

Aus dem Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie
(Prof. Dr. rer. nat. Wienands)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Suszeptibilität parthenogenetischer Stammzellen
und ihrer Derivate gegenüber zytotoxischen
Effektormechanismen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hannah Johannsen

aus
Bad Oldesloe

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. Heyo K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. Ralf Dressel

Ko-Referent/in: Prof. Dr. Gerald Wulf

Promotor-Vertretung Prof. Dr. Thomas Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 30. März 2017

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	5
1 EINLEITUNG	7
1.1 Stammzellen	7
1.1.1 Herkunft und Eigenschaften von Stammzellen	7
1.1.1.1 Embryonale Stammzellen (ESC)	7
1.1.1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC)	8
1.1.1.3 Multipotente adulte Stammzellen der Keimbahn (maGSC)	9
1.1.1.4 Parthenogenetische Stammzellen (PSC)	9
1.1.2 Schwierigkeiten in der Arbeit mit Stammzellen	11
1.2 Zytotoxische T-Zellen, ihre Effektormechanismen und Auswirkungen auf Stammzellen	13
1.2.1 Entwicklung zytotoxischer T-Lymphozyten	13
1.2.2 Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten	13
1.2.3 Effektormechanismen zytotoxischer T-Lymphozyten	14
1.2.4 Protektionsmechanismen gegen Effektormechanismen von CTL	15
1.2.5 Auswirkungen von CTL auf Stammzellen	16
1.3 NK-Zellen, ihre Effektormechanismen und deren Auswirkungen auf Stammzellen	19
1.3.1 Herkunft natürlicher Killerzellen	19
1.3.2 Aktivierung von NK-Zellen	19
1.3.3 Effektormechanismen natürlicher Killerzellen	20
1.3.4 Auswirkungen von NK-Zellen auf Stammzellen	21
1.4 Fragestellung	23

2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	Material	25
2.1.1	Verwendete Geräte	25
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	26
2.1.3	Analysesets	28
2.1.4	Nährmedien	28
2.1.5	Puffer und Stammlösungen	28
2.1.6	Gele	31
2.1.7	Antikörper	31
2.1.7.1	Primäre Antikörper	31
2.1.7.2	Sekundäre Antikörper, Isotypenkontrolle und Sekundärreagenzien	32
2.1.7.3	Rekombinante Ig-Fusionsproteine	33
2.1.8	Proteinmarker	33
2.1.9	Zytokine	33
2.1.10	Enzyme und Enzyminhibitoren	33
2.1.11	Primer	34
2.1.12	Zelllinien	35
2.1.13	Versuchstiere	36
2.1.14	Einwegartikel	36
2.1.15	Computeranalyse	37
2.1.16	Herstellerliste	37
2.2	Methoden	39
2.2.1	Zellkulturmethoden	39
2.2.1.1	Allgemeines zur Arbeit mit Zellkulturen	39
2.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl	39
2.2.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	40
2.2.1.4	Ablösung adhärent wachsender Zellen	40
2.2.1.5	Isolierung von Lymphozyten aus Mäusemilzen	41
2.2.1.6	Stimulation zytotoxischer T-Lymphozyten aus OT-I-Mäusen	41
2.2.1.7	Stimulation alloreaktiver zytotoxischer T-Lymphozyten	41
2.2.1.8	Stimulation Lymphokin-aktivierter NK-Zellen (LAK)	42
2.2.2	Magnetische Separation von NK-Zellen	42
2.2.2.1	Allgemeines zur MACS	42

2.2.2.2	MACS zur Separation von NK-Zellen	42
2.2.3	Zytotoxizitätstest	43
2.2.3.1	Allgemeines zur Arbeit mit radioaktiven Stoffen	43
2.2.3.2	Prinzip des ⁵¹ Chrom-Freisetzungstests	43
2.2.3.3	Durchführung des ⁵¹ Chromfreisetzungstests	44
2.2.4	Durchflusszytometrie	46
2.2.4.1	Allgemeines zur Durchflusszytometrie	46
2.2.4.2	Bestimmung verschiedener Oberflächenliganden mittels Durchflusszyto- metrie	46
2.2.5	Westernblot	47
2.2.5.1	Allgemeines zum Westernblot	47
2.2.5.2	Herstellung von Zell-Lysaten	47
2.2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
2.2.5.4	Westernblot	48
2.2.5.5	Immunfärbung der transferierten Proteine	48
2.2.6	Quantitative Echtzeit-PCR	49
2.2.6.1	Allgemeines zur quantitativen Echtzeit-PCR (<i>real-time-PCR</i> , rtPCR)	49
2.2.6.2	Erstellen von Primern	50
2.2.6.3	Isolierung und Aufreinigung von RNA	50
2.2.6.4	Synthese von cDNA	51
2.2.6.5	Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR	51
3	ERGEBNISSE	52
3.1	Auswirkungen von LAK-Zellen auf parthenogenetische Stammzellen	52
3.1.1	Lysierbarkeit parthenogenetischer Stammzellen durch LAK-Zellen	52
3.1.2	Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf parthenogenetischen Stammzellen in der Durchflusszytometrie	56
3.1.3	Expression von MHC-Klasse-I-mRNA in der rtPCR	59
3.1.4	Expression NK-Zell-aktivierender Liganden auf parthenogenetischen Stammzellen in der Durchflusszytometrie	60
3.2	Auswirkungen Peptid-spezifischer CTL auf parthenogenetische Stammzellen	64
3.2.1	Lyse parthenogenetischer Stammzellen durch CTL aus OT-I-Mäusen	64

3.2.2 Lyse parthenogenetischer Stammzellen durch OT-I-Zellen nach Behandlung mit Interferon- γ	67
3.2.3 Hinweise auf protektive Faktoren parthenogenetischer Stammzellen gegen CTL	68
3.3 Auswirkungen von CTL und NK-Zellen auf parthenogenetische Stammzellen im Vergleich zu differenzierten Zellen	69
3.3.1 Lysierbarkeit undifferenzierter parthenogenetischer Stammzellen durch LAK-Zellen im Vergleich zur Lysierbarkeit differenzierter parthenogenetischer Stammzellen	70
3.3.2 Lysierbarkeit undifferenzierter parthenogenetischer Stammzellen durch CTL im Vergleich zur Lysierbarkeit ihrer differenzierten Derivate	73
3.3.3 MHC-Klasse-I-Expression differenzierter Zellen	73
3.3.4 Veränderung der Expression NK-Zell-aktivierender Liganden während der Differenzierung der parthenogenetischen Stammzellen	75
4 DISKUSSION	77
4.1 Parthenogenetische Stammzellen und NK-Zellen	78
4.2 Parthenogenetische Stammzellen und CTL	80
4.3 Differenzierte Derivate	81
5 ZUSAMMENFASSUNG	84
6 LITERATURVERZEICHNIS	85

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDR	komplementaritätsbestimmende Region
cm	Zentimeter
CTL	zytotoxische T-Zelle / CD8 ⁺ T-Zelle
d.h.	das heißt
DMEM	<i>dulbecco modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleotidsäure
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleotidsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ESC	embryonale Stammzelle
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
Gy	Gray
HCl	Salzsäure
HSP	Hitzeschockprotein
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iPSC	induzierte pluripotente Stammzelle
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
maGSC	multipotente adulte Stammzelle der Keimbahn
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute

µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	potentia Hydrogenii
PCR	Polymerasekettenreaktion
PSC	parthenogenetische Stammzelle
RNA	Ribonukleinsäure
rtPCR	<i>realtime-polymerase chain reaction</i> /Echtzeit-
SDS	Polymerasekettenreaktion
SIINFEKL	Natriumdodecylsulfat
SPI-6	Peptid aus Ovalbumin (aa 257-264) Serinprotease-Inhibitor 6
SSC	spermatogoniale Stammzelle
TCR	T-Zellrezeptor
TGFβ	Tumorstromungsfaktor β
TNF	Tumornekrosefaktor
x g	x Erdbeschleunigung

1 Einleitung

1.1 Stammzellen

1.1.1 Herkunft und Eigenschaften von Stammzellen

Stammzellen können sich selbst erneuern oder in verschiedene Gewebe differenzieren (Klimanskaya et al. 2007). Ihre Erzeugung und gerichtete Ausdifferenzierung bietet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der regenerativen Medizin, der Evaluation von Medikamenten-Effekten und -Sicherheit, aber auch als Modellsystem embryonaler Entwicklung oder von Krankheiten (Zimmermann 2011). Die verschiedenen heute bekannten Stammzelltypen unterscheiden sich im Wesentlichen durch die Art ihrer Gewinnung aus embryonalem oder adultem Gewebe sowie hinsichtlich ihres Entwicklungspotentials.

1.1.1.1 Embryonale Stammzellen (ESC)

Murine embryonale Stammzellen (ESC) wurden erstmals 1981 aus Embryoblasten gewonnen (Evans und Kaufman 1981, Martin 1981). 1998 gaben Thomson und Kollegen die Erzeugung humaner ESC bekannt. Es folgten zahlreiche Experimente zur Ausdifferenzierung von ESC sowie der Transplantation der Stammzellen und ihrer Derivate in verschiedene Gewebe. So konnten aus humanen ESC gewonnene Kardiomyozyten die Funktion infarzierten Herzgewebes in Ratten und Mäusen verbessern (Caspi et al. 2007). Im Meerschweinchenmodell konnte gezeigt werden, dass sich aus humanen ESC gewonnene Kardiomyozyten auch bezüglich der elektrischen Aktivität integrierten und zu einer Reduktion von Arrhythmien führten (Shiba et al. 2012). Die Entwicklung von Patches zur Integration von Stammzellderivaten in infarziertes Herzgewebe ist weiterhin Gegenstand der Forschung (vgl. Ye et al. 2013). Auch bei der Erzeugung neuronalen Gewebes wurden Fortschritte erzielt, so führten im Parkinson-Modell bei Ratten neuronale Progenitorzellen aus humanen ESC nach Injektion in das Striatum zu einer signifikanten Verbesserung der Symptomatik (Ben-Hur et al. 2004). 2007 gelang zudem die Ausdifferenzierung humaner ESC zu Motoneuronen, welche für Erkrankungen wie die Amyotrophe Lateralsklerose Hoffnungen wecken (Lee et al. 2007). Hinsichtlich neuer Therapieansätze in der Alzheimer-Forschung konnten aus humanen ESC cholinerge

Neurone gewonnen werden, welche in hippocampalem Gewebe von Mäusen funktionsfähige Synapsen bildeten (Bissonnette et al. 2011).

Dennoch bleiben ethische Bedenken, die sich vor allem mit der Zerstörung von Embryonen zur Erzeugung von ESC beschäftigen. Auch die Frage, wie im Falle einer klinischen Anwendung ggf. innerhalb kurzer Zeit immunkompatible ESC für den Erkrankten gewonnen und anschließend gerichtet differenziert werden sollen, stellt ein bisher nicht hinreichend gelöstes Problem dar.

1.1.1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC)

Um somatische Zellen in einen pluripotenten Zustand zu versetzen, bediente man sich ursprünglich des Transfers ihres Nucleus in Oozyten (Wilmut et al. 1997) oder der Fusion mit ESC (Cowan et al. 2005, Tada et al. 2001). 2006 gelang dies durch Transfektion von nur vier Transkriptionsfaktoren (Takahashi und Yamanaka 2006). Diese Methode stellt nach Weiterentwicklung und Modifikation eine der gebräuchlichsten Vorgehensweisen dar.

Die Generation von iPSC erfordert keine Destruktion eines Embryos. Zudem wird diskutiert, dass aus iPSC gewonnenes Gewebe weitgehend dem des Donors entspricht und daher eine immunologische Akzeptanz erwartet werden kann. Diese Auffassung war zuletzt Gegenstand von Diskussionen, nachdem berichtet worden war, dass eine iPSC-Linie, anders als die verglichene ESC-Linie, keine Teratome bildete (Zhao et al. 2011). Diese Ergebnisse ließen sich jedoch nicht auf andere Zelllinien übertragen, im Gegenteil zeigte eine Arbeitsgruppe um Araki, dass bei iPSC nur mit einer geringen Immunogenität zu rechnen sei und sie bezüglich Teratom-Ausbildung und T-Zell-Infiltration ESC-Linien weitestgehend ähnelten (Araki et al. 2013). Ein gewisser Grad an Immunogenität der iPSC durch zuletzt gezeigte genetische Aberrationen konnte jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden (Puri und Nagy 2012, Martins-Taylor und Xu 2012).

Die Einsatzmöglichkeiten der iPSC-Derivate werden zurzeit intensiv erforscht. So gelang beispielsweise die Reprogrammierung somatischer Zellen von an Fanconi-Anämie Erkrankten (Raya et al. 2009) und die Integration von aus iPSC gewonnenen neuronalen Vorläuferzellen in das fetale Gehirn von Ratten. Wurden diese dazu angeregt, sich in dopaminerge Neuronen zu differenzieren, konnten sie Symptome der Parkinsonerkrankung im Rattenmodell mildern (Wernig et al. 2008). Ebenso konnten Kardiomyozyten, Hepatozyten, Insulin-sezernierende Zellen u.a. aus iPSC generiert

werden (vgl. Ho et al. 2012). Auch zum Studium von Krankheiten und deren Beeinflussung durch Medikamente können iPSC genutzt werden. So gelang beispielsweise die Generierung von iPSC von Patienten, die an Parkinson oder Huntington erkrankt waren (Park et al. 2008).

Allerdings kann bei der Transduktion der Transkriptionsfaktoren durch Viren eine Veränderung des Genoms nicht ausgeschlossen werden. An Möglichkeiten, die Effizienz der iPSC-Protokolle zu verbessern, wird intensiv geforscht (Stadtfeld et al. 2008, Okita et al. 2008, Ma et al. 2013).

1.1.1.3 Multipotente adulte Stammzellen der Keimbahn (maGSC)

Aus männlichen Embryonen können Urkeimzellen der Keimdrüsenleiste (*embryonal germline stem cells*, EGC) gewonnen und zu Zellen aller drei Keimblätter differenziert werden (Rohwedel et al. 1996).

Spermatogonien lassen sich auch aus adulten männlichen Tieren isolieren (*spermatogonial stem cells*, SSC) und durch geeignete Kulturbedingungen in einen ESC-ähnlichen Zustand bringen (*multipotent adult germline stem cells*, maGSC; Guan et al. 2006). Murine maGSC konnten zu Kardiomyozyten und Gliazellen differenziert werden (Guan et al. 2007, Streckfuss-Bömeke et al. 2008, Glaser et al. 2008).

1.1.1.4 Parthenogenetische Stammzellen (PSC)

Parthenogenetische Stammzellen (PSC) werden aus künstlich aktivierten Oozyten gewonnen. Zur Erzeugung diploider PSC sind zwei Methoden bekannt: Meist werden Oozyten der Metaphase II durch Behandlung mit Strontium zu Kalzium-Oszillationen angeregt (Zhang et al. 2005) und dadurch aktiviert. Cytochalasin B verhindert anschließend die Ausstoßung des zweiten Polkörperchens (Balakier und Tarkowski 1976). Eine zweite, weniger gebräuchliche Methode, bei welcher mittels Cytochalasin D zunächst tetraploide Oozyten erzeugt werden, die sich anschließend teilen, wurde 1991 durch Kubiak und Kollegen etabliert (Kubiak et al. 1991). Da PSC aus Zellen mit haploidem Chromosomensatz erzeugt werden, sind sie überwiegend homozygot (Klimanskaya et al. 2007). Heterologe Abschnitte im Erbgut erklären sich durch Crossing-Over in der Meiose I (Kim et al. 2007).

Wie auch bei der Erzeugung von iPSCs und maGSCs müssen zur Generierung von PSC keine Embryonen zerstört werden. Ein weiterer Vorteil von PSC liegt in der Reduktion der Immunkomplexität durch den homologen Genotyp. Dadurch könnte sich die Anzahl immunkompatibler Empfänger von Linien parthenogenetischer

Stammzellen im Vergleich zu ESC-Linien deutlich erweitern, sodass Hoffnungen in den Aufbau von PSC-Banken gesetzt werden (Klimanskaya et al. 2007, Taylor et al. 2005, Nakajima et al. 2007). Zudem kann die Homozygotie zu einer einfacheren experimentellen Ermittlung von Onkogenen sowie Bezügen zwischen Medikamenten-Wirkmechanismen oder -Toxizität und -Genetik führen (Lin et al. 2003).

Erste murine PSC wurden bereits 1983 erzeugt (Kaufman et al. 1983). 2002 gelang einer Arbeitsgruppe um José Cibelli die Generierung von PSC aus Primaten und deren Ausdifferenzierung unter anderem zu neuronalen Zellen, Kardiomyozyten, Adipozyten und glatten Muskelzellen (Cibelli et al. 2002). Auch humane PSC wurden mittlerweile in verschiedenen Laboren etabliert (Mai et al. 2007; Revazova et al. 2007). Diese riefen in SCID-Mäusen Teratome hervor, sodass von ihrer Pluripotenz ausgegangen werden kann. Da sie über viele Passagen einen normalen Karyotyp behielten, kann auf eine weitere Verwendbarkeit in der regenerativen Medizin gehofft werden (Mai et al. 2007). Mittels Komplementierung tetraploider Embryonen konnten voll entwickelte Mäuse aus PSC gewonnen werden (Chen et al. 2009).

Die in dieser Arbeit verwendeten parthenogenetischen Stammzellen der Linien A3 und A6 wurden von Peter Christalla im Labor von Prof. W. H. Zimmermann etabliert. Hierzu wurden weiblichen Mäusen der F1-Generation, einer Kreuzung von C57BL/6- und DBA/2-Mäusen, Eizellen entnommen und künstlich aktiviert. Die Zelllinie A3 zeigte einen homozygoten ($H2^{d/d}$), die Zelllinie A6 dagegen einen heterozygoten MHC-Genotyp ($H2^{b/d}$). Die Zellen riefen in immundefizienten Mäusen und solchen mit demselben Haplotyp Teratome hervor, während keine Teratome bei allogener Transplantation in Mäuse mit unterschiedlichem Haplotyp gefunden wurden. Daraus konnte geschlossen werden, dass das Immunsystem der Mäuse PSC desselben Haplotyps weitestgehend akzeptierte (Didié et al. 2013). Trotz Verlustes der Heterozygotie und der dadurch möglichen Kompensationsmechanismen bei Aberrationen des Allels sowie der Unterschiede im Imprinting konnte - anders als teilweise erwartet (Eckardt et al. 2008) - gezeigt werden, dass es zwischen dem Differenzierungspotenzial zu Kardiomyozyten gegenüber ESC wenig Unterschiede zu geben schien. Auch bezüglich Morphe, Expression von Stammzellmarkern, Wachstumscharakteristika und in der Transkriptomanalyse ähnelten diese PSC den ESC- bzw. maGSC- und iPSC-Linien weitestgehend (Didié et al. 2013).

1.1.2 Schwierigkeiten in der Arbeit mit Stammzellen

Einige anfängliche Hürden in der Arbeit mit Stammzellen konnten genommen werden. So kann durch die Erzeugung von iPSC, maGSC und PSC die Zerstörung von Embryonen vermieden werden, welches diesbezügliche ethische Bedenken entkräftet. Verschiedene Ansätze minimieren eine mögliche Kontamination der Stammzellen durch Viren oder den Einsatz xenogener Materialien (vgl. Amit und Itskovitz-Eldor 2006, Zhou et al. 2009, Okita et al. 2008). Auch eine einfachere Vermehrung und Differenzierung der Stammzellen ist durch verschiedene Protokolle möglich geworden (z. B. Thomas et al. 2009, Fu et al. 2011, Bernstein und Hyun 2012). Allerdings müssen vor einem weitreichenden Einsatz von Stammzellen in der regenerativen Medizin und Medikamentenforschung noch weitere Probleme gelöst werden.

Eng mit der Pluripotenz von Stammzellen verbunden ist ihre Neigung zur Ausbildung von Tumoren aus Derivaten aller drei Keimblätter, sogenannten Teratomen (Hentze et al. 2009, Blum und Benvenisty 2009). Wenn auch zuletzt zunehmend überdacht (Buta et al. 2013), wird die Pluripotenz von Stammzellen weiterhin häufig durch Teratombildung in immundefizienten Empfängern überprüft. Es genügen schon 2 murine ESC oder 245 humane ESC, um in immuninkompetenten Mäusen Teratome hervorzurufen (Hentze et al. 2009, Lawrenz et al. 2004). Obgleich die Tumoren meist benigner Natur sind, gibt es Berichte über aus ESC hervorgehende maligne, metastasierende Tumoren (Erdö et al. 2003, Amariglio et al. 2009), die zu ernsthaften Bedenken in Bezug auf die Transplantierbarkeit von Stammzellen bzw. ihrer Derivate beitragen.

Die Vorgänge, die zur Ausbildung von Teratomen führen, sind noch nicht im Detail verstanden, eine Neigung zu maligner Entartung wird unter anderem auf genetische Veränderungen während der Kultivierung (Blum und Benvenisty 2009), bei iPSC auch auf vorbestehende somatische Mutationen sowie Mutationen während der Transfektion (Gore et al. 2011) und Erlangen der Pluripotenz (Lister et al. 2011) zurückgeführt.

Eine Grundvoraussetzung der Bildung von Teratomen ist in jedem Fall das Versagen des Immunsystems bei der Bekämpfung der Tumorzellen. Aber auch eine starke Immunantwort birgt Risiken, da sie in der Abstoßung eines Transplantates aus Stammzellen münden kann. Die genauen Ursachen, die der Abstoßung transplanteder Stammzellen und deren Derivaten zugrunde liegen, sind noch nicht hinreichend geklärt. Es scheint verschiedene Mechanismen zu geben, die, abhängig vom Grad der Differenzierung transplanteder Zellen, relevant werden (Dressel 2011).

Während B-Zellen in diesem Kontext wohl eine untergeordnete Rolle spielen, konnte eine Abstoßung von ESC durch T-Zellen gezeigt werden (Drukker et al. 2006). CD8⁺-T-Zellen (CTL) interagieren mit MHC-Klasse-I-Molekülen, welche zytosolische Peptide präsentieren (Kapitel 1.2.2). Werden die Peptide von aktivierten CTL als fremd erkannt, induzieren diese die Apoptose der Peptid-präsentierenden Zelle. Mit dem Grad der Differenzierung steigt die Zahl der MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche der Stammzellen (Drukker et al. 2002). Allerdings exprimieren in vitro differenzierte Stammzell-Derivate zum Teil andere Peptide als voll differenzierte Zellen, was die verstärkte Lyse von Derivaten der Stammzellen durch CD8⁺-Zellen im Vergleich zu ihren Vorläufern erklären könnte (Swijnenburg et al. 2005). Zudem wurde berichtet, dass einige Stammzelllinien in der Lage sind, sich durch Expression von SPI-6, TGF- β oder Arginase I gegen CTL zu schützen (Abdullah et al. 2007, Yachimovich-Cohen et al. 2010, Koch et al. 2008).

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) lysieren Stammzellen effektiv (Dressel et al. 2010). Ihre Aktivierung beruht vermutlich auf einem Zusammenspiel zweier Faktoren: zum einen exprimieren Stammzellen nur ein sehr geringes Maß an MHC-Klasse-I-Molekülen (Drukker et al. 2002). Dies könnte nach der *missing-self*-Hypothese NK-Zellen aktivieren (Kärre 1985). Zum anderen exprimieren Stammzellen verschiedene NK-Zell-aktivierende Liganden (Dressel et al. 2008, Frenzel et al. 2009). Jedoch sind NK-Zellen, anders als T-Zellen, in der Regel nicht alleine in der Lage, die Ausbildung von Teratomen nach Injektion von Stammzellen zu verhindern (Drukker et al. 2006, Tian et al. 2006, vgl. Kapitel 1.2.5).

Auch das Komplementsystem scheint in der Lage, über den alternativen Aktivierungsweg die Bildung von Teratomen nach Injektion kleiner Mengen von ESC zu verhindern (Koch et al. 2006).

1.2 Zytotoxische T-Zellen, ihre Effektormechanismen und Auswirkungen auf Stammzellen

1.2.1 Entwicklung zytotoxischer T-Lymphozyten

CD8⁺ T-Lymphozyten (zytotoxische T-Lymphozyten, CTL) spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr intrazellulärer Pathogene und Tumoren. Über T-Zell-Rezeptoren (TCR) interagieren sie mit den MHC-Klasse-I-Molekülen ihrer Zielzellen, die i.d.R. zytosolische Peptide präsentieren (Garcia et al. 1999). Ein verändertes Präsentationsmuster kann so z. B. auf eine Infektion der Zelle durch Viren hinweisen. Wird dies von CTL erkannt, können sie über die Exozytose zytotoxischer Granula oder die Aktivierung sogenannter Todesrezeptoren die Apoptose dieser Zellen induzieren (Lowin et al. 1994).

CTL entstammen als Untergruppe der T-Lymphozyten der hämatopoetischen Reihe des Knochenmarks. Sie differenzieren im Thymus, wo sie ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor erlangen (Bhandoola und Sambandam 2006). Bevor die Zellen in die Peripherie wandern, werden sie hinsichtlich der Bindung an MHC-Moleküle überprüft: binden sie diese zu stark und bergen somit eine Gefahr zur Autoreaktivität, wird ihre Apoptose induziert (negative Selektion; Kappler et al. 1987). Sind sie andererseits in der Lage, die Moleküle zu erkennen, ohne gleichzeitig eine zu starke Bindung einzugehen, erhält die Zelle ein überlebenssicherndes Signal (positive Selektion, Anderson et al. 1996). T-Lymphozyten, die diesen Reifungsprozess überstehen, treten als sogenannte naive T-Lymphozyten in das Blut über.

1.2.2 Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten

MHC-Moleküle sind in der Lage, fragmentierte Proteine auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. MHC-Klasse-II-Moleküle werden auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert und präsentieren extrazelluläre Proteine, die zuvor über Endozytose aufgenommen wurden. MHC-Klasse-I-Moleküle werden dagegen auf nahezu allen kernhaltigen Zellen des Organismus beobachtet und präsentieren vor allem zytosolische Proteine (Grommé und Neefjes 2002). Über eine sogenannte Kreuzpräsentation können jedoch auch extrazelluläre Proteine über MHC-Klasse-I-

Moleküle antigenpräsentierender Zellen präsentiert werden (Ackerman und Cresswell 2004, Bevan 1976).

CTL interagieren über den T-Zell-Rezeptor (TCR) mit MHC-Klasse-I-Molekülen (Garcia et al. 1999). Dieser besteht in diesem Fall aus einer α - und einer β -Kette, welche je eine variable ($V\alpha/V\beta$) und eine konstante ($C\alpha/C\beta$), in der Zellmembran verankerte, Region aufweisen. Für die Erkennung des MHC-Moleküls und des prozessierten Antigens besitzen α - und β -Kette jeweils drei sehr variable, komplementaritätsdeteminierende Regionen (CDRs).

Der TCR bildet einen Komplex mit CD3, einem signaltransduzierenden Proteinkomplex (Davis et al. 1998). Die Bindung eines MHC-Klasse-I- bzw. Klasse-II-Moleküls durch den TCR wird durch CD8- bzw. CD4-Korezeptoren stabilisiert (Gao und Jakobsen 2000).

Erkennt eine zytotoxische T-Zelle ein ihr durch professionelle APC präsentiertes Peptid und erhält ein zusätzliches costimulatorisches Signal, wird sie aktiviert. Gut untersucht ist z. B. die Gruppe der B7-Proteine (z. B. CD80, CD86), die auf aktivierten APC vermehrt exprimiert werden, an CD28 auf T-Zellen binden und ein costimulatorisches Signal vermitteln. Ein zusätzliches Signal ist insofern wichtig, als dass es hilft, eine T-Zell-Antwort nur dann hervorzurufen, wenn diese auch wirklich vonnöten ist (Lenschow et al. 1996, Green et al. 1994). Erkennt eine T-Zelle zwar ein Antigen, erhält jedoch kein costimulatorisches Signal, wird sie anerg. Dieser Mechanismus, der zu „peripherer Toleranz“ führt, verhindert, dass seltene autoreaktive Zellen, die die Selektion im Thymus überlebt haben, eine Zerstörung körpereigenen Gewebes induzieren (Schwartz 2003).

1.2.3 Effektormechanismen zytotoxischer T-Lymphozyten

Nach Antigen-Erkennung und -Bindung sowie Erhalt costimulativer Signale proliferieren CTL (Groscurth und Filguiera 1998). Anschließend können sie über die Aktivierung sogenannter Todesrezeptoren oder über Exozytose zytotoxischer Granula die Apoptose ihrer Zielzellen hervorrufen (Lowin et al. 1994).

Eine Möglichkeit der CTL, die Apoptose der Zielzellen einzuleiten, besteht in der Kalzium-abhängigen Exozytose zytotoxischer Granula. Nach Erkennen des Antigens formiert sich innerhalb weniger Minuten die sogenannte immunologische Synapse. Um

den TCR-Komplex stabilisieren vor allem CD2 und LFA1 (*leukozyte-function-associated-antigen-1*) die Bindung zwischen TCR und MHC-Molekül der Zielzelle (Grakoui et al. 1999). Entlang von Mikrotubuli werden die Granula anschließend gen immunologischer Synapse geführt und fusionieren dort mit der Zellmembran, sodass die lytischen Proteine in die Synapse entlassen werden (Kuhn und Poenie 2002), während die umgebenden Moleküle die Adhäsion ermöglichen.

Die Granula enthalten vor allem Perforin und Granzyme. Perforin polymerisiert und ist in der Lage, Poren in der Membran der Zielzellen zu formen. Die Poren führen zu einem unkontrolliertem Ein- und Ausstrom von Flüssigkeit in die Zelle, welches zum Zelltod führen kann (Voskoboinik et al. 2010).

Granzyme sind Serin-Proteasen. Es gibt verschiedene Subgruppen von Granzymen, welche auf unterschiedliche Weisen die Apoptose der Zielzellen einleiten. Granzym B ist z. B. in der Lage, über Interaktion mit dem Bid-Protein eine Freisetzung von Cytochrom C zu veranlassen und somit den Zelltod einzuleiten (Lieberman 2003). Granzyme scheinen auf Perforin angewiesen zu sein, um in das Zytosol der Zielzellen zu gelangen (Kägi et al. 1994).

Eine zweite Möglichkeit die Apoptose einzuleiten, besteht in der Aktivierung von Todesrezeptoren der Zielzelle, die schließlich zu deren Apoptose führt. Gut erforscht ist beispielsweise der Rezeptor Fas (CD95), ein Mitglied der TNF-Familie, der durch den Fas-Liganden auf CTL, aber auch auf T_{H1}-Zellen, aktiviert werden kann und die Apoptose Caspasen-abhängig vermittelt (Wajant 2002). Dieser zweite Mechanismus scheint vor allem in der Regulation der Immunantwort und dem Verhindern von Autoimmunität eine Rolle zu spielen (Lieberman 2003). Da aber in einzelnen zytotoxischen T-Zellen zum Teil sehr unterschiedliche Mengen von Granula vorhanden sind, könnte die zusätzliche Aktivierung der Todesrezeptoren auch eine größere Sicherheit bei der Elimination der veränderten Zellen bedingen (Hassin et al. 2011).

1.2.4 Protektionsmechanismen gegen Effektormechanismen von CTL

Es gibt verschiedene Mechanismen mit denen sich zum einen CTL selbst, zum anderen Zellen, die einer CTL-vermittelten Lyse entgehen wollen, vor zytotoxischen Effektormechanismen schützen können. So entgehen verschiedene Tumoren der T-Zell-Kontrolle durch Herabregulation stimulierender Liganden (v.a. MHC-Klasse-I-

Moleküle), Veränderung der Antigenexpression oder Sekretion immunsupprimierender Zytokine wie TGF- β oder IL-10 (Pawelec 2004). CTL selbst exprimieren auf ihrer Oberfläche Cathepsin B, welches Perforin abbaut (Balaji et al. 2002). Zudem werden die Granula polarisiert in die immunologische Synapse ausgeschüttet, was einen zusätzlichen Schutz der CTL ermöglicht (Stinchcombe und Griffiths 2007).

1.2.5 Auswirkungen von CTL auf Stammzellen

Im Hinblick auf die Transplantierbarkeit von Stammzellen und deren Derivaten müssen unterschiedliche Effektormechanismen des Immunsystems berücksichtigt werden. Verschiedene Studien zeigen, dass T- (Drukker et al. 2006) und NK-Zellen (Dressel 2010) sowie der alternative Weg des Komplementsystems (Koch et al. 2006) bei der Lyse von Stammzelllinien in vitro und in vivo eine Rolle spielen können. Das Ausmaß, in welchem diese Zellen/Systeme auf die Stammzellen wirken, hängt vom Grad der Differenzierung der Stammzellen sowie den Transplantationsbedingungen (xeno-/allo-/syngen) ab (Dressel 2011).

Die Auswirkungen von CTL auf Stammzellen werden teils sehr kontrovers diskutiert. Im Allgemeinen scheinen CTL in der Lage, Stammzellen zu lysieren (Dressel et al. 2009). So sind verschiedene Stammzelllinien aus maGSC, ESC und iPSC durch aktivierte CTL in vitro lysierbar und dementsprechend nicht generell gegen CTL-vermittelte Lyse geschützt. Dies ist insofern relevant, da durchflusszytometrisch auf allen bisher bekannten murinen Stammzelllinien MHC-Klasse-I-Moleküle nicht detektiert werden konnten und so die Frage aufgeworfen wurde, ob CTL überhaupt in der Lage seien, Stammzellen zu erkennen (z. B. Bonde und Zavazava 2006). Im Gegensatz zu murinen Stammzelllinien weisen humane Stammzellen in der Durchflusszytometrie ein geringes Maß an MHC-Klasse-I-Molekülen auf ihrer Oberfläche auf (Drukker et al. 2002, Draper et al. 2002).

Die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen steigt i.d.R. mit dem Grad der Differenzierung der Stammzellen, wobei das Maß, in welchem MHC-Klasse-I-Moleküle vermehrt exprimiert werden, in den einzelnen Studien sehr unterschiedlich ausfällt (z. B. Drukker et al. 2002, v.d.Brink und Burakoff 2002, Frenzel et al. 2009). Durch die vermehrte Expression können T-Zellen vermutlich Stammzellen bzw. deren Derivate

im Laufe des Differenzierungsprozesses besser erkennen und deren Lyse hervorrufen (Karabekian et al. 2011). Zudem exprimieren Stammzell-Derivate teils andere Peptide als voll differenzierte Zellen oder Stammzellen, eine Tatsache, die ebenfalls in die Interpretation der unterschiedlichen Lysierbarkeit durch CTL von Derivaten der Stammzellen gegenüber ihren Vorläufern einbezogen werden sollte (Swijnenburg et al. 2005).

Wie bereits erwähnt, scheinen CTL unter verschiedenen Transplantationsbedingungen unterschiedliche Bedeutung zuzukommen. So fanden Drukker und Kollegen 2006 im xenogenen Modell heraus, dass nach Injektion von hESC in Mausmodelle, die entweder keine B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen oder T- und B-Zellen bilden konnten, ausschließlich in T-Zell-defizienten Modellen Teratome hervorgerufen wurden. Sie schlossen daraus, dass die Teratom-Ausbildung, also das Versagen des Immunsystems bei der Abwehr xenogener Stammzellen, vor allem von der T-Zell-Antwort des Empfängers abhängig sei.

Wird humane Haut auf Mäuse transplantiert, wird bei CD4-Knockout-Mäusen eine verlangsamte Abstoßung im Vergleich zu CD8-Knockout- und immunkompetenten Mäusen festgestellt (Uchida et al. 1999). CTL scheinen dementsprechend unter xenogenen Transplantationsbedingungen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Swijnenburg und Kollegen stellten daher die These auf, dass auch bei der Transplantation von Stammzellen CD4⁺-Zellen wichtiger als CD8⁺-Zellen seien. Tatsächlich überlebten hESC nach Injektion in Mäuse mit CD8-Knockout länger als nach Injektion in Mäuse mit CD4-Knockout (Swijnenburg et al. 2008). In beiden Fällen waren die Stammzellen jedoch nicht in der Lage, Teratome zu bilden, sodass davon auszugehen ist, dass sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-Zellen in der xenogenen Situation genügen, um transplantierte Stammzellen abzuwehren. Eine mögliche Erklärung für die untergeordnete Rolle von CTL gegenüber CD4⁺-Zellen könnte darin liegen, dass in der xenogenen Transplantation keine direkte Alloerkennung durch CTL möglich ist.

Verschiedene Studien zeigen, dass auch unter allogenen Bedingungen eine Abwehr der transplantierten Stammzellen oder deren Derivate stattfindet, wobei auch hier das Ausmaß der Abstoßung in den einzelnen Studien recht unterschiedlich ausfällt (z. B. Bonde und Zavazava 2006, Yachomovik-Cohen et al. 2010, Dressel 2011). In einigen Studien riefen allogene ESC zunächst Teratome hervor, wurden später jedoch abgestoßen (Nussbaum et al. 2007). Als mögliche Erklärung gilt die zunehmende Differenzierung der Zellen und somit verbesserte Erkennung durch CTL (siehe oben).

Wu und Kollegen zeigten 2008, dass die allogene Abwehr von Stammzellen mit ihrer Infiltration durch CD4⁺- und CD8⁺-Zellen sowie Makrophagen einherging und dass das Teratom-Wachstum durch CTL unterbunden werden konnte, wenn diese durch APC aktiviert wurden. Dies unterstützt die Vermutung, dass CTL eine entscheidende Rolle in der Abwehr allogener Stammzellen spielen. Lui und Kollegen schreiben außerdem regulatorischen T-Zellen (Treg) eine bedeutende Rolle in der Akzeptanz der Stammzellen zu (vgl. Lui et al. 2010). Weiterhin scheinen bereits Unterschiede in Nebenhistokompatibilitätsantigenen auszureichen, um ein Wachstum von Teratomen nach Injektion von Stammzellen zu verhindern (Dressel et al. 2008).

Über immunologische Mechanismen bei der Abwehr oder Annahme syngener Stammzellen bei Transplantationen ist erstaunlich wenig bekannt. Bei syngenen Transplantationen kommt es zum Wachstum von Teratomen. Eine Immunsuppression mit Cyclosporin A zeigte hierauf keine Auswirkungen (Dressel 2011). Die sich in syngenen Empfängern bildenden Teratome sind gelegentlich mit T-, B- und NK-Zellen infiltriert, diese reichten jedoch nicht aus, um deren Auftreten zu unterbinden (Dressel 2011).

Lawrenz und Kollegen stellten 2004 fest, dass es in immundefizienten Mäusen nur zweier ESC bedarf, um Teratome hervorzurufen. Allerdings können u.U. kleinere Mengen von Stammzellen abgewehrt werden. Vermutlich kommt hier vor allem das angeborene Immunsystem zum Tragen (Kapitel 1.3.4).

Inwieweit Stammzelllinien generell in der Lage sind, sich gegen CTL zu schützen, bleibt zu klären. Ergebnisse, die nahelegten, dass sie hierzu z. B. durch Expression von SPI-6, TGF- β oder Arginase I fähig seien, wurden bisher nur vereinzelt publiziert und ließen sich nicht regelmäßig auf andere Stammzelllinien übertragen (Yachimovich-Cohen et al. 2010, Koch et al. 2008, Abdullah et al. 2007). Weiter diskutiert wird die Rolle des FAS-Liganden, dessen Expression zu einer Toleranz gegen T-Zellen führen könnte. Dieser konnte – wenn auch nicht regelhaft (Grinnemo et al. 2006, Drukker et al. 2006) in einigen Studien auf verschiedenen Stammzelllinien nachgewiesen werden (Fändrich et al. 2002). Auch die Expression von CD80 und CD86, zwei costimulatorischen Molekülen, wurde untersucht. CD86 konnte z. B. auf murinen ESC detektiert (Robertson et al. 2007) und mRNA von CD80 in humanen ESC nachgewiesen werden (Grinnemo et al. 2006).

Zusammenfassend kommen bei der Abwehr von Stammzellen verschiedene Effektormechanismen des Immunsystems zum Tragen. T-Zellen scheinen vor allem unter xeno- und allogenen Transplantationsbedingungen von Bedeutung zu sein.

1.3 NK-Zellen, ihre Effektormechanismen und deren Auswirkungen auf Stammzellen

1.3.1 Herkunft natürlicher Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Teil des angeborenen Immunsystems und ein wichtiger Bestandteil bei der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene. Sie sind in der Lage, verschiedene Virusinfektionen (z. B. durch Herpes-Viren) so lange zu bekämpfen, bis das adaptive Immunsystem durch spezifische Maßnahmen dafür sorgen kann, dass die Erreger eliminiert werden. NK-Zellen sind jedoch auch bei der Abwehr von Tumorzellen, der Bekämpfung von Protozoen (z. B. Leishmanien oder Listerien) und vermutlich an einigen hypersensiblen und autoimmunen Vorgängen beteiligt (Vivier et al. 2008, Flodström-Tullberg 2009).

Als Teil der lymphoiden Reihe entwickeln sich NK-Zellen im Knochenmark und zirkulieren anschließend im Blut. Sie sind größer als T- oder B-Lymphozyten und weisen, ähnlich wie CTL, zytoplasmatische Granula auf, welche sie exozytieren und mit deren Hilfe sie die Apoptose anderer Zellen einleiten können (Lettau et al. 2007).

1.3.2 Aktivierung von NK-Zellen

Besteht in einem Organismus eine Entzündung, können NK-Zellen über Chemokine angelockt werden (Gregoire et al. 2007). Zudem werden in der Frühphase eines Infektes potente Stimulatoren der NK-Zellen produziert. Bekannte Beispiele sind IFN- α als Antwort verschiedener Zelltypen auf virale oder bakterielle Nukleinsäuren oder IL-12, welches von aktivierten Makrophagen produziert wird.

NK-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche aktivierende und inhibierende Rezeptoren (Pegram et al. 2011). Aktivierende Rezeptoren lösen jeweils unterschiedliche Signalwege aus, welche zurzeit Gegenstand der Forschung sind. Abhängig vom Typ des aktivierenden Rezeptors und dem nachfolgenden Signalweg, folgen der Interaktion mit einem entsprechenden Liganden unterschiedliche Effektor-

mechanismen der NK-Zelle. So können virale Infektionen die Expression von MICA und MICB, zwei Liganden von NKG2D auf humanen Zellen, induzieren, auf diesem Wege deren Lyse durch NK-Zellen hervorrufen und so den Organismus schützen (Mistry und O'Callaghan 2007).

Eine Stimulation von NKG2D kann zu aktivem Rollen der NK-Zelle auf Endothelien führen, während Liganden von CD244 (die aktivierende Isoform von 2B4, einem NK-Zell-Rezeptor) die Invasivität der Zellen steigern und eine Zytokin-Antwort hervorrufen (Bryceson et al. 2011).

NK-Zellen exprimieren zudem CD16, welches an die Fc-Region von IgG-Antikörpern bindet. Somit können NK-Zellen andere, durch Antikörper markierte, Zellen lysieren (Trinchieri und Valiante 1993). CD16 selbst fördert die Degranulation von NK-Zellen (Bryceson et al. 2011).

Überwiegen aktivierende Signale im Vergleich zu inhibierenden Signalen, kommt es zu einer vermehrten Expression von LFA-1 auf der Oberfläche der NK-Zellen. Die durch LFA-1 vermittelte Adhäsion (vgl. Bryceson et al. 2009) kann jedoch auch wieder durch Signale inhibierender NK-Rezeptoren unterbrochen werden (Burshtyn et al. 2000).

Anders als die Signalwege der aktivierenden Rezeptoren, sind diejenigen der inhibierenden Rezeptoren recht gut verstanden. Ihnen gemein ist, dass sie ihre Wirkung vor allem über die Aktivierung von Thyrosinphosphatasen entfalten (Long 2008).

Ein wichtiges inhibierendes Signal für NK-Zellen ist die Präsenz von MHC-Klasse-I-Molekülen. Werden diese, z. B. im Rahmen einer Infektion mit Herpesviren, herunterreguliert, kommt es über eine verminderte Inhibition sogenannter KIR-Rezeptoren oder CD94-NKG2A auf den NK-Zellen zu einer Aktivierung der NK-Zelle (Hewitt 2003).

1.3.3 Effektormechanismen natürlicher Killerzellen

Natürliche Killerzellen zeigen ähnliche Effektormechanismen wie zytotoxische T-Lymphozyten. Auch NK-Zellen enthalten Granula mit Perforin und Granzymen (Lettau et al. 2007), die nach Stimulation ausgeschüttet werden können und die Apoptose ihrer Zielzellen einleiten (Lieberman 2003).

Nach ihrer Aktivierung formiert sich zunächst das Zytoskelett der NK-Zelle neu. Entlang von Mikrotubuli polarisieren sich die Granula an der neu entstandenen

Synapse, bevor sie mit der Zellmembran fusionieren und ihre Enzyme auf die Zielzellen wirken können. (Topham und Hewitt 2009 und Kapitel 1.2.3).

Neben den offensichtlichen Ähnlichkeiten der Effektormechanismen von CTL und NK-Zellen bestehen jedoch auch Unterschiede. So entsteht die zytoskelettale Polarität der CTL meist schneller als bei NK-Zellen, bei welchen sie teils sogar inkomplett bleibt (Wulfing et al. 2003). Zudem scheint der Kontakt zwischen CTL und Zielzelle deutlich stabiler als zwischen NK- und Zielzelle zu sein (Deguine et al. 2010, Sinai et al. 2010). Neben der Induktion der Apoptose ihrer Zielzellen, sind NK-Zellen zudem in der Lage, verschiedene Chemokine und Zytokine zu produzieren und somit Einfluss auf die Entzündungsreaktion zu nehmen (Bryceson et al. 2011).

Für die unterschiedlichen Effektormechanismen der NK-Zellen müssen zum einen verschiedene Signale, zum anderen aber auch ein unterschiedlicher Grad an aktivierenden Stimuli gegeben sein (Fauriat et al. 2010). Werden Chemokine wie MIP1 α und MIP1 β vergleichsweise früh und mittels weniger Stimuli ausgeschüttet, verlangt die Degranulation, mehr aber noch die Ausschüttung von entzündungsfördernden Substanzen wie TNF- α oder Interferonen, ein höheres Maß aktivierender Stimuli.

1.3.4 Auswirkungen von NK-Zellen auf Stammzellen

Über die Auswirkungen von NK-Zellen auf Stammzellen sind teils sehr unterschiedliche Ergebnisse publiziert worden. So kamen beispielsweise Koch und Kollegen 2008 zu dem Schluss, dass murine Stammzellen nicht durch aktivierte syngene oder allogene NK-Zellen lysiert werden könnten.

Dagegen kamen andere Gruppen zu gegenteiligen Ergebnissen. So wurden murine hämatopoetische Vorläuferzellen nach Transplantation in Mäuse durch NK-Zellen lysiert (Rideout et al. 2002). Bonnevie und Kollegen zeigten 2007, dass die Abwehr einer xenogenen Transplantation von ESC in Affen zum Teil NK-Zell-abhängig war (vgl. auch Bonde und Zavazava 2006). Mit diesen Ergebnissen steht im Einklang, dass Teratome nach Injektion humaner Stammzellen in einem T- und B-Zell-defizienten Mausmodell langsamer wuchsen als in einem T-, B- und NK-Zell-defizienten Mausmodell oder wenn die NK-Zellaktivität T- und B-Zell-defizienter Mäuse zusätzlich inhibiert wurde (Tian et al. 2006). Hieraus wurde geschlossen, dass NK-Zellen an der

Rejektion von Stammzellen beteiligt waren. Ähnliche Ergebnisse konnten für die allogene Situation demonstriert werden (Dressel 2011). Umgekehrt konnte durch die Aktivierung von NK-Zellen ein langsames Wachstum der Teratome erreicht werden (Dressel et al. 2010). In vitro konnte gezeigt werden, dass z. B. durch IL-2 aktivierte NK-Zellen in der Lage waren, einzelne Stammzelllinien teils effektiver als die entsprechenden Kontrollzelllinien zu lysieren (Dressel et al. 2008, Frenzel et al. 2009). Dennoch scheinen funktionstüchtige NK-Zellen in der Regel alleine nicht auszureichen, um eine Teratomausbildung zu verhindern. NK-Zellen können also für die vollständige Rejektion von in größeren Mengen applizierten undifferenzierten Stammzellen keine ausreichende Immunreaktion hervorrufen (Drukker et al. 2006). Eine mögliche Erklärung der in den meisten Studien sehr effektiven Lyse von Stammzelllinien durch NK-Zellen könnte in dem Zusammenspiel zweier Faktoren liegen: zum einen zeigen murine Stammzellen in der Durchflusszytometrie keine Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, sodass nur von einer sehr geringen Menge an MHC-Klasse-I-Molekülen auf murinen Stammzellen ausgegangen werden kann. Auch humane ESC zeigen nur eine sehr geringe Anzahl von MHC-Klasse-I-Molekülen (Kapitel 1.2.5). Im Einklang mit der *missing-self*-Hypothese könnten die Stammzellen so zu Zielzellen der NK-Zellen werden (Kärre 1985). Zum anderen wurden auf Stammzellen verschiedene NK-Zell-aktivierende Liganden nachgewiesen. So exprimieren verschiedene Stammzelllinien Rae-1, einen Liganden von NKG2D, einem potenten NK-Zell-Aktivator. Auch CD112 und CD155, Liganden von DNAM-1, welcher ebenfalls NK-Zellen aktivieren kann, konnten durchflusszytometrisch erfasst werden. Bisher konnten noch keine Liganden der ebenfalls aktivierenden Rezeptoren NKp46 oder 2B4 auf Stammzellen detektiert werden (Dressel et al. 2008 und 2010). Frenzel und Kollegen zeigten 2009 die Expression von ICAM-1, welcher für die Interaktion von NK-Zellen mit ihren Zielzellen vonnöten ist. Auf humanen Stammzellen konnten MICA und MICB, ebenfalls Liganden von NKG2D, nachgewiesen werden (Suárez-Alvarez et al. 2010). In vitro konnte zudem gezeigt werden, dass eine Lyse von Stammzelllinien durch NK-Zellen durch die Zugabe von rekombinanten NKG2D vermindern kann (Dressel et al. 2010), die Lyse von Stammzelllinien daher von NKG2D-Liganden abhängig ist. So könnte das geringe Maß an MHC-Klasse-I-Molekülen und das Fehlen inhibierender Liganden zusammen mit NK-Zell-aktivierenden Liganden eine Erklärung für die gute Lysierbarkeit verschiedener Stammzelllinien durch NK-Zellen darstellen.

In verschiedenen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass die Lysierbarkeit von Stammzellderivaten durch NK-Zellen mit dem Grad ihrer Differenzierung sinkt (Koch et al. 2006, Dressel et al. 2008, Frenzel et al. 2009). Dies ließe sich durch die Hochregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen erklären (siehe Kapitel 1.3.4). Dressel et al. schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die zunehmende Resistenz gegenüber NK-Zellen durch eine Herunterregulation NK-Zell-aktivierender Liganden während des Differenzierungsprozesses zu erklären sei, Frenzel und Kollegen kamen im Hinblick auf ICAM-1 zu ähnlichen Schlüssen (Frenzel et al. 2009).

Auch das angeborene Immunsystem scheint Auswirkungen auf die Transplantierbarkeit von Stammzellen zu haben: so publizierten Koch und Kollegen 2006, dass murine ESC - im Gegensatz zu ihren Derivaten - durch den alternativen Komplementweg sehr gut lysierbar seien.

Zusammengefasst scheinen NK-Zellen in der Lage, verschiedene Stammzelllinien sehr effektiv zu lysieren, wobei zum einen die Menge der MHC-Klasse-I-Moleküle, zum anderen aktivierende Liganden eine große Rolle spielen. Dass die Lyse differenzierter Derivate dieser Linien sinkt, ist vermutlich auf die Herauf- bzw. Herabregulation dieser beiden Parameter zurückzuführen.

1.4 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen zytotoxischer Effektormechanismen auf parthenogenetische Stammzellen sowie auf deren Derivate zu untersuchen, um sie mit anderen Stammzelllinien zu vergleichen.

Parthenogenetische Stammzellen lassen sich ohne die Zerstörung von Embryonen aus adulten Organismen gewinnen. Zudem könnte ihr homologer Genotyp die Anzahl immunkompatibler Empfänger im Vergleich zu ESC-Linien deutlich erweitern. Dennoch ist über die Auswirkungen des Immunsystems auf parthenogenetische Stammzelllinien kaum etwas bekannt.

Um diese näher zu untersuchen, haben wir murine parthenogenetische Stammzellen der Linien A3 und A6, welche zuvor durch P. Christalla etabliert worden waren (Didié et al. 2013), sowie deren Derivate nach Behandlung in Differenzierungsmedium im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest hinsichtlich ihrer Lysierbarkeit durch CTL und NK-Zellen untersucht. Mithilfe von Durchflusszytometrie, Westernblot und rtPCR wurden die

Zellen auf verschiedene immunologisch relevante Proteine sowie mögliche Protektionsmechanismen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Firma
Autoklav	Fedegari FVS/3	Integra Biosciences GmbH
	Fedegari FVS/2	Integra Biosciences GmbH
Blot-Kammer		Bethesda Research Laboratories
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH
Echtzeit-PCR	7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems GmbH
Elektrophoresekammer und Zubehör		Boskamp Pherostat
Hamiltonspritze	Hamilton Mikroliter Spritze	Hamilton Bonaduz AG
Homogenisator	Tenbroek	über Schütt Labortechnik GmbH
Inkubator	Hera Cell 150	Heraeus Holding GmbH
Flüssigszintillatorzähler	1450 MicroBeta Trilux	Wallac
Kanüle	0,45mm 100 Sterican	Braun Melsungen AG
MACS-Separator	Nr. M2/93/817	Miltenyi Biotec GmbH
Magnetrührer	RH basic 2	IKA Werke GmbH & Co. KG
Mikroskop	Axiovert 35	Carl Zeiss MicroImaging GmbH
Netzteile	Pipetboy acu	Orion Integrated Biosciences Inc.
Neubauerzählkammer		über Omnilab

Pipetten	2 µl, 2,5 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, 300 µl 8-Kanal	Eppendorf AG
Pipettierhilfe	pipete boy acu	Orion Integrated Biosciences Inc.
Rotoshake	Genie	Scientific Industries Inc.
sterile Werkbank	KS 18	Heraeus Holding GmbH
Thermocycler	Tpersonal	Biometra GmbH
Thermomixer	Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf AG
Trockenschrank	T6120	Heraeus Holding GmbH
Vortexer	MS1 Minishaker	IKA Werke GmbH & Co.KG
Waagen	H95 BP 61	Sartorius AG Sartorius AG
Zentrifugen	3K30 Multifuge 1 L Multifuge 3 S-R Mikro 22 Mikroliter	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Heraeus Holding GmbH Heraeus Holding GmbH Hettich GmbH & Co.KG Hettich GmbH & Co. KG

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid 30% (Rotiphorese Gel 30; 29:1)	Roth GmbH & Co.
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bromphenolblau	Merck Bioscience GmbH
Chloroform	Merck Bioscience GmbH
Concanavalin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DAB (Diaminobenzidin)	Roth GmbH & Co.

DMEM (<i>dulbecco modified Eagle medium</i>) – GIBCO (Pulver)	Invitrogen GmbH
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck Bioscience GmbH
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth GmbH & Co.
EGTA (Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Essigsäure 100%	Merck Bioscience GmbH
Ethanol absolut	AppliChem
FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom AG
Glycerin	Roth GmbH & Co.
Glycin	AppliChem
HCl (Salzsäure)	Merck Bioscience GmbH
Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Roth GmbH & Co.
Isoamylalkohol	Merck Bioscience GmbH
Isopropanol (100%)	Roth GmbH & Co.
KHCO ₃ (Kaliumhydrogencarbonat)	Merck Bioscience GmbH
Methanol	Roth GmbH & Co.
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid) Hexahydrat	Merck Bioscience GmbH
Na ₂ ⁵¹ CrO ₄ (radioaktives Natriumchromat)	Hartmann Analytic GmbH
NaCl (Natriumchlorid)	Merck Bioscience GmbH
NaOH (Natronlauge)	Merck Bioscience GmbH
NH ₄ Cl (Ammoniumchlorid)	Merck Bioscience GmbH
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Biochrom AG
PenStrep (Penicillin G 10000U/ml; Streptomycin 10000 µg/ml)	Invitrogen GmbH
Perhydrol 30% H ₂ O ₂	Merck Bioscience GmbH
Phenol	Merck Bioscience GmbH
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth GmbH & Co.
SIINFEKL (Ovalbumin aa 257-264)	Bachem Distribution Services GmbH

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	AppliChem
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth GmbH & Co.
Triton X-100	Serva Electrophoresis GmbH
TRizol Reagent	Invitrogen GmbH
Trypanblau	Merck Bioscience GmbH
Trypsin	Biochrom AG
Tween-20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	AppliChem

2.1.3 Analysesets

NK Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec GmbH
Sybr-Green-Kit (Power SYBR green PCR master mix)	Applied Biosystems GmbH

2.1.4 Nährmedien

Name	Zusammensetzung
DMEM-Komplett-Medium	500 ml DMEM-Medium 5 ml 100x PenStrep 50 ml FCS
Hepes-gepuffertes DMEM	13,54 g/l DMEM (Pulver) 4,77 g/l Hepes dest. H ₂ O pH mit NaOH auf 7.2 einstellen

2.1.5 Puffer und Stammlösungen

Name	Zusammensetzung
DAB-Lösung	50 ml PBS/Tween 25 mg DAB

EDTA /Trypsin	50 µl H ₂ O ₂ 0.05 % Trypsin 0.02 % EDTA in PBS
EGTA/MgCl ₂	4 mM EGTA 8 mM MgCl ₂ 10 % FCS Hepes-gepuffertes DMEM pH auf 7.2 mit 0,5 M NaOH einstellen
Einfriermedium	80 % FCS 20 % DMSO
Erythrozytenlyse-Puffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA in dest. H ₂ O
PBS	9,55 g/l PBS in dest. H ₂ O
PBS/Tween	0,05% Tween-20 in PBS
Probenpuffer (reduzierend)	0,02 M Tris/HCl pH 8,0 20% Glycerin 2% SDS 2 mM EDTA 10% β-Mercaptoethanol 0,1% Bromphenolblau in dest. H ₂ O
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8

	0,4% SDS in dest. H ₂ O
SDS-Laufpuffer	3,02 g Tris 14,41 g Glycin 10 ml 10% SDS ad 5 l dest. H ₂ O
Triton-Lyse-Puffer	10 % Triton X-100 in PBS
Transferpuffer	9,084 g Tris 43,23 g Glycin 20% Methanol in dest. H ₂ O
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCL pH 8,8 0,4% SDS in dest. H ₂ O
Trypanblau	0.2 % Trypanblau in dest. H ₂ O
	4.25 % NaCl in dest. H ₂ O Trypanblau mit NaCl in einem Verhältnis von 4:1 mischen

2.1.6 Gele

Name	Zusammensetzung
Sammelgel	2,4 ml Acrylamid 3,75 ml Sammelgelpuffer 8,85 ml dest. H ₂ O unmittelbar vor dem Gießen hinzufügen: 150 µl APS (10%) 15 µl TEMED
Trenngel	10,6 ml Acrylamid (40%) 8 ml Trenngelpuffer 13,4 ml dest. H ₂ O unmittelbar vor dem Gießen zufügen: 200 µl APS (10%) 30 µl TEMED

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Klon/Isotyp	Hersteller
Anti-Cathepsin B	Ziege IgG (polyklonal)	R & D Systems GmbH
Anti-HSC70	Klon: 1B5 Isotyp: Ratte IgG2a	Biomol GmbH
Anti-SPI9	Maus IgG1 (polyklonal)	MBL Internat. Coop.
Anti-CD112	Klon: 502-57 Isotyp: Ratte IgG2a	R & D Systems GmbH
Anti-CD155	Klon: TX56 Isotyp: Ratte IgG2a	BioLegend Inc.
Anti-CD48	Klon: 331504 Isotyp: Ratte IgG1	R & D Systems GmbH

Anti-H2D ^b (PE-konjugiert)	Klon: KH95 Isotyp: Maus IgG2b	BioLegend Inc.
Anti-H2D ^d (PE-konjugiert)	Klon: 34-2-12 Isotyp: IgG2a	BioLegend Inc.
Anti-H2K ^b (PE-konjugiert)	Klon: AF6-88.5 Isotyp: IgG2a	BD Biosciences
Anti-H2K ^d (PE-konjugiert)	Klon: SF 1-1.1 Isotyp: IgG2a	BD Biosciences
Anti-H60	Klon: 205326 Isotyp: Ratte IgG2a	R & D Systems GmbH
Anti-Mult1	Klon: 237104 Isotyp: Ratte IgG2a	R & D Systems GmbH
Anti-Rae1	Klon: 186107 Isotyp: Ratte IgG2a	R & D Systems GmbH
Anti-Qa1b	Klon: 6A8.6F10.1AG	BD Biosciences

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper, Isotypenkontrolle und Sekundärreagenzien

Name	Hersteller
Kaninchen anti-Ziege IgG; HRP-konjugiert	Dianova
Ziege anti-Maus IgG ; HRP-konjugiert	Dianova
Ziege anti-Ratte IgG; FITC-konjugiert	Dianova
Ziege anti-Maus IgG; FITC-konjugiert	Dianova
Ziege anti-Mensch IgG/M/A; FITC- konjugiert	Dianova
Streptavidin Tricolor-konjugiert	BioLegend Inc.
Maus-IgG2a; FITC-konjugiert	ImmunoTools GmbH
Maus-IgG2b; PE-konjugiert	ImmunoTools GmbH

2.1.7.3 Rekombinante Ig-Fusionsproteine

Rekombinante Ig-Fusionsproteine	Isotyp des IgG-Anteils	Hersteller
2B4	Isotyp: human IgG1	R & D Systems GmbH
DNAM-1	Isotyp: Maus IgG2a	R & D Systems GmbH
NKG2D	Isotyp: humanes IgG2a	R & D Systems GmbH
NKp46	Isotyp: humanes IgG1	R & D Systems GmbH

2.1.8 Proteinmarker

Proteinmarker	Beschreibung	Hersteller
SDS-6H	Molekulargewicht: 30,000-200,000	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH

2.1.9 Zytokine

Zytokin	Hersteller
rekombinantes murines Interferon-Gamma (rm IFN- γ)	ImmunoTools GmbH
rekombinantes murines IL-2 (rm IL-2)	R&D Systems GmbH
humanes IL-2 (hu IL-2)	Novartis GmbH

2.1.10 Enzyme und Enzyminhibitoren

Enzym/Enzyminhibitor	Hersteller
Taq-Polymerase	New England Biolabs AG
M-MLV (<i>Moloney murine leukemia virus</i>) reverse Transkriptase	New England Biolabs AG

DNase (10U/ μ l)

New England Biolabs AG

RNAse Inhibitor (40U/ μ l)

New England Biolabs AG

2.1.11 Primer

untersuchte Gene

Arginase

Primer

forward 5' acctggccttatgtcc 3'

reverse 5' agcaccacacccattc 3'

β 2Mikroglobulin

forward 5' ctcacactgaattcaccccc 3'

reverse 5' cagtagacggattgggctc 3'

Dnam-1

forward 5' tcgttgagggtttcac 3'

reverse 5' gctaccttactccctg 3'

H2D^b

forward 5' ggaacctgctcggctactac 3'

reverse 5' gccttgaatgctctgc 3'

H2D^d

forward 5' agtggatggctggctgtgac 3'

reverse 5' cgtagcattcccgttattcag 3'

H2K^b

forward 5' agcagacctgaagataaagtcac 3'

reverse 5' gatgcccacttctggaaggt 3'

H2K^d

forward 5' cacacgttccagcggatgttc 3'

reverse 5' tccacgttttcaggctctcg 3'

H60

forward 5' gtggcttctccagcaaaga 3'

reverse 5' gccaccactctcatgggttc 3'

Hprt

forward 5' gtctgtggccatctgccta 3'

reverse 5' gggacgcagcaactgacatt 3'

Ido1

forward 5' ccacactgagcacggacgg 3'

reverse 5' tgcggggcagcacctttcg 3'

Mult-1

forward 5' ggggcttctcttgctctgt 3'

reverse 5' ttagagaccatgccctgcttg 3'

NKG2D

forward 5' gctggtaagcactgg 3'

reverse 5' ttgagccatagcacag 3'

<i>Nectin-2 (CD112)</i>	forward 5' cgagagtcacccagcacag 3' reverse 5' tgtgtcggcagatgaggatg 3'
<i>Polyviruslike-Receptor (CD155)</i>	forward 5' gatgttcttgccgtcgtcct 3' reverse 5' agttgccgtcatagccagaga 3'
<i>Qa1b</i>	forward 5' gatgttgcttttgccac 3' reverse 5' tagcccgacaatgatgaacc 3'
<i>Rae-1</i>	forward 5' ccaaggacaggccagagcag 3' reverse 5' tgctgttcttgagacctcctc 3'
<i>Spi6/Serpinb9</i>	forward 5' tgcagacaaaacttgtaagtcctc 3' reverse 5' tgcttgacacctctgcttc 3'
<i>Tap1</i>	forward 5' ctgctctccctctaccctc 3' reverse 5' ctgctggagagcaaggagtc 3'
<i>Tap2</i>	forward 5' gcagacgactcatagggga 3' reverse 5' gttgcttctgtcccacagc 3'
<i>TGFβ</i>	forward 5' gcaacaattcaccttg 3' reverse 5' agcaccacaccattc 3'

2.1.12 Zelllinien

Name	Art
A3	homologe parthenogenetische Stammzelllinie
A6	heterologe parthenogenetische Stammzelllinie
RMA	Maus T-Zell-Lymphom-Linie
X63-Ag8.653	Maus Myelom-Zelllinie
YAC	Maus T-Zell-Lymphom-Linie

RMA, YAC und 653 sind Suspensionszellen, die parthenogenetische Stammzellen wachsen adhären auf Feederzellen.

2.1.13 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Georg-August-Universität Göttingen gehalten.

Name	Art	Beschreibung
OT-1	Maus	Transgen für einen Va2Vβ5 T-Zellrezeptor gegen durch H2K ^b präsentierte SIINFEKL
C57BL/6	Maus (Wildtyp)	Haplotyp: H2 ^b
129/Sv	Maus (Wildtyp)	Haplotyp: H2 ^b
FVB	Maus (Wildtyp)	Haplotyp: H2 ^q
DBA	Maus (Wildtyp)	Haplotyp: H2 ^d

2.1.14 Einwegartikel

Artikel	Typ	Firma
Eppendorfgefäß	1,5 ml	Sarstedt AG & Co.
	2 ml	Sarstedt AG & Co.
FACS-Röhrchen	BD Falcon 5 ml	Becton Dickinson GmbH
Gefrier Röhrchen	Cryo Tube Vialis 1,8 ml	Nunc A/S
Gewebekultur-Petrischale	unbeschichtet 94x16mm	Greiner Bio-One
Handschuhe	Peha-soft S/M	Hartmann AG
	Nitrile S/M	Ansell Healthcare Limited
Klebefolie	Top Seal-A 96-Loch- Platten	PerkinElmer LAS GmbH
MACS Separationssäulen	LS	Miltenyi Biotec GmbH
Mikrotiterplatte	96-Loch-Rundboden	Sarstedt AG & Co.
Nitrozellulosemembran	200 x 200 mm	Schleicher&Schuell
	0,45 mm Porengröße	
Pipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One
	cellstar	
Pipettenspitzen	10 µl weiß, 200 µl gelb, 1000 µl blau	Greiner Bio-One / Sarstedt AG & Co.

Sterilfilter	Filtropur S	Sarstedt AG & Co.
Wallac Messplatte	96-Loch	PerkinElmer LAS GmbH
Whatmanpapier	GB 003	Schleicher&Schuell
Zentrifugationsröhrchen	13 ml Röhrchen	Sarstedt AG & Co.
	50 ml Röhrchen	Sarstedt AG & Co.

2.1.15 Computeranalyse

Die Computeranalyse des ⁵¹Chrom-Freisetzungstest erfolgte mithilfe der MicroBeta Software für den Wallac MicroBeta Trilux Flüssigszintillationszähler und Excel 2007 (Microsoft).

Die Analyse der FACS-Daten wurde mit Cell Quest (BD Biosciences) und Excel 2010 durchgeführt, während die Daten der quantitativen rtPCR mithilfe von 7500 Systems (AB) und Excel 2010 ausgewertet wurden. Die statistische Analyse erfolgte mit GraphPad Prism 5.

2.1.16 Herstellerliste

Hersteller	Adresse
AppliChem GmbH	Ottoweg 4, 64291 Darmstadt
Applied Biosystems (AB) GmbH	Frankfurter Straße 129b, 64291 Darmstadt
Bachem Distribution Services GmbH	Hegenheimer Str. 5, 79576 Weil am Rhein
Becton Dickinson GmbH	Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg
BD Biosciences	1 Becton Drive, Franklin Lakes, NJ USA
Biochrom AG	Leonorenstr. 2-6, 12247 Berlin
BioLegend	11080 Roselle Street, San Diego, USA
Biometra GmbH	Rudolf-Wissel-Straße 30, 37079 Göttingen
Biotec-Fischer GmbH	Daimlerstraße 6, 35447 Reiskirchen
Brand GmbH + Co. KG	Otto-Schott-Straße 25, 97877 Wertheim

Braun Melsungen AG	Carl-Braun-Straße 1, 34212 Melsungen
Caltag Laboratories	Brauhausstieg 15-17, 22041 Hamburg
Carl Zeiss MicroImaging GmbH	Carl-Zeiss-Straße 22, 73447 Oberkochen
Desaga (Sarstedt-Group)	In den Ziegelwiesen 1-7, 69168 Wiesloch
Dianova	Warburgstr. 45, 20354 Hamburg
Eppendorf AG	Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg
GeReSo GmbH	Carl-Orff-Str. 33, 37574 Einbeck
Greiner BioOne AG	Bad Haller Straße 32, 4550 Kremsmünster, Österreich
Hamilton Bonaduz AG	Via Crush 8, 7402 Bonadiz, Schweiz
Hartmann Analytic GmbH	Butterberg 1a, 38108 Braunschweig
Hettich GmbH & Co.KG	Föhrenstraße 12, 78532 Tuttlingen
Heraeus Holding GmbH	Heraeusstraße 12-14, 63450 Hanau
Hewlett-Packard	Herrenbergerstraße 140, 71034 Böblingen
IKA Werke GmbH & Co. KG	Janke & Kunkel-Str. 10, 79219 Staufen
ImmunoTools GmbH	Altenoyther Str. 10, 26169 Friesoythe
Integra Biosciences GmbH	Ruhberg 4, 35463 Fernwald
Invitrogen GmbH	Frankfurter Straße 129b, 64293 Darmstadt
Merck KGaA	Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
Miltenyi Biotec GmbH	Friedrich Ebert Straße 68, 51429 Bergisch Gladbach
New England Biolabs AG	240 County Road, Ipswich, MA 01938- 2723
Nunc A/S	Kamstrupvej 90, 4000 Roskilde, Denmark
Omnilab (Krannich)	Rooke-Hooke-Straße 8, 28359 Bremen
Orion Integrated Biosciences	265 Centre Ave Suite 1R, New Rochelle, New York, USA
Phase GmbH	Blücherstraße 2, 23564 Lübeck
R & D Systems GmbH	Borsigstraße 7, 65205 Wiesbaden
Roth GmbH & Co.	Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe
Sarstedt AG & Co.	Rommelsdorfer Straße, Postfach 1220, 51582 Nümbrecht

Sartorius AG	Weender Landstraße 94-108, 37075 Göttingen
Schütt Labortechnik GmbH Scientific Industries, Inc.	Rudolf-Wissell-Str. 11, 37079 Göttingen 70 Orville Drive, Bohemia, New York 11716 USA
Serva Electrophoresis GmbH Sigma-Aldrich Chemie GmbH Wallac	Carl-Benz-Straße 7, 69115 Heidelberg Riedstraße 2, 89555 Steinkirchen Jetzt: PerkinElmer, 940 Winter Street, Waltham, Massachusetts 02451, USA
Webeco GmbH & Co.KG	An der Trave 14, 23923 Selmsdorf

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

2.2.1.1 Allgemeines zur Arbeit mit Zellkulturen

Um eine mögliche Kontamination durch Pilze oder Bakterien zu vermeiden, wurden alle Arbeiten mit Zellkulturen unter sterilen Bedingungen, d.h. unter einer sterilen Werkbank mit sterilen Materialien durchgeführt.

Bei den Zellen mit denen gearbeitet wurde, handelte es sich um Suspensionszellen und adhärent auf Feeder wachsende Zelllinien. Suspensionszellen wurden in Gewebekultur-Petrischalen für Suspensionskulturen in 10 ml DMEM-Komplettmedium gehalten. Aufgrund der hohen Teilungsrates vieler dieser Kulturen wurde die Zahl der Zellen täglich halbiert. Die auf Feeder wachsenden Stammzelllinien wurden freundlicherweise von Vijay Muppalla im Labor der Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen in Gewebekultur-Petrischalen zur Verfügung gestellt. Die Zellkulturen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl in einem gegebenen Volumen, wurden diesem 10 µl entnommen und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Aus den unter dem

Mikroskop pro Großquadrat gezählten Zellen ließ sich auf die Gesamtzellzahl rückschließen:

Zellzahl= mittlere Zellzahl x Verdünnungsfaktor x 10^4

Sollten zudem ausschließlich lebende Zellen gezählt werden, wurden die Zellen zuvor in Trypanblau 1:10 verdünnt. Trypanblau dringt nicht durch intakte Zellmembranen, sodass intakte lebende Zellen hell vor dem blau gefärbten Hintergrund erscheinen.

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese zunächst gezählt und anschließend etwa 5×10^6 Zellen in ein 13-ml-Röhrchen überführt. In diesem wurden sie bei $300 \times g$ 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 0,5 ml Hepes-gepuffertem DMEM-Medium resuspendiert und anschließend ein gleiches Volumen Einfriermedium hinzugefügt. Die Zellen wurden schnell in Einfrier Röhrchen überführt und in einer Styroporbox bei -80°C langsam eingefroren.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfrier Röhrchen in warmes Wasser gehalten bis der Inhalt flüssig wurde. Dieser wurde in ein 13-ml-Röhrchen mit 10 ml Hepes-gepuffertes DMEM-Medium überführt und bei $300 \times g$ 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen und inkubiert.

2.2.1.4 Ablösung adhärent wachsender Zellen

Die untersuchten parthenogenetischen Stammzellen wuchsen adhärent auf Feederzellen und mussten daher vor allen Versuchen vom Boden der Gewebepplatten gelöst werden. Dazu wurde das Inkubationsmedium entfernt und die Innenfläche der Platten kurz mit sterilem PBS gespült. Anschließend wurden 10 ml PBS/EDTA mit 1 ml $10 \times$ Trypsin auf die Zellen gegeben. Da Trypsin die Oberflächen der Zellen angreift und Oberflächenproteine zerstören könnte, wurde nur so lang wie unbedingt notwendig (meist zwei bis drei Minuten) abgewartet. Die Stammzellen hatten sich zu diesem Zeitpunkt von den Feederzellen gelöst und konnten abgenommen werden. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 200 μl FCS inaktiviert, die Zellen für 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und das Zellpellet in DMEM-Komplettmedium aufgenommen.

2.2.1.5 Isolierung von Lymphozyten aus Mäusemilzen

Um Lymphozyten aus Mäusemilzen zu gewinnen, mussten diese zunächst präpariert werden. Die Mäuse wurden hierzu unter Narkose durch CO₂ mit einem Genickbruch getötet. Die anschließende Präparation erfolgte mithilfe von autoklavierten chirurgischen Instrumenten. Nach alkoholischer Desinfektion des Fells wurde median ein Bauchschnitt durchgeführt, das Fell abpräpariert und nach Wechsel der Instrumente das Bauchfell eröffnet. Die Milz wurde aufgesucht und isoliert, um anschließend entnommen und in ein 13ml-Röhrchen mit 10 ml HEPES-gepuffertem DMEM-Medium überführt zu werden.

Unter einer sterilen Werkbank wurden die Milzzellen nun mithilfe eines Tenbroek-Homogenisators homogenisiert und bei 300 x g 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden zur Lyse der Erythrozyten in 3 ml Erythrozytenlyse-Puffer resuspendiert. Nach 3 min wurden die Zellen, um den Puffer auszuwaschen, dreimal mit 10 ml DMEM-Komplettmedium bei 300 x g 10 min zentrifugiert.

Die weiteren Arbeitsschritte ergaben sich daraus, welche Zellen aus der entnommenen Milz stimuliert werden sollten (s. 2.2.1.7-9).

2.2.1.6 Stimulation zytotoxischer T-Lymphozyten aus OT-I-Mäusen

OT-I-Mäuse besitzen einen transgenen, für über H2K^b-präsentiertes SIINFEKL spezifischen, T-Zellrezeptor. Sie ließen sich in einem Medium aus 16 ml DMEM-Komplettmedium, 20 % ConA-Überstand, 20 ng/ml murines IL-2 und 1 nM SIINFEKL peptidspezifisch stimulieren. Um die räumliche Nähe von SIINFEKL und CTL zu gewährleisten, wurden die Zellen in einer rundbödigen 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät. Die Zellen wurden anschließend für vier Tage inkubiert.

2.2.1.7 Stimulation alloreaktiver zytotoxischer T-Lymphozyten

Um alloreaktive CTL zu gewinnen, mussten die Mäuse zunächst über einen Zeitraum von 40 Tagen immunisiert werden (s. 2.2.1.4). Dabei war zu beachten, dass, um eine optimale Stimulation der Zellen zu gewährleisten, vier Tage vor Präparation der Milz noch einmal immunisiert wurde. Nach Präparation und Erythrozyten-Lyse (s. 2.2.1.5) wurden die Zellen restimuliert. Hierzu wurden etwa 5×10^6 Milzzellen der allogenen Linie – also jener, gegen welche zuvor immunisiert worden war – zu den präparierten

Zellen gegeben und bei 300 x g 10 min zentrifugiert. Die so gemischten Zellen wurden in 16 ml Kompletmedium, 20 % ConA-Überstand und 10 ng/ml murinem IL-2 in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät und anschließend für vier Tage inkubiert.

Zu beachten war, dass die Milzzellen der allogenen Linie zuvor mit 30 Gy bestrahlt worden waren. Dies inaktivierte die Zellen, sodass sie zwar allogene Lymphozyten stimulieren, jedoch selbst nicht weiter stimuliert werden konnten.

2.2.1.8 Stimulation Lymphokin-aktivierter NK-Zellen (LAK)

Um NK-Zellen zu stimulieren, wurden die Milzzellen in 8 ml DMEM-Kompletmedium, 20 % ConA-Überstand, 20 ng/ml murinem IL-2 und 2000 U/ml humanem IL-2 in einer Gewebekulturplatte ausgesät und für vier Tage inkubiert.

2.2.2 Magnetische Separation von NK-Zellen

2.2.2.1 Allgemeines zur MACS

MACS (*magnetic activated cell sorting*) ist eine Methode zur An- oder Abreicherung verschiedener Zellpopulationen aus einer Suspension verschiedener Zelltypen. Hierbei werden die benötigten Zellen selbst (Anreicherung) oder die meisten der umgebenden Zellen (Abreicherung) mittels zellspezifischer Antikörper detektiert. Diese sind entweder direkt gekoppelt, d.h. an ihnen befindet sich ein Magnetpartikel (*micro bead*), oder sie sind mit Biotin konjugiert und werden ihrerseits durch an Streptavidin gekoppelte Magnetpartikel erkannt. Lässt man die Zellen nun durch ein magnetisches Feld laufen, verbleiben die Antikörper-gebundenen Zellen im Magneten, sodass sich die verschiedenen Zellpopulationen trennen.

2.2.2.2 MACS zur Separation von NK-Zellen

Zunächst wurde die Milz einer Maus präpariert und homogenisiert (s. 2.2.1.5), die Erythrozytenlyse unterblieb. Zur magnetischen Abreicherung von NK-Zellen wurde das Maus-NK-Zell-Isolations Kit der Firma Miltenyi verwendet.

Zur Herstellung des MACS-Puffers wurde PBS entgast und 0,5 % FCS, sowie 2 mM EDTA hinzugefügt. Alle sich anschließenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

Die folgenden Mengen- und Volumenangaben beziehen sich auf eine Ausgangszahl von 1×10^7 Zellen, bei anderen Zellzahlen wurden die Volumina entsprechend angepasst.

Die Zellen wurden gezählt und bei $300 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, die Zellen in $40 \mu\text{l}$ MACS-Puffer resuspendiert und $10 \mu\text{l}$ der Biotin-gekoppelten Antikörper gegen verschiedene Zelltypen aus dem Kit (T-Zellen, dendritische Zellen, B-Zellen, Granulozyten und Erythrozyten) hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 4°C inkubiert.

$30 \mu\text{l}$ MACS-Puffer sowie $20 \mu\text{l}$ der Anti-Biotin-Magnetpartikel wurden hinzupipettiert und erneut bei 4°C für 15 min inkubiert. Die Zellen wurden in 1-2 ml Puffer bei $300 \times g$ für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in $500 \mu\text{l}$ Puffer aufgenommen.

Eine LS-Säule wurde in den MACS Separator eingesetzt und mit 3 ml Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde auf die Säule appliziert und die NK-Zellen, welche nicht in ihr verblieben, aufgefangen. Die Säule wurde dreimal mit je 3 ml Puffer gewaschen. Anschließend wurde sie entnommen und die in ihr verbliebenen Zellen herausgewaschen. Die Reinheit der aufgefangenen NK-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft.

2.2.3 Zytotoxizitätstest

2.2.3.1 Allgemeines zur Arbeit mit radioaktiven Stoffen

Alle Arbeiten mit radioaktiven Stoffen wurden im Isotopenlabor durchgeführt. Die Werkbank war mit einer bleiernen Schutzmauer umgeben, hinter der die Arbeit mit den radioaktiven Stoffen erfolgte. Fester und flüssiger radioaktiver Abfall wurden getrennt entsorgt.

2.2.3.2 Prinzip des $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstests

Mittels des $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstests lässt sich die zytolytische Aktivität verschiedener Killerzellen gegen Zielzellen bestimmen.

Die Zielzellen werden mit radioaktiven $^{51}\text{Chrom}$ inkubiert, welches sie internalisieren und an intrazelluläre Proteine binden. Die Killerzellen werden im Folgenden zu den

Zielzellen gegeben. Durch die Lyse der Killerzellen erfolgte die Freisetzung von Chrom aus den Zellen. Über die so freigesetzte Menge an radioaktivem Chrom lassen sich daher Rückschlüsse auf die zytolytische Aktivität der Killerzellen ziehen.

2.2.3.3 Durchführung des ^{51}Cr Chromfreisetzungstests

Zunächst wurden die Zielzellen, in diesem Fall die parthenogenetischen Stammzellen sowie die jeweiligen Kontrollzellen, gezählt, in 150 μl FCS resuspendiert und mit 8-10 μl (abhängig von der Aktivität der verwendeten Charge) des radioaktiven Chroms $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ inkubiert. Dabei bedurfte es pro getesteter Killerzellsorte 240.000 Zielzellen.

Nach 90 min wurden die Zellen dreimal in 10 ml Hapes-gepuffertem DMEM-Medium für je 10 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen, um das freie Chrom zu entfernen. Die Zellen wurden nun in DMEM-Komplettmedium aufgenommen, sodass sich eine Konzentration von 100.000 Zellen / ml ergab.

Die Effektorzellen wurden in ihrem Medium resuspendiert und anschließend bei 300 x g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in DMEM-Komplettmedium aufgenommen und gezählt.

Der weitere Testansatz ist für einen Test mit LAK-Zellen beschrieben. Pro Zielzellsorte wurden 12×10^6 Zellen (OT-I-Zellen: $0,6 \times 10^6$; alloreaktive CTL: 6×10^6) eingesetzt. In eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde pro Zielzellsorte in je drei Reihen 100 μl DMEM-Komplettmedium vorgelegt. Die Effektorzellen wurden in 300 μl Medium aufgenommen und je 100 μl in jedes der drei Löcher des Triplets pipettiert. Die Zellen wurden anschließend in diesem Volumen von nun 200 μl resuspendiert. Daraufhin wurden 100 μl dieses Gemisches - entsprechend der Hälfte der Zellen - in die zweite Reihe übertragen, gemischt, erneut 100 μl in die dritte Reihe übertragen und entsprechend fortgefahren. Resultat dieses Verfahrens war eine Verdünnungsreihe, in der sich zuoberst etwa 2×10^6 Effektorzellen fanden, in der nächsten Reihe nur noch 1×10^6 Zellen/Loch usw. Um die spontane Chromfreisetzung (Spontanrelease) zu bestimmen, blieb die letzte Reihe frei von Effektorzellen.

Die Verdünnungsreihen alloreaktiver CTL sowie von CTL, die aus OT-I gewonnen wurden, wurden prinzipiell ähnlich hergestellt. Dennoch gab es einige Abweichungen, die zu beachten waren: bei alloreaktiven Zellen begann der Ansatz statt mit 2×10^6 mit 1×10^6 Zellen, bei CTL aus OT-I-Mäusen mit 100.000 Zellen. Ein weiterer wichtiger

Unterschied des Testansatzes mit CTL aus OT-I-Mäusen war, dass die Verdünnungsreihe in 50 µl statt 100 µl durchgeführt wurde. Anschließend wurde zu dieser Verdünnungsreihe pro Loch 50 µl DMEM-Komplettmedium mit 0,25 µg/ml SIINFEKL gegeben, sodass wieder ein Gesamtvolumen von 100 µl entstand. Zudem wurde eine Negativkontrolle angefertigt, die die Peptidspezifität zeigen sollte: ihr wurde kein SIINFEKL zugegeben. Als Nachweis, dass die Lyse über den kalziumabhängigen Granula-Exozytose-Weg vermittelt wurde, wurde zu einem Tripletts zudem 2 mM EGTA und 4 mM MgCl₂ gegeben.

Je 100 µl des Mediums, in welchem die Zielzellen resuspendiert worden waren, wurden nun zu den Effektorzellen gegeben und für 3 min bei 20 x g zentrifugiert, um den Kontakt zwischen Ziel- und Effektorzellen zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Inkubation für 4 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ in einer feuchten Kammer.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen wiederum für 3 min bei 20 x g zentrifugiert, um die Zellen und den Überstand, welcher das freigesetzte ⁵¹Chrom enthielt, zu trennen. Je 50 µl des Überstands wurden abgenommen und in eine 96-Loch-Wallac-Messplatte pipettiert. Um die Radioaktivität des Überstandes in Relation zur Gesamtmenge des ⁵¹Chroms in den Zielzellen zu setzen, wurden die verbliebenen Zellen durch 5 µl 10%-Triton lysiert und 50 µl des Sediments in eine zweite 96-Loch-Wallac-Messplatte gegeben. Zur Messung der Radioaktivität wurde in jedes der Löcher der 96-Loch-Wallac-Messplatte 200 µl Szintillatorflüssigkeit gegeben. Mittels einer Klebefolie wurden die Messplatten verschlossen und kurz auf einem Schüttler geschüttelt. Mittels eines Wallac-MicroBeta-Trilux-Zählers konnte die Radioaktivität anschließend gemessen werden, wobei die *counts per minute* (cpm) in jedem Loch der Messplatte ermittelt wurden. Die Lyse wurde anschließend mit folgender Formel berechnet:

$$[\%] \text{ Lyse} = (4 \times \text{cpm Überstand} \times 100) / (3 \times \text{cpm Sediment} + \text{cpm Überstand})$$

Um die spezifische Lyse zu ermitteln, wurde von den Werten anschließend der Spontanrelease abgezogen. Dieser ergab sich aus der gemessenen Radioaktivität eines Tripletts, in welches nur Zielzellen, nicht jedoch Effektorzellen vorgelegt worden, entsprach also der Menge an Radioaktivität, die auch ohne Lyse durch Killerzellen aus den Zellen freigesetzt wurde.

2.2.4 Durchflusszytometrie

2.2.4.1 Allgemeines zur Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie können Zellen hinsichtlich der Expression verschiedener Oberflächenantigene verglichen werden. Hierzu werden die Zellen mit einem Antikörper inkubiert, welcher spezifisch an sein Antigen, z. B. einen Oberflächenrezeptor, bindet. Häufig sind diese Antikörper direkt fluoreszenzmarkiert, ist dies nicht der Fall, müssen die Zellen ein weiteres Mal mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper inkubiert werden, welcher in der Lage ist, an den Primärantikörper zu binden.

Zur Ermittlung unspezifischer Bindungen dient eine Isotypkontrolle, d.h., dass ein Teil der Zellen mit einem Antikörper gleichen Typs inkubiert wird, welcher sich jedoch gegen Strukturen richtet, die die Zellen nicht exprimieren. Bei der Auswertung wird die Messung der Fluoreszenz der Isotypkontrolle von der der untersuchten Zellen abgezogen.

Die Zellen werden einzeln in die Messkammer gesaugt und in einer Spülflüssigkeit an einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Das Licht, welches die Ak-markierten Zellen durch Anregung der Fluorochrome dabei emittieren, ist proportional zur Menge der gebundenen Antikörper.

2.2.4.2 Bestimmung verschiedener Oberflächenliganden mittels Durchflusszytometrie

Parallel zu jedem Chromfreisetzungstest wurde die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle und weiterer Oberflächenantigene auf den untersuchten Zellen gemessen. Ebenso konnte die Reinheit der Auftrennung von Zellpopulationen durch MACS überprüft werden.

Zunächst wurden je etwa 1×10^6 Zellen in FACS-Röhrchen überführt. Diese wurden mit PBS aufgefüllt und 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und je $1 \mu\text{g}$ des entsprechenden Antikörpers pro 1 Mio. Zielzellen (1:10 in PBS gelöst) zu den Zellen hinzugefügt. Die Zellen wurden für 30 min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Die Röhrchen wurden erneut mit PBS aufgefüllt, für 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und der Überstand wurde wiederum abgegossen, sodass

ungebundene Antikörper entfernt wurden. Waren die Antikörper direkt fluoreszenzmarkiert, konnten nun 200 µl PBS hinzugefügt werden, die Fluoreszenzintensität im FACSCalibur, dem Durchflusszytometer, gemessen und mittels des Programmes Cell Quest Pro ausgewertet werden. Andernfalls schloss sich zuvor noch die Inkubation mit einem Sekundärantikörper (ebenfalls Zugabe von 1 µg, für 30 min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert) und ein erneutes Waschen der Zellen an.

2.2.5 Westernblot

2.2.5.1 Allgemeines zum Westernblot

Mittels des Westernblots lassen sich Proteine in einem Zelllysate nachweisen. Durch eine Gelelektrophorese werden die Proteine abhängig von ihrer Größe aufgetrennt und anschließend durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Membran aus Nitrozellulose überführt. Diese wird mit einem spezifischen, gegen das nachzuweisende Protein gerichteten Antikörper inkubiert. Daraufhin erfolgt die Inkubation mit einem zweiten Antikörper, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist und ihn durch Oxidation eines Farbstoffes sichtbar machen kann.

2.2.5.2 Herstellung von Zell-Lysaten

2×10^6 Zellen wurden in 1,5 ml PBS aufgenommen, in ein Eppendorf-Cup überführt und bei $300 \times g$ 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und das Zellpellet bei -20°C eingefroren. Zu den Zellpellets wurde 30 µl Probenpuffer gegeben. Dann wurden die Pellets 5 min auf 95°C erhitzt und im Anschluss 5 min bei $10.000 \times g$ zentrifugiert.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zwei Glasplatten (19 x 16,5 cm und 16 x 16,5 cm) wurden mit Isopropanol gereinigt, die Spacer an drei Seiten der größeren Platte befestigt und die kleinere Platte schließlich mithilfe von drei Klammern befestigt. In den Spalt zwischen den beiden Platten konnte nun bis 3 cm unter den Rand das Trenngel gegossen werden, welches

sofort mit 1 ml Isopropanol überschichtet wurde. Anschließend wurde das Trenngel etwa 1 Stunde ausgehärtet.

Das Isopropanol wurde mit destilliertem Wasser ausgespült, das Sammelgel über das Trenngel gegossen, ein Kamm mit Kammern in dieses gesteckt und 1 Stunde aushärten gelassen.

Klammern, Kamm und unterer Spacer wurden entfernt und das Gel an der Elektrophoreseapparatur befestigt. In obere und untere Kammer wurde SDS-Laufpuffer gegeben. Eventuell entstandene Luftblasen wurden mithilfe einer Spritze entfernt. Die Kammern wurden nun mit einem Proteinmarker und je 30 µl der Zelllysate befüllt. Der Proteinmarker diente als Längenstandard, da er eine Mischung von Proteinen bekannter Größe enthielt. Beim Befüllen der Kammern mit Zelllysaten war darauf zu achten, dass alle Proben doppelt aufgetragen wurden – einmal links, einmal rechts der Mittellinie.

Zunächst wurde eine Stromstärke von 20 mA angelegt, sobald die Proben das Trenngel jedoch erreicht hatten, wurde diese auf 40 mA erhöht. Nachdem die Proben am unteren Rand des Gels angekommen waren, wurde das Gel vorsichtig von der Platte gelöst und zugeschnitten.

2.2.5.4 Westernblot

Um die Proteine aus dem Gel zu lösen und auf die Nitrozellulose zu übertragen, wurde senkrecht zu beiden ein elektrisches Feld angelegt. Dabei lag das Gel auf der Nitrozellulose und unter sowie über beiden fand sich mit Blotpuffer angefeuchtetes Wathman-Filterpapier. Es wurde eine Spannung von 16 V angelegt. Nach 70 Minuten konnte die Nitrozellulose entnommen und in PBS/Tween 1 Stunde auf einem Schüttler gewaschen werden.

2.2.5.5 Immunfärbung der transferierten Proteine

Zur Anfärbung der Proteine wurde die Nitrozellulose in Ponceau-S-Lösung gegeben. Die Marker wurden angezeichnet und die Nitrozellulose längs der Mittellinie zerschnitten. Um die Ponceau-S-Lösung möglichst weitgehend vom Blot zu entfernen, wurde dieser 4 x für je 5 min in PBS/Tween auf einem Schüttler gewaschen. Zur Detektion unspezifischer Bindungen durch den Sekundärantikörper, wurde eine Hälfte der Nitrozellulose nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Diese Hälfte blieb

daher zunächst in PBS/Tween. Die andere Hälfte wurde währenddessen in 5 ml PBS/Tween mit 10 µl des Primärantikörper (Anti-Cathepsin-B bzw. Anti-SPI9) und 5 µl Anti-HSC70 auf einem Schüttler inkubiert. HSC70 ist ein ubiquitär vorhandenes Hitzeschockprotein, das als Ladekontrolle diente.

Nach 2 Stunden wurde die Nitrozellulose 4 x für 5 min mit PBS/Tween gewaschen. Für die Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden beide Hälften der Nitrozellulose für 90 min in einer Schale mit 10 ml PBS/Tween und 2 µl des entsprechenden Sekundärantikörpers auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde sie 4 x für 5 min in PBS/Tween gewaschen. Anschließend wurde die Nitrozellulose kurz in einen Ansatz mit 50 mg DAB, 50 ml PBS/Tween und 25 µl H₂O₂ getaucht. Die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase oxidiert H₂O₂ zu Wasser und einem Sauerstoffradikal, welches wiederum DAB zu einem braunen Farbstoff oxidiert, der auf der Nitrozellulose niederschlägt und die Proteinbanden so sichtbar macht.

2.2.6 Quantitative Echtzeit-PCR

2.2.6.1 Allgemeines zur quantitativen Echtzeit-PCR (*real-time-PCR*, rtPCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), erlaubt aber im Unterschied zu dieser auch die Quantifizierung der gewonnenen Produkte.

Die quantitative Echtzeit-PCR kann in verschiedenen Bereichen zum Einsatz kommen. In den vorliegenden Experimenten wurde mRNA aus den untersuchten Zellen gewonnen, diese zu cDNA umgeschrieben und anschließend mithilfe spezifischer Primer verschiedene Sequenzen amplifiziert. Vor der Amplifikation wurde Sybr-Green hinzugegeben. Sybr-Green interkaliert in dsDNA und bildet dabei einen fluoreszierenden Farbstoff. Die gemessene Fluoreszenz ist somit direkt proportional zur Menge der gebildeten DNA.

Es ist bekannt, dass einige Gene, sogenannte Haushaltsgene, eine vergleichsweise konstante Expression zeigen. Bei der quantitativen Echtzeit-PCR kann man diese als Vergleichswert hinzuziehen. Dabei wird die Fluoreszenz der Probe der untersuchten Sequenz mit der eines Haushaltsgens unter den gleichen Bedingungen verglichen. Zu beachten ist hierbei, dass die Proben während eines Zykluses verglichen werden, in denen bei beiden die Fluoreszenz exponentiell ansteigt, die Bedingungen also optimal

sind. Hierzu wird ein Schwellenwert (threshold) definiert. Der Punkt, an welchem die Fluoreszenz diesen überschreitet wird Ct (threshold cycle) genannt.

2.2.6.2 Erstellen von Primern

Die Primer wurden mithilfe von Datenbanken der Internetseiten <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> und <http://eu.idtdna.com> erstellt und mithilfe des Programmes GENTle Version 1.9.4 überarbeitet. Mittels PCR und rtPCR wurden die Primer ob ihrer Spezifität und Genauigkeit überprüft.

2.2.6.3 Isolierung und Aufreinigung von RNA

Etwa 1×10^7 Zellen wurden in 30 μ l PBS gesammelt und 360 μ l TRIzol hinzupipettiert. TRIzol enthält Guanidiniumthiocyanat, welches Zellen lysiert und Enzyme inaktiviert. Die Suspension wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4°C und 15000 U/min für 10 min zentrifugiert. Das Sediment mit größeren Zelltrümmern wurde verworfen und 72 μ l Chloroform zur Phasentrennung hinzugegeben. Es wurde 30 s gevortext und für 5 min wiederum bei 4°C und 15000 U/min zentrifugiert. Das Sediment wurde erneut verworfen und der Überstand zur Fällung von RNA und DNA in 200 μ l Isopropanol resuspendiert. Die Lösung wurde anschließend bei -80°C für 15 min gefällt und im Folgenden bei 4°C für 30 min bei 15000 U/min zentrifugiert. RNA und DNA befanden sich nun im Sediment und der Überstand konnte verworfen werden. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol in RNase-freiem Wasser gewaschen, 10 Minuten bei 15000 U/min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 50 μ l RNase freiem Wasser gelöst.

Um Reste von DNA zu entfernen, wurde dieses anschließend mit 5 μ l 1 M Tris-HCl (pH 7.5), 1 μ l 1 M MgCl₂, 1 μ l DNase (10 U μ l), 0,5 μ l RNase Inhibitor (40 U/ μ l) und 42,5 μ l RNase-freiem Wasser für 20 min in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Nun folgte die Aufreinigung. Zu der Suspension wurden 100 μ l Phenol, Chloroform und Isoamyl-alkohol im Verhältnis 25:24:1 gegeben und kurz gevortext. Anschließend wurde bei Raumtemperatur für 2 min bei 15000 U/min zentrifugiert, die oberste Phase in ein weiteres Eppendorf-Cup überführt und zu diesem 150 μ l Isopropanol und 15 μ l 3M Natriumacetat pipettiert. Daraufhin wurde bei -80°C für 15 min präzipitiert, kurz gevortext und für 15 min bei 4°C und 15000 U/min zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde entfernt, das Pellet in 1 ml Ethanol (70%) gewaschen und bei Raumtemperatur und

maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die vorangehenden zwei Schritte wurden zweimal wiederholt. Das Pellet wurde anschließend in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und bei 42°C für in ein Wasserbad gestellt.

Um die Güte der Isolierung, sowie das Gelingen der Aufreinigung und die Menge der gewonnenen RNA zu überprüfen, wurde 1 µl der Probe mithilfe eines Spektrophotometers analysiert. Hierzu wurde der Quotient der Absorption der Probe bei 260 und 280 nm herangezogen. Lag dieser bei $A_{280}/A_{260} \approx 2,0$, so konnte davon ausgegangen werden, dass die Probe weitgehend reine RNA enthielt.

2.2.6.4 Synthese von cDNA

Zu 2 µg der isolierten RNA wurden 2 µl Zufallsprimer (*random primers*) gegeben und auf ein Volumen von 15 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. In einem Wasserbad wurde das Gemisch für 10 min bei 70°C inkubiert, sodass die Sekundärstruktur zerfiel und sich die Primer anlagern konnten. Anschließend wurden 5 µl M-MLV 5x Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl) und 1 µl M-MLV reverse Transkriptase hinzupipettiert und die Suspension für 60 min bei 37°C inkubiert. Danach konnte mit der quantitativen Echtzeit-PCR fortgefahren oder die Suspension bei -20°C gelagert werden.

2.2.6.5 Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR

Pro Testansatz wurden je drei identische Proben auf eine 96-well-Platte aufgetragen. Diese enthielten 12,5 µl Sybr-Green-Lösung, je 1 µl des *forward*- und des *reverse*-Primers (5 pmol/µl) 4 µl cDNA (1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt) und 6,5 µl RNase-freies Wasser.

Der Ansatz wurde mithilfe eines 7500 Real Time PCR Systems durchgeführt und erfolgte über 40 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 62°C. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe von 7500 RT-Systems (Applied Biosystems).

Die mRNA-Menge wurde unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel bestimmt. Mit dieser ließen sich die relativen Änderungen der mRNA-Menge bezogen auf die Kontrolle darstellen.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen von LAK-Zellen auf parthenogenetische Stammzellen

3.1.1 Lysierbarkeit parthenogenetischer Stammzellen durch LAK-Zellen

Um das Ausmaß der Lyse parthenogenetischer Stammzellen durch LAK-Zellen zu bestimmen, wurde der $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest eingesetzt. Als Zielzellen wurden parthenogenetische Stammzellen der Linien A3 (H2^{d}) und A6 ($\text{H2}^{\text{b/d}}$) sowie zum Vergleich YAC-1-Zellen (H2^{a}) eingesetzt, welche aufgrund ihrer niedrigen Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen gut von LAK-Zellen lysiert werden.

Die LAK-Zellen wurden aus Milzen verschiedener Mauslinien gewonnen (s. Methodenteil). Es wurden Zellen der Stämme 129Sv (H2^{b}), C57BL/6 (H2^{b}), FVB (H2^{a}) und DBA (H2^{d}) eingesetzt, welche somit entweder beiden, einem oder keinem der Allele des MHC-Klasse-I-Lokus der Zielzellen entsprachen. Es wurde sowohl die spezifische Lyse, also der Mittelwert der absolut gemessenen Werte einer Tripletreihe abzüglich der Spontanfreisetzung von Chrom aus den Zielzellen, als auch die relative Lyse berechnet. Hierfür wurde jeweils die spezifische Lyse der Zielzellen auf die höchste spezifische Lyse der Kontrollzellen (YAC-1 bei einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 200:1) bezogen und prozentual dargestellt. Abb. 3.1 zeigt einen exemplarischen Test.

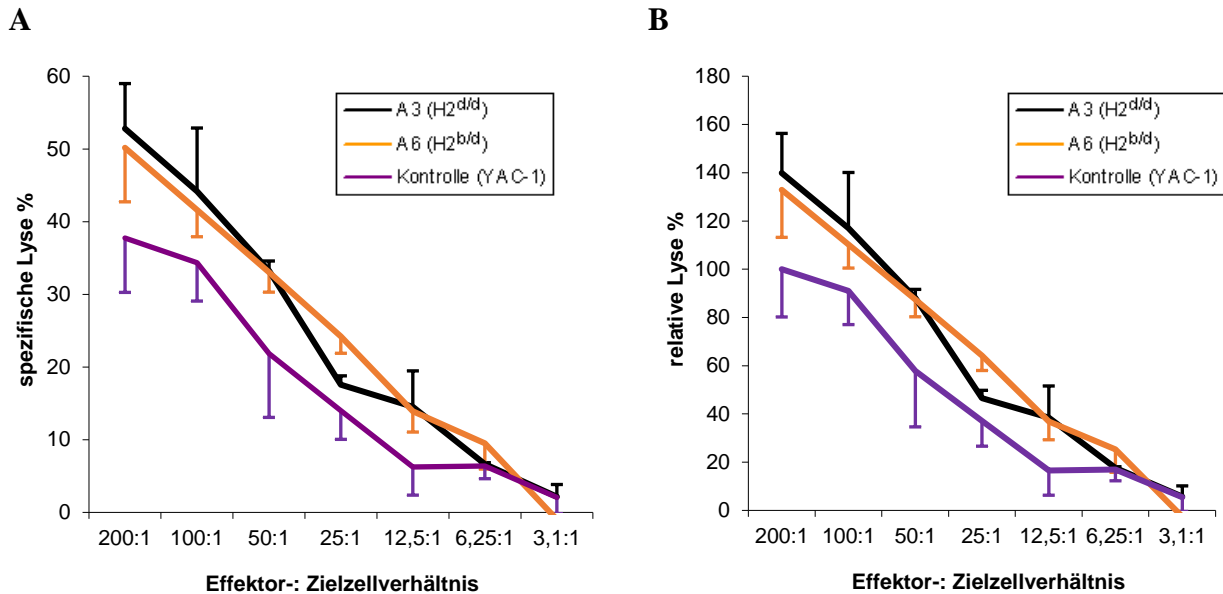


Abb. 3.1 Exemplarischer Test

Dargestellt sind die Ergebnisse eines ⁵¹Chrom-Freisetzungstests, bei welchem LAK-Zellen aus Milzen von 129Sv-Mäusen als Effektorzellen verwendet wurden. Als Zielzellen wurden A3-, A6- und YAC-1-Zellen eingesetzt. Zur besseren Übersicht sind die Standardabweichungen jeweils nur nach oben oder unten angegeben.

A spezifische Lyse. Dargestellt ist die prozentuale Lyse der Zielzellen, bezogen auf die eingesetzte Gesamtzellzahl. Die mittlere spezifische Lyse berechnete sich aus den absolut gemessenen Werten in Triplets mit gleichem Testansatz. Gezeigt ist zudem die Standardabweichung zwischen den einzelnen Rundlöchern der Triplets.

B relative Lyse. Es wurde die spezifische Lyse der Zielzellen auf die höchste spezifische Lyse der Kontrollzellen (YAC-1 bei einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 200:1) bezogen und prozentual dargestellt.

Die Ergebnisse der ⁵¹Chrom-Freisetzungstests sind in den Abb. 3.2 zusammengefasst. In die Gesamtauswertung wurden hierbei Experimente eingebracht, welche eine spezifische Lyse von >35% für die Kontrollzelllinie (YAC-1) bei einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 200:1 aufwiesen. Da davon auszugehen ist, dass die LAK-Zellen bei einer geringeren spezifischen Lyse nicht ausreichend stimuliert wurden, wurden Ergebnisse mit einer geringeren spezifischen Lyse der Kontrollzellen aus der Gesamtauswertung ausgeschlossen.

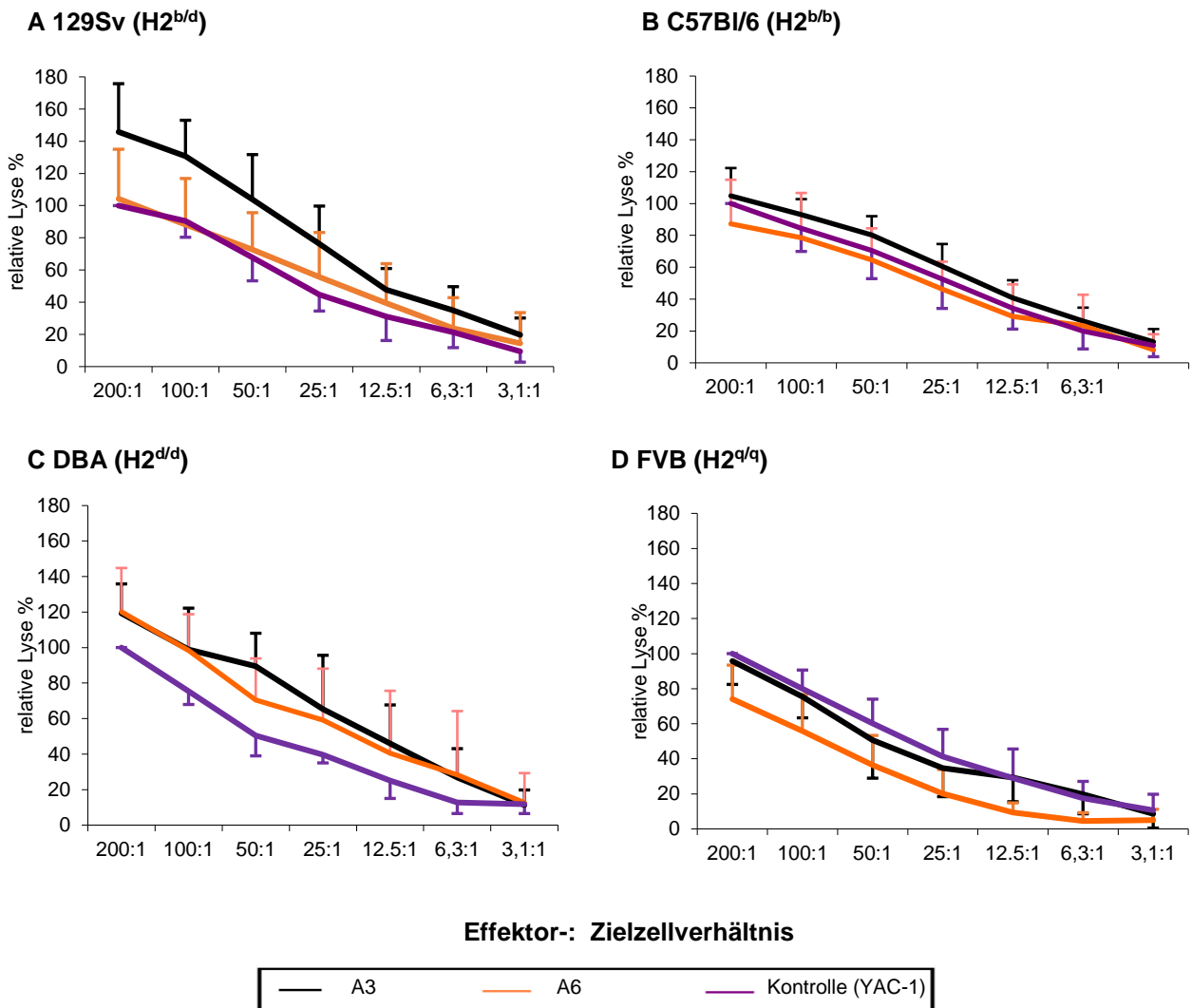


Abb. 3.2 Gesamtauswertung ⁵¹Chrom-Freisetzungstests: LAK-Zellen und undifferenzierte PSC

Die Überschrift der Diagramme zeigt die Herkunft der Effektorzellen an. Als Zielzellen wurden A3-, A6- und YAC-1-Zellen eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Lyse. Die Balken geben die Standardabweichung (SD) an.

A 129Sv. A3: n=5; A6: n=5. Im Vergleich mit Effektorzellen anderer Stämme werden A3-Zellen stärker als Zellen der Linie A6 lysiert. Die spezifische Lyse lag bei einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 200:1 für A3 durchschnittlich bei 66,03 % (SD: 11,1), für A6 bei 48,28% (SD: 9,89)

B C57Bl/6. A3: n=4; A6: n=6. Die spezifische Lyse lag für A3 durchschnittlich bei 48,82 % (SD:18,38), für A6 bei 44,94% (SD:18,77)

C DBA. A3: n=4; A6: n=3. Spezifische Lyse A3: 53,87 % (SD: 12,26), A6: 53,37 % (SD:15,82)

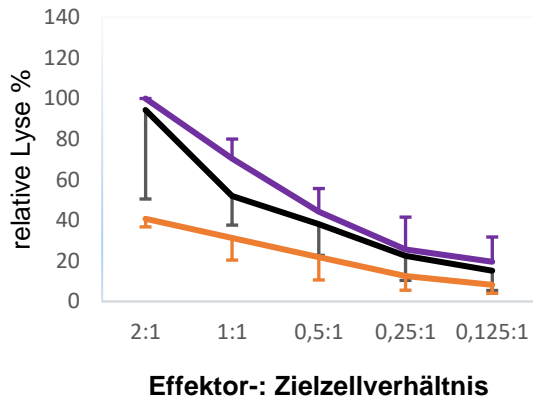
D FVB. A3: n=5; A6: n=6. Die geringste Lyse im Vergleich zu der Kontrollzelllinie zeigten sowohl A3- als auch A6-Zellen, die durch LAK-Zellen aus FVB (H2^{q/q}) lysiert wurden. Die durchschnittliche spezifische Lyse lag für A3 bei 52,41 % (SD: 10,26), für A6 bei 36,88 % (SD: 13,12)

Auffallend ist die gute Lysierbarkeit der parthenogenetischen Stammzellen durch LAK-Zellen, welche - mit Ausnahme der aus FVB-Mäusen gewonnenen LAK-Zellen - stärker als die Kontrollzellen (YAC-1) lysiert werden.

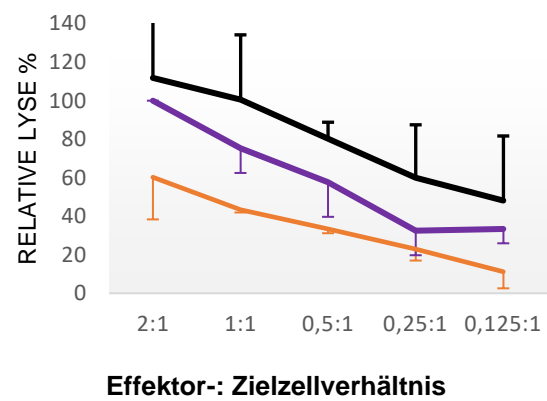
Um zu überprüfen, ob die Lyse der LAK-Zellen vornehmlich durch NK-Zellen vermittelt wurde, wurden NK-Zellen aus Milzen der Mausarten Balb/c (H2^{d/d}), DBA (H2^{d/d}) und C57/Bl6 (H2^{b/b}) angereichert und wie zuvor die LAK-Zellen im ⁵¹Chrom-

Freisetzungstest eingesetzt (Abb. 3.3). Auch hier zeigte sich eine gute Lysierbarkeit der PSC. Es sei beachtet, dass das Effektor-: Zielzellverhältnis nur 1% dessen der Experimente mit LAK-Zellen.

A Balb/c (H2^{d/d})



B DBA (H2^{d/d})



C C57/BI6 (H2^{b/b})

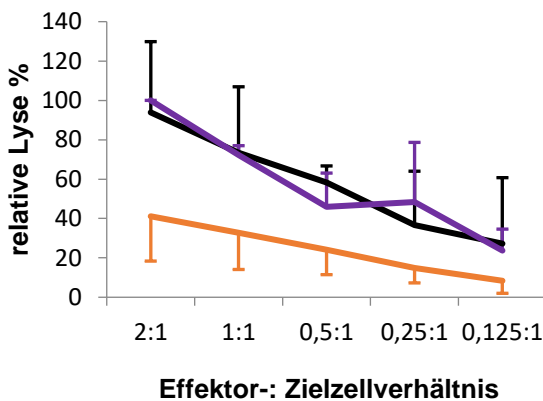


Abb. 3.3 Gesamtauswertung ⁵¹Chrom-Freisetzungstests: NK-Zellen und undifferenzierte PSC

Die Überschrift der Diagramme zeigt die Herkunft der Effektorzellen an. Als Zielzellen wurden A3-, A6- und YAC-1-Zellen eingesetzt. Die Balken geben die Standardabweichung (SD) an. Dargestellt ist die relative Lyse.

A Balb/c. A3: n=3; A6: n=3. Die spezifische Lyse lag bei einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 200:1 für A3 durchschnittlich bei 35,6 % (SD: 1,84), für A6 bei 17 % (SD: 7,2)

B DBA. A3: n=3; A6: n=3. Die spezifische Lyse lag für A3 durchschnittlich bei 71,8 % (SD:33,2), für A6 bei 36,8 % (SD: 8,9)

C C57/BI6 A3: n=3; A6: n=3 Die spezifische Lyse lag für A3 durchschnittlich bei 58,7 % (SD: 22,9), für A6 bei 26,6 % (SD: 11,7)

3.1.2 Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf parthenogenetischen Stammzellen in der Durchflusszytometrie

MHC-Klasse-I-Moleküle können die Lyse durch NK-Zellen inhibieren. Auf verschiedenen murinen Stammzelllinien konnte jedoch keine Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen in durchflusszytometrischen Messungen nachgewiesen werden, was die gute Lysierbarkeit von Stammzellen durch NK-Zellen mitbedingen könnte. Auch die parthenogenetischen Stammzellen der Linien A3 und A6 wurden mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich einer Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen überprüft. Abb. 3.4 zeigt exemplarisch eine Messung von H2D^d- und H2K^d-Molekülen.

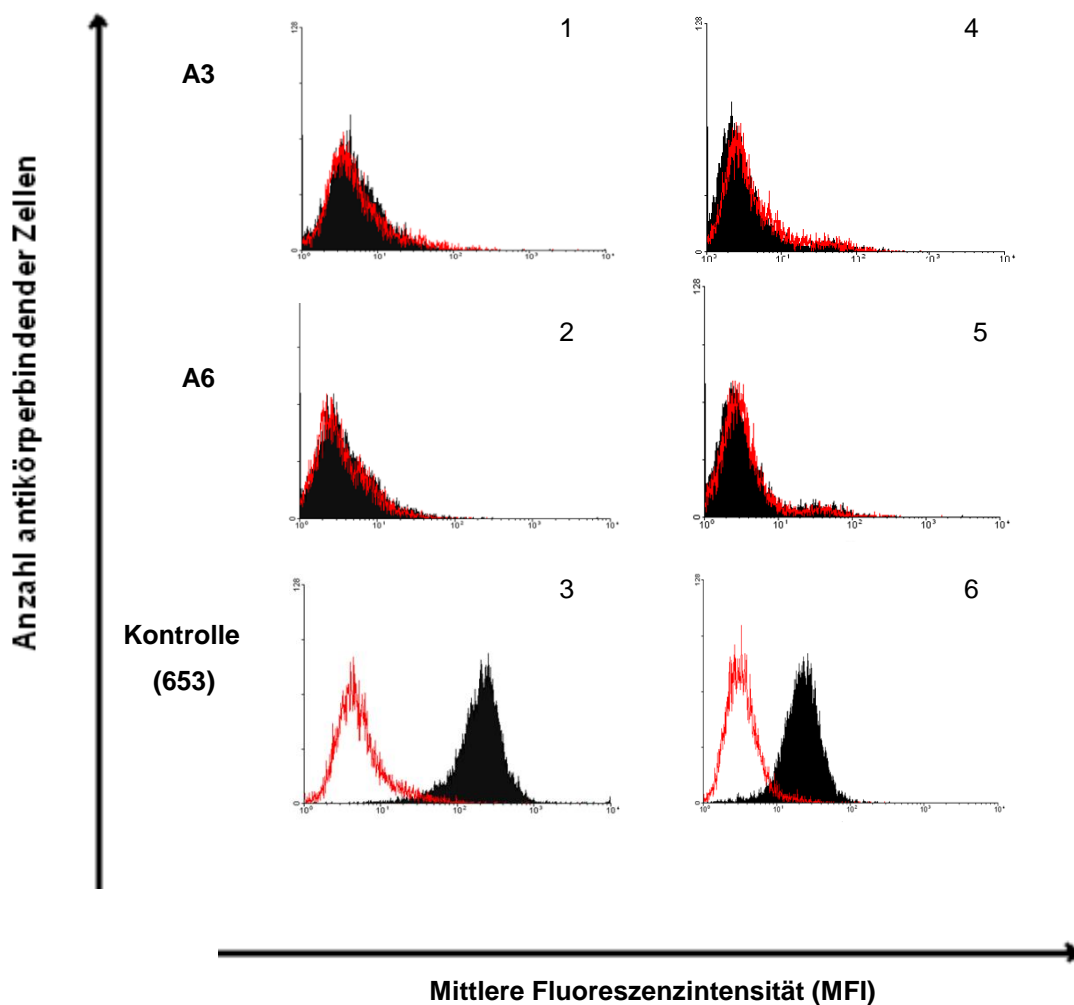


Abb. 3.4 Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf parthenogenetischen Stammzellen: exemplarische Grafik einer durchflusszytometrischen Messung

Die Grafiken 1-3 zeigen die durchflusszytometrisch gemessene Expression von H2K^d, die Grafiken 4-6 die Expression von H2D^d. Die Isotypkontrollen sind in Rot, die gemessenen antikörperbindenden Zellen in Schwarz dargestellt.

Es konnte, wie bereits in Abb. 3.4 angedeutet, in der Durchflusszytometrie im Allgemeinen keine Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf den parthenogenetischen Stammzellen nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich einzelne Messungen schwach positiv. Als Kontrolle für die Funktion der Antikörper wurden parallel MHC-Klasse-I-positive Zellen getestet (RMA-Zellen für H2K^b und H2D^b, sowie 653-Zellen für H2K^d und H2D^d). Eine Zusammenfassung der einzelnen Messungen zeigt Abb. 3.5.

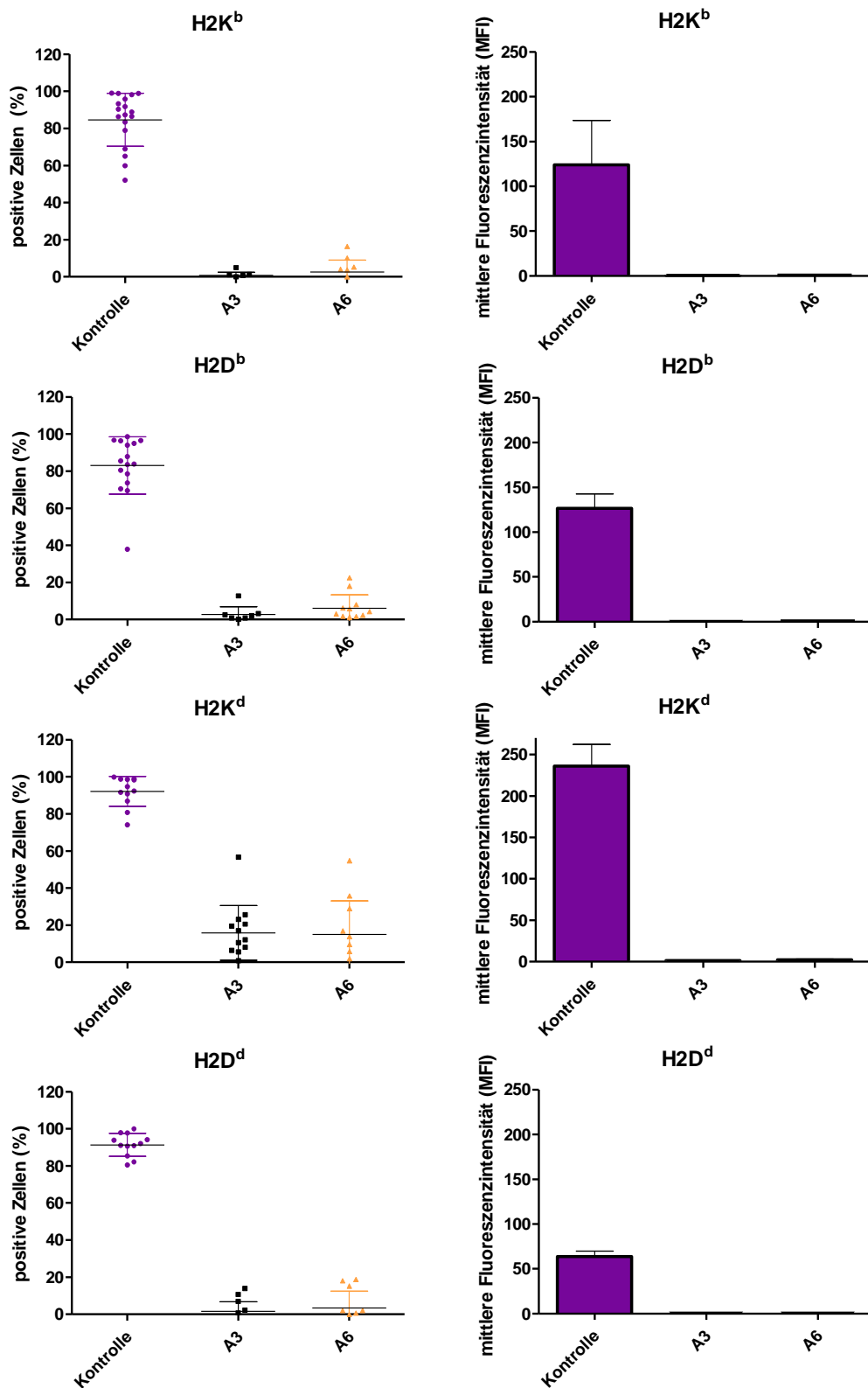


Abb. 3.5 MHC-Klasse-I-Expression auf PSC in der Durchflusszytometrie

Als Kontrolle fungierten Zellen, von welchen eine Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle bekannt ist: für H2K^b und H2D^b wurden RMA-Zellen, für H2K^d und H2D^d 653-Zellen eingesetzt. Auf der linken Seite dargestellt ist jeweils die mittlere Anzahl positiv gefärbter Zellen einschließlich der Standardabweichung (SD) der einzelnen Messungen. Rechts wird die mittlere Fluoreszenzintensität der Messungen einschließlich der Abweichung vom Mittelwert (SEM) angegeben.

H2K^b: Kontrolle: n=18, A3: n=9, A6: n=11; H2D^b: Kontrolle: n=16, A3: n=5, A6: n=12;
 Kontrolle: n=12, A3: n=13, A6: n=11; H2D^d: Kontrolle: n=14, A3: n=14, A6: n=12

H2K^d:

3.1.3 Expression von MHC-Klasse-I-mRNA in der rtPCR

Die Expression verschiedener Gene der parthenogenetischen Stammzellen wurde mittels rtPCR zudem auf Ebene der mRNA untersucht (Abb. 3.6).

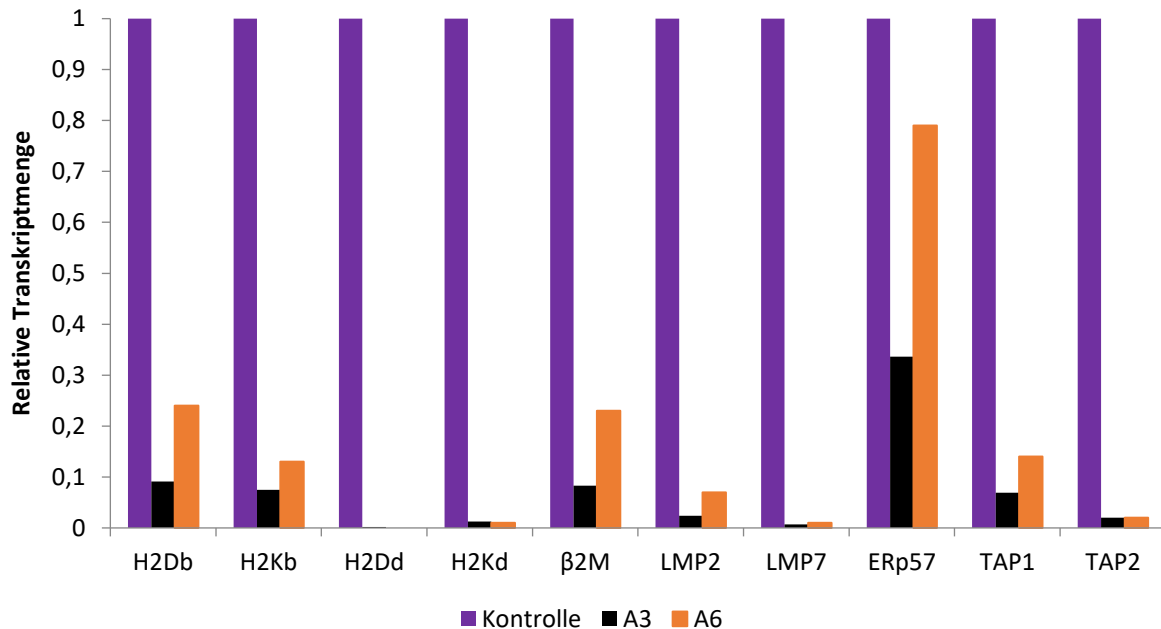


Abb. 3.6 Expression von mRNA des MHC-Klasse-I-Komplexes und assoziierter Proteine

In der quantitativen rtPCR wurden die Zelllinien A3 und A6 auf die Expression von mRNA untersucht (Kontrollzelllinien für H2K^d und H2D^d: Milzzellen aus DBA, für weitere dargestellte Ergebnisse: RMA). Die Berechnung der Daten erfolgte mithilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methoden nach Pfaffl, die Werte sind als relative Transkriptionsmenge in Bezug auf die Kontrollzelllinien als $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ dargestellt. Die Normalisierung erfolgte auf HPRT.

Im Vergleich mit den Kontrollzelllinien zeigten die untersuchten Stammzelllinien eine deutlich geringere Expression von mRNA der meisten analysierten Gene. So lag der relative Expressionsunterschied von MHC-Klasse-I-mRNA der PSC zu RMA- (H2^b) und DBA-Zellen (H2^d) bei durchschnittlich 0,2% nach Normalisierung auf HPRT. Auch mRNA der MHC-Klasse-I-Komplex assoziierten Moleküle wie den Subeinheiten des Proteasoms LMP2 und LMP7 oder dem Antigentransporter TAP wurde vergleichsweise wenig gebildet.

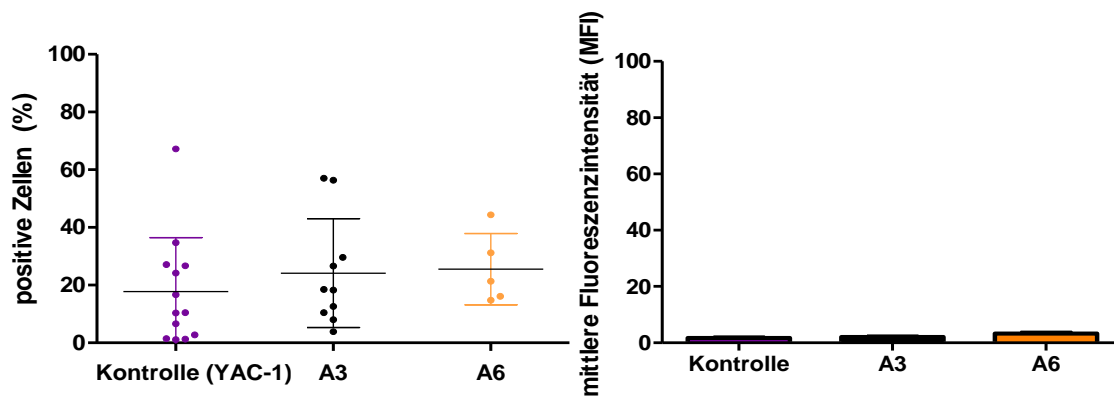
3.1.4 Expression NK-Zell-aktivierender Liganden auf parthenogenetischen Stammzellen in der Durchflusszytometrie

Aufgrund der guten Lysierbarkeit der PSC durch LAK stellte sich die Frage, ob PSC NK-Zell-aktivierende Liganden exprimieren. Dies wurde sowohl durchflusszytometrisch wie auch mittels rtPCR untersucht. Die Ergebnisse fassen Abb. 3.7 und 3.8 zusammen.

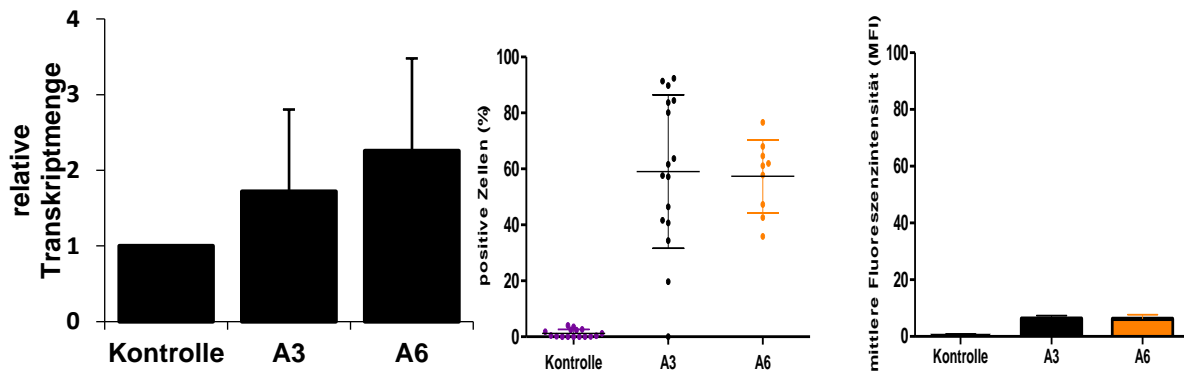
Hierbei wurde die Bindung von rekombinantem DNAM-1 (CD226), einem aktivierenden Rezeptor auf NK-Zellen, an PSC sowie die Expression der beiden wichtigsten Liganden von DNAM-1, CD112 und CD155 auf PSC analysiert. Als Kontrolle dienten Zellen der Linie YAC-1 (vgl. Abb. 3.7).

Zum anderen wurde die Bindung eines rekombinanten NK-Zell-Rezeptors NKG2D an die PSC-Linien untersucht. Auch die Expression der Liganden dieses Rezeptors, Rae-1, Mult-1 und H60, wurde überprüft (Abb. 3.8).

A Bindung an DNAM-1



B CD112



C CD155

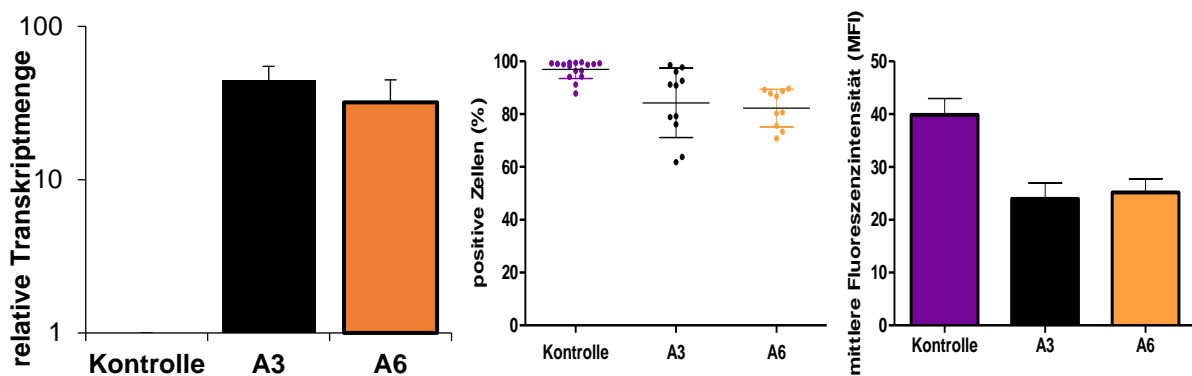


Abb. 3.7 Expression NK-Zell-aktivierender Liganden auf PSC: DNAM-1

A Bindung an DNAM-1 Kontrolle (YAC-1) n=13, A3 n=10, A6 n=5. Die Messung erfolgte nach Zugabe von FITC-gebundenen Sekundärantikörpern, die an zuvor zugegebenes, rekombinantes DNAM-1 banden. Dargestellt ist der prozentuale Anteil DNAM-1-bindender Zellen abzüglich der Werte des Sekundärantikörpers. Ein Punkt entspricht einer Messung, angegeben sind zudem der Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (SD).

B CD112 Durchflusszytometrie: Kontrolle (YAC-1): n=16, A3 n=16, A6 n=9; rtPCR: n=3.

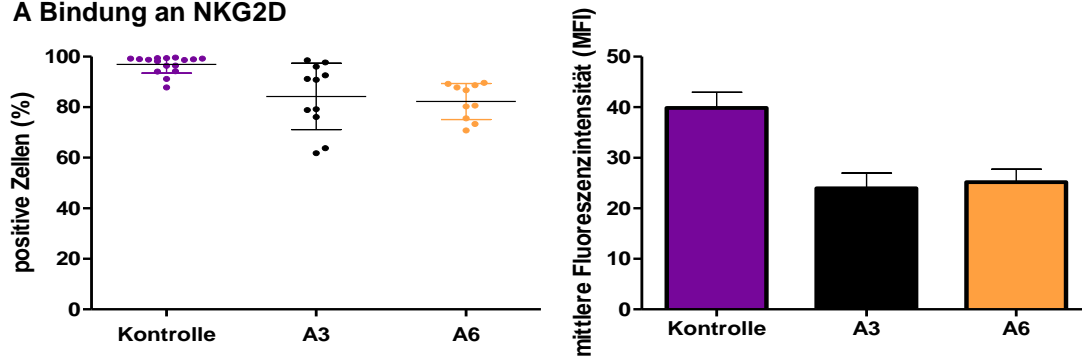
In der quantitativen rtPCR wurden die Zelllinien A3 und A6 auf die Expression von mRNA zu CD112 untersucht. Die Berechnung der Daten der rtPCR erfolgte mithilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methoden nach Pfaffl, die Werte sind als relative Transkriptionsmenge in Bezug auf die Kontrollzelllinien als $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ dargestellt. Die Normalisierung erfolgte auf HPRT.

C CD155 Durchflusszytometrie: Kontrolle (YAC-1): n=16, A3 n=11, A6 n=10; rtPCR: n=3.

Die Berechnung der Daten der rtPCR erfolgte wie in Abb. 3.6. Die Ergebnisse sind logarithmisch dargestellt.

Während sowohl die Kontrollzelllinie (YAC-1) als auch die PSC in den einzelnen durchflusszyometrischen Experimenten unterschiedlich stark an DNAM-1 banden, zeigten sich die PSC in den durchflusszytometrischen Messungen deutlich positiv für CD155 und in einzelnen Messungen positiv für CD112. Für beide Liganden zeigte sich, normalisiert auf HPRT, eine erhöhte Expression von mRNA im Vergleich zu YAC-1-Zellen.

A Bindung an NKG2D



B Liganden NKG2D

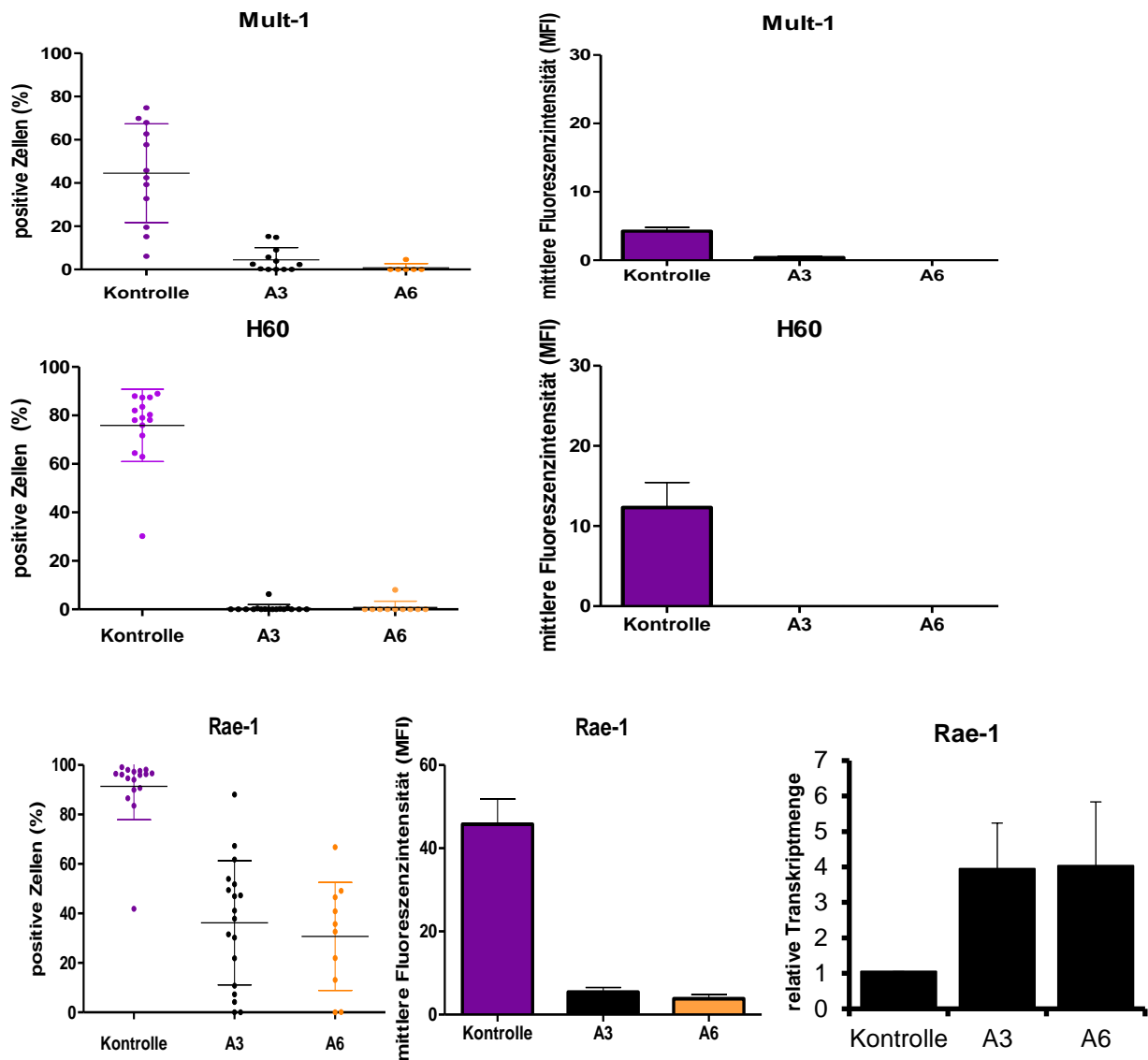


Abb. 3.8 Expression NK-Zell-aktivierender Liganden auf parthenogenetischen Stammzellen: NKG2D

A Bindung an NKG2D. Die Messung erfolgte nach Zugabe von FITC-gebundenen Sekundärantikörpern, die an zuvor zugegebenes rekombinantes NKG2D banden. Die Zusammenstellung der Ergebnisse erfolgte wie in Abb. 3.7. Kontrolle n=12, A3 n=10, A6 n=6

B Liganden von NKG2D. Durchflusszytometrie: Mult-1 Kontrolle n=12, A3 n=12, A6 n=6; H60 Kontrolle n=15, A3 n=15, A6 n=10; Rae-1 Kontrolle n=17, A3 n=17, A6 n=10
rtPCR: n=3. Die Berechnung der Daten erfolgte mithilfe der $\Delta\Delta CT$ -Methode, die Werte sind als $2^{-\Delta\Delta CT}$ dargestellt. Die Normalisierung erfolgte auf HPRT.

Die PSC zeigten eine Interaktion mit rekombinanten NKG2D, einem der wichtigsten aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren. Murine Zellen können H60, Mult1 und Rae-1 als Liganden von NKG2D exprimieren. Die PSC wurden daher auf die Expression dieser drei Liganden getestet und es konnte eine Expression von Rae-1, jedoch keine wesentliche Expression von H60 oder Mult1 in der Durchflusszytometrie gezeigt werden (vgl. Abb. 3.8 B).

In der rtPCR zeigte sich, dass die Linien A3 und A6 mehr mRNA von Rae-1 als die Kontrollzellen (YAC-1) exprimierten.

Die Zellen wurden weiterhin auf eine Interaktion mit 2B4 und NKp46, zwei aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren, untersucht. Diese ließen sich jedoch nicht nachweisen. Auch konnte keine Expression von CD48, welches über eine Interaktion mit 2B4 die NK-Zell-Antwort beeinflusst, auf den parthenogenetischen Linien gezeigt werden.

3.2 Auswirkungen Peptid-spezifischer CTL auf parthenogenetische Stammzellen

3.2.1 Lyse parthenogenetischer Stammzellen durch CTL aus OT-I-Mäusen

Zur Bestimmung der Lyse der PSC durch CTL aus OT-I-Mäusen wurde der ⁵¹Chrom-Freisetzungstest eingesetzt. OT-I-Mäuse sind transgen für einen Rezeptor, welcher auf H2K^b präsentierte SIINFEKL erkennt. Als Kontrollzellen dienten RMA-Zellen, von denen eine gute Lysierbarkeit durch CTL aus OT-I-Mäusen bekannt ist. Die Experimente beinhalteten zudem eine Negativkontrolle, welcher kein SIINFEKL zugegeben wurde und somit die Peptidspezifität sichern sollte. Als Nachweis, dass die Lyse über den Granula-Exozytose-Weg vermittelt und somit kalziumabhängig war, wurde zu einem Triplett zudem ein Ca²⁺-Chelator, EDTA, gegeben (s. Abb 3.9).

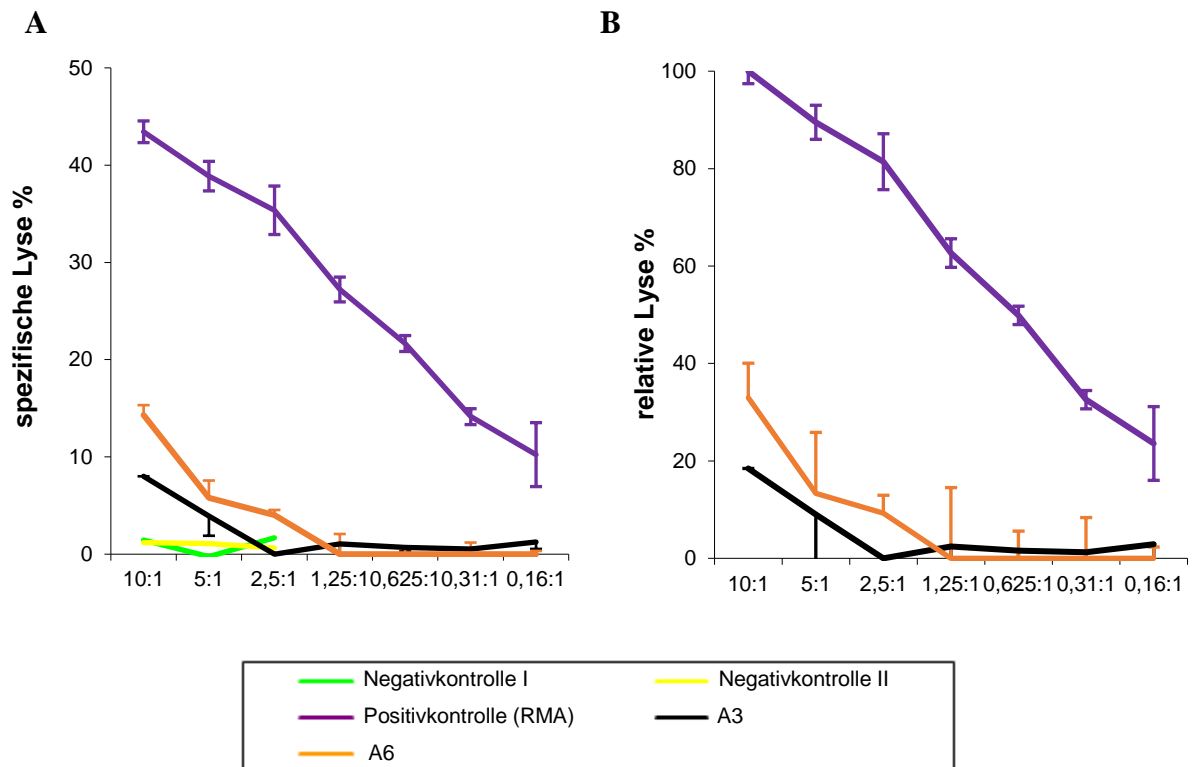
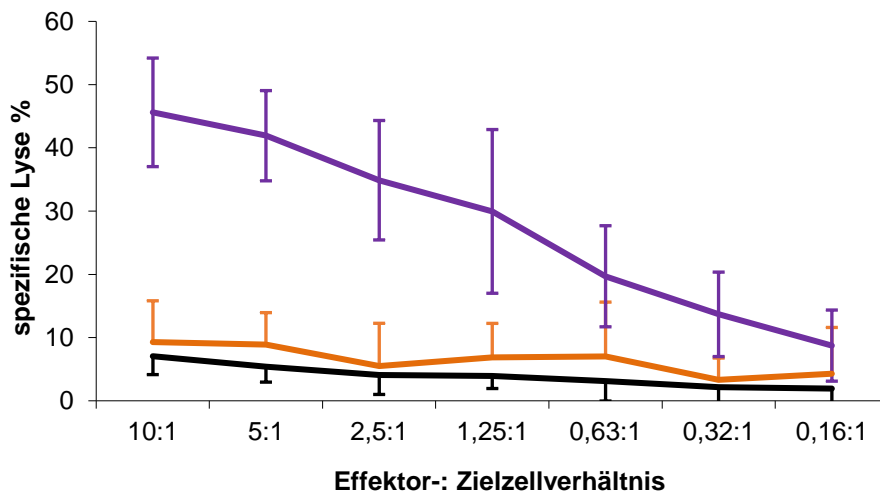
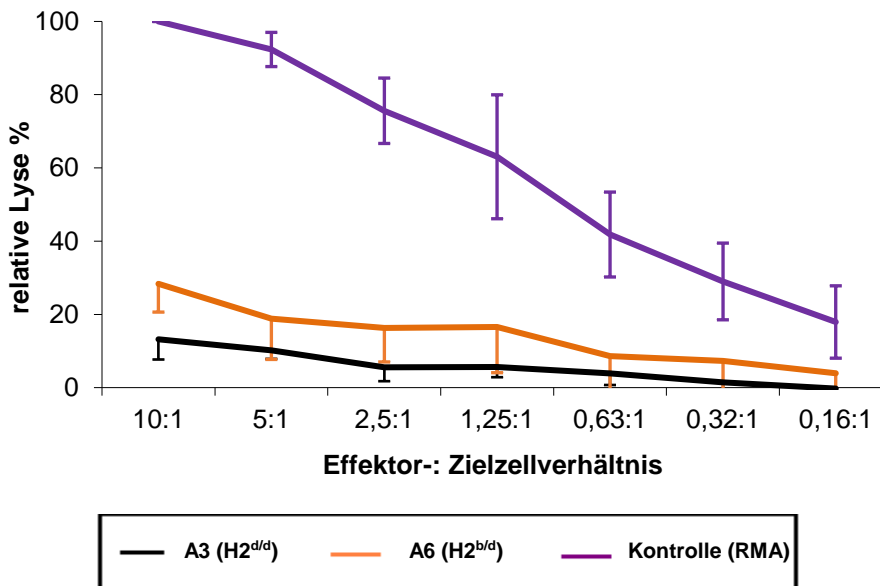


Abb. 3.9 Exemplarischer ⁵¹Chrom-Freisetzungstest

A spezifische Lyse. Exemplarisch ist ein Experiment dargestellt. Die Kontrollen zeigen die Peptidspezifität (Negativkontrolle I: RMA + SIINFEKL) sowie eine Abhängigkeit der Lyse von Kalzium (Negativkontrolle II: RMA + SIINFEKL + EGTA). Sowohl der Positivkontrolle, als auch den Messungen mit A3- und A6-Zellen wurde SIINFEKL hinzugefügt. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der einzelnen Messungen. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung (SD) der Triplets an.

B relative Lyse. Die Abbildung zeigt dasselbe Experiment wie Abb. 3.9A, dargestellt ist hier jedoch die relative Lyse in Bezug auf die Positivkontrolle. Diese Darstellung macht eine bessere Vergleichbarkeit der Testreihen untereinander möglich.

Die Ergebnisse der Experimente sind in Abb. 3.10 zusammengefasst. Dargestellt ist zum einen die spezifische, zum anderen die relative Lyse, bezogen auf die Kontrollzellen (RMA). Die Berechnung der relativen Lyse erfolgte dabei ähnlich wie zuvor bei den ⁵¹Chrom-Freisetzungstests, zu welchen LAK-Zellen als Effektorzellen eingesetzt worden waren: bei einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 10:1 wurde die Lyse der Kontrollzelllinie als 100% festgesetzt und die Lyse der Zielzelllinien in Relation gesetzt.

A**B****Abb. 3.10 Lyse von PSC durch CTL aus OT-I-Mäusen**

A spezifische Lyse. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der spezifischen Lyse der durchgeführten Experimente. Zusätzlich angegeben ist die Standardabweichung. Kontrolle: n=6, A3: n=4, A6: n=4

B relative Lyse. Um eine Vergleichbarkeit der Tests untereinander zu gewährleisten, wurde die relative Lyse der Zielzellen in Bezug auf die Kontrollzellen (RMA) berechnet. Hierbei wurde der Wert der spezifischen Lyse von RMA-Zellen des höchsten Effektor-: Zielzellverhältnisses von 10:1 100% gleichgesetzt.

Die homologen PSC (A3), welche aufgrund ihres Hintergrundes (H2^{d/d}) kein H2K^b exprimieren und somit von peptidspezifischen CTL aus OT-I-Mäusen nicht erkannt werden, wurden nicht lysiert. Allerdings zeigten auch die heterologen PSC (A6: H2^{b/d}) im Vergleich zur Kontrolle (RMA) nur eine geringe Lysierbarkeit. Dies warf die Frage auf, ob sich PSC gegen Lyse durch CTL zu schützen vermögen und ob die niedrige

Lyse beispielsweise durch die geringe Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen zu erklären sei.

3.2.2 Lyse parthenogenetischer Stammzellen durch OT-I-Zellen nach Behandlung mit Interferon- γ

Es ist bekannt, dass Interferon- γ die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen steigern kann. Da die geringe Lyse parthenogenetischer Stammzellen in Zusammenhang mit der niedrigen Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen stehen könnte, wurde versucht, die MHC-Klasse-I-Expression durch Behandlung mittels Applikation von Interferon- γ über 48h zu steigern und den Effekt mittels durchflusszytometrischer Analyse und $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest zu überprüfen. Die Ergebnisse fassen Abb. 3.11 und 3.12 zusammen.

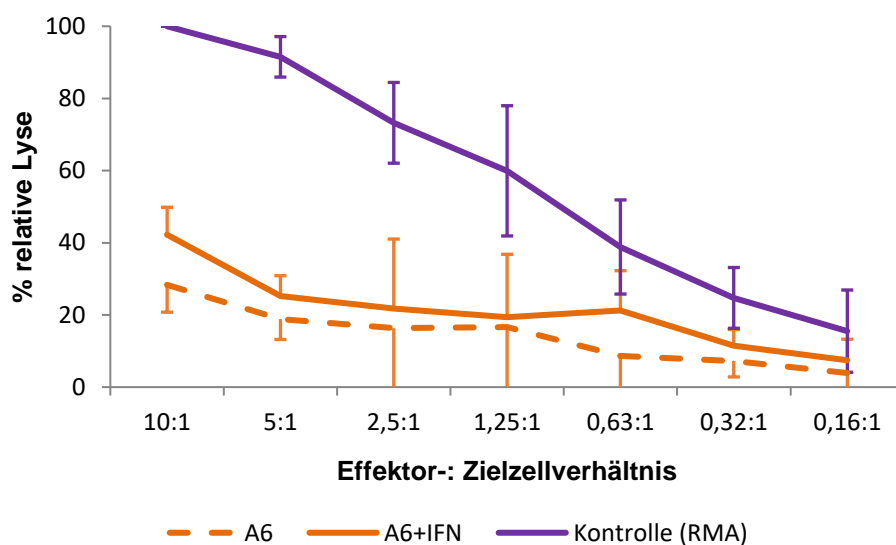


Abb. 3.11 Auswirkungen von Behandlung mit IFN- γ über 48 Stunden

A relative Lyse der mit Interferon- γ behandelten im Vergleich zu unbehandelten Zellen der Linie A6.

n=3. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (MW) der relativen Lyse der durchgeführten Experimente. Die Zielzellen wurden über 48 Stunden mit Interferon- γ inkubiert und anschließend im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest getestet. Angegeben ist zudem die Standardabweichung (SD). Die gestrichelten Linien zeigen unbehandelte, während die durchgezogenen Linien mit Interferon- γ behandelte Zellen darstellen.

Die mit Interferon- γ behandelten Zellen scheinen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen leicht vermehrt lysiert zu werden. Jedoch konnte sich durchflusszytometrisch

keine Steigerung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen nachweisen lassen (vgl. Abb. 3.12).

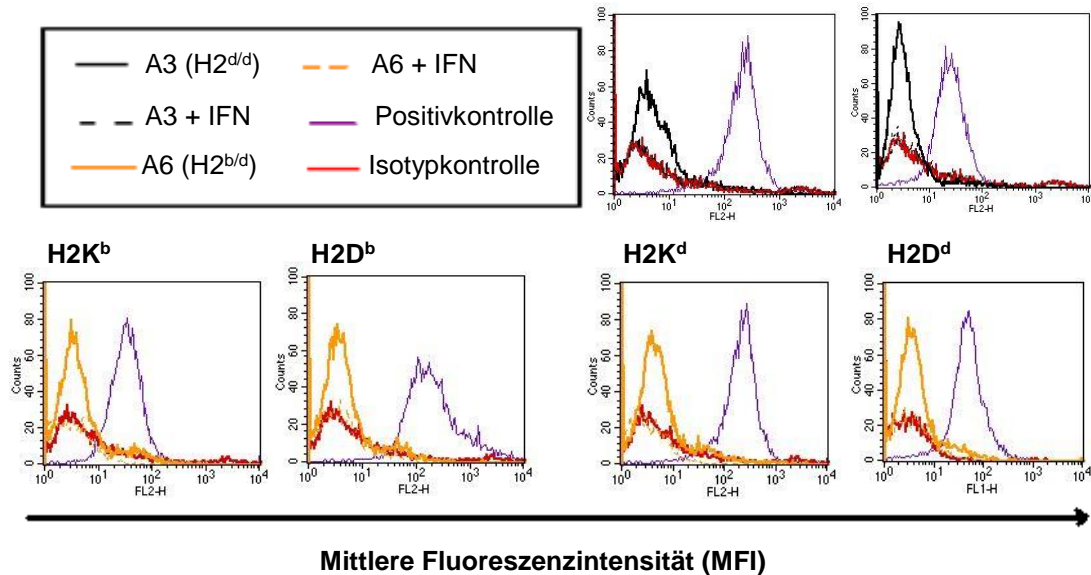


Abb. 3.12 Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf mit Interferon- γ behandelten parthenogenetischen Stammzellen, exemplarische Darstellung durchflusszytometrischer Messungen.

Die Abbildung zeigt einen Vergleich der durchflusszytometrisch gemessenen MHC-Klasse-I-Expression auf parthenogenetischen Stammzellen und solchen, die über 48 Stunden mit Interferon- γ behandelt wurden. Es lässt sich keine vermehrte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen erkennen.

3.2.3 Hinweise auf protektive Faktoren parthenogenetischer Stammzellen gegen CTL

Aufgrund der geringen Lysierbarkeit der PSC durch CTL stellte sich die Frage, ob sich die parthenogenetischen Stammzellen gegen die Zytotoxizität der CD8⁺-Zellen zu schützen vermögen. Bekannte Mechanismen hierzu sind z. B. die Expression von SPI6/Serpinb9, Arginase oder TGF β . Die Zellen wurden daher im Westernblot auf eine Expression von SPI6/Serpinb9 hin untersucht. Hierbei konnte keine Expression nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.13A). Mittels rtPCR wurde die Expression von Arginase, TGF β und SPI6 auf Ebene der mRNA untersucht. Als Kontrolle für die Expression von Arginase dienten murine Leberzellen, für TGF β RMA-Zellen und für SPI6 OTI-Zellen. Auch hier ließ sich keine Expression nachweisen (Abb. 3.13B).

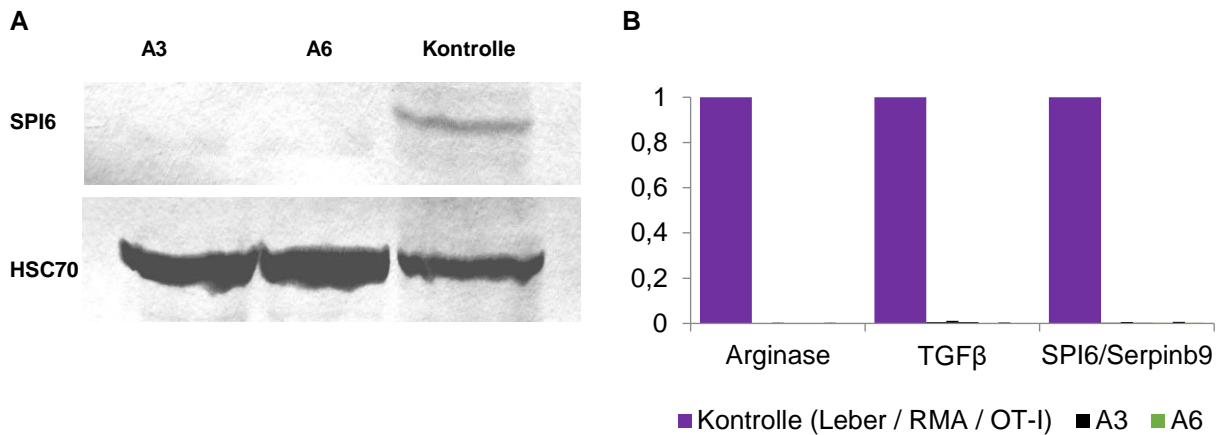


Abb. 3.13 Hinweise auf protektive Faktoren der PSC gegen CTL

A Westernblot. Im Westernblot konnte keine Expression von SPI6 für A3- oder A6-Zellen nachgewiesen werden. Als Kontrolle dienten CTL aus OT-I-Mäusen, welche Serpin99/SPI6 zum Schutz gegen ihre eigene Zytotoxizität exprimieren. HSC70 diente als Ladekontrolle.

B rtPCR. n=3. cDNA zur Kontrolle der Ergebnisse wurde aus Leber (für Arginase), RMA-Zellen (für TGFβ) und OT-I-Mäusen (für SPI6) gewonnen. Die Berechnung der Daten erfolgte nach Pfaffl mithilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, die Werte sind als $2^{-\Delta\Delta CT}$ dargestellt. Die Normalisierung erfolgte auf HPRT.

3.3 Auswirkungen von CTL und NK-Zellen auf parthenogenetische Stammzellen im Vergleich zu differenzierten Zellen

Im Hinblick auf die Transplantierbarkeit differenzierter parthenogenetischer Stammzellen rückten auch die immunologischen Eigenschaften dieser Zellen in den Fokus. Zur Gewinnung differenzierter PSC wurden die Zellen über 12 Tage in einem Differenzierungsmedium gehalten. Um einen Eindruck von dem Grad ihrer Differenzierung zu bekommen, wurden die Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse auf die Expression von SSEA-1 getestet, einem murinen Stammzellmarker (s. Abb. 3.14).

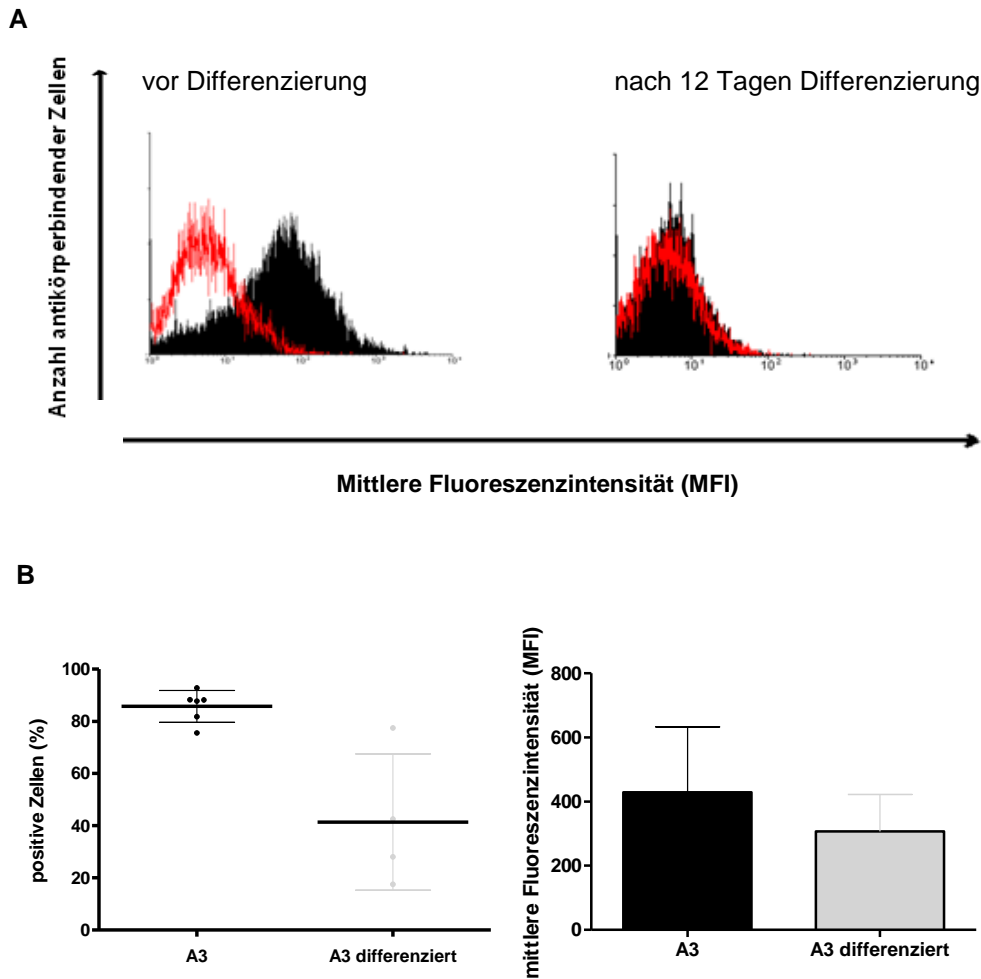


Abb. 3.14 Expression von SSEA-1 in der Durchflusszytometrie

A exemplarische Messung von SSEA-1 in der Durchflusszytometrie. Die Grafik zeigt die durchflusszytometrisch gemessene Expression von SSEA-1 auf A3-Zellen zu Beginn und nach 12 Tagen Differenzierung. In rot ist die Isotypkontrolle, in schwarz die mit SSEA-1-Antikörper behandelten Zellen dargestellt.

B Zusammenschau der Messungen von SSEA-1 auf undifferenzierten und differenzierten A3-Zellen. A3 n=6, A3 differenziert n=4. Angegeben ist der Mittelwert, sowie die Standardabweichung. Die Ergebnisse ergeben sich aus den prozentualen Anteilen positiv gemessener Zellen sowie der durchschnittlichen mittleren Fluoreszenzintensität

3.3.1 Lysierbarkeit undifferenzierter parthenogenetischer Stammzellen durch LAK-Zellen im Vergleich zur Lysierbarkeit differenzierter parthenogenetischer Stammzellen

Zum Vergleich der Lysierbarkeit undifferenzierter und differenzierter parthenogenetischer Stammzellen diente erneut der ⁵¹Chrom-Freisetzungstest. Zur Differenzierung der parthenogenetischen Stammzellen wurden diese für 12 Tage in Differenzierungsmedium gehalten und anschließend - wie bereits die undifferenzierten PSC (s. Abb. 3.1 und 3.2) zuvor - auf ihre Lysierbarkeit durch LAK-Zellen aus Milzen

von Mäusen gleichen (129Sv, C57BL/6, DBA) und unterschiedlichen Haplotyps (FVB) getestet (vgl. Abb. 3.16).

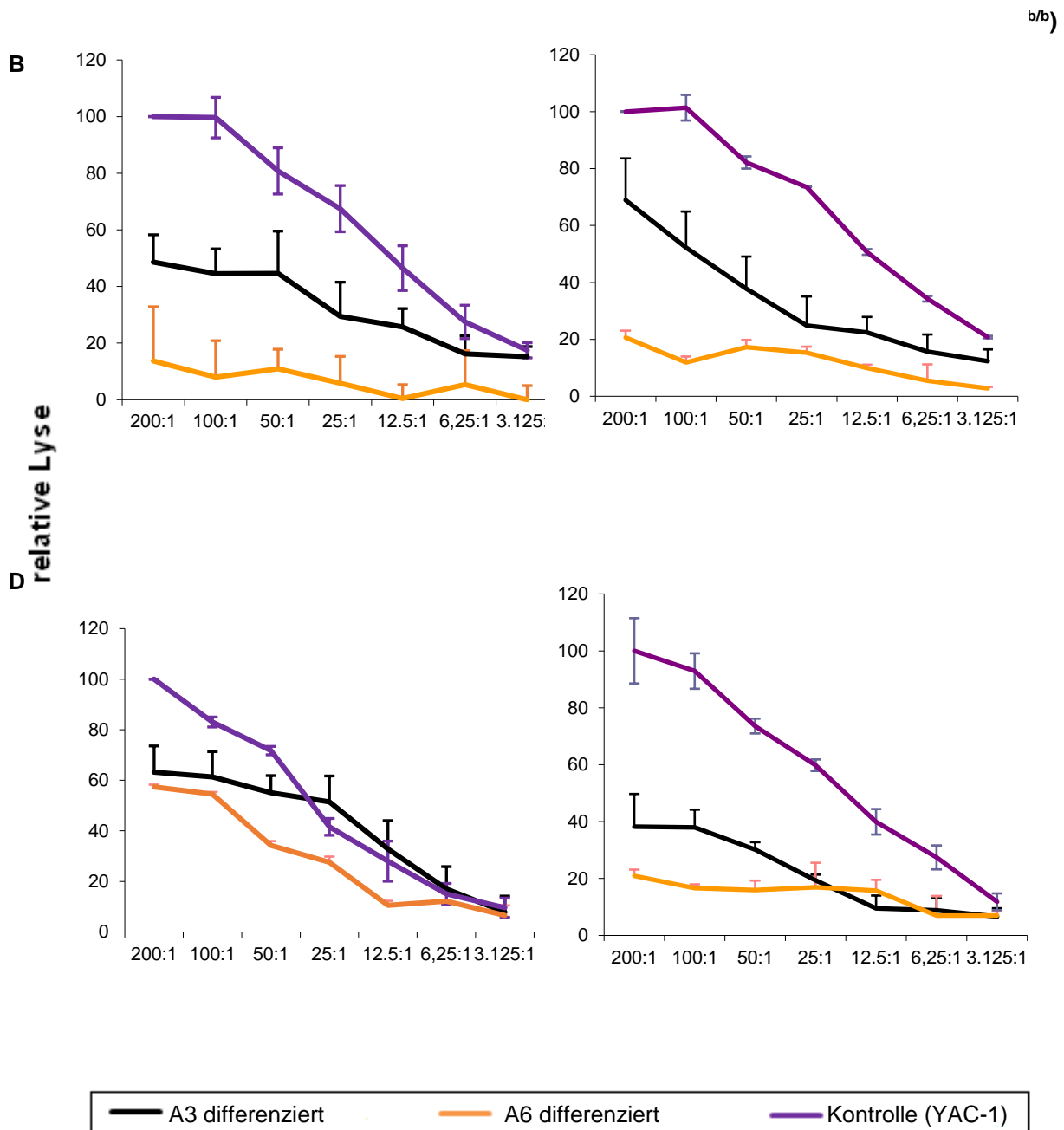


Abb. 3.15 relative Lyse differenzierter PSC durch LAK-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Lyse der einzelnen Experimente der PSC, welche zuvor 12 Tage mit Differenzierungsmedium behandelt wurden. Die Balken geben die jeweilige Abweichung vom Mittelwert an.

A 129Sv. A3 n=6, A6 n=6. A6-Zellen. Die absolute spezifische Lyse lag bei einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 200:1 für A3-Zellen durchschnittlich bei 30,71 % (SD: 7,42), für A6-Zellen bei 9,66 % (SD: 16,41)

B C57BL/6. A3 n=3, A6 n=2. Die spezifische Lyse für A3-Zellen lag durchschnittlich bei 54,24% (SD: 15,5), für A6-Zellen bei 16,33% (SD: 2,72).

C DBA. A3 n=3, A6 n=2. Die spezifische Lyse für A3-Zellen lag durchschnittlich bei 36,45% (SD: 15,73), für A6-Zellen bei 32,17 % (SD: 6,83)

D FVB. A3 n=4, A6 n=2 Spezifische Lyse A3: 26,39% (SD: 12,43), A6: 14,79% (SD: 7,12)

Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der Lysierbarkeit durch LAK-Zellen mit steigendem Grad der Differenzierung (s. Abb 3.17, in zweifaktorieller ANOVA, für alle Tests $p < 0,01$). Auffällig ist zudem, dass A6-Zellen ($H2^{b/d}$) deutlich weniger als A3-Zellen lysiert werden, obwohl sie zuvor unter gleichen Bedingungen gehalten wurden (s. Abb. 3.15 und 3.16).

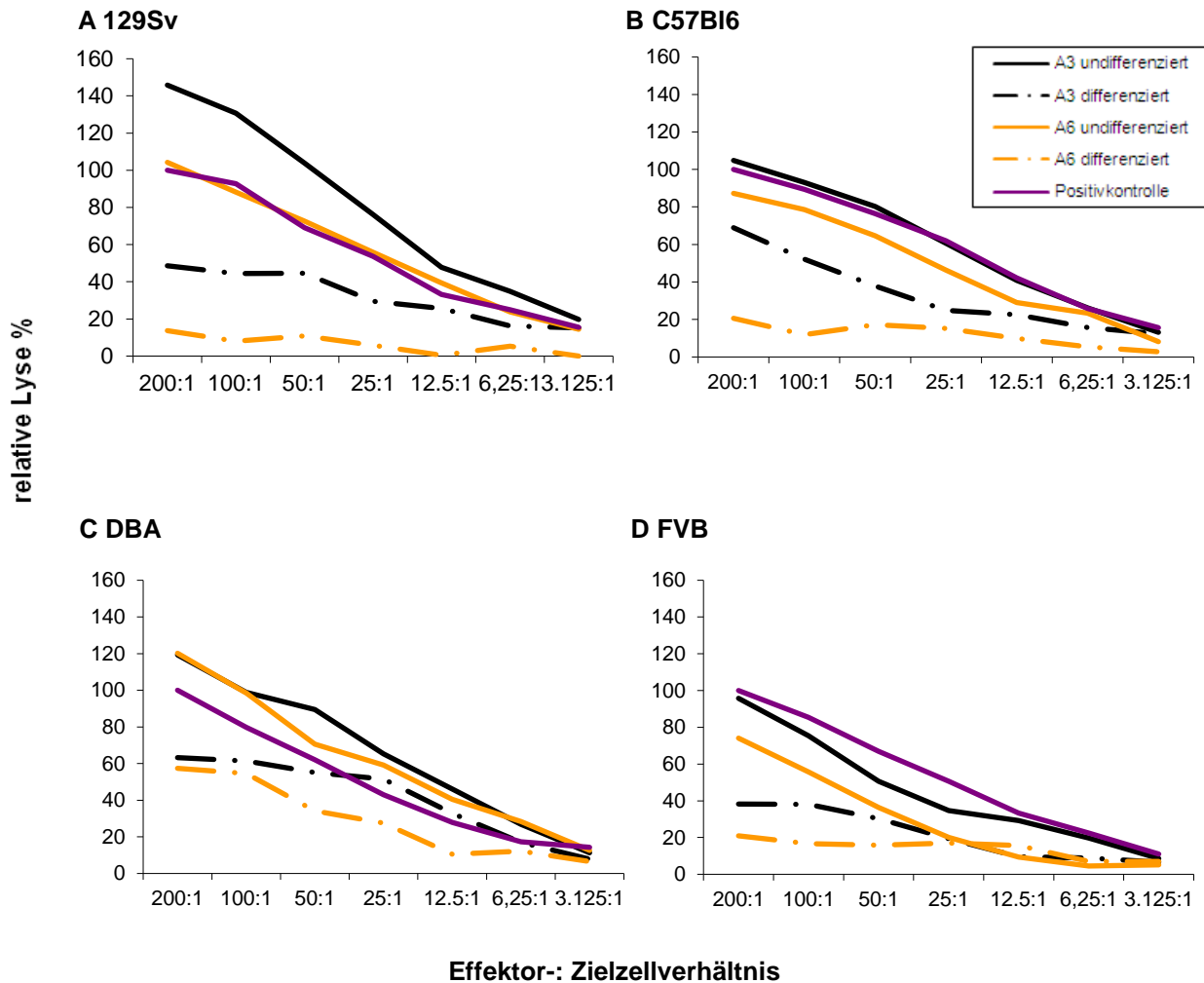


Abb. 3.16 Vergleich der Lysierbarkeit undifferenzierter und differenzierter PSC durch LAK-Zellen
 Dargestellt ist die relative Lyse undifferenzierter und differenzierter PSC gegenüber einer Kontrollzelllinie (YAC-1) durch LAK-Zellen. Auf Standardabweichungen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet, sie sind jedoch den Abb. 3.2 und 3.15 zu entnehmen.

A Lyse durch LAK- Zellen aus 129Sv-Mäusen. A3 undifferenziert $n=5$, A3 differenziert $n=6$, A6 undifferenziert $n=5$, A6 differenziert $n=6$. Deutlich erkennbar ist die mit steigender Differenzierung der Zellen abnehmende Lysierbarkeit.

B Lyse durch LAK- Zellen aus C57BL-Mäusen. A3 undifferenziert $n=4$, A3 differenziert $n=3$, A6 undifferenziert $n=6$, A6 differenziert $n=2$. Wie auch in den anderen Experimenten scheint die Abnahme der Lysierbarkeit bei den Zellen der Linie A6 stärker ausgeprägt als bei den Zellen der Linie A3.

C Lyse durch LAK- Zellen aus DBA-Mäusen. A3 undifferenziert $n=4$, A3 differenziert $n=3$, A6 undifferenziert $n=3$, A6 differenziert $n=2$

D Lyse durch LAK- Zellen aus FVB-Mäusen. A3 undifferenziert $n=5$, A3 differenziert $n=4$, A6 undifferenziert $n=6$, A6 differenziert $n=2$

3.3.2 Lysierbarkeit undifferenzierter parthenogenetischer Stammzellen durch CTL im Vergleich zur Lysierbarkeit ihrer differenzierten Derivate

Im Vergleich mit undifferenzierten PSC zeigten differenzierte PSC im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest eine kaum veränderte Lysierbarkeit durch aus OT-I-Mäusen gewonnenen CTL (Abb. 3.17; $p=0,29$; zweifaktorielle ANOVA). Zu beachten ist, dass A3-Zellen kein H2K^b exprimieren und daher durch CTL aus OT-I-Mäusen nicht Peptid-abhängig lysiert werden können.

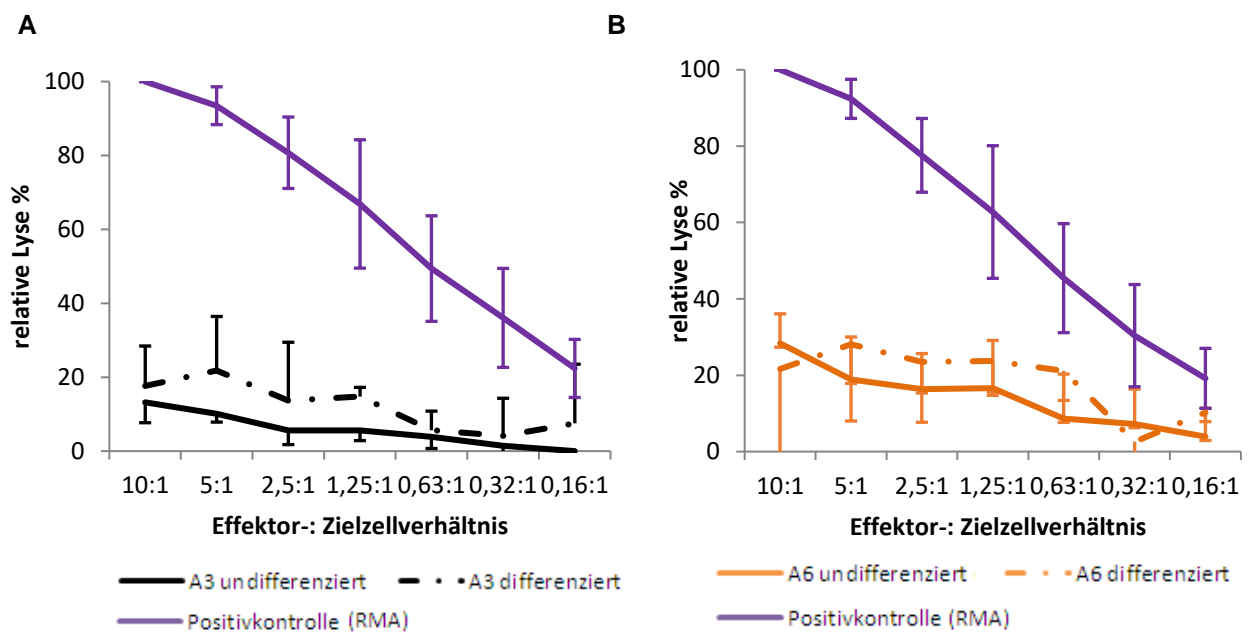


Abb. 3.17 Vergleich der Lysierbarkeit undifferenzierter und differenzierter PSC durch CTL aus OT-I-Mäusen

Ergebnisse der $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest mit CTL aus OT-I-Mäusen. Dargestellt ist die relative Lyse undifferenzierter und differenzierter PSC gegenüber einer Kontrollzelllinie (RMA) als Mittelwerte der einzelnen Messungen. Angegeben ist zudem die Standardabweichung.

A Linie A3. A3 undifferenziert $n=4$; A3 differenziert $n=2$; Positivkontrolle (RMA) $n=6$

B Linie A6. A6 undifferenziert $n=4$; A6 differenziert $n=3$; Positivkontrolle (RMA) $n=6$

3.3.3 MHC-Klasse-I-Expression differenzierter Zellen

Zur inhaltlichen Einordnung der Daten aus den $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstests wurden auch die differenzierten PSC hinsichtlich der Expression verschiedener Moleküle untersucht. Abb. 3.18 zeigt die Expression von MHC-I-Molekülen nach 12 Tagen Differenzierung. Trotz der starken Reduktion der Lysierbarkeit durch LAK im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest ist die durchflusszytometrisch nachweisbare Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche der Zielzellen kaum gestiegen.

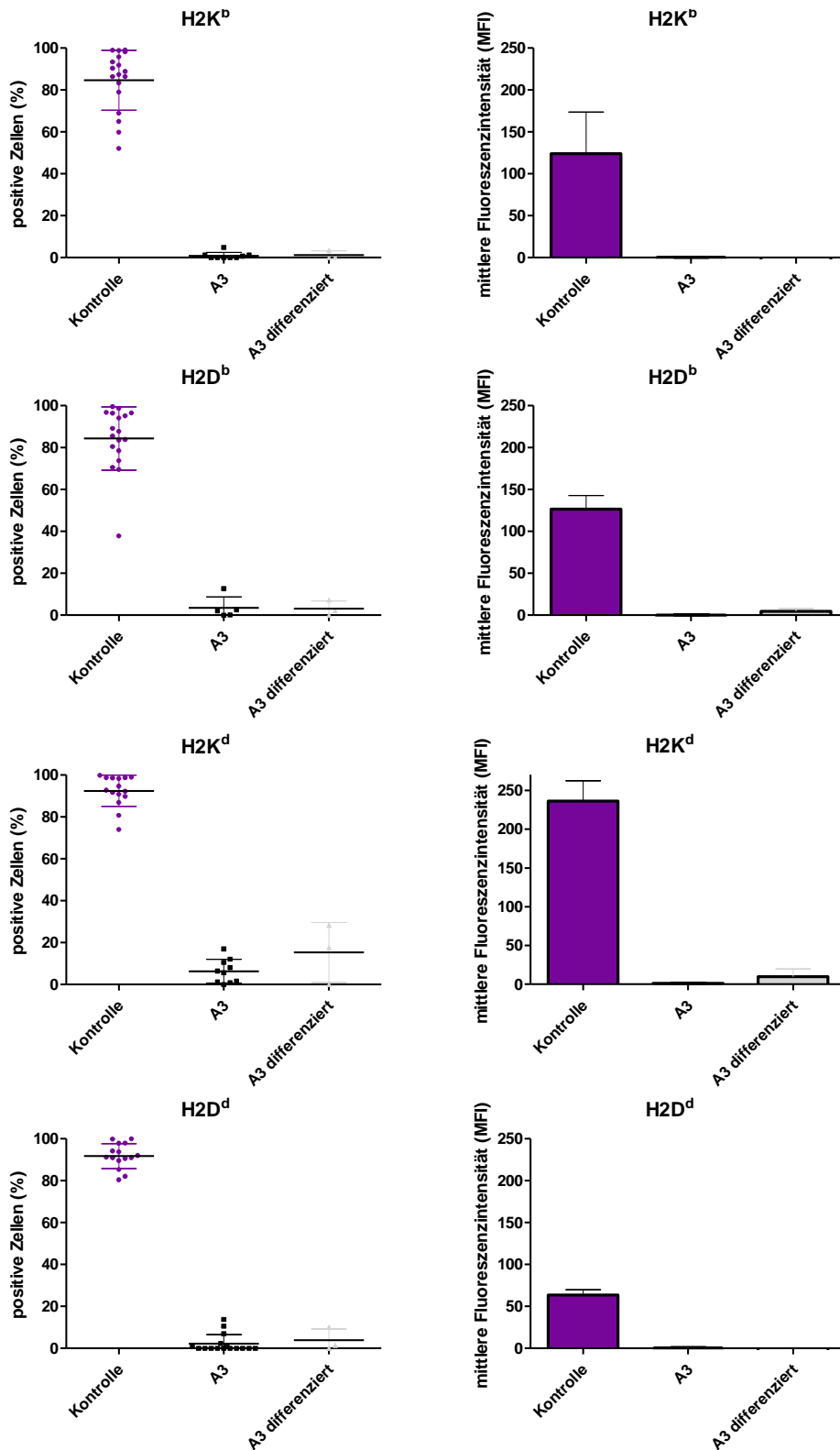


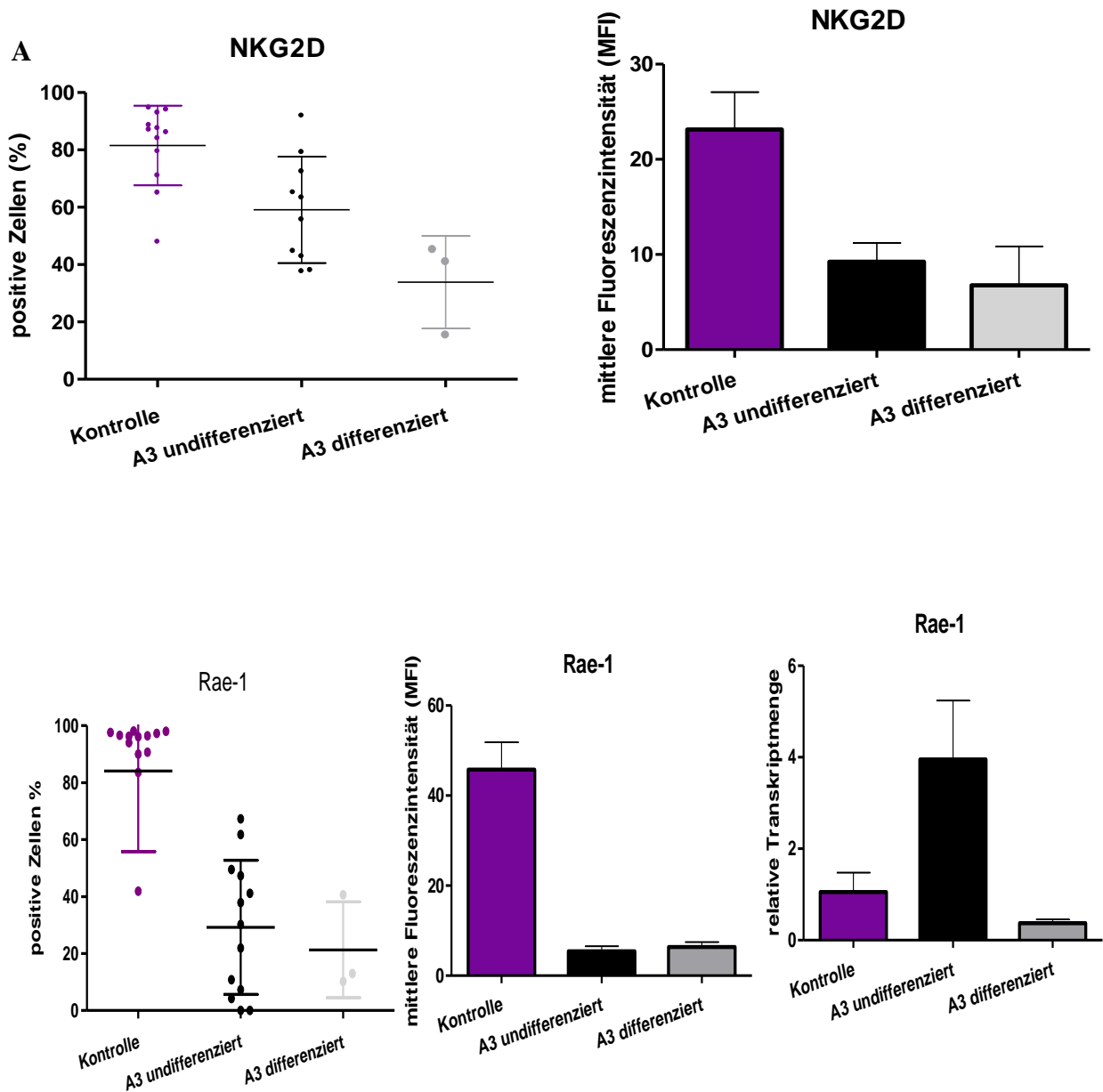
Abb. 3.18 Durchflusszytometrische Messungen der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf differenzierten PSC

Kontrolle für H2K^b und H2D^b: RMA-Zellen; für H2K^d und H2D^d: 653-Zellen. Auf der linken Seite dargestellt ist jeweils die mittlere Anzahl positiv gefärbter Zellen einschließlich der Standardabweichung (SD) der einzelnen Messungen. Rechts wird die mittlere Fluoreszenzintensität der Messungen einschließlich der Abweichung vom Mittelwert (SEM) angegeben.

H2K^b: Kontrolle: n=18, A3: n=9, A3 differenziert: n=3; H2D^b: Kontrolle: n=18, A3: n=5, A3 differenziert: n=3; H2K^d: Kontrolle: n=15, A3: n=10, A3 differenziert: n=3; H2D^d: Kontrolle: n=15, A3: n=15, A3 differenziert: n=3

3.3.4 Veränderung der Expression NK-Zell-aktivierender Liganden während der Differenzierung der parthenogenetischen Stammzellen

Auch die Expression verschiedener NK-Zell-Liganden, insbesondere Rae-1 und CD155 der differenzierten Derivate wurde mit der Expression der Stammzellen verglichen. Die Ergebnisse fasst Abb. 3.19 graphisch zusammen.



B CD155

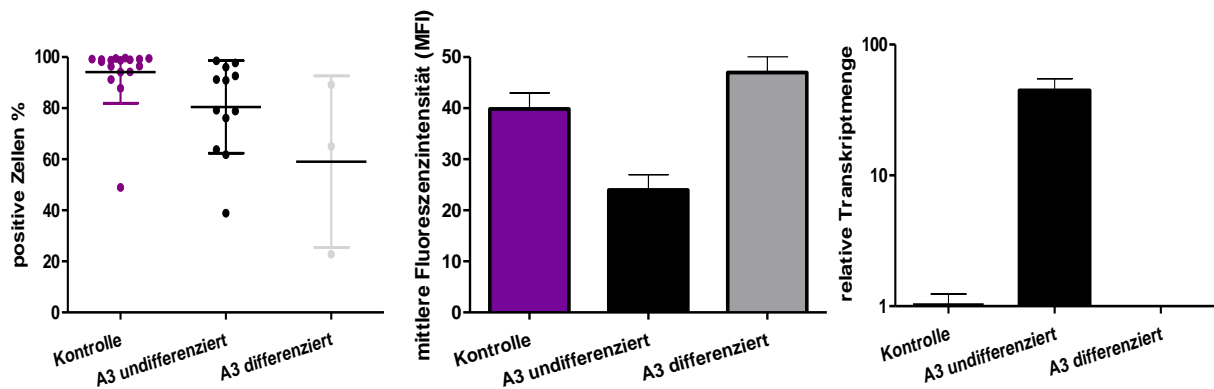


Abb. 3.19 Vergleich der Expression NK-Zell-aktivierender Liganden auf differenzierten und undifferenzierten PSC

Dargestellt sind verschiedene Messungen aus rtPCR und Durchflusszytometrie

A NKG2D und Rae-1 rtPCR: n=3. FACS: NKG2D: Kontrolle (YAC-1: n=12), A3 (n=10), A3 differenziert (n=3); Rae-1: Kontrolle (YAC-1: n=17), A3 (n=17), A3 differenziert (n=3)

B Expression von CD155 auf undifferenzierten und differenzierten PSC. rtPCR: n=3. FACS: Kontrolle (YAC-1; n=17), A3 (n=12), A3 differenziert (n=3)

Es zeigte sich eine Abnahme der Bindung an NKG2D, die jedoch knapp nicht signifikant war ($p=0,058$; t-test). Die Reduktion der Expression von Rae-1 war in der Durchflusszytometrie nicht signifikant ($p=0,59$; t-Test), jedoch zeigte sich ein Trend in der rtPCR ($p=0,09$; t-Test). CD155 zeigte zwar eine durchschnittlich geringere Anzahl positiver Zellen, doch war die mittlere Fluoreszenzintensität der differenzierten Zellen höher als jene der undifferenzierten. In der rtPCR zeigte sich jedoch eine deutlich höhere relative Transkriptmenge der undifferenzierten Zellen sowohl gegenüber der Kontrollzelllinie als auch gegenüber der differenzierten Linie.

4 Diskussion

Stammzellen wecken als Modell für Medikamenten-Effekte und embryonale Entwicklung, vor allem aber als Quelle verschiedenster Gewebe große Erwartungen (Zimmermann 2011).

Während in den letzten Jahren Fortschritte im Hinblick auf die gerichtete Differenzierung und Gewebeintegration bei verschiedenen Stammzelllinien erreicht werden konnten, stellt die zeitgerechte Verfügbarkeit von patientenspezifischen, also bestenfalls kaum immunogenen, Stammzellen und ihrer Derivate ein nicht hinreichend gelöstes Problem dar. So konnte zuletzt von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) gezeigt werden, dass das Immunsystem eines syngenen Empfängers diese weitestgehend akzeptiert (Araki et al. 2013). Allerdings bleibt fraglich, ob die Zeit und die Kosten, welche für die Gewinnung, Reprogrammierung und Differenzierung von Stammzellen im Falle einer klinischen Anwendung benötigt würden, eine praktikable Anwendung erlauben.

Parthenogenetische Stammzellen (PSC) könnten Lösungen für einige dieser Problemfelder bieten. Sie weisen prinzipiell einen homologen Chromosomensatz auf, sodass die Variabilität ihres MHC-Lokus stark reduziert ist. Hochrechnungen besagen, dass nur wenige MHC-haploidentische Zelllinien genügen müssten, um den Großteil einer Bevölkerung mit immunkompatiblen Zellen versorgen zu können (Taylor et al. 2005, Nakajima et al. 2007). Der Aufbau von PSC-Banken könnte dementsprechend die zeitnahe Verfügbarkeit wenig immunogener Stammzellen deutlich vereinfachen.

Trotz der immunologischen Vorteile, die parthenogenetische Stammzellen demnach bieten könnten, existieren bisher nur wenige Studien, die sich mit den tatsächlichen Auswirkungen des Immunsystems auf PSC auseinandergesetzt haben. Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, Effektormechanismen von zytotoxischen T-Zellen (CTL) und Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) auf parthenogenetische Stammzellen zu untersuchen und einen Ausblick auf die immunologischen Eigenschaften ihrer differenzierten Derivate zu geben. Die für die Experimente eingesetzten PSC entstammten den murinen Linien A3 und A6, welche von einer Arbeitsgruppe um Michael Didié etabliert wurden (Didié et al. 2013). Die Zellen der Linie A3 wiesen einen homologen ($H2^{d/d}$), diejenigen der Linie A6 aufgrund eines Crossing-Overs einen heterologen MHC-Lokus ($H2^{b/d}$) auf.

Didié und Kollegen hatten zuvor nachweisen können, dass die untersuchten Zelllinien sich zu ekto-, ento- und mesodermalen Zellen (in vitro und in vivo) und im Vergleich zu embryonalen Stammzellen ebenso gut zu Kardiomyozyten differenzieren ließen. Diese waren nach Injektion in das Myokard adulter Mäuse in der Lage, sich funktionell zu integrieren (Didié et al. 2013).

4.1 Parthenogenetische Stammzellen und NK-Zellen

Um die Lysierbarkeit der PSC durch NK-Zellen zu quantifizieren, wurde der ⁵¹Chrom-Freisetzungstest eingesetzt. Als Kontrolle wurden YAC-1-Zellen eingesetzt, von denen eine gute Lysierbarkeit durch LAK-Zellen bekannt ist.

Es zeigte sich, dass die untersuchten PSC-Linien von LAK-Zellen sehr gut lysiert wurden, häufig sogar stärker als die Kontrollzelllinien (vgl. Abb. 3.2). Der Haplotyp der lysierenden Zellen wirkte sich dabei nicht signifikant auf die Lyse der Zielzellen aus. Es scheint demnach zunächst keinen Unterschied zu machen, ob die lysierenden Zellen die gleichen Allele für den MHC-Klasse-I-Lokus wie die untersuchten Zellen besitzen oder nicht.

Um zu überprüfen, ob die Lyse der Stammzellen tatsächlich durch NK-Zellen vermittelt wurde, führten wir die Experimente erneut mit aufgereinigten NK-Zellen durch (Abb. 3.3). Auch hier zeigte sich eine gute Lysierbarkeit der parthenogenetischen Linien.

Vergleicht man unsere Ergebnisse mit der bereits publizierten Literatur, fällt auf, dass verschiedene Arbeitsgruppen in Bezug auf die Lysierbarkeit von Stammzellen durch NK-Zellen zu teils sehr unterschiedlichen Ergebnissen gekommen sind (vgl. 1.3.4). So kam eine Arbeitsgruppe zu dem Schluss, dass sich murine embryonale Stammzellen (ESC) nicht durch aktivierte syngene oder allogene NK-Zellen lysieren ließen (Koch et al. 2008). In der Nachfolge wurden diverse Stammzelllinien hinsichtlich ihrer Lysierbarkeit durch NK-Zellen untersucht und bis dato zeigten sich die meisten Linien – ebenso wie die aktuell für diese Dissertation getesteten Zellen - gut von NK-Zellen lysierbar (vgl. z. B. Frenzel et al. 2009). Wie die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen zu erklären ist, bleibt letztlich unklar und bedürfte eventuell weiterer Testung der von Koch et al. untersuchten Zellen.

Didié et al. konnten zeigen, dass nach Injektion der untersuchten PSC in MHC-identische Empfänger (z. B. A3 (H2^{d/d}) in DBA-Mäuse (H2^{d/d})) und solche mit einem

fehlenden, aber nicht unterschiedlichen MHC-Genotyp (z. B. A3 (H2^{d/d}) in B6D2-Mäuse (H2^{b/d})), Teratome gebildet wurden, das Immunsystem der Empfänger die PSC also weitestgehend akzeptierte. Dementsprechend scheint die in dieser Arbeit in vitro nachgewiesene NK-Zell-Antwort nicht auszureichen, um eine Abstoßung der Zellen in vivo zu erreichen. Im Einklang hierzu stehen Ergebnisse, nach denen NK-Zellen in vivo zwar beispielsweise in der Lage waren, ein langsames Teratom-Wachstum zu verursachen, es letztlich jedoch nicht vollständig verhindern konnten (vgl. Tian et al. 2006; Dressel et al. 2010).

Eine mögliche Erklärung der guten Lysierbarkeit verschiedener Stammzelllinien durch NK-Zellen ist die geringe bis nicht messbare Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf ihren Oberflächen im Sinne der *missing-self*-Hypothese (Kärre 1985). Passend hierzu konnten wir durchflusszytometrisch keine Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf den Stammzelllinien zeigen (Abb. 3.4 und 3.5). Auch auf Ebene der mRNA konnten wir relativ zu den Kontrollzelllinien kaum Expression nachweisen (Abb. 3.6).

Zum anderen scheint die Expression von NK-Zell-aktivierenden Liganden eine Rolle zu spielen. In der Durchflusszytometrie zeigte sich eine Bindung des NK-Zell-aktivierenden Rezeptor NKG2D an die untersuchten PSC (Abb. 3.8A). Wir untersuchten die PSC dementsprechend auf die murinen NKG2D-Liganden Rae-1, Mult-1 und H60. Wir konnten zeigen, dass Antikörper gegen Rae-1 sowohl in der Durchflusszytometrie an die Stammzellen banden, wie auch dessen mRNA – im Vergleich zu den Kontrollzelllinien - vermehrt exprimiert wurde (vgl. Abb. 3.8B). Mult-1 und H60 wurden hingegen nicht exprimiert. Auch auf anderen Stammzelllinien sowie Zellen einer embryonalen Karzinomlinie (Dressel et al. 2008, Nomura et al. 1996) konnte Rae-1 als Ligand von NKG2D nachgewiesen werden. Wie bedeutend der Einfluss von Rae-1 bezüglich der NK-Zell-Lyse genau ist, ist noch nicht abschließend geklärt.

Neben Rae-1 konnten wir in Durchflusszytometrie und rtPCR CD155 und CD112 auf den beiden untersuchten parthenogenetischen Zelllinien nachweisen (Abb. 3.7). Beide Moleküle stimulieren über Interaktion mit CD226 (DNAM-1) die Aktivität von NK-Zellen und könnten so - wie auch Rae-1 - zur Lyse der PSC beigetragen haben. CD115 und CD112 wurden ebenfalls bereits auf anderen Stammzelllinien nachgewiesen (Dressel et al. 2010).

In der rtPCR zeigte sich zudem, dass die parthenogenetischen Stammzellen sowohl deutlich mehr mRNA von CD155 als auch von Rae-1 exprimieren als die jeweiligen Kontrollzelllinien, dennoch zeigte sich durchflusszytometrisch eine im Vergleich geringere Expression dieser Moleküle. Es wäre zu erwägen, ob die Stammzellen nicht im gleichen Maße wie die Kontrollzelllinien in der Lage sind, mRNA zu translatieren oder gebildete Moleküle an die Oberfläche der Zellen zu transportieren.

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass die Expression NK-Zell-aktivierender Liganden, insbesondere Rae-1 und CD155, sowie der Mangel an MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche der untersuchten Zellen die gute Lysierbarkeit der untersuchten Stammzelllinien bedingt.

4.2 Parthenogenetische Stammzellen und CTL

CTL erkennen andere Zellen über die Interaktion ihres T-Zell-Rezeptors mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Erkennen sie ein dort präsentiertes Antigen als körperfremd, lysieren sie die präsentierende Zelle.

Um die Lysierbarkeit der PSC durch zytotoxische T-Zellen (CTL) zu untersuchen, wurde ebenfalls der ⁵¹Chrom-Freisetzungstest eingesetzt.

Da die CTL-vermittelte Lyse in diesen Experimenten H2K^b-abhängig erfolgte, war davon auszugehen, dass Zellen der Linie A3, welche kein Gen für H2K^b besitzen, nicht lysiert werden konnten und tatsächlich zeigte sich hier keine Lyse der Zellen (Abb. 3.10). Die Zellen der Linie A6 wurden dagegen in geringem Maße lysiert, sodass es scheint, als könnten CTL PSC prinzipiell lysieren und die dafür notwendigen MHC-Klasse-I-Molekülen doch exprimieren.

Zwar konnten diese in der Durchflusszytometrie nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.4), doch wäre eine mögliche Erklärung, dass parthenogenetische Stammzellen MHC-Klasse-I-Moleküle in so geringem Maße exprimieren, dass sie durchflusszytometrisch nicht nachweisbar sind. Es ist bekannt, dass bereits eine sehr geringe Anzahl von MHC-Klasse-I-Molekülen genügt, um CTL zu aktivieren (Brower et al. 1994, Sykulev et al. 1996). Hiermit im Einklang stehen Experimente, bei denen verschiedene Stammzelllinien aus maGSC, ESC und iPSC trotz durchflusszytometrisch nicht nachweisbarer Expression von MHC-I-Molekülen durch aktivierte CTL in vitro lysierbar und dementsprechend nicht generell gegen CTL-vermittelte Lyse

geschützt waren (Dressel et al. 2009, vgl. auch Bonde und Zavazava 2006, Yachomovik-Cohen et al. 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass die allogene Abwehr von Stammzellen mit ihrer Infiltration durch CD4⁺- und CD8⁺-Zellen sowie Makrophagen einherging und dass das Teratom-Wachstum durch CTL unterbunden werden konnte, wenn diese durch APC aktiviert wurden (Wu et al. 2008). Dies unterstützt die Vermutung, dass CTL eine entscheidende Rolle in der Abwehr allogener Stammzellen spielen.

Um zu überprüfen, ob ein Anstieg der MHC-I-Moleküle auf den PSC ihre Lysierbarkeit beeinflusst, schlossen wir einige Experimente an. IFN- γ steigert die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf verschiedenen Zelllinien. Wir inkubierten die PSC über 48 h mit IFN- γ . Obwohl durchflusszytometrisch keine Steigerung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen gezeigt werden konnte, war ein leichter Anstieg der Lyse durch CTL aus OT-I-Mäusen (Abb. 3.11 und 3.12) zu messen.

Aufgrund der im Vergleich geringen Lysierbarkeit der parthenogenetischen Stammzellen im Vergleich mit anderen Stammzelllinien stellte sich die Frage, ob sie sich auf eine andere Art und Weise als durch die niedrige Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen vor CTL zu schützen vermögen. Bisher gab es einige wenige Publikationen, die nahelegten, dass sich einzelne Stammzelllinien durch Expression von SPI-6 (Serpinb9), TGF- β oder Arginase I gegen CTL schützen. Dies ließ sich bisher jedoch nicht auf andere Linien übertragen (Yachimovich-Cohen et al. 2010, Koch et al. 2008, Abdullah et al. 2007).

Wir untersuchten die Zellen mittels Westernblot und rtPCR auf die Expression dieser Moleküle. Es konnte jedoch keine Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.13), weshalb davon auszugehen ist, dass zumindest die untersuchten parthenogenetischen Stammzelllinien sich nicht durch deren Expression zu schützen vermögen. Inwiefern und ob PSC sich durch andere Mechanismen gegen CTL zu schützen vermögen, bleibt weiter zu untersuchen.

4.3 Differenzierte Derivate

Neben den Eigenschaften der Stammzelllinien selbst sind gerade für die Transplantationsmedizin ihre differenzierten Derivate von Interesse. Es stellte sich demnach die Frage, ob und inwiefern sich die Antwort der T- und NK-Zellen auf die

untersuchten Stammzelllinien im Laufe einer weiterführenden Differenzierung verändern würde.

Zur Gewinnung differenzierter Derivate der PSC wurden diese für 12 Tage in einem Differenzierungsmedium gehalten. Die Zellen wurden anschließend in der durchflusszytometrischen Analyse auf die Expression von SSEA-1 getestet, einem murinen Stammzellmarker, wobei es zu einer deutlichen Abnahme der Expression von SSEA-1 kam (vgl. Abb. 3.13).

Es ist bekannt, dass die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf anderen Stammzelllinien im Laufe ihrer Differenzierung ansteigt, wobei das Ausmaß dieser Zunahme in einzelnen Studien sehr unterschiedlich ausfiel (z. B. Drukker et al. 2002, v.d. Brink und Burakoff 2002, Frenzel et al. 2009). Es wird daher davon ausgegangen, dass CD8⁺-T-Zellen die Derivate im Laufe des Differenzierungsprozesses besser erkennen und deren Lyse vermehrt hervorrufen können (Nussbaum et al. 2007), während die Antwort der NK-Zellen im Einklang mit der *missing-self*-Hypothese typischerweise sinkt (Koch et al. 2006, Dressel et al. 2008, Frenzel et al. 2009).

Der Anstieg der Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle auf den partheno-genetischen Stammzelllinien fiel in den meisten durchflusszytometrischen Messungen nach 12 Tagen Inkubationszeit gering bis negativ aus (Abb.3.19). Dennoch kam es im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest zu einer deutlichen Reduktion der Lysierbarkeit durch NK-Zellen (Abb. 3.15 und Abb. 3.16), sodass davon auszugehen ist, dass bereits ein geringer Anstieg der MHC-I-Expression auf den Stammzellen genügte, um die PSC weitgehend vor NK-Zell vermittelter Lyse zu schützen (vgl. Kap. 4.2).

Ebenfalls einen Einfluss auf die Immunogenität der Zellen hat vermutlich die Tatsache, dass die Derivate andere Moleküle als ihre Vorläuferzellen exprimieren (z. B. Swijnenburg et al. 2005). Die durchschnittliche Bindung an NKG2D sank in unseren Experimenten in der Durchflusszytometrie ebenso wie die Expression von Rae-1 mit zunehmender Differenzierung. Auch die Expression von CD155 reduzierte sich. Diese - allerdings nicht signifikanten - Ergebnisse fanden sich auch in der rtPCR wieder (vgl. Abb. 3.20) und könnten die geringere Lyse differenzierter Derivate im Vergleich zu ihren Vorläuferzellen erklären.

Auffällig war, dass differenzierte Zellen der Linie A6 meist geringer lysiert wurden als die Zellen der Linie A3. Daher ließe sich überlegen, ob Zellen der Linie A6 anfänglich besser differenzierbar waren als die Zellen der Linie A3 (Abb. 3.15). Weiterführende

Experimente der Arbeitsgruppe um Didié zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Differenzierbarkeit (Didié et al. 2013).

Die Lysierbarkeit durch CTL stieg geringfügig, jedoch nicht signifikant (Abb. 3.18), was dem geringen Anstieg der MHC-Klasse-I-Expression geschuldet sein könnte. In diesem Fall wäre es sehr interessant, die Lysierbarkeit weiter differenzierter Derivate durch CTL zu untersuchen. Eventuell könnten differenzierte Derivate auch protektive Mechanismen gegen CTL aufweisen, wir konnten allerdings bei Überprüfung keine der vermuteten Protektionsmechanismen (z. B. durch SPI-1 oder Arginase) nachweisen.

5 Zusammenfassung

Parthenogenetische Stammzellen sind aus adulten Eizellen gewonnene Stammzellen. Ihr homologer Chromosomensatz könnte für die Einführung von Stammzellbanken ein entscheidender Vorteil sein. In der vorliegenden Arbeit haben wir untersucht, wie sich NK-Zellen und CTL auf parthenogenetische Stammzellen und deren Derivate in vitro auswirken.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass PSC sich ähnlich wie andere Stammzelllinien von NK-Zellen sehr gut und von CTL vergleichsweise gering lysieren lassen. Dies lässt sich am ehesten mit der geringen Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und der Expression einiger NK-Zell-aktivierender Liganden, insbesondere Rae-1 und CD155, erklären. Im Laufe der Differenzierung konnten wir nur eine geringe Steigerung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen zeigen, während die Zahl der NK-Zell-aktivierenden Liganden deutlich abnahm. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurden die differenzierten Derivate der Zellen deutlich geringer durch NK-Zellen lysiert als ihre Vorläuferzellen, der Anstieg der Lyse durch CTL war dagegen nur geringfügig ausgeprägt.

Parthenogenetische Stammzellen verhalten sich aus immunologischer Sicht somit weitgehend ähnlich wie andere Stammzelllinien. Für die Zukunft wäre eine weitergehende Untersuchung der differenzierten Derivate in Bezug auf ihre Lyse durch CTL, aber auch hinsichtlich der Relevanz von CD155 und Rae-1 bezüglich der NK-Zell-vermittelten Lyse undifferenzierter Zellen wünschenswert.

6 Literaturverzeichnis

Abdullah Z, Saric T, Kashkar H, Baschuk N, Yazdanpanah B, Fleischmann BK, Hescheler J, Krönke M, Utermöhlen O (2007): Serpin-6 expression protects embryonic stem cells from lysis by antigen-specific CTL. *J Immunol* 178, 3390-9

Ackerman AL, Cresswell P (2004): Cellular mechanisms governing crosspresentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* 5, 678-84

Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, Paz N, Koren-Michowitz M, Waldman D, Leider-Trejo Let al. (2009): Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 6, e1000029

Amit M, Itskovitz-Eldor J (2006): Feeder-free culture of human embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 420, 37–49

Anderson G, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ (1996): Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol* 14, 73-99

Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, Sugiura M, Ideno H, Shimada A, Nifuji A et al. (2013): Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature* 494, 100-4

Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA (2002): Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* 196, 493-503

Balakier H, Tarkowski AK (1976): Diploid parthenogenetic mouse embryos produced by heat-shock and Cytochalasin B. *J Embryol Exp Morph* 35, 25–39.

Ben-Hur T, Idelson M, Khaner H, Pera M, Reinhartz E, Itzik A, Reubinoff BE (2004): Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats. *Stem Cells* 22, 1246–55

Bernstein HS, Hyun WC (2012): Strategies for enrichment and selection of stem cell-derived tissue precursors. *Stem Cell Res Ther* 3, 17

Bevan MJ (1976): Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J Immunol* 117, 2233–8

Bhandoola A, Sambandam A (2006): From stem cell to T cell: one route or many? *Nat Rev Immunol* 6, 117-26

Bissonnette CJ, Lyass L, Bhattacharyya BJ, Belmadani A, Miller RJ, Kessler JA (2011): The controlled generation of functional basal forebrain cholinergic neurons from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 29, 802-11

Blum B, Benvenisty N (2009): The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. *Cell Cycle* 8, 3822–30

Bonde S, Zavazava N (2006): Immunogenicity and engraftment of mouse embryonic stem cells in allogeneic recipients. *Stem Cells* 24, 2192-201

- Bonnevie L, Bel A, Sabbah L, Al Attar N, Pradeau P, Weill B, Le Deist F, Bellamy V, Peyrard S, Ménard C et al. (2007): Transplantation 83, 333-5
- Brower RC, England R, Takeshita T, Kozlowski S, Margulies DH, Berzofsky JA, Delisi C (1994): Minimal requirements for peptide mediated activation of CD8+ CTL. Mol Immunol 31,1285–93
- Bryceson YT, Ljunggren HG, Long EO (2009): Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. Blood 114, 2657–66
- Bryceson YT, Chiang S, Darmanin S, Fauriat C, Schlums H, Theorell J, Wood S (2011): Molecular Mechanisms of Natural Killer Cell Activation. J Innate Immun 2011 3, 216-26
- Burshtyn DN, Shin J, Stebbins C, Long EO (2000): Adhesion to target cells is disrupted by the killer cell inhibitory receptor. Curr Biol 10, 777–80
- Buta C, David R, Dressel R, Emgård M, Fuchs C, Gross U, Healy L, Hescheler J, Kolar R, Martin U et al. (2013): Reconsidering pluripotency tests: do we still need teratoma assays? Stem Cell Research 11, 552-62
- Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, Gepstein A, Arbel G, Habib ICH, Gepstein L, Levenberg S (2007): Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. Circ Res 100, 263-72
- Chen Z, Liu Z, Huang J, Amano T, Li C, Cao S, Wu C, Liu B, Zhou L, Carter MG et al. (2009): Birth of parthenote mice directly from parthenogenetic embryonic stem cells. Stem Cells 9, 2136-45
- Christalla P (2010): Entwicklung von bioartifiziellem Herzgewebe aus parthenogenetischen Stammzellen der Maus. SUB Univ Hamburg EDiss 2011/4821
- Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, Cunniff K, Worst T, Green HL, Walker SJ, Gutin PH, Vilner L, Tabar V et al. (2002): Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. Science 295, 819
- Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K (2005): Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. Science 309, 1369–73
- Davis M, Boniface J, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, Chien Y (1998): Ligand Recognition by T Cell Receptors. Ann Rev Immunol 16, 523–44
- Deguine J, Breart B, Lemaitre F, Di Santo JP, Bousso P (2010): Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and CD8(+) T cells during tumor regression. Immunity 33, 632–44
- Didié M, Christalla P, Rubart M, Muppala V, Döker S, Unsöld B, El-Armouche A, Rau T, Eschenhagen T, Schwoerer AP et al. (2013): Parthenogenetic stem cells for tissue-engineered heart repair. J Clin Invest 123, 1285-98
- Draper JS, Pigott C, Thomson JA, Andrews PW (2002): Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. J Anat 200, 249

- Dressel R (2011): Effects of histocompatibility and host immune responses on the tumorigenicity of pluripotent stem cells. *Sem Immunopath* 33, 573-91
- Dressel R, Schindehütte J, Kuhlmann T, Elsner L, Novota P, Baier PC, Schillert A, Bickeböller H, Herrmann T, Trenkwalder C et al. (2008): The tumorigenicity of mouse embryonic stem cells and in vitro differentiated neuronal cells is controlled by the recipients' immune response. *PLoS One* 3, 2622
- Dressel R, Nolte J, Elsner L, Novota P, Guan K, Streckfuss-Bömeke K, Hasenfuss G, Jaenisch R, Engel W (2010): Pluripotent stem cells are highly susceptible targets for syngeneic, allogeneic, and xenogeneic natural killer cells. *FASEB J* 24, 2164–77
- Dressel R, Guan K, Nolte J, Elsner L, Monecke S, Nayernia K, Hasenfuss G, Engel W (2009): *Biol Direct* 4, 31
- Drukker M, Katchman H, Katz G, Even-Tov Friedman S, Shezen E, Hornstein E, Mandelboim O, Reisner Y, Benvenisty N (2006): Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells* 24, 221–9
- Drukker M, Katz G, Urbach A, Schuldiner M, Markel G, Itskovitz-Eldor J, Reubinoff B, Mandelboim O, Benvenisty N (2002): Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9864–9
- Eckardt S, Dinger T C, Kurosaka S, Leu NA, Müller AM, McLaughlin KJ (2008): In vivo and in vitro differentiation of uniparental embryonic stem cells into hematopoietic and neural cell types. *Organogenesis* 4, 33–41
- Erdö F, Buhle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Focking M, Kustermann E, Kolossov E, Hescheler J et al. (2003): Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 780–5
- Evans MJ, Kaufman MH (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-6
- Fändrich F, Lin X, Chai GX, Schulze M, Ganten D, Bader M, Holle J, Huang DS, Parwaresch R, Zavazava N et al. (2002): Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med* 8, 171-8
- Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT (2010): Regulation of human NK cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115, 2167–76
- Flodström-Tullberg M, Bryceson YT, Shi FD, Hoglund P, Ljunggren HG (2009): Natural killer cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 21, 634–40
- Frenzel LP, Abdullah Z, Kriegeskorte AK, Dieterich R, Lange N, Busch DH, Krönke M, Utermöhlen O, Hescheler J, Saric T (2009): Role of NKG2D-ligands and ICAM-1 in NK cell-mediated lysis of murine embryonic stem cells and embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells* 27, 307–16

- Fu RH, Wang YC, Liu SP, Huang CM, Kang YH, Tsai CH, Shyu WC, Lin SZ (2011): Differentiation of stem cells: strategies for modifying surface biomaterials. *Cell Transplant* 20, 37-47
- Gao GF, Jakobsen BK (2000): Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunol Today* 21, 630-6
- Garcia KC, Teyton L, Wilson IA. (1999): Structural basis of T cell recognition. *Annu Rev Immunol* 17, 369-97
- Glaser T, Opitz T, Kischlat T, Konang R, Sasse P, Fleischmann BK, Engel W, Nayernia K, Brüstle O (2008): Adult germ line stem cells as a source of functional neurons and glia. *Stem Cells* 26, 2434-43
- Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, Canto I, Giorgetti A, Israel MA, Kiskinis E et al. (2011): Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 63–7
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML (1999): The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-7
- Green JM, Noel PJ, Sperling AI, Walunas TL, Gray GS, Bluestone JA, Thompson CB (1994): Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* 1, 501-8
- Gregoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E, Walzer T (2007): The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 220, 169–82
- Grinnemo KH, Kumagai-Braesch M, Månsson-Broberg A, Skottman H, Hao X, Siddiqui A, Andersson A, Strömberg AM, Lahesmaa R, Hovatta O et al. (2006): Human embryonic stem cells are immunogenic in allogeneic and xenogeneic settings. *Reprod Biomed Online* 13, 712-24
- Grommé M, Neefjes J (2002): Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 39, 181-202
- Groscurth P, Filgueira L (1998): Killing Mechanisms of Cytotoxic T Lymphocytes. *News Physiol Sci* 13, 17-21
- Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G (2006): Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440, 1199-1203
- Guan K, Wagner S, Unsöld B, Maier LS, Kaiser D, Hemmerlein B, Nayernia K, Engel W, Hasenfuss G (2007): Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circ Res* 100, 1615-25
- Hassin D, Garber OG, Meiraz A, Schiffenbauer YS, Berke G (2011): Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology* 133, 190-6

- Hentze H, Soong PL, Wang ST, Phillips BW, Putti TC, Dunn NR (2009): Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res* 2, 198–210
- Hewitt EW (2003): The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology* 110, 163-9
- Ho PJ, Yen ML, Yet SF, Yen BL (2012): Current applications of human pluripotent stem cells: possibilities and challenges. *Cell Transplant* 21, 801-14
- Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H (1994): Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369, 31-7
- Kappler JW, Roehm N, Marrack P. (1987): T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49, 273–80
- Karabekian Z, Posnack NG, Sarvazyan N (2011): Immunological barriers to stem-cell based cardiac repair. *Stem Cell Rev* 7, 315-25
- Kärre K (1985): Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and a hypothesis. In: *Mechanisms of NK cell mediated cytotoxicity*. Academic Press Orlando, 81–91
- Kaufman MH, Robertson EJ, Handyside AH, Evans MJ (1983) Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 73, 249—61
- Kim K, Lerou P, Yabuuchi A, Lengerke C, Ng K, West J, Kirby A, Daly MJ, Daley GQ (2007): Histocompatible embryonic stem cells by parthenogenesis. *Science* 315, 482-6
- Klimanskaya I, Rosenthal N, Lanza R (2007): Derive and Conquer: sourcing and differentiating stem cells for clinical purposes. *Nat Rev Drug Discov* 7, 131-42
- Ko K, Arauzo-Bravo MJ, Tapia N, Kim J, Lin Q, Bernemann C, Han DW, Gentile L, Reinhardt P, Greber B et al. (2010): Human adult germline stem cells in question. *Nature* 465, E1
- Koch CA, Jordan CE, Platt JL (2006): Complement-dependent control of teratoma formation by embryonic stem cells. *J Immunol* 177, 4803–9
- Koch CA, Gerald P, Platt JL (2008): Immunosuppression by embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 89–98
- Kubiak J, Paldi A, Weber M, Maro B (1991): Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of the first meiotic cleavage with cytochalasin D. *Development* 111, 763–9
- Kuhn JR, Poenie M (2002): Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity* 16, 111-21
- Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S et al. (2007). Cardiomyocytes derived from human

embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature Biotech* 25, 1015–24

Lawrenz B, Schiller H, Willbold E, Ruediger M, Muhs A, Esser S (2004): Highly sensitive biosafety model for stem-cell-derived grafts. *Cytotherapy* 6, 212-22

Lee H, Shamy GA, Elkabetz Y, Schofield CM, Harrision NL, Panagiotakos G, Socci ND, Tabar V, Studer L (2007): Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem Cells* 25, 1931-9

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. (1996): CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14, 233-58

Lettau M, Schmidt H, Kabelitz D, Janssen O (2007): Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol Lett* 108, 10-19

Lieberman J (2003): The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3, 361-70

Lin H, Lei J, Wininger D, Nguyen MT, Khanna R, Hartmann C, Yan WL, Huang SC (2003): Multilineage potential of homozygous stem cells derived from metaphase II oocytes. *Stem Cells* 21, 152–61

Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, Antosiewicz-Bourget J, O'Malley R, Castanon R, Klugman S et al. (2011): Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 68–73

Long EO (2008): Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol Rev* 224, 70–84

Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J (1994): Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370, 650-2

Lui KO, Boyd AS, Cobbold SP, Waldmann H, Fairchild PJ (2010): A role for regulatory T cells in acceptance of ESC-derived tissues transplanted across an major histocompatibility complex barrier. *Stem Cells* 28, 1905–14

Ma T, Xie M, Laurent T, Ding S (2013): Progress in the reprogramming of somatic cells. *Circ Res* 112, 562-74

Mai Q, Yu Y, Li T, Wang J, Chen M, Huang S, Zhou C, Zhou Q (2007): Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts. *Cell Res* 17, 1008-19

Martin GR (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Procl Natl Acad Sci USA* 78, 7634-8

Martins-Taylor K, Xu RH (2012): Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 30, 22-7

Mistry AR, O'Callaghan CA (2007): Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology* 121, 439-47

Nakajima F, Tokunaga K, Nakatsuji N (2007): Human leukocyte antigen matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in the Japanese population for use in cell transplantation therapy. *Stem Cells* 25, 983-5

Nomura M, Zou Z, Joh T, Takihara Y, Matsuda Y, Shimada K (1996): Genomic structures and characterization of Rae1 family members encoding GPI-anchored cell surface proteins and expressed predominantly in embryonic mouse brain. *J Biochem* 120, 987-95

Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Asino A, Muskheli V, Pabon L, Reinecke H, Murry CE (2007): Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J* 21, 1345-57

Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S (2008): Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949-53

Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ (2008): Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877-86

Pawelec G (2004): Tumour escape from the immune response. *Cancer Immunol Immunother* 53, 843

Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH (2011): Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol* 89, 216-24

Puri MC, Nagy A (2012): Concise review: Embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells: the game is on. *Stem Cells* 30, 10-14

Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castellà M, Río P, Sleep E et al. (2009): Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460, 53-9

Revazova ES, Turovets NA, Kochetkova OD, Kindarova LB, Kuzmichev LN, Janus JD, Pryzhkova MV (2007): Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning Stem Cells* 9, 432-49

Rideout WM, Hochedlinger K, Kyba M, Daley GQ, Jaenisch R (2002): Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 109, 17

Robertson NJ, Brook FA, Gardner RL, Cobbold SP, Waldmann H, Fairchild PJ (2007): Embryonic stem cell-derived tissues are immunogenic but their inherent immune privilege promotes the induction of tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 20920-5

Rohwedel J, Sehlmeier U, Shan J, Meister A, Wobus AM (1996): Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution. *Cell Biol Int* 20, 579-87

Schwartz RH (2003): T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21, 305-34

Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ, Filice D, Muskheli V, Laflamme MA (2012): Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature* 489, 322-5

Sinai P, Roybal KT, Wülfing C (2010): Tentative and transient natural killer cell polarization balances the requirements for discriminatory recognition and cytolytic efficacy. *Commun Integr Biol* 3, 545-8

Stadtfield M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K (2008): Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945-9

Stinchcombe JC, Griffiths GM (2007): Secretory Mechanisms in Cell-Mediated Cytotoxicity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 495–517

Streckfuss-Bömeke K, Vlasov A, Hülsmann S, Yin D, Nayernia K, Engel W, Hasenfuss G, Guan K (2008): Generation of functional neurons and glia from multipotent adult mouse germ-line stem cells. *Stem Cell Res* 2, 139–54

Suárez-Alvarez B, Rodriguez RM, Calvanese V, Blanco-Gelaz MA, Suhr ST, Ortega F, Otero J, Cibelli JB, Moore H, Fraga MF et al. (2010): Epigenetic mechanisms regulate MHC and antigen processing molecules in human embryonic and induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 5, e10192

Swijnenburg RJ, Tanaka M, Vogel H, Baker J, Kofidis T, Gunawan F, Lebl DR, Caffarelli AD, de Bruin JL, Fedoseyeva EV et al. (2005): Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation* 112, 1166–72

Swijnenburg RJ, Schrepfer S, Cao F, Pearl JI, Xie X, Connolly AJ, Robbins RC, Wu JC (2008): In vivo imaging of embryonic stem cells reveals patterns of survival and immune rejection following transplantation. *Stem Cells Dev* 17, 1023–9

Sykulev Y, Joo M, Vturina I, Tsomides TJ, Eisen HN (1996): Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity* 4, 565–71

Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T (2001): Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11, 1553–8

Takahashi K, Yamanaka S (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–76

Taylor CJ, Bolton EM, Pocock S, Sharples LD, Pedersen RA, Bradley JA. (2005): Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet* 366, 2019-25.

Thomas RJ, Anderson D, Chandra A, Smith NM, Young LE, Williams D, Denning C (2009): Automated, scalable culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Biotechnol Bioeng* 102, 1636-44.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–7

- Tian X, Woll PS, Morris JK, Linehan JL, Kaufman DS (2006): Hematopoietic engraftment of human embryonic stem cell derived cells is regulated by recipient innate immunity. *Stem Cells* 24, 1370-80
- Topham NJ, Hewitt EW (2009): Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology* 128, 7-15
- Trinchieri G, Valiante N (1993): Receptors for the Fc fragment of IgG on natural killer cells. *Nat Immun* 12, 218-34
- Uchida T, Tomita Y, Anzai K, Zhang QW, Yoshikawa M, Kishihara K, Nomoto K, Yasui H (1999): Roles of CD4+ and CD8+ T cells in discordant skin xenograft rejection. *Transplantation* 68, 1721-7
- Van den Brink MR, Burakoff SJ (2002): Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol* 2, 273
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S (2008): Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9, 503–10
- Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA (2010): Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev* 235, 35-54
- Wajant H (2002): The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635-6
- Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R (2008): Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 5856-61
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-3
- Wu DC, Boyd AS, Wood KJ (2008): Embryonic stem cells and their differentiated derivatives have a fragile immune privilege but still represent novel targets of immune attack. *Stem Cells* 26, 1939–50
- Wulfing C, Purtic B, Klem J, Schatzle JD (2003): Stepwise cytoskeletal polarization as a series of checkpoints in innate but not adaptive cytolytic killing. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 7767–72
- Yachimovich-Cohen N, Even-Ram S, Shufaro Y, Rachmilewitz J, Reubinoff B (2010): Human embryonic stem cells suppress T cell responses via arginase I-dependent mechanism. *J Immunol* 184, 1300-8
- Ye L, Zimmermann WH, Garry DJ, Zhang J (2013): Patching the heart: cardiac repair from within and outside. *Circ Res* 113, 922-32
- Zimmermann WH (2011): Embryonic and embryonic-like stem cells in heart muscle engineering. *J Mol Cell Cardiol* 50, 320-6
- Zhang D, Pan L, Yang LH, He XK, Huang XY, Sun FZ (2005): Strontium promotes calcium oscillations in mouse meiotic oocytes and early embryos through InsP3

receptors and requires activation of phospholipase and the synergistic action of InsP3. *Human Reproduction* 20, 3053-61

Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y (2011): Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 13, 212-5

Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y et al. (2009): Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381-4

Danksagung

Insbesondere möchte ich Prof. Ralf Dressel für die freundliche Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die fortwährende Motivation während des gesamten Projektes danken.

Ebenso geht mein Dank an die Mitarbeiter im Labor – insbesondere an Leslie Elsner für die stete Unterstützung und Rat bei der praktischen Arbeit.

Dank auch der Abteilung für Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen und insbesondere Vijaykumar Muppala, der einen Teil der untersuchten Zellen zur Verfügung stellte.

Lebenslauf

Ich wurde am 17. August 1987 als erste Tochter von Hartmut Johannsen und Dagmar Derendorf geboren.

Bis 2006 besuchte ich das „Gymnasium am Kothen“ in Wuppertal und das „Colegio San Luis de Alba“ in Valdivia, Chile. 2007 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Georgia Augusta. Seit April 2014 befinde ich mich in der Weiterbildung zur Fachärztin für Innere Medizin.

Im Februar 2010 begann ich mit den Arbeiten an der vorliegenden Dissertation.