

**Rolle von löslichen MHC-Klasse I-Molekülen bei
der Apoptose sensibilisierter T-Lymphozyten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Mandana Khazand
aus Teheran/Iran

Göttingen 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Immunologie der George-August Universität zu Göttingen angefertigt.

Die Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

D7

Referent:	Prof. Dr. F. Mayer
Koreferent:	Prof. Dr. R. Hardeland

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2003

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Immunsystem	1
1.1.1. Angeborene unspezifische Resistenz und erworbene spezifische Immunität	
1. 1. 2. Antigenpräsentierende Zellen	2
1. 1. 2. 1. Subpopulationen antigenpräsentierender Zellen	2
1. 1. 2. 2. Antigenaufnahme und Antigenprozessierung	4
1. 1. 2. 3. Antigenpräsentation und antigenspezifische Aktivierung von Lymphozyten	5
1. 2. Immunaktivierung durch Tumorantigene	6
1. 2. 1. Immunisierung mit RMA-Tumorzellen	6
1.3. Immuntherapie mit DC	7
1. 4. Apoptose	7
1. 5. Anergie-Induktion bei der sensibilisierten T-Lymphozyten	8
1. 6. Themenstellung	9
2. MATERIAL UND METHODEN	10
2. 1. Material	10
2. 1. 1. Biologisches Material	10
2. 1. 1. 1. Zellen und Zelllinien	10
2. 1. 2. Chemikalien und Substanzgemische	10
2. 1. 2. 1. Medien, Puffer und Medienzusätze	10
2. 1. 2. 2. Antikörper, Zytokine, ELISA-Testkits	11
2. 1. 2. 3. Radioaktive Substanzen	12
2. 1. 3. Zellkulturutensilien und andere Verbrauchsmaterialien	12
2. 1. 3. 1. Vorrats-, Arbeits- und Kulturgefäße	12
2. 1. 4. Geräte und feste Laborinstallationen	13
2. 1. 4. 1. Ausrüstung des Zellkulturlabors	13
2. 1. 4. 2. Ausrüstung des Radioaktivlabors	14

2. 2. Methoden	15
2. 2. 1. Zellkultur	15
2. 2. 1. 1. Allgemeine Bedingungen der Zellkultur	15
2. 2. 1. 2. Gefrierkonservierung	15
2. 2. 1. 2. 1. Einfrieren	15
2. 2. 1. 2. 2. Auftauen	16
2. 2. 1. 3. Behandlung von Infektionen	17
2. 2. 1. 3. 1. Pilze	17
2. 2. 1. 3. 2. Mykoplasmen	18
2. 2. 2. Gewinnung von DC aus Knochenmark (Bone marrow dendritic cells)	19
2. 2. 3. Herstellung von Einzelzellsuspension aus der Milz	20
2. 2. 3. 1. Isolierung von T-Lymphozyten aus der Milz über magnetpartikelgekoppelte Antikörper durch negative Selektion am autoMACS-Gerät (auto MACS: <i>automatic magnetic cell sorting</i>)	21
2. 2. 4. Isolierung von sekretorischen MHC-Klasse I-Molekülen aus dem Tumorüberstand über magnetpartikelgekoppelte Antikörper (MACS: <i>magnetic cell sorting</i>)	22
2. 2. 5. Färbungen	24
2. 2. 5. 1. Färbungen der klassischen Histologie	24
2. 2. 5. 1. 1. Vitalitätstest mit Trypanblau	24
2. 2. 5. 1. 2. Mykoplasmentest mit einem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff	24
2. 2. 5. 2. Färbungen der Immunzytochemie	25
2. 2. 5. 2. 1. Durchflusszytometrie	26
2. 2. 5. 2. 2. Immunfluoreszenzfärbung von Zellen für die Durchflusszytometrie	26
2. 2. 5. 2. 3. Direkte Färbung membranständiger Antigene	27
2. 2. 5. 2. 4. Doppelfärbung membranständiger Antigene	28
2. 2. 5. 2.5. Durchflusszytometrische Analyse und Auswertung	28
2. 2. 5. 2. 6. Membranfluoreszenzmarkierung von Zellen durch Inkorporation aliphatischer Trägermoleküle	28
2. 2. 6. ELISA	30
2. 2. 6. 1. IL-12-ELISA	30
2. 2. 6. 2. IFN- γ -ELISA	32

2. 2. 7. Proliferationstest mit [³ H]-Thymidin	33
2. 2. 8. <i>Mixed leukocyte culture</i> (MLC)	34
2. 2. 9. <i>Mixed leukocyte tumor culture</i> (MLTC)	35
2. 2. 10. SDS-PA-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2. 2. 10. 1. Immunblot	38
2. 2. 11. Die Herstellung von Tumorzelllysate	39
2. 2. 12. Der TUNEL-Test	40
3. ERGEBNISSE	41
3. 1. Charakterisierung der isolierten dendritischen Zellen aus dem Knochenmark von Balb/c-Mäusen (KMDC)	41
3. 1. 1. Morphologie der isolierten KMDC von Balb/c-Mäusen	41
3. 1. 2. Phänotypisierung der isolierten KMDC von Balb/c-Mäusen	42
3. 1. 3. <i>Mixed leukocyte cell culture</i> (MLC)	44
3. 1. 4. IL-12-Sekretion	45
3. 2. Charakterisierung der isolierten Milz-T-Lymphozyten aus C57BL/6 Mäusen	46
3. 3. <i>In-vitro</i> -Immunisierung mit den Tumorzellen RMA und RMA-S in einem MLTC System	48
3. 3.1. Proliferation der stimulierten T-Lymphozyten im MLTC-System	49
3. 3. 2. IFN- γ -Sekretion	52
3. 3. 3. Zytotoxische Aktivität der sensibilisierten T-Lymphozyten gegen RMA und RMA-S Zellen	54
3. 4. Restimulation der sensibilisierten T-Lymphozyten mit der aus RMA Tumorzelllinie isolierten MHC Klasse I-Molekülen	57
3. 4. 1. Isolierung von sekretorischen MHC-Klasse I-Molekülen aus dem Tumorüberstand der Tumorzelllinie RMA über magnetpartikelgekoppelte Antikörper	57
3. 4. 2. Reinheit der in Restimulation eingesetzten T-Lymphozyten	59
3. 4. 2. Reinheit der in Restimulation eingesetzten T-Lymphozyten	60
3. 4. 4. Sekretion des Th1-Antwort spezifischen Zytokins IFN- γ nach Restimulation mit MHC Klasse-I-Molekül	63
3. 4. 5. APOPTOSE-Test	66

4. DISKUSSION	68
4. 1. Gewinnung und Charakterisierung dendritischer Zellen	68
4. 2. Gewinnung und Charakterisierung von T-Lymphozyten	71
4. 3. <i>In-vitro</i> -Immunisierung von gegen Tumorantigene der Lymphomzelllinie RMA	72
4.4. RMA-Zellen führen durch Sekretion löslicher MHC Klasse I-Moleküle zur T-Zell-Apoptose	75
5. Zusammenfassung	78
6. LITERATURVERZEICHNIS	79

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ak	Antikörper
Ag	Antigen
APC	antigen presenting cell(s) (Antigen-präsentierende Zelle(n))
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CD	cluster of differentiation
Ci	Curie ($3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle/min)
DC	dendritic cell(s) (Dendritische Zelle(n))
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	decays per minute (Zerfälle pro Minute)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em _{max}	Emmissions-Maximum
FACS	Fluorescence activated cell sorter (Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter)
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	forward scatter
GM-CSF	granulocyte/Monocyte-Colony Stimulation Factor
[³ H]-Thymidin	Tritium-Thymidin
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IU	International units
Ko	Kontrolle
mAK	monoklonale Antikörper
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
MLC	Mixed leukocyte culture
MLTC	Mixed leukocyte tumor culture
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBS	Phosphat gebufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin

PEG	Polyethylenglykol
RT	Raumtemperatur
SSC	side scatter
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsantei pro Volumen

1. EINLEITUNG

1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem dient der Abwehr von Mikroorganismen und körperfremden Substanzen, die Infektionen und andere pathogene Veränderungen auslösen können. Innerhalb der Immunantwort wird die angeborene unspezifische Resistenz von der spezifischen erworbenen Immunität unterschieden. Beide Systeme verfügen sowohl über zelluläre als auch über humorale Bestandteile und arbeiten ergänzend zusammen.

1.1.1. Angeborene unspezifische Resistenz und erworbene spezifische Immunität

Die angeborenen unspezifischen Schutzmechanismen stellen den phylogenetisch älteren Teil des Abwehrsystems dar (RATCLIFFE und ROWLEY, 1981; NAITO, 1993). Ihre Wirksamkeit ist nicht von einem früheren Kontakt mit dem Erreger abhängig (ROITT, 1993). Der unspezifische Teil des Immunsystems ist die erste Barriere, welche pathogene Erreger überwinden müssen, um in den Körper gelangen bzw. um sich systemisch verbreiten zu können. Gelingt es einem Erreger die Verteidigungslinie, die Haut und Schleimhäute bilden, zu überwinden, wird er durch phagozytierende Zellen wie neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen bekämpft. Zu den humoralen Faktoren, die die unspezifische zelluläre Resistenz unterstützen, gehören Zytokine, Enzyme, Akute-Phase-Proteine und die alternative Komplementaktivierung. Fremdkörper können agglutiniert werden, bakterizide und opsonierende Funktionen locken die Zellen der spezifischen Immunität zum Ort des Geschehens.

Eine evolutive Weiterentwicklung ist die spezifisch erworbene Immunität. Diese ist nur bei den höheren Wirbeltieren vorhanden. Kennzeichen des spezifischen Teils des Abwehrsystems ist das Vorhandensein von antigenspezifischen Gedächtniszellen, die eine schnellere und effektivere Immunreaktion bei einer Reinfektion ermöglichen. Am Beginn der adaptiven Immunantwort steht die Aufnahme und Prozessierung eines fremden Antigens durch antigenpräsentierende Zellen (APC). Sie präsentieren den Zellen der spezifischen Immunität (naive B- und T-Zellen) Proteinfragmente des Fremdantigens in Verbindung mit körpereigenen MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen, z.B. CD80, CD86. Dieser Prozess führt zur Aktivierung der antigenspezifischen Immunantwort. Die antigenspezifischen Lymphozyten reagieren mit klonaler Proliferation und differenzieren zu

Effektorzellen aus. Der erste Kontakt zwischen einem der zellulären Immunität und seinem Angriffsziel wird dann durch Adhäsionsmoleküle vermittelt. Die Zielzelle wird nun auf passende Peptid-MHC-Komplexe hinabgesucht. Zytotoxische T-Lymphozyten ($CD8^+$) können dann Zellen, die Ag-Fragmente von zytosolischen Pathogenen wie Viren zusammen mit MHC-Klasse I-Molekülen an ihrer Oberfläche tragen, in die Apoptose treiben oder sie durch Perforine und Proteasen lysieren. Die $CD4^+$ erkennen in Vesikeln abgebaute bakterielle und parasitäre Ag zusammen mit MHC-Klasse II-Molekülen. Sie durchlaufen in ihrer Entwicklung ein Zwischenstadium als Th0-Zellen bevor sie als inflammatorische Th1-Zellen Makrophagen stimulieren, Erreger abtöten, oder als T-Helferzellen (Th2), durch die Aktivierung von B-Zellen die spezifische humorale Immunantwort vermitteln.

Die B-Lymphozyten produzieren Antikörper, die an spezifische Epitope der Pathogene binden und sie damit neutralisieren oder für Makrophagen oder das Komplementsystem opsonieren. Phagozytose bzw. komplementvermittelte Lyse des Pathogens sind die Folge.

Das Immunsystem mit seiner Abwehrfunktion steht darüber hinaus noch mit anderen physiologischen Regelkreisen wie dem neuroendokrinen Netzwerk in Verbindung. Diese komplexe Verschaltung ermöglicht die effektive Bekämpfung externer Krankheitserreger bei gleichzeitiger Berücksichtigung der endogenen Bedürfnisse des menschlichen Organismus (JANEWAY und TRAVERS, 1995).

1. 1. 2. Antigenpräsentierende Zellen

Die Induktion einer adaptiven Immunantwort erfordert die Beteiligung von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC). Diese APC stehen am Beginn fast aller spezifischen Primärreaktionen und halten somit eine Schlüsselstellung innerhalb der komplexen körpereigenen Abwehrmechanismen.

Antigenpräsentierende Zellen sind in fast allen lymphoiden und nichtlymphoiden Organen zu finden, jedoch nur in geringer Menge (JANEWAY und TRAVERS, 1995).

1. 1. 2. 1. Subpopulationen antigenpräsentierender Zellen

Zuerst wurde das Prinzip der Antigenpräsentation an Makrophagen näher untersucht (ELLINER et al., 1977). Im Laufe der Zeit wurden weitere Populationen akzessorischer Zellen identifiziert. Zu den Hauptvertretern der APC gehören die dendritischen Zellen, die B-

Lymphozyten und das Monozyten-Makrophagen-System. Endothelzellen zählen nicht zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen; sie können aber fakultativ rekrutiert werden.

Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen und wurden 1973 erstmals von STEINMAN und COHN beschrieben (STEINMAN und COHN, 1973). Die verzweigte Morphologie und die hohe Expression von MHC-Klasse I und II, Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen zählen zu ihren charakteristischen Kennzeichen. Im Gegensatz zu Makrophagen können sie nach einem ersten Antigenkontakt eine Primärantwort induzieren (STEINMAN et al., 1983; STEINMAN, 1991).

Der Oberbegriff „Dendritische Zellen“ umfasst viele organspezifische Subtypen. In den nicht-lymphoiden Organen findet man interstitielle DC u.a. als Langerhans-Zellen in der Haut und blutdendritische Zellen (BDC) im Blutkreislauf.

Die *veiled cells* in der afferenten Lymphe dienen dem Antigentransfer. Die folliculären dendritischen Zellen (FDC) sind in den Lymphfollikeln für die B-Zell-Stimulation verantwortlich (TEW et al., 1990). Sie erhalten darüber hinaus noch durch Aktivierung der B-Lymphozyten das immunologische Gedächtnis aufrecht (KNIGHT und STAGG, 1993). Die interdigitierenden retikulären dendritischen Zellen (IDC) in den T-Zell-Arealen der Lymphknoten und in den periarteriolären lymphatischen Scheiden der Milz aktivieren T-Lymphozyten (KING und KATZ, 1990).

B-Lymphozyten

B-Zellen produzieren monoklonale Immunglobuline, die in löslicher Form als Antikörper fungieren. Mit Hilfe der Transmembranform dieser Immunglobuline können lösliche Antigene gebunden, aufgenommen, prozessiert und naiven T-Helferzellen präsentiert werden (ASHERSON und COLIZZI, 1989; LANZAVECCHIA, 1990).

Monozyten und Makrophagen

Monozyten und Makrophagen haben neben ihrer Phagozytosefunktion im Rahmen der unspezifischen Resistenz eine Reihe weiterer Aufgaben. Über die Sekretion löslicher Mediatoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren greifen sie regulierend in viele

Abwehrmechanismen ein. Außerdem sind sie als APC an der spezifischen Immunantwort beteiligt, können jedoch hier nur eine Sekundärreaktion induzieren (STEINMAN, 1991).

DCs und die Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems scheinen einen gemeinsamen Ursprung zu haben. Eine Vorläuferzelle zweigt früh von der gemeinsamen Linie ab und erscheint als unreife dendritische Zelle im Blut, die ihre Entwicklung nach dem Eintritt ins Gewebe vollendet. Aus der anderen Differenzierungslinie entstehen Monozyten, die unter dem Einfluss des jeweiligen Mikromilieus zu DC (SALLUSTO und LANZAVECCHIA, 1994) oder Makrophagen (MUSSON, 1983; DOUGHERTY und MC BRIDE, 1989) ausreifen.

Außerdem gelang es in den letzten Jahren, aus Monozyten *in-vitro* Zellen auszudifferenzieren, die den DC sowohl phänotypisch als auch funktionell ähneln (KIERTSCHER und ROTH, 1996; ZHOU und THEDDER, 1996; SALLUSTO und LANZAVECCHIA, 1994).

Diese Ergebnisse bestätigen die myeloische Herkunft der dendritischen Zellen und ermöglichen es antigenpräsentierende Zellen auf einfache Weise für weitere Analysen und Therapieansätze zu gewinnen.

1. 1. 2. 2. Antigenaufnahme und Antigenprozessierung

Jede spezifische primäre Immunreaktion beginnt mit der Aufnahme und Verarbeitung eines Fremdkörpers durch antigenpräsentierende Zellen.

Dringen Krankheitserreger in einen immunkompetenten Organismus ein oder entarten körpereigene Zellen, können deren Antigene von naiven dendritischen Zellen in den nicht-lymphatischen Organen erkannt werden. Die intakten oder schon durch andere Zellen vorprozessierten Antigene werden von den APC aufgenommen. Über Makropinozytose können kontinuierlich große Mengen löslicher Antigene jeglicher Art internalisiert werden. Der Mannoserezeptor hingegen fängt selektiv „Nichtselbst“-Moleküle ab und maximiert so die Effektivität der DC (SALLUSTO et al., 1995; STEINMAN und SWANSON, 1995; LANZAVECCHIA, 1996). Die aufgenommenen Antigene werden anschließend über zwei Mechanismen zu einer bestimmten Größe zerlegt (Antigenprozessierung).

Proteine von Viren und wahrscheinlich auch von Tumorzellen werden im Zytosol durch Proteasomen verdaut und aktiv mit Hilfe der TAP-1- und TAP-2-Transportermoleküle zu den MHC-Klasse I-Molekülen im endoplasmatischen Retikulum gebracht. Der Peptid-MHC-Klasse I-Komplex wird dann über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert (GOLDBERG und ROCK, 1992; SHEPHERD et al., 1993). Antigene von Parasiten und

Bakterien werden im aziden Milieu der Endosomen prozessiert. Diese Vesikel fusionieren mit solchen, die MHC-Klasse II-Moleküle enthalten und bringen daraufhin die Peptid-MHC-Klasse II-Komplexe an die Zelloberfläche (ROCHE und CRESSWELL, 1990; LANZAVECCHIA et al., 1992; NEFFJES und MOMBURG, 1993).

Nach der Antigenverarbeitung verlassen die DC ihr ursprüngliches Gewebe, um als Wanderform, als *veiled cell*, die Schaltstellen des Immunsystems, die lymphatischen Organe, über das Blut oder die Lymphe zu erreichen. Als reife Zellen können sie keine Fremdproteine mehr aufnehmen, dafür aber T-Lymphozyten spezifisch stimulieren (AUSTYN, 1993).

1. 1. 2. 3. Antigenpräsentation und antigenspezifische Aktivierung von Lymphozyten

Die antigenspezifische Aktivierung von Lymphozyten erfolgt in den lymphatischen Organen. Die erste Wechselwirkung von T-Lymphozyten mit APC wird durch Adhäsionsmoleküle herbeigeführt. Wenn naive T-Lymphozyten durch den Kortex eines Lymphknotens treten, binden sie vorübergehend an jede antigenpräsentierende Zelle, die sie treffen. Dies geschieht durch die Interaktionen von LFA-1 und CD2 auf der T-Zelle mit ICAM-1, -2, -3 und LFA-3 auf der DC. Während des Kontaktes prüft der T-Lymphozyt viele MHC-Moleküle der APC auf das Vorhandensein spezifischer Antigene. In den seltenen Fällen, in denen er mit dem T-Zell-Rezeptor seinen spezifischen Peptid-MHC-Liganden erkennt, löst sich der Lymphozyt nicht ab, sondern induziert eine Konformationsänderung von LFA-1. Dies verstärkt die Assoziation zwischen der T-Zelle und der APC verstärkt (GUINAN et al., 1994). Der T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex lagert sich nun mit dem entsprechenden Ko-Rezeptor (CD4 oder CD8) und dem CD45-Molekül zusammen und es erfolgt eine Signalweiterleitung in die T-Zelle hinein (MONDINO und JENKINS, 1994).

Für die klonale Expansion der ist ein zweites, kostimulatorisches Signal erforderlich. Dendritische Zellen binden mit ihrem kostimulatorischen Molekül B7 an das CD28-Molekül der naiven T-Lymphozyten, die daraufhin CTLA-4 exprimieren, das mit noch höherer Affinität an B7 bindet (FREEDMAN et al., 1987; FREEMAN et al., 1989; LINSLEY et al., 1990, 1992). Das kostimulatorische Signal induziert die Synthese von IL-2 und dessen Rezeptor und bewirkt so die Aktivierung und Proliferation von T-Effektorzellen (GIMMI et al., 1991; KUPIER et al., 1994).

Eine Antigenerkennung, bei der kein kostimulatorisches Signal vermittelt wird, führt bei den Lymphozyten zur Anergie (GIMMI et al., 1993) mit nachfolgender Apoptose (VAN PARIJS und ABBAS, 1996).

Ein Teil der T-Lymphozyten wandert nun als CD8⁺ T-Killerzellen und als inflammatorische CD4⁺ Th1-Zellen zum Krankheitsherd und übt dort Effektorwirkung aus. Der andere Teil bleibt als CD4⁺ Th2-Helferzellen vor Ort und aktiviert B-Lymphozyten. Die Verstärkung der Antikörperproduktion und die Affinitätsreifung wird durch eine zweite Zell-Zell-Interaktion der B-Lymphozyten mit den DC induziert.

1. 2. Immunaktivierung durch Tumorantigene

Tumorantigene sind Peptide von Tumorzellproteinen, die von DC über MHC-Moleküle den T-Lymphozyten präsentiert werden. Diese Peptide werden damit Ziel einer spezifischen T-Zell-Antwort. Tumorantigene werden normalerweise nicht auf gesunden Körperzellen exprimiert und wenn, dann in so geringen Mengen, dass sie für die T-Zell-Erkennung keine Rolle spielen (JANEWAY und TRAVERS, 1995).

Es konnte *in-vivo* und *in-vitro* gezeigt werden, dass DC starke gegen Tumorzellen gerichtete Abwehrreaktionen über die Aktivierung von hervorrufen können. Tumorstoffe, die auf einer Immunisierung gegen ein oder mehrere spezifische Tumorantigene oder einem adaptiven Transfer von *ex-vivo* generierten Lymphozyten mit einer hohen Spezifität gegen Tumorantigene beruhen, repräsentieren eine attraktive Annäherung an eine funktionierende Tumorthherapie (WEN et al., 2002).

Eine Form der adaptiven Immuntherapie gegen Krebs beinhaltet die Verwendung von Tumorzelllysaten. DC, die mit Tumorzelllysaten kokultiviert werden, nehmen die Tumorantigene auf und prozessieren sie. Durch die Präsentation der Peptide auf MHC-Molekülen der DC, werden naive spezifische T-Lymphozyten zur Proliferation angeregt. Man erhält einen Pool aus tumorantigen-spezifischen CD8- und CD4-positiven Zellen (FIELDS et al., 1998). Verglichen mit einem einzigen spezifischen Tumorantigen, bietet ein Tumorzelllysate als Quelle für die Tumorantigene den Vorteil, dass eine große Anzahl unterschiedlich spezifischer T-Lymphozyten aktiviert werden können und somit verschiedenen Epitope der Tumorantigene angreifbar werden (SCHNURR et al., 2001).

1. 2. 1. Immunisierung mit RMA-Tumorzellen

Die durch das Rauschervirus in Mäusen induzierte Lymphomzelllinie RMA wurde bereits in Immunisierungsversuchen in Form von *apoptotic bodies in-vivo* eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass durch die Immunisierung der Mäuse mit RMA-*apoptotic bodies* eine Tumorrückbildung

erzielt werden kann (RONCHETTI et al., 1999). Innerhalb dieser Studie konnten *in-vitro* autologe zytotoxische T-Lymphozyten gegen RMA-Zelllinie generiert werden. RMA-S stellt eine abgewandelte Form dieser Tumorzelllinie dar. Durch einen TAP-Defekt können diese Zellen zwar MHC-Klasse I-Moleküle produzieren aber im Gegensatz zu RMA, kein MHC-Klasse I auf der Zelloberfläche präsentieren. Diese beiden Zelllinien bieten sich für die Untersuchung der MHC-Klasse I-abhängige T-Zell-Antwort *in-vitro* und *in-vivo* (VAN HALL et al., 2000).

1.3. Immuntherapie mit DC

Zur Therapie maligner Erkrankungen, wie z.B. des Melanoms, werden seit einiger Zeit verschiedene Konzepte, welche die dendritischen Zellen als potenteste antigenpräsentierende Zellen einbeziehen, in klinischen Studien angewandt (NESTLE et al., 1998; SCHOTT et al., 2002; YAO et al., 2002; GALEA-LAURI et al., 2002).

Einige Studien konnten zeigen, dass DC Tumorantigene aus Melanom prozessieren und den naiven T-Lymphozyten präsentieren können (SORURI et al., 1998; 2001). Allerdings konnten die T-Lymphozyten die Tumorzellen zwar *in-vitro* eliminieren, *in-vivo* aber wurde dieser Effekt leider nichts beobachtet (KRAUSE et al., 2002; HÄNSSLE et al., 2002, zur Publikation eingereicht). Möglicherweise können die Tumorzellen *in-vivo* Mechanismen entwickeln, die zur Apoptose der T-Lymphozyten führen.

1. 4. Apoptose

Der Begriff Apoptose leitet sich von den griechischen Wörtern „apo“ für weg und „ptose“ für fallen ab. Der programmierte Zelltod, oder Apoptose, ist ein Mechanismus zur zielgerichteten Zerstörung von Zellen, der bei der Aufrechterhaltung der Gewebe und bei Entwicklungsvorgängen eine wichtige Rolle spielt. Auch für die Aufrechterhaltung der normalen Funktionen des Immunsystems, insbesondere bei der T- und B-Zellreifung inklusive der Toleranzentwicklung gegen Selbstantigene, spielt die Apoptose eine wichtige physiologische Rolle (SCHWARZ und OSBORNE, 1993).

Im Verlauf der Apoptose treten charakteristische, morphologische und biochemische Veränderungen in den Zellen auf (COHEN, 1993). Während des Prozesses kommt es zur Degradation des Zytoskletts und der Nucleinsäuren durch spezifischen Proteinase und Nukleasen. Diese Veränderungen in den Zellen erfordert die Induktion und Synthese von

verschiedenen Enzymen und ist somit ein selbst induzierter energieverbrauchender Vorgang (DUKE et al., 1997).

Einige für den apoptotischen Zelltod charakteristische Veränderungen lassen sich experimentell in den Zellen untersuchen. Beispielsweise kann die Degradation der DNA molekularbiologisch nachgewiesen werden. In apoptotischen Zellen wird die genomische DNA von induzierten Endonukleasen selektiv zwischen den Nukleosomen geschnitten, wodurch multimere Fragmente von etwa 180 Basenpaaren entstehen (SCHWARZ und OSBORNE, 1993). Diese DNA Fragmente können durch eine Gelelektrophorese im Agarosegel nachgewiesen werden (WYLLI, 1980).

1. 5. Anergie-Induktion bei der sensibilisierten T-Lymphozyten

Das Thema „Toleranzinduktion“ durch das Antigen beschäftigt seit Jahren die Immunologen. Die Arbeitsgruppen LIBLAU hat 1996 berichtet, dass in Abhängigkeit von der Influenza Virus Hämagglutinin-Dosis einen T-Zelltod im Thymus der Mäusen beobachtet werden kann (LIBLAU et al., 1996). Bishop et al. haben gezeigt, dass *in-vivo* eine hohe Antigendosis zur Toleranz Induktion bzw. zur Apoptose der T-Lymphozyten führt. Zur Untersuchung dieses Phänomens haben sie Transplantationsversuche bei Ratten durchgeführt. Bei einer Gruppe der Ratten wurden jeweils zwei Herzen und zwei Nieren allogren transplantiert. Bei der anderen Gruppe wurden die Organe einzeln verpflanzt. In der ersten Gruppe mit allogener Multiorgan-Transplantation waren die Ratten ca. 200 Tage nach der Transplantation noch am Leben, während die Tiere der zweiten Gruppe am Folge einer allogenen Transplantationsabstoßung innerhalb 12 bis 13 Tage gestorben sind. (BISHOP et al., 1996; BISHOP et al., 1997). Eine andere interessante Beobachtung wurde von Schneck et al., Zavazava et al. und Hausmann et al. berichtet: Sie beschreiben, dass lösliche MHC-Klasse I-Moleküle bei der bereits gegen ein bestimmtes Antigen sensibilisierten T-Lymphozyten zur T-Zell-Anergie führen kann (SCHNECK et al., 1989; ZAVAZAVA et al., 1991; HAUSMANN et al., 1993)

In Anlehnung der oben genannten Arbeiten untersuchten wir in dieser Studie die Apoptoserate der gegen den Tumor gerichteten T-Lymphozyten nach der Restimulation mit löslichen, antigenbeladenen MHC-Klasse I-Molekülen.

1. 6. Themenstellung

Seit einigen Jahren werden große Anstrengungen unternommen, um Alternativkonzepte zur kurativen Behandlung bösartiger Tumoren zu entwickeln. Eines dieser Konzepte ist die Immuntherapie mit Hilfe dendritischer Zellen. DC stehen am Anfang einer spezifischen T-Zell-vermittelten Immunantwort. Sie sind in der Lage, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und den Effektorzellen des Immunsystems (T-Zellen) zu präsentieren. Zur Immuntherapie maligner Tumoren wird daher seit einigen Jahren versucht, diese Fähigkeiten dendritischer Zellen zu nutzen. Tatsächlich konnte *in-vitro* mehrfach nachgewiesen werden, dass DC Tumor-assoziierte Antigene präsentieren und somit eine zytotoxische Immunantwort durch Aktivierung naiver T-Lymphozyten auslösen können. Es wurde z.B. gezeigt, dass infolge einer DC-basierten Immunisierung T-Lymphozyten generiert werden können, die in neoplastischen Zellen eines Virus-induzierten Lymphoms der Maus (RMA) Apoptose induzieren (VAN HALL et al., 2000). Interessanterweise konnten diese Daten auch in einem experimentellen Tiermodell bestätigt werden (RONCHETTI et al., 1999).

Diese experimentellen *In-vitro*- und *In-vivo*-Daten ließen sich jedoch in klinischen Projekten nicht ganz nachvollziehen. In einer gemeinsamen klinischen Studie der Abteilung Immunologie mit der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität Göttingen und der onkologischen Klinik der Universität Regensburg wurde z.B. trotz erfolgsversprechender *In-vitro*-Daten kein therapeutischer Erfolg bei über 30 immuntherapeutisch behandelten Patienten erzielt (KRAUSE et al., 2002; HÄNSSLE et al., 2002, zur Publikation eingereicht). Worauf diese Diskrepanz zwischen den *In-vitro*-Daten und der klinischen Realität zurückzuführen war, konnte jedoch nicht ermittelt werden.

Ausgehend von Literaturdaten, dass bei vielen Tumoren vermehrt lösliche MHC-Klasse I-Moleküle vorkommen (BODEY et al., 1996; KLEIN et al., 1996; DALL, 1999), wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Hypothese überprüft, ob die Antigen-beladenen, aus Tumorzellen freigesetzten MHC-Klasse I-Moleküle durch eine spezifische Bindung an den T-Zell-Rezeptor der bereits sensibilisierten Anti-Tumor-T-Lymphozyten zu einer inkompletten Reaktivierung somit zur Apoptose dieser Zellen und dadurch zur Limitierung der DC-basierten Immuntherapie beitragen können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2. 1. Material

2. 1. 1. Biologisches Material

2. 1. 1. 1. Zellen und Zelllinien

Murine dendritischen Zellen:

Sie stammten aus dem Knochenmark von C57BL/6- und Balb/c-Mäusen.

Murine Lymphozyten:

Sie stammten aus der Milz von C57BL/6-Mäusen.

Tumorzelllinien:

Die Tumorzelllinien RMA und RMA-S stammen aus C57BL/6-Mäusen

2. 1. 2. Chemikalien und Substanzgemische

2. 1. 2. 1. Medien, Puffer und Medienzusätze

RPMI 1640	Trockenmedium mit L-Glutamin Biochrom, Berlin
PBS	phosphat buffered saline, PBS-Tabletten Dulbeccos Formula (modified) ohne Magnesium und Kalzium ICN Biomedicals, Eschwege
FCS	fetal calf serum Biochrom, Berlin
Penicillin	5,000 IU/ml Penicillin
Streptomycin	5,000 µg/ml Streptomycin Flow, Meckenheim

Hinweis: Alle Medien enthielten das o.g. Antibiotika-Gemisch in einer Verdünnung von 1/100.

Lysispuffer für Erythrozyten	Stammlsg. 1: (5,5 g Ammoniumchlorid auf 500 ml Aqua-dest)
	Stammlsg. 2: (10,29 Tris auf 500 ml Aqua-dest; mit 1 M HCL auf pH 7,2 einstellen)

Nach dem Ansetzen autoklaveieren. Zur Erythrolyse werden 9 Teile von Lsg. 1 mit 1 Teil von Lsg. 2 versetzt.

Trypsin/EDTA-Lösung	0,05% plus 0,02% (w/v) in PBS ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺ ; Biochrom, Berlin
EDTA	1% (w/v) in PBS ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺ ; Biochrom, Berlin
BSA endotoxinarm	Fraktion V; Serva Feinbiochemika, Heidelberg
H ₂ O ₂	Hydrogen Peroxide, 30%ig; Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	0,4%ig; Gibco BRL, Eggenstein
DAPI	4-Diamino-2-phenylindol-di-hydrochlorid; MW 350,3 D; Boehringer, Mannheim
DMSO	Merck, Darmstadt
Formalin	37%ig; Merck, Darmstadt

2. 1. 2. 2. Antikörper, Zytokine, ELISA-Testkits

Maus IgG, (FITC- bzw. PE-gekoppelt)	DAKO, Hamburg
CD86 (PE) (Anti-Maus)	(B7-2) (GL 1); PharMingen, Hamburg
CD80 (PE) (Anti-Maus)	(B7-1) (16-1pA1); PharMingen, Hamburg
CD11c (PE) (Anti-Maus)	(HL3); PharMingen, Hamburg
14/4/4s (PE) (Anti-Maus)	(I-E ^k); PharMingen, Hamburg
CD19 (PE) (Anti-Maus)	(1D3); PharMingen, Hamburg
CD4 (PE) (Anti-Maus)	Immunothech, Krefeld
CD3 (PE) (Anti-Maus)	Immunothech, Krefeld

CD8 (PE) (Anti-Maus)	biotinyliert, Immunothech, Krefeld
Streptavidin (PE)	Immunothech, Krefeld
Mouse γ Globulin Serum	Calbiochem, Bad Sooden
Murine GM-CSF	Cell Concepts, Umkirch
Murine IL-4	Cell Concepts, Umkirch
ELISA IL-12p70	Testkit von R&D Systems, Wiesbaden
ELISA IL-12p40	Testkit von R&D Systems, Wiesbaden
ELISA IFN- γ	Testkit von R&D Systems, Wiesbaden

2. 1. 2. 3. Radioaktive Substanzen

[³ H]-Thymidin	spezifische Aktivität = 1 mCi/ml Amersham Buchler, Braunschweig
----------------------------	--

2. 1. 3. Zellkulturutensilien und andere Verbrauchsmaterialien

2. 1. 3. 1. Vorrats-, Arbeits- und Kulturgefäße

Zentrifugenröhrchen	10 ml; Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen	50 ml; Greiner, Nürtingen
Mikrotiterplatten	6, 24 und 96 Vertiefungen; Costar, Bodenheim
Spritzen	1 ml, 2 ml, 5 ml, 20 ml und 50 ml zum Einmalgebrauch; Braun, Melsungen
Handschuhe	Einmal-Untersuchungs-Handschuhe aus reinem Latex; Hartmann
Glasgefäße	Schütt, Göttingen
Eppendorf-Varipetten	1-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1.000 μ l; Eppendorf-Gerätebau, Hamburg
ED-Pipette	Electronic Digital Pipette, mit Adapter für 0-100 μ l und 100-1.000 μ l, Nr.: EDP RCS AININ, Instrument Co., Inc.,

	Woburn, USA
Octapetten	8-Kanal-Pipetten, 100 µl, 200 µl;
	Costar, Cambridge, MA, USA
8-Kanal-Pipetten	50-100 µl, 100-250 µl, EFLABoy;
	Flow, Meckenheim
Pipetboy	automatische Pipettierhilfe;
	Technomara, Fernwald
Pasteur-Pipetten	Schütt, Göttingen
Glaspipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml,
	Schütt, Göttingen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Minisart-Filter	Sartorius, Göttingen
Eppendorf-Reaktionsgefäße	0,5 ml und 1,5 ml;
	Eppendorf, Hamburg
Kulturgefäße	Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Kulturflaschen	Costar, Bodenheim
Adhäsionsobjektträger	Starfrost, Camon, Wiesbaden
Silikonkammer	Flexiperm-Slide, Heraeus, Hanau
Petripermschale	Viva science, Hannover

2. 1. 4. Geräte und feste Laborinstallationen

2. 1. 4. 1. Ausrüstung des Zellkulturlabors

Invertmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Durchlichtmikroskop KM	mit Rahmen für NEUBAUER- Zählkammer, Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Standard WL	zur Photomikroskopie verwendet; Zeiss, Oberkochen
Belichtungsautomat	Zeiss MC 63, Zeiss, Oberkochen
Kamera M 35	(47 6072-9901), Spiegelreflexkamera mit Winder M (47 60 79), Zeiss, Oberkochen
AutoklavCERTOclav	Hochdruck-Dampf Sterilisator, Gruber & Kaja, Druckguß und Metallwarenfabrik;

	Traun-Wien, Österreich
Brutschrank	Heraeus Cytoperm 8088, HLB 2472, Sollwerteinstellung: CO ₂ : 6 %, T: 37 °C, RH: 95 %; Heraeus, Hanau
Sterilbank	Heraeus-Lamin Air, HLB 2472, Sicherheitsklasse II Heraeus, Hanau
Suc-O-Mat	Absauganlage, WISA, Wuppertal
Zentrifuge	Heraeus Christ Digifuge GL, Heraeus, Hanau
Plattenrotor	Nr.: 3471 Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge	Nr.: 4400, Heraeus, Hanau
ELISA-Reader	Thermo Max Molecular Devices, Menlo Park, USA
Durchflusszytometer	FACSscan Becton & Dickinson, USA
autoMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2. 1. 4. 2. Ausrüstung des Radioaktivlabors

Radioaktivitätsmessgerät	Micro Beta Tri Lux Liquid Scintillation Counter, EG&E Wallac, Turku, Finland
Zellharvester	Dunn Labortechnik Ansbach

Weitere in dieser Arbeit verwendete Geräte, Hilfsmittel und Reagenzien sind im Rahmen der jeweiligen Methode erwähnt.

2. 2. Methoden

2. 2. 1. Zellkultur

2. 2. 1. 1. Allgemeine Bedingungen der Zellkultur

Die Arbeit mit Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen und aufgrund der potentiellen Infektiösität unter einer Werkbank der Sicherheitsklasse II. Soweit nicht anders erwähnt, wurde RPMI immer mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt.

2. 2. 1. 2. Gefrierkonservierung

Viele Zellen können durch Gefrierkonservierung unbegrenzt unter weitestgehender Beibehaltung ihrer Vitalität gelagert werden. Um Zellschäden durch die Bildung intrazellulärer Kristalle zu vermeiden, nimmt man die Zellen in einer Einfrierlösung auf, die DMSO als Gefrierschutzmittel enthält. Hierfür wird eiskaltes Serum mit 10% DMSO versetzt. Bei höheren Temperaturen und in Konzentrationen ab 4% (v/v) wirkt DMSO zytotoxisch. Deshalb müssen die Zellen schnell an die 0 °C-Grenze gebracht werden. Während des weiteren Einfriervorganges sollte die Zellsuspension langsam abkühlen, so dass über Osmose intrazelluläres Wasser austreten kann. Für die Vitalität ist es wichtig, beim Auftauen unverzüglich die Zellsuspension langsam mit kaltem Kulturmedium zu verdünnen, um den osmotischen Schock zu minimieren. Anschließend wird das DMSO durch Abzentrifugieren ausgewaschen und durch Zugabe frischen Mediums die Zellen in Kultur genommen.

2. 2. 1. 2. 1. Einfrieren

Material:

Eisbad

Einfrierlösung:

10 % (v/v) DMSO in FCS

Kryoröhrchen: 48.x 12,5 mm, W/base

Nunc, Wiesbaden

Einfrierbox aus Styropor

Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf

Tiefkühltruhe: -80 °C

Ges. für Labortechnik, Hamburg

Stickstofftank: Chronos 350

Messer Griesheim, Mudersbach

Durchführung:

- Styroporbox, beschriftete Kryoröhrchen und Serum kaltstellen.
- Zellen ernten, Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer.
- Zentrifugation mit 1300 UPM für 5 min bei 4 °C.
- Vollständiges Absaugen des Überstandes, Aufnahme in die Einfrierlösung mit einer Zellzahl von ca. 1×10^8 Zellen/ml.
- In Portionen à 0,5-1 ml auf die Kryoröhrchen verteilen, diese dann in die vorgekühlte Styroporbox geben und bei -80 °C lagern (optimale Einfrierkinetik liegt bei 1-2 °C/min).
- Für die Langzeitkonservierung die Zellen am folgenden Tag in die Gasphase eines Flüssigstickstoff-Tanks überführen.

2. 2. 1. 2. 2. Auftauen

Material:

Methanol: p.a. 100%

Merck, Darmstadt

Kulturmedium: variabel

Durchführung:

- In ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen 5 ml Medium (4 °C) vorlegen.
- Kryoröhrchen in der Hand halten bis der Inhalt vollständig aufgetaut ist. Röhrchen im Methanol-Tauchbad desinfizieren, um das Risiko einer Mykoplasmeninfektion zu minimieren.
- 1 ml kaltes Medium über 3 min langsam zu der Zellsuspension tropfen.
- Diese Lösung den 5 ml Medium vorsichtig unterschichten und über 3 min durch leichtes Schwenken vermischen, dann langsam mit Medium auf 20 ml auffüllen.
- 5 min bei 1300 UPM und 4 °C zentrifugieren.
- Zweimal mit 35 ml Medium waschen (1300 UPM, 5 min, 4 °C), Vitalitätstest und Zellzahlbestimmung durchführen.
- Aufnahme der Zellen in der gewünschte Menge Kulturmedium.

2. 2. 1. 3. Behandlung von Infektionen

Sterile Arbeitsbedingungen und die prophylaktische Zugabe von Antibiotika (s. 2.2.1.1) zum Medium verhindern normalerweise Infektionen von Kulturen. Kommt es dennoch zu einer Kontamination, sind funktionelle Tests zu verwerfen, während Permanentlinien und Langzeitkulturen behandelt werden können. Diese sollten dann möglichst in neue sterile Kulturflaschen mit einer Filterverschlusskappe umgesetzt werden, um eine Übergreifen der Infektion zu vermeiden.

Weiterhin ist sicherzustellen, dass von jeder Permanentlinie in N₂ eingefrorene Zellen vorhanden sind um im Infektionsfall auf diese zurückgreifen zu können.

2. 2. 1 .3. 1. Pilze

Material:

Amphotericin B: in Aqua bidest	Sigma-AldrichChemie
Kupfersulfat: 10% (w/v) in Aqua bidest	Merck, Darmstadt
Paraffin, dünnflüssig	Merck, Darmstadt
25 cm ² -, 80 cm ² -Gewebekulturflaschen mit infektionsgeschützter Filterverschlusskappe	Nunc, Wiesbaden

Durchführung:

- Reduktion der Keimzahl durch wiederholtes Waschen (800 UPM, 7 min, RT), durch „Picken“ gut erkennbarer, lokal begrenzter Pilzkolonien und zusätzlich bei adhärent wachsenden Zellen durch Spülen.
- Keime in einzelnen Näpfen von Mikrotiterplatten werden durch Zugabe von Kupfersulfat abgetötet. Somit wird ein Übergreifen der Infektion auf die Nachbarnäpfe verhindert. Dann wird der Napf mit einer dicken Lage von dünnflüssigem Paraffin überschichtet und damit isoliert.
- Die Antibiotikabehandlung pilzinfizierter Kulturen besteht in der Zugabe von 2,5 µg/ml Amphotericin B zum Medium. Hierbei ist zu beachten, dass die Kulturgefäße innen von allen Seiten mit dem chemotherapeutikumhaltigen Medium benetzt werden müssen, um Infektionen an den Flaschenseiten zu verhindern.

2. 2. 1. 3. 2. Mykoplasmen

Mykoplasmen sind auf der Oberfläche von Eukaryonten wachsende Bakterien der Klasse *Mollicutes*. Als zellwandlose Prokaryonten sind sie leicht verformbar und schlüpfen so selbst noch durch die Poren eines 0,2 µm-Sterilfilters. Meist töten die Mykoplasmen ihre Wirtszellen nicht, lassen sie oft nicht morphologisch anders aussehen. Daher bleiben viele Infektionen unerkannt. Eine regelmäßig durchgeführte Überprüfung ist allerdings wichtig, da Mykoplasmen für eine Fülle von Kultivierungsartefakten verantwortlich sein können. Sie greifen z.B. in den Metabolismus der Wirtszellen ein (MC GARRITY et al., 1984), verursachen zytogenetische Schäden (LANG, 1985), wirken je nach Spezies im Mitogentest inhibierend oder stimulierend, führen zur überschießenden Interferonfreisetzung und zum *natural killing* (BIRKE et al., 1981). Der [³H]-Thymidinproliferationstest wird verfälscht, da Thymidin durch mykoplasmathe Degradierung oder durch den Einbau in die Erbsubstanz der Prokaryonten für die zu markierenden Zellen nicht mehr zur Verfügung steht. Beim Vorliegen einer Mykoplasmeninfektion wird wie folgt behandelt:

Material:

Ciprofloxacin (Ciprobay 200)

Bayer, Leverkusen

Durchführung:

- Zugabe von 10 µg/ml Ciprofloxacin zum Medium (Benetzung der gesamten Flascheninnenseite s. 2.2.1.3.1.), Behandlung über 12 Tage.
- einwöchige Kultur der Zellen ohne Ciprofloxacin, im Anschluss daran erneute Prüfung des Kulturüberstandes, ggf. Wiederholung der Behandlung.

2. 2. 2. Gewinnung von DC aus Knochenmark (Bone marrow dendritic cells)

Für jeden Ansatz wurden jeweils 2 Balb/c bzw. 2 C57BL/6 Mäuse per CO₂ Asphyxie getötet und auf einer Styroporplatte unter der Sterilbank aufgespannt.

Die Präparation läuft folgendermassen:

- Die Ober- und Unterschenkelknochen frei präparieren und in PBS aufbewahren, bis zur weiteren Verwendung.
- Die Knochen in der Petrischale durch vorsichtiges Abschaben mit dem Skalpel von Muskel- und Sehnenresten befreien. Anschließend die Knochen in eine weitere mit PBS gefüllte Petrischale überführen und sie an den Gelenkflächen (distal und proximal) ausschneiden .
- Mit einer PBS-gefüllten Spritze (Kanüle 0,4) das Knochenmark herauspülen.
- Anschließend mit einer 10 ml Pipette und Pipetus durch ständiges Ein- und Auspipettieren das Knochenmark suspendieren (ca. 5 min).
- Zellen abzentrifugieren 1200 UPM, 10 min, RT.
- Überstand verwerfen.
- Erythrozyten mit 3 ml Lysepuffer, für 7 min bei RT lysieren.
- Die Reaktion durch Zugabe von 10 ml RPMI Medium stoppen.
- Diese Suspension durch Sieb geben.
- Erneut Zentrifugieren s.o..
- Überstand verwerfen.
- Pellet in 10 ml RPMI Komplet 10% FCS resuspendieren.
- Die Zellsuspension (1×10^6 /ml) auf 2 TC-Schale verteilen (pro Schale 10 ml).
- Petrischalen 2 Stunden im Brutschrank inkubieren.
- Nicht adhärante Zellen in eine neue Röhrcchen überführen.
- Die Petrischalen 1 mal mit warmem Medium vorsichtig spülen.
- Abgewaschene Zellen ebenfalls mit in Röhrcchen geben.
- Zellen zentrifugieren s. o..
- BMDC-Medium ansetzen: RPMI, 5% FCS, 50 μ M Mercaptoethanol, 1% Glutamin, 50 μ M Penicillin/Streptomycin.
- Das Pellet in 5-10 ml BMDC-Medium resuspendieren.
- Zellzahl bestimmen und Zellen mit BMDC-Medium auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml einstellen.

- Zugabe von 100 U/ml GM-CSF und 100 U/ml IL-4.
- Von dieser Zellsuspension jeweils 1 ml pro Napf in eine 24 Well-Platte einpipettieren.
- Platten für 3 Tage im Brutschrank inkubieren.
- Nach 3 Tagen Inkubation mit einer 1000er Eppendorfpipette jeweils 300 µl Überstand aus jedem Napf vorsichtig abnehmen, poolen und bei 1200 UPM herunterzentrifugieren, den Überstand verwerfen, das Zellpellet in der gleichen Mediummenge und entsprechenden Zytokinen (100 U/ml GM-CSF und 100 U/ml IL-4) resuspendieren und wieder in die Nöpfe pipettieren.
- Platten erneut für weitere 2 Tage inkubieren.
- Dann aus dem Napf die Zellen durch vorsichtiges Ein- und Auspipetieren ernten und bei 1200 UPM für 5 min bei RT abzentrifugieren.
- Zellen in einer 6 Well-Platte (3 ml /Well//1 x 10⁶ Zellen/ml) in BMDC-Medium + 100 U/ml GM-CSF + 100 U/ml IL-4 ausplattieren.
- Dendritischen Zellen sind am nächsten Tag im Überstand zu finden.
- Diese nicht adhärenen Zellen erneut ernten.
- Bei 1200 UPM 5 min zentrifugieren.
- Es folgt die Zellzahlbestimmung.
- Zellen im Versuch einsetzen.

2. 2. 3. Herstellung von Einzelzellsuspension aus der Milz

- Maus mit CO₂ Asphyxie töten.
- Die Milz herauspräparieren.
- In eine Bakterienchale 10 ml RPMI-Medium pipettieren.
- Die Milz im Medium eintauchen.
- Mit einer 5 ml Spritze und Kanüle ein Teil des Mediums aufziehen.
- Von einer Seite mit der Kanüle in die Milz einstechen und die Flüssigkeit durch die Milz spritzen. Dies solange wiederholen, bis die Milz hell ist.
- Die Milzkapsel mit einer Pinzette entfernen, die Zellen poolen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen geben.
- Bei 1200 UPM 10 min bei RT abzentrifugieren.
- Erythrozyten mit 3 ml Lysepuffer, für 7 min bei RT lysieren.
- Die Reaktion durch Zugabe von 10 ml RPMI-Medium stoppen.
- Diese Suspension durch Sieb geben.

- Erneut Zentrifugieren s.o.
- Überstand verwerfen.
- Pellet in 10 ml RPMI-Medium und 10% FCS resuspendieren.
- Die Zellsuspension auf eine TC-Petrischale verteilen.
- Petrischalen 2 Stunden im Brutschrank inkubieren.
- Nicht adhärante Zellen in ein neues Röhrchen überführen.
- Die Petrischalen 1x mit warmem Medium vorsichtig spülen.
- Abgespülte Zellen ebenfalls mit in Röhrchen geben.
- Zellen zentrifugieren s. o.
- Anschließend aus diesen Zellen die T-Lymphozyten anhand unten erklärten Methoden (2. 2. 3.) isolieren.

2. 2. 3. 1. Isolierung von T-Lymphozyten aus der Milz über magnetpartikelgekoppelte Antikörper durch negative Selektion am autoMACS-Gerät (auto MACS: *automatic magnetic cell sorting*)

Ein Gemisch verschiedener Zellen wird mit Antikörpern gegen Membranantigene auf einer Subpopulation des Zellgemisches inkubiert. Die spezifischen mAk werden vorher an paramagnetische Microbeads gekoppelt. Die entstehenden Komplexe aus Zellen, Antikörper und Beads werden in ein Magnetfeld gebracht und so aus der Suspension entfernt (negativ Selektion: die unerwünschte Zellen werden an microBeads Antikörper gekoppelt und aus dem System aussortiert).

Material:

auto MACS	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach
Antikörper	MHC-Klasse II Antikörper (microbeads) Anti-NK (D x 5) (microbeads)
<i>Running Puffer</i>	PBS + 2mM EDTA + 0,5% BSA
Ethanol	70%ig

Die gesamte Aufarbeitung erfolgt mit vorgekühlten Reagenzien und Behältern bei 4 °C.

- Unter 2. 2. 3. isolierten Zellen auf (ca. 1×10^7) einstellen.
- Runterzentrifugieren.
- Zellpellet aufwirbeln und in 90 μ l *Running* Puffer und jeweils 10 μ l MHC-Klasse II Antikörper und Anti-NK (D x 5) aufnehmen.
- 15 min auf dem Schüttler inkubieren.
- Einmal mit Running Puffer waschen.
- In 2 ml *Running* Puffer aufnehmen.
- Jetzt sind die Zellen sind nun für das Gerät vorbereitet. Die nachfolgenden Prozedur wird nach dem zugehörigen Protokoll des Herstellers durchgeführt.
- Nach der Beendigung der Isolierungsprozeß am Gerät, die Zellen entweder einfrieren oder im Versuch einsetzen.

2. 2. 4. Isolierung von sekretorischen MHC-Klasse I-Molekülen aus dem Tumorüberstand über magnetpartikelgekoppelte Antikörper (MACS: magnetic cell sorting)

Die Aufreinigung von MHC-Klasse I-Molekülen aus dem Tumorüberstand der RMA-Zellen erfolgte mittels eines Komplexes aus Protein A Microbeads und Anti-MHC-Klasse I-Antikörpern (H-2D^b-Antikörper). Protein A ist ein 42 kDa Protein und stammt aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus*. Es ist in der Lage, die meisten Antikörper über deren Fc-Region hochspezifisch zu binden und ermöglicht damit eine Komplexbildung mit antigenbeladenen Immunglobulinen. Da das Protein A mit supermagnetischen MicroBeads markiert ist, wird die Isolierung eines beliebigen Proteins, das mit einem spezifischen Antikörper gekoppelt ist, im Magnetfeld möglich.

Material:

MACS-Separationssäule M	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach
Antikörper	MHC-Klasse I Antikörper (Anti-mouse H-2D ^b)
Protein A Microbeads	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach
Elutionspuffer	0,1 M Trimethylamin, pH: 11,8
Zentrifugeröhrchen vivaspin 20	Sartorius

Die gesamte Aufarbeitung erfolgt mit vorgekühlten Reagenzien und Behältern bei 4 °C.

- Den Überstand von Tumorzellen (enthält MHC-Klasse I-Moleküle) abnehmen und bei 1300 UPM herunterzentrifugieren.
- Den Überstand in ein spezielles Zentrifugenröhrchen, das zum Aufkonzentrieren der Flüssigkeit dient (vivaspin 20, Sartorius), pipettieren und solange bei 3500 UPM zentrifugieren bis die gesamte Flüssigkeit, die sich vor der Zentrifugation im oberen Teil des Röhrchens befindet, nach unten gelaufen ist und die aufkonzentrierte Flüssigkeit sich in der Auffangtasche gesammelt hat.
- Den ankonzentrierten Tumorüberstand mit Hilfe einer Pasteurpipette aus der Tasche abnehmen und 1 h mit 10 µg/ml Anti-mouse H-2D^b-Antikörper und 50 µl Protein A Microbeads auf dem Schüttler inkubieren.
- Die Separationssäule an die Haltevorrichtung (Magnet) klemmen und die Säule mit 4 ml PBS spülen.
- Die Säule mit dem Überstand beschicken und anschließend die nicht gebundenen Partikel mit PBS herauswaschen.
- Nun hält man einen mit PBS gefüllten Auffangbehälter unter die Säule und entfernt diese aus dem Magnetfeld.
- Mit 3 ml Elutionspuffer die Säule spülen.
- Säule noch einmal mit PBS spülen, um die restlichen MHC-Klasse I-Moleküle zu gewinnen.
- Die Elutionsfraktion zum Ankonzentrieren in ein neues Zentrifugenröhrchen (vivaspin 20, Sartorius) überführen und solange bei 3500 UPM zentrifugieren bis die gesamte Flüssigkeit, die sich vor der Zentrifugation im oberen Teil des Röhrchens befindet, nach unten gelaufen ist und die ankonzentrierte Flüssigkeit sich in der Auffangtasche gesammelt hat.
- Den ankonzentrierten Teil mit einer Pasteurpipette aus der Tasche abnehmen, anhand der SDS-PA-Gelelektrophorese die MHC-Klasse I-Molekül nachweisen, die Konzentration bestimmen, aliquotieren und bei -80 °C einfrieren.

2. 2. 5. Färbungen

2. 2. 5. 1. Färbungen der klassischen Histologie

2. 2. 5. 1. 1. Vitalitätstest mit Trypanblau

Trypanblau kann nur über vorgeschädigte Membranen in die Zelle diffundieren. Erst nach längerer Zeit färbt es auch lebende, phagozytierende Zellen an. Zur Vitalitätsbestimmung wird die Zellsuspension 1 : 2 mit 0,4%iger Trypanblaulösung (Gibco BRL, Eggenstein) gemischt und sofort der prozentuale Anteil der toten Zellen mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2. 2. 5. 1. 2. Mykoplasmentest mit einem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff

Mit Hilfe spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe weist man die DNA von Mykoplasmen und ihren Wirtszellen zytochemisch nach RUSSEL et al., 1975. Auf langgestreckten, adhärennten Zellen sind die Erreger in der Peripherie gut zu erkennen. Runde zytoplasmaarme Zellen lassen sich schwerer auswerten. Da Mykoplasmen auch im Kulturüberstand zu finden sind, kann in diesen Fällen die Infektion auf eine geeignete Indikatorzelllinie übertragen werden.

Material:

Silikonkammer	Flexiperm-Slide; Heraeus, Hanau
Adhäsionsobjektträger	Starfrost, Camon, Wiesbaden
Lösung 1	26% (v/v) Ethanol 2% (v/v) Essigsäure in Aqua bidest.
Indikatorzelllinie	Vero B4
Kulturmedium	RPMI+10% (v/v) FCS
DAPI	Boehringer, Mannheim
DAPI-Stammlösung	100 µg/ml PBS
DAPI-Gebrauchslösung	1:100 in Methanol Lichtgeschützt bei 4 °C gelagert ca. 1 Jahr haltbar
DAPI-Filterkombination	BP 365/11, FT 395 und LP 387; Zeiss, Oberkochen

Durchführung:

- Vorbereitung der Objektträger und Silikonaufsätze: Die Objektträger werden 3 Tage zur Entfettung in Lösung 1 gelagert und dann 1 Tag in Aqua bidest. gewässert. Objektträger und Kammern werden autoklaviert, zum Trocknen in Petrischalen unter die Sterilbank gestellt und anschließend zusammengebaut.
- Aussaat der Zellen: $5-10 \times 10^4$ Zellen pro Kammer. Sobald die Zellen adhärent sind, kann mit dem direkten Nachweis der Mykoplasmen begonnen werden. Beim indirekten Test kultiviert man die Indikatorzellen ggf. 1-2 Tage vor, bis ca. 20% der Zellen konfluent sind. Dann ersetzt man das Medium durch zellfreien Überstand der auf Mykoplasmen zu testen ist und kultiviert für weitere 3 Tage.
- Färbung: Überstand absaugen, Kammern gut mit PBS waschen und 200 µl DAPI-Gebrauchslösung pro Feld pipettieren, 15 min inkubieren, Silikonaufsätze abnehmen und die Objektträger unter fließendem Wasser kurz spülen. Die Kammern werden zur weiteren Verwendung mit 70%igem Ethanol gereinigt, gewässert und wieder autoklaviert.
- Auswertung: erfolgt unter einem Fluoreszenzmikroskop in Wasserimmersion und mit der entsprechenden Filterkombination. Mykoplasmen sind als kleine leuchtende Punkte einheitlicher Größe vorwiegend an der Zellperipherie und auf Zytoplasmafortsätzen zu finden.

Hinweis: Beim direkten Nachweis werden die Zellen nicht mit Trypsin abgelöst, beim indirekten Test wird mit inaktiviertem Serum kultiviert. Dies verhindert falschnegative Interpretationen.

2. 2. 5. 2. Färbungen der Immunzytochemie

Die immunzytochemische Färbung ermöglicht es, Proteine auf der Oberfläche und im Inneren von Zellen darzustellen. Dafür werden die Zellen zuerst so fixiert, dass die Antigene nicht denaturieren. Anschließend müssen unspezifische Bindungsstellen blockiert werden: Immunglobuline im Maus- und Kaninchenserum sättigen die Fc-Rezeptoren ab, BSA verhindert unspezifische ladungsbedingte Anlagerungen an die Zellen, Na-Azid hemmt die mitochondriale Atmungskette und damit die Internalisierung von Oberflächenantigenen. Danach kann der Antikörper einer anderen Spezies spezifisch an ein bestimmtes Protein

binden. Der entstandene Immunkomplex wird nun zum Aufbau eines Nachweissystems benutzt.

2. 2. 5. 2. 1. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können physikalische und biochemische Eigenschaften von Zellen auf der Grundlage von Emission und Lichtbrechung untersucht werden.

Hierfür wird eine Zellsuspension in die partikelfreie schnellfließende Trägerflüssigkeit eines Durchflusszytometers gebracht. Hydrodynamisch fokussiert, fließen die Zellen einzeln durch einen scharf gebündelten Laserstrahl. Jede Zelle erzeugt Signale, indem sie Licht streut und Fluoreszenz emittiert. Die Strahlung wird über Linsen, Spiegel und Filter auf Photodetektoren geleitet und verstärkt. Der *forward scatter* (FSC) erfasst Licht, das im 180 °C Winkel durchgelassen wurde und mißt damit die Größe der Partikel. Durch Detektion der seitlichen Streuung im *side scatter* (SSC) wird die Granularität bestimmt. Sind die Zellen mit Fluoreszenzmolekülen verbunden, werden diese durch den Laserstrahl (Argonlaser, $\lambda=488$ nm) angeregt und geben die absorbierte Energie in Form von Licht höherer Wellenlänge wieder ab. Fluoreszeinisothiocyanat und Phycoerythrin haben ein ähnliches Absorptionsspektrum, können aber durch die unterschiedlichen Maxima ihrer Emissionswellenlängen [$E_{m_{max}}$ (FITC)=520 nm, $E_{m_{max}}$ (PE)=575 nm] separat erfasst werden. Dies ermöglicht die Messung von zwei weiteren Parametern, der Grün- und Rotfluoreszenz.

2. 2. 5. 2. 2. Immunfluoreszenzfärbung von Zellen für die Durchflusszytometrie

Die Fluoreszenzfärbung von Zellen für die Durchflusszytometrie (FACS-Färbung) ist im Prinzip eine immunzytochemische Färbung. Sie erfolgt in einer Mikrotiterplatte, in Näpfen, die möglichst weit voneinander entfernt liegen, so dass ein Ineinanderlaufen der Proben vermieden wird. Alle Puffer werden sterilfiltriert, um Partikelverunreinigungen vorzubeugen. Gekühlte Lösungen und die Durchführung auf Eis verlangsamen den Stoffwechsel und gewährleisten die Erhaltung des *status quo* der membranständigen Antigene. Bei der Zugabe der Reagenzien müssen die Zellen vollständig suspendiert sein. Nach der Zugabe der fluorochromgekoppelten Antikörper müssen die Proben dunkel gelagert werden, um eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu verhindern. Nach Abschluss der Färbung können die formalinfixierten Zellen maximal eine Woche bei 4 °C für die Messung aufbewahrt werden.

2. 2. 5. 2. 3. Direkte Färbung membranständiger Antigene

Für die Negativkontrolle wird ein direkt markierter, sogenannter Nonsense-Antikörper verwendet, der der gleichen Immunglobulinsubklasse angehört wie die zu testenden Antikörper (siehe 2. 1. 2. 2.).

Material:

96-Napf-Platte: Rundboden	Greiner, Frickenhausen
Antikörper	spezifische murine Ak gegen Maus Ag, FITC- oder PE-markiert
FACS-Puffer	0,1% (w/v) NaN_3 + 1% (w/v) BSA in PBS
Blockpuffer	FACS-Puffer + 2% (v/v) Maus Globulin-Serum, Calbiochem,
Fixierungspuffer	1% (v/v) Formalin in PBS

Durchführung:

- Die zu färbenden Zellen einmal mit PBS waschen und auf eine Konzentration von $0,5-1 \times 10^6/\text{ml}$ in PBS einstellen. $200 \mu\text{l}$ pro Napf ($1-2 \times 10^5$ Zellen) aussäen.
- Mikrotiterplatte bei 1300 UPM für 2 min ohne Bremse zentrifugieren.
- Den Überstand durch kurzes Ausschlagen verwerfen. Makroskopische Kontrolle des Pellets.
- Blocken: Zugabe von $200 \mu\text{l}$ Blockpuffer pro Napf.
- Inkubation für 20 min im Eisbad.
- Zentrifugation, Überstand ausschlagen (s.o.).
- Zugabe des mAK: Zellpellet in $1 \mu\text{g}$ des unverdünnten, direkt markierten MAK (FITC oder PE) resuspendieren. Inkubation für 40 min im Eisbad.
- Zentrifugation, Überstand ausschlagen (s.o.).
- Waschen: Zugabe von $200 \mu\text{l}$ Waschpuffer pro Napf. Zentrifugation, Überstand ausschlagen (s.o.). Waschvorgang wiederholen.
- Formalin-Fixierung: Die Zellen jeweils in $200 \mu\text{l}$ Formalin (1%ig) aufnehmen und in FACS-Röhrchen überführen.

2. 2. 5. 2. 4. Doppelfärbung membranständiger Antigene

Direkt FITC- und PE-markierte Antikörper unterschiedlicher Spezifitäten können im selben Ansatz eingesetzt werden, um zwei verschiedene Antigene auf einer Zelle gleichzeitig darzustellen.

Die Färbung erfolgt im wesentlichen wie in 2. 2. 6. 1. 1. beschrieben. Das Zellpellet wird hier jedoch mit beiden Aks zugleich inkubiert: also Zugabe von je 1 µg/µl des FITC- und PE-markierten Antikörpers pro Ansatz.

2. 2. 5. 2.5. Durchflusszytometrische Analyse und Auswertung

Im Durchflusszytometer, dem *fluorescence activated cell sorter*, wurden pro Ansatz 5000 Zellen mit einer konstanten Durchflussrate von ca. 1000 Zellen pro Sekunde gemessen. Mit Hilfe des FACscan-Programms werden die Daten im *list mode* multiparametrisch charakterisiert und abgespeichert. Signale unspezifisch gefärbter Trümmer und störender Zellpopulationen wurden von der Analyse ausgeschlossen. Für die detailliertere Auswertung wurden das FACStar-Rechenprogramm und Consort 30 genutzt. Die Darstellung der Ergebnisse basiert auf der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) und der Anzahl positiver Zellen im Prozent. Nach Subtraktion der Negativkontrolle erhält man den um die Autofluoreszenz der Zellen korrigierten Wert (Δ MFI, $\Delta\%$; modifiziert nach WERFEL et al., 1991).

% Positive Zellen = % Positivpeak - % positive Zellen der Negativkontrolle

2. 2. 5. 2. 6. Membranfluoreszenzmarkierung von Zellen durch Inkorporation aliphatischer Trägermoleküle

Die Membranfluoreszenzmarkierung erlaubt es, Zellen unabhängig ihrer Oberflächenantigene stabil mit Fluorochromen zu kennzeichnen. Dieses Zell-Linker-System kann verwendet werden, wenn keine spezifischen Antikörper für die jeweilige Fragestellung etabliert sind und dasselbe Nachweissystem für verschiedene Zellpopulationen benötigt wird. Im Anschluss an eine rote Membranfärbung ist es möglich, Antigene der Zelloberfläche mit spezifischen grünmarkierten Antikörpern nachzuweisen und umgekehrt.

Material:

Zell-Linker-Kit: Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Farbstoff: PKH-26-GL, Rotfluoreszenz
Markierungslösung: Diluent C
Verdünnungslösung des Kits

Durchführung:

- Die Zellen müssen geerntet und unbedingt in eine Einzelzellsuspension gebracht werden. Bei Tumorzellen kann hierfür Trypsin verwendet werden. Zweimal mit 50 ml serumfreiem RPMI waschen (1300 UPM, 10 min, 4 °C). Alle nachfolgenden Schritte finden bei RT statt.
- Kurz vor der Färbung die zweifach konzentrierte Stammlösung in einem 10 ml-Zentrifugen-röhrchen ansetzen: 4 µl PKH-26 zu 1 ml Diluent C geben.
- Überstand absaugen, das Pellet durch das leichte Klopfen des Röhrchen gegen die Handfläche auflockern und mit der Markierungslösung auf 2×10^7 Zellen/ml einstellen. Vorsichtig resuspendieren.
- Die Zellsuspension in das 10 ml-Zentrifugenröhrchen mit der 2 x Stammlösung überführen und 5 min inkubiert.
- Anschließend die Reaktion durch die Zugabe von 2 ml FCS abstoppen, 1 min inkubieren, dann mit RPMI + 10% (v/v) FCS auf 10 ml auffüllen.
- Zentrifugation: 1300 UPM, 10 min (RT).
- Das in RPMI + 10% (v/v) FCS resuspendierte Pellet in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführen, auf 30 ml auffüllen und bei 1300 UPM, 7 min zentrifugieren.
- Diesen Schritt einmal wiederholen. Am Schluss wird der Erfolg der Färbung fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert und die Vitalität der Zellen überprüft.

2. 2. 6. ELISA

Ein ELISA ist eine immunologische Methode, bei der mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die mit ihrem Fc-Teil an Kunststoffmaterial gekoppelt sind (Coating), ein bestimmtes Antigen eingefangen werden kann. Das Antigen kann dann mit einem zweiten enzymmarkierten Antikörper reagieren. Durch Waschvorgänge werden alle überschüssigen Immunglobuline ausgewaschen, so dass nur die gebundenen verbleiben. Durch anschließende Zugabe eines bestimmten Substrates kann eine Enzymreaktion ablaufen, die als Produkt einen Farbstoff entstehen lässt, dessen Intensität in einem ELISA-Reader gemessen werden kann. Diese Farbintensität ist ein direktes Maß für die Konzentration des Antigens in der Probe (KRAFT und DÜRR, 1995). Als Proben dienten die Kulturüberstände, die nach der Zellernte eingefroren worden waren. Die in dieser Arbeit erwähnte ELISA wurde nach Vorgabe des Herstellers durchgeführt.

Im ELISA sollte die Cytokine IL-12 und IFN- γ nachgewiesen werden.

IL-12 ist ein heterodimeres Cytokin, das von APC gebildet wird. Es besteht aus den beiden Untereinheiten p40 und p35, welche zusammen das biologisch active Cytokin IL-12(p70) bilden (TRINCHIERI, 1994).

IFN- γ ist der Hauptinduktor der IL-12 Sekretion. (HILKENS et al., 1997). Erst die Bindung von IL-12 an seinen Rezeptor (IL-12R) ermöglicht die IFN- γ Produktion. IFN- γ wird durch Antigenstimulation von zytotoxischen T- und NK-Zellen produziert (MAGRAM et al., 1996).

2. 2. 6. 1. IL-12-ELISA

Reagenzien:

OPTEIA™ Mouse IL-12 Kit:

- mit Anti-maus IL-12-Antikörper gecoatete Wells
- biotynlierter Detektionsantikörper Anti-maus IL-12
- Enzymkonzentrat (250 x Peroxidase)
- Standard (rekombinantes maus IL-12 1500 pg)
- Standard Diluent
- Waschkonzentrat (25 x)
- Substrat Reagenz A (Wasserstoffperoxidlösung)

- Substrat Reagenz B (tetramethylbenzidin)
- Stopplösung (1 M Salzsäure)

Durchführung:

Vorbereitungen:

- Nach Angaben des Herstellers des Testkits bei jedem IL-12-Nachweis eine Standardkurve erstellen.
- Zu diesem Zweck der lyophilisierte Standard (1500 pg rekombiniertes Maus IL-12 für 15 min bei RT inkubieren und dann in 2 ml Standard Diluent durch vorsichtiges Vortexen auflösen.
- Je 100 µl Standard Diluent in sieben gecoatete Wells pipettieren.
- Ein Volumen von 100 µl dem nun gelösten Standard (750 pg/ml) entnehmen und ebenfalls in ein Well geben.
- Weitere 100 µl des Standards in ein Well mit 100 µl Standard Diluent pipettieren, gut durchmischen, 100 µl entnehmen und in das nächste Well mit 100 µl Standard Diluent überführen. Diesen Vorgang bis zu einer Konzentration von 11,7 pg/ml weiterführen.
- Als Negativkontrolle 100 µl Standard Diluent in ein Well pipettieren.
- 15 min vor Gebrauch 1 Teil des Enzymkonzentrats und 22 Teile der Lösung mit dem Detektionsantikörper miteinander vermischen. Es entsteht so eine Verdünnung von 1:450.
- Der Waschpuffer ist 25fach konzentriert. Daher mit destilliertem Wasser auf eine einfach konzentrierte Lösung verdünnen. Das Verhältnis beträgt hierbei 1 Teil Waschpuffer zu 25 Teilen Wasser.
- 15 min vor Gebrauch die gleiche Mengen Substrat Reagenz A und Substrat Reagenz B miteinander vermischen.

- *Assayprozedur:*

- Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Zimmertemperatur bringen.
- Die benötigte Menge an Wells dem Testkit entnehmen.
- 100 µl Standard, Standardverdünnung, Proben, Kontrollen pipettieren, mit einem Platte Sealer abdecken und für 2 h bei RT inkubieren.

- Ausgeschlagen des Flüssigkeit in den Wells. In jedes Well 300 µl 1 x Waschpuffer pipettieren und wieder entfernen. Den Waschvorgang insgesamt 5 mal wiederholen. Danach die letzten Flüssigkeitsreste durch Saugpapier vorsichtig entfernen.
- Pro Well 100 µl der Enzym-Antikörper-Lösung pipettieren, die Wells mit einem Platten Sealer abdecken und für 1 h bei Raumtemperatur inkubieren. Die Wells 5 mal waschen, Waschpuffer jedesmal 30 bis 60 sec einwirken lassen.
- Pro Well 100 µl des Gemisches aus Substrat Reagenz A und Substrat Reagenz B pipettieren. 30 min bei RT ohne Abdeckung inkubieren. (dunkel stellen)
- 50 µl der Stopplösung pro Well pipettieren.
- Innerhalb von 30 min nach dem Abstoppen der Reaktion die ELISA-Platte auf einem ELISA-Reader photometrisch bei 450 nm messen.

2. 2. 6. 2. IFN- γ -ELISA

Reagenzien:

OPTEIA™ Mouse IFN- γ Kit:

- mit Anti-maus IFN- γ -Antikörper gecoatete Wells
- biotynilierter Detektionsantikörper Anti-maus IFN- γ
- Enzymkonzentrat (250 x Peroxidase)
- Standard (rekombinantes maus IFN- γ 3000 pg)
- Standard Diluent
- Waschkonzentrat (25 x)
- Substrat Reagenz A (Wasserstoffperoxidlösung)
- Substrat Reagenz B (tetramethylbenzidin)
- Stopplösung (1 M Salzsäure)

Vorbereitung und Durchführung waren identisch mit denen IL-12(p40)-ELISA.

Allerdings wurde der lyophilisierte Standard in 2 ml Standard Diluent aufgelöst. Die Ausgangskonzentration des Standards betrug 600 pg/ml, so dass daraus folgende Konzentrationen für die Standardkurve ergaben:

600 pg/ml, 300 pg/ml, 150 pg/ml, 75 pg/ml, 37,5 pg/ml, 18,8 pg/ml, 9,4 pg/ml

Hinweise für die Handhabung der ELISA-Testkits

- Nur die benötigte Menge an Reagenzien sollte hergestellt werden.
- Gebrauchslösung, die nach dem ELISA-Durchgang übrigbleiben, dürfen nicht weiterverwendet und müssen deshalb verworfen werden.
- Alle Ansätze sollten doppelt pipettiert werden, um bei der Auswertung der Ergebnisse einen Mittelwert erhalten zu können.

2. 2. 7. Proliferationstest mit [³H]-Thymidin

[³H]-Thymidin wird von Zellen ausschließlich als Baustein für die DNA-Synthese verwendet. Damit lässt der Einbau des Nucleosids in das Genom Rückschlüsse auf die Proliferationsaktivität zu. Die inkorporierte Radioaktivität wird durch eine indirekte Gasentladungsmethode gemessen. Das über die mit Tritium markierte Probe hinwegströmende Edelgas Helium wird in einem elektrischen Feld durch die β -Strahlen ionisiert. Die daraus resultierende Entladung wird als eine vom Messgerät abhängige Zählrate in *counts per minute* registriert. Nach Multiplikation mit einem nur für den jeweiligen Detektor geltenden Faktor erhält man die spezifische Aktivität des Präparates in *disintegrations per minute*: $[\text{cpm}] \cdot 4,6 \cong [\text{dpm}]$.

Durchführung:

- Die Zellen bzw. Zellpopulationen werden entsprechend der unterschiedlichen Protokolle vorkultiviert und dann als Triplikate auf 96-Napf-Platten (Flachboden, Abdeckplatte, TC-Qualität; Nunc, Wiesbaden-Biebrich) in BMDC-Medium ausplattiert. Um Randphänomene zu vermeiden, müssen die äußersten Näpfe von Multiwellplatten bei allen Kultivierungen und funktionellen Tests PBS als Verdunstungs- und Infektionsschutz enthalten.
- Jeder Napf mit 20 μl der [³H]-Thymidinlösung markieren (entspricht 0,2 μCi pro Ansatz), 24 Stunden bei 37 °C inkubieren und anschließend bei -20 °C einfrieren. Letzteres dient dem Abstoppen der Reaktion und dem Zellaufschluss, der die Freisetzung der DNA bewirkt.

- Nach dem Auftauen werden die Lysate mit Hilfe eines Harvesters auf einen Glasfaserfilter überführt. Die DNA bleibt auf dem Filter zurück, während ungebundenes [³H]-Thymidin herausgewaschen wird.
- Glasfasermatten mindestens 30 min bei 60 °C trocknen und dann auf RT abgekühlen lassen.
- Messung der inkorporierten Radioaktivität im Szintillationscounter.

2. 2. 8. *Mixed leukocyte culture (MLC)*

Die gemischte Leukozytenkultur (mixed leukocyte culture) diente ursprünglich der Ermittlung eines passenden Organspenders speziell für eine Knochenmarktransplantation (ROSE et al., 1997). Der Test ermöglicht die Untersuchung der zellulären Immunantwort auf MHC-Klasse II assoziierten immunogenen Strukturen. Zum MHC-Klasse II gehört z.B. das HLA-DR. Die stimulierenden Zellen, z.B. DC, aktivieren ruhende allogene T-Lymphozyten durch das Vorhandensein nicht identischer MHC-Klasse II-Moleküle. Die T-Lymphozyten beginnen daraufhin mit einer logarithmisch verlaufenden Proliferation. Es bilden sich Zellklone. Mit jeder Zellteilung ist eine Verdopplung der DNA verbunden. Das radioaktive [³H]-Thymidin wird bei der Reduplikation der lymphozytären Erbinformation eingebaut. Die radioaktive Strahlung, die ein direktes Maß für die Lymphozytenproliferation darstellt, kann nach dem Ernten der Zellen gemessen werden. Die Messung selbst erfolgt durch Szintillationsspektrophotometrie. Die Reaktivität der MHC-Klasse I Moleküle ist in der MLC von untergeordneter Bedeutung.

Durchführung:

- Reife KMDC aus Balb/c-Mäusen (2×10^5 Zellen/ml) in eine 96 Well Platte mit 2×10^6 Lymphozyten/ml von C57BL/6 kokultivieren (bei einer autologen MLC stammen sowohl die KMDC als auch Lymphozyten aus C57BL/6-Mäusen).
- Mit [³H]-Thymidin markieren (erfolgt am Tag 3).
- Nach 24 Stunden Reaktion stoppen.
- Messen der [³H]-Thymidininkorporation.

2. 2. 9. *Mixed leukocyte tumor culture (MLTC)*

Die MLTC ist eine Spezialform der MLC, mit deren Hilfe untersucht werden kann, ob Tumorzellen oder deren Lysate als Antigen fungieren können und damit eine Proliferation von T-Lymphozyten hervorrufen. In der allogenen MLTC soll geklärt werden, ob Tumoren sich schon auf der Ebene der Antigenpräsentation der Immunkontrolle entziehen. Die KMDC und Lymphozyten agieren als Stimulator- und Responderzellen. Tumorzellen stellen das Antigen dar.

(In allen allogenen MLTC stammten die eingesetzten Lymphozyten von C57BL/6 Mäusen, die KMDC von Balb/c; bei allen autologen MLTC stammten sowohl die Lymphozyten als auch die KMDC von C57BL/6 Mäusen.)

Durchführung:

- Aus Tumorzellkulturen von Primärkulturen Tumorzelllysate herstellen. Anschließend die Tumorzelllysate unterschiedlich konzentrieren und in ein Volumen von 50 µl pro Napf einsetzen.
- Gewinnung von Stimulatorzellen: Frisch isolierte KMDC 6 Tage lang zu DC differenzieren, dann je 2×10^4 Zellen in 50 µl Medium aussäen.
- Gewinnung von Responderzellen: Die Lymphozyten werden während der 6 tägigen Differenzierungsphase der KMDC kryokonserviert. Nach dem Auftauen 2×10^5 Zellen in 50 µl Medium pro Napf zu den KMDC geben.
- Als Hintergrundkontrolle werden Tumorzellen und Lymphozyten einmal allein ausplattiert, zur Überprüfung der akzessorischen Aktivität KMDC und Lymphozyten auch ohne Tumorzellen kultivieren (MLC).
- [^3H]-Thymidinmarkierung an Tag 3 (gerechnet vom Beginn der Kokultur).
- Nach 24 Stunden die Reaktion stoppen.
- [^3H]-Thymidininkorporation messen.

2. 2. 10. SDS-PA-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Anhand dieser Methode wurden die MHC-Klasse I isolierten Moleküle aus dem Tumorüberstand identifiziert.

SDS (Abkürzung für *sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladungen von Proteinen äußerst effektiv.

Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss von SDS auf 95 °C erhitzt. So werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Moleküle aufgelöst.

Mit SDS gehen auch sehr hydrophobe und denaturierte Proteine in Lösung. Dabei werden auch Aggregationen innerhalb der Proteine verhindert, weil die Oberflächen negativ geladen sind. Alle Proteine wandern in Richtung der Anode. Die Trennung erfolgt fast ausschließlich nach dem Parameter „Molekulargewicht“. Bei der Elektrophorese in einem Gel mit definiertem Polyacrylamid-(PA)-Gehalt erhält man in Abhängigkeit von der PA-Konzentration über bestimmte Bereiche eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungstrecken der SDS-denaturierten Proteine (LAEMMLI, 1970).

Es wurde ein vertikales Mini-Gelelektrophores-System der Firma Biometra verwendet. Zunächst wurde ein 10%iges Gel gegossen. Die „10%“ beziehen sich auf den Polyacrylamidanteil im sogenannten Trenngel. Das Polyacrylamidgel besteht aus zwei Komponenten, dem Sammelgel und dem Trenngel. Im Sammelgel befinden sich die Auftragstaschen. Die Proteinproben erreichen innerhalb dieses Gels eine einheitliche Startlinie. Erst im Trenngel erfolgt die Trennung aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte der Proteine.

SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer) (10ml):

2 ml 0,625 M Tris/HCl pH 6,8

0,2 g SDS

5 ml Glycerin

0,1 ml Bromphenolblau (1%ige Lösung in Ethanol)

2,9 ml bidestilliertes H₂O

Ein 10%iges Gel wurde nach folgender Rezeptur erstellt:

Trenngel 6 ml (10%ig)

Bisacrylamidstammlösung	2 ml 0,8%ig
Acrylamidlösung	2 ml 30%ige
Tris/HCl	1,2 ml 1,88 M (pH 8,8)
SDS	1,2 ml 0,5%ig
H ₂ O _{bide} st	1,6 ml
TEMED	5 µl
Ammoniumpersulfatlösung	30 µl 10%ig

- Das Trenngel in den Gelträger gießen.
- Mit wassergesättigtem Butanol überschichten. (Dieser Schritt ist notwendig, damit sich ein glatter Gelabschluss bildet, auf den das Sammelgel gegossen werden kann.)
- Nachdem das Gel auspolymerisiert war, konnte man unterhalb der wässrigen Phase eine weitere Trennlinie erkennen. Butanol und Restwasser mit bidestilliertem Wasser entfernen.
- Noch verbleibendes Wasser mit einem Papiertuch vom Gel abziehen.
- Das Sammelgel gießen.

Das Sammelgel setzte sich wie folgt zusammen:

Sammelgel 2ml (5%ig)

Bisacrylamidstammlösung	0,33 ml 0,8%ig
Acrylamidlösung	0,33 ml 30%ig
Tris/HCl	0,4 ml 0,625 M (pH 6,8)
SDS	0,4 ml 0,5%ig
H ₂ O _{bides}	0,87 ml
TEMED	2 µl
Ammoniumpersulfatlösung	10 µl 10%

Laufpuffer für 2 Liter-Ansatz:

Tris-Base	6,04 g
Glycin	28,8 g
SDS	2 g

In das Sammelgel wurde der Kamm für die Ausbildung der Taschen eingesetzt. Sobald das Gel ausgehärtet war, wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit bidestilliertem Wasser nachgespült, um eventuelle Reste zu entfernen.

- Proben in der entsprechenden Menge Probenpuffer aufnehmen und aufkochen.
- Je 20 µl der Probe in jede Geltasche geben.
- Damit eine Größenbestimmung möglich war, 10 µl eines Proteinstandards (Sigma, SDS 6H Standard) auftragen.
- Bei 17 mA und etwa 2 Stunden die Elektrophorese laufen lassen.
- Nach Austritt der Bromphenolblau-Front aus dem Gel die Elektrophorese abbrechen.
- Das Sammelgel vom Trenngel entfernen und eine Ecke des Trenngels markieren, um die Reihenfolge des Probenauftrags zu kennzeichnen.
- Das Gel für 5 min in Blotpuffer äquilibrieren und anschließend blotten.

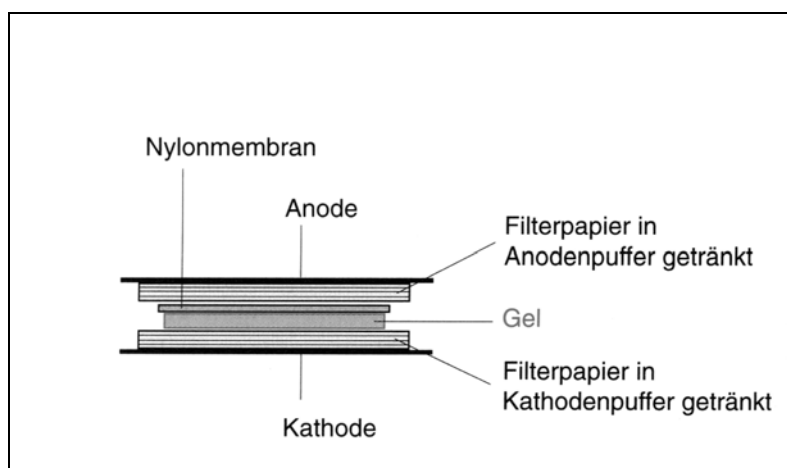
2. 2 .10. 1. Immunblot

Abb. 1: Darstellung des Aufbaus eines Immunoblots

Blotpuffer 1l (pH 8,9):

Tris Base	5,8 g
Glycin	2,9 g
SDS	0,37 g
Methanol	200 ml

Auf 1 l mit bidestilliertem H₂O auffüllen. Der Puffer wurde sowohl als Anoden als auch Kathodenpuffer verwendet.

Durchführung:

-
- Nach dem Blocken der erste Antikörper (Anti-mouse H-2D^b) in einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS/Tween auf die Membran geben.
- Unter stetem Schwenken 3 h inkubieren.
- Im Anschluss an die Inkubation dreimal für je 5 min mit PBS/Tween waschen.
- Der zweite AK (ein Peroxidase-konjugierter-Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörper) in einer Verdünnung von 1:4000 auf die Nitrozellulosemembran geben.
- für 2 h auf einer Schwenkapparatur inkubieren.
- dreimal mit PBS/Tween für je 5 min waschen.
- Das Blot entwickeln. Zu diesem Zweck 25 mg Diaminobenzidin (DAB) in 50 ml PBS/Tween lösen und auf die Membran geben. Die Farbreaktion startet nach der Zugabe von 500 µl H₂O₂ (3%ig). Detektierte Proteinbanden färben sich braun.
- Die Reaktion durch Waschen in PBS/Tween stoppen.
- Die Membran zwischen „Whatmann“-Papier trocknen.

2. 2. 11. Die Herstellung von Tumorzelllysate

Tumorzelllysate gewinnt man nach aufeinander folgenden Einfrier- und Auftauschritten. Die Tumorzellen werden zu diesem Zweck auf eine gewünschte Zellzahl eingestellt und bis zum vollständigen Durchfrieren der Suspension bei minus 80 °C eingelagert. Dabei kommt es zur Penetration der Zellmembranen durch die beim Einfrieren entstehenden Eiskristalle. Die Zellen werden dadurch zerstört. Das Auftauen erfolgt im Wasserbad bei 37 °C. Der Einfrier-

Auftau-Prozess wurde insgesamt 5 mal durchgeführt und die Lysate anschließend in den Versuchen eingesetzt.

2. 2. 12. Der TUNEL-Test

Der zur Bestimmung der Apoptose angewendete TUNEL-Test wurde nach den Vorgaben des Herstellers, wie nach folgend beschrieben, durchgeführt. Der Prinzip dieses Testes besteht darin, dass durch die Apoptose entstandenen DNA-Bruchstücke mit Hilfe einer Biotin-Streptavidin-Bindung im FACS detektiert werden können, indem die freien 3'-Hydroxy-Enden der DNA-Fragmente durch die Terminal Desoxynukleotidyltransferase biotinyliert werden und anschließend durch die Bindung der biotinylierten Enden mit einer streptavidinkonjugierten fluoreszierenden Substanz im FACS analysiert werden können.

Material:

Formaldehyd	1%ig; Merck, Darmstadt
APO-DIRECT™ Kit	PharMingen, Hamburg

Durchführung:

- 1 x 10⁶ T-Lymphozyten in 0,5 ml PBS aufnehmen.
- 15 min bei RT mit 5 ml 1%iges Formaldehyd inkubieren.
- Bei 1300 UPM für 5 min zentrifugieren
- Zellpellet in 0,5 ml PBS aufnehmen.
- 5 ml kalten Ethanol (70%ig) dazugeben.
- Bei 1300 UPM für 5 min zentrifugieren.
- Zellpellet in 50,75 µl der *staining solution* der obengenanntem Kit resuspendieren.
- (Diese Lösung enthält 10 µl Reaktionspuffer, 0,75 µl TdT Enzym, 8 µl FITC-dUTP und 32 µl H₂O)
- 60 min bei 37 °C inkubieren.
- mit dem Waschpuffer (aus dem Kit) zweimal bei 1300 UPM waschen.
- Anschließend den Proben eine FACS-Färbung mit Anti-CD3 Ak und TUNEL Ak (im Kit enthalten) unterziehen.

3. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Hypothese überprüft werden, ob die von RMA-Zellen freigesetzten MHC-Klasse I-Moleküle, welche Tumorantigene tragen, zur Apoptose geprimter T-Lymphozyten führen können.

3. 1. Charakterisierung der isolierten dendritischen Zellen aus dem Knochenmark von Balb/c-Mäusen (KMDC)

3. 1. 1. Morphologie der isolierten KMDC von Balb/c-Mäusen

Isolierte Vorläufer-Zellen aus dem Knochenmark lassen sich innerhalb von 6 Tagen in BMDC-Medium unter Einfluss von jeweils 100 U/ml GM-CSF und IL-4 zu dendritischen Zellen differenzieren. Charakteristisch für diese Zellen sind ihre verzweigten Ausläufer, welche aufgrund ihrer segelartigen Form *veils* (Segel) genannt werden.

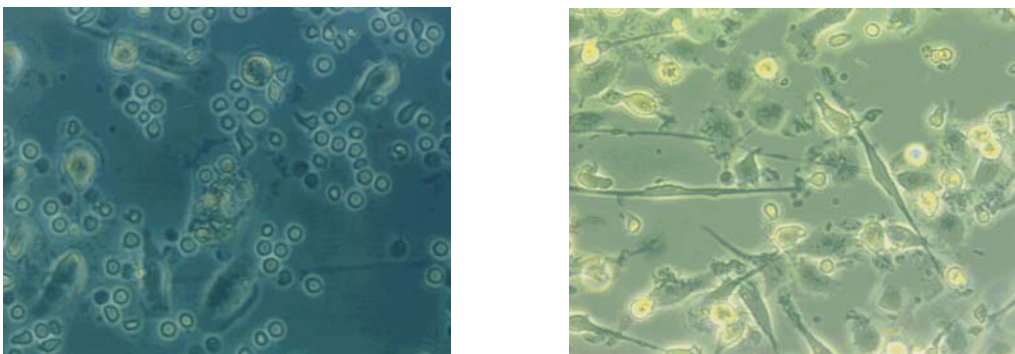


Abb. 2: Links: Frisch isolierte Knochenmarkzellen unmittelbar nach der Aufarbeitung. Rechts: Aus Knochenmark differenzierte dendritische Zellen (KMDC). Knochenmarkzellen wurden 6 Tage in BMDC-Medium mit 100 U/ml GM-CSF und 100 U/ml IL-4 kultiviert. Die isolierten KMDC zeigen die charakteristische segelartige Ausläufer.

3. 1. 2. Phänotypisierung der isolierten KMDC von Balb/c-Mäusen

Der Differenzierungsstatus der KMDC kann anhand bestimmter Oberflächenmoleküle charakterisiert werden. Hierbei fungieren CD11c, CD80, CD86 und MHC-Klasse II-Moleküle als spezifische Marker. MHC-Klasse II-Moleküle von Mäusen werden durch die Allele I^A und I^E kodiert. Für den Nachweis von MHC-Klasse II-Molekülen wurde der 14/4/4-Antikörper, welcher gegen I^E gerichtet ist, verwendet. Frisch isolierte Knochenmarkzellen wurden für 6 Tage in KMDC-Medium unter Zusatz von je 100 U/ml GMCSF und IL-4 kultiviert. Innerhalb dieser Zeit differenzierten sich Knochenmarkzellen zu DC. Der Nachweis von funktionell wichtigen Oberflächenantigene erfolgte am Tag 6 der Kultivierung mittels FACS-Analyse. Wie aus der Abb. 3 zu entnehmen ist, ist die Expression von MHC-Klasse II (14/4/4) bei 70 % der Zellen nachweisbar. Während 46 % der Zellen auf ihrer Oberfläche CD86 exprimierten, zeigten 30 % der Zellen CD80 und nur 41 % der Zellen stellten sich als CD11c positive Zellen dar. Diese Resultate beweisen, dass die in dieser Arbeit aus Knochenmarkzellen generierten DC typische Merkmale von dendritischen Zellen aufwiesen.

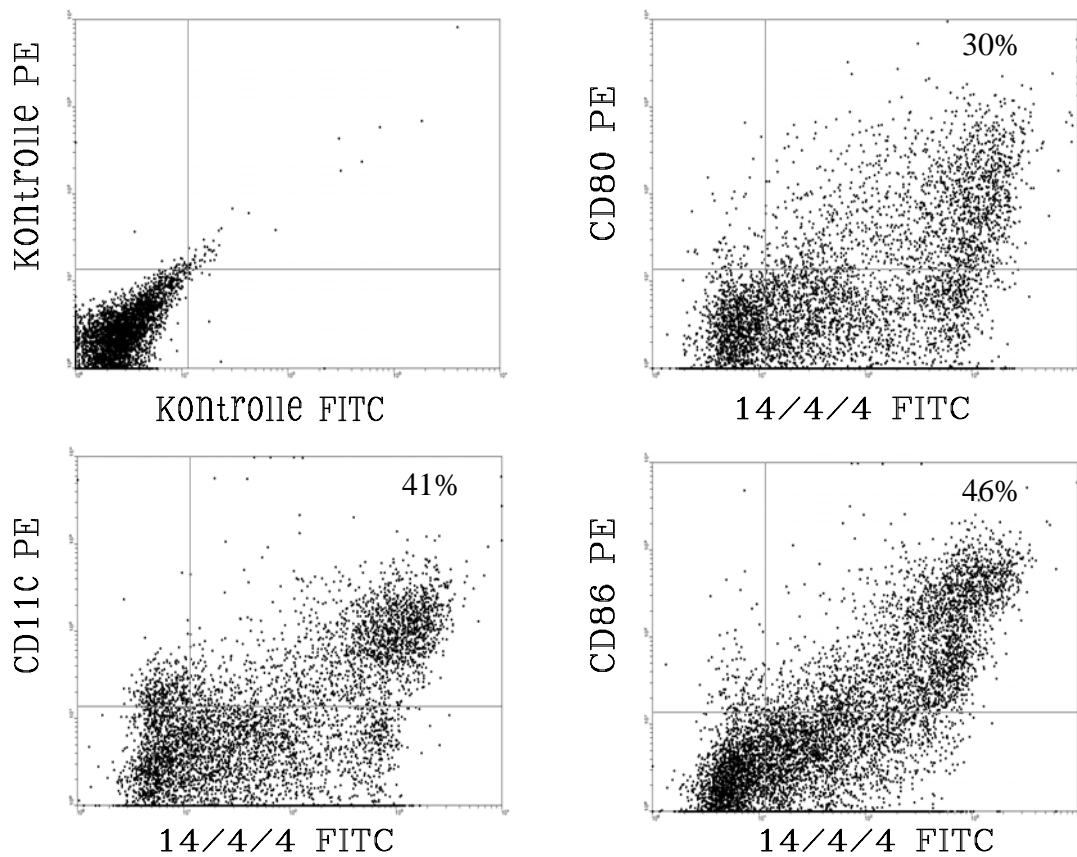


Abb. 3: Prozentualer Anteil der exprimierten Oberflächenantigene bei aus Knochenmarkzelle differenzierte dendritischen Zellen. Aus Knochenmark isolierte Zellen wurden für 6 Tage in KMDC-Medium unter Zusatz von je 100 U/ml GMCSF und IL-4 kultiviert. Anschließend erfolgte der Nachweis von Oberflächenantigene mittels FACS-Analyse. Die Expression von MHC-Klasse II (14/4/4) war bei 70% der Zellen nachweisbar, 46% der Zellen exprimierten CD86, 30% der Zellen CD80 und nur 41% der Zellen CD11c.

3. 1. 3. *Mixed leukocyte cell culture (MLC)*

Die DC stellen innerhalb der APC die potenteste Zellpopulation dar. Infolge ihrer starken Expression von MHC-Molekülen der Klasse I und II (BOOG et al., 1988; KING und KATZ, 1990; BANCHEREAU und STEINMAN, 1988), den kostimulierenden Molekülen CD40, B7-1 (CD80), und B7-2 (CD86) sowie den Adhäsionsmolekülen, initiieren sie eine starke T-Zell-Proliferation und somit eine T-Zell-Aktivierung (BANCHEREAU und STEINMAN, 1998). In einer *mixed leukocyte culture (MLC)* aktivieren die dendritische Zellen allogene T-Lymphozyten durch das Vorhandensein nicht identischer MHC-Klasse II-Moleküle. Die T-Lymphozyten beginnen daraufhin mit einer logarithmisch verlaufenden Proliferation. Anschließend kann die T-Zellproliferation anhand des [³H]-Thymidin-Einbaus gemessen werden. Um die Fähigkeit der hier behandelten DC in Bezug auf eine T-Zellstimulation zu untersuchen, wurden sie in einem allogenen MLC angesetzt. In einer 96 Well Platte wurden 2×10^5 DC/ml (Balb/c), 2×10^6 Lymphozyten/ml (C57BL/6) für 3 Tage kokultiviert. Als Kontrolle dienten 2×10^6 Lymphozyten/ml (C57BL/6). Anschließend wurden die Platten mit [³H]Thymidin markiert. Nach 24 h wurde die Reaktion gestoppt und die Proliferation der T-Zellen gemessen. Die Ergebnisse zeigen im MLC-Ansatz eine um das 20-fach erhöhte T-Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle. Dies ist auf eine starke stimulatorische Wirkung der DC zurückzuführen (Abb. 4).

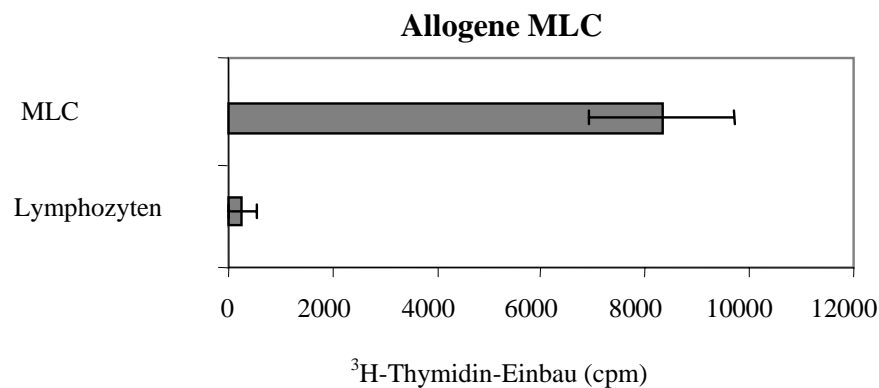


Abb. 4: Allogene MLC: 2×10^5 DC/ml (Balb/c) und 2×10^6 Lymphozyten/ml (C57BL/6) wurden für 3 Tage kokultiviert (siehe 2. 2. 8). Die T-Zellproliferation wurde mittels ³H-Thymidin-Einbau gemessen. Im Vergleich zum Kontrollansatz (Lymphozyten) ist eine signifikante Erhöhung der T-Zellproliferation um das 20-fache zu erkennen.

3. 1. 4. IL-12-Sekretion

IL-12 wirkt als basales Zytokin in der Entwicklung einer Th1-vermittelten zellulären Immunantwort. Die Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen fungieren dabei als Hauptquelle der IL-12-Sekretion. Die Produktion von IL-12 unterliegt dabei einer strikten Regulation durch positive und negative *feedback* Mechanismen. IL-12 mit einem Molekulargewicht von 70 kDa (p70) ist ein heterodimeres Glykoprotein und besteht aus einer 40 kDa (p40) und einer 35 kDa (p35) Untereinheit. DC sind in der Lage in Anwesenheit von Tumorzellen eine Th1-Antwort zu induzieren. Um dieses überprüfen zu können, wurden die DC mit Tumorzelllysate kultiviert. 2×10^5 DC/ml (C57BL/6) mit 1×10^4 Tumorzelllysate/ml der RMA- und RMA-S-Zellen wurden für 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle dienten nur die dendritische Zellen (C57BL/6) ohne Tumorzelllysate. Die Überstände wurden im ELISA auf das Vorhandensein von IL-12 getestet. Aus Abbildung 5 ist zu erkennen, dass die Ansätze mit Tumorzelllysate-Zusatz im Vergleich zur Kontrolle eine um das 2-fach höhere IL-12-Sekretion aufweisen. Dies weist auf die Induktion einer Th1-Antwort auf. Es gab keinen Unterschied zwischen den Ansätzen mit RMA und RMA-S Tumorzelllysaten in Bezug auf die IL-12-Sekretion.

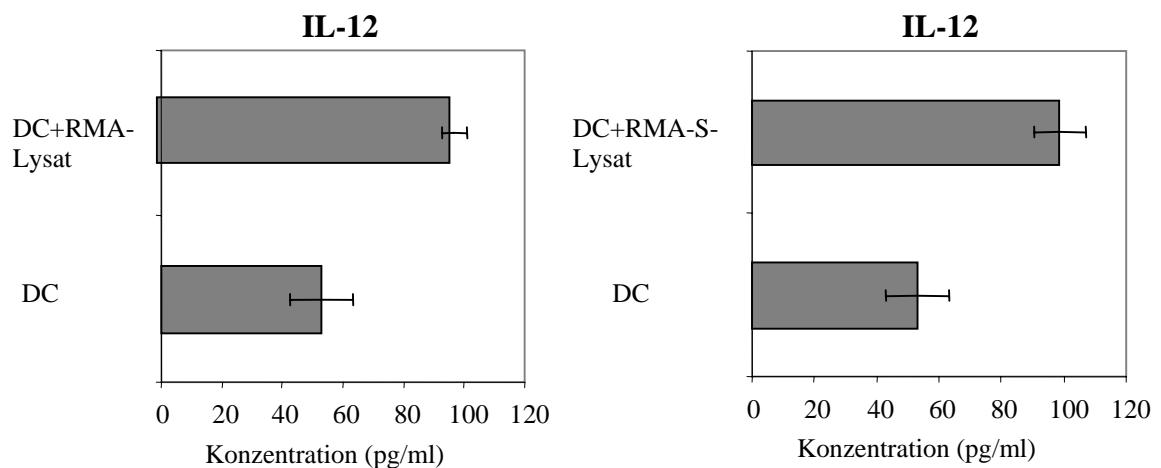


Abb. 5: IL-12-Konzentration im ELISA. 2×10^5 DC/ml (C57BL/6) wurden mit 1×10^3 Tumorzelllysate/ml der RMA- und RMA-S-Zellen für 48 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Überstände im ELISA getestet. Die Ansätze mit Tumorzelllysate-Zusatz zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine doppelt so hohe IL-12-Sekretion.

3. 2. Charakterisierung der isolierten Milz-T-Lymphozyten aus C57BL/6 Mäusen

Anhand der spezifischen Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 konnten die isolierten T-Lymphozyten charakterisiert werden. Frisch isolierte Milz-Zellen wurden für 2 h in BMDC-Medium zur Adhärenz im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der T-Zellen über magnetpartikelgekoppelte Antikörper durch negative Selektion am autoMACS-Gerät (siehe 2. 2. 3. 1.).

Der Nachweis von funktionell wichtigen Oberflächenantigenen erfolgte mittels FACS-Analyse. Im FACS wurden die Lymphozyten zusätzlich auf CD19 getestet um die Reinheit der T-Zellpopulation zu bestimmen. CD19 ist ein spezifischer Oberflächenmarker für B-Lymphozyten. Ein positiver Befund bezüglich dieses Antigens würde eine Verunreinigung mit B-Lymphozyten aufzeigen. 61% der im FACS gemessenen Zellen exprimierten CD4, 18% der Zellen CD8. Nur 2% der Zellen stellten sich als CD19 positiv dar. Diese Resultate zeigen, dass über magnetpartikelgekoppelte Antikörper T-Lymphozyten erfolgreich isoliert werden konnten und die Verunreinigung mit anderen Zellen statistisch zu vernachlässigen ist (Abb. 6).

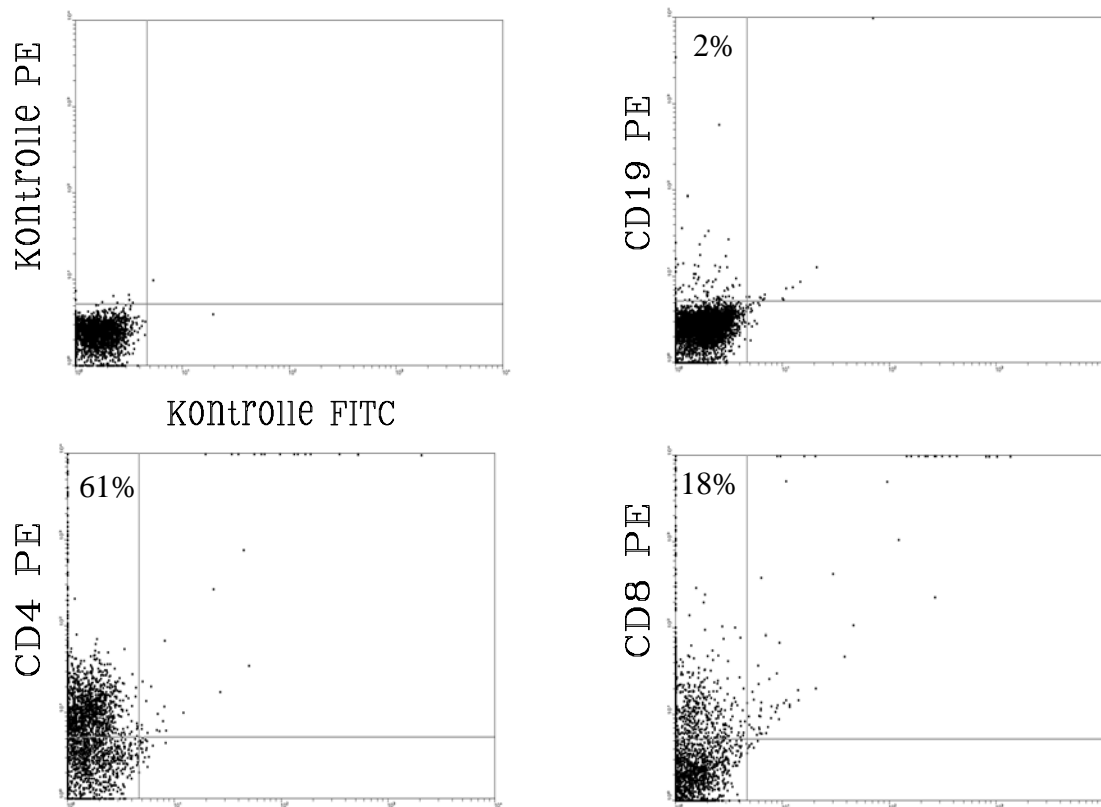


Abb. 6: Phänotypisierung der isolierten T-Lymphozyten aus der Milz der C57BL/6 Mäusen nach MACS-Aufreinigung. Die Isolierung von T-Lymphozyten aus der Milz wurde mit Hilfe von magnetpartikelgekoppelte Antikörper durchgeführt. Anschließend wurde der Anteil von Oberflächenmarkern CD4 und CD8, als auch der Anteil von B-Zellen spezifischen Markern (CD19) anhand der FACS-Analyse ermittelt. 61% der im FACS gemessenen Zellen exprimierten CD4, 18% der Zellen CD8, 2% CD19.

3. 3. *In-vitro*-Immunisierung mit den Tumorzellen RMA und RMA-S in einem MLTC System

Die MLTC als Spezialform der MLC kann zur Untersuchung von Immunreaktionen, die durch Stimulation von T-Lymphozyten durch Tumorzellen oder deren Lysate gekennzeichnet sind, herangezogen werden. Es kann festgestellt werden, ob Tumorzellen auf der Ebene der Antigenpräsentation durch das Immunsystem bekämpfbar sind oder nicht.

Bei der allogenen MLTC fungieren APC als Stimulatorzellen, wobei sie durch ihre MHC-Moleküle den Responderzellen, nämlich den T-Zellen eines anderen Individuums, Tumorantigene präsentieren und somit die Proliferation der Lymphozyten bedingen. In allen allogenen MLTC in dieser Arbeit stammten die eingesetzten T-Lymphozyten von C57BL/6 Mäusen und die KMDC (APC) von Balb/c Mäusen. Bei der autologen MLTC stammen sowohl die APC als auch die Lymphozyten aus dem selben Individuum. In den autologen MLTC in dieser Arbeit stammten sowohl die Lymphozyten als auch die KMDC von C57BL/6 Mäusen.

Es sollte geklärt werden, ob Tumorzelllysate in der Lage sind, in einer MLTC eine spezifische Anti-Tumor-Immunantwort auszulösen. Diese wurde anhand von Proliferationsrate der T-Zellen, Produktion von IFN- γ und der zytotoxischen Wirkung der T-Zellen auf die Tumorzellen nachgewiesen.

3. 3. 1. Proliferation der stimulierten T-Lymphozyten im MLTC-System

Die Proliferationsrate allogenen und autologen stimulierter Lymphozyten in Gegenwart von Tumorzelllysaten als Tumorantigen wurde durch den Einbau von radioaktiv markierten [^3H]-Thymidin nachgewiesen. Im allogenen System wurden 2×10^5 DC/ml (Balb/c) und 2×10^6 Lymphozyten/ml (C57BL/6) mit verschiedenen Konzentrationen (1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 und 1×10^6) der Tumorzelllysate der RMA bzw. RMA-S Zellen/ml für 3 Tage im Brutschrank bei 37°C kokultiviert. Anschließend erfolgte die Markierung der Platten mit [^3H]-Thymidin. Nach 24 h wurde die Reaktion gestoppt und die Proliferation der T-Zellen gemessen. Als Kontrolle dienten einmal die Lymphozyten und einmal die DC und Lymphozyten (MLC). Die selben Experimente wurden auch im autologen System (DC und Lymphozyten stammten aus C57BL/6 Maus) durchgeführt. Wie in den Abbildungen 7 und 8 zu sehen, ist eine sichtbare T-Zell-Proliferation in allen MLTC-Ansätzen zu erkennen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen sind nicht bedeutend. Aus diesem Grund wählten wir für die weiteren Versuche eine Tumorzelllysate-Konzentration von 1×10^3 /ml aus. Die Werte aus dem autologen System liegen deutlich niedriger als die der äquivalenten Ansätze im allogenen System. In Bezug auf die T-Zellproliferation konnte kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden verwendeten Tumorzelllinien RMA und RMA-S festgestellt werden.

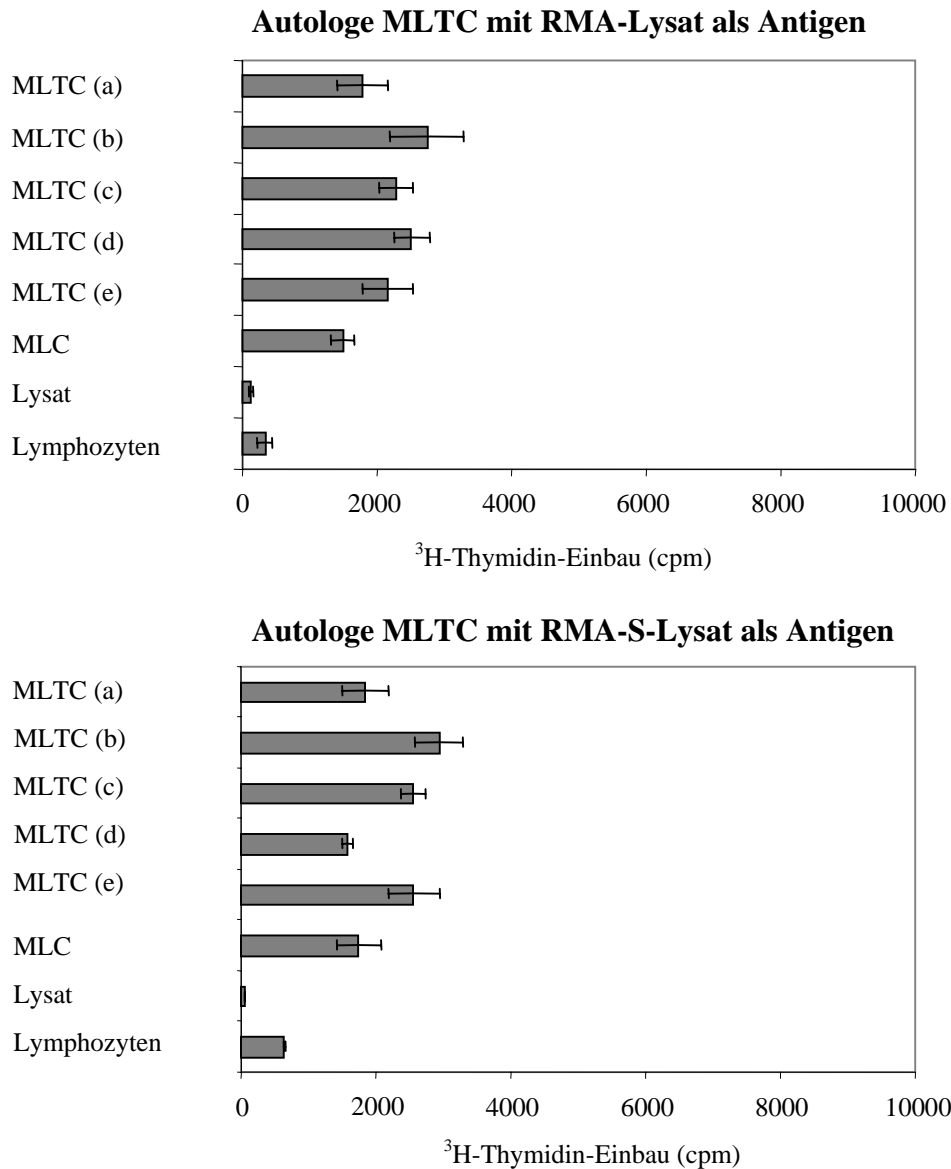


Abb. 7: Autologe MLTC: Oben: Proliferation der Lymphozyten durch RMA-Lysat. Unten: Proliferation der Lymphozyten durch RMA-S-Lysat. Aus dem Stamm C57BL/6 wurden jeweils 2×10^5 DC/ml, 2×10^6 Lymphozyten/ml mit (a): 1×10^2 , (b): 1×10^3 , (c): 1×10^4 , (d): 1×10^5 , (e): 1×10^6 der Tumorzelllysate/ml für 3 Tage bei 37°C kokultiviert. Anschließend erfolgte die Messung der Proliferation anhand des [^3H]-Thymidin-Einbau. Es konnte in allen MLTC-Ansätzen eine T-Zellproliferation festgestellt werden. Die Tumorzelllysatkonzentration von 1×10^3 /ml wurde für die nachfolgenden Versuche ausgewählt. Es konnte kein erwähnenswerter Unterschied zwischen den beiden Tumorzelllinien bezogen auf die T-Zellproliferation festgestellt werden.

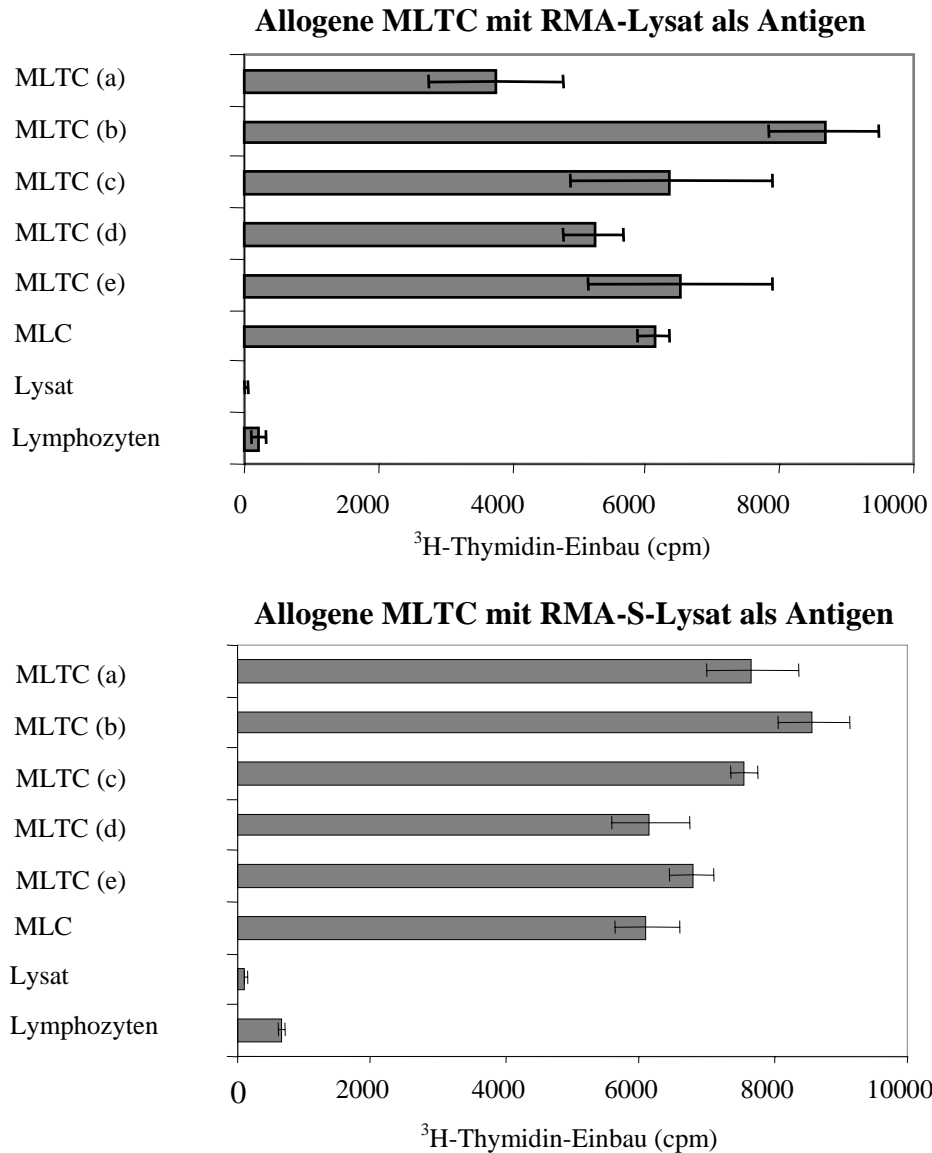


Abb. 8: Allogene MLTC: Oben: Proliferation der Lymphozyten durch RMA-Lysat. Unten: Proliferation der Lymphozyten durch RMA-S-Lysat. Es wurden 2×10^5 DC/ml (Balb/c) und 2×10^6 Lymphozyten/ml (C57BL/6) mit (a): 1×10^2 , (b): 1×10^3 , (c): 1×10^4 , (d): 1×10^5 , (e): 1×10^6 der Tumorzelllysate/ml für 3 Tage bei 37°C kokultiviert. Anschließend erfolgte die Messung der Proliferation anhand des [^3H]-Thymidin-Einbau. Es konnte in allen MLTC-Ansätzen eine T-Zellproliferation festgestellt werden. Die Tumorzelllysatkonzentration von 1×10^3 /ml wurde für die nachfolgenden Versuche ausgewählt. Es konnte kein erwähnenswerter Unterschied zwischen den beiden Tumorzelllinien bezogen auf die T-Zellproliferation festgestellt werden.

3. 3. 2. IFN- γ -Sekretion

IFN- γ ist der Hauptinduktor der IL-12-Sekretion. (Hilkens et al., 1997). IFN- γ wird durch Antigenstimulation von zytotoxischen T- und NK-Zellen produziert und ist der Indikator einer Th1-Antwort (Magram et al., 1996).

Es sollte untersucht werden, ob die Stimulation mit RMA bzw. RMA-S-Zelllysaten die IFN- γ -Sekretion der T-Zellen beeinflusst bzw. ob eine Th1-Antwort nachweisbar ist. Dafür wurden die gleichen Platten wie für den T-Zellproliferation-Test angesetzt. Nach 3 Tagen Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die Überstände im IFN- γ -ELISA untersucht. Die Daten zeigen im Vergleich zur Kontrolle (MLC), eine Verdoppelung der IFN- γ -Konzentration in den Ansätzen mit Tumorzelllysate sowohl im autologen als auch im allogenen System. Dies weist darauf hin, dass T-Zellen durch Stimulation mit Tumorzelllysate RMA und RMA-S eine Th1-Antwort induziert haben. Die Werte im autologen System sind niedriger als die im allogenen System (Abb. 9).

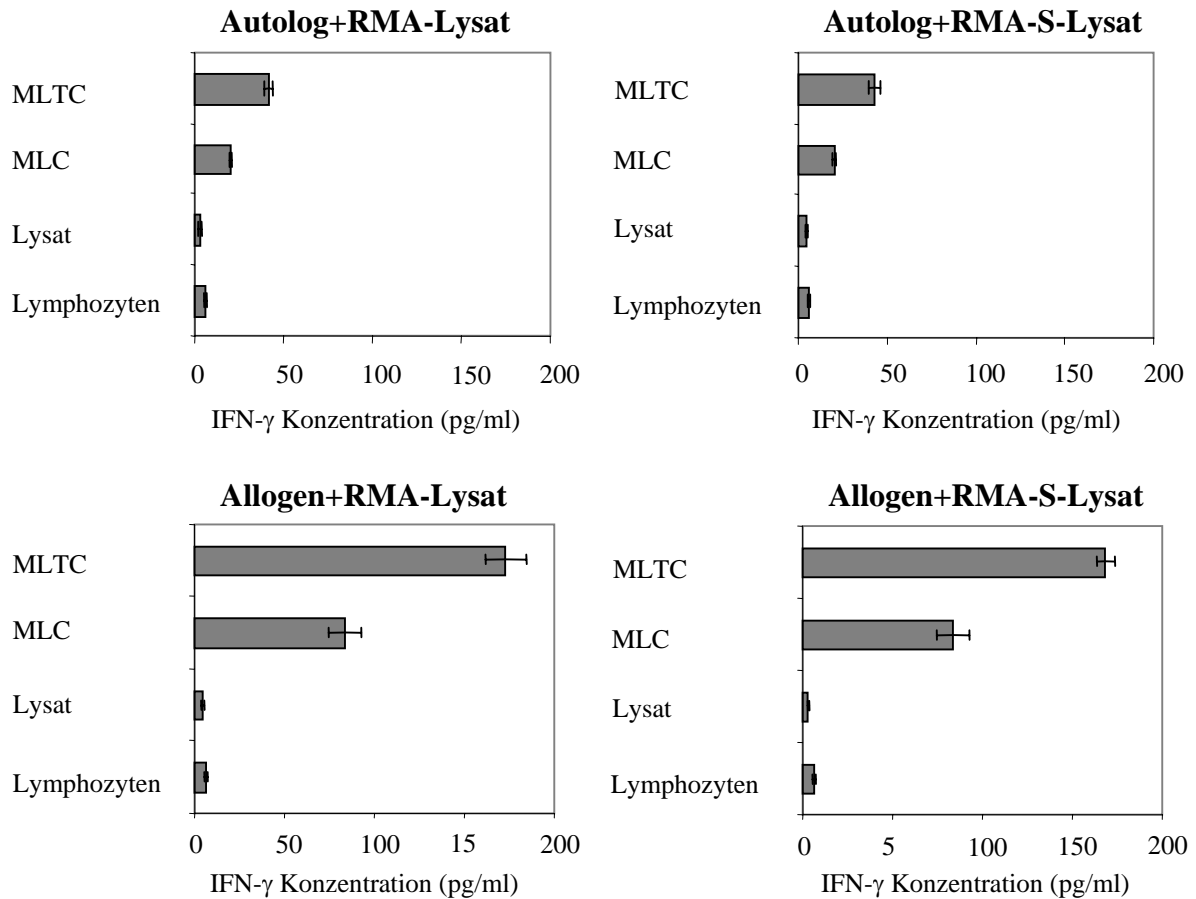


Abb. 9: IFN- γ -ELISA der Kulturüberstände mit Tumorlysat stimulierten Lymphozyten. Im autologen MLTC-System wurden 2×10^5 DC/ml (C57BL/6) und 2×10^6 Lymphozyten/ml (C57BL/6) mit 1×10^3 der Tumorzelllysate der RMA (oben, links) bzw. RMA-S Zellen/ml (oben, rechts) für 3 Tage im Brutschrank bei 37 °C kokultiviert. Im allogenem MLTC-System (Stimulation durch RMA: unten, links. Stimulation durch RMA-S: unten, rechts) wurden 2×10^5 DC/ml (Balb/c) und 2×10^6 Lymphozyten/ml (C57BL/6) mit 1×10^3 der Tumorzelllysate/ml für 3 Tage im Brutschrank bei 37 °C kokultiviert. Die IFN- γ -Sekretion in beiden Systemen ist durch die Kokultivierung mit den Tumorzelllysaten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollansätzen (Tumorzelllysate allein, Lymphozyten allein, DC und Lymphozyten in der MLC) ausgeprägter. Weiterhin ist im allogenem System, die IFN- γ -Sekretion nach der Stimulation durch RMA- und RMA-S-Tumorzelllysate deutlich stärker als die im autologen System.

3. 3. 3. Zytotoxische Aktivität der sensibilisierten T-Lymphozyten gegen RMA und RMA-S Zellen

Um den Zytotoxizitätseffekt der Lymphozyten auf die Tumorzellen zu untersuchen, wurden im autologen und im allogenen System 1×10^5 Tumorzelllysate/ml mit 2×10^5 DC/ml und 2×10^6 Lymphozyten/ml für 4 Tage kokultiviert. Als Negativkontrolle dienten Lymphozyten und Lymphozyten und DC (MLC-Ansatz). Nach 4 Tagen wurden die Überstände, welche die Lymphozyten enthielten, gesammelt und die Lymphozyten auf 5×10^6 /ml eingestellt. Die RMA- und RMA-S-Zellen wurden auf eine Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ /ml eingestellt und mit Gammastrahlung bestrahlt (200 Gy), damit sie ihre proliferative Aktivität verlieren. Anschließend wurden sie mit PKH-26 Farbstoff rot gefärbt. Die Lymphozyten und die gefärbten Tumorzellen wurden auf für Adhärenz geeignete Objektträger 48 Stunden kokultiviert. Die Objektträger wurden dann sowohl einer FACS-Färbung (Abb. 10) als auch einer DAPI-Färbung unterzogen. Danach wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (blaues Licht) beurteilt (Abb. 11) und die lebenden Tumorzellen (rot) gezählt. Apoptotische Tumorzellen stellten sich unter dem Mikroskop als rote Zellen mit fluoreszierenden DNA-Fragmenten im Kern dar. Diese DNA-Fluoreszenz ist auf den DAPI-Farbstoff zurückzuführen.

Die RMA-S-Zellen waren kaum apoptotisch. Da diese Zellen keine MHC-Klasse I-Moleküle exprimieren, konnten sie nicht durch zytotoxische T-Zellen getötet werden. Die RMA-Zellen waren zu einem hohen Prozentsatz apoptotisch. Die höchste Apoptoserate ($60 \pm 10\%$) konnte von den sensibilisierten T-Lymphozyten erzeugt werden, die aus einem allogenen MLTC-Ansatz (stimuliert mit RMA Zellen) gewonnen wurden (Abb.10 und11).

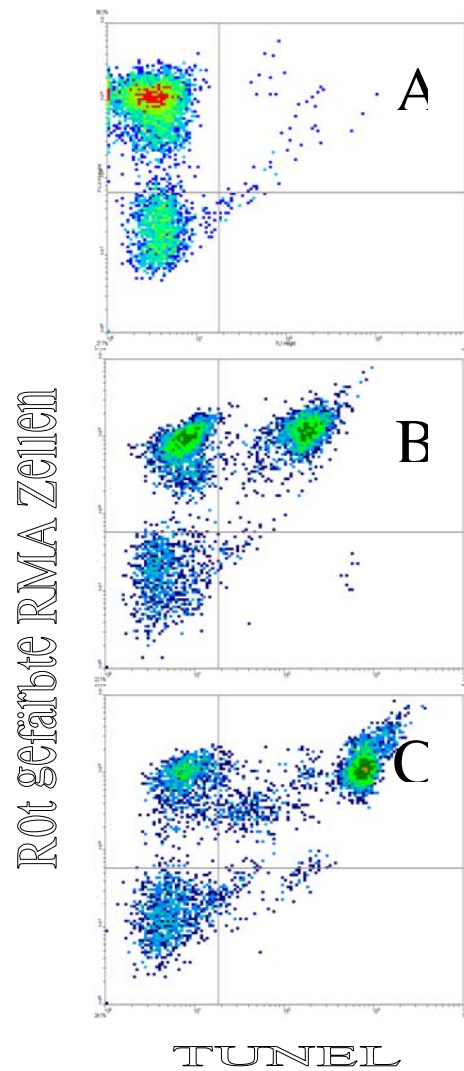


Abb. 10:FACS-Analyse zur Beurteilung der zytotoxische Aktivität der sensibilisierten T-Lymphozyten gegen RMA-Tumorzellen: Lebende RMA-Tumorzellen (rot) wurden mit den nicht sensibilisierten (A) und sensibilisierten T-Lymphozyten aus autologen (B) und allogenen (C) Ansätzen für 48 h kokultiviert. Die Apoptoserate der Tumor-Zellen im Ansatz A beträgt 5%. Die Menge der apoptotischen Tumor-Zellen aus autologer MLTC (B) beträgt 36%. Im Gegensatz liegt die Menge der apoptotischen Tumor-Zellen aus allogener MLTC(C) höher (52%).

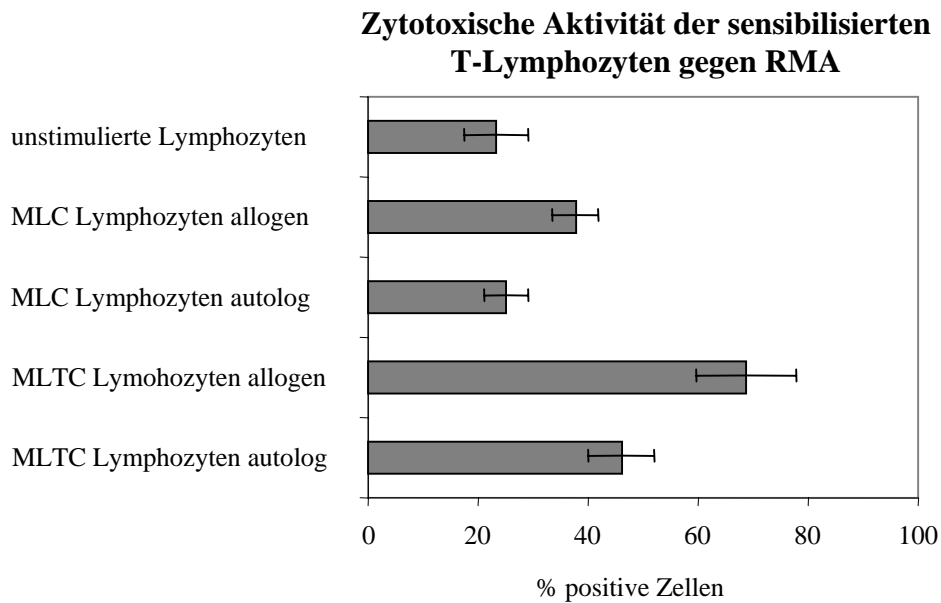


Abb. 11: Zytotoxische Aktivität der sensibilisierten T-Lymphozyten gegen RMA. Im autologen und allogenen System wurden 1×10^5 /ml Tumorzelllysate der beiden Zelllinien RMA mit 2×10^5 DC/ml und 2×10^6 Lymphozyten/ml für 4 Tage kokultiviert. Als Negativkontrolle dienten Lymphozyten und Lymphozyten mit DC in Kokultur (MLC-Ansatz). Nach 4 Tagen wurden die Zellzahl der Überstände welche die Lymphozyten enthielten, auf 5×10^6 /ml eingestellt. Die Tumorzelllysate wurden auf eine Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ /ml eingestellt und Gammastrahlung ausgesetzt (200 Gy). Anschließend wurden die Zellen mit PKH-26 Farbstoff rot gefärbt. Die Lymphozyten und die gefärbten Tumorzellen wurden auf für Adhärenz geeignete Objektträger für 48 Stunden kokultiviert. Die DAPI-Färbung ergab, dass die sensibilisierten T-Lymphozyten aus dem allogenen System im Vergleich zu den aus dem autologen System eine stärkere zytotoxische Wirkung auf die RMA-Zellen besitzen. Die höchste Apoptoserate konnte in der allogenen MLTC erzeugt werden.

3. 4. Restimulation der sensibilisierten T-Lymphozyten mit der aus RMA Tumorzelllinie isolierten MHC Klasse I-Molekülen

Die Arbeitsgruppe SCHNECK hat im Maus-Modell nachgewiesen, dass lösliche MHC-Klasse I-Moleküle in der Lage sind, innerhalb eines Restimulationsansatzes die T-Zellproliferation und die Sekretion von IL-2 zu blockieren (SCHNECK, et al, 1989). ZAVAZAVA und HAUSMANN haben später bei der Untersuchung dieses Phänomens herausgefunden, dass die Blockade der T-Zellproliferation unter Einwirkung von löslichen MHC-Klasse I-Molekülen von der Konzentration dieser Moleküle abhängig ist (ZAVAZAVA et al, 1991; HAUSMANN *et al*, 1993). Zur Restimulation der sensibilisierten T-Lymphozyten mit löslichen MHC-Klasse I-Molekülen sollten sie aus dem autologen und dem allogenen MLTC-System isoliert werden und unter Einfluss von MHC-Klasse I-Molekülen kultiviert und anschließend die T-Zellproliferation, IFN- γ -Sekretion und die Apoptoserate der Lymphozyten bestimmt werden.

3. 4. 1. Isolierung von sekretorischen MHC-Klasse I-Molekülen aus dem Tumorüberstand der Tumorzelllinie RMA über magnetpartikelgekoppelte Antikörper

Die Isolierung von MHC Klasse I-Molekülen aus dem Tumorüberstand der RMA-Zellen erfolgte mittels eines Komplexes aus Protein A Microbeads und Anti-MHC-Klasse I-Antikörpern (H-2D^b-Antikörper). Das Protein A ist an magnetischen MicroBeads gekoppelt. Es ist in der Lage, die meisten Antikörper hochspezifisch zu binden. So wird die Isolierung eines beliebigen Proteins, das mit einem spezifischen Antikörper gekoppelt ist, im Magnetfeld möglich. Anschließend wurden die MHC-Klasse I-Moleküle anhand der SDS-PA-Gelelektrophorese nachgewiesen (Abb. 12).

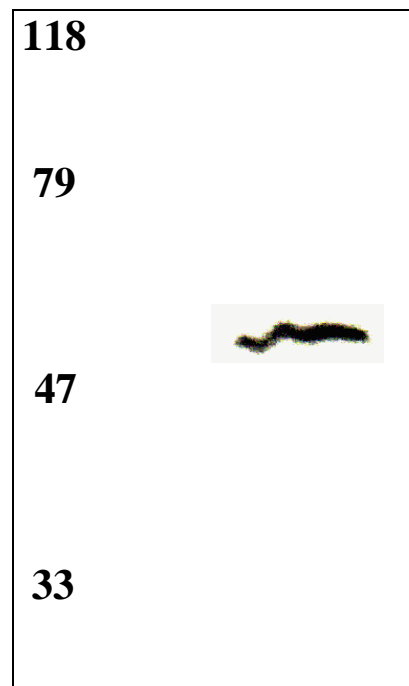


Abb. 12: Nachweis der isolierten MHC-Klasse I-Molekülen aus dem Tumorüberstand der Tumorzelllinie RMA anhand der SDS-PA-Gelelektrophorese

3. 4. 2. Reinheit der in Restimulation eingesetzten T-Lymphozyten

In den Restimulationsexperimenten sollten die Lymphozyten aus den Überständen von MLC- und MLTC-Ansätzen mit MHC-Klasse I-Molekülen konfrontiert werden. Sie wurden vom Überstand der MLC- bzw. MLTC-Ansätzen abgenommen und vor der Restimulation auf ihre Reinheit durch den Nachweis von CD3 im FACS überprüft. 85% der isolierten Zellen zeigten den CD3 Marker auf ihrer Oberflächen (Abb. 13).

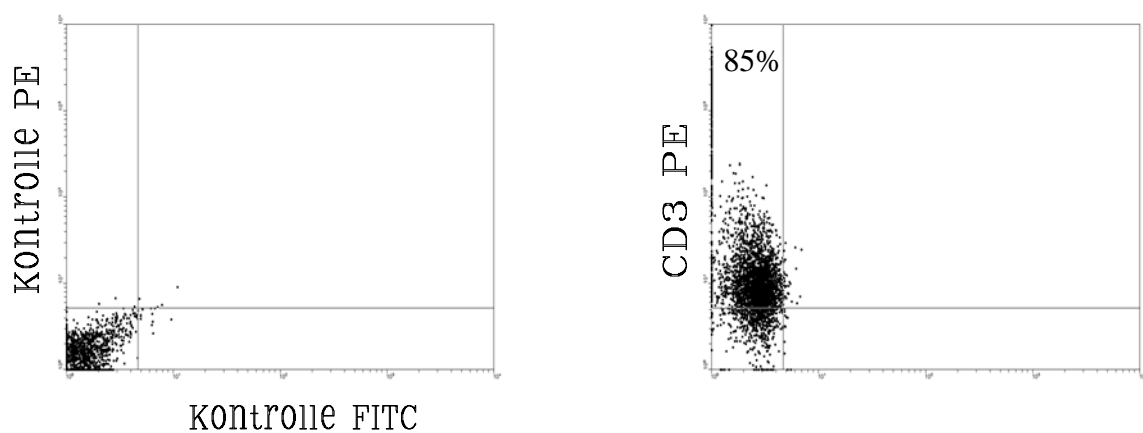


Abb.13: Reinheit der in Restimulation eingesetzten T-Lymphozyten. In den Restimulationsexperiment wurden die Lymphozyten aus den Überständen von MLC- und MLTC-Ansätzen restimuliert. Bevor die T-Lymphozyten in den Restimulationsexperimenten angesetzt wurden, sollte deren Reinheit durch Nachweis der CD3 Oberflächenmarker im FACS ermittelt werden. 85% der isolierten Zellen zeigten die CD3 Marker auf ihre Oberflächen.

3. 4. 3. Proliferation der mit MHC-Klasse I-Molekülen restimulierten T-Lymphozyten

Anhand des [³H]-Thymidin-Einbaus wurde die T-Zellproliferation nach der Restimulation der sensibilisierten T-Lymphozyten mit MHC-Klasse I-Molekülen untersucht. In einer allogenen MLTC wurden 2×10^5 DC/ml (Balb/c) und 2×10^6 Lymphozyten/ml (C57BL/6) mit RMA- bzw. RMA-S-Tumorzelllysate für 3 Tage kokultiviert. Als Negativkontrollen wurden Lymphozyten allein und Lymphozyten mit DC (MLC) ausplattiert. Im autologen System stammten sowohl die dendritischen Zellen als auch die Lymphozyten aus der C57BL/6 Maus. Alle Platten wurden zweifach angesetzt. Eine Platte sollte für die Untersuchung der Ausgangsproliferation (Proliferationskontrolle) in der MLTC genutzt werden und die andere für die Restimulation. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte für die Restimulation kurz zentrifugiert. Nach Abnahme der Überstände und Zusatz von 100 µg/ml MHC-Klasse I-Molekülen wurden die Platten für 48 h inkubiert. Anschließend folgte die Messung der T-Zellproliferation

In Abb. 14 und 15 ist zu erkennen, dass bei der Restimulation mit MHC-Klasse I-Molekülen die Proliferation der Lymphozyten in der MLTC im Vergleich zur Proliferationskontrolle rückläufig ist.

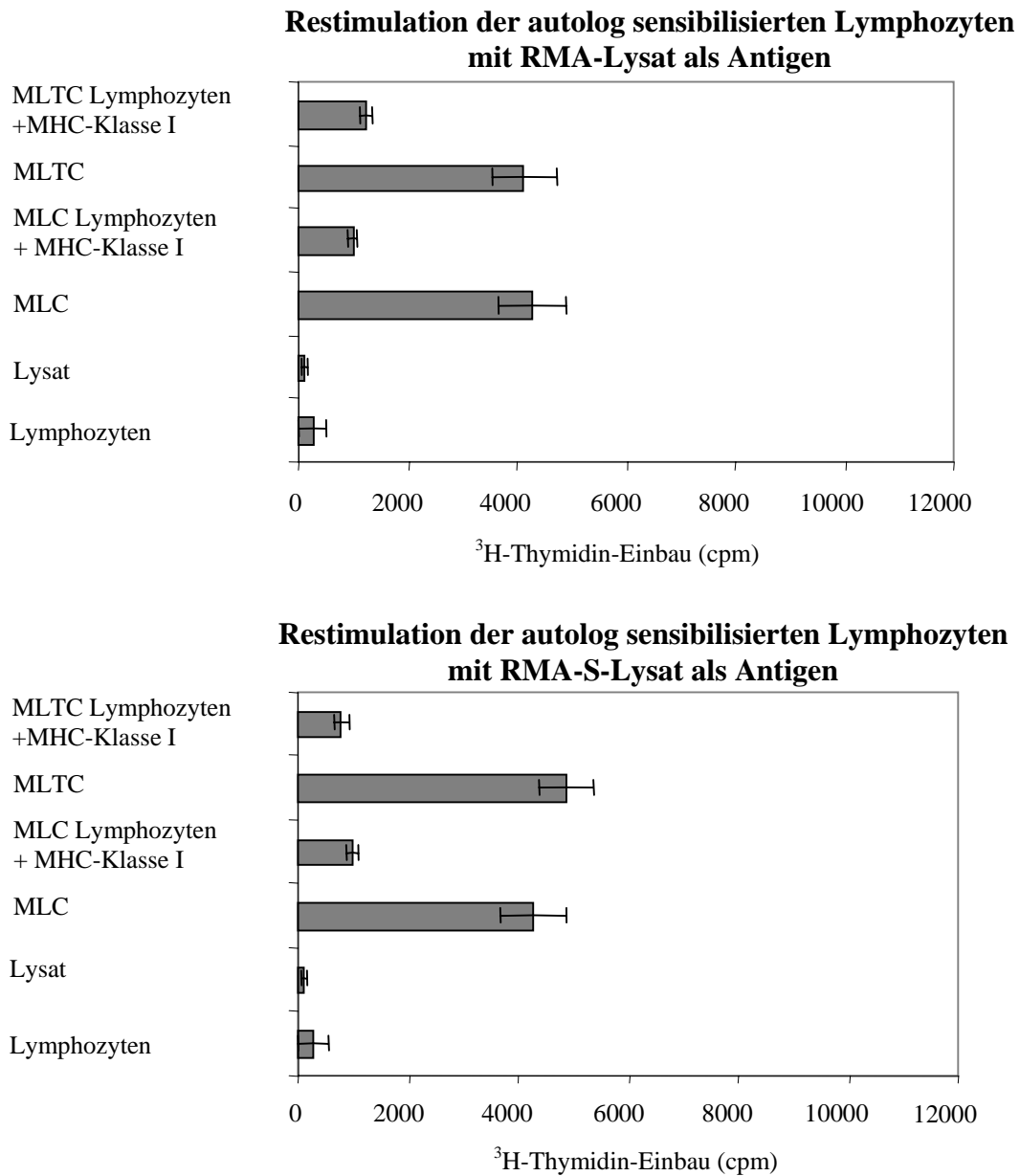


Abb.14: Restimulation der autolog sensibilisierten Lymphozyten mit RMA- und RMA-S-Zellysat als Antigen. In beiden Darstellungen wurden die Werte aus der nicht restimulierten Ansätzen als Vergleich aufgetragen. In einer autologen MLTC wurden 2×10^5 DC/ml (C57BL/6) und 2×10^6 Lymphozyten/ml (C57BL/6) mit RMA- bzw. RMA-S-Tumorzellysat für 3 Tage kokultiviert. Als Negativkontrollen wurden Lymphozyten allein und Lymphozyten mit DC (MLC) ausplattiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Restimulationsplatte mit $100 \mu\text{g/ml}$ MHC-Klasse I-Molekülen 48 h inkubiert. Anschließend folgte die Messung der T-Zellproliferation. Durch Restimulation mit den MHC-Klasse I-Molekülen ist die Proliferation der Lymphozyten im Vergleich zur Proliferationskontrolle rückläufig .

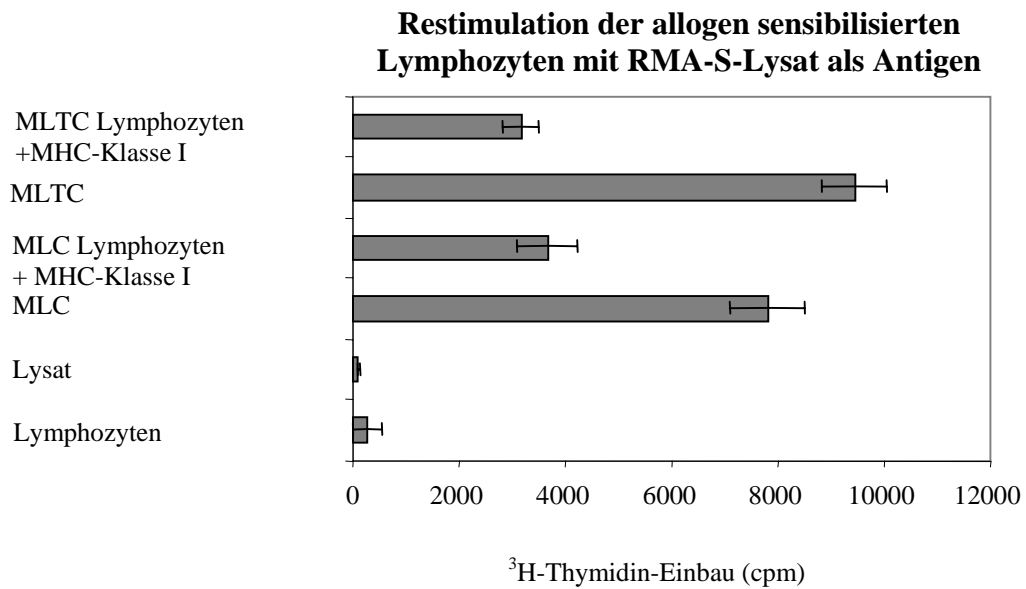
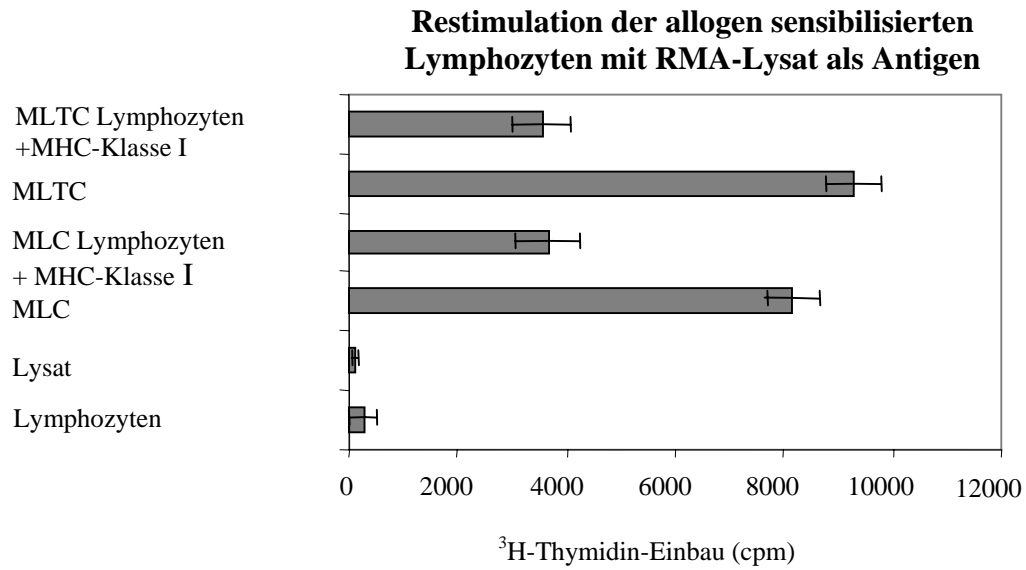


Abb.15: Restimulation der allogen sensibilisierten Lymphozyten mit RMA- und RMA-S-Zellen als Antigen. In beiden Darstellungen wurden die Werte aus der nicht restimulierten Ansätzen als Vergleich aufgetragen. In einer allogenen MLTC wurden 2×10^5 DC/ml (Balb/c) und 2×10^6 Lymphozyten/ml (C57BL/6) mit RMA- bzw. RMA-S-Tumorzelllysat für 3 Tage kokultiviert. Als Negativkontrollen wurden Lymphozyten allein und Lymphozyten mit DC (MLC) ausplattiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Restimulationsplatte mit $100 \mu\text{g/ml}$ MHC-Klasse I-Molekülen 48 h inkubiert. Anschließend folgte die Messung der T-Zellproliferation. Durch Restimulation mit den MHC-Klasse I-Molekülen ist die Proliferation der Lymphozyten im Vergleich zur Proliferationskontrolle rückläufig.

3. 4. 4. Sekretion des Th1-Antwort spezifischen Zytokins IFN- γ nach Restimulation mit MHC Klasse-I-Molekül

In einer allogenen MLTC wurden 2×10^5 DC/ml (Balb/c) und 2×10^6 /ml Lymphozyten (C57BL/6) mit RMA- bzw. RMA-S-Tumorzelllysate für 3 Tage kokultiviert. Als Negativkontrollen wurden Lymphozyten allein und Lymphozyten mit DC (MLC) ausplattiert. Im autologen System stammten sowohl die dendritischen Zellen als auch die Lymphozyten aus der C57BL/6 Maus. Alle Platten wurden zweifach angesetzt. Eine Platte sollte für die Untersuchung der IFN- γ -Sekretion (Kontrollplatte) in der MLTC genutzt werden und die andere für die Untersuchung der IFN- γ -Sekretion nach der Restimulation. Nach Abnahme der T-Lymphozyten und Zusatz von 100 μ g/ml MHC-Klasse I-Molekülen wurden die Platten für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Überstände nach IFN- γ -Sekretion getestet.

Im Gegensatz zu den IFN- γ -Konzentrationen des ELISA der Stimulationsexperimente (siehe Abb. 9) sind die IFN- γ -Sekretionen durch die Restimulation mit MHC-Klasse I-Molekülen dramatisch gesunken (Abb. 16).

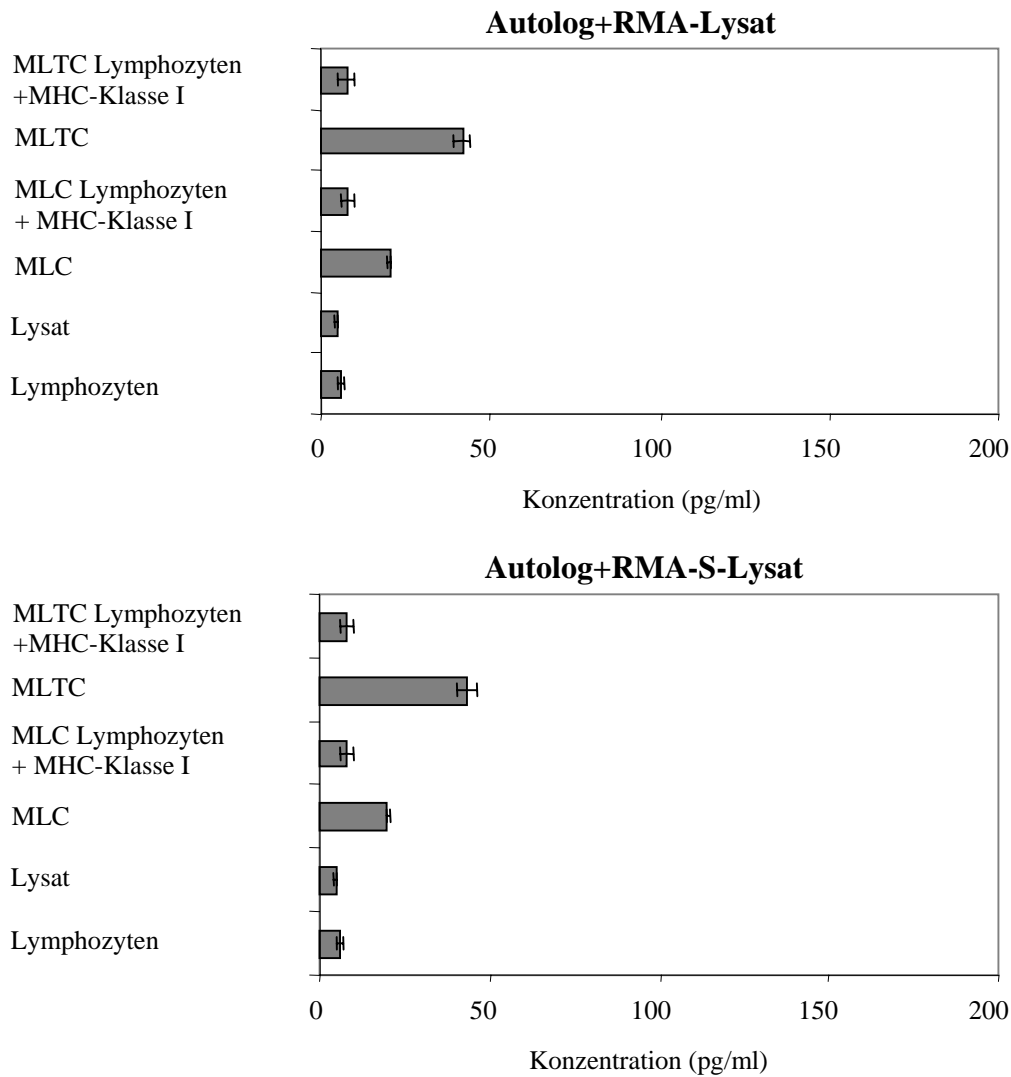


Abb. 16: IFN- γ -Konzentration der mit MHC-Klasse I restimulierte Lymphozyten aus dem autologen System im ELISA. In einer autologen MLTC wurden 2×10^5 DC/ml (C57BL/6) und 2×10^6 Lymphozyten/ml (C57BL/6) mit RMA- bzw. RMA-S-Tumorzelllysate für 3 Tage kokultiviert. Als Negativkontrollen wurden Lymphozyten allein und Lymphozyten mit DC (MLC) ausplattiert. Die Restimulationsplatte wurde mit $100 \mu\text{g/ml}$ MHC-Klasse I-Molekülen 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Überstände im IFN- γ -ELISA getestet. Der IFN- γ -Wert nach der Restimulation durch MHC-Klasse I-Moleküle ist deutlich geringer als der Wert der in der MLTC stimulierten T-Lymphozyten. In beiden Darstellungen wurden die Werte aus den nicht restimulierten Ansätzen als Vergleich aufgetragen.

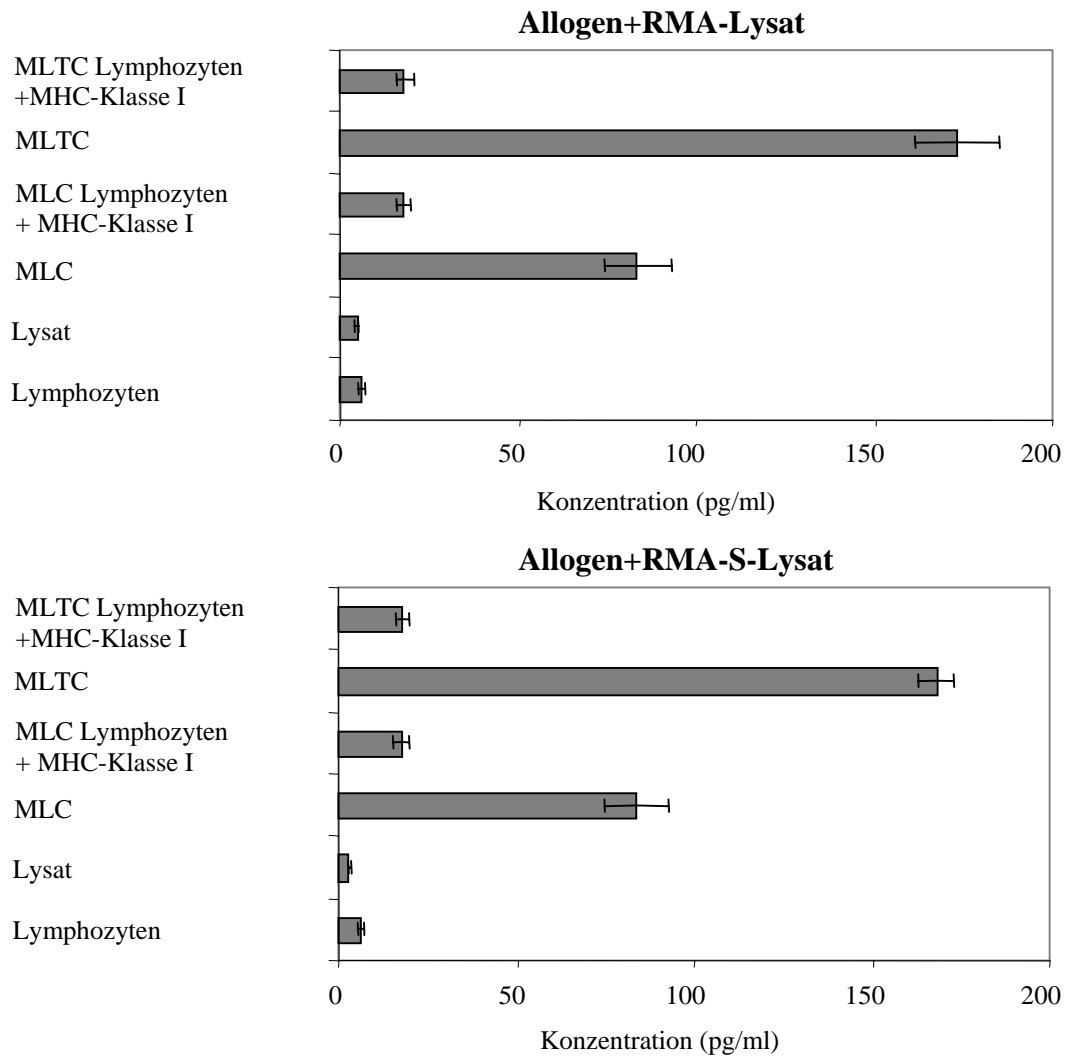


Abb. 17: IFN- γ -Konzentration der mit MHC-Klasse I restimulierte Lymphozyten aus dem allogenen System im ELISA. In einer allogenen MLTC wurden 2×10^5 DC/ml (Balb/c) und 2×10^6 Lymphozyten/ml (C57BL/6) mit RMA- bzw. RMA-S-Tumorzelllysate für 3 Tage kokultiviert. Als Negativkontrollen wurden Lymphozyten allein und Lymphozyten mit DC (MLC) ausplattiert. Die Restimulationsplatte mit $100 \mu\text{g/ml}$ MHC-Klasse I-Molekülen 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Überstände im IFN- γ -ELISA getestet. Der IFN- γ -Wert nach der Restimulation durch MHC-Klasse I-Moleküle ist deutlich geringer als der Wert der in der MLTC stimulierten T-Lymphozyten. In beiden Darstellungen wurden die Werte aus der nicht restimulierten Ansätzen als Vergleich aufgetragen.

3. 4. 5. APOPTOSE-Test

Durch den Einsatz eines Apoptosetests, den sogenannten TUNEL-Test, wurde die Apoptoserate zwischen den in den Stimulationsversuchen mit Tumorlysat und den in der Restimulation mit MHC-Klasse I-Moleküle eingesetzten Zellen miteinander verglichen.

Die Negativkontrollen und die Expression von CD3 sind in den Stimulations- und Restimulationsversuchen äquivalent. Die Rate der apoptotischen Zellen lässt sich anhand der Menge der Einlagerung des streptavidinkonjugierten FITC in die durch das Enzym TdT biotinylierten DNA-Fragmente ermessen. Im Stimulationsversuch sind nur wenige Zellen FITC-markiert (siehe Abb.18, Linkes Histogramm). Die Apoptoserate ist gering. Im Restimulationsversuch allerdings kann man einen dramatischen Anstieg der toten Zellen erkennen. Diese sind PE- und FITC-markiert, da sowohl der Nachweis von CD3 als auch der fragmentierten DNA stark ausgeprägt ist (siehe Abb. 18, rechtes Histogramm, großes Gate).

Durch den Nachweis der verminderten Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten, der reduzierten IFN- γ -Sekretion und der gesteigerten Apoptoserate wurde die Annahme bestätigt, dass durch eine Restimulation mit MHC-Klasse I-Molekülen die T-Zell-Antwort unterdrückt wird.

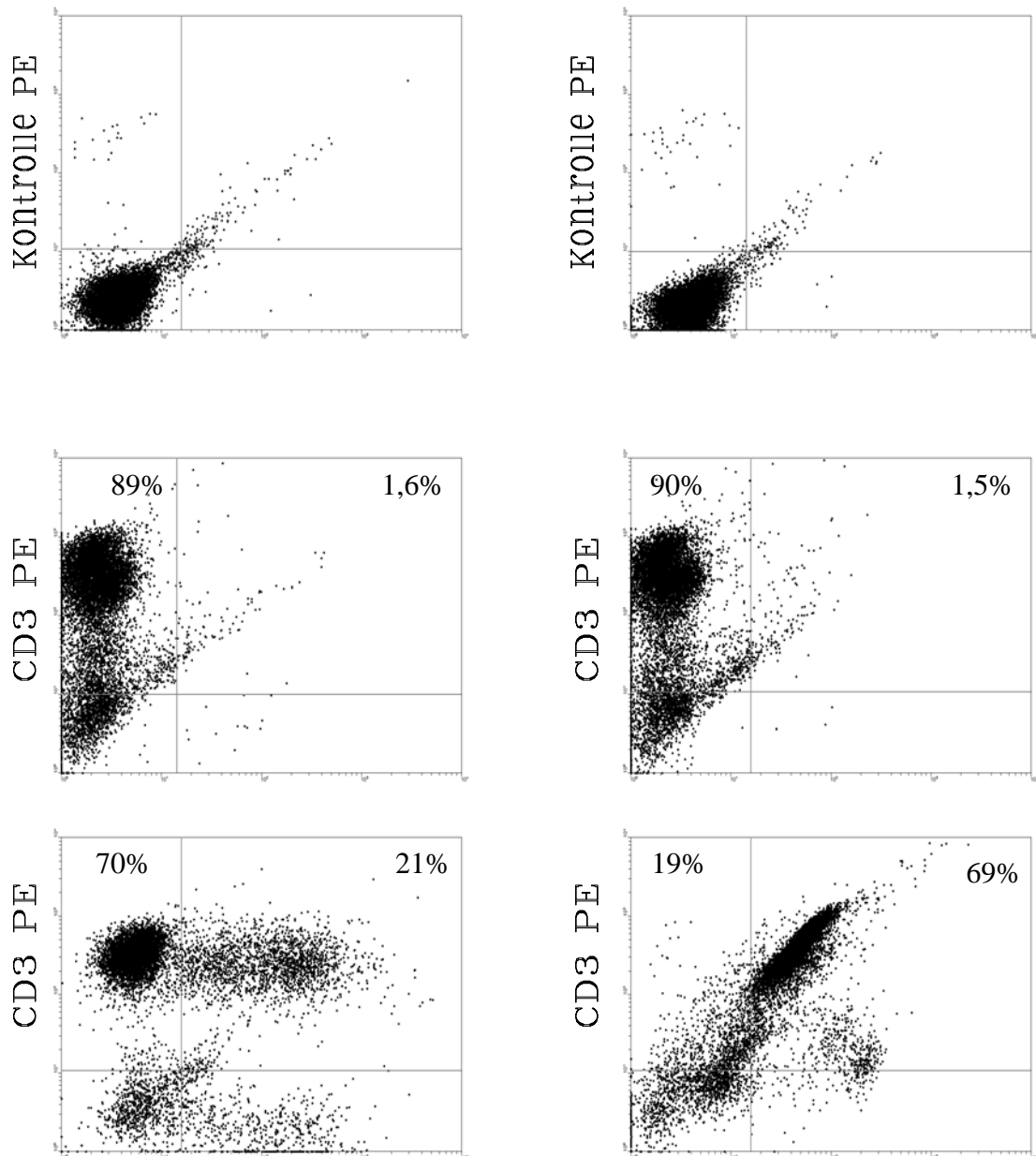


Abb. 18: Apoptosenachweis durch TUNEL-Test: Die T-Lymphozyten aus der MLTC zeigen in der CD3-Färbung durch Anti-CD-PE das gleiche Färbemuster wie die T-Lyphozyten aus der MLTC mit Restimulation durch MHC-Klasse I-Moleküle. 89% bzw. 90% der Zellen sind CD3-positiv. In den Ansätzen der Doppelfärbung (CD3-PE, Streptavidin-FITC) ist bei den T-Lymphozyten des Stimulationsversuchs zu erkennen, dass 21% der Zellen FITC-markiert sind. Diese Zellen sind apoptotisch. Im Restimulationsansatz hingegen sind 69% der Zellen der CD3-positiven Zellen FITC-markiert. Die Menge der apoptotischen Zellen ist hier wesentlich größer.

4. DISKUSSION

Trotz der enormen Fortschritte in der molekularen Pathologie maligner Tumoren in den letzten Jahren, stellt die chirurgische Entfernung eines Primärtumors die einzig kurative Option vieler Malignome. Obwohl mehrere andere therapeutische Maßnahmen in den letzten Jahren zur Behandlung dieser Tumoren etabliert wurden, zeigen sie in vielen Fällen keine kurative Wirkung. Seit einigen Jahren wurden daher Anstrengungen unternommen, Alternativkonzepte zu entwickeln. Eines dieser Konzepte ist die DC-basierte Immuntherapie. DC sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen und gelten aufgrund ihrer Fähigkeit, eine primäre Immunantwort zu induzieren, als mögliche klinisch einzusetzende Initiatoren einer T-Zell-Reaktion gegen maligne Tumoren (STEINMAN, 1991; GATZA und OKADA, 2002; BAI et al., 2003; MOTHY et al., 2002). Obwohl viele *In-vitro*-Studien und wenige klinische Pilotstudien auf die Effizienz solch DC-basierter Immuntherapien hinweisen (NESTLE et al., 1998; SCHOTT et al., 2002; YAO et al., 2002; GALEA-LAURI et al., 2002), sind die Ergebnisse größerer klinischer Studien mehr frustrierend als motivierend (KRAUSE et al., 2002; HÄNSSLE et al., 2002, zur Publikation eingereicht). Welche Mechanismen für die Misserfolge DC-basierter Immuntherapien verantwortlich sind, wurde jedoch bisher nicht genau charakterisiert. In der vorliegenden Studie wurde die Hypothese überprüft, ob Tumorzellen durch die Freisetzung löslicher, antigenbeladener MHC-Moleküle zur Apoptose von bereits sensibilisierten (geprimten) Anti-Tumor-T-Zellen und somit zum Scheitern DC-basierter Immuntherapien beitragen können.

4. 1. Gewinnung und Charakterisierung dendritischer Zellen

Zur Durchführung der vorliegenden Studie wurden zuerst DC aus Knochenmarksstammzellen der Maus unter Einwirkung von GM-CSF und IL-4 generiert. Danach wurden sie morphologisch und phänotypisch charakterisiert und auf DC-typische pro-inflammatorische und funktionelle Fähigkeiten überprüft, bevor sie zur Stimulation von Anti-Tumor-T-Zellen eingesetzt wurden.

Morphologie der dendritischen Zellen

DC besitzen eine typische Morphologie, die durch die Ausbildung von verzweigten Ausläufern gekennzeichnet ist. Diese Zellausläufer sind segelartig geformt und werden deshalb als „veils“ (Segel) bezeichnet (INABA et al., 1992). Die für die Experimente der vorliegenden Studie frisch aus dem Knochenmark von Mäusen isolierten hämatopoetischen Stammzellen waren rund und wiesen keine Zytoplasma-Ausläufer auf. Nach der Kultivierung mit GM-CSF und IL-4 entwickelten sie jedoch die für DC typischen Segeln. Dies war das erste Indiz dafür, dass es sich bei den generierten Zellen um DC handelt.

Phänotyp der dendritischen Zellen

DC werden in reife und unreife Subpopulationen eingeteilt. Die unreifen DC können zwar Antigene aufnehmen und prozessieren, sind jedoch nicht imstande, suffizient Antigene an T-Lymphozyten zu präsentieren. Expressieren DC funktionell aktive kostimulierende Moleküle wie CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) und Adhäsionsmoleküle wie CD11c, können sie eine antigenspezifische Immunität mit konsekutiver klonaler T-Zell-Expansion hervorrufen (STEINMAN et al., 1991; JANEWAY und TRAVERS, 1995). Damit solch eine klonale T-Zell-Proliferation zustande kommt, ist allerdings notwendig, dass ein fremdes (z.B. virales) Antigen über MHC-Moleküle an naive T-Zellen präsentiert wird. MHC-gekoppelte Antigensignal (auch Signal 1 genannt) muss jedoch durch ein kostimulierendes Signal (auch Signal 2 genannt) komplettiert werden. Das Signal 2 wird durch die Bindung von CD80 und CD86 auf dendritischen Zellen mit ihren Rezeptoren auf T-Lymphozyten ausgelöst (SCHWARTZ, 1993). Gleichzeitig muss aber der DC-T-Zell-Kontakt stabilisiert werden. Dieser Kontakt wird durch Adhäsionsmoleküle vermittelt (JANEWAY und TRAVERS, 1995). CD11c ist ein Adhäsionsmolekül, gehört zu den Integrinen, und sorgt als Zelloberflächenprotein für eine stabile Bindung von DC an Lymphozyten (JANEWAY und TRAVERS, 1995). Mittels Durchflusszytometrie konnten wir zeigen, dass die aus hämatopoetischen Knochenmarksstammzellen generierten Zellen 6 Tage nach dem Beginn der Kultivierung MHC-Klasse II-Moleküle, CD11c, CD80 und CD86 exprimieren und somit phänotypisch dendritischen Zellen entsprechen.

Pro-inflammatorische Aktivität der dendritischen Zellen

DC produzieren das Zytokin IL-12 (BANCHEREAU und STEINMANN, 1998). IL-12 wurde ursprünglich als Reifungs- bzw. Stimulationsfaktor für zytotoxische T-Lymphozyten bzw. natürliche Killerzellen identifiziert (KOBAYASHI et al., 1989; STERN et al., 1990; GUBLER et al., 1991). Es besteht aus den beiden Untereinheiten p40 und p35 und ist somit ein Heterodimer (GILLESSEN et al., 1995; LING et al., 1995). P35 besitzt einen ähnlichen Aufbau wie IL-6, hingegen ist p40 mit dem IL-6-Rezeptor strukturell verwandt (MURPHY et al., 2000). Die Untereinheit p40 kann mit p35 zum biologisch aktiven IL-12 (p70) verschmelzen (LING et al., 1995). In der vorliegenden Studie wurde festgestellt, dass die mit den Lysaten der Zelllinien RMA oder RMA-S stimulierten DC zweifach mehr als nicht-stimulierte dendritische Zellen IL-12 sezernierten. Dieser Befund war in Übereinstimmung mit den Literaturdaten (CELLA et al., 1996) und zeigte, dass die generierten DC pro-inflammatorische Zellen waren, die infolge des Kontaktes mit Tumorantigenen stimuliert wurden und somit vermehrt IL-12 freisetzen.

Funktionelle Aktivität der dendritischen Zellen

Reife DC sind mit ihrer antigenpräsentierenden Fähigkeit die potentesten Stimulatoren im allogenen System (ZHO und TEDDER, 1995). Durch Kultivierung von dendritischen Zellen und T-Lymphozyten zweier verschiedener Individuen (allogene MLC) kommt es zur Ausbildung klusterförmiger Zellzusammenschlüsse, in denen eine starke Proliferation naiver T-Lymphozyten stattfindet (STEINMAN und INABA, 1985). In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Effizienz dendritischer Zellen in einem allogenen MLC-System getestet. Die Daten zeigten eine zwanzigfach höhere T-Zell-Proliferation in der allogenen MLC als in den Kontrollansätzen. Daraus wurde geschlossen, dass die im allogenen MLC-Ansatz eingesetzten murinen dendritischen Zellen starke Stimulatoren einer MHC-restringierten Immunantwort sind.

Betrachtet man die Ergebnisse der morphologischen und phänotypischen Charakterisierung sowie die Ergebnisse der Charakterisierung pro-inflammatorischer und funktioneller Fähigkeiten in einem Kontext, so entsprachen die *in-vitro* aus Knochenmarksstammzellen generierten Zellen effizienten DC, die für eine T-Zell-Stimulation gegen Tumorantigene eingesetzt werden konnten.

4. 2. Gewinnung und Charakterisierung von T-Lymphozyten

Nach der Generierung und Charakterisierung von DC (siehe 4.1) wurden murine T-Zellen gewonnen und charakterisiert, bevor diese mithilfe von DC gegen Tumorantigene sensibilisiert (geprimt) wurden.

T-Lymphozyten spielen bei der adaptiven Immunantwort eine entscheidende Rolle. Sie werden in naive (nicht-Antigen-geprimte) und Antigen-geprimte T-Lymphozyten eingeteilt. Beide T-Zell-Typen tragen auf ihrer Oberfläche entweder das CD4- oder das CD8-Molekül. Werden die naiven T-Lymphozyten gegen ein bestimmtes Antigen sensibilisiert (geprimt), differenzieren sie sich zu CD4⁺-T-Helfer-1-Zellen (Th1) oder CD4⁺-T-Helfer-2-Zellen (Th2) oder CD8⁺-zytotoxischen T-Killerzellen. Jede dieser Subpopulationen stellt eine Spezialisierung in der Bekämpfung einer bestimmten Gruppe von Krankheitserregern dar. Th1- und Th2-Lymphozyten erkennen Antigenfragmente, die über MHC-Klasse II-Molekülen präsentiert werden und häufig von Antigenen stammen, die nach Aufnahme in die Wirtszelle in intrazellulären Vesikeln abgebaut werden, ohne in das Zytosol einzudringen. Nach ihrer Aktivierung stimulieren die Th1-Zellen Makrophagen und/oder CD8⁺-zytotoxische T-Killerzelle und die Th2-Zellen B-Lymphozyten. Hingegen erkennen T-Killerzellen Peptidfragmente (z.B. virale Antigene), die im Zusammenhang mit MHC-Klasse I-Molekülen auf der Oberfläche der Targetzellen (z.B. Virus-beladene Tumorzellen) präsentiert werden und sind in der Lage, diese gezielt durch apoptotische Mechanismen abzutöten (JANEWAY und TRAVERS, 1995).

Isolierte Milzzellen sind entweder CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen

In dieser Arbeit stammten die Lymphozyten aus der Milz von C57BL/6-Mäusen. Nach der Isolierung der Milzzellen konnten die T-Lymphozyten über magnetgekoppelte Antikörper durch eine negative Selektion purifiziert werden. Die anschließende Durchflusszytometrie zeigte, dass es sich bei den isolierten um eine Mischpopulation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen handelt. Die Korezeptoren CD4 und CD8 gehören zu dem T-Zell-Komplex und unterstützen die T-Zellen bei der Erkennung der Targetzellen. Wenn der T-Zell-Rezeptor einen Peptid-MHC-Komplex auf der Oberfläche einer Targetzelle erkennt, bindet auch der Korezeptor an den MHC-Teil des Peptid-MHC-Komplex und forciert dadurch die T-Zellaktivierung. CD8 bindet an MHC-Klasse I-Moleküle und CD4 an MHC-Klasse II-

Moleküle. Etwa 61% der isolierten T-Zellen exprimierten den CD4-Korezeptor und etwa 18% den CD8-Korezeptor.

Frisch isolierte nicht-geprimte Milzzellen sind naive T-Lymphozyten

In dem nächsten Schritt untersuchten wir, ob die nicht-geprimten, frisch isolierten T-Lymphozyten in der Lage sind, Tumorzellen zu eliminieren. Als Apoptose-Nachweismethode wurde die sog. TUNEL-Methode angewandt. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Apoptoserate der RMA-Zellen infolge einer Kokultivierung mit Milzzellen nicht signifikant anstieg. Dieser Befund wies darauf hin, dass die frisch isolierten Milzzellen naiven T-Zellen entsprachen (WALZER et al., 2000).

4. 3. *In-vitro*-Immunisierung von gegen Tumorantigene der Lymphomzelllinie RMA

Nach der Gewinnung und Charakterisierung von DC bzw. T-Zellen wurden die beiden Subpopulationen in einer gemischten allogenen oder autologen Leukozytenkultur in Gegenwart von Tumorantigenen miteinander inkubiert (MLTC). In MLTC fungierten die aus Knochenmarksstammzellen der C57BL/6- oder der Balb/c-Mäuse generierten DC als antigenpräsentierende Zellen, die aus der Milz von C57BL/6-Mäusen gewonnenen T-Zellen als Effektorzellen und Lysate aus den Rauscher-Virus-induzierten Lymphomzelllinien RMA oder RMA-S als Antigene.

Geprimte T-Lymphozyten proliferieren

Da ein wichtiges Indiz für eine erfolgreiche Immunisierung eine massive Proliferation stimulierter T-Lymphozyten ist (GUDMUNSDOTTIR, et al., 1999), überprüften wir zunächst, ob sich die mit den antigenbeladenen DCs ko-kultivierten T-Lymphozyten vermehrten. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl in allogenen als auch in autologen MLTCs eine starke T-Zell-Proliferation stattfindet. Interessanterweise war die Proliferationsrate der T-Lymphozyten unabhängig davon, ob T-Lymphozyten gegen RMA- oder RMA-S-Antigene geprimt worden waren. Dieser Befund beruht darauf, dass in Lysaten von RMA- und RMA-S-Zellen gleiche Tumor (Virus)-assoziierte Antigene vorkommen (VAN HAL et al., 2000). Von Bedeutung war aber auch der Befund, dass die Proliferationsrate der allogenen T-Lymphozyten deutlich höher war als die der autologen T-Lymphozyten. Diesbezüglich sind

zwei Möglichkeiten zu diskutieren: I) Die T-Lymphozyten der C57BL/6-Mäuse zeigten eine stärkere T-Zell-Reaktion, weil ihr TCR von alloenen MHC-Molekülen der Balb/c-Mäuse ligiert wurden, II) Da die Tumorzelllinien aus C57BL/6-Mäusen stammten, konnten ihre Antigene effektiver von alloenen MHC-Molekülen der Balb/c-Mäuse präsentiert werden als von autologen C57BL/6-Mäusen (ROTZSCHKE et al., 1991; OBST et al., 2000).

Gepriete T-Zellen sind Th1-differenzierte Zellen

Da bekannt ist, dass infolge einer suffizienten Immunisierung gegen Tumor-Antigene, die geprieten Zellen eine Th1-Differenzierung aufweisen (XIANG et al., 1999; POSPISILOVA et al., 2002), untersuchten wir im nächsten Schritt, ob es sich bei den in MLTCs proliferierenden T-Lymphozyten um Th1-differenzierte Zellen handelt. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass eine signifikante Steigerung der IFN- γ -Produktion das wichtigste Indiz für eine Th1-Differenzierung ist. Zum Beispiel wiesen die SCHNURR und Kollegen nach, dass die *in-vitro* mit Pankreas-Tumorzelllysaten gepulsten humanen DC zur Induktion einer Tumor-spezifischen T-Zellantwort führen konnten, die mit einer starken IFN- γ -Produktion geprieter T-Lymphozyten assoziiert war (SCHNURR et al., 2001). Auch im Mausmodell ist eine Analogie zum humanen System zu beobachten. So fand die Arbeitsgruppe ASAVAROENGCHAI in mit MT-901-gepulsten DC immunisierten Balb/c-Mäusen Th1-differenzierte Anti-Tumor-T-Lymphozyten mit einer starken IFN- γ -Produktion (ASAVAROENGCHAI, 2001). IFN- γ ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das im Rahmen der erworbenen Immunität von aktivierten, Th1-differenzierten T-Lymphozyten produziert und erst nach Bindung von IL-12 an seinen Rezeptor (IL-12R) auf der Oberfläche von T-Lymphozyten sezerniert werden kann (MAGRAM et al., 1996).

Tatsächlich zeigten ELISA-Untersuchungen, dass im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant vermehrte IFN- γ -Sekretion in den mit den Tumorzelllysaten angesetzten MLTCs stattfindet. Erwartungsgemäß gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den MLTCs, die mit RMA- oder RMA-S-Zelllysaten angesetzt worden waren.

Gepriete T-Zellen sind zytotoxisch gegen Tumorzellen

In dem nächsten Schritt untersuchten wir, ob die geprieten T-Lymphozyten in der Lage sind, Tumorzellen zu eliminieren, weil –wie bereits von VAN HAL und Kollegen gezeigt (2000) – im Zuge einer erfolgreichen Immunisierung Anti-RMA-T-Lymphozyten generiert werden, die

in RMA-Zellen Apoptose induzieren können (VAN HAL et al., 2000). Als Apoptose-Nachweismethode wurde die sog. TUNEL-Methode angewandt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Apoptoserate der RMA-Zellen von 19% auf 75% bzw. auf 49% anstieg, wenn diese mit geprimten T-Lymphozyten aus allogenen bzw. autologen MLTCs stammten. Diese Daten entsprechen den Befunden von VAN HAL und Kollegen, die mittels einer anderen Zytotoxizitätsnachweismethode (^{51}Cr release assay) ermittelt worden waren und zeigten, dass die geprimten T-Lymphozyten je nach Immunisierungsmodus zur Apoptose von bis zu 55% der RMA-Zellen führen können (VAN HAL et al., 2000). Daraus wurde geschlossen, dass die in MLTCs geprimten T-Lymphozyten infolge der Immunisierung zytotoxische Fähigkeiten erworben hatten, die gegen RMA-Zellen gerichtet waren. Aufgrund der höheren zytotoxischen Aktivität der allogenen geprimten T-Lymphozyten gegen RMA-Zellen vertreten wir jedoch die Meinung, dass die Tumor (Virus)-assoziierten Antigene in einer allogenen MLTC effektiver an naive T-Lymphozyten präsentiert werden können als in einer autologen MLTC (ROTZSCHKE et al., 1991; OBST et al., 2000).

Geprimte T-Zellen eliminieren die Tumorzellen erst nach Erkennung der Tumor-assoziierten Antigene, die über MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert werden

Da sowohl die RMA-Zellen als auch die T-Lymphozyten den gleichen Haplotyp (H-2D^b) aufwiesen, vermuteten wir, dass die zytotoxische Aktivität der geprimten T-Lymphozyten nicht gegen MHC-Moleküle der Tumorzellen, sondern möglicherweise gegen Tumor (Virus)-assoziierte Antigene der RMA-Zellen gerichtet war. Damit diese Hypothese belegt werden kann, wurde die zytotoxische Wirkung der geprimten T-Lymphozyten auf die Apoptose der RMA-S-Zellen untersucht. Die angewandte TUNEL-Methode zeigte, dass die Apoptoserate von RMA-S-Zellen infolge der Kokultivierung mit den geprimten T-Lymphozyten nur marginal anstieg. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass RMA-S-Zellen aufgrund eines TAP-Defektes nicht in der Lage sind, MHC-Klasse I-Moleküle und somit Antigene (z.B. Antigene des Rauscher-Viruses) auf ihrer Oberfläche zu präsentieren (VAN HAL et al., 2000), ist davon auszugehen, dass, die geprimten T-Lymphozyten nur dann zur Tumorzellapoptose führen, wenn sie die Tumor (Virus)-assoziierten Antigene im Zusammenhang mit MHC-Klasse I-Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen erkennen können.

4. 4. RMA-Zellen führen durch Sekretion löslicher MHC Klasse I-Moleküle zur T-Zell-Apoptose

Nachdem –wie unter 4.3 beschrieben- festgestellt wurde, dass naive T-Zellen infolge der Immunisierung gegen Tumorzellantigene die Fähigkeit erwerben, diese zu erkennen und durch Apoptose zu eliminieren, wurde die Hypothese überprüft, ob Tumorzellen durch Sekretion löslicher MHC-Klasse I-Moleküle zur T-Zell-Apoptose im Sinne eines „tumour counter-attack“ führen können.

RMA-Zellen setzen lösliche MHC-Klasse I-Moleküle frei

Zuerst überprüften wir, ob RMA-Zellen lösliche MHC-Klasse I-Moleküle sezernieren. Dafür analysierten wir die Kulturüberstände der Tumorzelllinie RMA. Mittels Western-blot konnte gezeigt werden, dass die RMA-Zellen MHC-Klasse-I-Moleküle nicht nur exprimieren, sondern auch freisetzen.

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass bei unterschiedlichen entzündlichen Reaktionen und Tumorleiden MHC-Klasse I-Moleküle (soluble MHC = sMHC) vermehrt freigesetzt werden. Welche immunologische Rolle das sMHC spielt ist jedoch nicht genau bekannt (BARNEA et al., 2002). Wir spekulierten, dass antigenbeladene sMHC durch Bindung an den TCR-Komplex zur Restimulation der bereits geprimten Anti-Tumor-T-Zellen und somit zum Aktivierungs-induzierten T-Zell-Tod (activation-induced cell death = AICD) führt (POHL et al., 1995; ZHANG et al., 1996) und vermuteten, dass AICD auf DC-basierte Immuntherapien limitierend wirken kann (SORURI et al., 2002, zur Publikation eingereicht). Um diese Hypothese zu belegen, wurden die aus MLTCs gewonnenen Anti-RMA-T-Zellen mit sMHC aus Kulturüberständen der RMA-Zellen ko-inkubiert.

Autologe sMHC-I-Moleküle aus RMA-Zellen führen zur Apoptose von Anti-RMA-T-Zellen

Die sMHC I-Moleküle aus Kulturüberständen der RMA-Zellen wurden nach der Quantifizierung für 48 Stunden mit den aus MLTCs gewonnenen Anti-RMA-T-Zellen (siehe 4.3) inkubiert. Die anschließende [3H]-Thymidin-Untersuchung zeigte, dass infolge der Applikation der löslichen MHC I-Moleküle die Proliferationsrate von Anti-RMA-T-Zellen um 75% abnahm. Die parallel durchgeführte TUNEL-Methode wies nach, dass dieses

Phänomen mit einer Erhöhung der Apoptoserate der geprimten Anti-RMA-T-Zellen assoziiert war. Interessanterweise war die Apoptoserate der Anti-RMA-T-Zellen konzentrationsabhängig. So stellten wir fest, dass je höher die sMHC-Konzentration, desto höher die Apoptoserate der T-Zellen. Zum Beispiel konnten wir feststellen, dass nach der Applikation von 100 µg/ml sMHC etwa 75% der Anti-RMA-T-Zellen apoptotisch wurden. Zum Ausschluss der Möglichkeit, dass ein anderer Faktor außer sMHC für die Apoptose der Anti-RMA-T-Zellen verantwortlich ist, wurden die T-Zellen mit dem Kulturüberstand von RMA-S-Zellen inkubiert. Erwartungsgemäß wurde kein signifikanter Anstieg der T-Zell-Apoptose beobachtet. Diese Daten legen nahe, dass die löslichen MHC-I-Moleküle aus RMA-Zellen zur Apoptose von Anti-RMA-T-Zellen führen können. Sie stellen gleichzeitig aber auch die Frage, ob eine Reaktivierung des TCR der Anti-RMA-T-Zellen durch den sMHC-Antigenkomplex für die Apoptose dieser Zellen im Sinne eines AICD verantwortlich ist?

Autologe sMHC-I-Moleküle führen zur Apoptose aktivierter T-Zellen

Zur Überprüfung der Hypothese, ob eine spezifische (antigenabhängige) Bindung zwischen dem TCR der Anti-RMA-T-Zellen und den aus RMA-Zellen freigesetzten sMHC-Klasse I-Molekülen stattfindet, wurden aktivierte T-Lymphozyten aus allogenen MLCs mit sMHC Klasse I-Molekülen aus RMA-Zellen inkubiert. Obwohl in diesem Versuchsansatz sowohl die T-Lymphozyten als auch die sMHC Klasse I-Moleküle aus C57BL/6-Mäusen stammten und daher den gleichen Haplotyp besaßen, wies die im Anschluss durchgeführte TUNEL-Methode nach, dass die aktivierten aus MLCs stammten T-Zellen genauso Apoptose-empfindlich waren wie die aktivierten aus MLTCs stammten Anti-RMA-T-Zellen. Interessanterweise zeigten nicht-aktivierte (naive) T-Zellen aus der Milz der C57BL/6-Mäusen keine Suszeptibilität gegenüber gegenüber sMHC-I-Molekülen. Daraus ergibt sich, dass die sMHC-induzierte Apoptose von T-Zellen zwar eine Aktivierung der T-Zellen voraussetzt, wird jedoch nicht durch eine Reaktivierung des TCR ausgelöst. Mit anderen Worten entspricht die sMHC-induzierte Apoptose aktivierter T-Zellen nicht den Kriterien eines AICD.

Autologe sMHC-I-Moleküle führen möglicherweise durch die Bindung an andere Rezeptoren außer TCR zur Apoptose aktivierter T-Zellen

Die Schlussfolgerung, dass die sMHC-induzierte Apoptose TCR unabhängig ist, wirft die Frage auf, welche Alternativmechanismen für diese Form der Apoptose aktivierter T-

Lymphozyten infrage kommt. Zur Zeit ist es schwer diese Frage konkret zu beantworten. Tatsache ist jedoch, dass aktivierte –aber nicht naive– T-Lymphozyten Rezeptoren exprimieren können, die in der Lage sind, die TCR-vermittelte Aktivität der T-Lymphozyten zu kompensieren. Diese Rezeptoren werden als „killer inhibitory receptors“ (KIRs) bezeichnet und bestehen beim Menschen aus 13 verschiedenen Proteingruppen. „Killer inhibitory receptors“ wurden ursprünglich in natürlichen Killerzellen entdeckt (Mingari et al 1998, Vilches und Parham 2002). Die neueren Daten zeigen jedoch, dass aktivierte humane T-Lymphozyten ebenfalls KIRs exprimieren und die Stimulation vieler KIRs zur Inaktivierung der betroffenen T-Lymphozyten führt (Mingari et al 1998, Vilches und Parham 2002). Mäuse verfügen jedoch nicht über KIRs, sondern zwei phylogenetisch ältere inhibierende MHC-Klasse-I-Rezeptoren, nämlich CD94:NKG2A-Rezeptor und Ly94. Ob diese oder andere Rezeptoren für die sMHC-induzierte Apoptose aktivierter muriner T-Zellen verantwortlich sind, bleibt jedoch noch offen.

5. Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen und gelten aufgrund ihrer Fähigkeit, eine primäre, T-Zell-vermittelte Immunantwort zu induzieren, als mögliche Kandidaten zur Induktion einer Immuntherapie. Obwohl *In-vitro*-Studien, tierexperimentelle *In-vivo*-Studien und einige klinische Pilotstudien auf die Effizienz der DC-basierten Immuntherapie hinweisen, sind die Ergebnisse größerer klinischen Studien mehr frustrierend als motivierend. Welche Mechanismen für die Misserfolge der DC-basierten Immuntherapie verantwortlich sind, wurden jedoch bisher nicht beschrieben. In der vorliegenden Studie wurde die Hypothese überprüft, ob Tumorzellen durch die Freisetzung löslicher, antigenbeladener MHC-Klasse-I-Moleküle zur Apoptose von bereits sensibilisierten Anti-Tumor-T-Zellen und somit zum Scheitern DC-basierter Immuntherapien beitragen können.

Zuerst wurden antigenpräsentierende Zellen aus hämatopoetischen Knochenmarkszellen der C57BL/6- (H-2D^b) oder Balb/c-Mäuse (H-2D^d) hergestellt. Die Morphologie, der Phänotyp, die pro-inflammatorische und die funktionelle Aktivität dieser Zellen zeigten, dass es sich bei den generierten antigenpräsentierenden Zellen um DC handelte. *In-vitro* wurden mit Hilfe dieser DC naive T-Lymphozyten der Maus (H-2D^b) gegen tumorassoziierte Antigene der Rauscher-Virus-induzierten Lymphomzelllinien RMA (H-2D^b) sensibilisiert. Die Charakterisierung der sensibilisierten T-Lymphozyten zeigte, dass diese aktivierte, Th1-differenzierte zytotoxische T-Zellen repräsentierten, die in Lage waren, die RMA-Zellen durch Apoptose zu eliminieren. Es wurde nachgewiesen, dass die RMA-Zellen lösliche MHC-Klasse-I-Moleküle (sMHC) sezernierten, die dosisabhängig zur Apoptose der sensibilisierten Anti-RMA-T-Zellen führten. Somit ließ sich die Hypothese bestätigen, dass Tumorzellen durch die Freisetzung von sMHC zur Apoptose von bereits sensibilisierten Anti-Tumor-T-Zellen beitragen können. Die Apoptose-Induktion in Anti-RMA-T-Zellen war jedoch Antigen- und T-Zell-Rezeptor (TCR)-unabhängig. Es wird vermutet, dass sMHC-Moleküle durch eine spezifische, antigenunabhängige Bindung an andere Rezeptoren außer TCR (z.B. CD94:NKG2A-Rezeptor) zur T-Zell-Apoptose führen können.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ASAVAROENGCHAI W., KOTERA Y., MULE J. J., 2001: Tumor lysate-pulsed dendritic cells can elicit an effective antitumor immune response during early lymphoid recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 931-936

ASHERSON G. L., COLIZZI V., 1989: Antigenpresentation; in: *Human monocytes*; Academic Press, London. 313-326

AUSTYN J. M., 1993: Dendritic cells in transplantation; in: *Dendritic cells in fundamental and clinical immunology*; hrsg. Kamperdijk EWA, Nieuwenhuis P, Hoefsmit ECM; Plenum, New York. 489-494

BAI L., BECKHOVE P., FEUERER M., UMANSKY V., CHOI C., SOLOMAYER F. S., DIEHL I. J., SCHIRRMACHER V., 2003: Cognate interaction between memory T cells and tumor antigen-presenting dendritic cells from bone marrow of breast cancer patients: Bidirectional cell stimulation, survival and antitumor activity in vivo. *Int. J. Cancer* 103: 73-83

BANCHEREAU J., STEINMAN R. M., 1998: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252

BARNEA E., BEER I., PATOKA R., ZIV T., KESSLER O., TZEHOVAL E., EISENBACH L., ZAVAZAVA N., ADAMON A., 2002: Analysis of endogenous peptides bound by soluble MHC class I molecules: a novel approach for identifying tumor-specific antigens. *Eur. J. Immunol.* 32: 213-222

BIRKE C., PETER H. H., LANGENBERG U., MÜLLER-HERMES W. J. P., PETERS J. H., HEITMANN J., LEIBOLD W., DALÜGGE H., KRAPF E., KIRCHNER H., 1981: Mycoplasma contamination in human tumor cell lines: effect on interferon induction and susceptibility to natural killing. *J. Immunol.* 127: 94-98

BISHOP G., SUN J., DE CRUZ D., ROKAHR K., SEDGWICK J., SHEIL A., GALLAGHER N., MC CAUGHAN G., 1996: Tolerance to rat liver allografts III. Donor cell migration and tolerance-associated cytokine production in peripheral lymphoid tissues. *J. Immunol.* 156: 4925-4931

BISHOP G., SUN J., SHEIL A., MC CAUGHAN G., 1997: High-dose/activation-associated tolerance. *Transplantation (Baltimore)* 64: 1377-1382

BODEY B., BODEY B. JR., SIEGEL S. E., LUCK J. V., KAISER H. E., 1996: Immunophenotypic characterisation of human primary and metastatic melanoma infiltrating leukocytes. *Anticancer Res.* 16: 3439-3446

CELLA M., SCHEIDEGGER D., PALMER-LEHMANN K., LANE P., LANZAVECCHIA A., ALBER G., 1996: Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 184: 747-752

COHEN J. J., 1993: Apoptosis. *Immunol. Today* 14: 126-130

DALL P., 1999: Genetic techniques to overcome antitumor anergy. *Zentralb. Gynokol.* 121: 198-201

DOUGHERTY G. L., MC BRIDE W. H., 1989: Monocyte differentiation *in vitro*; in: human monocytes. Academic Press, London. 313-326

DUKE R. C., OJCIUS D. M., YOUNG J. D. E., 1997: Die Apoptose-Regeln und Fehler beim Zellselbstmord. *Spektrum der Wissenschaft.* 2: 26-35

ELLNER J. J., LIPSLEY P. E., ROSENTHAL A. S., 1977: Antigen handling by guinea pig macrophages: Further evidence for the sequestration of antigen relevant for activation of primed T lymphocytes. *J. Immunol.* 118: 2053-2057

FIELDS R. C., SHIMIZU K., MULE J. J., 1998: Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses *in vitro* und *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 9482-9487

FREEDMAN A. S., FREEMAN G. L., HOROWITZ J. C., DALEY J., NADLER L. M., 1987: B7, a B cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells. J. Immunol. 139: 3260-3267

FREEMAN G. L., FREEDMAN A. S., SEGIL J. M., LEE G, WHITEMAN J. F., NADLER L. M., 1989: B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. J. Immunol. 143: 2714-2722

GALEA-LAURI J., DARLING D., MUFTI G., HARRISON P., FARZANEH F., 2002: Eliciting cytotoxic T lymphocytes against acute myeloid leukemia-derived antigens: evaluation of dendritic cell hybrids and other antigen-loading strategies for dendritic cell-based vaccination. Cancer Immunol. Immunother. 51: 299-310

GATZA E., OKADA C. Y., 2002: Tumor cell lysate-pulsed dendritic cells are more effective than TCR Id-Protein vaccines for active Immunotherapy of T cell lymphoma. J. Immunol. 169: 5227-5235

GILLESSEN S., CARVAJAL D., LING P., PODLASKI F. J., STREMLLO D. L., FAMILLETTI P. C., GUBLER U., PRESKY D. H., STERN A. S., GATELY M. K., 1995: Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. Eur. J. Immunol. 25: 200-206

GIMMI C. D., FREEMAN G. J., GRIBBEN J. G., SUGITA K., FREEDMAN A. S., MORIMOTO C., NADLER L. M., 1991: B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 6575-6579

GIMMI C. D., FREEMAN G. J , GRIEBBEN J. G., GRAY G. NADLER L. M., 1993: Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in thte absence of B7 costimulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 6586-6590

GOLDBERG A. L., ROCK K. L., 1992: Proteolysis, proteosomes and antigen presentation. *Nature* 357: 875-879

GUBLER U., CHUA A. O., SCHOENENHAUT D. S., DWYER C. M., MC COMAS W., MOTYKA R., NABAVI N., WOLITZKY A. G., QUINN P. M., FAMILLETTI P. C., 1991: Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 4143-4147

GUDMUNSDOTTIR H., WELLS A. D., TURKA L. A., 1999: Dynamic and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the signal-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J. Immunol.* 162: 5212-5213

GUINAN E. C., GRIEBBEN J. G., BOUSSIOTIS V. A., FREEMANN G. J., NADLER L. M., 1994: Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* 84: 3261-3282

HAENSSELE H. A., EMMERT S., ZUTT M., KRETSCHMER L., SCHMIDBERGER H., KRAUSE S. W. ANDREESEN, SORURI A., 2002: Hybrid cell vaccination in metastatic melanoma: Clinical and immunologic results of a phase I/II study. in press

HAUSMANN R., ZAVAZAVA N., STEINMANN J., MUELER-RUCHHOLTZ W., 1993: Interaction of papain-digested HLA class I molecules with human alloreactive cytotoxic T lymphocytes (CTL). *Clin. Exp. Immunol.* 91: 183-188

HILKENS C. M., KALINSKI P., DE BOER M., KAPSENBERG M. L., 1997: Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naïve T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* 84: 1920-1926

INABA K., STEINMAN R. M., PACK M. W., AYA H., INAB M., SUDO T., WOLPE S., SCHULER G., 1992: Identification of proliferation dendritic cells precursors in mouse blood. *J. Exp. Med.* 175: 1157-1167

JANEWAY C. A., TRAVERS P., 1995: *Immunologie.* 1. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

JENKINS M. K., 1992: The role of cell division in the induction of clonal anergy. *Immunol. Today* 13: 69-73

KABELITZ D., OBERG H. H., POHL T., PECHHOLD K., 1994: Antigen-induced death of mature T lymphocytes: analysis by flow cytometry. *Immunol. Rev.* 142: 157 Review

KIERTSCHER S. M., ROTH M. D., 1996: Human CD14⁺ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J. Leukoc. Biol.* 59: 208-218

KING P. D., KATZ D. R., 1990: Mechanism of dendritic cell function. *Immunol. Today.* 11: 206-211

KLEIN T., LEVIN I., NISKA A., KOREN R., GAL R., SCHACHTER J., KFIR B., NARINSKI R., WARCHAIZER S., KLEIN B., 1996: Correlation between tumor and serum beta 2m expression in patient with breast cancer. *Eur. J. Immunogenet.* 23: 417-423

KNIGHT S. C., STAGGA A. J., 1993: Antigen-presenting cell types. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 374-382

KOBAYASHI M., FRITZ L., RYAN M., HEWICK R. M., CLARK S. C., CHAN S., LOUDON R., SHERMAN F., PERUSSIA B., TRINCHIERI G., 1989: Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170: 827-845

KRAFT W., DÜRR U., 1995: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.* 3. Auflage, Stuttgart: Schattauer

KRAUSE S. W., NEUMANN C., SORURI A., MAYER S., PETERS J. H., ANDRESSEN R., 2002: The treatment of patients with disseminated malignant melanoma by vaccination with autologous cell hybrids of tumor cells and dendritic cells. *J. Immunother.* 25: 421-428

KUIPER H. M., DE JONG R., BROUWER M., LAMMERS K., WIJDENES J., VAN LIER R. A. W., 1994: Influence of CD28 co-stimulation on cytokine production is mainly regulated via interleukin-2. *Immunol.* 83: 38-44

LAEMMLI U. K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

LANG K., 1985: Mycoplasmen und Zellkulturen. *Biologie in unserer Zeit.* 15: 52-61

LANZAVECCHIA A., 1990: Receptor mediated uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 773-793

LANZAVECCHIA A., REID P. A., WATTS C., 1992: Irreversible association of peptides with class II MHC molecules in living cells. *Nature* 357: 249-252

LANZAVECCHIA A., 1996: Mechanism of antigen uptake for presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 348-354

LIBLAU R., TISCH R., SHOKAT K., YANG X., DUMONT N., GOODNOW C., MC DEVIT H., 1996: Intravenous injection of soluble antigen induces thymic and peripheral T-cell apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 3031-3036

LING P., GATELY M. K., GUBLER U., STERN A. S., LIN P., HOLLFELDER K., S. U. C., PAN Y. C. E., HAKIMI J., 1995: Human IL12p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J. Immunol.* 154: 116-127

LINSLEY P. S., CLARK E. A., LEDBETTER J. A., 1990: T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with the activation antigen B7/BB-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 5031-5035

LINSLEY P. S., GREENE J. L., TAN P., BRADSHAW J., LEDBETTER J. A., ANASETTI C., DAMLE N. K., 1992: Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 176: 1595-1604

MAGRAM J, CONNAUGHTON S. E., WARRIER R. R., CARVAJAL D. M., WU C. Y., FERRANTE J, STEWART C, SARMIENTO U, FAHERTY D. A., GATELY M. K., 1996: IL-12-deficient mice are defectiv in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4: 471-481

MC GARRITY G. J., VANAMAN V., SARAMA J., 1985: Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures: a review. *In vitro.* 20: 1-18

MINGARI M. C., PONTE M., BERTONE S., SCHIAVETTI F., VITALE C., BELLOMO R., MORETTA A., MORETTA L., 1998: HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD28 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 95: 1172-1177

MONDINO A., JENKINS M. K., 1994: Surface proteins involved in T cell costimulation. *J. Leukoc. Biol.* 55: 805-815

MOTHY M., ISNARDON D., BLAISE D., MOZZICONACCI M. J., LAFAGE-POCHITALOFF M., BRIERE F., GASTAUT J. A., OLIVE D., GAUGLER B., 2002: Identification of precursors of leukemic dendritic cells differentiated from patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 16: 2267-2274

MURPHY F. J., HAYES M. P., BURD P. R., 2000: Disperate intracellular processing of IL12 preprotein subunits: A typical processing of the p35 signal peptide. *J. Immunol.* 164: 839-847

MUSSON R. A., 1983: Human serum induces maturation of human monocytes *in vitro.* *Am. J. Pathol.* 111: 331-340

NAITO M., 1993: Macrophage heterogeneity in developement and differentiation. *Arch. Histol. Cytol.* 56: 331-351

NEEFJES J. J., MOMBURG F., 1993: Cell biology of antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 27-34

NESTLE F. O., ALIJAGIC S., GILLET M., SUN Y., GRABBE S., DUMMER R., BURG G., SCHADENDORF D., 1998: Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4: 328-332

OBST R., NETUSCHIL N., KLOPFER K., STEVANOVIC S., RAMMENSEE H. G., 2000: The role of peptides in T cell alloreactivity is determined by self-major histocompatibility complex molecules. *J. Exp. Med.* 191: 805-812

POHL T., PECHHOLD K., OBERG H., WILBERT O., KABELITZ D., 1995: Antigen-induced death of alloreactive human T-lymphocytes occurs in the absence of low molecular weight DNA fragmentation. *Cell. Immunol.* 166: 187-195

POSPISILOVA D., BROVIKOV J., POLOUCKOVA A., SPISEK R., SEDIVA A., HRUSAK O., STARY J., BARTUNKOVA J., 2002: Generation of functional dendritic cells for potential use in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol. Immunother.* 51: 72-78

RATCLIFFE N A., ROWLEY A. F., 1981: Invertebrate blood cells. Academic press, London

ROCHE P. A., CRESSWELL P., 1990: Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345: 615-618

ROITT I. M., 1993: Leitfaden der Immunologie. 4. Auflage; Blackwell Wissenschaft, Berlin

RONCHETTI A., ROVERE P., LEZZI G., GALATI G., HELATI S., POTTI M. P., GARANCINI M. P., MANFREDI A. A., RUGARLI C., BELLONE M., 1999: Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: Role of antigen-load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J. Immunol.* 163: 130-136

ROSE N. R., D. E., MACARIO E. C., FOLDS J. D., LANE H. C., NAKAMURA R. M., 1997: Manual of Clinical Laboratory Immunology. 5. Auflage, Washington DC: American Society for Microbiology

ROTZSCHKE O., FALK K., FATH S., RAMMENSEE H. G., 1991: On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity. J. Exp. Med. 174: 1059-1071

RUSSEL W. C., NEWMAN C., WILLIAMSON D. H., 1975: A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. Nature 253: 461-462

SALLUSTO F., LANZAVECCHIA A., 1994: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J. Exp. Med. 179: 1109-1118

SALLUSTO F., CELLA M., DANIELI C., LANZAVECCHIA A., 1995: Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartement: Downregulation by cytokines and bacterial products. J. Exp. Med. 182: 389-400

SCHNECK J., MALOY W., COLIGAN J., MARGULIES D., 1989: Inhibition of an allospecific T cell hybridoma by soluble class I proteins and peptides: estimation of the affinity of a T cell receptor for MHC. Cell 54: 47-55

SCHNURR M., GALAMBOS P., SCHOLZ C., THEN F., DAUER M., ENDRES S. EIGLER A., 2001: Tumor cell lysates-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an *in vitro* model for the assesment of tumor vaccines. Cancer Research 61: 6445-6450

SCHOTT M., FELDKAMP J., KLUCKEN M., KOBBE G., SCHERBAUM W. A., SEISSLER J., 2002: Calcitonin-specific antitumor immunity in medullary thyroid carcinoma following dendritic cell vaccination. Cancer Immunol. Immunother. 51: 663-668

SCHWARTZ R. H., 1993: T cell anergy. Sci . Am. 269: 62-63, 66-67

SCHWARZ L. M., OSBORNE B. A., 1993: Programmed cell death, apoptosis and killer genes. Immunol. Today 14: 582-590

SHEPHERD J. C., SCHUMACHER T. N. M., ASHTON-RICKARDT P. G., IMAEDA S., PLOEGH H. L., JANEWAY C. A. J. R., TONEWAGA S., 1993: TAP-1-dependant peptide translocation *in vitro* is ATP-dependant and peptide-selective. *Cell* 74: 577-584

SORURI A., FAYYAZI A., GIESELER R., SCHLOTT T., RUNGER T. M., NEUMANN C., PETERS J. H., 1998: specific autologous anti-melanoma T cell response *in vitro* using monocyte-derived dendritic cells. *Immunobiol.* 198: 527-538

SORURI A., FAYYAZI A., NEUMANN C., SCHLOTT T., JUNG T., MATHES C., ZWIRNER J., RIGGERT J., PETERS J. H., 2001: Ex vivo generation of human anti-melanoma autologous cytolytic T cell by dendritic cell/melanoma cell hybridomas. *Cancer Immunol. Immunother.* 50: 307-314

SORURI A., SCHLOTT T., GANGL S., GRIESINGER C., ALBRECHT C. A., KHAZAND M., FAYYAZI A., 2002: In vitro generation of cytolytic T cells against human melanoma cells over-expressing HDM2. *in press*

STEINMAN R. M., COHN Z. A., 1973: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology quantitation and tissue contribution. *J. Exp. Med.* 137: 1142-1162

STEINMAN R. M., GUTCHINOV B., WITMER M., NUSSENZWEIG M.C., 1983: Dendritic cells are the principal stimulator of the primery mixed lymphocyte reaction in mice. *Exp. Med.* 157: 613-627

STEINMAN R. M., INABA K., 1985: Stimulation of the primary mixed leucocyte reaction. *CRC Crit Rev. Immunol.* 5: 331-348

STEINMAN R. M., 1991: The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 271-296

STEINMAN R. M., SWANSON J., 1995: The endocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 182: 283-288

STERN A. S., PODLASKI F. J., HULMES J. D., PAN Y. C., QUINN P. M., WOLITZKY A. G. , FAMILLETTI P. C., STREMLO D. L., TRUITT T., CHIZZONITE R., 1990: Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 6808-6812

TEW J. G., KOSCO M. H., BURTON G. F., SZAKAL A. K., 1990: Follicular dendritic cells as accessory cells. Immunol. Rev. 117: 185-211

TRICHERI G., 1994: Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. Blood 84: 4008-27

VAN HALL T., VAN BERGEN J., VAN VEELLEN P. A., KRAAKMAN M., HEUKAMP L. C., KONING F., MELIEF C. J. M., OSSENDORP F., OFFRINGA R., 2000: Identification of a novel tumor-specific CTL epitope presented by RMA, EL-4, and MBL-2 lymphomas reveals their common origin. J. Immunol. 165: 869-877

VAN PARJIS L., ABBAS A. K., 1996: Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. Curr. Opin. Immunol. 8: 355-361

VILCHES C., PARHAM P., 2002: KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. Annu. Rev. Immunol. 217-251

WALZER T., JOUBERT G., DUBOIS P. M., TOMKOWIAK M., ARPIN C., PIHLGREN M., MARVEL J., 2000: Characterisation at the single-cell level of naive and primed CD8 T cell cytokine responses. Cell. Immunol. 206: 16-25

WEN Y. J., MIN R., TRICOT G., BARLOGIE B., YI Q., 2002: Tumor lysate-specific cytotoxic T Lymphocytes in multiple myeloma: promising effector cells for immunotherapy. Blood 99: 3280-3285

WERFEL T., SONNTAG G., WEBER M. H., GÖTZE O., 1991: Rapid increases in the membrane expression of neutral endopeptidase (CD10), aminopeptidase N (CD13), tyrosine phosphatase (CD45), and Fc gamma-RIII (CD16) upon stimulation of human peripheral leucocytes with human C5a. *J. Immunol.* 147: 3909-3914

WYLLI A. H., 1980: Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306

XIANG R., LODE H. N., GILLIES S. D., REISFELD R. A., 1999: T cell memory against colon carcinoma is long-lived in the absence of Antigen. *J. Immunol.* 163: 3676-3683

YAO V., PLATELL C., HALL J. C., 2002: Dendritic cells. *A. N. Z. J. Surg.* 72: 501-506

ZAVAZAVA N., HAUSMANN R., MUELER-RUCHHOLTZ W., 1991: Inhibition of anti-HLAB7 alloreactive CTL by affinity purified soluble HLA. *Transplantation (Batimore)* 51: 838-842

ZHANG L., 1996: The fate of adoptively transferred antigen-specific T cells in vivo. *Eur. J. Immunol.* 166: 2208-2214

ZHOU L. J., TEDDER T. F., 1995: Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol.* 154: 3821-3835

ZHOU L. J., THEDDER T. F., 1996: CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 2588-2592

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Otto Götze danke ich für die Möglichkeit, in der Abteilung Immunologie zu promovieren.

Herrn Prof. Dr. Frank Mayer danke ich für die Übernahme des Referats im Fachbereich Biologie der George August Universität Göttingen, desweiteren Prof. Rüdiger Hardeland für die Übernahme des Koreferats.

Herrn PD Dr. med. Jörg Zwirner möchte ich für die Überlassung des Themas danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Afsaneh Soruri für die intensive Betreuung sowie für die stete Unterstützung und die Geduld während meiner Dissertation.

Ohne die Unterstützung von Herrn PD Dr. med. Afshin Fayyazi wären viele Experimente nicht möglich gewesen. Für die gute Zusammenarbeit und viele anregende Diskussionen danke ich herzlich.

Frau. Jutta Wollenweber danke ich für die Anleitung und Unterstützung während der praktischen Arbeit im Labor.

Bei Frau Diplombiologin Claudia Detmer bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft, gute Zusammenarbeit und viele anregende Gespräche.

Frau. Dr. med. Ziba Kiafard danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Bei meiner Tochter Newsha möchte ich mich besonders bedanken. Sie hat mich mit viel Liebe und Geduld durch manches Motivationstief begleitet.

Mandana Khazand
Valentinsbreite 7
37077 Göttingen
Tel.: 0551/3079996

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 18.05.1966
Geburtsort: Teheran/Iran
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: geschieden, 1 Kind

Schulbildung:

1972-1977 Grundschole in Abadan
1977-1980 Mittelschole in Abadan
1980-1984 Gymnasium in Teheran, Abschluß: Abitur

Hochschulbildung:

1987-1988 Studienkolleg in Hannover

SS' 1988 Studium der Chemie
an der Georg-August-Universität Göttingen

WS' 1989 Beginn des Studiums der Biologie
an der Georg-August-Universität Göttingen

10/1991 Diplom-Vorprüfung

3/1994 Diplom-Hauptprüfung in den Fächern
Mikrobiologie, Botanik und Organische Chemie

1994-1995 Anfertigung der Diplomarbeit in der Abteilung Medizinische
Mikrobiologie des Göttinger Zentrums für Hygiene und Humangenetik

3/1998-12/1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Immungenetik im
DPZ Göttingen

3/2000 Beginn der experimentellen Arbeit zum vorliegen des Dissertation in
der Abteilung Immunologie der Georg-August-Universität Göttingen