd, Glutathion-Depletion und Endotoxine erfolgen (Bouton and Demple, 2000). Auch Häm als natürliches Substrat und andere Metalloporphyrine induzieren HO-1 (Shan et al., 2000; Woo et al., 1998), ebenso Zytokine wie IL-1 und IL-6 sowie TNF α (Cantoni et al., 1991; Lavrovsky et al., 1996). NO induziert die HO-1 Expression in Makrophagen und Fibroblasten (Alcaraz et al., 2000; Alcaraz et al., 2001; Bouton and Demple, 2000).

In den letzten Jahren zeigte sich in einer Reihe von Untersuchungen, dass die Induktion der HO-1 einen Schutzmechanismus gegenüber verschiedener Noxen wie Hämoglobin oder reinem Sauerstoff darstellt (Taylor et al., 1998; Willis et al., 1996). In der Maus vermittelt die HO-1 Induktion teilweise den antiinflammatorischen Effekt von IL-10 (Lee and Chau, 2002).

HO-1 Expression verzögert auch die Abstoßung kardialer Xenotransplantate unter immunsuppressiven Bedingungen (Sato et al., 2001). HO-1 ist dabei notwendig um vaskuläre Thrombosen zu verhindern und die Infiltration aktivierter Empfänger Leukozyten im Transplantat zu unterdrücken. Dabei wird die Apoptose von EC und Kardiomyozyten verhindert (Sato et al., 2001; Soares et al., 1998). HO-1 schützt

somit unter immunreaktiven Bedingungen, wie sie bei einer Xenotransplantation vorhanden sind, das Endothel vor Apoptose.

Untersuchungen an einer HO-1 defizienten Maus zeigen die Bedeutung von HO-1 (Poss and Tonegawa, 1997). Bei diesen Tieren ist eine hohe Mortalitätsrate nach 25 Wochen zu beobachten. Sie leiden ab diesem Zeitpunkt an starkem Gewichtsverlust und Anämie. Der Eisenspiegel im Serum ist sehr niedrig, dafür akkumuliert Eisen aber stark im Gewebe. Es kommt zu chronischen Entzündungen und Fibrosen. HO-1 Defizienz im Menschen führt u.a. zu Wachstumsverzögerung, Asplenie, verstärkter Erythrozytenfragmentation und intravaskulärer Hämolyse (Yachie et al., 1999). Dadurch kommt es zu einer erhöhten Zirkulation fragmentierter und verbrauchter Erythrozyten, die besonders das vaskuläre Endothel schädigen können. Die Abwesenheit der HO-1 Aktivität kann also die Anfälligkeit für Stimuli wie oxidativen Stress erhöhen und damit eine Kaskade inflammatorischer Reaktionen und Endothelschäden in Gang setzen.

1.5 Zielsetzung

Arbeiten von Gerbitz et al. (Gerbitz et al., 2000) zeigen, dass es in murinen Transplantationsmodellen zu einem Lungenendothelschaden sowohl durch Konditionierung als auch durch alloreaktive T-Zellen kommt. Andererseits konnte bei Transplantation solider Organe nachgewiesen werden, dass Endothelschaden durch Überexpression von HO-1 verhindert werden kann (Soares et al., 1998). Ziel dieser Arbeit ist nun, Strategien zur Prävention und Therapie endothelialer Schäden nach allogener SZT zu entwickeln.

Auf diesen Ergebnissen basierend soll nun untersucht werden, ob

a) der EC Schaden durch Induktion von HO-1 begrenzt werden kann und bei allogener SZT mit Hilfe der HO-1 Induktion eine GvHD Prävention möglich ist.

- *In vitro* wird der Einfluss der HO-1 auf Endothelzellen untersucht. Können Metalloporphyrine in Endothelzellen HO-1 induzieren, ist die Induktion dosisabhängig und kann die Induktion von HO-1 Endothelzellen vor bestrahlungsinduzierter Apoptose schützen?
- *In vivo* soll zum einen geprüft werden, ob die HO-1 Induktion in einem murinen haploidenten Transplantationsmodell vor GvHD schützt. Dabei wird das Überleben und eine mögliche GvHD Reduktion untersucht. Zum anderen soll der Einfluss von *in vivo* induzierter HO-1 auf einzelne Zellpopulationen (wie Makrophagen und Leukozyten), die eine besondere Bedeutung bei der GvHD haben, in Bezug auf Zytokinsekretion untersucht werden.

b) der EC Schaden bei allogener SZT mit Hilfe einer zellulären Therapie verringert werden kann, indem gesunde EC bereitgestellt werden. Da in der Lunge der EC Schaden nach allogener SZT bereits nachgewiesen wurde, soll dieses Organ primär für diese Untersuchungen herangezogen werden.

- Es soll untersucht werden, ob eine Transplantation von Endothelzellen möglich ist. Die Spenderendothelzellen sollen aus dem gleichen Zuchtstamm wie das restliche Transplantat stammen, so dass keine allogenen T-Zell stimulierenden

Eigenschaften zu erwarten sind. Sie können folglich gegenüber dem Knochenmark nicht als allogen gewertet werden.

- Dafür sollen Endothelzellen aus der Lunge isoliert, charakterisiert, *ex vivo* expandiert und anschließend zusammen mit Knochenmark als Stammzellquelle in letal bestrahlte Mäuse transplantiert werden. Die Endothelzellen sollen aus GFP transgenen Mäusen isoliert werden, damit sie im Empfänger leicht zu verfolgen sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Zentrifugen: Biofuge Fresco	Heraeus, Osterode
Megafuge 3.0R	Heraeus, Osterode
Biofuge Pico	Heraeus, Osterode
Cytospin 3	Shandon, Manchester UK
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim/Main
Bestrahlungsgerät für Mäuse Primus	Siemens
Bestrahlungsgerät für Zellen IBL437C	CISbio International, Gif-Sur-Yvette F
Brutschrank BBD6220	Heraeus, Osterode
Mikroskop Wilovert S LL	Hund, Wetzlar
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss, Oberkochen
Kamera AxioCam	Zeiss, Oberkochen
Blottingapparatur Fast Blot B34	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer Minigel Twin	Biometra, Göttingen
Rotationsständer REAX2	Heidolph, Schwabach
Schüttler KS250 basic	IKA Labortechnik
Power Supply Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Vortex Genie2	Scientific Industries
Mikrotom Frigocut 2800-E	Reichert Jung, Wetzlar
Wasserbad Lauda E100	NeoLab, Heidelberg
pH-Meter pH538	WTW, Weilheim
Sterilbank Herasafe HS18	Heraeus, Osterode
Thermoblock BT 1303	Merck Eurolab, Darmstadt; HLC
Elisareader Emax	MWG-Biotech, Ebersberg
Microplate Scintillation counter Topcount	Packard Canberra, Dreieich
Microtiterplate washer ELx 50	Packard Canberra, Dreieich

Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickison, Heidelberg
FACS Star plus Cell Sorter	Becton Dickison, Heidelberg
Magnet zur Säulenisolierung OctoMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach

2.1.2 Materialien

Zellsiebe 70µm	Falcon, Heidelberg
Petrischalen (35x10, 60x15, 100x15 mm)	Falcon, Heidelberg
Spritzen (1, 5, 10, 20, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen (0,4; 0,9; 1,2 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Butterflykanülen (0,8 mm)	Abbott, Sligo IRE
Polypropylenröhrchen (15, 50 ml) Blue Max	Falcon, Heidelberg
Objektträger Superior	Menzel Gläser, Braunschweig
Super Frost® Plus Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
Deckgläser (24x24 mm, 24x50 mm)	Carl Roth, Karlsruhe
Polystyrolröhrchen (Rundboden, 5 ml) FACS	Falcon, Heidelberg
Zellkulturflaschen (25, 75 cm ²)	Corning Costar, Wiesbaden
sterile Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Corning Costar, Wiesbaden
96-Lochplatten Zellkultur (Flacher Boden)	Corning Costar, Wiesbaden
Nitrocellulose-Membran (Poren 0,45 µm) Protran BA85	Schleicher und Schuell, Dassel
Gel Blotting Papier GB003	Schleicher und Schuell, Dassel
ECL Filme Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
pH-Indikatorstäbchen (pH 6,5-10)	Merck Eurolab, Darmstadt
Plastikförmchen Tissue Tek® Cryomold	Sakura Finetek, Zoeterwoude NL
MACS Separationssäulen (MS, LS)	Miltenyi, Bergisch Gladbach

2.1.3 Medien und Zusätze

RPMI 1640 (E15-039)	PAA Laboratories, Cölbe
DMEM mit NEAA (10938-025)	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe

fötales Rinderserum (FCS) (10270-106)	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
200 mM Glutamin (25030-032)	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
10 mg/ml Penicillin/0,85% Streptomycin (15140-122)	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
100 mM Natriumpyruvat (11360-039)	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
1M HEPES (15630-049)	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
100x NEAA (11140-035)	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
50 mM 2-Mercaptoethanol (31350-010)	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
EC growth supplement (C-30120)	Promocell, Heidelberg
5000 U/ml Heparin (Liquemin® N25000)	Roche, Basel CH
Dimethylsulfoxid (DMSO, 99,7%) (109678)	Merck Eurolab, Darmstadt

2.1.4 Chemikalien

Gelatine (G-9391)	Sigma, Taufkirchen
EDTA 99,5% (ED455)	Sigma, Taufkirchen
DAPI (236276)	Roche, Basel CH
Tris-Hydrochlorid (90903)	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl p.a. (106404)	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumazid reinst 99% (106688)	Merck Eurolab, Darmstadt
PMSF (15.971-9)	Aldrich, Taufkirchen
BSA Fraktion V (1400) (A-7888)	Biomol, Hamburg Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS) (A-3678)	Sigma, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS) (L-5750)	Sigma, Taufkirchen
Glycin (G-7403)	Sigma, Taufkirchen
6-Amino-hexanoic-acid (A-7824)	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver Naturaflor	Töpfer GmbH, Dietmannsried
Cobalt(III) Protoporphyrin IX (CoPP) (Co654-9)	Frontier Scientific, Canforth UK
Zinn(IV) Protoporphyrin IX (SnPP) (Sn749-9)	Frontier Scientific, Canforth UK
Zink(II) Protoporphyrin IX (ZnPP) (Zn625-9)	Frontier Scientific, Canforth UK

Glycerin (G-5516)	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau (111732)	Merck Eurolab, Darmstadt
Bicinchinonsäure (B-9643)	Sigma, Taufkirchen
Cu(II)SO ₄ (4% w/v) (C-2284)	Sigma, Taufkirchen
Methyl- ³ H-Thymidin (MT6032)	Amersham Biosciences, Freiburg

2.1.5 Enzyme + Inhibitoren

Collagenase H (1074059)	Roche, Basel CH
Dispase II (165859)	Roche, Basel CH
Trypsin/EDTA (25200-056)	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
Aprotinin (236624)	Roche, Basel CH
Leupeptin (1017128)	Roche, Basel CH
Natriumorthovanadat (159664)	ICN, Aurora USA
Natiumfluorid (S-1504)	Sigma, Taufkirchen

2.1.6 Lösungen und Puffer

Türks Lösung (109277)	Merck Eurolab, Darmstadt
PBS ohne Mg/Ca (BE17-512F)	Cambrex BioScience, Verviers B
Laemmlipuffer(2x) (S-3401)	Sigma, Taufkirchen
Aceton p.a. (100014)	Merck Eurolab, Darmstadt
Methanol p.a. (106009)	Merck Eurolab, Darmstadt
Isopropanol p.a. (109634)	Merck Eurolab, Darmstadt
HCl (37%) (100317)	Merck Eurolab, Darmstadt
NaOH (1N) (K021.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamidlösung (30%) (3029.1)	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED p.a. (2367.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Nonidet P40 (10%) (1332473)	Roche, Basel CH
Tween 20 (P-1379)	Sigma, Taufkirchen
ECL Detection Kit (RPN2106)	Amersham Biosciences, Freiburg
Einbettmedium Tissue Tek® O.C.T.™	

Compound (4583)	Sakura Finetek, Zoeterwoude NL
Fluoreszenz Mounting Medium (2627)	DAKO, Hamburg
Hämatoxylin (MHS-128)	DAKO, Hamburg
Eosin (HT-110-2-32)	DAKO, Hamburg

2.1.7 Antikörper, Seren und Marker

Ratte α Maus CD31 (Klon: MEC13.3)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte α Maus Panendothelial antigen (Klon: MECA32)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte α Maus CD106 (Klon: 429)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte α Maus CD45 (Klon: 30.F11)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte α Maus CD3 ϵ (Klon: 145-2c11)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte α Maus CD80 (Klon: 16-10A1)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte α Maus CD86 (Klon: GL1)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte α Maus Gr-1 (Klon: RB6-8C5)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte α Maus CD11b (Klon: M1/70)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte α Maus H-2K ^b (Klon: AF6-88.5)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte α Maus I-A ^b (Klon: AF6-120.1)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kaninchen α Maus β -Actin (A-2066)	Sigma, Taufkirchen
Kaninchen α Maus Hämoxygenase-1 (SPA-895)	StressGen, Victoria CAN
GSL-IsolektinB4 (B-1205)	Vector Laboratories, Burlingame USA
Ratte IgG 2a (Klon: R35-95)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte IgG 2b ^k (Klon: A95-1)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ziege α Ratte-F(ab) ₂ -PE-Cy5 (Klon: YW 62.8)	Cedarlane, Hornby CAN
Ziege α Ratte-Ig-PE (ARI4407)	Biosource, Camarillo USA
Schwein α Kaninchen-Ig-FITC (F0205)	DAKO, Hamburg
α Biotin-HRP (7075)	Cell Signaling (New England Biolabs), Frankfurt/Main
Ziege α Kaninchen-Ig-HRP (P0448)	DAKO, Hamburg

Ziegenserum (X0907)	DAKO, Hamburg
Kaninchenserum (X0903)	DAKO, Hamburg
Benchmark Protein Leiter (10748-010)	Invitrogen, Karlsruhe
Biotinylierter SDS-PAGE Marker (161-0319)	Biorad, Hercules USA
Dil-AcLDL (L-3484)	Molecular Probes, Leiden NL
Mouse lineage panel (559971)	Becton Dickinson, Heidelberg
Streptavidin Microbeads (130-048-101)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Anti-PE Microbeads (130-048-801)	Miltenyi, Bergisch Gladbach

2.1.8 Mäusstämme

C57/Bl6 N	Charles River, Sulzbach
B6D2F1 (C57/Bl6 x DBA)	Charles River, Sulzbach
C57/Bl6-GFP (Okabe et al., 1997)	Eigene Zucht
B6D2F1-GFP	Eigene Zucht

2.2 Methoden

2.2.1 Transplantation

2.2.1.1 Isolierung von murinen Milzzellen

Eine Maus wird euthanasiert, die Milz herauspräpariert und bis zur weiteren Verarbeitung in einer Petrischale mit 5 ml RPMI/5% FCS auf Eis gelagert. Unter sterilen Bedingungen wird die Milz zwischen zwei sterilen Objektträgern zerrieben und in eine Petrischale mit 10 ml RPMI/5% FCS überführt. Es erfolgt eine weitere Vereinzelung der Zellen mit einer 10 ml Spritze und einer 0,9 mm Kanüle. Die Zellsuspension wird über ein Zellsieb in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt. Die Petrischale wird zweimal mit 5 ml RPMI/5% FCS gespült und die Lösung ebenfalls über das Zellsieb in das Polypropylenröhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation mit 1200 rpm für 10 Min. bei 4°C wird der Überstand dekantiert, die Zellen in 3 ml Erylyse-puffer resuspendiert und für 2 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Zugabe

von 17 ml RPMI/5% FCS wird erneut zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in 10 ml RPMI/5% FCS resuspendiert.

Für die Bestimmung der Zellzahl werden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau gemischt und mit einer Neubauer Zählkammer gezählt.

Erylysepuffer:	NH ₄ Cl	90 ml	(0,16 M)	
	Tris	10 ml	(0,2 M)	pH 7,65
	sterilfiltriert			

2.2.1.2 Isolierung von murinen Knochenmarkzellen

Femur und Tibia der Hinterläufe einer Maus werden herauspräpariert, das restliche Muskelfleisch mit einem Skalpell vollständig abgeschabt und die Knochen bis zur weiteren Verarbeitung in einer Petrischale mit 5 ml RPMI/5% FCS auf Eis gelagert. Unter sterilen Bedingungen werden die Enden der Knochen mit einer sterilen Schere abgeschnitten und die so freigelegten Knochenmarkkanäle mit RPMI/5% FCS (10 ml Spritze und 0,4 mm Kanüle) durchgespült. Das herausgedrückte Knochenmark wird in einer Petrischale aufgefangen und die Zellen mit einer Spritze und einer 0,9 mm Kanüle vereinzelt. Anschließend wird die Zellsuspension über ein Zellsieb in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt. Die Petrischale wird zweimal mit 5 ml RPMI/5% FCS gespült und die Lösung ebenfalls über das Zellsieb in das Polypropylenröhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation mit 1200 rpm für 10 Min. bei 4°C wird der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 8 ml RPMI/5% FCS resuspendiert.

Für die Bestimmung der Zellzahl werden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Türkölösung gemischt und mit einer Neubauer Zählkammer gezählt.

2.2.1.3 Injektion von Knochenmark- und Milzzellen

Für die Transplantation wird die gesamte benötigte Zahl an Knochenmark- und Milzzellen pro Gruppe berechnet. Diese Mengen an Knochenmark- und Milzzellen werden zusammenpipettiert, zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen werden in soviel L15 Leibovitz-Medium aufgenommen, dass pro Maus 250 µl injiziert werden können. Die Injektion erfolgt mit einer 1 ml Spritze und einer 0,4 mm Kanüle in die Schwanzvene der Maus.

Bei Transplantation von Endothelzellen werden isolierte und kultivierte Endothelzellen der Knochenmark-/Milzzellsuspension hinzugefügt.

2.2.1.4 Bestrahlung der Mäuse

Die Mäuse werden in Abhängigkeit vom Versuchsaufbau mit 2x600 bis 2x700 cGy (150cGy pro Min.) im Abstand von 3-4 Std. bestrahlt. Anschließend erfolgt die Transplantation.

2.2.1.5 Bewertung der GvHD

Die Beurteilung des Gesundheitszustandes der Mäuse nach der Transplantation erfolgt nach einem von (Cooke et al., 1996) eingeführten Schema (**Tabelle 2-1**). Dabei werden der Zustand des Fells und der Haut, sowie Haltung, Mobilität und Gewicht der Mäuse berücksichtigt. Auf einer Skala von 0-2 pro Kriterium erhält man einen maximalen Wert von 10, bei dem die Tiere ein maximales Krankheitsbild zeigen würden.

Nach den Tierschutzbestimmungen dürfen Tiere bei den durchgeführten Versuchen nicht übermäßig leiden. Bei dem hier verwendeten Transplantationsmodell (C57Bl6 → B6D2F1) kommt es nach Konditionierung mit hohen Bestrahlungsdosen und Transplantation mit T-Zellen zu einer erheblichen Belastung für die Tiere und führt zu starkem Gewichtsverlust, einer fulminanten GvH Reaktion und letztlich zum Tod. Das Bewertungsschema für die GvHD wird daher als Abbruchkriterium herangezogen. Erreichen die Tiere einen Wert von ≥ 6 , ist die GvHD schon so stark ausgeprägt, dass der Tod der Tiere zu erwarten ist. Daher werden die Tiere ab einem GvHD Wert von 6 unverzüglich euthanasiert und dieser Tag als Todestag in der Überlebensgrafik angegeben (siehe **Abb. 3-13**).

Kriterium	Grad 0	Grad 0,5 - 1	Grad 1,5 - 2
Gewichtsverlust	< 10%	Grad 1: > 10% bis < 25%	Grad 2: > 25%
Haltung	Normal	bucklig im Sitzen	stark bucklig, beeinträchtigt Bewegung
Mobilität	Normal	leicht bis mittelstark verringert	regungslos außer bei Stimulation
Felltextur	Normal	leicht bis mittelstarke Sträubung	starke Sträubung/ungepflegt
Haut	Normal	schuppig an Pfote/Schwanz	sichtbare Areale entblößter Haut

Tabelle 2-1: Bewertung der klinischen GvHD. Nach Cooke et al., 1996

2.2.2 Einbetten von Organen

Zur Herstellung von Gewebeschnitten müssen die Organe zunächst aus den Tieren entfernt, in einem Einbettmedium (Tissue Tek[®] O.C.T.[™] Compound) eingebettet und schockgefroren werden. Hierfür werden die Tiere zunächst getötet, aufgeschnitten und die Organe vorsichtig dem Körper entnommen. Überschüssiges Blut wird abgetupft und das Organ in ein mit Einbettmedium gefülltes Plastikförmchen gelegt. Das Gewebe wird mit Einbettmedium überschichtet und das Förmchen in ein mit 2-Methylbutan gefülltes und in flüssigem Stickstoff gekühltes 50 ml Polypropylenröhrchen geschoben. 2-Methylbutan hat den Vorteil, dass der Schmelzpunkt bei -160°C liegt und damit nicht so kalt ist wie Stickstoff (-196°C). Dadurch wird das Gewebe schonender eingefroren, und es kommt zu geringeren Schäden während des Einfriervorgangs. Das Röhrchen wird in flüssigen Stickstoff gelegt. Dabei friert das Gewebe in dem Medium sofort durch. Anschließend werden die Organe bis zur endgültigen Lagerung bei -80°C auf Trockeneis gelegt.

Für die Herstellung von Paraffinblöcken werden die entnommenen Organe zunächst in 3-5%iger Formalinlösung gelagert. Anschließend werden sie in Plastikförmchen eingebettet, in heißem Paraffin eingegossen und bei RT gelagert.

2.2.3 Gewebeschnitte

Kryoschnitte: Die eingebetteten Organe werden zunächst von -80°C auf -20°C erwärmt, da sich die Blöcke sonst nur schlecht schneiden lassen. Mit einem Kältemikrotom werden sie $5\text{ }\mu\text{m}$ dick geschnitten und auf Objektträger gezogen. Die Schnitte werden anschließend bis zur immunhistochemischen Markierung bei -80°C gelagert.

Paraffinschnitte: Die eingebetteten Organe werden am Mikrotom $5\text{ }\mu\text{m}$ dick geschnitten und auf Objektträger gezogen. Die Schnitte werden bei RT gelagert. Vor Verwendung der Schnitte wird das restliche Paraffin bei ca. 80°C abgeschmolzen.

2.2.4 Beschichtung von Zellkulturflaschen und Schalen mit Gelatine

Für die Gelatinebeschichtung werden 1-6 ml einer 2%igen Gelatinelösung (abhängig von der Größe des Gefäßes) in die Flaschen oder Schalen pipettiert und für 2 Std. inkubiert. Nach Abnahme der Lösung werden die Gefäße mit PBS gespült und im Kühlschrank bis zur Benutzung gelagert. Die benutzte Gelatinelösung kann wieder verwendet werden.

2%ige Gelatinelösung:

2 g Gelatine werden in 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst und autoklaviert.

2.2.5 Kernmarkierung: Einsatz von 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

Für Apoptoseinduktionsversuche werden $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ Zellen in Zellkulturschalen ($35 \times 10 \text{ mm}$) ausgesät. 24 Std. nach der Apoptoseinduktion wird das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Methanol/Aceton (1:1) für 2 Min. fixiert. Danach werden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Die Ränder der Schalen werden mit einem Tuch trocken gewischt und $50\text{ }\mu\text{l}$ der verdünnten DAPI-Lösung in die Mitte der Schale pipettiert. Anschließend wird ein Deckglas ($24 \times 24 \text{ mm}$) in die Schale gelegt und die Zellen bis zur Aufnahme der Fotos am Mikroskop (Okular und Objektiv: $\times 10$ Vergrößerung) im Kühlschrank im Dunkeln aufbewahrt.

DAPI-Stocklösung: 0,1 mg/ml in PBS

Verdünnte DAPI-Lösung: Stocklösung 1:200 verdünnt mit Glycerin/PBS (1:3) = 0,5µg/ml

2.2.6 Zellen

- bEnd2 murine Endotheliomzelllinie aus dem Gehirn (von PD. Dr. G. Eissner zur Verfügung gestellt)
- bEnd3 murine SV129 Endotheliomzelllinie (Fa. ECAAC, Nr. 96091929)
- primäre Lungenendothelzellen isoliert aus murinen Lungenlappen
- Primärzellen aus der murinen Leber
- primäre Peritonealmakrophagen

2.2.7 Zellkultur

2.2.7.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung erfolgt bei allen Zellen im Inkubator bei 37°C, 5% Kohlendioxidgehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Alle verwendeten Zellen sind adhärent und werden bei 80-90%iger Konfluenz passagiert.

Medium für bEnd2/bEnd3:	500 ml	DMEM mit NEAA
	1%	Glutamin
	1%	Natriumpyruvat
	1%	Penicillin/Streptomycin
	10%	FCS
	50µM	2-Mercaptoethanol

Medium für Makrophagen/Leberzellen:

500 ml	RPMI 1640
1%	Penicillin/Streptomycin
10%	FCS

Lungenendothelmedium:	500 ml	DMEM mit NEAA
	2 mM	200 mM Glutamin
	1%	Penicillin/Streptomycin
	1 mM	100 mM Na-Pyruvat
	20 mM	1M HEPES
	1%	100x NEAA
	5 µM	50 mM 2-Mercaptoethanol
	20%	FCS
	150µg/ml	EC growth supplement
	12 U/ml	5000 U/ml Heparin

Für das Passagieren von bEnd- und Lungenendothelzellen wird das Medium entfernt, die Zellen werden mit 2-5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1-2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 20 Sekunden bis 1 Min. bei 37°C inkubiert. Dabei lösen sich die Zellen von der Oberfläche der Flasche oder Schale. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgt durch eine 1:5 Verdünnung mit serumhaltigem Medium. Die Zellsuspension wird in ein Polypropylenröhrchen überführt, bei 1400 rpm und RT für 5 Min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden in Medium resuspendiert und 1:5 bis 1:20 in neue Zellkulturflaschen oder Schalen ausgesät.

2.2.7.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zum Auftauen werden Zellen aus dem flüssigen Stickstoff oder dem -80°C kalten Tiefkühlschrank in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und nach dem Antauen in warmes Kulturmedium pipettiert. Nach Zentrifugation bei 1400 rpm und RT für 5 Min. wird der Überstand verworfen, die Zellen in frischen Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt. 3-5 Std. nach der Aussaat wird das Medium erneut gewechselt.

Zum Einfrieren werden die konfluenten Zellen trypsiniert, gezählt und in soviel Einfriermedium resuspendiert, dass die Zelldichte bei ca. 4×10^6 Zellen pro ml liegt. Nach Überführen der Suspension in Kryoröhrchen wird sie in einer Einfrierbox bei -80°C langsam eingefroren und für längerfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium: 70% Medium mit FCS
20% FCS
10% Dimethylsulfoxid

2.2.7.3 Nachweis von Mycoplasmen

Zelllinien werden in zweimonatlichen Abständen auf Mycoplasmenkontamination mit Hilfe des Mycoplasma Detection Kit (Roche) überprüft.

2.2.8 Westernblot

2.2.8.1 Herstellung von Zelllysaten

Dieses Protokoll wird zur Herstellung von Gesamtzelllysaten verwendet.

Lösungen

- TBS-Stammlösung (2x)

			Endkonzentration
pH 8,0	Tris/HCl	4,8 g	(40 mM)
	NaCl	18 g	(0,3 mM)
	EDTA	0,74 g	(2 mM)
	Na-Azid	50 mg	(0,05%)
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml	
- Nonidet P40

10% (Fertiglösung von Fa. Roche)

Proteasehemmer

- PMSF-Stammlösung PMSF 1,74 g (100 mM)
(Phenylmethylsulfonylfluorid) Isopropanol ad 100 ml
- Aprotinin-Stammlösung Aprotinin 10 mg/ml in H₂O_{dest.}
(lagern bei -20°C)
- Leupeptin-Stammlösung Leupeptin 0,5 mg/ml in H₂O_{dest.}
(lagern bei -20°C)

Phosphatasehemmer

- Thyrosin-Hemmer Na-Orthovanadat 500 mM in H₂O_{dest.}
(zum Lösen 5 Min. aufkochen lassen)
- Threonin/Serin-Hemmer NaF 200 mM in H₂O_{dest.}

Waschpuffer

		Endkonzentration
TBS (2x)	5 ml	
PMSF	100 µl	(1 mM)
Aprotinin	2 µl	(2 µg/ml)
Leupeptin	10 µl	(0,5 µg/ml)
Vanadat	10 µl	(0,5 mM)
NaF	10 µl	(0,2 mM)
H ₂ O _{dest.}	ad 10 ml	

Lysepuffer

		Endkonzentration
TBS (2x)	5 ml	
PMSF	100 µl	(1 mM)
Aprotinin	2 µl	(2 µg/ml)
Leupeptin	10 µl	(0,5 µg/ml)
Vanadat	10 µl	(0,5 mM)
NaF	10 µl	(0,2 mM)
Nonidet	1 ml	(1%)
H ₂ O _{dest.}	ad 10 ml	

Allgemeine Bemerkungen

Angaben bei der Durchführung der Zellyse sind auf ca. 10 Mio Zellen bezogen, bei weniger Zellen wird entsprechend weniger Lysepuffer und bei der Proteinbestimmung eine geringere Verdünnung eingesetzt. Es sollten mindestens 3 Mio Zellen verwendet werden, da sonst das Protein nicht für mehrere Westernblots reicht. Alle Arbeiten müssen auf Eis und mit kalten Lösungen durchgeführt werden.

Gesamtzelllysate

Zellen werden geerntet und abzentrifugiert (1400 rpm, 5 Min., 4°C). Sie werden 2-3x mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen, dabei in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 3000 rpm für 5 Min. bei 4°C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wird der Überstand vollständig abgesaugt und das Zellpellet in 140 µl Lysepuffer aufgenommen und kurz aufgeschüttelt (bei ~ 3 Mio Zellen 80 µl Lysepuffer nehmen). Es erfolgt eine Inkubation auf Eis für 30 Min., anschließend wird bei 13000 rpm zentrifugiert, 4°C für 15 Min., größere Zelltrümmer, Zellkerne und Membranfragmente sedimentieren dabei. Der Überstand (130 µl oder 70 µl bei 80 µl eingesetztem Lysepuffer) wird in neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 10 µl des Überstandes werden für Proteinbestimmung eingesetzt, der Rest wird mit Laemmli-Puffer (2x) 1:1 vermischt, bei 95°C für 5 Min. gekocht und anschließend bei -20°C gelagert. Die Proben sind nun für den Westernblot einsatzbereit.

Zytosolische Lysate

Zur Herstellung zytosolischer Lysate werden die Zellen mit einem Homogenisator aufgeschlossen. Hierbei werden Mitochondrien und Zellkerne nicht zerstört, so dass nur Proteine aus dem Zytosol extrahiert werden.

Puffer:

		Endkonzentration
1 M HEPES	200 µl	(20 mM)
1 M KCl	100 µl	(10 mM)
1 M MgCl ₂	15 µl	(1,5 mM)
0,1 M EDTA	100 µl	(1 mM)
0,2 M EGTA	50 µl	(1 mM)
0,1 M PMSF	100 µl	(1 mM)
10 mg/ml Aprotinin	2 µl	(2 µg/ml)
0,5 mg/ml Leupeptin	10 µl	(0,5 µg/ml)
0,5 M Na-Orthovanadat	10 µl	(0,5 mM)
0,2 M NaF	10 µl	(0,2 mM)
H ₂ O _{dest.}	9,5 ml	
	pH-Wert mit 1M NaOH auf 7,4 - 7,5 einstellen	

Bohrer: Fa. Xenox
Motorhandstück Typ 2.35

Die vorbereiteten Zellen werden geerntet und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 Min. bei 4°C wird der Überstand abpipettiert und das Pellet mit 1 ml Puffer gewaschen. Das Pellet wird in 350 µl Puffer resuspendiert und mit einem Bohrer 1 Min. lang homogenisiert. Es folgt wieder ein Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 15 Min. Der Überstand (330 µl) wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 10 µl des Überstandes werden für die Proteinbestimmung eingesetzt, der Rest wird mit der gleichen Menge Laemmli-Puffer (2x) versetzt und bei 95°C für 5 Min. gekocht. Die Proben sind nun für den Westernblot bereit.

2.2.8.2 Bestimmung des Proteingehaltes in den Zelllysaten

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wird Bicinchoninsäure (BCA) eingesetzt. Dabei werden Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen im alkalischen Milieu reduziert (Biuret-Reaktion). Es kommt dann zur Cu^{1+} -Chelatbildung mit zwei Molekülen BCA. Dieser Komplex zeigt eine starke Absorption bei 562 nm, welche linear mit steigender Proteinkonzentration ist. Die Absorption kann in einem Bereich zwischen 540 und 590 nm gemessen werden.

Es werden für die Proteinbestimmung 200 µl BCA/CuSO_4 -Lösung in einer 96 Lochplatte vorgelegt und 10 µl der verdünnten Proben oder der Proteinstandards hinzugefügt. Die Platte wird bei 37°C für 30 Min. inkubiert. Nach Abkühlen wird die optische Dichte bei 540 nm gemessen und die Proteinkonzentration der Proben über die Standards bestimmt.

Lösungen: Bicinchoninsäure
 CuSO_4 -Lösung 4% (w/v)
 BCA/CuSO_4 -Lösung: 5 ml BCA + 100 µl CuSO_4 -Lösung
 Proteinstandards: BSA in PBS 8/4/2/1/0,5/0,25/0,125 mg/ml

2.2.8.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-Page

Lösungen

- Acrylamid-Lösung 30%ige Stammlösung
- Tris/HCl für Untergel (1,5M) 90,83 g pH 8,8
ad 500 ml H₂O bidest
- Tris/HCl für Obergel (0,5M) 30 g pH 6,8
ad 500 ml H₂O bidest
- Ammoniumpersulfat APS (10%) 100 mg
ad 1 ml H₂O bidest
- SDS-Stammlsg. (10%) 10 g
ad 100 ml H₂O bidest
- Elektrodenpuffer (1x) 9 g Tris
45 g Glycine
3 g SDS
ad 3 l H₂O bidest
- TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
- Glycerin 99%ig
- Laemmli-Probenpuffer (2x) Sigma

2.2.8.4 Herstellung der Gele und elektrophoretische Auftrennung der Proteine

- Untergel

Gelkonzentration	12%	15%
30%ige Acrylamid-Lösung	16 ml	20 ml
1,5 M Tris/HCl	10 ml	10 ml
Glycerin	6,6 ml	4,6 ml
H ₂ O bidest	7 ml	5 ml
10%iges SDS	400 µl	400 µl
TEMED	40 µl	40 µl
10%iges APS	120 µl	120 µl

Die Gelkonzentration bezieht sich auf Acrylamidmenge

- Obergel (10%ig)

30%ige Acrylamid-Lösung	2,6 ml
Tris/HCl (0,5 M)	4,0 ml
Glycerin	4,0 ml
H ₂ O bidest	4,4 ml
SDS (10%)	40 µl
TEMED	40 µl
APS (10%)	80 µl

Zuerst wird 1,5 cm vom oberen Plattenrand der zusammengesetzten Glasplatten eine Markierung gesetzt. Sie zeigt an, wie weit das Untergel gegossen werden muss. Das Untergel wird bis zu der Markierung gegossen und mit Isopropanol überschichtet. 1 Std. nach dem Gießen ist das Gel auspolymerisiert. Isopropanol wird entfernt, die Oberfläche des Gels mit H₂O gespült, das Obergel über das Untergel geschichtet und ein Kamm zur Taschenbildung zwischen die Glasplatten geschoben. Nach Auspolymerisieren (etwa 1 Std.) wird der Kamm entfernt und das Gel in die

Elektrophoresekammer eingesetzt. Es wird mit Elektrodenpuffer aufgefüllt. Es werden je nach Bedarf 10-40 µg Protein (max. 20 µl) und Proteinmarker in die Taschen pipettiert. Nicht benötigte Taschen werden mit Laemmli-Puffer (1x) gefüllt. Der Vorlauf des Obergels erfolgt bei 70V für ca. 30 Min., der Lauf des Untergels bei 120-145V. Die Elektrophorese ist beendet, wenn das Bromphenolblau aus dem Laemmli-Puffer den unteren Rand der Gelplatten erreicht hat.

2.2.8.5 Blotting von Proteinen

Lösungen

- Kathodenpuffer C **pH 7,6**

Tris	1,51 g
6-Amino-hexanoic-acid	2,62 g (4 mM)
Methanol	100 ml (20%)
H ₂ O bidest	ad 500 ml

- Anodenpuffer B **pH 10,4**

Tris	1,51 g
Methanol	100 ml
H ₂ O bidest	ad 500 ml

- Anodenpuffer A **pH 10,4**

Tris	18,16 g
Methanol	100 ml
H ₂ O bidest	ad 500 ml

Membranen

Nitrocellulose - in Anodenpuffer B schwenken

Durchführung

Filterpapiere (Whatman 3MM) werden auf die Größe des Gels (ca. 6 x 9 cm) zurecht geschnitten (ebenso die Membran), mit Blotpuffer getränkt, in folgender Reihenfolge in die Blotkammer gelegt und mit einer Pipette luftblasenfrei gerollt:

- 3 Filterpapiere in Anodenpuffer A
- 3 Filterpapiere in Anodenpuffer B
- Membran in Anodenpuffer B
- Gel in Anodenpuffer B getränkt und luftblasenfrei aufgelegt, etwas Anodenpuffer B(I) darauf geträufelt und mit den Fingern glattgestrichen
- 5 Filterpapiere in Kathodenpuffer C
- Blotten: $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche (bzw. Filterpapiergröße)
je kleines Gel (6 x 9 cm): 44 mA
30 - 35 Min.

2.2.8.6 Antikörpermarkierung*Lösungen*

Endkonzentration

- | | | | |
|----------------|------------------|------------|----------|
| • TBS (2x) | pH 7,4 | | |
| | Tris/HCl | 9,7 g | (40 mM) |
| | NaCl | 35,1 g | (300 mM) |
| | H ₂ O | ad 2000 ml | |
| • TBS-Tween | pH 7,4 | | |
| | TBS (2x) | 1000 ml | |
| | Tween 20 | 2 ml | (0,1%) |
| | H ₂ O | 1000 ml | |
| • Blocklösung: | Magermilchpulver | 5 g | (5%) |
| | TBS-Tween | 100 ml | |

Durchführung

Die Membran wird nach dem Blotten für 1 Std. bei RT mit Blocklösung inkubiert, anschließend 2x mit TBS-Tween gewaschen, und dann in eine 50 ml Spritze hineingeschoben.

5 - 7 ml der mit dem primären Antikörper versetzten Blocklösung werden in die Spritze pipettiert und die Spritze verschlossen. Anschließend wird die Spritze auf einem Rotationsständer angebracht, so dass bei der Rotation die geringe Flüssigkeitsmenge die gesamte Membran benetzen kann. Auf diese Weise wird die AK-Menge gering gehalten. Die Inkubation erfolgt für 1 Std. bei RT oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wird dann 3x für 10 Min. in TBS-Tween auf einem Schüttler gewaschen. Die Inkubation des sekundären Antikörpers (mit HRP gekoppelt) erfolgt für 1 Std. bei RT. Danach wird 3x für 10 Min. auf einem Schüttler in TBS-Tween gewaschen.

Lösungen

- TBS (2x) **pH 7,4**

Tris/HCl	9,7 g (40 mM)
NaCl	35,1 g (300 mM)
H ₂ O	ad 2000 ml

- TBS-Tween **pH 7,4**

TBS (2x)	1000 ml
Tween 20	2 ml (0,1%)
H ₂ O	1000 ml

- Blocklösung:

Magermilchpulver	5 g (5%)
TBS-Tween	100 ml

- Antikörper Primärantikörper 1:500 -1:2000 verdünnt in Blocklösung
Sekundärantikörper 1:1000 verdünnt in Blocklösung,
gekoppelt mit Horseradishperoxidase (HRP)

Detektion mit ECL

Die Detektion der mit Antikörper markierten Proteinbanden erfolgt mit Hilfe eines ECL-Detektion Kits (Amersham). Hierfür werden die ECL-Färbelösungen A + B kurz vor der Entwicklung 1:1 (4 ml + 4 ml) gemischt. Die Membran soll kurz abtropfen, dann wird sie in die ECL-Lösung für 1 Min. gelegt. Dabei wird gleichmäßig geschwenkt. Die Membran soll erneut kurz abtropfen und in einer Folie in eine Filmkassette gelegt werden. In der Dunkelkammer wird ein ECL-Film aufgelegt, 1-5 Min. belichtet und anschließend entwickelt.

2.2.9 Resuspension von Protoporphyrin IX

Alle Arbeiten müssen in stark gedämpftem Licht stattfinden, da Protoporphyrine sehr lichtempfindlich sind. Ebenso sind Protoporphyrin-Salze nur geringe Zeit stabil in verdünnten alkalischen oder neutralen Lösungen und müssen grundsätzlich frisch angesetzt werden. Aus diesem Grund sollte auch zügig während der Resuspension gearbeitet werden.

Für *in vivo* Versuche:

Die abgewogene Menge wird in 100 µl NaOH (150 mM) aufgelöst. Dann erfolgt die Zugabe von soviel PBS, dass eine 125 µg/250 µl Lösung entsteht. Es wird die Klarheit der Lösung geprüft: Dafür wird ein Aliquot in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und die Kristallbildung überprüft. Dann erfolgt die Zugabe von HCl (37%) bis die Lösung im neutralen pH-Bereich ist. Die pH-Wertbestimmung erfolgt mit Indikatorstäbchen. Dabei darf die Lösung nicht sauer werden, da die Protoporphyrine im Sauren auskristallisieren.

Für *in vitro* Versuche:

Die abgewogene Menge wird in 100 µl NaOH (150 mM) aufgelöst. Dann erfolgt die Zugabe von soviel PBS, dass eine 10mM Lösung entsteht. Es wird wie beim Lösen für *in vivo* Versuche die Klarheit der Lösung geprüft. Die Lösung wird nicht neutralisiert, da die Mengen, die in die Zellkulturschalen pipettiert werden, so gering sind, dass das Medium noch in der Lage ist den alkalischen pH-Wert zu puffern.

Zugaben der 10 mM Lösung zur Zellkultur pro ml Medium:

Endkonzentration	Pipettierte Menge
20 μ M	2 μ l
50 μ M	5 μ l
100 μ M	10 μ l

Molekulargewicht der einzelnen Salze:

10 mM Lösung		
CoPP	MG 654,5	2 mg in 306 μ l
ZnPP	MG 625,6	2 mg in 319 μ l
SnPP	MG 749	2 mg in 267 μ l

2.2.10 Bestimmung von Zytokinen und LPS

Aus dem Serum von Mäusen und den Kulturüberständen von *in vitro* stimulierten Zellen werden $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$, IL-12 und IL-10 Mengen mit kommerziell erhältlichen ELISA-Tests (alle Biosource; Nivelles, Belgium; $\text{IFN}\gamma$: Endogen; Woburn MA, USA) bestimmt. Die Durchführung erfolgt entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Die Serumproben werden 1:2 verdünnt, die Kulturüberstände werden unverdünnt eingesetzt.

Die Quantifizierung von LPS im Serum erfolgt mit dem QCL 1000 Test entsprechend dem Protokoll des Herstellers (BioWhittaker; Walkersville, USA).

2.2.11 Hämatoxylin/Eosin Färbung

Paraffinschnitte werden zuerst in Xylol für 10 Min., dann in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 100%, 90%, 70%, 50%, 30%) für jeweils 5 Min. und schließlich zweimal in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült. Danach werden die Schnitte für 5-20 Min. mit Hämatoxylin gefärbt, wobei die Zeit abhängig von der Färbekraft des Hämatoxylins ist. Die Schnitte werden 5-10 Min. mit warmem Leitungswasser gebläut und 2 Min. in Eosinlösung (mit einigen Tropfen Essigsäure) erneut gefärbt. Nach zweimaligem Spülen mit kaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ werden die Schnitte über die aufsteigende Alkoholreihe bis hin zum Xylol wieder entwässert und mit Eindeckmedium eingedeckt.

2.2.12 Immunfluoreszenzuntersuchungen - Nachweis von Antikörpern

2.2.12.1 Durchflusszytometrische Analyse

Grundlagen

Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen. Das Durchflusszytometer erlaubt die gleichzeitige Messung von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen an einzelnen Zellen (Raffael, 1988).

Zellen werden hierfür mit Fluorochromen behafteten Antikörpern markiert und die Zellsuspension aus dem Proberöhrchen über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt. Trifft Licht auf die Zellen, wird der Strahl in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Zellen gestreut. Als Lichtquelle für die Messung dient ein Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Das Durchflusszytometer unterscheidet zwischen:

- a) Vorwärtsstreulicht (engl. forward light scatter, FSC) entlang der Achse des einfallenden Lichtes, welches ein Maß für die Größe der Zellen darstellt.
- b) Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter, SSC), das im 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen wird und Aussagen über die intrazelluläre Granularität erlaubt.
- c) Fluoreszenzintensität, bei denen das Fluorochrom der markierten Zellen durch den Laser angeregt wird, und die Energie in Form von Licht einer anderen, höheren Wellenlänge emittiert wird. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes ist abhängig vom eingesetzten Fluorochrom: Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) beispielsweise emittiert Licht bei 525 nm, Phycoerythrin (PE) emittiert Licht bei 576 nm.

Soweit nicht anders angegeben, werden während der Messung 10000 Zellen analysiert. Die Versuche werden am Durchflusszytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des Programms "Cellquest".

Durchführung

Vorbereitete Zellen werden in 1 ml PBS/10% FCS aufgenommen und gezählt. Es werden so viele Zellen in ein Röhrchen überführt, wie für alle Ansätze mit dieser Zellsorte benötigt werden. Im günstigsten Falle werden 1 Mio Zellen pro FACS-Ansatz verwendet. Die Zellen werden 5 Min. bei 1400 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in Anzahl der Ansätze x 100 µl PBS/10% FCS/5% Serum

(des Tieres, aus dem der sekundäre Antikörper - oder bei direkt konjugierten Antikörpern das Serum des Tieres, aus dem dieser Antikörper - stammt) resuspendiert. Inkubiert wird für 30 Min. im Kühlschrank. Je 100 µl Suspension werden auf die Röhrchen verteilt. Danach erfolgt die Zugabe des primären Antikörpers. Üblicherweise werden 0,5 - 1 µg Antikörper pro Mio Zellen eingesetzt (nach Herstellerangaben). Die Inkubation erfolgt für 30 Min. im Kühlschrank.

Nach Zugabe von 1 ml PBS/10% FCS pro Röhrchen wird zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet erneut in 100 µl PBS/10% FCS aufgenommen. Es wird der sekundäre Antikörper zupipettiert und für 30 Min. im Kühlschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS/10% FCS gewaschen und für die Analyse in 1 ml PBS/10% FCS aufgenommen. Bei direkt konjugierten primären Antikörpern wird ohne Zugabe eines weiteren Antikörpers zweimal mit je 1 ml PBS/10% FCS gewaschen und das Pellet in 1 ml PBS/10% FCS für die durchflusszytometrische Analyse resuspendiert. Stehen für die Analyse weniger als 1 Mio Zellen zur Verfügung, wird das Pellet in entsprechend weniger Puffer aufgenommen.

2.2.12.2 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

Es werden adhärente Zellen (bzw. Zytospinpräparate) untersucht. Die Zellen werden zweimal mit 2 ml (bzw. 400 µl) PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml (bzw. 400 µl) Methanol/Aceton (1:1) für 2 Min. oder mit Paraformaldehyd (2% in PBS) für 5 Min. fixiert. Die Zellen werden erneut zweimal mit PBS gewaschen und mit 2 ml (bzw. 400 µl) PBS/10% FCS/5% Serum (der Spezies, aus der der sekundäre Antikörper stammt, oder bei direkt konjugierten Antikörpern der Spezies, aus der der primäre Antikörper stammt) für 30 Min. bei RT geblockt. Das Serum wird anschließend entfernt und die Zellen mit 150 µl (bzw. 50 µl) des primären Antikörpers (in PBS/10% FCS) inkubiert. Zytospins werden bei RT für 1 h, adhärente Zellen in Schalen bei 37°C für 45 Min. inkubiert. Es wird zweimal mit PBS bei Zytospins und mit PBS/10% FCS bei adhärenenten Zellen gewaschen. Danach erfolgt die Zugabe von 150 µl (bzw. 50 µl) des sekundären Antikörpers, inkubiert wird für Zytospins 1 Std. bei RT im Dunkeln, für adhärente Zellen 30 Min. bei 37°C. Die Zellen werden nochmals mit PBS gewaschen und mit 50 µl (bzw. 20 µl) Fluoreszenz Mounting Medium eingedeckt.

Die Fluoreszenzuntersuchung erfolgt am Mikroskop:

PE oder TRITC mit Rhodaminfilter (Ex. 488 nm, Em. 578)

FITC mit FITC-Filter (Ex. 488 nm, Em. 525 nm)

2.2.12.3 Immunhistologische Untersuchungen

Eingesetzt werden Kryo-Gewebeschnitte. Die Schnitte werden zunächst mit 50 µl PFA (2% in PBS) für 5 Min. bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend werden sie mit PBS gewaschen und mit 50 µl PBS/10% FCS/5% Serum (der Spezies, aus der der sekundäre Antikörper stammt, oder bei direkt konjugierten Antikörpern der Spezies, aus der der primäre Antikörper stammt) für 30 Min. bei RT geblockt. Die Schnitte werden erneut mit PBS gewaschen. Danach erfolgt die Zugabe von 50 µl des sekundären Antikörpers, inkubiert wird für 1 Std. bei RT im Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wird ein Tropfen Fluoreszenz Mounting Medium auf die Schnitte gegeben und mit Deckgläschen eingedeckt.

Die Fluoreszenzuntersuchung erfolgt ebenfalls am Mikroskop.

2.2.12.4 LDL-Aufnahme

Zum Nachweis der Aufnahme von Dil-AcLDL werden 20000 Zellen in 400 µl Medium auf Glasobjektträger (für Zellkultur behandelt) mit 8-Kammer-Aufsatz ausgesät. Wenn die Zellen adhärent sind, werden 10µg/ml Dil-AcLDL hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Std. bei 37°C wird der Überstand verworfen, die Zellen werden zweimal mit je 400 µl PBS gewaschen und mit 400 µl Formalin (10%) für 5 Min. fixiert. Die Zellen werden erneut zweimal mit je 400µl PBS gewaschen und der Kammeraufsatz entfernt. Pro Kammer werden 20 µl Glycerin/PBS (1+3) pipettiert und mit Deckgläschen eingedeckt.

Die Fluoreszenzuntersuchung erfolgt am Mikroskop mit Rhodaminfilter.

2.2.13 Zellisolierung

2.2.13.1 Isolierung von Peritonealmakrophagen

Um eine größere Zahl an Makrophagen zu erhalten, werden der Maus 24 Std. vor Isolierung 250 µl PBS intraperitoneal injiziert.

Zur Isolierung von Peritonealmakrophagen wird die Maus euthanasiert, anschließend 10 ml PBS ins Peritoneum einer Maus injiziert und kräftig gespült. Die Lösung soll

dann dort 1 Minute lang verweilen, dabei wird immer wieder leicht geklopft, damit sich die Zellen lösen. Danach wird das PBS wieder herausgezogen. Die Suspension wird in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt und bei 1200 rpm und 4°C für 7 Min. zentrifugiert. Die Zellen werden mit 5 ml PBS/10%FCS gewaschen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.13.2 Isolierung von CD45 positiven Leberzellen

Es wird ein Leberlappen einer Maus entnommen und in PBS gelagert. Unter sterilen Bedingungen wird der Leberlappen kurz mit PBS gespült, in einer Petrischale in 2 mm³ große Blöcke mit einem sterilen Skalpell geschnitten und in ein Polypropylenröhrchen mit 10 ml Collagenase H in PBS (1mg/ml) überführt. Die Inkubation erfolgt für 30 Min. bei 37°C im Wasserbad, dabei soll alle 5-10 Min. resuspendiert werden. Das verdaute Gewebe wird durch ein Zellsieb gegeben, um noch unverdautes Gewebe zu entfernen. Nach Zentrifugation bei 1400 U/min für 10 Min. bei 4°C wird noch einmal mit 10 ml PBS/10% FCS gewaschen. Es wird die Zellzahl bestimmt und 50 Mio Zellen werden in ein neues Gefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation wird das Zellpellet in 1 ml PBS/10% FCS resuspendiert und für 30 Min. im Kühlschrank inkubiert. Es werden dann 50 µl CD45 Antikörper hinzugefügt und erneut 30 Min. inkubiert. Danach werden 9 ml PBS/0,5% FCS dazu pipettiert und mit 1400 rpm für 5 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 450 µl PBS/0,5% FCS resuspendiert und 50 µl Anti PE-Microbeads dazu gegeben. Nach einer Inkubation für 15 Min. im Kühlschrank wird wieder zentrifugiert, die Zellen mit 1 ml PBS/0,5% FCS gewaschen und das Pellet in 500 µl PBS/0,5% FCS aufgenommen. Eine Magnetsäule (Miltenyi) wird mit 500 µl PBS/0,5% FCS äquilibriert und die Zellsuspension auf die Säule pipettiert. Nach Durchlaufen der Suspension wird die Säule dreimal mit 500 µl PBS/0,5% FCS gewaschen, anschließend vom Magneten genommen und auf ein 15 ml Polypropylenröhrchen gesetzt. Die Zellen werden zweimal mit je 1 ml PBS/0,5% FCS von der Säule gespült, die Suspension zentrifugiert und mit 1 ml PBS/0,5% FCS gewaschen. Anschließend erfolgt die Zellzahlbestimmung.

2.2.13.3 Isolierung von GFP positiven Lungenendothelzellen

1. Tag: Isolierung von Lungenzellen

2 Lungen (von einer C57/Bl6-GFP-Maus und einer Wildtyp-Maus) werden folgendermaßen isoliert:

Die Lunge und das Herz einer Maus werden freigelegt und eine 1,2 mm Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt. Eine Butterflykanüle wird in den rechten Ventrikel eingeführt und die Lunge über diese Kanüle mit ca. 5 ml PBS gespült (Blut und PBS sollte über die 1,2 mm Kanüle abfließen). Nach anschließender Perfusion mit 5 ml Collagenase H/Dispase II (1mg/ml bzw. 2mg/ml) werden die Lungenlappen entnommen und in PBS gelagert. Unter sterilen Bedingungen werden die Lungenlappen kurz in 70% Ethanol geschwenkt, mit PBS gespült, mit einem sterilen Skalpell in einer Petrischale in 2 mm³ große Blöcke geschnitten und schließlich in ein Polypropylenröhrchen mit 10 ml Collagenase H/Dispase II in PBS (1mg/ml bzw. 2mg/ml) überführt. Die Inkubation erfolgt für 30-45 Min. bei 37°C im Wasserbad, dabei soll alle 5-10 Min. resuspendiert werden. Das verdaute Gewebe wird durch ein Zellsieb gegeben, um noch unverdautes Gewebe zu entfernen. Nach Zentrifugation bei 1400 U/min für 10 Min. bei 4°C wird noch zweimal mit je 5 ml PBS/10% FCS gewaschen. Die Zellen einer Lunge werden in einer mit Gelatine beschichteten 75cm² Zellkultur Flasche ausgesät und für zwei Tage in Lungenendothelmedium kultiviert.

3. Tag: LDL Aufnahme

Nach Entfernen des Mediums werden die adhärennten Zellen zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA ca. 1 Min. trypsinisiert. Nach Zugabe von 8 ml PBS/10% FCS wird die Zellsuspension in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt, die Flasche mit 5 ml PBS/10% FCS gespült, diese Suspension ebenfalls in das Röhrchen überführt und bei 1200 U/min für 7 Min. bei RT zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml Lungenendothelmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

GFP positive Zellen: 1/5 der Zellen werden in eine 25 cm² Zellkulturflasche mit 2 ml Medium, der Rest der Zellen in eine zweite Flasche mit 2 ml Medium überführt.

GFP negative Zellen: Die Zellen werden gleichmäßig auf 2 Flaschen mit je 2 ml Medium verteilt.

In die Flasche mit den meisten GFP positiven Zellen und in eine der Flaschen mit GFP negativen Zellen werden jeweils 20 µl Dil-AcLDL gegeben.

Man hat dann 4 Flaschen:

ohne GFP

ohne GFP, mit LDL

mit GFP

mit GFP und LDL

Die Inkubation erfolgt für 4 Std. oder über Nacht bei 37°C.

Markierung mit Anti-CD45

Nach Entfernen des Mediums werden die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin/EDTA ca. 30 sek. trypsinisiert und nach Zugabe von 4 ml PBS/10% FCS in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt. Die Flasche wird mit 5 ml PBS/10% FCS gespült, die Lösung ebenfalls in das Röhrchen überführt und bei 1200U/min für 7 Min. bei RT zentrifugiert.

Zellen ohne GFP und ohne LDL werden in 1 ml PBS/10% FCS aufgenommen und auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Alle anderen Zellen werden in je 1 ml PBS/10% FCS aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zentrifugation erfolgt bei 2500 rpm für 5 Min. bei 4°C in einer Eppendorf Zentrifuge. Die Pellets werden in 100 µl Ziegenserum (10%ig in PBS) resuspendiert. Die GFP und LDL positiven Zellen (= Sortprobe) werden in 200µl aufgenommen. Es erfolgt eine Inkubation für 30 Min. im Kühlschrank.

Prim. AK-Zugabe (1 µl):Ratte-Anti-Maus CD45 (Sortprobe: 2 µl)

Isokontrolle Ratte

Die Inkubation erfolgt erneut für 30 Min. im Kühlschrank. Nach Zugabe von 1 ml PBS/10% FCS wird mit 2500 U/min für 5 Min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in 100 µl PBS/10% FCS (Sortprobe: 200 µl) resuspendiert.

Sek. AK-Zugabe (2 µl): Ziege-Anti-Ratte-F(ab)₂-PE-Cy5 (Sortprobe: 4 µl)

Es erfolgt eine Inkubation für 30 Min. im Kühlschrank. Nach Zugabe von 1 ml PBS/10% FCS wird erneut zentrifugiert, die Zellen mit 1 ml PBS/2mM EDTA gewa-

schen, das Pellet mit 1 ml PBS/2mM EDTA resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt.

Bei der Sortprobe wird die Zellsuspension über ein Zellsieb in das FACS-Röhrchen pipettiert, das Eppendorfgesäß nochmals mit 1 ml PBS/2mM EDTA gespült und die Lösung ebenfalls über das Sieb in das FACS-Röhrchen gegeben.

Man hat dann 5 Ansätze:

ohne GFP/ohne LDL/Iso Ratte	= Iso
ohne GFP/ohne LDL/CD45	= CD45
ohne GFP/LDL/Iso Ratte	= LDL
mit GFP/ohne LDL/Iso Ratte	= GFP
mit GFP/mit LDL/CD45	= Sortprobe

Die ersten 4 Ansätze werden für die Einstellung des Sortgerätes benötigt. Bei der Sortprobe werden die $\text{LDL}^+/\text{CD45}^-$ Zellen in 2 ml Lungenendothelmedium (siehe 2.2.7.1) hineinsortiert. 10^5 Zellen pro 2 ml Medium werden in eine gelatine-beschichtete Zellkulturschale (35x10 mm) überführt und im Brutschrank kultiviert.

Die Bedienung des Zellsortierers erfolgte durch Frau Marit Hoffmann (Abteilung für Pathologie, Uniklinikum Regensburg)

PBS/2mM EDTA:

0,2 M EDTA-Lösung:	0,744 g	EDTA
	10 ml	PBS
	pH 7,4 mit $\text{HCl}_{\text{konz.}}$ einstellen	
2 mM EDTA-Lösung:	0,5 ml	0,2 M EDTA
	49,5 ml	PBS
	sterilfiltrieren	

2.2.13.4 Isolierung von CD3 positiven Milzzellen durch Negativseparation

Bei der Negativseparation über Magnetsäulen werden alle unerwünschten Zellen mit Antikörpern markiert und verbleiben in der Säule, während die benötigten Zellen ohne Manipulation durch die Säule laufen und als "Negativfraktion" gesammelt werden.

Es wird 1 ml Collagenase H Lösung (1 mg/ml RPMI 1640) in die Milz injiziert und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Die verdaute Milz wird anschließend vorsichtig zwischen zwei Objektträgern zerdrückt, die Zellen mit einer Pipette weiter vereinzelt und die Zellsuspension über ein 70 µm Zellsieb filtriert. Die Zellen werden dann für 10 Min. bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert und mit PBS/10% FCS gewaschen. 50 Mio dieser Zellen werden in ein neues Gefäß überführt und mit 1 ml PBS/10% FCS für 30 Min. bei 4°C inkubiert. Es erfolgt die Zugabe von je 100 µl biotinylierten B220, Gr-1, CD11b und TER119 Antikörper (BD, Mouse lineage panel) und eine weitere Inkubation für 15 Min. bei 4°C. Nach Zugabe von 9 ml PBS/0,5% FCS wird erneut zentrifugiert und das Zellpellet in 450 µl PBS/0,5% FCS + 50 µl Streptavidin Microbeads (Miltenyi) resuspendiert. Nach 15 Min. Inkubation bei 4°C werden die Zellen über äquilibrierte Magnetsäulen isoliert. Der Durchlauf enthält die CD3 positiven Zellen, die mit 2 ml PBS/10% FCS gewaschen werden. Die Zellen können nun für die weiteren Versuche eingesetzt werden.

2.2.13.5 Zytospins

Zur Herstellung von Zytospins werden 5×10^4 Zellen in 200 µl PBS/10% FCS aufgenommen und in einer Zytospinzentrifuge auf einen Objektträger mit 1200 rpm für 5 Min. bei RT zentrifugiert. Die Zytospins können bei 4°C gelagert werden oder für längere Lagerzeit bei -20°C.

2.2.14 LPS – Stimulation CD45 positiver Leberzellen

Medium: RPMI 1640
 10% FCS
 1% Glutamin
 1% Penicillin/Streptomycin
 1% nicht essentielle Aminosäuren

Es werden 10^5 Zellen in 100 µl Medium aufgenommen und in eine 96 Lochplatte (flacher Boden) pipettiert. 12 Std. später werden 100 µl LPS haltiges Medium (200 ng/ml) zu den Zellen pipettiert, so dass die Endkonzentration von LPS 100 ng/ml entspricht.

24 Std. nach Stimulation werden 100 µl Überstand entnommen und bis zur Zytokinbestimmung bei -80°C gelagert.

2.2.15 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

Medium: RPMI 1640
 10% FCS
 1% Penicillin/Streptomycin

Es werden 1×10^5 Stimulatorzellen (CD45 positive Leberzellen) und 2×10^5 Effektorzellen (CD3 positive Milzzellen) jeweils in 50 µl Medium resuspendiert und zusammen in eine 96 Lochplatte (flacher Boden) pipettiert. Die Stimulatorzellen werden zuvor mit 30 Gy bestrahlt. Nach 48 Std. erfolgt ein halber Mediumwechsel. Zusätzlich werden 0,037 MBq ^3H -Thymidin in 10 µl Medium pro Loch pipettiert. Nach weiteren 18 Std. wird die Proliferation mit einem Szintillationszähler gemessen.

2.2.16 Statistik

Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Für die statistische Analyse der *in vitro* Daten wurde der nichtparametrische Mann-Whitney U-Test angewendet. Bei parametrischen Tests wie dem Student's t-Test werden Normalverteilung und gleiche Standardabweichungen der betrachteten Gruppen vorausgesetzt. Dies war bei einigen Experimenten nicht gegeben. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Die Überlebenskurven der transplantierten Tiere wurde mit Hilfe des Kaplan-Meier Tests geschätzt und der Mantel-Cox log-rank Test zur Analyse der Überlebenswerte verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Schutz von Endothelien durch HO-1

3.1.1 *In vitro* Untersuchungen zur Induktion von HO-1

Bestrahlung führt zur Aktivierung und Induktion von Apoptose bei Endothelzellen (Behrends et al., 1994; Eissner et al., 1995). Andererseits schützt die Induktion von HO-1 das Endothel vor Apoptose bei inflammatorischen und alloreaktiven Vorgängen (Abraham et al., 1995; Soares et al., 1998). Es sollte nun untersucht werden, ob die Induktion von HO-1 durch Protoporphyrine in Endothelzellen zum Schutz vor Apoptose nach Bestrahlung führt.

3.1.1.1 Induktion von HO-1 durch Metalloporphyrine und der Einfluss auf bestrahlungsinduzierte Apoptose

Verschiedene Metalloporphyrine können HO-1 induzieren, trotzdem wirken sie in Abhängigkeit vom Metallion aktivierend oder inhibierend auf das Enzym. Eisenprotoporphyrin IX (FePP = Häm) und Kobaltprotoporphyrin IX (CoPP) aktivieren HO-1. Im Gegensatz dazu hemmen Zinnprotoporphyrin IX (SnPP) und Zinkprotoporphyrin IX (ZnPP) kompetitiv die HO-1 (Rodgers et al., 1996).

Um die Induktion in unserem Endothelmodell zu verifizieren, wurden bEnd2 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen CoPP und SnPP für 24 Std. inkubiert. Anschließend wurde aus den Zellen Lysate hergestellt und die Proteinexpression im Westernblot überprüft. Um zu gewährleisten, dass bei allen Lysaten die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde, wurde β -Aktin in allen Westernblots mit überprüft. β -Aktin ist das Produkt eines so genannten 'housekeeping' Gens, dass für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion notwendig ist und in allen Zellen konstitutiv in gleichen Mengen exprimiert wird. Es ist damit eine geeignete interne Kontrolle bei semiquantitativer Bestimmung eines anderen Proteins.

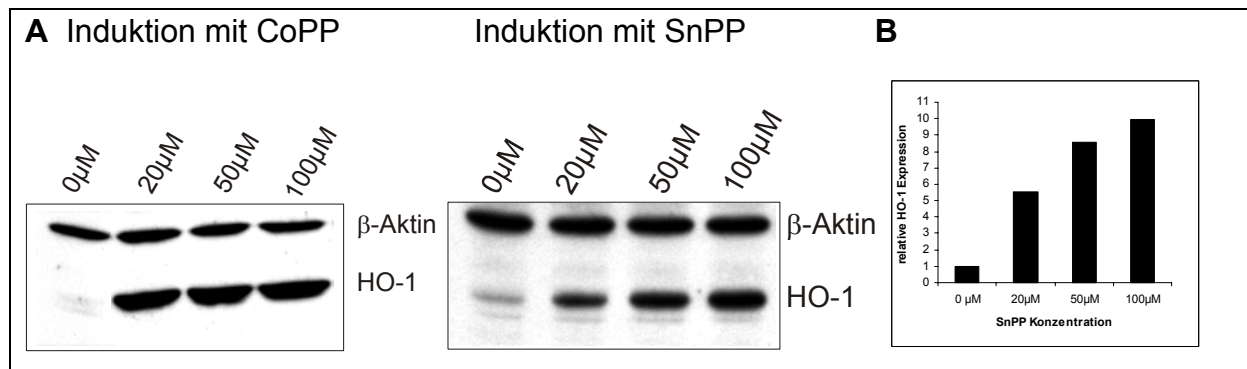


Abb. 3-1: Westernblotanalyse zum Nachweis der HO-1 Induktion in bEnd2 Zellen. Mit den Zelllysaten erfolgte eine Westernblot Analyse mit Nachweis auf HO-1 und β -Aktin als Kontrollprotein. **A:** bEnd2 wurden 24 Std. mit CoPP oder SnPP inkubiert (Kontrolle: Inkubation mit PBS). **B:** Relative HO-1 Expression in bEnd2-Zellen nach Stimulation mit SnPP.

Es zeigte sich, dass bEnd2 Zellen ohne Stimulation keine HO-1 exprimieren. Die Zugabe von CoPP oder SnPP in die Zellkultur führte dann schon in geringen Konzentrationen zu einer Expression von HO-1 (**Abb. 3-1A**). Bei der Induktion mit SnPP stieg die HO-1 Expression mit steigender SnPP Konzentration an (**Abb. 3-1B**). Bei Inkubation mit CoPP ließ sich bei gleichen Konzentrationen eine maximale Induktion bereits ab 20μM feststellen. Insgesamt kam es bei Inkubation mit CoPP zu einer stärkeren Expression von HO-1 als bei der Induktion mit SnPP.

Interessanterweise exprimiert die Endothelzelllinie bEnd3 auch ohne Stimulation geringe Mengen an HO-1 (**Abb. 3-2A**), die Expression wurde allerdings bei Stimulation mit CoPP um das 1,4 bis 2,3 fache gesteigert (**Abb. 3-2B**).

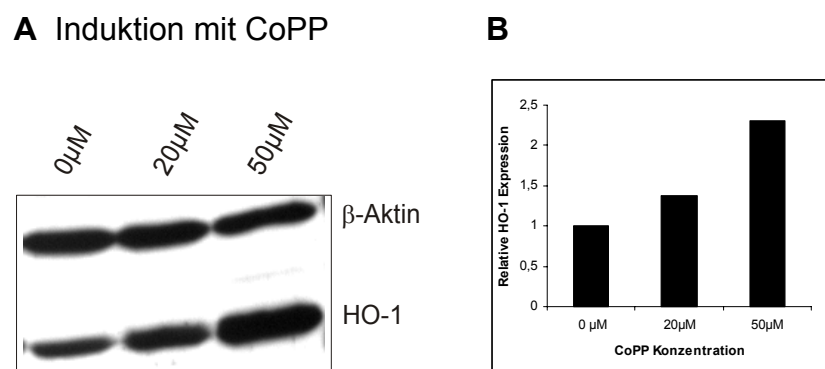


Abb. 3-2: Westernblotanalyse zum Nachweis der HO-1 Induktion in bEnd3 Zellen. Mit den Zelllysaten erfolgte eine Westernblot Analyse mit Nachweis auf HO-1 und β -Aktin als Kontrollprotein. **A:** bEnd3 wurden 24 Std. mit CoPP inkubiert (Kontrolle: Inkubation mit PBS statt CoPP). **B:** Relative HO-1 Expression in bEnd3-Zellen nach Stimulation mit CoPP.

Es sollte nun überprüft werden ob die HO-1 Induktion mit CoPP in Endothelzellen vor bestrahlungsinduzierter Apoptose schützt und ob dieser Effekt bei Induktion mit SnPP verhindert wird.

Bestrahlung führt bei Endothelzellen (und anderen Zellen) zur Apoptose. Dabei kommt es zu einer Reihe von Veränderungen in der Zelle. Neben der Ausstülpung von Phosphatidylserin an die äußere Seite der Zellmembran, der DNA-Fragmentierung in 180 Basenpaar große Stücke durch entsprechende DNasen (Hengartner, 2000) und der Aktivierung proapoptotischer Enzyme wie Caspasen kommt es auch zur Ausschleusung von DNA aus dem Zellkern in Form von Bläschen (Friedman, 2002). Diese Bläschen sind bei einer Kernmarkierung mit DAPI im Fluoreszenzmikroskop leicht zu beobachten (Lindner et al., 1997a). Je mehr Zellen Bläschen bilden, desto höher ist auch die Apoptoserate.

Für den Versuch wurden bEnd2 Zellen für 24 Std. mit CoPP bzw. SnPP (und PBS als Kontrolle) inkubiert und anschließend mit verschiedenen Dosen bestrahlt. Die höchste Bestrahlungsdosis wurde mit 8 Gy festgelegt, da Werte über 8 Gy zu Nekrose in bEnd2 Zellen führte. Nach weiteren 24 Std. wurden die Zellen fixiert, die DNA DAPI markiert und apoptotische Zellkerne im Mikroskop ausgezählt.

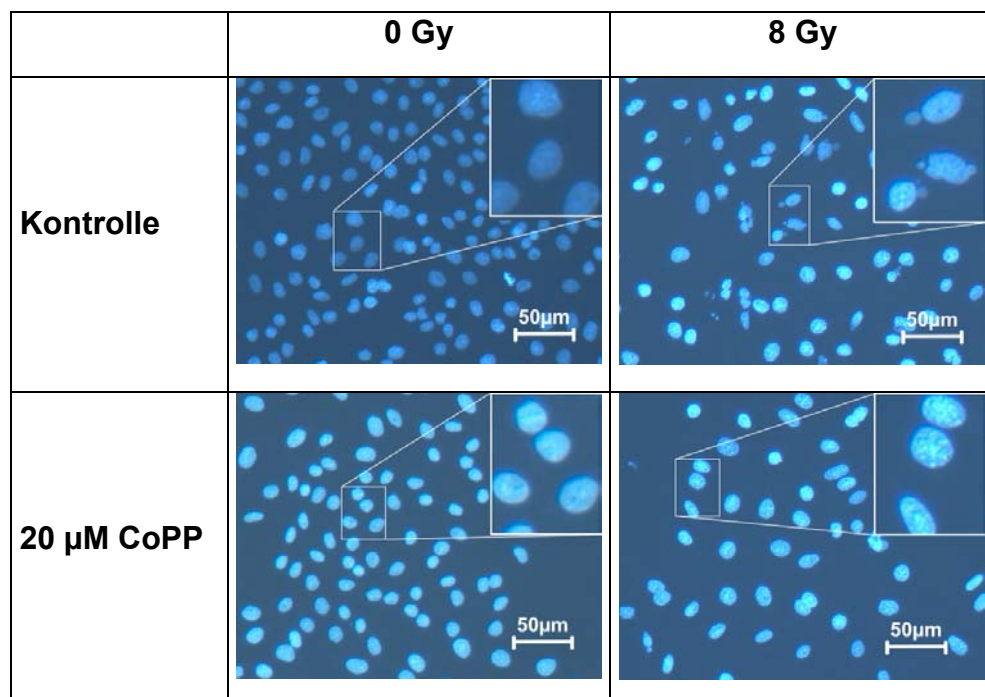


Abb. 3-3: Nachweis von Apoptose bei bestrahlten bEnd2 mit DAPI Markierung. bEnd2 wurden mit PBS (Kontrolle) oder 20 μM CoPP für 24 Std. inkubiert und anschließend bestrahlt. Nach weiteren 24 Std. wurde die EC Apoptose über DNA Markierung mit DAPI ermittelt. Die Auswertung der Apoptose erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Apoptotische Zellen zeichneten sich durch Kernfragmentierung bzw. starke Bläschenbildung aus.

Abb. 3-3 zeigt, dass bEnd2 Zellen, die mit 8 Gy bestrahlt wurden, in Apoptose gingen. Die Kerne der Kontrollzellen waren stark fragmentiert, es kam zur starken Bläschenbildung. Bei Inkubation mit CoPP für 24 Std. vor Bestrahlung wurden die Zellen geschützt, es waren nur sehr wenig Kerne fragmentiert.

Um die Apoptose zu quantifizieren, wurden die apoptotischen Kerne im Mikroskop ausgezählt. Dafür wurden 4 Felder pro Schale mit mindestens 200 Kernen pro Feld ausgezählt.

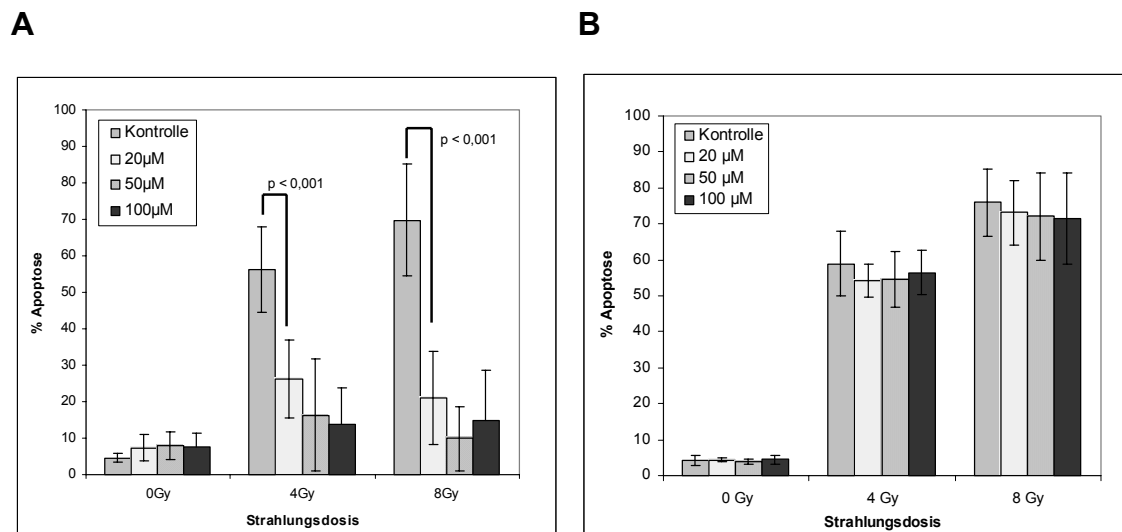


Abb. 3-4: Quantitative Bestimmung bestrahlungsinduzierter Apoptose von CoPP bzw. SnPP behandelten bEnd2 mit DAPI. bEnd2 wurden mit CoPP (**A**) oder SnPP (**B**) für 24 Std. inkubiert und anschließend bestrahlt. Kontrollzellen wurden mit PBS inkubiert (= Lösungsmittel der Protoporphyrine). Nach weiteren 24 Std. wurde die EC Apoptose über DNA Markierung mit DAPI ermittelt. Die quantitative Auswertung der Apoptose erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Gezeigt sind die Mittelwerte % apoptotischer Zellen und die dazugehörigen Standardabweichungen aus 4 Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Mann-Whitney U-Test.

Wie in **Abb. 3-4A** zu ersehen ist, war eine CoPP-Konzentration von 20 µM ausreichend, um bEnd2 Zellen vor Apoptose nach Bestrahlung zu schützen. Die Apoptoserate lag bei diesen Zellen bei $26,2 \pm 10,7\%$ (4Gy) und $21,0 \pm 12,8\%$ (8Gy), während bei der Kontrolle $56,3 \pm 11,6\%$ (4Gy) bzw. $69,8 \pm 15,4\%$ (8Gy) der Zellen apoptotisch waren.

Bei Inkubation der bEnd2 mit SnPP 24 Std. vor Bestrahlung lag die Apoptoserate mit $54,3 \pm 8,9\%$ bei 4 Gy und $73,2 \pm 9,1\%$ bei 8Gy (angegebene Werte für 20 µM SnPP) genauso hoch wie bei den Kontrollzellen mit $58,9 \pm 8,9\%$ bei 4Gy und $75,9 \pm 9,4\%$

bei 8Gy (**Abb. 3-4B**). Trotz Induktion der HO-1 zeigte sich keine Protektion, d.h. SnPP war nicht in der Lage, die Zellen vor bestrahlungsinduzierter Apoptose zu schützen. Um festzustellen, ob diese Hemmung aufgehoben werden kann, wurden bEnd2 zuerst 24 Std. mit SnPP und dann 24 Std. mit CoPP behandelt. Anschließend erfolgte wieder die Bestrahlung.

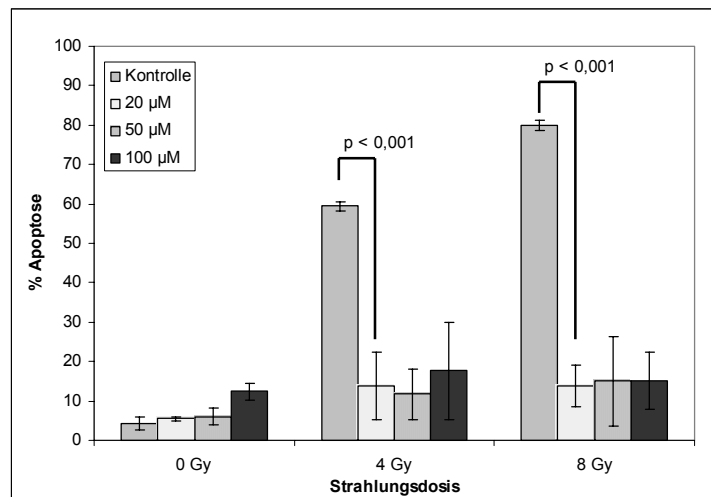


Abb. 3-5: Quantitative Bestimmung bestrahlungsinduzierter Apoptose von SnPP und CoPP behandelten bEnd2 mit DAPI. bEnd2 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen SnPP für 24 Std. inkubiert, gewaschen und anschließend mit der jeweils gleichen Konzentration CoPP für 24 Std. behandelt. Kontrollzellen wurden mit PBS inkubiert (= Lösungsmittel beider Porphyrine). Danach wurden die Zellen bestrahlt. Nach weiteren 24 Std. wurde die EC Apoptose über DNA Markierung mit DAPI ermittelt. Die quantitative Auswertung der Apoptose erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Gezeigt sind die Mittelwerte % apoptotischer Zellen und die dazugehörigen Standardabweichungen aus 3 Experimenten bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen und Porphyrinkonzentrationen. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Mann-Whitney U-Test.

Wie in **Abb. 3-5** zu erkennen ist, war die Apoptoserate bei den Zellen, die zuerst mit SnPP und anschließend mit CoPP behandelt wurden, signifikant niedriger als bei den Kontrollzellen (20µM Sn/CoPP $13,8 \pm 8,6\%$ bei 4 Gy und $13,8 \pm 5,3\%$ bei 8Gy versus Kontrolle $59,4 \pm 1,3$ bei 4Gy und $80,1 \pm 1,4\%$ bei 8Gy, $p < 0,001$). Es kann daraus geschlossen werden, dass die inhibierende Wirkung von SnPP durch die Gabe von CoPP wieder aufgehoben wird, und dass die Zellen wieder vor Bestrahlung geschützt werden können.

Um zu klären, ob umgekehrt die aktivierende Wirkung von CoPP durch die anschließende Gabe von SnPP aufgehoben werden kann, wurden bEnd2 zuerst für 24 Std.

mit CoPP und dann mit SnPP inkubiert. Die Zellen wurden wieder bestrahlt und nach weiteren 24 Std. mit DAPI markiert.

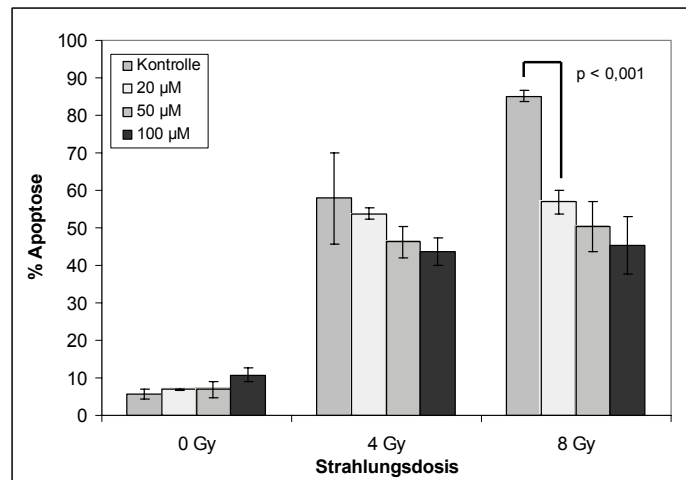


Abb. 3-6: Quantitative Bestimmung bestrahlungsinduzierter Apoptose von CoPP und SnPP behandelten bEnd2 mit DAPI. bEnd2 wurden mit verschiedenen Konzentrationen CoPP für 24 Std. inkubiert, gewaschen und anschließend mit der jeweils gleichen Konzentration SnPP für 1 Std. behandelt. Kontrollzellen wurden mit PBS inkubiert (= Lösungsmittel beider Porphyrine). Danach wurden die Zellen bestrahlt. Nach weiteren 24 Std. wurde die EC Apoptose über DNA Markierung mit DAPI ermittelt. Die quantitative Auswertung der Apoptose erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Gezeigt sind die Mittelwerte % apoptotischer Zellen und die dazugehörigen Standardabweichungen aus 3 Experimenten bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen und Porphyrinkonzentrationen.

Die protektive Wirkung von CoPP wurde schon durch eine einstündige Inkubation mit SnPP teilweise aufgehoben (**Abb. 3-6**). Dies galt auch für eine 24 stündige Inkubation mit SnPP (Daten nicht gezeigt). Zwar war die Apoptoserate bei den mit Co-/Sn-Protoporphyrin behandelten Zellen nach Bestrahlung nicht so hoch wie bei den Kontrollzellen (bei 8 Gy Bestrahlung, 20µM Co-/SnPP: $56,9 \pm 3,0\%$ versus Kontrolle: $85,1 \pm 1,6\%$), aber im Vergleich zu den Zellen, die nur mit CoPP behandelt worden sind, stark gestiegen (Co-/SnPP: $56,9 \pm 3,0\%$ versus CoPP: $21,0 \pm 12,8\%$, $p < 0,001$). CoPP induzierte die HO-1, und diese war in unserem Zellsystem auch aktiviert. SnPP induzierte ebenfalls die HO-1, im Gegensatz zur Induktion mit CoPP wurde HO-1 aber nicht aktiviert und konnte nicht vor bestrahlungsinduzierter Apoptose schützen. Die Wirkung der Porphyrine dauerte solange an, wie diese in der Zellkultur vorhanden waren. Danach wurde ihre Wirkung wieder aufgehoben.

Die Induktion von Apoptose kann über die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol erfolgen (Friedman, 2002). Die Unterdrückung der Freisetzung kann Apoptose verhindern (Tepper et al., 1999). Es stellte sich die Frage, ob die Wirkung von CoPP in den hier beschriebenen Versuchen möglicherweise auf die reduzierte Freisetzung von Cytochrom c zurückzuführen ist.

Um dies zu überprüfen, wurden bEnd2 Zellen wieder für 24 Std. mit 20µM CoPP, SnPP oder PBS inkubiert und anschließend mit 4 Gy bestrahlt. Nach weiteren 24 Std. wurden Lysate hergestellt und die Cytochrom c Freisetzung im Westernblot überprüft. In diesem Fall wurden zytosolische Lysate benötigt, um nicht die gesamte Menge von mitochondrialem Cytochrom c zu messen.

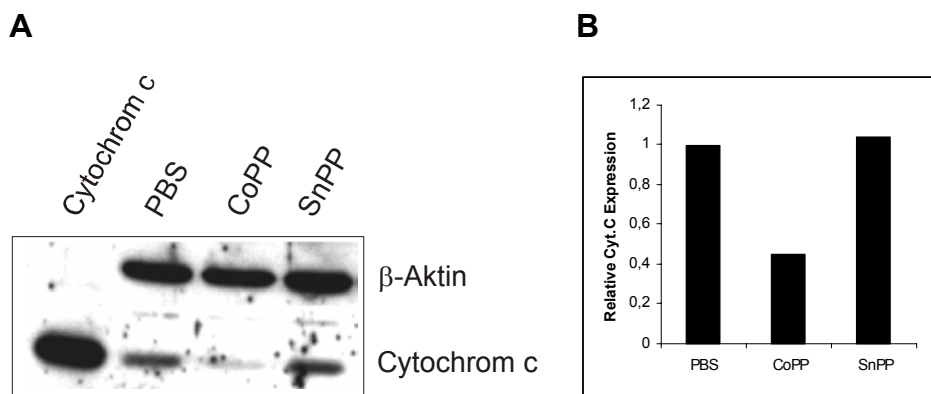


Abb. 3-7: Westernblotanalyse zum Nachweis von Cytochrom c im Zytosol nach Bestrahlung. A: bEnd2 wurden 24 Std. mit CoPP oder SnPP inkubiert (Kontrolle: Inkubation mit PBS), bestrahlt und anschließend lysiert. Mit den Zelllysaten erfolgte eine Westernblot Analyse mit Nachweis auf Cytochrom c und β -Aktin als Kontrollprotein. Zur Identifizierung wurde zusätzlich 5 ng rekombinantes Cytochrom c aufgetragen. **B:** Relative Cytochrom c Expression in bEnd2 Zellen nach Inkubation mit PBS, CoPP oder SnPP und anschließender Bestrahlung.

Bei den Zellen, die mit PBS oder SnPP inkubiert waren, konnten deutliche Mengen an Cytochrom c nachgewiesen werden (**Abb. 3-7**). Im Gegensatz dazu war der Anteil bei den Zellen, die mit CoPP inkubiert wurden, sehr gering. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die bestrahlungsinduzierte Apoptose über die Freisetzung von Cytochrom c verläuft und dass durch die HO-1 Aktivierung die Cytochrom c Freisetzung und damit die Apoptoseinduktion verhindert wird.

3.1.2 *In vivo* Untersuchungen von HO-1

3.1.2.1 HO-1 Induktion in Organen

In vitro konnte gezeigt werden dass die Inkubation mit Protoporphyrinen bei Endothelzellen zur Expression von HO-1 führt. HO-1 kann auch *in vivo* induziert werden (Amersi et al., 1999; Foresti et al., 2001; Taylor et al., 1998). In den folgenden Untersuchungen sollte nun festgestellt werden, ob durch die systemische Gabe von Protoporphyrinen auch in Zielorganen der GvHD wie Leber und Darm HO-1 induziert werden kann. Die Milz diente als Positivkontrolle, da in der Milz der Abbau von Erythrozyten durch phagozytierende Zellen erfolgt und durch die permanente Hämexposition in diesem Organ HO-1 konstitutiv exprimiert wird.

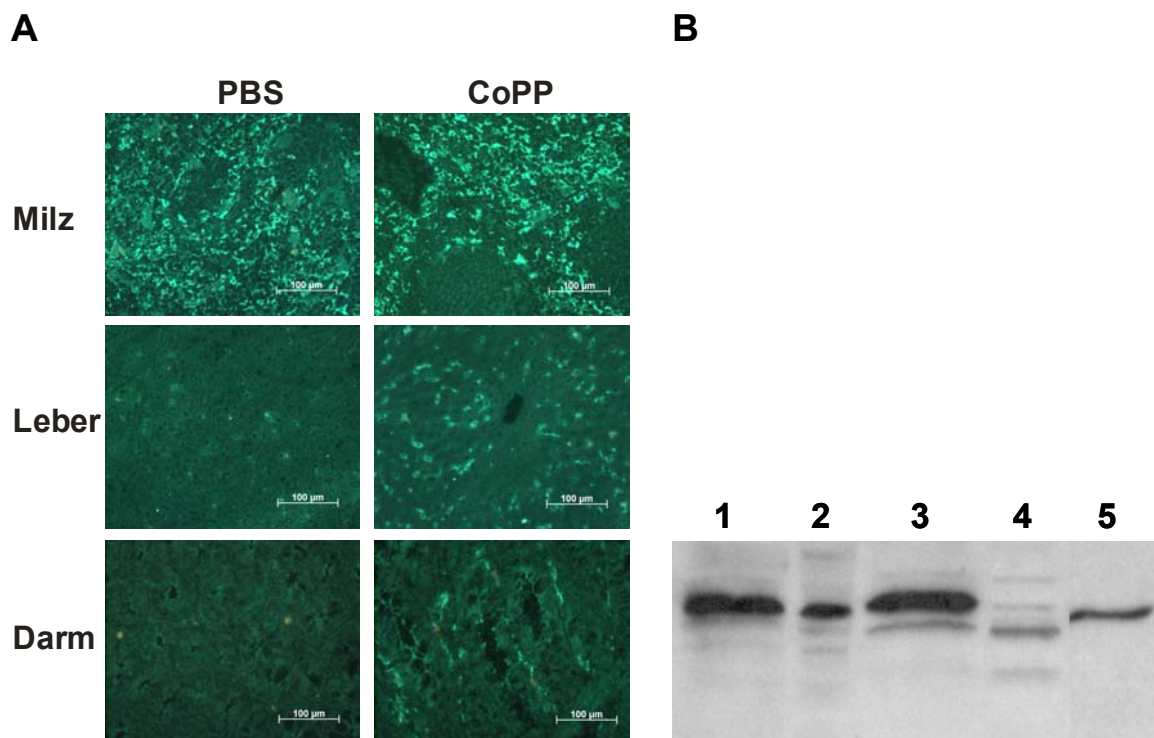


Abb. 3-8: Fluoreszenzmarkierung und Westernblotanalyse zum Nachweis der HO-1 Induktion *in vivo*. Kryoschnitte und Zelllysate von Organen aus Mäusen, welche mit CoPP bzw. PBS behandelt wurden, wurden auf HO-1 Bildung untersucht. **A:** Mit FITC konjugierten HO-1 Antikörper markierte, 5µm dicke Schnitte. Grüne Fluoreszenz zeigt die HO-1 Expression. **B:** Mit den Zelllysaten aus Leber- und Milzzellen erfolgte eine Westernblot Analyse mit Nachweis auf HO-1. (1) Milz CoPP, (2) Milz PBS, (3) Leber CoPP, (4) Leber PBS, (5) rekombinante HO-1.

Dafür wurden 2 x 125 µg CoPP (in 250 µl PBS) über zwei Tage intraperitoneal verabreicht. Nach 48 Std. wurden die Organe entnommen, mit HO-1 Antikörper markiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Kontrolle dienten Organe aus Tieren, denen PBS statt CoPP verabreicht wurde.

In Leber und Darm kann die HO-1 Expression durch intraperitoneale Gabe von CoPP induziert werden (**Abb. 3-8A**, siehe auch Anhang I vergrößert). Während bei Gabe von PBS keine (Darm) oder nur geringste Mengen (Leber) an HO-1 nachweisbar waren, konnte bei den CoPP behandelten Tieren eine fleckige Verteilung über die gesamte Leber bzw. den Darm beobachtet werden. In der Leber wurden nicht die Hepatozyten mit HO-1 Antikörper angefärbt, sondern die HO-1 verteilte sich zwischen diesen Zellen in den Sinusoiden. In der Lunge konnte durch CoPP Stimulation keine HO-1 Expression induziert werden.

In der Milz war die HO-1 Expression der PBS und CoPP behandelten Tiere vergleichbar. HO-1 wird hauptsächlich in der roten Pulpa exprimiert, also in einem Bereich, in dem aktivierte Makrophagen und Phagozyten zu finden sind. Die HO-1 Expression konnte für Milz und Leber auch im Westernblot bestätigt werden (**Abb. 3-8B**).

Da in der Leber HO-1 induziert werden kann, sollte geprüft werden, welche Leberzellen HO-1 exprimieren. **Abb. 3-9A** zeigt nochmals die alleinige HO-1 Markierung in der Leber. Die gleichzeitige Markierung von HO-1 und CD45 als Leukozytenmarker zeigte eine vollständige Kolo-kalisation (**Abb. 3-9B**). Alle CD45 positiven Zellen exprimierten gleichzeitig HO-1, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Leukozyten für die HO-1 Expression verantwortlich sind.

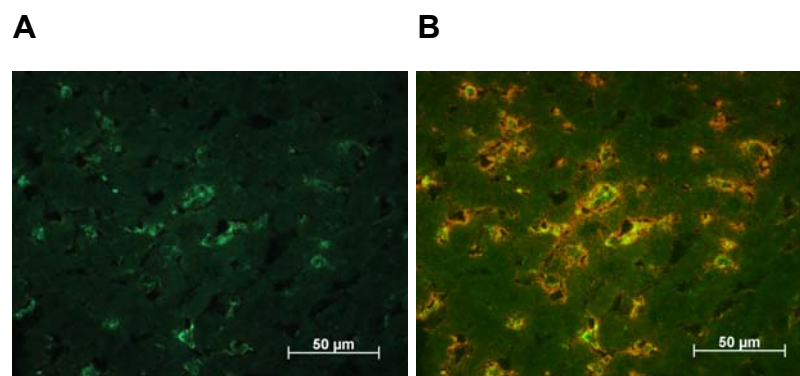


Abb. 3-9: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zur Koexpression von HO-1 und CD45 in der Leber. Kryoschnitte (5µm) der Leber aus Mäusen, welche mit CoPP behandelt wurden. **A:** Markierung mit HO-1-FITC Antikörper. **B:** Markierung mit HO-1-FITC + CD45-PE-Antikörper.

3.1.2.2 HO-1 Induktion in CD45 positiven Leberzellen

Um die Ergebnisse aus 3.1.2.1 zu verifizieren, wurden CD45 positive Leberzellen für weitere Untersuchungen aus der Leber isoliert. CD45 wird auf allen Leukozyten exprimiert, daher werden bei der Isolierung neben Makrophagen auch dendritische Zellen und Lymphozyten erfasst.

Zunächst wurden Mäuse mit CoPP, PBS und ZnPP behandelt. Nach 48 Std. wurden Zellen aus der Leber mit CD45 Antikörper über Magnetsäulen isoliert und auf HO-1 Induktion überprüft.

Experiment Nr.	PBS CD45 ⁺ (%)	CoPP CD45 ⁺ (%)	ZnPP CD45 ⁺ (%)
1	5,4	3,3	2,7
2	6,1	5,3	3,0
3	3,3	2,2	2,7
4	1,2	2,6	2,4

Tabelle 3-1: Isolierung von CD45 positiven Leberzellen. Ausbeute CD45 positiver Leberzellen aus Mäusen, welche mit CoPP, ZnPP bzw. PBS behandelt wurden. Die Bestimmung erfolgte über Zellzählung mit einer Neubauer Zählkammer. Gezeigt wird die Ausbeute in 4 voneinander unabhängigen Experimenten.

In **Tabelle 3-1** sind repräsentativ die Ausbeuten bei Isolierung CD45 positiver Leberzellen nach Stimulation mit PBS, CoPP und ZnPP aufgeführt. Dabei ergaben sich bei den PBS behandelten Tieren Ausbeuten von 1,2 % bis 6,1 %, bei den CoPP Tieren 2,2 % bis 5,3 %, und bei den ZnPP behandelten Tieren 2,4 % bis 3,0 %. Die Varianz der Zellausbeuten bei den Experimenten einer Gruppe war damit recht hoch, so dass es zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede gab.

Bei Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie lag der Anteil CD45 positiver Zellen in den isolierten Zellen zwischen 77 % und 86 %. Diese Reinheit war für die weiteren Untersuchungen ausreichend.

Zur Überprüfung der HO-1 Expression wurden Zytospins der CD45 positiven Leberzellen hergestellt, diese mit HO-1 Antikörper markiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

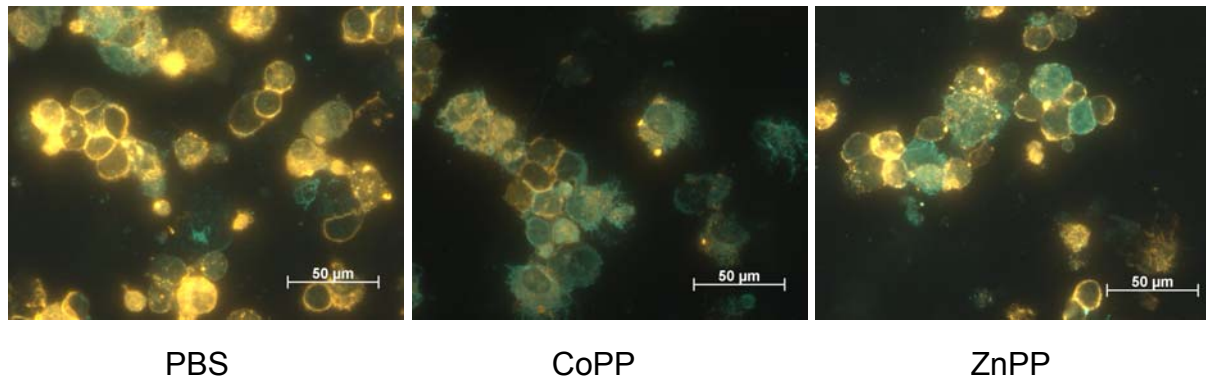


Abb. 3-10: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zum Nachweis der HO-1 Induktion in CD45 positiven Leberzellen. CD45 positive Leberzellen aus Mäusen, welche mit CoPP, ZnPP bzw. PBS behandelt wurden. Die Isolierung der Leberzellen erfolgte mit einem PE-konjugierten CD45 Antikörper. Da das CD45 Antigen membranständig ist, zeigten alle positiven Zellen einen orange fluoreszierenden Halo. Die HO-1 Markierung erfolgte mit FITC-konjugierten HO-1 Antikörper.

Die isolierten Zellen wiesen einen makrophagenähnlichen Phänotyp auf (**Abb. 3-10**). Möglicherweise handelte es sich bei diesen Zellen um Kupfferzellen. CD45 positive Leberzellen aus PBS behandelten Tieren bildeten kein HO-1. Im Gegensatz dazu exprimierten 80-90 % der isolierten Zellen aus CoPP behandelten Tieren HO-1. Die HO-1 Induktion mit ZnPP entsprach der Induktion mit CoPP. Durch die Isolierung der Zellen mit CD45-PE Antikörper war eine starke PE-Fluoreszenz zu erkennen. CD45 ist membranständig, daher zeigten die PE gefärbten Zellen einen orangen Halo. Im Gegensatz dazu wird HO-1 im Zytosol exprimiert, und die grüne Fluoreszenz verteilte sich über die gesamte Zelle.

3.1.2.3 HO-1 Induktion in Makrophagen

Da Makrophagen zu den CD45 exprimierenden Zellen gehören, wurde weiterhin überprüft, ob durch CoPP Stimulation HO-1 auch in Peritonealmakrophagen induziert werden kann. Lee und Mitarbeiter konnten bereits zeigen, dass Hämoxxygenase-1 in Peritonealmakrophagen durch IL-10 Gabe induziert wird (Lee and Chau, 2002).

CoPP wurde dafür den Mäusen injiziert und nach 48 Std. die Makrophagen durch Spülung des Bauchraumes isoliert.

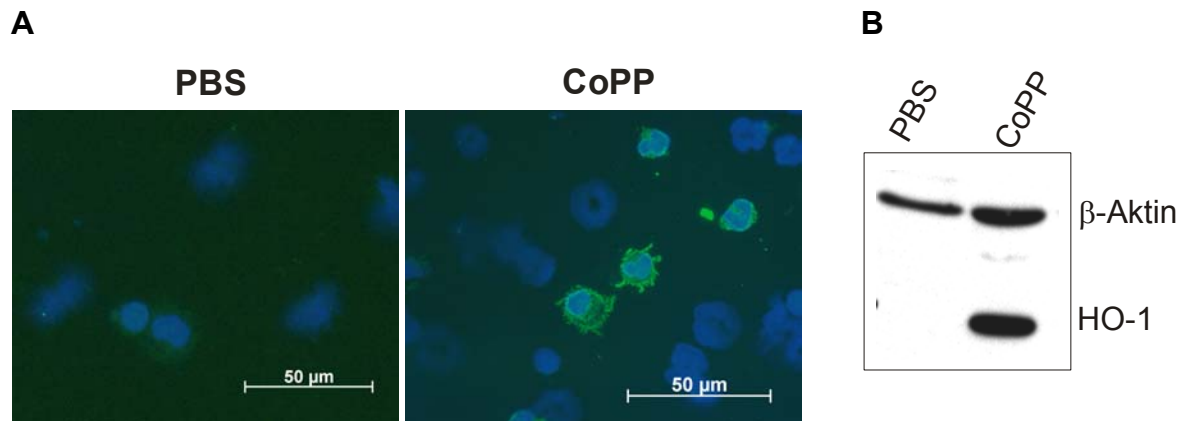


Abb. 3-11: Fluoreszenzmarkierung und Westernblotanalyse zum Nachweis der HO-1 Induktion in Peritonealmakrophagen. Peritonealmakrophagen aus Mäusen, welche mit CoPP bzw. PBS behandelt wurden, wurden auf HO-1 Induktion untersucht. **A:** Die Expression von HO-1 wird durch die grüne Fluoreszenz sichtbar. Die Kernmarkierung (blau) erfolgte mit DAPI um alle vorhandenen Zellen zu kennzeichnen. **B:** Beim Westernblot erfolgte ein Nachweis auf HO-1 und β -Aktin als Kontrollprotein.

Sowohl bei Immunfluoreszenzmarkierungen von Zytospins als auch im Westernblot konnte bestätigt werden, dass HO-1 durch CoPP in Makrophagen induziert werden kann (**Abb. 3-11A, B**). Die Behandlung mit PBS führte zu keiner HO-1 Bildung.

3.1.2.4 Allogene KMT bei CoPP behandelten Tieren

CD45 positive Zellen spielen bei der allogenen KMT eine wichtige Rolle, da sie teilweise für die Zytokinsekretion und für die Antigen-Präsentation bei der Entstehung der GvHD verantwortlich sind. HO-1 inhibiert in Makrophagen auch die Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-1 β nach Stimulation mit LPS, einem Hauptmediator für GvHD (Lee and Chau, 2002; Otterbein et al., 2000). Daher sollte untersucht werden, ob HO-1 Induktion bei allogener KMT mit Bestrahlung als Konditionierungsregime GvHD beeinflussen kann.

Bei den *in vitro* Untersuchungen hat es sich als Vorteil erwiesen, SnPP als HO-1 Inhibitor zu verwenden. ZnPP war ebenfalls ein potenter Inhibitor und induzierte in noch viel stärkerem Maße die HO-1 Expression (Daten nicht gezeigt), es zeigte sich aber, dass ZnPP in den eingesetzten Konzentrationen toxisch für Endothelzellen war. Die Zellen starben schon nach 24 Std. ohne Bestrahlung ab. *In vivo* schien ZnPP jedoch nicht toxisch zu wirken, und in der Literatur wurde ZnPP für *in vivo*

Studien bereits häufig als Inhibitor beschrieben. Um unsere Ergebnisse mit bereits vorhandenen Veröffentlichungen vergleichen zu können, wurde bei unseren *in vivo* Experimenten ebenfalls ZnPP verwendet.

Zur Untersuchung der *in vivo* Effekte von CoPP bzw. ZnPP wurde ein murines haploidentes Transplantationsmodell verwendet, bei dem Zellen des Mausstammes C57Bl6 mit dem MHC H2^b in die F1-Generation von C57Bl6 (H2^b) x DBA (H2^d) (=B6D2F1 mit dem MHC H2^{bxd}) transplantiert werden. Das Transplantat kann in diesem Modell vom Empfänger wegen der bestehenden Toleranz gegenüber H2^b nicht abgestoßen werden. Immunkompetente Zellen (T-Zellen) im Transplantat erkennen aber den MHC H2^d-Anteil der Empfängertiere als fremd an, was letztlich zu GvHD führt. In diesem Modell spielen die Stärke der Konditionierung und die Zahl der transplantierten T-Zellen für die Entstehung der GvHD eine Rolle. Mit höherer Strahlungs-dosis kommt es zur stärkeren Schädigung des Darmtraktes, höherer Zytokinausschüttung, und damit zu mehr GvHD (Hill et al., 1997a). Erhöhte T-Zellzahl führt zu erhöhter Alloreaktivität und ebenfalls zu verstärkter GvHD.

T-Zellen	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	Gesamt CD3 ⁺
% Anteil in der Milz	12-16 %	6-8 %	18 - 24 %

Tabelle 3-2: Prozentualer Anteil von T-Zellen in der Milz. Milzzellen wurden mit CD3-FITC und CD4- bzw. CD8-PE konjugierten Antikörpern durchflusszytometrisch charakterisiert.

Für die Untersuchungen wurden B6D2F1-Mäuse mit 14 Gy bestrahlt und als Empfänger verwendet. Anschließend wurde in diese Tiere Knochenmark als Stammzellquelle und Milzzellen als T-Zellquelle aus C57Bl6 Mäusen transplantiert. Zusätzliche T-Zellen wurden für die Entstehung akuter GvHD in diesem Transplantationsmodell benötigt, da die T-Zellzahl im Knochenmark bei diesem Transplantationsmodell nicht ausreicht, GvHD zu induzieren. Durchflusszytometrische Analysen auf CD3⁺CD4⁺ (T-Helferzellen) und CD3⁺CD8⁺ (zytotoxische T-Lymphozyten) Zellen zeigten, dass etwa 1/5 der Milzzellen T-Zellen (CD3⁺) waren (**Tabelle 3-2**). Beide Subpopulationen sind an der Entstehung von GvHD beteiligt (Ferrara, 1993). Eine Aufreinigung der T-Zellen aus der Milz war in diesem Modell und unter diesen Bedingungen nicht notwendig. Das genaue Transplantationsschema wird in **Abb. 3-12** verdeutlicht.

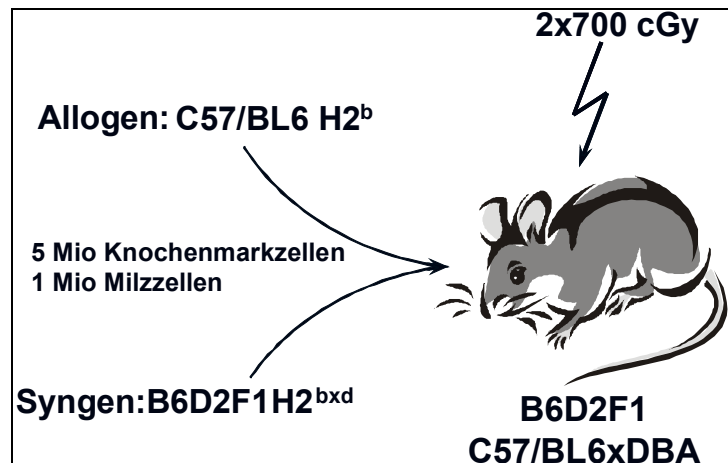


Abb. 3-12: Transplantationsschema. B6D2F1-Mäuse wurden 2 Tage mit je 125 µg CoPP bzw. ZnPP behandelt. Anschließend wurden sie mit 2 x 700 cGy bestrahlt und mit 5 Mio Knochenmark- und 1 Mio Milzzellen aus C57Bl6 Mäusen transplantiert. Zur Kontrolle wurden B6D2F1-Mäuse syngen transplantiert und erhielten Zellen von Mäusen des gleichen Stammes.

B6D2F1-Mäusen wurden an den beiden Tagen vor Transplantation je 125 µg CoPP, ZnPP gelöst in PBS bzw. PBS allein intraperitoneal injiziert. Am Tag der Transplantation wurden die Tiere mit 2x700 cGy im Abstand von 3-4 Std. fraktioniert bestrahlt. Die fraktionierte Bestrahlung verringert die strahlungsbedingte Toxizität bei den Empfängertieren. Die Strahlungs-dosis wurde so hoch gewählt, um untersuchen zu können, ob HO-1 Induktion vor den Auswirkungen der Bestrahlung schützen kann. Als syngene Kontrolle wurden Zellen von B6D2F1-Mäusen transplantiert. Das Überleben der Tiere wurde täglich überwacht und die sich entwickelnde GvHD nach dem Bewertungsschema in **Tabelle 2-1** wöchentlich bestimmt. Die Bewertung erfolgte verblindet, um die Objektivität dieser Bewertung zu gewährleisten.

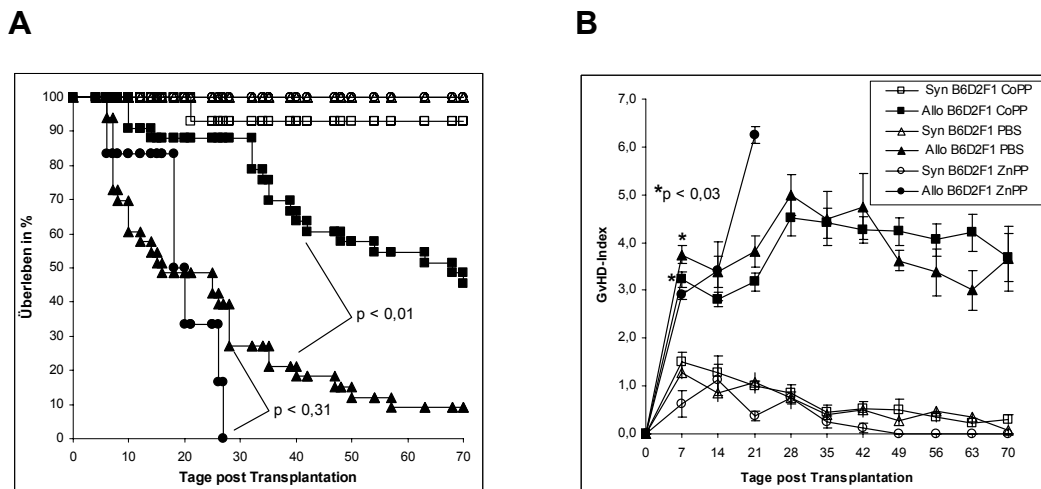


Abb. 3-13: Überleben, und GvHD Score von B6D2F1-Mäusen nach allogener KMT. Empfänger-tiere (B6D2F1) erhielten CoPP (32 Tiere), PBS (32 Tiere) bzw. ZnPP (6 Tiere) an den Tagen -1,-2 vor Transplantation. Anschließend wurden sie mit 2 x 7 Gy bestrahlt, und mit Knochenmark- und Milzzellen aus C57Bl6-Mäusen (bzw. B6D2F1 als syngene Kontrolle) transplantiert. Das Überleben (**A**) wurde täglich überwacht. Die GvHD (**B**) nach dem klinischen Index, wie er bei (Cooke et al., 1996) eingeführt wurde, wurde wöchentlich bestimmt. Zusammengefasst sind die Ergebnisse aus vier voneinander unabhängigen Experimenten mit PBS und CoPP Gruppen sowie ein Experiment mit der ZnPP Gruppe. **A:** Statistischer Test: log rank Test $p < 0,01$ (allo PBS vs. allo CoPP); $p < 0,31$ (PBS vs ZnPP). **B:** Statistischer Test: Mann Whitney U-Test $p < 0,03$ (Tag7 allo PBS vs. allo CoPP)

Abb. 3-13A zeigt das Überleben der transplantierten Tiere. Die syngen transplantierten Mäuse überlebten unter den beschriebenen Transplantationsbedingungen zu fast 100%. Lediglich in einem Experiment verstarb ein Tier in der syngen CoPP Gruppe. In der ersten Woche war in allen syngen Gruppen ein leichter Anstieg der GvHD-Werte (CoPP: 1,5; PBS: 1,3; ZnPP: 0,6) zu verzeichnen (**Abb. 3-13B**). Dieser Anstieg wurde durch den in den GvHD-Wert einfließenden Gewichtsverlust von ca. 10% verursacht, da es durch die Bestrahlung zu Darmschädigung und einem daraus resultierenden Malabsorptionssyndrom kam. Der GvH Index sank während der Beobachtungszeit wieder auf den Wert naiver Tiere, und es waren keine bestrahlungsbedingten Symptome mehr feststellbar.

In den allogenen transplantierten PBS und ZnPP Gruppen war eine hohe Frühmortalität zu verzeichnen (**Abb. 3-13A**). Bereits nach 28 Tagen waren alle Tiere der ZnPP Gruppe mit den Anzeichen einer akuten GvHD verstorben, bei der PBS Gruppe lag die Mortalitätsrate mit 24 verstorbenen Tieren bei 75%. Im Gegensatz dazu lag in der CoPP Gruppe die Todesrate zu diesem Zeitpunkt lediglich bei 12%. Im Laufe der Beobachtungszeit erhöhte sich die Mortalität auch in dieser Gruppe (Tag 70: 56%

Mortalität), trotzdem hatten die CoPP Tiere einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber der PBS Gruppe (Tag 70: 94% Mortalität; $p < 0,01$).

Die frühe Mortalität ging mit akuter GvHD einher (**Abb. 3-13B**). Die GvHD Werte lagen an Tag 7 bei allen allogenen transplantierten Tieren zwar zwischen 3,0 und 3,7 (PBS: 3,7; CoPP: 3,2; ZnPP: 3,0), allerdings waren zu diesem Zeitpunkt schon ein Tier der ZnPP Gruppe und 9 Tiere der PBS Gruppe verstorben, so dass diese aus der Gesamt GvHD Wertung herausfielen und diese Werte falsch niedrig ausfielen. Nach dieser akuten GvHD Phase und einer leichten Erholung in der zweiten Woche, in der die bestrahlungsbedingte Toxizität wieder abnahm, lag der GvHD Wert der allogenen transplantierten PBS und CoPP Tiere im restlichen Beobachtungszeitraum konstant bei einem Wert von etwa 4. Die GvH Reaktion konnte durch Gabe von CoPP nicht vollständig unterdrückt werden, allerdings konnte besonders die frühe Mortalität bei allogener KMT verhindert werden.

3.1.2.5 Serumzytokine nach allogener KMT

Frühere Studien konnten zeigen, dass es in dem hier verwendeten murinen Transplantationsmodell zu einer starken Zytokinsekretion bei akuter GvHD kommt. Besonders $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ spielen bei der Entstehung der Organtoxizität eine Rolle (Hill et al., 1997a; Hill et al., 1998).

Um zu untersuchen, ob die Gabe von CoPP vor Transplantation einen Einfluss auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine hat, wurden Serumzytokine am Tag 4-6 nach Transplantation gemessen. Der Zeitraum wurde gewählt, da zu diesem Zeitpunkt Empfängertiere anfangen Symptome akuter GvHD zu zeigen, und die Zytokinsekretion in diesem Transplantationsmodell dann sehr hoch ist (Hill et al., 1997a). Dafür wurden die Mäuse betäubt und das Blut durch Herzpunktion entnommen. Das Serum wurde dann für die Messung von $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, IL-12 und $\text{IFN}\gamma$ mittels Elisa eingesetzt, da diese Zytokine an der Entstehung akuter GvHD beteiligt sind (Hill et al., 1997b). Neben den proinflammatorischen Zytokinen wurde auch IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin im Serum bestimmt, da ein erhöhter IL-10 Spiegel teilweise mit weniger GvHD nach Transplantation einhergeht (Blazar et al., 1998; Krenger et al., 1994).

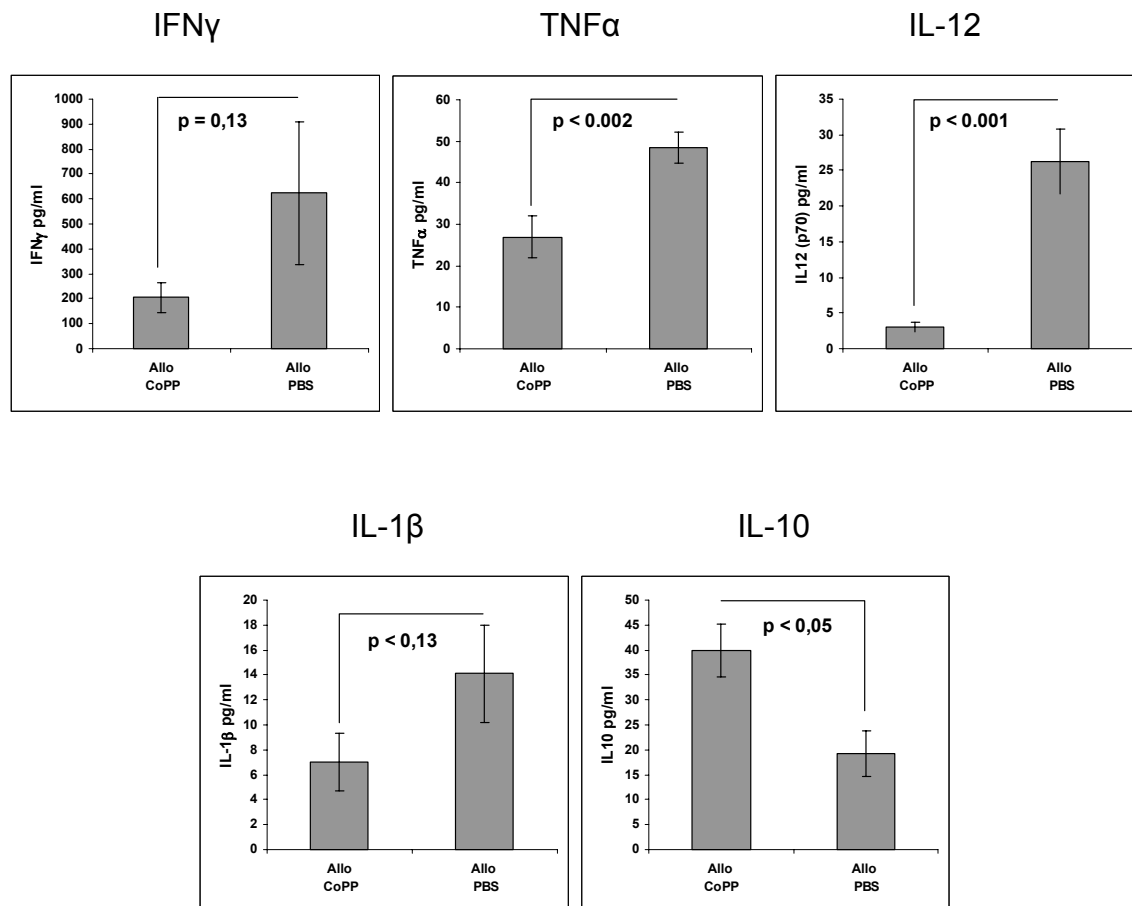


Abb. 3-14: Messung von Zytokinen im Serum mittels Elisa bis 6 Tage nach Transplantation. Mäusen wurden 4-6 Tage nach Transplantation Blut durch Herzpunktion entnommen. Zytokin-konzentration in pg/ml. Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung (8-20 Tiere pro Gruppe). Statistische Analysen wurden mit Mann Whitney U-Test durchgeführt.

Abb. 3-14 zeigt, dass TNF α (26,5 versus 48,6 pg/ml, $p < 0,002$) und IL-12 (26,3 versus 3 pg/ml, $p < 0,001$) im Serum bei den allogenen transplantierten CoPP Tieren nach 4-6 Tagen gegenüber den PBS Kontrollgruppen deutlich reduziert war. IFN γ war bei den CoPP Tieren ebenfalls erniedrigt, erreichte aber keine statistische Signifikanz (204 versus 623 pg/ml, $p = 0,13$), da die Werte in der PBS Kontrollgruppe stark variierten. IL-1 β war auch bei den CoPP Tieren niedriger als bei der Kontrollgruppe, ebenfalls ohne statistische Signifikanz (7 versus 14,1 pg/ml, $p < 0,13$). Im Gegensatz dazu war die Bildung von IL-10 in der CoPP Gruppe deutlich erhöht (40 pg/ml vs. PBS 19,1 pg/ml, $p < 0,05$). Bei den syngen transplantierten Kontrollgruppen konnten keine nennenswerten Zytokinmengen gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Eine Ausnahme war das Zytokin IL-1 β , bei dem ein höherer Wert in

der syngenischen PBS Gruppe gemessen wurde als den CoPP Tieren (PBS 9,9 pg/ml vs. CoPP 3,6 pg/ml).

Insgesamt zeigten die Messungen, dass die Gabe von CoPP vor Transplantation die Sekretion proinflammatorischer Zytokine verringert.

3.1.2.6 Expression von Aktivierungsmarkern auf Makrophagen und Stimulation von T-Zellen nach KMT

Da Makrophagen neben ihrer Rolle als Quelle der Zytokinproduktion für die Antigenpräsentation verantwortlich sind, wurde die Expression von Aktivierungsmarkern auf Peritonealmakrophagen untersucht.

B6D2F1 Mäuse wurden mit CoPP oder PBS behandelt und wie unter **3.1.2.4** beschrieben allogene transplantiert. Vier Tage nach KMT wurden Peritonealmakrophagen isoliert und auf CD11b, MHC, CD80 und CD86 durchflusszytometrisch untersucht.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich die Fähigkeit der APCs, allogene T-Zellen zu stimulieren, durch CoPP Gabe verändert. Um eine mögliche direkte Toxizität durch die Protoporphyrine auf die Zellen im Bauchraum der Maus als Ort der Stimulation ausschließen zu können, wurden für diesen Versuch CD45 positive Leberzellen verwendet. Hierfür wurden ebenfalls B6D2F1 Mäuse mit PBS, ZnPP und CoPP behandelt, nach 24 Std. die CD45 positiven Zellen aus der Leber isoliert und diese in einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) zusammen mit CD3⁺ T-Zellen der Milz einer Maus, die 6 Tage zuvor transplantiert wurde, eingesetzt und die T-Zellproliferation überprüft.

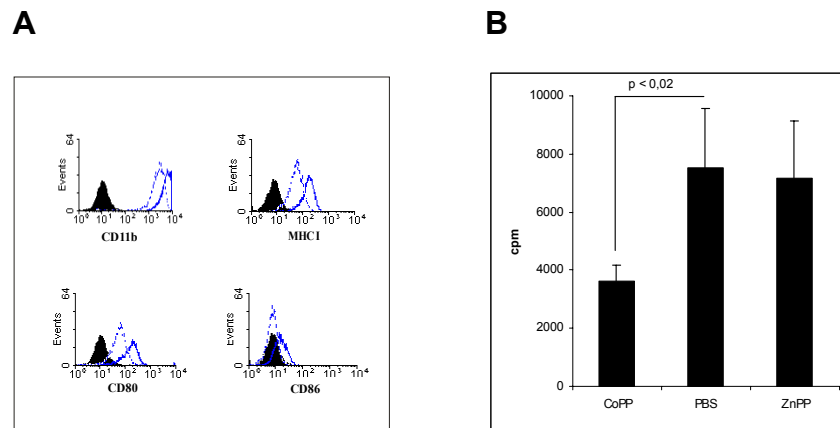


Abb. 3-15: Durchflusszytometrische Untersuchung zur Expression von Aktivierungsmarkern auf Peritonealmakrophagen und Proliferationsnachweis stimulierter T-Zellen. A: Peritonealmakrophagen wurden 6 Tage nach allogener KMT isoliert und durchflusszytometrisch auf die Expression von CD11b, MHC I, CD80 und CD86 untersucht. Das gefüllte Histogramm zeigt die Isokontrolle, das Histogramm mit durchgezogener Linie gibt die Zellen der PBS behandelten Maus und das mit gestrichelter Linie Zellen der CoPP behandelten Maus an. **B:** Frisch isolierte CD45 positive Leberzellen aus PBS, CoPP oder ZnPP behandelten Tieren wurden eingesetzt um allogene Milz T-Zellen von Mäusen, die 6 Tage zuvor transplantiert wurden, in einer MLR zu stimulieren. Die Proliferation wurde über den Einbau von ³H-Thymidin bestimmt. cpm: counts per million

Fast 100% der Peritonealmakrophagen exprimierten CD11b (**Abb. 3-15A**). Diese Expression war allerdings bei den Zellen aus den CoPP behandelten Tieren geringer als bei den Zellen aus den PBS behandelten Mäusen. Auch die Expression von MHC Klasse I, CD80 und CD86 war deutlich reduziert.

Abb. 3-15B zeigt, dass die Proliferation CD3⁺ T-Zellen um über 50% reduziert war, wenn die Stimulatorzellen aus der CoPP behandelten Maus stammten (PBS 2041cpm, CoPP 584 cpm; PBS versus CoPP: p < 0,02). Der Einsatz von Zellen aus der ZnPP behandelten Maus führte wie erwartet zu keiner Veränderung der T-Zellproliferation gegenüber Zellen aus dem PBS behandelten Tier (PBS 2042 cpm, ZnPP 1976 cpm).

3.1.2.7 TNF-Sekretion von Makrophagen und CD45 positiven Leberzellen nach LPS Stimulation

Weiterhin wurde untersucht, ob die Gabe von CoPP vor allogener KMT einen Einfluss auf die Aktivierung von Makrophagen oder CD45 positiven Leberzellen durch LPS hat. LPS kann nach Bestrahlung und allogener KMT verstärkt ins Gewebe gelangen und Makrophagen aktivieren, was zur Freisetzung von TNF α führt und

damit ein wichtiger Stimulus bei der Entstehung von GvHD ist (Hill et al., 1997b). Hierfür wurden B6D2F1 Mäuse wieder mit CoPP, ZnPP oder PBS intraperitoneal behandelt und wie unter **3.1.2.4** beschrieben allogene transplantiert. Bei den Spender-tieren handelte es sich allerdings um GFP (= green fluorescent protein) transgene C57Bl6 Mäuse, die sich dadurch auszeichnen, dass sie GFP ubiquitär in allen Geweben und den hämatopoetischen Zellen außer Erythrozyten exprimieren. Die Zellen sind dadurch leicht mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops oder durchfluss-zytometrisch zu identifizieren. Peritonealmakrophagen und Leberzellen wurden 6 Tage nach Transplantation isoliert, in einer 96 Loch Platte ausgesät und mit 100 ng/ml LPS für 24 Std. stimuliert. Anschließend wurde TNF α im Überstand bestimmt.

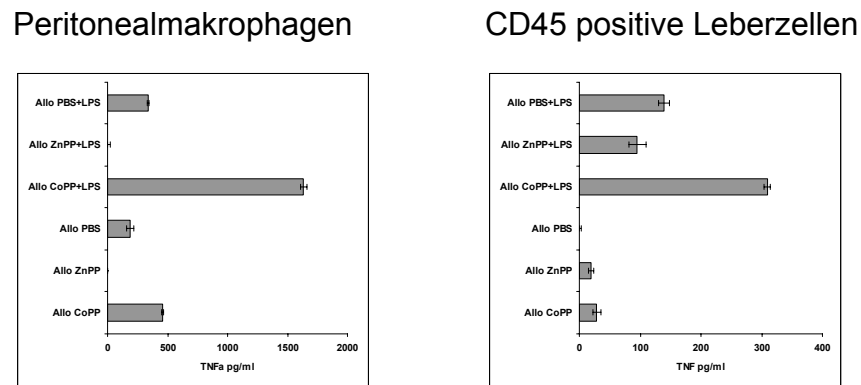


Abb. 3-16: Nachweis der TNF α Sekretion von Peritonealmakrophagen und CD45 positiven Leberzellen nach Transplantation mittels Elisa. Peritonealmakrophagen und CD45 positive Leberzellen wurden 6 Tage nach Transplantation isoliert und mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Die TNF α Produktion wurde im Überstand nach 24 Std. bestimmt. Zur Kontrolle wurde die TNF α Sekretion unstimulierter Peritonealmakrophagen und CD45 positiver Zellen bestimmt. TNF α Konzentration in pg/ml.

Der Spenderanteil bei den isolierten Peritonealmakrophagen und CD45 positiven Leberzellen lag 6 Tage nach Transplantation in allen Gruppen (PBS, CoPP, ZnPP Stimulation) unter 7% (Daten nicht gezeigt). Der Anteil konnte mit Hilfe der GFP Expression durchflusszytometrisch bestimmt werden. Überraschenderweise zeigten sowohl Peritonealmakrophagen als auch CD45 positive Leberzellen aus den Tieren, die mit CoPP vor Transplantation behandelt wurden, nach LPS Stimulation die höchste TNF α Produktion (Peritonealmakrophagen: 1634 ± 29 pg/ml, CD45-Zellen: 309 ± 5 pg/ml). Zellen aus PBS oder ZnPP behandelten Tieren sezernierten nach

Stimulation deutlich weniger TNF α (PBS Peritonealmakrophagen: $336 \pm 10,5$ pg/ml, CD45-Zellen: 139 ± 9 pg/ml; ZnPP Peritonealmakrophagen: 109 ± 6 pg/ml, CD45-Zellen: $95,5 \pm 13,8$ pg/ml). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Serumzytokindaten in **3.1.2.5**. Dort konnte gezeigt werden, dass in den CoPP behandelten Tieren nach Transplantation weniger TNF α gebildet wurde als in den PBS behandelten Tieren. Daher wurde überprüft, ob nach KMT *in vivo* überhaupt eine Stimulation durch LPS erfolgen konnte. Dafür wurde der LPS Spiegel im Serum bei den Tieren 6 Tage nach Transplantation bestimmt.

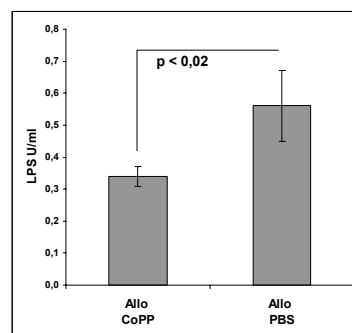


Abb. 3-17: Bestimmung von LPS im Serum 6 Tage nach Transplantation. Mäusen wurden 6 Tage nach Transplantation Blut durch Herzpunktion entnommen. LPS wurden mit Hilfe des Limulustests bestimmt. Konzentration in U/ml. Daten aus 3 voneinander unabhängigen Transplantationen sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung (10-17 Tiere pro Gruppe). Statistische Analysen wurden mit Mann Whitney U-Test durchgeführt.

Im Serum der CoPP behandelten Tiere wurde deutlich weniger LPS gemessen als im Serum der PBS behandelten Mäuse. (CoPP: 0,34 U/ml versus PBS: 0,56 U/ml, $p < 0,02$). Dieses Ergebnis stützt die Serumzytokindaten in Abschnitt **3.1.2.5**.

Da besonders die Bestrahlung des Empfängers bei allogener KMT zur Schädigung der Mucosa im Darmtrakt führt und den Eintritt bakterieller Produkte wie Endotoxin oder LPS in den Körper ermöglicht (Hill et al., 1997b), wurde der Dünndarm der Mäuse 6 Tage nach Transplantation histologisch untersucht. Hierfür wurden Parafinschnitte des Dünndarms angefertigt, mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und mikroskopisch untersucht.

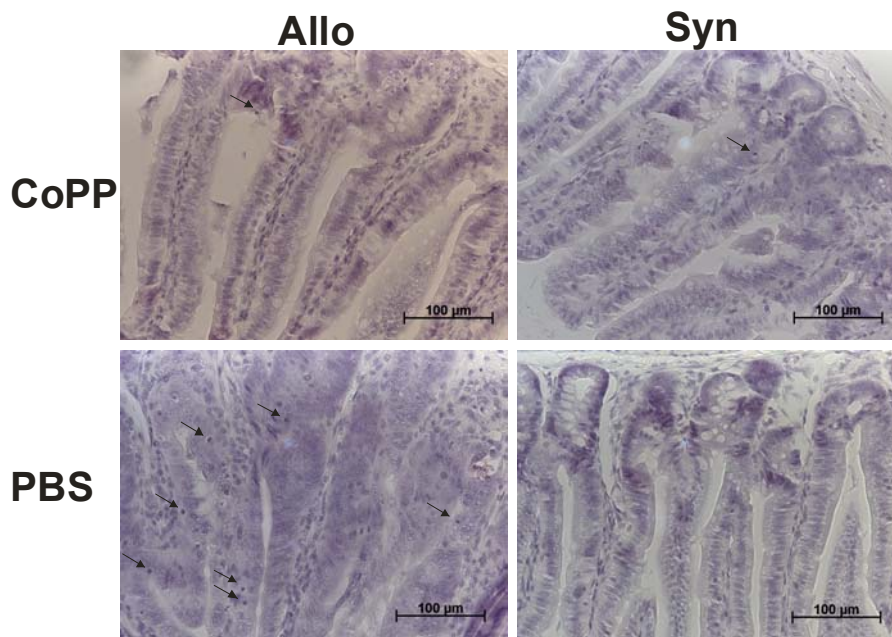


Abb. 3-18: Darmhistologie 6 Tage nach Transplantation. Der Dünndarm wurde von Tieren, die mit CoPP oder PBS behandelt wurden, 6 Tage nach Transplantation entnommen. Paraffinschnitte (5 µm) wurden mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Die Pfeile zeigen apoptotische Zellen an.

Die Dünndarmschnitte der allogenen transplantierten, PBS behandelten Empfängertiere zeigten 6 Tage nach Transplantation deutliche Zeichen einer Gewebeerstörung. Diese war vor allem gekennzeichnet durch eine erhöhte Apoptoserate von Darmepithelzellen der Zotten und Krypten. Gleichzeitig waren verstärkt Mitoseaktivitäten in den Kryptenepithelzellen zu beobachten. Im weiteren Verlauf kam es zu einer Abstumpfung der Zotten, da die hohe Apoptoserate nicht durch die höhere Mitoserate ausgeglichen werden konnte und die Zotten sich durch Absterben der Zellen immer weiter verkürzten. Zusätzlich verringerte sich die Zahl der Paneth-Körnerzellen in den Krypten.

Im Gegensatz dazu kam es sowohl bei den syngen transplantierten, PBS oder CoPP behandelten, als auch bei den allogenen transplantierten, CoPP behandelten Tieren kaum zu Veränderungen der Darmstruktur. Es waren nur wenige apoptotische Zellen nachweisbar, und die Mitoserate in den Krypten bewegte sich im Rahmen der stets vorhandenen Aktivität. Es kam zu keiner Abstumpfung der Zotten.

In **Abb. 3-18** sind die apoptotischen Kerne mit Pfeilen gekennzeichnet. Eine vergrößerte Darstellung befindet sich in Anhang II. Schäden wie die Abstumpfung der Zotten sind in der gezeigten Abbildung nicht erkennbar, aber in Kooperation mit Dr. Thomas Schubert (Abteilung für Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg)

wurden die Veränderungen in ein Punktesystem eingestuft, welches die Stärke der Apoptose, der Mitose, die Struktur der Zotten und die Zahl der Paneth-Körnerzellen berücksichtigt. Anhand dieser Wertung konnte bestätigt werden, dass der Darm der CoPP behandelten, allogenen transplantierten Mäuse geringere Strukturveränderungen aufwies als der Darm der PBS behandelten Tiere. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen stehen in Einklang mit den gemessenen LPS Konzentrationen im Serum nach allogener KMT, da eine geringe Veränderung der Darmstruktur auch weniger LPS-Einschwemmung bedeutet.

3.2 Zelluläre Therapie

3.2.1 Isolierung und Transplantation primärer pulmonaler Endothelzellen

Wie bereits in der Einleitung (1.3) erwähnt, hat die allogene KMT Einfluss auf das Endothel. Es kommt zu einem Endothelschaden, der mit schweren klinischen Komplikationen wie VOD, ELS, und Mikroangiopathie assoziiert ist (Holler et al., 1989; Holler et al., 1990; Scrobohaci et al., 1991). Im murinen System konnte gezeigt werden, dass IPS ebenfalls mit endothelialelem Schaden verbunden ist.

Es sollte daher eine Methode entwickelt werden, Endothelzellen zusammen mit Knochenmarkstransplantat zur Verfügung zu stellen, um eine schnelle Reparatur des Endothelschadens zu erreichen und damit pulmonale Komplikationen zu verringern. Es könnte mit dieser Methode ein Endothelchimerismus etabliert werden, bei dem Spender und Empfängerzellen koexistieren. Unter der Voraussetzung, dass Endothelzellen und das Knochenmarkstransplantat vom selben Spender stammen, können alloreaktive Spenderzellen diese Endothelzellen als nicht fremd erkennen, so dass es zu keiner Abstoßungsreaktion kommen kann.

Hierfür sollten *ex vivo* expandierte, primäre, pulmonale Endothelzellen zusammen mit Knochenmark transplantiert werden. Es sollte überprüft werden, ob diese transplantierten Endothelzellen in der Lunge verweilen.

Die Zellen wurden aus Tieren des gleichen Mausstammes wie das Knochenmark entnommen, so dass es bezüglich des Knochenmarks und der darin enthaltenen T-Zellen zu keinem MHC-Mismatch und damit zu keiner Abstoßung kommen sollte. Um die Zellen in der transplantierten Maus identifizieren zu können, wurden als Lungenendothelspender GFP-transgene C57/Bl6 Mäuse verwendet. Das Knochen-

mark hingegen wurde vom C57/Bl6 Wildtyp verwendet, so dass die Endothelzellen vom Knochenmark zu unterscheiden waren.

3.2.1.1 Isolierung von pulmonalen Endothelzellen durch LDL Aufnahme

Die Lungen wurden aus einer GFP-transgenen Maus präpariert und Endothelzellen durchflusszytometrisch isoliert.

Endothelzellen (Kume et al., 1998) ebenso wie Makrophagen (Endemann et al., 1993) sind in der Lage modifiziertes low density lipoprotein (oxidiertes oder acetyliertes LDL) zu inkorporieren. Die Isolierung über DiIAcLDL und der Ausschluss CD45 positiver Zellen (Ausschluss der Makrophagen und anderer LDL inkorporierenden Leukozyten) wurde daher als Methode eingesetzt um eine reine Endothelpopulation zu erhalten.

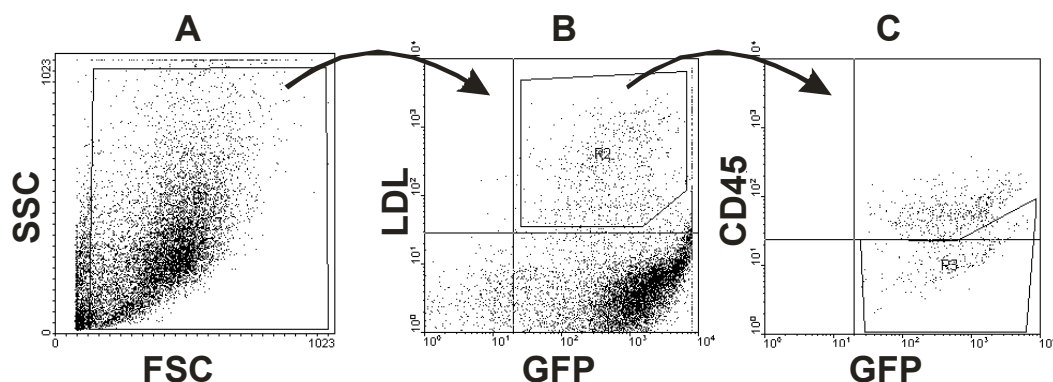


Abb. 3-19: Schema zur durchflusszytometrischen Isolierung von Endothelzellen. In Fenster A werden die Einstellung im Vorwärts-/Seitwärtsscatter sowie die Festlegung der Grenze R1 gezeigt, welche nur die Zellen einschließt, die für die weiteren Grenzfestsetzungen (R2+R3) berücksichtigt werden. Fenster B zeigt die Grenzfestlegung für LDL und GFP positive Zellen (R2). In Fenster C werden GFP positive und CD45 negative Zellen in R3 angezeigt. Nur Zellen innerhalb der Grenzen 1+2+3 (R1+R2+R3) wurden isoliert. Gesammelt wurden 2500 Zellen/Sekunde.

In **Abb. 3-19** wird gezeigt, wie die Grenzen beim Zellsortierer gesetzt wurden, um unerwünschte Zellen auszuschließen. Zunächst wurden im Vorwärts-/Seitwärtsscatter tote Zellen, Zelltrümmer und -fragmente sowie Zellcluster ausgeschlossen (= R1). Anschließend wurden von allen Zellen in R1 die DiIAcLDL und GFP positiven Zellen selektioniert (= R2). Die zusätzliche Markierung mit PE-Cy5 konjugiertem

Antikörper gegen CD45 erlaubte es, nicht endotheliale, aber LDL Rezeptor exprimierende Zellen auszuschließen, so dass LDL positive und CD45 negative Zellen gesammelt wurden (= R3).

Experiment Nr.	Zellzahl nach Adhärenzselektion	% LDL ⁺ Zellen	% GFP ⁺ Zellen	% CD45 ⁺ Zellen	Ertrag CD45 ⁻ LDL ⁺ GFP ⁺ Zellen
1	3,5 mio	6,0	95	12,1	33000 (0,94%)
2	4,3 mio	5,8	96	16,0	42000 (0,98%)
3	3,9 mio	4,6	97	0,6	75000 (1,92%)
4	4,3 mio	3,5	96	4,6	41000 (0,95%)

Tabelle 3-3: Ausbeute von EC nach Isolierung aus der Lunge. Es wurden die Zellcharakteristika aus 4 unabhängigen Isolierungsexperimenten angegeben.

Wie in **Tabelle 3-3** gezeigt, nahmen lediglich ca. 5 % aller adhärenzselektierten Zellen LDL auf. Davon waren 28-50 % CD45 positiv. In mehreren Versuchen lag die Ausbeute zwischen $3,1 \times 10^4$ und $7,5 \times 10^4$ Zellen. Die entsprach etwa 0,9-1,9 % aller Zellen nach Adhärenzselektion. Es konnten somit mit dieser Methode genügend Endothelzellen für eine weitere Kultivierung isoliert werden. Diese Zellen exprimieren auch in Kultur GFP, so dass GFP bei späteren Transplantationsexperimenten zur Zellidentifizierung herangezogen werden konnte.

3.2.1.2 CD31 und CD106 Expression auf pulmonalen Endothelzellen *in vivo*

Endothelzellen lassen sich mit Hilfe verschiedener Oberflächenantigene nachweisen. Hierzu gehören unter anderem die Adhäsionsmoleküle CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM) und CD106 (vascular cell adhesion molecule, VCAM-1). CD31 ist auf sowohl auf Endothelzellen als auch auf Leukozyten und Platelets exprimiert. CD31 wird normalerweise auf Endothelzellen ubiquitär exprimiert, während CD106 ein Aktivierungsmarker ist, der erst nach Stimulation mit LPS, TNF α und anderen inflammatorischen Stimuli wie z.B. Bestrahlung auf Endothelzellen gebildet wird.

Mäuse wurden hierfür mit 12 Gy bestrahlt, die Lungen 8 Std. nach Bestrahlung entnommen und Schnitte angefertigt. Diese wurden anschließend mit CD31 und CD106 Antikörpern markiert.

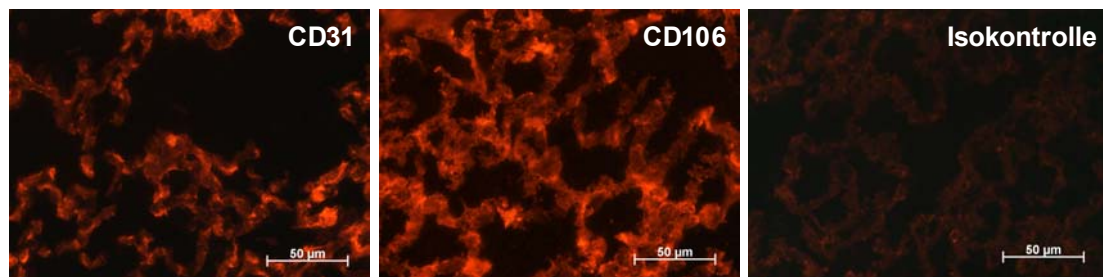


Abb. 3-20: Immunfluoreszenz: Expression von CD31 und CD106 auf Lungenzellen nach *in situ* Stimulation durch Bestrahlung. Kryoschnitte der Lunge aus bestrahlten Mäusen. Die orange Fluoreszenz zeigt CD31 bzw. CD106 positive Zellen an.

In den Lungen unstimulierter Mäuse konnte CD31, nicht aber CD106 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nach Bestrahlung wurden beide Adhäsionsmoleküle in pulmonalen Blutgefäßen exprimiert (**Abb. 3-20**). Sie wurden sowohl von makrovaskulären EC als auch von Kapillarendothelzellen gebildet. (Die Elastica interna der Arterien zeigte zusätzlich eine starke Autofluoreszenz). Beide Marker waren also für die spätere Analyse pulmonaler Endothelzellen geeignet.

3.2.1.3 Phänotypische Charakterisierung der isolierten pulmonalen Zellen

Nach der Isolierung wurden die pulmonalen Zellen 3-4 Wochen auf Gelatine beschichteten Platten kultiviert. Dabei kam es zu einer ca. 50 fachen Expansion innerhalb von 4 Passagen.

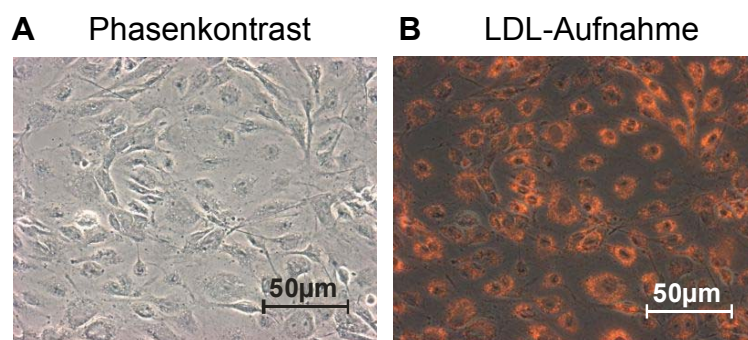


Abb. 3-21: Morphologie und LDL-Aufnahme von isolierten und kultivierten pulmonalen Zellen. Pulmonale Zellen wurden auf Gelatine beschichteten Platten für 3-4 Wochen kultiviert und passagiert. Für die Bestimmung der Morphologie erfolgte eine mikroskopische Untersuchung mit Phasenkontrast (**A**). Zum Nachweis der LDL-Aufnahme wurden die Zellen mit 10 µg/ml DiIAcLDL für 4 Std. inkubiert (**B**). Die Untersuchung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch.

Die Zellen wuchsen langsam und einschichtig und hatten bei mikroskopischer Untersuchung im Phasenkontrast eine uneinheitliche Morphologie (**Abb. 3-21A**). Ein Großteil der Zellen wuchs breitflächig und zeigte auch den so genannten cobble stone Phänotyp. Andere Zellen hatten spindelförmige Körper. Anhand der Morphologie konnte eine Fibroblastenkontamination bei den kultivierten Zellen nicht ausgeschlossen werden. Nach einer erneuten Exposition mit DilAcLDL zeigte sich, dass fast 100% der Zellen weiterhin in der Lage waren LDL aufzunehmen (**Abb. 3-21B**). Auch durch LDL konnte eine Fibroblastenkontamination nicht ausgeschlossen werden, da auch Fibroblasten teilweise LDL inkorporieren können (Garlanda and Dejana, 1997).

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Zellen auch auf andere Oberflächenmoleküle hin durchflusszytometrisch untersucht. Neben CD31 ist auch Panendothelial cell antigen (MECA32) als ein endothelspezifischer Oberflächenmarker beschrieben worden (MacPhee et al., 1994; Orosz et al., 1992). Die isolierten Zellen exprimierten sowohl CD31 als auch MECA32 (**Abb. 3-22**). Außerdem können Endothelzellen mit IsolektinB₄ nachgewiesen werden. Auch dies konnte bei unseren expandierten Zellen bestätigt werden. Um nochmals Makrophagen und damit eine Kontamination ausschließen zu können, wurden die Zellen des Weiteren mit CD45 Antikörper markiert. Es konnte keine relevante CD45 Expression bei den isolierten Zellen nachgewiesen werden. Alle Zellen waren nach 4 Passagen immer noch GFP positiv (Daten nicht gezeigt).

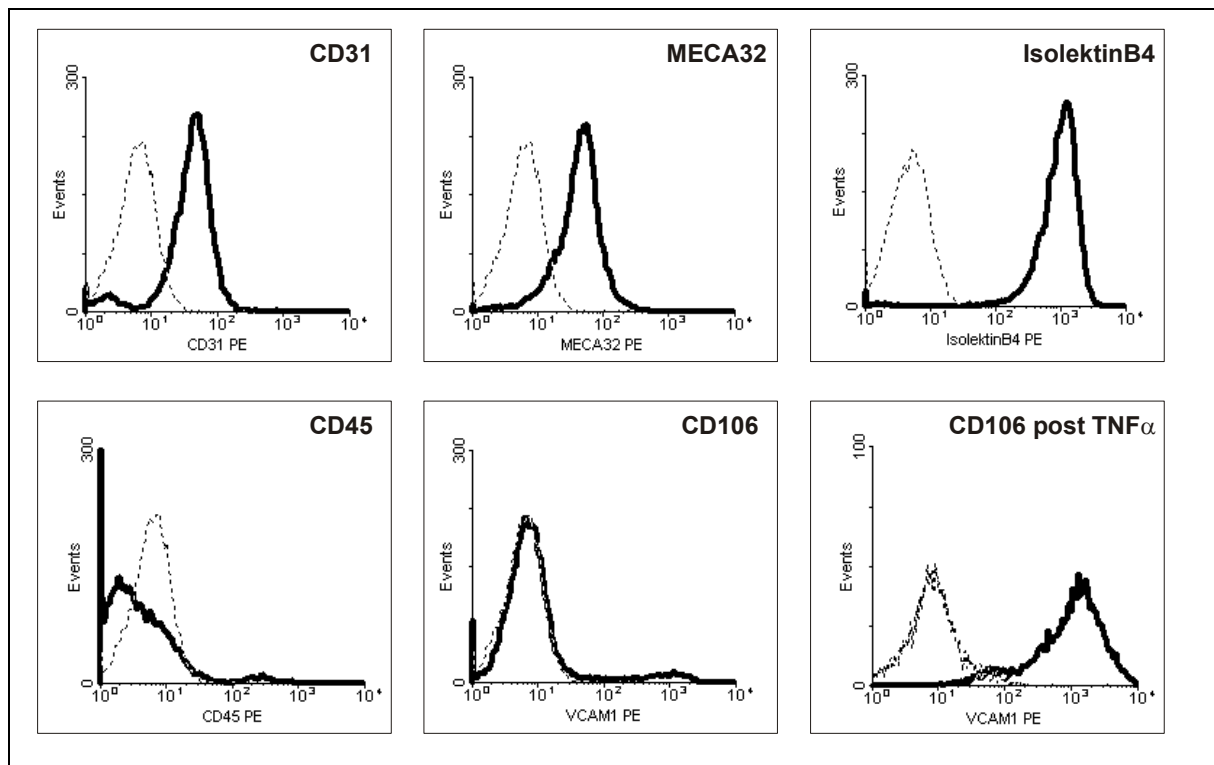


Abb. 3-22: Durchflusszytometrische Untersuchung von Oberflächenantigenen auf isolierten und kultivierten pulmonalen Zellen. Pulmonale Zellen wurden auf Gelatine beschichteten Platten für 3-4 Wochen kultiviert und passagiert. Für die Charakterisierung wurden die Zellen mit CD31, MECA32, CD45 oder CD106 Antikörpern sowie IsolektinB₄ markiert. Zur Expression von CD106 wurden Zellen mit 10 ng/ml TNF α für 24 Std. stimuliert. Gestrichelte Linie: IgG_{2a} als Isokontrolle; durchgezogene Linie: mit Antikörpern markierte Zellen.

Auch CD106 sollte auf den isolierten Zellen nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, wird dieses Adhäsionsmolekül nur nach Stimulation von Endothelzellen gebildet. Die isolierten und expandierten Zellen sollten bei normaler Kultivierung also kein CD106 exprimieren. Die Zellen wurden daher mit TNF α (10 ng/ml) für 24 Std. inkubiert. **Abb. 3-22** zeigt, dass die unbehandelten Zellen kein VCAM-1 bildeten. Nach Stimulation mit TNF α kam es zu einem deutlichen Anstieg der CD106 Expression.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zusammen mit dem Nachweis, dass die isolierten Zellen auch während der Kultivierung fast zu 100 % LDL aufnehmen konnten, zeigten, dass es sich bei diesen Zellen um Endothelzellen handelte. Diese Methode war also geeignet, Endothelzellen zu isolieren, zu kultivieren und zu expandieren. Die Zellen konnten innerhalb von 3 Wochen um das 50fache expandiert werden.

3.2.1.4 Transplantation von *ex vivo* expandierten Endothelzellen

Im nächsten Schritt sollten die kultivierten Endothelzellen nun transplantiert und überprüft werden, ob sie in der Lunge verbleiben.

Für dieses Experiment wurden B6D2F1-Mäuse mit 12 Gy fraktioniert bestrahlt um einen Lungenschaden und eine Aktivierung der EC zu verursachen (Gerbitz et al., 2000). Anschließend wurden 4×10^5 pulmonale Endothelzellen (pEC) GFP transgener C57/Bl6 Mäuse und 5 Mio Knochenmarkzellen von C57/Bl6 Wildtyp Mäusen über Schwanzveneninjektion transplantiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Lunge entnommen. Es wurden Kryoschnitte angefertigt und diese auf GFP positive Zellen hin untersucht.

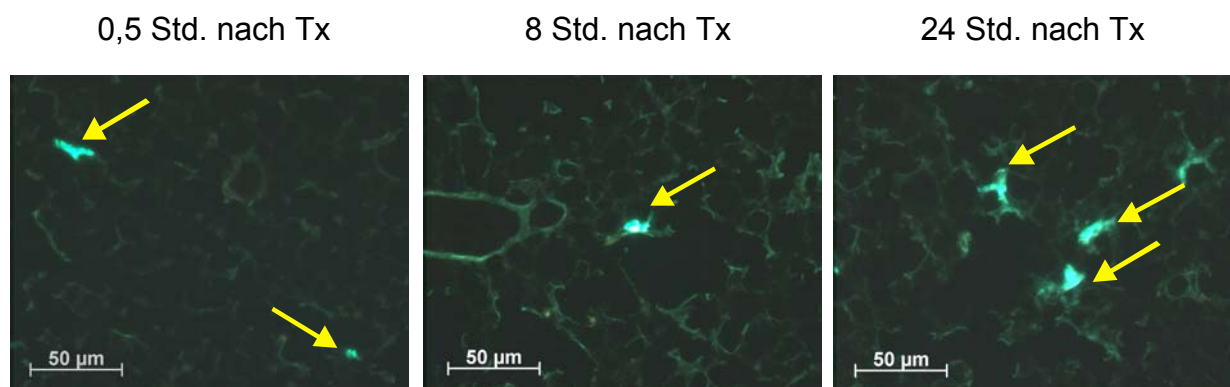


Abb. 3-23: GFP Fluoreszenz: Nachweis transplanteder GFP positiver pEC in der Lunge. Lungenschnitte von Mäusen, welche mit 2 x 6 Gy bestrahlt und mit expandierten GFP positiven pEC sowie 5 Mio Knochenmarkzellen von C57/Bl6 Wildtyp Mäusen transplantiert wurden. Die grüne Fluoreszenz (gelbe Pfeile) zeigt GFP positive Zellen.

Die Mäuse tolerierten die Endothelzelltransplantation mit eingesetzten Zellzahlen gut. Ursprüngliche Bedenken wegen der möglichen Entstehung einer pulmonalen Embolie nach Injektion dieser großvolumigen Zellen haben sich nicht bestätigt. **Abb. 3-23** zeigt repräsentative Schnitte von Lungen der Empfängermause 0,5 bis 24 Std. nach Transplantation. Die Schnitte wurden ohne Fixierung analysiert. Dies erlaubte eine maximale GFP Fluoreszenz. GFP positive Zellen konnten nicht in den Arterien oder Venen, sondern eher in den Arteriolen lokalisiert werden. Sie wurden teilweise in Clustern gefunden. Die genauere Lokalisation der Zellen in der Lunge muss noch untersucht werden.

In der Leber und Milz konnten keine GFP positiven Zellen gefunden wurden. Das wies darauf hin, dass der Großteil der Zellen bis zu diesem Zeitpunkt in der Lunge verblieben war. Die starke Fluoreszenz wies auch darauf hin, dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt noch vital waren.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt Ansätze zur Prävention und Therapie von Komplikationen nach allogener SZT auf dem Boden der Endothelzellmodulation. Hierfür wurde der Einfluss der HO-1 Induktion bei Endothelzellen untersucht. CoPP konnte bei bEnd2 Zellen als Modellsystem für Endothelzellen HO-1 induzieren und diese Zellen vor bestrahlungsinduzierter Apoptose schützen (**Abb. 3-4**). Auch SnPP als inhibierendes Protoporphyrin war in der Lage HO-1 zu induzieren. Allerdings wurden die Zellen nach Bestrahlung nicht vor Apoptose geschützt. Die aktivierende Wirkung von CoPP bzw. inhibierende Wirkung von SnPP konnte jeweils durch das andere Protoporphyrin aufgehoben werden. CoPP konnte auch im Gegensatz zu SnPP die Freisetzung von Cytochrom c nach Bestrahlung verhindern.

In vivo wurde die HO-1 Induktion ebenfalls nachgewiesen. In der Milz wurde HO-1 konstitutiv exprimiert, während in Leber und Darm HO-1 durch CoPP induziert werden konnte (**Abb. 3-8**). Das Gleiche galt für Peritonealmakrophagen und CD45 positive Leberzellen (**Abb. 3-10, Abb. 3-11**). Allerdings zeigte sich, dass diese Zellen nach Transplantation auf LPS-Stimulation mit erhöhter TNF α -Sekretion reagierten (**Abb. 3-16**).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CoPP behandelte Mäuse nach allogener SZT einen signifikanten Überlebensvorteil haben (**Abb. 3-13**). Die GvH-Reaktion konnte jedoch bei diesen Tieren nicht vollständig unterdrückt werden. Die Bestimmung von Serumzytokinen 4-6 Tage nach SZT zeigte, dass proinflammatorische Zytokine wie IFN γ , TNF α , IL-1 β und IL-12 sowie LPS als inflammatorischer Mediator in den CoPP behandelten Tieren deutlich reduziert waren (**Abb. 3-14**). IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin hingegen war erhöht.

Des Weiteren wurde die Transplantierbarkeit von Endothelzellen untersucht. Hierfür wurden EC über die LDL-Aufnahme und den Ausschluss CD45 positiver Zellen durchflusszytometrisch isoliert. Diese Zellen exprimierten nach vierwöchiger Expansion endothelspezifische Oberflächenantigene wie CD31, CD106 und MECA32, und konnten trotz *ex vivo* Expansion weiterhin LDL zu inkorporieren (**Abb. 3-21, Abb. 3-22**). Nach Transplantation waren die Endothelzellen im überprüften Zeitraum bis 24 Std. nach Transplantation in der Lunge wiederzufinden.

HO-1 Induktion schützt vor bestrahlungsinduzierter Apoptose

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten führte die Induktion von HO-1 durch CoPP zum Schutz vor bestrahlungsinduzierter Apoptose bei bEnd2 Zellen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit anderen Untersuchungen, die ebenfalls zeigen konnten, dass die Induktion von HO-1 schützend wirkt. Die wichtigsten Arbeiten sind in **Tabelle 4-1** aufgeführt.

HO-1 Induktion	Zellsystem	Apoptosestimulus	Referenz
HO-1 Transfektion	Coronar EC (Kaninchen)	Häm, Hämoglobin	(Abraham et al., 1995)
Hemin	Mesenteriale Gefäße	H ₂ O ₂	(Hayashi et al., 1999)
HO-1 Transfektion	Rinder Aorten EC 2F-2B EC-Zelllinie	TNF α	(Brouard et al., 2000)
HO-1 Transfektion	HMEC	TNF α	(Kushida et al., 2002)
Hemin	Schweine Aorten EC	H ₂ O ₂	(Balla et al., 1993)
CoPP	Ratten Herz EC	Ischämie/Reperfusion	(Katori et al., 2002)
HO-1 Transfektion	2F-2B EC-Zelllinie	Cycloheximid, TNF α	(Soares et al., 1998)

Tabelle 4-1: HO-1 Induktion in Endothelzellen und Schutz vor Apoptose

CoPP - wie auch Häm (=FePP) - ist ein potenter Induktor und Aktivator der HO-1 und wurde auch von anderen Arbeitsgruppen zur Induktion eingesetzt (Brouard et al., 2000; Deramaudt et al., 1998; Woo et al., 1998). Im Gegensatz dazu wirken SnPP und ZnPP induzierend und inhibierend (Brouard et al., 2000; Rodgers et al., 1996). Diese Protoporphyrine sind zwar in der Lage HO-1 zu induzieren, sie verhindern aber die Aktivierung dieses Enzyms (Kushida et al., 2002). Dies bestätigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, da HO-1 in mit SnPP behandelten bEnd2 nachgewiesen werden konnte, die Induktion aber nicht zum Schutz vor Apoptose führte.

Der aktivierende und schützende Effekt von CoPP konnte aufgehoben werden, wenn nach CoPP-Gabe eine Blockade mit SnPP erfolgte. Erfolgte nach SnPP Stimulation eine Stimulation mit CoPP, wurde die Apoptoserate wieder verringert. Für ZnPP ist bekannt, dass es HO-1 induziert und das Enzym gleichzeitig kompetitiv hemmt

(Rodgers et al., 1996; Yang et al., 2001). Für SnPP gilt die gleiche Art der Hemmung, die reversibel ist, sobald SnPP durch CoPP verdrängt wird.

Die Mechanismen der HO-1 Wirkung sind nicht vollständig geklärt. Gegenwärtig werden mehrere Signalwege diskutiert, bei denen die Abbauprodukte von Häm, nämlich Eisen, Bilirubin und CO eine Rolle spielen (Kushida et al., 2002). Besonders die Bildung von CO scheint beim Schutz vor Apoptose wichtig zu sein (Brouard et al., 2000). So verhindert CO Anoxi/Reoxygenierungsinduzierte Apoptose bei pulmonalen Endothelzellen. Dieser Effekt erfolgt über die Modulation der p38 mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und Caspase 3 (Zhang et al., 2003). p38 reguliert auch die Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom c bei UVB-induzierter Apoptose (Assefa et al., 2000). Auch bei bestrahlungsinduzierter Apoptose kommt es über die Aktivierung von p53 zur Freisetzung von Cytochrom c und letztlich zur Aktivierung von Caspasen (Friedman, 2002).

In Endothelzellen verhindert die HO-1-Induktion die Freisetzung von Cytochrom c nach Bestrahlung. Im Gegensatz dazu ist die Cytochrom c Freisetzung bei unbehandelten oder mit SnPP behandelten EC deutlich gegeben. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Schutz vor bestrahlungsinduzierter Apoptose über die oben genannte Signalkaskade verlaufen könnte.

HO-1 scheint nicht dieselbe Wirkung bei allen Endothelzellen zu haben. Die Endothelzelllinie bEnd3 exprimiert konstitutiv HO-1. Die Inkubation mit Protoporphyrinen erhöht lediglich die HO-1 Expression. Außerdem kommt es bei Einsatz von CoPP zu keinem Schutz vor bestrahlungsinduzierter Apoptose. Möglicherweise ist es für eine Zelle bezüglich des schützenden Effektes von Bedeutung, ob HO-1 konstitutiv vorhanden ist oder erst induziert werden muss. In der Regel wird bei Stimulation einer Zelle ein Signalweg initiiert. Ist das Stimulanz permanent vorhanden, kann dieser Signalweg durch negative Rückkopplung blockiert werden (Barak et al., 1994; Vaziri and Wang, 1999). Möglicherweise hat die permanente Anwesenheit von HO-1 in bEnd3 Zellen diese Wirkung und kann so die Zellen nicht mehr schützen.

HO-1 verringert die Mortalität nach allogener SZT

Die intraperitoneale Gabe von CoPP führt zur HO-1 Induktion in Organen wie Leber und Darm nach 24 Std. (**Abb. 3-8**). Die Milz hingegen exprimiert konstitutiv HO-1, was sich aus der Hauptaufgabe der Milz ergibt, nämlich gealterte und pathologisch

veränderte Erythrozyten und Partikel zu filtern (Waller H.D., 1994). Um den Einfluss der HO-1 Induktion auf GvHD nach allogener SZT *in vivo* zu untersuchen, wurde HO-1 mit CoPP an 2 Tagen vor Transplantation induziert. Es kommt in dem hier verwendeten haploidenten Transplantationsmodell nach Bestrahlung und Transplantation zur starken Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (Hill et al., 1997a; Teshima et al., 2002), die mit der Entstehung von GvHD einhergehen.

Mäuse, die vor Transplantation mit CoPP behandelt wurden, hatten einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber den mit PBS behandelten Tieren (**Abb. 3-13**). Als Kontrolle wurden Tiere mit ZnPP, einem HO-1 Inhibitor, vor Transplantation behandelt. Diese Tiere verstarben genauso schnell wie die mit PBS behandelten Tiere. Dies zeigt, dass die HO-1 Induktion und Aktivierung vor Frühmortalität bei allogener SZT mit Bestrahlung als Konditionierungsregime schützt. Auch in anderen Studien wurde der Einfluss der HO-1 auf die GvH-Reaktion untersucht (Woo et al., 1998; Woo et al., 2000). In diesen Arbeiten wurde die gleiche Mausstammkombination wie in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Die GvH-Reaktion wurde allerdings durch Injektion von 80 Mio Milzzellen initiiert. Es erfolgte dadurch kein Priming von Makrophagen, wie dies bei Bestrahlung der Fall ist, und es kam damit auch nicht zu einer bestrahlungsinduzierten TNF Bildung mit weiterer Aktivierung von APCs. Durch das Fehlen eines Konditionierungsregimes wie Ganzkörperbestrahlung wurde in der Studie die klinische Situation nicht mit einbezogen. HO-1 wurde zudem in Spenderzellen und nicht in Empfängerzellen induziert und führte nach Transplantation dosisabhängig zu einem signifikanten Überlebensvorteil gegenüber den Tieren mit PBS behandelten Spendermilzzellen. Die Milzzellen der Tiere, die mit CoPP behandelten Zellen transplantiert wurden, zeigten in Kultur eine geringere Sontanproliferation sowie niedrigere spontane IFN γ Freisetzung und eine höhere IL-10 Bildung. Es wurden allerdings im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit keine Zytokine im Serum der transplantierten Tiere gemessen. Außerdem wurden die Zielorgane der GvHD nicht auf histologische Veränderungen hin untersucht, so dass kein Zusammenhang zwischen erhöhtem Überlebensvorteil sowie Veränderungen der GvH sensitiven Organe mit veränderter Zytokinproduktion *in vivo* gezeigt werden konnte.

Trotz des signifikanten Überlebensvorteils der mit CoPP behandelten Tiere konnte in der vorliegenden Arbeit die GvHD während der gesamten Zeit nicht vollständig verhindert werden. Die alloreaktiven Eigenschaften der transplantierten T-Zellen gegenüber den Empfängerzellen wurden durch CoPP nicht unterdrückt. Die CoPP

Behandlung vor Transplantation erlaubt unter dem klinischen Gesichtspunkt möglicherweise einen Antitumoreffekt (GvL Effekt) durch das Fortbestehen klinisch apparer GvHD, während die frühe Toxizität nach allogener KMT unterdrückt wird. In dieser Arbeit wurde CoPP an zwei Tagen vor Transplantation verabreicht. Die Anwendung von CoPP über einen längeren Zeitraum nach Transplantation könnte einen längerfristigen und stärkeren protektiven Effekt haben, allerdings könnte dies auch einen negativen Einfluss auf die Alloreaktivität der T-Zellen haben. Die Gabe vor Transplantation wurde daher bewusst früh gewählt um die T-Zellaktivität und den möglichen GvL Effekt zu erhalten.

Ob HO-1 durch CoPP auch in Leukämie- oder anderen Tumorzellen induziert werden kann, und ob dies möglicherweise zum Schutz dieser Zellen vor Bestrahlung oder anderen Konditionierungsregimen führt, ist bisher nicht geklärt und bedarf dringend weiterer Untersuchungen.

Die Induktion von HO-1 durch CoPP hat an verschiedenen Punkten einen Einfluss auf die Entstehung der GvHD nach allogener KMT:

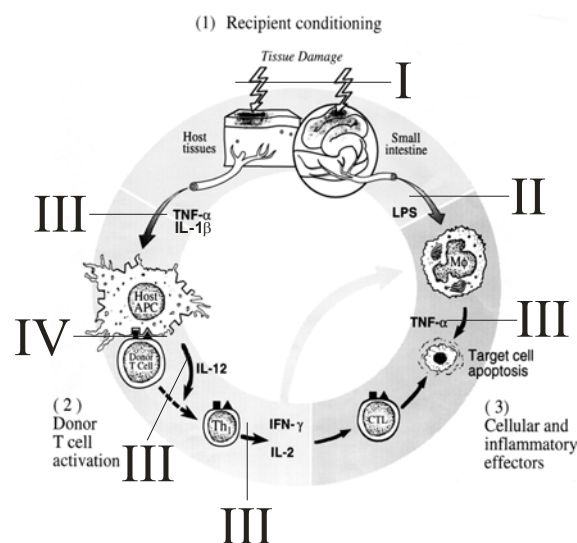


Abb. 4-1 : Einfluss der HO-1 bei der Entstehung der GvHD. Nach (Hill et al., 1997b)

(I) CoPP schützt den Darm vor bestrahlungsbedingtem Schaden (Abb. 4-1)

Histologische Untersuchungen des Darms nach KMT zeigten geringe Gewebeveränderungen in den CoPP behandelten Tieren, während bei den Kontrolltieren deutlich eine Auflösung der Strukturen von Krypten und Zotten zu erkennen war (Abb. 3-18).

Untersuchungen einer anderen Gruppe zeigen, dass das primäre Ereignis bei bestrahlungsinduziertem Darmschaden die Endothelapoptose ist (Paris et al., 2001). Die Induktion von HO-1 im Darm führt möglicherweise in unserem Modell zu einer verringerten bestrahlungsinduzierten Apoptose dieser Zellen. Ein geringerer Endothelschaden und die damit verbundene Erhaltung des Zell-Zellkontakts würde so das Eindringen von LPS durch die Mucosa verhindern. Die vorliegenden Ergebnisse weisen also darauf hin, dass die Effekte der HO-1 Induktion mit dem Schutz der transplantierten Mäuse vor bestrahlungsinduziertem Schaden zusammenhängen, besonders in Hinblick auf strahlungssensitive Organe wie dem Dünndarm. Ein ähnlicher Effekt ist auch für Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF) beschrieben worden. KGF scheint ebenfalls im Empfängergerewebe vor konditionierungsbedingtem Schaden schützend zu wirken (Krijanovski et al., 1999; Panoskaltsis-Mortari et al., 1998).

(II) CoPP verhindert verstärkte LPS Einschwemmung in den Organismus (Abb. 4-1)

LPS Bestimmungen im Serum 4 - 6 Tage nach allogener KMT wiesen geringere Konzentrationen in CoPP behandelten Tieren als in PBS behandelten Tieren auf. Dieses Ergebnis stützt die Vorstellung, dass die HO-1 Induktion den Darm vor bestrahlungsinduzierter Schädigung schützt und ein erhöhtes Eindringen von LPS in den Darm verhindert. LPS ist ein wichtiger Stimulator zur Aktivierung von APC und zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Mäuse mit einer LPS Resistenz, welche durch eine Mutation im Toll-like Rezeptorgen (*Tlr4*) oder durch CD14 Defizienz verursacht wurde (Haziot et al., 1996; Poltorak et al., 1998), zeichnen sich durch ein verlängertes Überleben und einem besseren GvHD-Index gegenüber LPS sensitiven Mäusen nach allogener KMT aus (Cooke et al., 2000a; Cooke et al., 2002). Der Einsatz eines LPS Antagonisten (B975) führt zu ähnlichen Ergebnissen, die mit einem deutlich niedrigeren TNF α Spiegel im Serum und geringerer intestinaler Histopathologie einhergehen (Cooke et al., 2001). Die geringere Einschwemmung von LPS nach KMT bei CoPP behandelten Mäusen verringert zusätzlich die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen des Empfängers und die zusätzliche Freisetzung von TNF α . Diese Ergebnisse stehen auch in Einklang mit experimentellen und klinischen Studien, bei denen die bakterielle Dekontamination des Darms bei allogener KMT die GvHD reduziert (Storb et al., 1983; van Bekkum et al., 1974).

(III) *Der Einsatz von CoPP führt zur verringerten Sekretion proinflammatorischer Zytokine IL-1 β , TNF α , IL-12 und IFN γ (Abb. 4-1)*

IL-1 β und TNF α werden nach Konditionierung vom Empfängergerewebe (bzw. von Makrophagen und TNF auch von T-Zellen) gebildet und aktivieren Empfänger APC, die ihrerseits T-Lymphozyten aktivieren. Sowohl die Produktion von IL-1 β als auch von TNF α ist abhängig von der Stärke der Konditionierung (Hill et al., 1997a). Die hohe Bestrahlungsdosis von 14 Gy führte auch in der vorliegenden Arbeit zu einer Zytokinproduktion, die durch CoPP-Gabe verringert wurde. Allerdings sezernierten Peritonealmakrophagen und CD45⁺ Leberzellen von Tieren, die vor Transplantation mit CoPP behandelt wurden, *in vitro* nach LPS Stimulation deutlich mehr TNF α als die Zellen PBS oder ZnPP behandelte Tiere. Möglicherweise kommt es bei den Zellen der PBS oder ZnPP behandelten Tiere zu einer Erschöpfung: Da in diesen Tieren nach Transplantation der Serum LPS-Spiegel höher war, führte dies *in vivo* zur stärkeren Aktivierung als bei Zellen der CoPP behandelten Tiere. Bei erneuter LPS Stimulation *in vitro* sezernierten die Zellen der CoPP behandelten Tieren deutlich mehr TNF α als die Zellen der PBS behandelten Tiere, da letztere durch die Primärstimulation nicht mehr im gleichen Maße auf LPS reagieren konnten. Für humane Makrophagen wurde die Bildung einer Resistenz bei wiederholter LPS Stimulation bereits beschrieben (Eissner et al., 2000a) und könnte die gegensätzlichen Ergebnisse der reduzierten TNF Produktion *in vivo* nach Transplantation und der erhöhten Produktion bei Restimulation mit LPS *in vitro* erklären.

Auch die TNF α Freisetzung von Spender T-Zellen hat einen Einfluss auf GvHD und GvL (Schmaltz et al., 2003). Werden Empfängerermäusen nach Konditionierung mit 13 Gy CD4 positive Zellen von TNF^{-/-} Mäusen zusammen mit Knochenmark transplantiert, führt dies zu einer deutlich erhöhten Überlebensrate gegenüber der Transplantation mit Wildtyp CD4 positiven Zellen. Dies verdeutlicht, dass sowohl die TNF α Freisetzung von Makrophagen als auch die von Spender T-Zellen bei der Entwicklung der GvHD eine Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit wurde die TNF α Sekretion von T-Zellen nicht untersucht, so dass keine Aussage über die Herkunft des gemessenen TNF α gemacht werden kann. Da die Gabe von CoPP einen Einfluss auf die Proliferation von Milzzellen bei einer *in vitro* Stimulation hat und außerdem bei Initiation einer GvHD mit 80 Mio Milzzellen einen signifikanten Überlebensvorteil bietet (Woo et al., 2000), wäre es interessant zu untersuchen, ob die CoPP Gabe an den Spender in dem in dieser Arbeit verwendeten Transplantationsmodell einen

(zusätzlichen) Einfluss auf das Überleben, der Entstehung der GvHD und der Zytokinsekretion hat.

IL-12 wird nach entsprechender Stimulation von APC sezerniert und stimuliert seinerseits T-Zellen zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IFN γ und IL-2. Diese Zytokine gehören dem so genannten Typ1 oder Th1 Zytokinen an und sind kritische Mediatoren der akuten GvHD (Cooke et al., 2002), da sie die Immunantwort kontrollieren und verstärken sowie CTL und NK-Zellen aktivieren. IFN γ hat direkte toxische Effekte auf die Haut und den Gastrointestinaltrakt und aktiviert Monozyten/Makrophagen derart, dass diese während der GvHD zytopathische Mengen inflammatorischer Zytokine wie TNF α als Antwort auf LPS Stimulation produzieren (Nestel et al., 1992).

IL-12 verhindert die Bildung so genannter Th2 Zellen, d.h. Zellen, die Zytokine des Typ2 wie IL-4, IL-5 und IL-10 sezernieren (Yang, 2000). Im allogenen Transplantationsmodell geht ein erhöhter IL-12 Spiegel mit erhöhter IFN γ Produktion einher. Die Neutralisation von IL-12 mit Antikörpern verringert die IFN γ Produktion und erhöht die Sekretion von IL-5 und IL-10 (Williamson et al., 1997). Es kommt damit zu einer Verschiebung einer Immunantwort von Th1 in Richtung Th2 und zu verbessertem Überleben, da Th2 Zytokine teilweise antiinflammatorische Eigenschaften aufweisen. Auch andere Arbeiten zeigen, dass eine Verschiebung der T-Zellantwort in Richtung Th2 eine akute GvHD vermindert (Fowler et al., 1994; Hill et al., 1998; Pan et al., 1995). Möglicherweise hat die Gabe von CoPP in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zu einer Verschiebung der T-Zellantwort von Th1 in Richtung Th2 geführt, die Reduktion der IL-12 und IFN γ Sekretion und die erhöhte IL-10 Produktion stützen diese Vermutung.

IL-10 hat antiinflammatorische Eigenschaften und ist in der Lage T-Zellproliferation und IFN γ Produktion zu unterdrücken sowie die Expression von MHC-Molekülen auf APC zu verringern (Levings et al., 2001; Roncarolo et al., 2001b; Roncarolo et al., 2001a). Im klinischen Bereich wird IL-10 daher als prognostischer Faktor diskutiert (Baker et al., 1999; Holler et al., 2000). Allerdings gibt es auch gegensätzliche Ergebnisse, bei denen erhöhte IL-10 Spiegel mit verstärkter akuter und chronischer GvHD sowie Infektionen korrelieren (Liem et al., 1998). Auch im Mausmodell kommt es zu solch widersprüchlichen Ergebnissen (Blazar et al., 1998; Krenger et al., 1994). Lee and Chau (2002) konnten zeigen, dass ein antiinflammatorischer Effekt von IL-10 in Mäusen durch HO-1 vermittelt wird. Die HO-1-Expression wird durch IL-10 induziert

und verhindert die Freisetzung von TNF α in Makrophagen nach LPS-Stimulation. Diese Daten stehen in Einklang mit den in der vorliegenden Arbeit gemessenen TNF α Spiegeln im Serum nach allogener KMT.

(IV) Die Gabe von CoPP führt zu einer verringerten Expression aktivierender Moleküle auf APC (Abb. 4-1)

MHC und kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 auf APC spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen. Je höher der Anteil dieser Moleküle an der Zelloberfläche, desto stärker ist auch das Potential zur Stimulation. Eine Blockierung der Expression verhindert die Aktivierung von T-Zellen (Banchereau and Steinman, 1998; Yu et al., 2000).

Die Gabe von CoPP führt zur Reduktion von MHC I sowie CD80 und CD86 und könnte dadurch die Aktivierung von T-Zellen verringern und so regulatorisch in den GvH-Kreis eingreifen. Es ist allerdings beschrieben worden, dass die vollständige Blockade von CD80 bzw. CD86 einen unterschiedlichen Einfluss auf die GvHD hat (Lang et al., 2002). Wird bei Mäusen die GvHD mit Milzzellen induziert, so führt die Blockade von CD86 zur Inhibition der CD4 positiven T-Zellaktivierung, während die CD80 Blockade die CD8 positive T-Zellaktivierung verstärkt. Ob ein solcher Effekt durch die deutliche, aber nicht vollständige Reduktion der Expression kostimulatorischer Moleküle in dem hier verwendeten Transplantationsmodell erreicht werden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und bedarf weiterer Klärung.

Transplantation von Endothel

Die Aktivierung und Schädigung von Endothelzellen nach allogener SZT ist im Menschen beschrieben worden und steht in Zusammenhang mit Komplikationen wie Mikroangiopathie, erhöhter Kapillarpermeabilität und dem Lebervenenverschlusssyndrom (Biedermann et al., 2002; Nurnberger et al., 1998; Salat et al., 1997; Scrobohaci et al., 1991). Auch in murinen Modellen wurden Veränderungen an Endothelzellen nach Konditionierung beobachtet (Samlowski et al., 1987). Bei Untersuchungen in der Lunge konnte gezeigt werden, dass es neben Endothelapoptose zu verstärkter Proliferation der EC nach allogener KMT kommt (Gerbitz et al., 2000). Der Endothelschaden wird sowohl durch Konditionierung als auch durch alloreaktive T-Zellen verursacht. Letzteres lässt die Vermutung zu, dass das Endothel möglicherweise ebenfalls ein Zielorgan der GvH Reaktion ist. In Hinblick auf einen mögli-

chen protektiven Effekt transplanteder Endothelzellen wurde daher in dieser Arbeit untersucht, ob Endothelzellen isoliert, expandiert und zusammen mit Knochenmark transplantiert werden können.

Für die Isolierung von EC kamen verschiedene Quellen in Betracht: a) Vorläufer-EC aus peripherem Blut, b) EC-Differenzierung aus Knochenmark und c) EC-Isolierung aus Organen.

Beim Menschen können endotheliale Vorläuferzellen aus peripherem Blut isoliert (Asahara et al., 1997), und diese *ex vivo* expandiert werden (Kaushal et al., 2001). Dies gelingt auch mit murinen Zellen (Takahashi et al., 1999). Allerdings sind einerseits von vornherein die Mengen gering (pro Maus kann maximal 1 ml Blut entnommen werden), und es muss andererseits bei den Tieren eine Stimulation durch Verursachen einer Ischämie oder Zytokingabe erfolgen, um Vorläuferzellen zu mobilisieren. Insgesamt wäre aber die Ausbeute zu gering, um die für eine Transplantation benötigte Zellzahl zu erhalten.

Mehrere Gruppen haben Methoden entwickelt, EC aus humanem Knochenmark zu differenzieren und zu kultivieren (Masek and Sweetenham, 1994; Rafii et al., 1994; Schweitzer et al., 1995). Besonders der Einsatz von Antikörpern gegen CD133 (= AC133) eröffnet neue Möglichkeiten zur EC Differenzierung (Bagley et al., 2003; Quirici et al., 2001). CD133 ist ein Glycoprotein und wird von einer Subpopulation CD34 positiver Knochenmarkzellen exprimiert (Miraglia et al., 1997). Die Funktion dieses Antigens ist weitgehend unbekannt. CD133 wird auf murinen Zellen nicht exprimiert. Das murine Homolog Prolimin wird lediglich auf embryonalen und adulten Epithelzellen sowie Nierentubuli exprimiert (Weigmann et al., 1997) und ist daher zur Isolierung von endothelialen Vorläuferzellen ungeeignet. Die Isolierung und Kultivierung muriner EC aus Knochenmark ist zwar beschrieben worden (Fei et al., 1990; Wang et al., 1998), zeigte sich in unseren Händen allerdings als schwer durchführbar.

Die Isolierung humaner EC aus Organen ist durch gängige Methoden schon lange etabliert. So ist die Isolierung von Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) eine häufig angewendete Methode, um primäre EC zu erhalten (Jaffe et al., 1973). Die Isolierung von EC aus Mäusen gestaltet sich aufgrund der Größe der Tiere deutlich schwieriger. Es sind aber auch hierfür einige Methoden beschrieben worden. So können EC aus mit Collagenase verdautem Gewebe (z.B. Lunge, Herz) mit CD31 und CD105 Antikörpern sowie IsolektinB₄ über Magnetsäulen isoliert werden (Dong

et al., 1997; Marelli-Berg et al., 2000). Bei dieser Methode konnte allerdings eine Fibroblastenkontamination nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Methode ist die Isolierung pulmonaler EC nach *in vivo* Stimulation mit LPS. Es kommt dadurch zur verstärkten Expression von VCAM-1 in den EC. Über dieses Adhäsionsmolekül können die Zellen mit entsprechenden Antikörpern durchflusszytometrisch isoliert werden (Gerritsen et al., 1995). Dies führt allerdings zu einer Aktivierung der Endothelzellen, die für unsere Untersuchungen unerwünscht wäre.

Da es aber mit diesen Methoden möglich ist, durch Expansion größere Zellzahlen zu erhalten, erschien die Isolierung von EC aus Organen für unsere Zwecke geeignet. Hierfür wurde eine neue Methode erarbeitet, bei der die EC über LDL-Aufnahme durchflusszytometrisch isoliert wurden. Kontamination durch Makrophagen, die ebenfalls in der Lage sind, LDL zu inkorporieren, wurde aber über den allgemeinen Leukozytenmarker CD45 ausgeschlossen.

Nach Isolierung und Expansion konnten die Zellen phänotypisch untersucht werden. Mit dem Nachweis der LDL-Aufnahme, IsolektinB₄-Bindung und der CD31 sowie MECA32 Expression zeigten die Zellen typische Charakteristika pulmonaler Endothelzellen. Nach Stimulation mit TNF α wurde auch VCAM-1 hochreguliert. Die Zellen waren weiterhin CD45 negativ, so dass Makrophagenkontamination ausgeschlossen werden konnte.

Allerdings konnte kein von Willebrandfaktor (vWF) nachgewiesen werden. In der Regel exprimieren Lungen EC diesen Faktor, es kann aber bei Kultivierung der EC zum Verlust der Expression kommen (Hohenwarter et al., 1992; Unger et al., 2002). Möglicherweise ist dies bei unserer Kultivierung geschehen. Da die expandierten Zellen ansonsten alle EC Merkmale inklusive der Morphologie aufwiesen, wurde vWF zur Identifizierung nicht herangezogen. vWF ist ein Plasmaprotein, das in der dimeren Form im Plasma und der subendothelialen Matrix und als granuläres Multimer in Weibel Palade Bodies vorkommt. vWF bindet und stabilisiert Faktor VIII und ist ein Kofaktor für die Bindung von Platelets an exponierter extrazellulärer Matrix bei verletzten Zellwänden (Ruggeri, 2003; Sumpio et al., 2002). Besonders unter Bedingungen mit schnellem Blutfluss und hohem Scherstress, z.B. in Kapillaren oder verengten Gefäßen, wird die Fähigkeit von vWF Platelets zu rekrutieren deutlich, da die schnell dahin fließenden Platelets sonst nicht in der Lage wären, an den Gefäßwänden zu adhären und zu aggregieren (Matsui et al., 2002; Schmutz et al., 2003). Der Verlust der vWF Expression *in vitro* könnte sich nach Transplan-

tation dieser Zellen *in vivo* negativ auf die Bindung von Platelets auswirken. Daher ist es notwendig zu untersuchen, ob sich die Expression von vWF *in vivo* wieder verändert, so dass die transplantierten EC ihre volle Funktion zurückgewinnen.

Die Kultivierung mit 20% FCS führte zur Entstehung großvolumiger Endothelzellen (**Abb. 3-21**). Daher stellte sich die Frage, ob Zellen solcher Größe transplantierbar sind. Erfreulicherweise erwies sich die Transplantation als unproblematisch. Die Zellen konnten noch 24 Std. nach Transplantation durch die GFP-Fluoreszenz in der Lunge nachgewiesen werden. Der Verbleib der EC in der Lunge wurde nur bis 24 Std. nach Transplantation verfolgt. Ob die Zellen in den Blutgefäßen haften bleiben, anwachsen und die Funktion geschädigter EC übernehmen, konnte bisher nicht geklärt werden. Der Verbleib der Zellen muss daher in weiteren Untersuchungen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden.

Die Transplantation humaner, *ex vivo* expandierter, endothelialer Vorläuferzellen führt in einem murinen Ischämiemodell zur Neovaskularisierung (Kalka et al., 2000). Ob diese Zellen auch erfolgreich bei konditionierungs- und transplantationsbedingten Schäden besonders in der Lunge eingesetzt werden können, ist derzeit nicht bekannt, sollte aber in zukünftigen Experimenten untersucht werden und könnte vielleicht neue Möglichkeiten der zellulären Therapie eröffnen.

Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Wege aufgezeigt, welche endotheliale Schäden nach allogener KMT verhindern könnten. Sie werfen zahlreiche Fragen auf und können Voraussetzung für weitere Projekte sein.

In vitro führt die HO-1 Stimulation im Zusammenhang mit reduzierter strahlungs-induzierter Apoptose zu einer geringeren Freisetzung von Cytochrom c. Weitere Untersuchungen in der Apoptose-Signalkaskade sind von großem Interesse, da bisher nicht geklärt werden konnte, an welchem Punkt der Kaskade die HO-1 eingreift. *In vivo* ist der Nachweis der HO-1 Induktion durch CoPP in Endothelzellen noch nicht erbracht worden. Dies ist Voraussetzung dafür, dass HO-1 auch *in vivo* das Endothel vor bestrahlungsinduzierter Apoptose schützen kann.

Die Transplantation von EC sollte über einen längeren Zeitraum untersucht werden, da im Augenblick nicht klar ist, ob Endothelzellen in der Lunge länger als 24 Std. verbleiben. Es wäre in diesem Zusammenhang ebenfalls interessant zu untersuchen,

ob transplantierte EC über einen Endothelchimerismus einen Einfluss auf die GvHD haben.

Die Kulturbedingungen der isolierten EC können optimiert werden, um eine bessere und schnellere Expansion *ex vivo* zu ermöglichen. Die Strategie der EC-Isolierung kann auch auf andere Organe angewendet werden.

Da HO-1 in Makrophagen induziert werden kann, ist es in Hinblick auf eine klinische Anwendung von Interesse zu untersuchen, ob HO-1 auch in Leukämien wie z.B. der monozytären FAB M4/M5 AML induzierbar ist. Dies könnte möglicherweise zu einem Schutzmechanismus in den Zellen führen, der bei Therapie der Leukämie unerwünscht ist.

Die Einflussnahme auf APC durch die Induktion von HO-1 ist ebenfalls nicht abschließend geklärt. Hierfür können APC aus verschiedenen Organen und Geweben isoliert und ihre Eigenschaften durchflusszytometrisch untersucht werden. Dabei wären besonders Antigene zur T-Zellstimulation wie z.B. kostimulatorische Moleküle, MHC Klassen und Adhäsionsmoleküle von Interesse. Auch die Funktionalität dieser Zellen sollte in einer gemischten Lymphozytenreaktion sowie die Zytokinproduktion überprüft werden.

Weiterhin ist die Rolle der HO-1 Induktion in APC im Rahmen der immunmodulierenden Funktion von IL-10 von Interesse, da IL-10 schon seit längerem mit der Induktion von Toleranz bei allogener SZT in Verbindung gebracht wird (Baker et al., 1999; Battaglia et al., 2002; Roncarolo et al., 2001a). Zwar wurde bereits gezeigt, dass die Wirkung von IL-10 auf Makrophagen und deren Zytokinproduktion über die Induktion der HO-1 vermittelt wird (Lee and Chau, 2002), ob aber HO-1 eine gemeinsame Endstrecke für die Wirkung von IL-10 auf APC darstellt, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar.

5 Zusammenfassung

Komplikationen wie Graft-versus-Host Disease (GvHD), Mikroangiopathie (MA) und Venno-Occlusive Disease (VOD) stellen ein großes Problem bei allogener Stammzelltransplantation (SZT) dar. Für VOD und MA ist bekannt, dass diese mit Endothelschäden in Verbindung stehen. Ziel dieser Arbeit war daher, Strategien zur Prävention und Therapie endothelialer Schäden nach allogener SZT zu entwickeln. Dabei stand die Induktion von Hämoxigenase-1 (HO-1) sowie die Transplantation von *ex vivo* expandierten Endothelzellen im Blickpunkt.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigten, dass *in vitro* die Induktion von HO-1 durch Kobaltprotoporphyrin (CoPP) Endothelzellen vor bestrahlungsinduzierter Apoptose schützte. Dieser Schutz konnte durch inhibitorische Protoporphyrine wie Zinnprotoporphyrin (SnPP) aufgehoben werden.

Im Mausmodell führte die Induktion von HO-1 bei allogener SZT zu einer signifikant höheren Überlebensrate der Tiere. Der Schutz zeigte sich auch in einer geringeren Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-12 sowie LPS als proinflammatorischer Mediator, die bei der Entstehung der GvHD eine wichtige Rolle spielen. Die Sekretion von IL-10 als Inhibitor aktivierter Makrophagen war hingegen erhöht.

Bei allogener SZT im murinen System ist in der Regel ein bestrahlungsinduzierter Darmschaden mit Endothelapoptose zu beobachten. Durch die Behandlung mit CoPP vor SZT wurde die Darmstruktur nur gering geschädigt und verhinderte so eine erhöhte Einschwemmung von LPS in den Darm.

Nach allogener SZT kommt es im murinen System zu einem erhöhten Endothelschaden sowie verstärkter Endothelproliferation in der Lunge. Es wurde in Hinblick auf einen möglichen protektiven Effekt untersucht, ob isolierte und *ex vivo* expandierte Lungenendothelzellen transplantiert werden können. Hierfür wurde eine neue Methode etabliert Endothelzellen aus der Lunge zu isolieren. Diese Zellen exprimierten nach vierwöchiger Kultivierung endothelspezifische Marker wie CD31, MECA32, VCAM-1 und IsolektinB₄. 24 Std. nach Transplantation konnten diese Zellen in der Lunge nachgewiesen werden. Der Verbleib der Zellen muss zukünftig über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Das Endothel könnte möglicherweise als Ziel für die Modulation einer Immunreaktion dienen, so dass sich neue Möglichkeiten der zellulären Therapie eröffnen.

6 Literatur

- Abbas A.K, Lichtman A.H., 2003, The Major Histocompatibility Complex, in Abbas A.K and Lichtman A.H. (eds), Cellular and Molecular Immunology: Philadelphia, Saunders, Elsevier Science, p. 65-80.
- Abraham,NG, Y Lavrovsky, M L Schwartzman, R A Stoltz, R D Levere, M E Gerritsen, S Shibahara, A Kappas, 1995, Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 92, p. 6798-6802.
- Alcaraz,MJ, A Habib, C Creminon, A M Vicente, M Lebre, S Levy-Toledano, J Maclouf, 2001, Heme oxygenase-1 induction by nitric oxide in RAW 264.7 macrophages is upregulated by a cyclo-oxygenase-2 inhibitor: Biochim.Biophys.Acta, v. 1526, p. 13-16.
- Alcaraz,MJ, A Habib, M Lebre, C Creminon, S Levy-Toledano, J Maclouf, 2000, Enhanced expression of haem oxygenase-1 by nitric oxide and antiinflammatory drugs in NIH 3T3 fibroblasts: Br.J.Pharmacol., v. 130, p. 57-64.
- Amersi,F, R Buelow, H Kato, B Ke, A J Coito, X D Shen, D Zhao, J Zaky, J Melinek, C R Lassman, J K Kolls, J Alam, T Ritter, H D Volk, D G Farmer, R M Ghobrial, R W Busuttil, J W Kupiec-Weglinski, 1999, Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury: J.Clin.Invest, v. 104, p. 1631-1639.
- Antin,JH, J L Ferrara, 1992, Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease: Blood, v. 80, p. 2964-2968.
- Appelbaum,F, 1999, Radioimmunotherapy and Hematopoietic Cell Transplantation, in ED Thomas, K Blume, and S Forman (eds), Hematopoietic Cell Transplantation: Malden, Massachusetts, Blackwell Science, Inc., p. 168-175.
- Asahara,T, T Murohara, A Sullivan, M Silver, Z R van der, T Li, B Witzenbichler, G Schatteman, J M Isner, 1997, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis: Science, v. 275, p. 964-967.
- Assefa,Z, A Vantieghem, M Garmyn, W Declercq, P Vandenabeele, J R Vandenheede, R Bouillon, W Merlevede, P Agostinis, 2000, p38 mitogen-activated protein kinase regulates a novel, caspase-independent pathway for the mitochondrial cytochrome c release in ultraviolet B radiation-induced apoptosis: J.Biol.Chem., v. 275, p. 21416-21421.
- Bagley,RG, J Walter-Yohrling, X Cao, W Weber, B Simons, B P Cook, S D Chartrand, C Wang, S L Madden, B A Teicher, 2003, Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells: Cancer Res., v. 63, p. 5866-5873.
- Baker,KS, M G Roncarolo, C Peters, M Bigler, T DeFor, B R Blazar, 1999, High spontaneous IL-10 production in unrelated bone marrow transplant recipients is

- associated with fewer transplant-related complications and early deaths: Bone Marrow Transplant., v. 23, p. 1123-1129.
- Balla,J, H S Jacob, G Balla, K Nath, J W Eaton, G M Vercellotti, 1993, Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 90, p. 9285-9289.
- Banchereau,J, R M Steinman, 1998, Dendritic cells and the control of immunity: Nature, v. 392, p. 245-252.
- Barak,Y, E Gottlieb, T Juven-Gershon, M Oren, 1994, Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential: Genes Dev., v. 8, p. 1739-1749.
- Battaglia,M, B R Blazar, M G Roncarolo, 2002, The puzzling world of murine T regulatory cells: Microbes.Infect., v. 4, p. 559-566.
- Behrends,U, R U Peter, R Hintermeier-Knabe, G Eissner, E Holler, G W Bornkamm, S W Caughman, K Degitz, 1994, Ionizing radiation induces human intercellular adhesion molecule-1 in vitro: J.Invest Dermatol., v. 103, p. 726-730.
- Biedermann,BC, S Sahner, M Gregor, D A Tsakiris, C Jeanneret, J S Pober, A Gratwohl, 2002, Endothelial injury mediated by cytotoxic T lymphocytes and loss of microvessels in chronic graft versus host disease: Lancet, v. 359, p. 2078-2083.
- Blazar,BR, P A Taylor, A Panoskaltsis-Mortari, S K Narula, S R Smith, M G Roncarolo, D A Vallera, 1998, Interleukin-10 dose-dependent regulation of CD4+ and CD8+ T cell-mediated graft-versus-host disease: Transplantation, v. 66, p. 1220-1229.
- Bouton,C, B Demple, 2000, Nitric oxide-inducible expression of heme oxygenase-1 in human cells. Translation-independent stabilization of the mRNA and evidence for direct action of nitric oxide: J.Biol.Chem., v. 275, p. 32688-32693.
- Brouard,S, L E Otterbein, J Anrather, E Tobiasch, F H Bach, A M Choi, M P Soares, 2000, Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis: J.Exp.Med., v. 192, p. 1015-1026.
- Cantoni,L, C Rossi, M Rizzardini, M Gadina, P Ghezzi, 1991, Interleukin-1 and tumour necrosis factor induce hepatic haem oxygenase. Feedback regulation by glucocorticoids: Biochem.J., v. 279 (Pt 3), p. 891-894.
- Cines,DB, E S Pollak, C A Buck, J Loscalzo, G A Zimmerman, R P McEver, J S Pober, T M Wick, B A Konkle, B S Schwartz, E S Barnathan, K R McCrae, B A Hug, A M Schmidt, D M Stern, 1998, Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders: Blood, v. 91, p. 3527-3561.
- Clark,JG, D K Madtes, R C Hackman, W Chen, M A Cheever, P J Martin, 1998, Lung injury induced by alloreactive Th1 cells is characterized by host-derived mononuclear cell inflammation and activation of alveolar macrophages: J.Immunol., v. 161, p. 1913-1920.

- Clark,JG, D K Madtes, T R Martin, R C Hackman, A L Farrand, S W Crawford, 1999, Idiopathic pneumonia after bone marrow transplantation: cytokine activation and lipopolysaccharide amplification in the bronchoalveolar compartment: Crit Care Med., v. 27, p. 1800-1806.
- Cohena,Y, A Nagler, 2003, Hematopoietic stem-cell transplantation using umbilical-cord blood: Leuk.Lymphoma, v. 44, p. 1287-1299.
- Cooke,KR, A Gerbitz, J M Crawford, T Teshima, G R Hill, A Tesolin, D P Rossignol, J L Ferrara, 2001, LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation: J.Clin.Invest, v. 107, p. 1581-1589.
- Cooke,KR, G R Hill, A Gerbitz, L Kobzik, T R Martin, J M Crawford, J P Brewer, J L Ferrara, 2000a, Hyporesponsiveness of donor cells to lipopolysaccharide stimulation reduces the severity of experimental idiopathic pneumonia syndrome: potential role for a gut-lung axis of inflammation: J.Immunol., v. 165, p. 6612-6619.
- Cooke,KR, G R Hill, A Gerbitz, L Kobzik, T R Martin, J M Crawford, J P Brewer, J L Ferrara, 2000b, Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduces lung injury after experimental allogeneic bone marrow transplantation: Transplantation, v. 70, p. 272-279.
- Cooke,KR, L Kobzik, T R Martin, J Brewer, J Delmonte, Jr., J M Crawford, J L Ferrara, 1996, An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin: Blood, v. 88, p. 3230-3239.
- Cooke,KR, W Krenger, G Hill, T R Martin, L Kobzik, J Brewer, R Simmons, J M Crawford, M R van den Brink, J L Ferrara, 1998, Host reactive donor T cells are associated with lung injury after experimental allogeneic bone marrow transplantation: Blood, v. 92, p. 2571-2580.
- Cooke,KR, K Olkiewicz, N Erickson, J L Ferrara, 2002, The role of endotoxin and the innate immune response in the pathophysiology of acute graft versus host disease: J.Endotoxin.Res., v. 8, p. 441-448.
- Cordonnier,C, J F Bernaudin, P Bierling, Y Huet, J P Vernant, 1986, Pulmonary complications occurring after allogeneic bone marrow transplantation. A study of 130 consecutive transplanted patients: Cancer, v. 58, p. 1047-1054.
- Crawford,SW, G Longton, R Storb, 1993, Acute graft-versus-host disease and the risks for idiopathic pneumonia after marrow transplantation for severe aplastic anemia: Bone Marrow Transplant., v. 12, p. 225-231.
- Deramaudt,BM, S Braunstein, P Remy, N G Abraham, 1998, Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis: J.Cell Biochem., v. 68, p. 121-127.
- Dong,QG, S Bernasconi, S Lostaglio, R W De Calmanovici, I Martin-Padura, F Breviario, C Garlanda, S Ramponi, A Mantovani, A Vecchi, 1997, A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissues. Characterization of

- two endothelial cell lines from the murine lung and subcutaneous sponge implants: *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, v. 17, p. 1599-1604.
- Duhrsen,U, J L Villeval, J Boyd, G Kannourakis, G Morstyn, D Metcalf, 1988, Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients: *Blood*, v. 72, p. 2074-2081.
- Eissner,G, S Kirchner, H Lindner, W Kolch, P Janosch, M Grell, P Scheurich, R Andreesen, E Holler, 2000a, Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages: *J.Immunol.*, v. 164, p. 6193-6198.
- Eissner,G, F Kohlhuber, M Grell, M Ueffing, P Scheurich, A Hieke, G Multhoff, G W Bornkamm, E Holler, 1995, Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor-alpha in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin: *Blood*, v. 86, p. 4184-4193.
- Eissner,G, H Lindner, U Behrends, W Kolch, A Hieke, I Klauke, G W Bornkamm, E Holler, 1996, Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo: protective role of IL-10: *Transplantation*, v. 62, p. 819-827.
- Eissner,G, H Lindner, A Konur, M Kreutz, R Andreesen, E Holler, 2000b, Naive monocytes can trigger transendothelial migration of peripheral blood cells through the induction of endothelial tumour necrosis factor-alpha: *Scand.J.Immunol.*, v. 51, p. 251-261.
- Endemann,G, L W Stanton, K S Madden, C M Bryant, R T White, A A Protter, 1993, CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein: *J.Biol.Chem.*, v. 268, p. 11811-11816.
- Falkenburg,JH, L M Faber, E M van den, S A Luxemburg-Heijs, A Hooftman-den Otter, W M Smit, P J Voogt, R Willemze, 1993, Generation of donor-derived antileukemic cytotoxic T-lymphocyte responses for treatment of relapsed leukemia after allogeneic HLA-identical bone marrow transplantation: *J.Immunother.*, v. 14, p. 305-309.
- Fei,RG, P E Penn, N S Wolf, 1990, A method to establish pure fibroblast and endothelial cell colony cultures from murine bone marrow: *Exp.Hematol.*, v. 18, p. 953-957.
- Ferrara,JL, 1993, Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease: *Curr.Opin.Immunol.*, v. 5, p. 794-799.
- Ferrara,JL, J H Antin, 1999, The Pathophysiology of Graft-Versus-Host-Disease, in ED Thomas, K Blume, and S Forman (eds), *Hematopoietic Cell Transplantation*: Malden, Massachusetts, Blackwell Science, Inc., p. 305-315.
- Foresti,R, H Goatly, C J Green, R Motterlini, 2001, Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection: *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, v. 281, p. H1976-H1984.

- Fowler,DH, K Kurasawa, R Smith, R E Gress, 1994, Donor lymphoid cells of Th2 cytokine phenotype reduce lethal graft versus host disease and facilitate fully allogeneic cell transfers in sublethally irradiated mice: *Prog.Clin.Biol.Res.*, v. 389, p. 533-540.
- Friedman,EJ, 2002, Immune modulation by ionizing radiation and its implications for cancer immunotherapy: *Curr.Pharm.Des.*, v. 8, p. 1765-1780.
- Fuks,Z, R S Persaud, A Alfieri, M McLoughlin, D Ehleiter, J L Schwartz, A P Seddon, C Cordon-Cardo, A Haimovitz-Friedman, 1994, Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo: *Cancer Res.*, v. 54, p. 2582-2590.
- Garlanda,C, E Dejana, 1997, Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers: *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, v. 17, p. 1193-1202.
- Gerbitz,A, L Kobzik, G Eissner, E Holler, R Andreessen, J L Ferrara, K R Cooke, 2000, A role for TNFalpha mediated endothelial apoptosis in the development of experimental idiopathic pneumonia syndrome: *Bone Marrow Transplant.*, v. 25(suppl), p. S36.
- Gerritsen,ME, C P Shen, M C McHugh, W J Atkinson, J M Kiely, D S Milstone, F W Lusinskas, M A Gimbrone, Jr., 1995, Activation-dependent isolation and culture of murine pulmonary microvascular endothelium: *Microcirculation.*, v. 2, p. 151-163.
- Gluckman,E, A Devergie, H Bourdeau-Esperou, D Thierry, R Traineau, A Auerbach, H E Broxmeyer, 1990, Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi's anemia: *Nouv.Rev.Fr.Hematol.*, v. 32, p. 423-425.
- Glucksberg,H, R Storb, A Fefer, C D Buckner, P E Neiman, R A Clift, K G Lerner, E D Thomas, 1974, Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors: *Transplantation*, v. 18, p. 295-304.
- Goulmy,E, 1996, Human minor histocompatibility antigens: *Curr.Opin.Immunol.*, v. 8, p. 75-81.
- Goulmy,E, R Schipper, J Pool, E Blokland, J H Falkenburg, J Vossen, A Grathwohl, G B Vogelsang, H C van Houwelingen, J J van Rood, 1996, Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: *N.Engl.J.Med.*, v. 334, p. 281-285.
- Hale,G, H Waldmann, 1994, Control of graft-versus-host disease and graft rejection by T cell depletion of donor and recipient with Campath-1 antibodies. Results of matched sibling transplants for malignant diseases: *Bone Marrow Transplant.*, v. 13, p. 597-611.
- Hancock,WW, 1997, Impact of alloimmunity on chronic tissue remodelling: role of cytokines and protective genes in the vessel wall: *Transpl.Immunol.*, v. 5, p. 277-281.

- Hayashi,S, R Takamiya, T Yamaguchi, K Matsumoto, S J Tojo, T Tamatani, M Kitajima, N Makino, Y Ishimura, M Suematsu, 1999, Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme: *Circ.Res.*, v. 85, p. 663-671.
- Haziot,A, E Ferrero, F Kontgen, N Hijiya, S Yamamoto, J Silver, C L Stewart, S M Goyert, 1996, Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice: *Immunity.*, v. 4, p. 407-414.
- Hengartner,MO, 2000, The biochemistry of apoptosis: *Nature*, v. 407, p. 770-776.
- Hill,GR, K R Cooke, T Teshima, J M Crawford, J C Keith, Jr., Y S Brinson, D Bungard, J L Ferrara, 1998, Interleukin-11 promotes T cell polarization and prevents acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: *J.Clin.Invest*, v. 102, p. 115-123.
- Hill,GR, J M Crawford, K R Cooke, Y S Brinson, L Pan, J L Ferrara, 1997a, Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines: *Blood*, v. 90, p. 3204-3213.
- Hill,GR, W Krenger, J L Ferrara, 1997b, The role of cytokines in acute graft-versus-host disease: *Cytokines Cell Mol.Ther.*, v. 3, p. 257-266.
- Hintermeier-Knabe,R, M Brockhaus, E Holler, W Lesslauer, J Kempeni, H J Kolb, W Wilmanns, 1992, Sequential release of tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor receptors in complication of human bone marrow transplantations, in Freund, Link, Schmidt, and Welte (eds), *Hematopoiesis, Oncology and AIDS II*: Berlin, Springer Verlag, p. 443-448.
- Hohenwarter,O, C Schmatz, H Katinger, 1992, Stability of von Willebrand factor secretion in different human endothelial hybrid cell lines: *Cytotechnology*, v. 8, p. 31-37.
- Holler,E, B Ertl, R Hintermeier-Knabe, M G Roncarolo, G Eissner, F Mayer, P Fraunberger, U Behrends, W Pfannes, H J Kolb, W Wilmanns, 1997, Inflammatory reactions induced by pretransplant conditioning--an alternative target for modulation of acute GvHD and complications following allogeneic bone marrow transplantation?: *Leuk.Lymphoma*, v. 25, p. 217-224.
- Holler,E, J Hahn, A Reichle, R Andreesen. Transplantation hämatopoietischer Stammzellen aus Knochenmark und Blut. *Z.Allg.Med.* [77], 62-66. 2001a.
Ref Type: Journal (Full)
- Holler,E, H J Kolb, E Hiller, W Mraz, W Lehmacher, B Gleixner, C Seeber, U Jehn, H H Gerhartz, G Brehm, ., 1989, Microangiopathy in patients on cyclosporine prophylaxis who developed acute graft-versus-host disease after HLA-identical bone marrow transplantation: *Blood*, v. 73, p. 2018-2024.
- Holler,E, H J Kolb, J Mittermuller, M Kaul, G Ledderose, T Duell, B Seeber, M Schleuning, R Hintermeier-Knabe, B Ertl, ., 1995, Modulation of acute graft-versus-host-disease after allogeneic bone marrow transplantation by tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) release in the course of pretransplant conditioning: role of conditioning regimens and prophylactic application of a

- monoclonal antibody neutralizing human TNF alpha (MAK 195F): *Blood*, v. 86, p. 890-899.
- Holler,E, H J Kolb, A Moller, J Kempeni, S Liesenfeld, H Pechumer, W Lehmacher, G Ruckdeschel, B Gleixner, C Riedner, ., 1990, Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation: *Blood*, v. 75, p. 1011-1016.
- Holler,E, M Pfeifer, J Hahn, G Hildebrandt, A Gerbitz, A Reichle, T Müller, H J Kolb, R Andreesen, 2001b, Pneumologische Probleme nach allogener Stammzelltransplantation, in H Bartsch, J Finke, and A Mumm (eds), *Hämatopoetische Stammzelltransplantation*: Freiburg, Karger Verlag, p. 89-95.
- Holler,E, M G Roncarolo, R Hintermeier-Knabe, G Eissner, B Ertl, U Schulz, H Knabe, H J Kolb, R Andreesen, W Wilmanns, 2000, Prognostic significance of increased IL-10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation: *Bone Marrow Transplant.*, v. 25, p. 237-241.
- Horowitz,MM, 1999, Uses and Growth of Hematopoietic Cell Transplantation, in ED Thomas, K Blume, and S Forman (eds), *Hematopoietic Cell Transplantation*: Malden, Massachusetts, Blackwell Science, Inc, p. 12-18.
- Jaffe,EA, R L Nachman, C G Becker, C R Minick, 1973, Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria: *J.Clin.Invest.*, v. 52, p. 2745-2756.
- Kalka,C, H Masuda, T Takahashi, W M Kalka-Moll, M Silver, M Kearney, T Li, J M Isner, T Asahara, 2000, Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 97, p. 3422-3427.
- Katori,M, R Buelow, B Ke, J Ma, A J Coito, S Iyer, D Southard, R W Busuttil, J W Kupiec-Weglinski, 2002, Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway: *Transplantation*, v. 73, p. 287-292.
- Kaushal,S, G E Amiel, K J Guleserian, O M Shapira, T Perry, F W Sutherland, E Rabkin, A M Moran, F J Schoen, A Atala, S Soker, J Bischoff, J E Mayer, Jr., 2001, Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo: *Nat.Med.*, v. 7, p. 1035-1040.
- Kitada,O, T Kodama, K Kuribayashi, D Ihaku, M Fujita, T Matsuyama, M Sugita, 2001, Heme oxygenase-1 (HO-1) protein induction in a mouse model of asthma: *Clin.Exp.Allergy*, v. 31, p. 1470-1477.
- Kochi,S, H Takanaga, H Matsuo, H Ohtani, M Naito, T Tsuruo, Y Sawada, 2000, Induction of apoptosis in mouse brain capillary endothelial cells by cyclosporin A and tacrolimus: *Life Sci.*, v. 66, p. 2255-2260.
- Krenger,W, G R Hill, J L Ferrara, 1997, Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease: *Transplantation*, v. 64, p. 553-558.

- Krenger,W, K Snyder, S Smith, J L Ferrara, 1994, Effects of exogenous interleukin-10 in a murine model of graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens: Transplantation, v. 58, p. 1251-1257.
- Krijanovski,OI, G R Hill, K R Cooke, T Teshima, J M Crawford, Y S Brinson, J L Ferrara, 1999, Keratinocyte growth factor separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease: Blood, v. 94, p. 825-831.
- Kume,N, T Murase, H Moriwaki, T Aoyama, T Sawamura, T Masaki, T Kita, 1998, Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells: Circ.Res., v. 83, p. 322-327.
- Kushida,T, V G Li, S Quan, A Goodman, N G Abraham, 2002, Role of human heme oxygenase-1 in attenuating TNF-alpha-mediated inflammation injury in endothelial cells: J.Cell Biochem., v. 87, p. 377-385.
- Lang,TJ, P Nguyen, R Peach, W C Gause, C S Via, 2002, In vivo CD86 blockade inhibits CD4+ T cell activation, whereas CD80 blockade potentiates CD8+ T cell activation and CTL effector function: J.Immunol., v. 168, p. 3786-3792.
- Langley,RE, E A Bump, S G Quartuccio, D Medeiros, S J Braunhut, 1997, Radiation-induced apoptosis in microvascular endothelial cells: Br.J.Cancer, v. 75, p. 666-672.
- Lavrovsky,Y, G S Drummond, N G Abraham, 1996, Downregulation of the human heme oxygenase gene by glucocorticoids and identification of 56b regulatory elements: Biochem.Biophys.Res.Comm., v. 218, p. 759-765.
- Lechleitner,S, J Gille, D R Johnson, P Petzelbauer, 1998, Interferon enhances tumor necrosis factor-induced vascular cell adhesion molecule 1 (CD106) expression in human endothelial cells by an interferon-related factor 1-dependent pathway: J.Exp.Med., v. 187, p. 2023-2030.
- Lee,TS, L Y Chau, 2002, Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice: Nat.Med., v. 8, p. 240-246.
- Levings,MK, R Sangregorio, F Galbiati, S Squadrone, M R de Waal, M G Roncarolo, 2001, IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells: J.Immunol., v. 166, p. 5530-5539.
- Liem,LM, H C van Houwelingen, E Goulmy, 1998, Serum cytokine levels after HLA-identical bone marrow transplantation: Transplantation, v. 66, p. 863-871.
- Lindner,H, E Holler, B Ertl, G Multhoff, M Schreglmann, I Klauke, S Schultz-Hector, G Eissner, 1997a, Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and may prevent repair: role of cytokines: Blood, v. 89, p. 1931-1938.
- Lindner,H, E Holler, A Gerbitz, J P Johnson, G W Bornkamm, G Eissner, 1997b, Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo: interleukin-10 protects against transendothelial migration: Transplantation, v. 64, p. 1370-1373.

- MacPhee,MJ, R H Wiltout, K L McCormick, T J Sayers, A M Pilaro, 1994, A method for obtaining and culturing large numbers of purified organ-derived murine endothelial cells: *J.Leukoc.Biol.*, v. 55, p. 467-475.
- Marelli-Berg,FM, E Peek, E A Lidington, H J Stauss, R I Lechler, 2000, Isolation of endothelial cells from murine tissue: *J.Immunol.Methods*, v. 244, p. 205-215.
- Masek,LC, J W Sweetenham, 1994, Isolation and culture of endothelial cells from human bone marrow: *Br.J.Haematol.*, v. 88, p. 855-865.
- Matsui,H, M Sugimoto, T Mizuno, S Tsuji, S Miyata, M Matsuda, A Yoshioka, 2002, Distinct and concerted functions of von Willebrand factor and fibrinogen in mural thrombus growth under high shear flow: *Blood*, v. 100, p. 3604-3610.
- McCoubrey,WK, Jr., T J Huang, M D Maines, 1997, Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3: *Eur.J.Biochem.*, v. 247, p. 725-732.
- Meyers,JD, N Flournoy, E D Thomas, 1982, Nonbacterial pneumonia after allogeneic marrow transplantation: a review of ten years' experience: *Rev.Infect.Dis.*, v. 4, p. 1119-1132.
- Miraglia,S, W Godfrey, A H Yin, K Atkins, R Warnke, J T Holden, R A Bray, E K Waller, D W Buck, 1997, A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning: *Blood*, v. 90, p. 5013-5021.
- Mutis,T, E Goulmy, 2002, Targeting alloreactive T cells to hematopoietic system specific minor histocompatibility antigens for cellular immunotherapy of hematological malignancies after stem cell transplantation: *Ann Hematol.*, v. 81 Suppl 2, p. S38-S39.
- Nestel,FP, K S Price, T A Seemayer, W S Lapp, 1992, Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease: *J.Exp.Med.*, v. 175, p. 405-413.
- Nurnberger,W, I Michelmann, S Burdach, U Gobel, 1998, Endothelial dysfunction after bone marrow transplantation: increase of soluble thrombomodulin and PAI-1 in patients with multiple transplant-related complications: *Ann.Hematol.*, v. 76, p. 61-65.
- Okabe,M, M Ikawa, K Kominami, T Nakanishi, Y Nishimune, 1997, 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells: *FEBS Lett.*, v. 407, p. 313-319.
- Orosz,CG, A van Buskirk, D D Sedmak, P Kincade, K Miyake, R P Pelletier, 1992, Role of the endothelial adhesion molecule VCAM in murine cardiac allograft rejection: *Immunol.Lett.*, v. 32, p. 7-12.
- Ostendorf,P, U Schaefer, A R Zander, 1997, Knochenmarktransplantation, in P Ostendorf and S Seeber (eds), *Hämatologie Onkologie*: München, Urban und Schwarzenberg Verlag, p. 222-236.

- Otterbein, LE, F H Bach, J Alam, M Soares, L H Tao, M Wysk, R J Davis, R A Flavell, A M Choi, 2000, Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway: *Nat.Med.*, v. 6, p. 422-428.
- Pan, L, J Delmonte, Jr., C K Jalonon, J L Ferrara, 1995, Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease: *Blood*, v. 86, p. 4422-4429.
- Panoskaltzis-Mortari, A, D L Lacey, D A Vallera, B R Blazar, 1998, Keratinocyte growth factor administered before conditioning ameliorates graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice: *Blood*, v. 92, p. 3960-3967.
- Paris, F, Z Fuks, A Kang, P Capodiceci, G Juan, D Ehleiter, A Haimovitz-Friedman, C Cordon-Cardo, R Kolesnick, 2001, Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice: *Science*, v. 293, p. 293-297.
- Petrache, I, L E Otterbein, J Alam, G W Wiegand, A M Choi, 2000, Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts: *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, v. 278, p. L312-L319.
- Piguet, PF, G E Grau, M A Collart, P Vassalli, Y Kapanci, 1989, Pneumopathies of the graft-versus-host reaction. Alveolitis associated with an increased level of tumor necrosis factor mRNA and chronic interstitial pneumonitis: *Lab Invest*, v. 61, p. 37-45.
- Poltorak, A, X He, I Smirnova, M Y Liu, C Van Huffer, X Du, D Birdwell, E Alejos, M Silva, C Galanos, M Freudenberg, P Ricciardi-Castagnoli, B Layton, B Beutler, 1998, Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene: *Science*, v. 282, p. 2085-2088.
- Poss, KD, S Tonegawa, 1997, Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 94, p. 10919-10924.
- Quirici, N, D Soligo, L Caneva, F Servida, P Bossolasco, G L Deliliers, 2001, Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells: *Br.J.Haematol.*, v. 115, p. 186-194.
- Raffael, A, 1988, Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie, Labor-Medizin: Darmstadt, GIT Verlag GMBH, p. 89-97.
- Rafii, S, F Shapiro, J Rimarachin, R L Nachman, B Ferris, B Weksler, M A Moore, A S Asch, 1994, Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion: *Blood*, v. 84, p. 10-19.
- Richard, S, M Seigneur, A Blann, R Adams, M Renard, M Puntous, J M Boiron, J Amiral, J Reiffers, M Boisseau, 1996, Vascular endothelial lesion in patients undergoing bone marrow transplantation: *Bone Marrow Transplant.*, v. 18, p. 955-959.

- Rodgers,PA, D S Seidman, P L Wei, P A Dennerly, D K Stevenson, 1996, Duration of action and tissue distribution of zinc protoporphyrin in neonatal rats: *Pediatr.Res.*, v. 39, p. 1041-1049.
- Roncarolo,MG, R Bacchetta, C Bordignon, S Narula, M K Levings, 2001a, Type 1 T regulatory cells: *Immunol.Rev.*, v. 182, p. 68-79.
- Roncarolo,MG, M K Levings, C Traversari, 2001b, Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells: *J.Exp.Med.*, v. 193, p. F5-F9.
- Ruegg,C, A Yilmaz, G Bieler, J Bamat, P Chaubert, F J Lejeune, 1998, Evidence for the involvement of endothelial cell integrin $\alpha V\beta 3$ in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN- γ : *Nat.Med.*, v. 4, p. 408-414.
- Ruggeri,ZM, 2003, Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions: *J.Thromb.Haemost.*, v. 1, p. 1335-1342.
- Salat,C, E Holler, H J Kolb, B Reinhardt, R Pihusch, W Wilmanns, E Hiller, 1997, Plasminogen activator inhibitor-1 confirms the diagnosis of hepatic veno-occlusive disease in patients with hyperbilirubinemia after bone marrow transplantation: *Blood*, v. 89, p. 2184-2188.
- Samlowski,WE, H M Johnson, E H Hammond, B A Robertson, R A Daynes, 1987, Marrow ablative doses of gamma-irradiation and protracted changes in peripheral lymph node microvasculature of murine and human bone marrow transplant recipients: *Lab Invest*, v. 56, p. 85-95.
- Sata,M, K Walsh, 1998, TNF α regulation of Fas ligand expression on the vascular endothelium modulates leukocyte extravasation: *Nat.Med.*, v. 4, p. 415-420.
- Sata,M, K Walsh, 1999, Cyclosporine downregulates Fas ligand expression on vascular endothelial cells: implication for accelerated vasculopathy by immunosuppressive therapy: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 263, p. 430-432.
- Sato,K, J Balla, L Otterbein, R N Smith, S Brouard, Y Lin, E Csizmadia, J Sevigny, S C Robson, G Vercellotti, A M Choi, F H Bach, M P Soares, 2001, Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants: *J.Immunol.*, v. 166, p. 4185-4194.
- Scapagnini,G, V D'Agata, V Calabrese, A Pascale, C Colombrita, D Alkon, S Cavallaro, 2002, Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain: *Brain Res.*, v. 954, p. 51-59.
- Schmaltz,C, O Alpdogan, S J Muriglan, B J Kappel, J A Rotolo, E T Ricchetti, A S Greenberg, L M Willis, G F Murphy, J M Crawford, M R van den Brink, 2003, Donor T cell-derived TNF is required for graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity after bone marrow transplantation: *Blood*, v. 101, p. 2440-2445.
- Schmugge,M, M L Rand, J Freedman, 2003, Platelets and von Willebrand factor: *Transfus.Apheresis.Sci.*, v. 28, p. 269-277.

- Schweitzer,CM, C E van der Schoot, A M Drager, d van, V, A Zevenbergen, B Hooibrink, A H Westra, M M Langenhuijsen, 1995, Isolation and culture of human bone marrow endothelial cells: *Exp.Hematol.*, v. 23, p. 41-48.
- Scrobohaci,ML, L Drouet, A Monem-Mansi, A Devergie, B Baudin, M F D'Agay, E Gluckman, 1991, Liver veno-occlusive disease after bone marrow transplantation changes in coagulation parameters and endothelial markers: *Thromb.Res.*, v. 63, p. 509-519.
- Shan,Y, J Pepe, T H Lu, K K Elbirt, R W Lambrecht, H L Bonkovsky, 2000, Induction of the heme oxygenase-1 gene by metalloporphyrins: *Arch.Biochem.Biophys.*, v. 380, p. 219-227.
- Shankar,G, J S Bryson, C D Jennings, P E Morris, D A Cohen, 1998, Idiopathic pneumonia syndrome in mice after allogeneic bone marrow transplantation: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 18, p. 235-242.
- Shankar,G, D A Cohen, 2001, Idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: the role of pre-transplant radiation conditioning and local cytokine dysregulation in promoting lung inflammation and fibrosis: *Int.J.Exp.Pathol.*, v. 82, p. 101-113.
- Shankar,G, B J Scott, J C Darrell, A M Kaplan, D A Cohen, 1999, Idiopathic pneumonia syndrome after allogeneic bone marrow transplantation in mice. Role of pretransplant radiation conditioning: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 20, p. 1116-1124.
- Shlomchik,WD, M S Couzens, C B Tang, J McNiff, M E Robert, J Liu, M J Shlomchik, S G Emerson, 1999, Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells: *Science*, v. 285, p. 412-415.
- Snell,GD, 1948, Methods for the study of histocompatibility genes: *J.Genet.*, v. 49, p. 87-103.
- Soares,MP, Y Lin, J Anrather, E Csizmadia, K Takigami, K Sato, S T Grey, R B Colvin, A M Choi, K D Poss, F H Bach, 1998, Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival: *Nat.Med.*, v. 4, p. 1073-1077.
- Storb,R, R L Prentice, C D Buckner, R A Clift, F Appelbaum, J Deeg, K Doney, J A Hansen, M Mason, J E Sanders, J Singer, K M Sullivan, R P Witherspoon, E D Thomas, 1983, Graft-versus-host disease and survival in patients with aplastic anemia treated by marrow grafts from HLA-identical siblings. Beneficial effect of a protective environment: *N.Engl.J.Med.*, v. 308, p. 302-307.
- Stroncek,DF, M E Clay, M L Petzoldt, J Smith, W Jaszcz, F B Oldham, J McCullough, 1996, Treatment of normal individuals with granulocyte-colony-stimulating factor: donor experiences and the effects on peripheral blood CD34+ cell counts and on the collection of peripheral blood stem cells: *Transfusion*, v. 36, p. 601-610.
- Stryer,L, 1994, Biosynthese der Aminosäuren und des Häms, in L Stryer (ed), *Biochemie*: Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, p. 601-626.

- Sugishima,M, Y Omata, Y Kakuta, H Sakamoto, M Noguchi, K Fukuyama, 2000, Crystal structure of rat heme oxygenase-1 in complex with heme: FEBS Lett., v. 471, p. 61-66.
- Sullivan,KM, R Parkman, M C Walters, 2000, Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease: Hematology.(Am.Soc.Hematol.Educ.Program.), p. 319-338.
- Sumpio,BE, J T Riley, A Dardik, 2002, Cells in focus: endothelial cell: Int.J.Biochem.Cell Biol., v. 34, p. 1508-1512.
- Takahashi,T, C Kalka, H Masuda, D Chen, M Silver, M Kearney, M Magner, J M Isner, T Asahara, 1999, Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization: Nat.Med., v. 5, p. 434-438.
- Taylor,JL, M S Carraway, C A Piantadosi, 1998, Lung-specific induction of heme oxygenase-1 and hyperoxic lung injury: Am.J.Physiol, v. 274, p. L582-L590.
- Tepper,AD, E de Vries, W J van Blitterswijk, J Borst, 1999, Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage-induced apoptosis: J.Clin.Invest, v. 103, p. 971-978.
- Teshima,T, R Ordemann, P Reddy, S Gagin, C Liu, K R Cooke, J L Ferrara, 2002, Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium: Nat.Med., v. 8, p. 575-581.
- Testa,S, A Manna, A Porcellini, F Maffi, G Morstabilini, N Denti, S Macchi, G Rosti, G Porcellini, D Cassi, L Ferrari, 1996, Increased plasma level of vascular endothelial glycoprotein thrombomodulin as an early indicator of endothelial damage in bone marrow transplantation: Bone Marrow Transplant., v. 18, p. 383-388.
- Thomas,ED, H L Lochte, W C Lu, et al, 1957, Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy: N.Engl.J.Med., v. 257, p. 491-496.
- Thomas,ED, R Storb, R A Clift, A Fefer, L Johnson, P E Neiman, K G Lerner, H Glucksberg, C D Buckner, 1975, Bone-marrow transplantation (second of two parts): N.Engl.J.Med., v. 292, p. 895-902.
- Truitt,RL, B D Johnson, 1995, Principles of graft-vs.-leukemia reactivity: Biol.Blood Marrow Transplant., v. 1, p. 61-68.
- Unger,RE, V Krump-Konvalinkova, K Peters, C J Kirkpatrick, 2002, In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R: Microvasc.Res., v. 64, p. 384-397.
- van Bekkum,DW, J Roodenburg, P J Heidt, W D van der, 1974, Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora: J.Natl.Cancer Inst., v. 52, p. 401-404.
- Vaziri,ND, X Q Wang, 1999, cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide: Hypertension, v. 34, p. 1237-1241.

- Waller H.D., 1994, Erkrankungen der Milz, Immunologie.
- Wang,QR, Y Yan, B H Wang, W M Li, N S Wolf, 1998, Long-term culture of murine bone-marrow-derived endothelial cells: *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim*, v. 34, p. 443-446.
- Weigmann,A, D Corbeil, A Hellwig, W B Huttner, 1997, Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 94, p. 12425-12430.
- Weiner,RS, M M Horowitz, R P Gale, K A Dicke, D W van Bekkum, T Masaoka, N K Ramsay, A A Rimm, C Rozman, M M Bortin, 1989, Risk factors for interstitial pneumonia following bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia: *Br.J.Haematol.*, v. 71, p. 535-543.
- Weißinger,F, 1999a, Vergleich der autologen mit der allogenen Stammzelltransplantation, in F Weißinger, B Mansouri-Taleghani, P Reimer, and M Wilhelm (eds), *Grundlagen der autologen peripheren Stammzelltransplantation*: Bremen, UNI-MED Verlag, p. 28-30.
- Weißinger,F, 1999b, Vergleich der peripheren Stammzelltransplantation mit der Knochenmarktransplantation, in F Weißinger, B Mansouri-Taleghani, P Reimer, and M Wilhelm (eds), *Grundlagen der autologen peripheren Stammzelltransplantation*: Bremen, UNI-MED Verlag, p. 20-25.
- Williamson,E, P Garside, J A Bradley, I A More, A M Mowat, 1997, Neutralizing IL-12 during induction of murine acute graft-versus-host disease polarizes the cytokine profile toward a Th2-type alloimmune response and confers long term protection from disease: *J.Immunol.*, v. 159, p. 1208-1215.
- Willis,D, A R Moore, R Frederick, D A Willoughby, 1996, Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response: *Nat.Med.*, v. 2, p. 87-90.
- Woo,J, S Iyer, M C Cornejo, N Mori, L Gao, I Sipos, M Maines, R Buelow, 1998, Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (HSP 32): *Transpl.Immunol.*, v. 6, p. 84-93.
- Woo,J, S Iyer, N Mori, R Buelow, 2000, Alleviation of graft-versus-host disease after conditioning with cobalt-protoporphyrin, an inducer of heme oxygenase-1: *Transplantation*, v. 69, p. 623-633.
- Yachie,A, Y Niida, T Wada, N Igarashi, H Kaneda, T Toma, K Ohta, Y Kasahara, S Koizumi, 1999, Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency: *J.Clin.Invest*, v. 103, p. 129-135.
- Yang,G, X Nguyen, J Ou, P Rekulapelli, D K Stevenson, P A Dennery, 2001, Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis: *Blood*, v. 97, p. 1306-1313.
- Yang,YG, 2000, The role of interleukin-12 and interferon-gamma in GVHD and GVL: *Cytokines Cell Mol.Ther.*, v. 6, p. 41-46.

- Yu,X, S Fournier, J P Allison, A H Sharpe, R J Hodes, 2000, The role of B7 costimulation in CD4/CD8 T cell homeostasis: J.Immunol., v. 164, p. 3543-3553.
- Zhang,X, P Shan, L E Otterbein, J Alam, R A Flavell, R J Davis, A M Choi, P J Lee, 2003, Carbon monoxide inhibition of apoptosis during ischemia-reperfusion lung injury is dependent on the p38 mitogen-activated protein kinase pathway and involves caspase 3: J.Biol.Chem., v. 278, p. 1248-1258.

7 Anhang

7.1 Anhang I

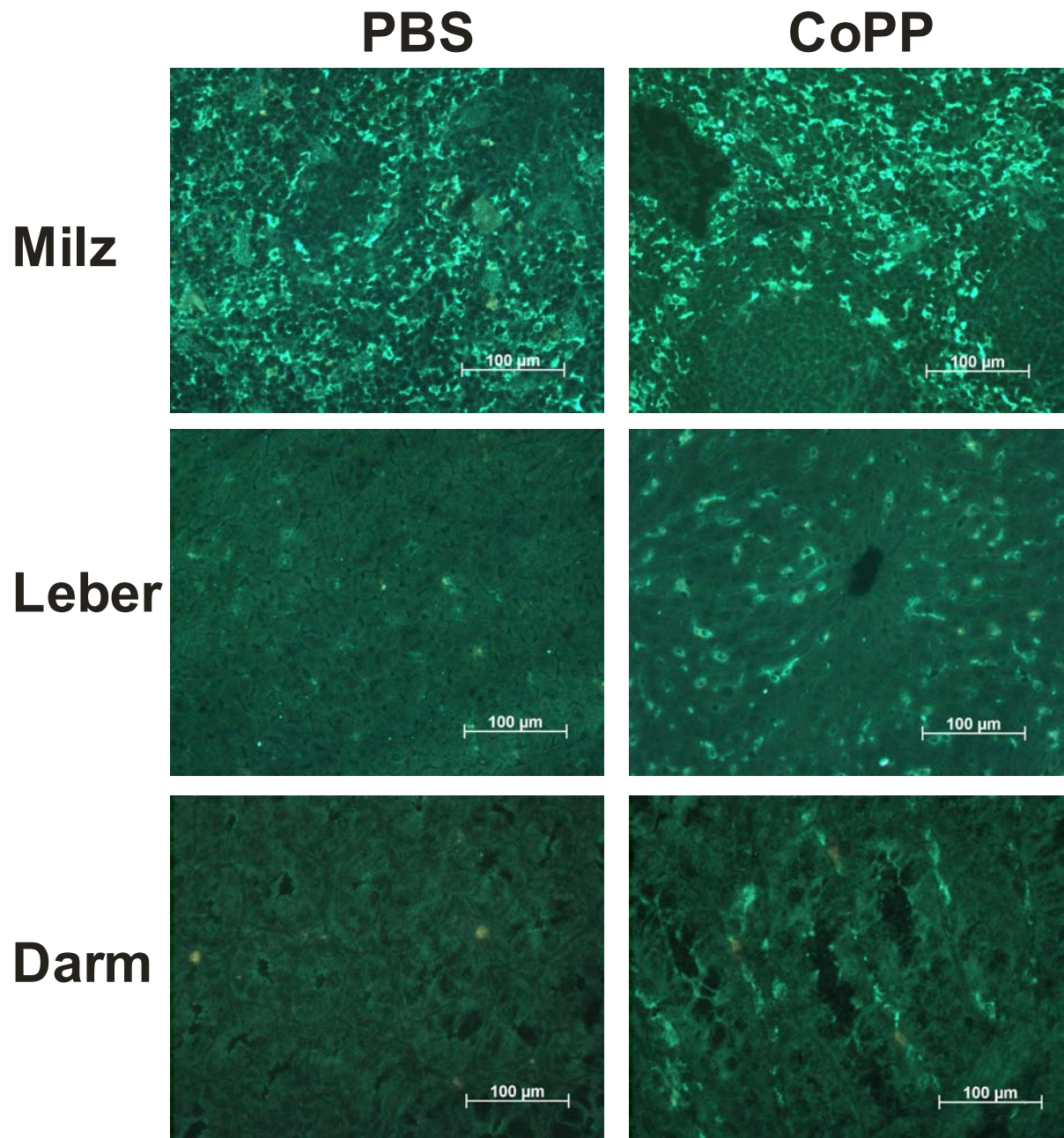


Abb. 7-1: Fluoreszenzmarkierung zum Nachweis der HO-1 Induktion *in vivo*. Kryoschnitte von Organen aus Mäusen, welche mit CoPP bzw. PBS behandelt wurden, wurden auf HO-1 Bildung untersucht. Mit FITC konjugierten HO-1 Antikörper markierte, 5µm dicke Schnitte. Grüne Fluoreszenz zeigt die HO-1 Expression.

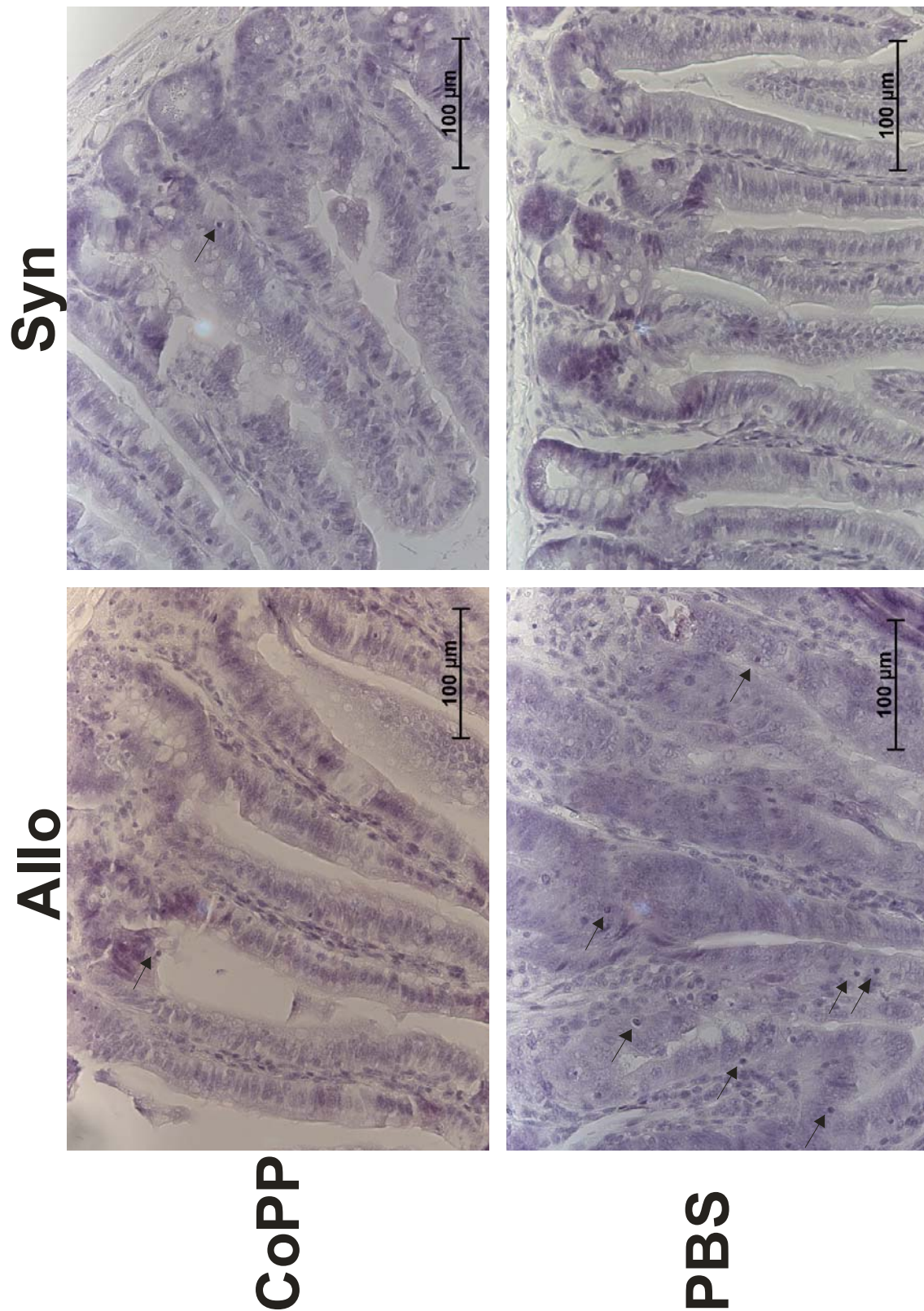
7.2 Anhang II

Abb. 7-2: Darmhistologie 6 Tage nach Transplantation. Der Dünndarm wurde von Tieren, die mit CoPP oder PBS behandelt wurden, 6 Tage nach Transplantation entnommen. Paraffinschnitte (5 µm) wurden mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Die Pfeile zeigen apoptotische Zellen an.

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen übernommen Ideen sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 6.2.2004

(Patricia Ewing Bartz)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst bin ich Dr. Armin Gerbitz zu großem Dank verpflichtet, da er die Idee zu diesem Thema hatte und mir die Gelegenheit gab an diesem Projekt zu partizipieren. Seine engagierte Unterstützung und Anregungen waren unverzichtbar für den Erfolg und die Fertigstellung dieser Arbeit.

Meiner Kollegin Andrea Wilke gebührt mein besonderer Dank, da sie großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte und mir auch in schwierigen Zeiten immer zur Seite stand.

Für die fakultätsinterne Betreuung und für sein Interesse am Voranschreiten dieser Arbeit danke ich Prof. Dr. W. Minuth.

Prof. Dr. E. Holler danke ich für die Betreuung der Arbeit, für die Diskussionsbereitschaft und seine Anregungen während der gesamten Zeit.

Für die Möglichkeit zur Anfertigung der Dissertation in der Abteilung für Hämatologie/Onkologie möchte ich mich bei Prof. Dr. R. Andreesen bedanken. Die von ihm großzügig initiierten Aktivitäten waren echte Highlights und trugen zum Wohlfühlen in der Abteilung bei.

Dr. Günther Eissner danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine Hilfestellungen bei experimentellen Problemen.

Ohne das gute Arbeitsklima in der Allo KMT Gruppe hätte die Anfertigung dieser Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht. Daher danke ich Heike Bremm, Conny Winter, Silvia Kirchner, Silvia Haffner, Daniela Sondermann, Bianca Lavae-Mokhtari, Verena Burger, Simone Planke, Nalini Kumar Vudattu und Ute Schulz für ihre Hilfsbereitschaft, ihre Anregungen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

PD Dr. Marina Kreutz, PD Dr. Gaby Multhoff und PD Dr. Michael Rehli danke ich für ihr Engagement bei den Seminaren, dem hämatologischen Journal Club und ihre fachlichen Ratschläge und Hilfe bei experimentellen Fragestellungen.

Selbstverständlich gebührt auch den anderen Mitarbeitern der Häma/Onko, nämlich die Makrophagen/Dendriten-, die Carreras- und die NK-Gruppe, mein Dank für ihre Unterstützung.

Für die Hilfe beim "cell sorting" bedanke ich bei PD Dr. Leoni Kunz-Schughart und Marit Hoffmann aus der Abteilung für Pathologie des Uniklinikums Regensburg.

Nicht zu vergessen ist die Stammzellgruppe mit Gunnar Müller, Diana Drewel und Nadine Pissler, die mit ihren heiteren Art und den vielen bunten e-mails viel Spaß in den Alltag gebracht haben.

Meinen Eltern und meiner Schwester bin ich zu großem Dank verpflichtet, da sie mich in allen Lebenslagen unterstützten und mir immer wieder Mut machten.

Last but not least danke ich meinem Mann Thomas; er zeigte sich immer verständnisvoll und war in allen Computerfragen eine große Stütze. Ohne ihn wäre der eine oder andere Rechner wahrscheinlich aus dem Fenster geflogen.