Experimentelle Immunpathologie und molekulare Infektionspathologie

Zelluläre Immunpathologie der GVHD-Entstehung

Die akute „Graft-versus-Host-Disease“ (GVHD) stellt nach wie vor eine schwerwiegende und häufig letal verlaufende Komplikation der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) dar [8, 10, 20]. Es handelt sich dabei um eine überschießende Immunreaktion, welche in ihrer Entstehung und Komplexität bis heute nicht vollständig geklärt ist. Die eigenen Studien konnten hierzu Erkenntnisgewinne im Bereich der Migration allogener T-Lymphozyten (gleichwertiger Beitrag von Dr. Andreas Beilhack) und allogener dendritischer Zellen (gleichwer-

tiger Beitrag von Dr. Christoph Schimmelpfennig) beisteuern. Im Speziellen konnte durch „In-vivo-“ und „Ex-vivo-Biolumineszenz-Imaging- (BLI-) Untersuchungen“ ein klar definierter zeitlicher und topographischer Verlauf der akuten GVHD charakterisiert werden. Die Initiationsphase war hierbei ausschließlich auf die lymphatischen Organe begrenzt und wies eine reproduzierbare Dauer von 3 Tagen nach allogener HSZT auf. Ab dem Tag 4 konnte die Effektorphase visualisiert werden, welche im Darmtrakt von einer initialen CD4-positiven in eine CD8-dominierte Reaktion (ab Tag 6) von Spender-T-Lymphozyten umschlug (**Abb. 1 a, b, [4]**).

Um die Rolle der lymphatischen Organe im GVHD-Entstehungsprozess zu klären, wurden Depletions- und Knock-out-Modelle verwendet [7, 16, 17]. Diese zeigten, dass im Rahmen der allogenen HSZT eine lymphatische Redundanz vorliegt. So konnte das Fehlen von MALT-System und Lymphknoten (Lymphotoxin-alpha-Knock-out-Modell) vollständig durch die Milz kompensiert werden. Vergleichbare Phänome fanden sich auch nach Antikörper-mediierter Homing-Blockade von T-Lymphknoten und MALT-System durch Anti-CD62L und Anti-MAdCAM-1. Auch hier reichte jedoch die Milz als kompensierendes Organ für die GVHD-Initiation aus [3].

Abb. 1 ▶ Transition von CD4⁺ in CD8⁺ Spenderlymphozyten. Reaktion im Rahmen der akuten intestinalen GVHD. Dreifache Immunfluoreszenzfärbungen konnten eine initial CD4⁺-dominierte Effektorphase durch Spenderlymphozyten (*violette Überlagerung*) am Darmtrakt visualisieren (**a**, Tag 4 nach HSZT, Dünndarm, Vergr. 200:1). Diese akute intestinale GVHD transformierte in eine CD8-dominierte Reaktion von Spenderlymphozyten (*hellblaue Überlagerung*) ab dem Tag 6 (**b**, Dünndarm, Vergr. 200:1). CD8 *grün*, CD4 *rot*, CD90.1 *blau* (Spenderlymphozyten)

Ein vielversprechender therapeutischer Ansatz gelang durch die Homing-Blockade mittels Anti-CD62L und Anti-MAd-CAM-1 in Kombination mit einer Splenektomie. Hierdurch ließ sich die GVHD nicht nur über den kurzen Zeitraum der Antikörperapplikation (Tag 0 bis 5 nach HSZT) unterdrücken, sondern überraschenderweise dauerhaft verhindern, was durch eine Verlaufskontrolle über mehr als 300 Tage bestätigt wurde [3].

Mit weiterführenden Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die myeloiden dendritischen Zellen (myDC) des Empfängers für einen Zeitraum von mindestens 3 Tagen in den Lymphknoten und für mindestens 6 Tage in der Milz überlebten. Diese Beobachtungen stellen die Grundlage für das aktuelle Forschungsprojekt dar (laufende DFG-Förderung, SCHU 1518/2-1), in welchem der Schwerpunkt auf den myDC des Empfängers liegt. Es soll hierbei zum einen geklärt werden, warum nach dem Absetzen der Antikörper-Homing-Blockade (ab dem Tag 6 nach allogener HSZT) keine verzögert einsetzende GVHD auftrat. Eine wichtige Hypothese hierfür ist die potenzielle Entstehung eines tolerogenen Milieus in den lymphatischen Organen. Neben einer möglichen Bildung Tolerogenität-vermittelnder dendritischer Zellen des Empfängers gibt es bereits erste Hinweise für die Entstehung von regulatorischen T-Lymphozyten. Es wird daher untersucht, welchem der Zelltypen eine primäre/initiale Bedeutung in diesem Prozess zukommt und in welchem Ausmaß Interaktionen zwischen den beiden Zelltypen auftreten.

Des Weiteren wird im Rahmen der laufenden Forschungsprojekte geklärt, wie lange myDC des Empfängers nach allogener HSZT persistieren können und wie diese im lebenden Organismus eradiziert werden können. Hierzu wird u. a. ein transgenes Mausmodell verwendet, bei welchem die CD11c-positiven dendritischen Zellen mittels Gabe von Diphterietoxin eliminiert werden [11]. Wichtige Fragen in diesem Zusammenhang sind, ob sich die Eradikation der Empfänger-myDC positiv auf den Verlauf einer akuten GVHD auswirkt und ob sich eine Beeinflussung der „Graft-versus-Tumor-Response“ ergibt. Diese Projekte haben

translationalen Charakter, da hiermit versucht werden soll, immunologische Verfahren (Homing-Blockade von T-Lymphozyten, Eradikation von myDC) auf ihre potenzielle Anwendbarkeit für neuartige Therapieansätze zu untersuchen.

Molekularpathologie atypischer mykobakterieller Infektionen

Opportunistische Infektionen sind neben der GVHD eine weitere und häufig schwerwiegende Komplikation nach allogener HSZT. Hierbei sind insbesondere virale Erreger wie z. B. Zytomegalieviren (CMV) von besonderer Bedeutung [5, 15]. In selteneren Fällen kann es nach allogener HSZT auch zu einer Tuberkuloseinfektion kommen [2, 18]. In der allgemeinen pathologischen Diagnostik stellt der Nachweis mykobakterieller Infektionen nach wie vor eine besondere Herausforderung dar. Dieses gilt insbesondere für Infektionen durch atypische (nichttuberkulöse) Mykobakterien, welche in Ziehl-Neelsen-Färbungen am fixierten Gewebe häufig negativ sind und auch in mikrobiologischen Kulturansätzen oft negativ bleiben.

In eigenen Studien zu granulomatösen Entzündungen konnte gezeigt werden, dass Infektionen durch nichttuberkulöse Mykobakterien (NTM) etwa ein Drittel (34%) der nachweisbaren mykobakteriellen Infektionen ausmachen [19]. Hierbei fiel eine hohe Rate an Infektionen durch Erreger des *Mycobacterium fortuitum*-Komplexes auf. Die auch in der Literatur beschriebene Zunahme von Infektionen durch NTM ist eine besorgniserregende Entwicklung, welche insbesondere im Hinblick auf Resistenzbildungen gegen Antibiotika aufmerksam verfolgt werden muss [1, 6, 9, 12, 13, 14].

Fazit

Die Herausforderungen für die zukünftige molekularchopathologische Diagnostik sind komplex. Zum einen müssen die Methoden trotz hoher Sensitivität eine hohe Spezifität aufweisen, d. h. möglichst wenig falsch-positive Ergebnisse generieren. Zweitens sollten die amplifizierten Fragmente eine gewisse Mindestgröße aufweisen (≥ 120 bp), um ei-

ne möglichst gute Subtypisierung des Erregers zu erlauben. Drittens sollten Sequenzierungen mit Homologieabgleich den Restriktions-Fragment-Längen-Poly-morphismen-Untersuchungen in der Diagnostik von NTM vorgezogen werden. Als vierter Punkt sind Resistenzgenanalysen auch für die molekularchopathologische Mykobakteriendiagnostik einzufordern, um bei wenig Material bzw. fehlender Einsendung von Frischmaterial an die Mikrobiologie ggf. ergänzende Untersuchungen am fixierten Gewebe durchzuführen. Abschließend ist festzustellen, dass jeder positive molekularchopathologische Nachweis mykobakterieller DNA einer engen Korrelation mit klinischen und mikrobiologischen Befunden bedarf, um eine gezielte und individualisierte Therapieplanung für die betroffenen Patienten zu ermöglichen.

Korrespondenzadresse

PD Dr. S. Schulz

Institut für Allgemeine Pathologie,
Technische Universität München
Ismaninger Str. 22, 81675 München
stephan.schulz@lrz.tum.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Research Committee of the British Thoracic Society (2001) First randomised trial of treatments for pulmonary disease caused by *M. avium* intracellulare, *M. malmoense* and *M. xenopi* in HIV negative patients: rifampicin, ethambutol and isoniazid versus rifampicin and ethambutol. *Thorax* 56:167–172
2. Akan H, Arslan O, Akan OA (2006) Tuberculosis in stem cell transplant patients. *J Hosp Infect* 62:421–426
3. Beilhack A, Schulz S, Baker J et al (2008) Prevention of acute graft-versus-host disease by blocking T-cell entry to secondary lymphoid organs. *Blood* 111:2919–2928
4. Beilhack A, Schulz S, Baker J et al (2005) In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T cell subsets. *Blood* 106:1113–1122
5. Boeckh M, Ljungman P (2009) How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 113:5711–5719
6. Colombo RE, Olivier KN (2008) Diagnosis and treatment of infections caused by rapidly growing mycobacteria. *Semin Respir Crit Care Med* 29:577–588
7. De Togni P, Goellner J, Ruddle NH et al (1994) Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 264:703–707
8. Deeg HJ (2007) How I treat refractory acute GVHD. *Blood* 109:4119–4126

9. Doucette K, Fishman JA (2004) Nontuberculous mycobacterial infection in hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 38:1428–1439
10. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet* 373:1550–1561
11. Jung SUD, Wong P, Sano G et al (2002) In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17:211–220
12. Marras TK, Daley CL (2002) Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med* 23:553–567
13. McGrath EE, McCabe J, Anderson PB (2008) Guidelines on the diagnosis and treatment of pulmonary non-tuberculous mycobacteria infection. *Int J Clin Pract* 62:1947–1955
14. Petrini B (2006) Non-tuberculous mycobacterial infections. *Scand J Infect Dis* 38:246–255
15. Razonable RR (2005) Epidemiology of cytomegalovirus disease in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. *Am J Health Syst Pharm* 62:S7–S13
16. Rennert PD, Browning JL, Hochman PS (1997) Selective disruption of lymphotoxin ligands reveals a novel set of mucosal lymph nodes and unique effects on lymph node cellular organization. *Int Immunol* 9:1627–1639
17. Rennert PD, Browning JL, Mebius R et al (1996) Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. *J Exp Med* 184:1999–2006
18. Russo RL, Dulle FL, Suganuma L et al (2009) Tuberculosis in hematopoietic stem cell transplant patients: case report and review of the literature. *Int J Infect Dis* [Epub ahead of print]
19. Schulz S, Cabras AD, Kremer M et al (2005) Species identification of mycobacteria in paraffin-embedded tissues: frequent detection of nontuberculous mycobacteria. *Mod Pathol* 18:274–282
20. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ (2007) Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 25:139–170

Zusammenfassung · Abstract

Pathologe 2010 · [Suppl 2] 31:167–169 DOI 10.1007/s00292-010-1327-9
© Springer-Verlag 2010

S. Schulz

Experimentelle Immunpathologie und molekulare Infektionspathologie

Zusammenfassung

In dieser kumulativen Habilitationsschrift werden die zwei wissenschaftlichen Schwerpunkte des Autors dargestellt: Die erste Gruppe von Arbeiten repräsentiert experimentelle Untersuchungen auf dem Gebiet der Immunpathologie, wobei translationale Fragen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation bearbeitet wurden. Der Fokus lag hierbei auf Migrationsanalysen allogener T-Lymphozyten im Rahmen der akuten Graft-versus-Host-Disease (GVHD) sowie expandierten dendritischen Zellen des Empfängers. Durch eine Kombination von Splenektomie und Antikörper-mediierter Homing-Blockade gelang es u. a., die Entstehung der akuten GVHD in einem „Major-Mismatch-Modell“ der Maus zu verhindern. Die zweite Gruppe von Arbeiten befasst sich mit molekularbio-

logischen Diagnoseverfahren der Infektionspathologie. Es wurde ein Kollektiv analysiert, welches durch granulomatöse Entzündungsreaktionen gekennzeichnet war. Mit Hilfe von Amplifikationen des 65 kDa „Heat-Shock-Protein-Gens“ gelang der Nachweis mykobakterieller DNA in 63% der Fälle. Bemerkenswert war ein großer Anteil von nichttuberkulösen Mykobakterien (etwa 1/3). Sequenzierungen erwiesen sich hierbei als sehr hilfreiches Mittel zur präzisen Subtypisierung der einzelnen Spezies.

Schlüsselwörter

Stammzelltransplantation · Allogen · „Graft-versus-Host-Disease“ · Immunfluoreszenz · Nontuberkulöse Mykobakterien

Experimental immunopathology and molecular pathology of infections

Abstract

This thesis work summarizes two scientific fields of interest of the author: The first group of studies represents experimental approaches in the field of immunopathology, analyzing translational questions of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The focus here was on cell migration studies of donor T cells in the setting of acute graft-versus-host disease (GVHD) and on ex vivo expanded host dendritic cells. Using a combination of antibody homing blockade and splenectomy development of acute GVHD was successfully prevented in a murine major mismatch model. The second group of studies focussed on molecular diagnostic strategies

for the detection of infectious diseases. Analysis of a collection of granulomatous reactions was performed amplifying the 65-kDa heat-shock protein gene. This enabled detection of mycobacterial DNA in 63% of cases, containing a high fraction of nontuberculous mycobacterial DNA (34%). Sequencing strategies have proven a very helpful tool, especially for subtyping NTM species on paraffin embedded material.

Keywords

Stem cell transplantation · Allogeneic · Graft-versus-host disease · Immunofluorescence · Nontuberculous mycobacteria